

Monica Skare
Else Røssevold Dyngeland
Pablo Gordo Sanchez

Hvilke preanalytiske faktorer kan påvirke analyse av laktat og glukose i frosset plasma fra laks, og kan analyse av glukose og laktat på Pentra C400 gi en indikasjon på stressnivå?

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Ann Kristin Tveten

Monica Skare
Else Røssevold Dyngeland
Pablo Gordo Sanchez

Hvilke preanalytiske faktorer kan påvirke analyse av laktat og glukose i frosset plasma fra laks, og kan analyse av glukose og laktat på Pentra C400 gi en indikasjon på stressnivå?

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Ann Kristin Tveten
Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å undersøke hvilke preanalytiske faktorer som kan påvirke analyse av laktat og glukose i frosset plasma fra laks, og om analyse av glukose og laktat på Pentra C400 kan gi en indikasjon på stressnivå. 49 frosne plasmaprøver fra laks ble brukt for å gjennomføre forsøket. Prøvene ble sortert visuelt etter hemolysegrad før de ble analysert på Pentra C400. Resultatene ble presentert i tabeller, og ved grafisk fremstilling. Ved hjelp av data fra tabellene ble det beregnet korrelasjonskoeffisient mellom glukose/laktat og hemolysegraden. Boksplott ble benyttet for å studere spredningen av glukose- og laktatverdier.

Resultatene ser ut til å indikere at det ikke er noen direkte sammenheng mellom glukose- og laktatverdier og hemolysegraden. Undersøkelsene tyder på at analyse av laktat på Pentra C400 kan gi en indikasjon på stressnivå. Analyse av glukose kan derimot ikke påvise en indikasjon på stressnivå i utgangspunkt i gitt prøvemateriale, og med de preanalytiske feilkilder som er oppgitt.

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet av tre studenter i forbindelse med avsluttende utdanning for studieretning bioingeniør, ved NTNU campus Ålesund – 2021.

I denne bacheloroppgaven analyseres frosset plasma tatt av laks i ulike stressituasjoner, der det blir fokusert på glukose og laktat. Det blir undersøkt om bruken av Pentra C400 er egnet til bruk av analysering av disse parameterne, og om preanalytiske faktorer vil ha en innvirkning på prøveresultatet.

Dette har vært en svært lærerik opplevelse, og vi har lært mye om denne måten å jobbe på, både med tanke på videre forskning og lab-arbeid.

Vi vil takke vår veileder Ann Kristin Tveten for et godt samarbeid og oppfølging under dette prosjektet. Og en stor takk til Heidi Engstrøm for all hjelp på lab.

Innhold

1.0. Innledning	3
1.1. Problemstilling	3
2.0. Teori	5
2.1. Laks	5
2.2. Velferd	6
2.3. Glukose	7
2.4. Laktat	7
2.5. Stress hos laks	8
2.6. Glukose og laktat som indikator på stress	10
2.7. Pentra C400 - Kolorimetrisk analyse av glukose og laktat	11
2.8. Kvalitetssikring av laboratoriemetoder	12
2.9. Preanalytiske feilkilder	13
2.9.1. Viskositet	13
2.9.2. Hemolyse	14
2.9.3. Koagel	15
2.9.4. Prøveutstyr	15
2.9.5. Triglyserider	16
2.10. Formler og statistiske grafer	16
3.0. Materialer og Metoder	18
3.1. Prøveinnsamling	18
3.2. Analyse av Glukose og Laktat på Pentra C400	18
3.3. Prosedyre for Laktat og Glukose	19
4.0. Resultat	20
5.0. Diskusjon	29
6.0. Konklusjon	32
7.0. Referanser	33
8.0 Vedlegg	36
8.1 Vedlegg 1. Pakningsvedlegg ABX Pentra Glucose HK CP	36
8.2. Vedlegg 2. Pakningsvedlegg ABX Pentra Lactic Acid	39

1.0. Innledning

Denne oppgaven ble valgt på bakgrunn av at vi ønsket en praktisk bacheloroppgave, som gikk i retning av forskning. Vi valgte denne oppgaven da den skilte seg litt ut med tanke på at det jobbes med laks i stressituasjoner, noe som vi i løpet av disse årene ikke har fokusert noe på. Likevel har vi vært innom de samme parameterne som måles; glukose og laktat, men innenfor humant materiale.

Vi fikk utdelt frosset plasma fra laks fra doktorgradstudent Jingwen Ding, samt informasjon om bakgrunn til materialet, som brukes i denne bacheloroppgaven.

Hensikten med denne oppgaven er å kunne teste ut bruken av frosset plasma fra laks, som har ulike preanalytiske faktorer, og ulike stressituasjoner, og dermed kunne undersøke om analyse på Pentra C400 er gjennomførbart, og vil kunne gi svar som er innenfor godkjente måleområder.

1.1. Problemstilling.

Vår problemstilling er: «*Hvilke preanalytiske faktorer kan påvirke analyse av laktat og glukose i frosset plasma fra laks, og kan analyse av glukose og laktat på Pentra C400 gi en indikasjon på stressnivå?*»

Vi vil undersøke om de preanalytiske faktorene som viskositet, hemolyse og koagel kan påvirke analysering av laktat og glukose på Pentra C400, og om det viser seg noen ulikheter med tanke på om prøvene er tatt før eller under stressituasjon. Metoden på Pentra C400 er allerede etablert, validert og evaluert for humane prøver, det må derfor utføres en evaluering for frosset plasma hentet fra laks. Dette gjøres ved å sortere prøvene etter hemolysegrad visuelt, og kommentar med eventuelt koagel eller unormal viskositet før analysering. Særlig viskositet er viktig ved bruk av Pentra C400.

De parameterne som vi har valgt å fokusere på i vår oppgave er glukose og laktat. Glukose er et karbohydrat som har en sentral rolle i dyrenes stoffskifte, mens laktat produseres fra glukose i en anaerob glykolyse når det ikke er tilstrekkelig med oksygen tilgjengelig for en aerob cellemetabolisme (1). Glukose og laktat er meget nyttige for å vurdere responsen på

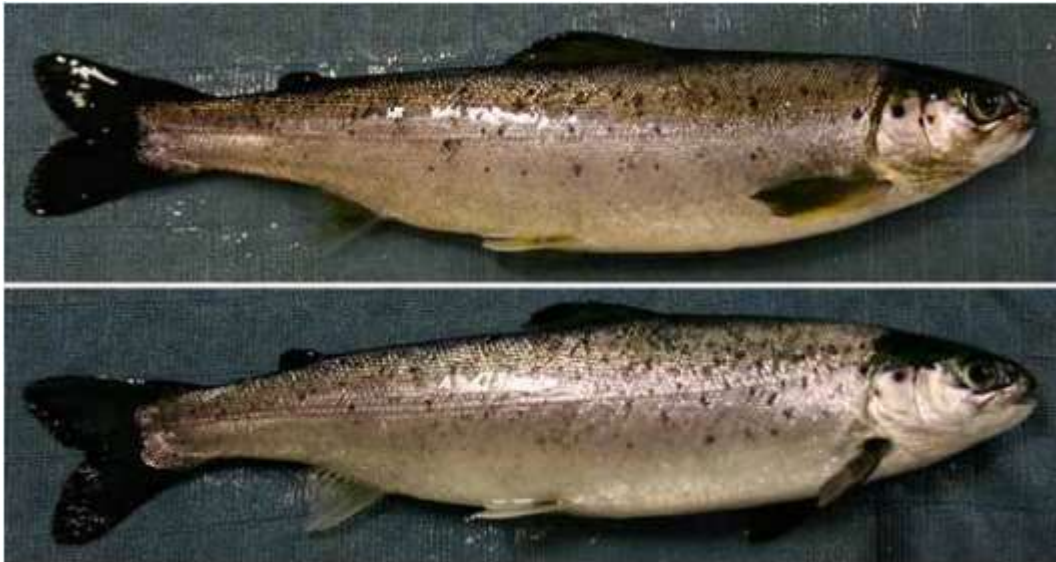
spesifikke stressorer, og vi vil derfor prøve å kunne kartlegge stressreaksjonen til fisken med bruk av disse parameterne (2).

For å kunne presentere resultatene vi kommer frem til blir det satt opp kurver til korrelasjon og boksploott for å studere sammenhengen mellom hemolyse og spredning.

2.0. Teori

2.1. Laks

Det finnes flere typer laks. Arten som finnes i Norge heter atlantisk laks, *Salmo salar*, og hører til familien *Salmonidae*. Den har en levetid på to til åtte år, og kan bli opptil 150 cm og 40 kg. Villaks starter livet i elven, hvor hunnen gyter i elvegrusen, og om våren klekkes eggene til plommeseckkyngel. Når yngelen har blitt fritt svømmende kommer den opp av grusen, og betegnes som parr. Parren blir i elven til den smoltifiserer, det vil si at den da gjennomgår en fysiologisk omstilling til livet i saltvann(3).



Bilde 1.0 Øvre bilde: En laks som ikke er ordentlig smoltifisert, det kan sees på gulaktig farge på gjellelokkene og området rundt brystfinnen. Nedre bilde: En helt smoltifisert laks (2).

Til tross for gode fiskeelver i Norge finnes over 94% av all voksen atlantisk laks (*Salmo salar*) innen akvakultur, det vil si oppdrett og dyrking av alle slags organismer i vann. Akvakultur som foregår i sjøen, kalles havbruk (4). Laks i oppdrett klekkes ut som plommeseckkyngel i ferskvann. Her bruker de åtte til 18 måneder på å utvikle seg til en smolt på cirka 100 gram. De blir da satt ut i store flytende innhegninger, merder, i sjøen. Det er viktig at det er god vanngjennomstrømning og gunstige miljøforhold som friskt og oksygenrikt vann, riktig vanntemperatur, saltinnhold og lys. Her vokser laksen til slaktevekt som er rundt tre til seks kg i løpet av tolv til 18 måneder (5).

Atlantisk laks, sjørøye og regnbueørret er de laksefiskene som hovedsakelig oppdrettes i Norge, og står for 97,5% av all fiskeoppdrett i Norge (4). Oppdrett av laksefisk har høy verdiskapning per årsverk. I 2018 hadde havbruk den fjerde høyeste verdien blant all næringsvirksomhet i landet, selv når oljenæringen var medregnet (6).

2.2. Velferd

Velferd hos laks, eller hos fisk generelt, er svært viktig og avgjørende for oppdrett av fisk. Dette gjelder både for selve dyreholdet, produksjonen og for forskning (7). For å kunne dokumentere fisken sin velferd blir det brukt velferdsindikatorer (VI) som et mål på fisken sin trivsel, egenskap eller atferd. De kan også være et mål på miljøet de oppholder seg i, eller ressursene de har tilgjengelig (2).

Velferd hos laks kan måles på mange måter (tabell 2.0), både ved å observere adferd og måling av fysiologiske indikatorer som glukose, laktat, kortisol og pH. Sistnevnte er målbare ved blodprøver. De subjektive indikatorene som adferd, helse, miljø og økonomi er ikke målbare ved blodprøver, men har likevel en stor og viktig rolle i å kartlegge velferd i fiskeindustrien.

Tabell 2.0 Ulike parametere som brukes for å kartlegge velferd:

Atferd	Helse	Miljø	Fysiologiske indikatorer (stressmålinger)	Økonomiske indikatorer
Direkte observasjoner som for eksempel svømming/bevegelse smønster	Sår og slitasje	Vannkvalitet: O ₂ , avfallsprodukter, temperatur, strømforhold	Glukose	Overlevelse/dødelighet
Aggresjon	Katarakt		Kortisol	Vekst
	Infisering med mark eller lakselus	Tetthet	Laktat	Daglig tilvekst
Utilstrekkelig/dårlig utført foring	Sykdom/dødelighet		Muskel pH	Produksjonskostnad
			Pre rigor tid	

				Superiorhandel
--	--	--	--	----------------

Stress fra korte og akutte hendelser som transport og håndtering vil kunne redusere atferden, og deretter livskvaliteten til laksen dersom det gjentas ofte. Dette igjen vil kunne påvirke gyteemne, appetitt, infeksjonsfare o.l. og dermed påvirke behovene på sikt (2).

I loven om dyre-velferd som ble publisert i 2009, omfatter forhold som påvirker velferden til både fisk og andre dyr. Her står det blant annet at fisken skal behandles godt, og ikke utsettes for unødige påkjenninger. Dyreholder skal sørge for at fisken blir ivaretatt, og at de blir håndtert av faglig kompetent personale. Driftsformer, metoder, utsyr og tekniske løsninger skal brukes med hensyn på dyrevelferd. Dette gjelder også når det er snakk om forsøk, undervisning og medisinsk virksomhet (8).

2.3. Glukose

Glukose er et karbohydrat som har en sentral rolle i dyrenes stoffskifte. Det løses lett i vann, og fraktes rundt i kroppen oppløst i blodet (9). Leveren og musklene lagrer glukose i form av glykogen, og hos fisk antas leveren å være det viktigste glykogendepotet for å regulere glukosekonsentrasjonen i blodet (10).

Stress er en energikrevende prosess som øker stoffskiftet. Glukose er et viktig drivstoff for metabolisme, og blir foretrukket som energi i stressresponsen. Visse vev hos fisk som for eksempel hjerne, hjerte og blodceller bruker hovedsakelig glukose som energikilde (1).

2.4. Laktat

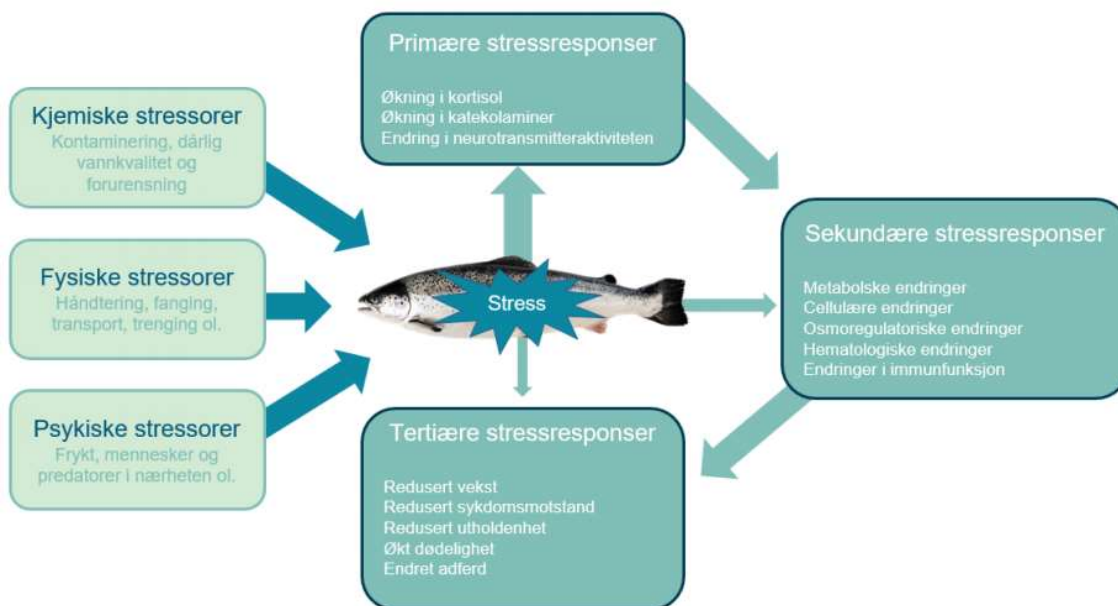
Laktat er et salt som består av melkesyrens anion. Det er et produkt av glykolysen i cellene når det ikke er tilstrekkelig med oksygen tilgjengelig for en anaerob ATP produksjon (2). Under forhold med for liten tilgang på oksygen bruker cellene denne måten for reoksidasjon av NADH og produksjon av ATP (11). Redusert oksygennivå i vann eller hard fysisk aktivitet kan hos fisk være årsak til en økende konsentrasjon av laktat i blodplasma (2).

Laktat kan også være et viktig substrat for glukoneogenese i fisk, og det blir muligens brukt til anaerobisk glukoneogenese i leveren (1). Plasmalaktat fra musklene blir oksidert i leveren eller omdannet til glukose ved glukoneogenese.

2.5. Stress hos laks

Stress hos laks er en biologisk respons på ulik stimulus, fra enten en intern eller en ekstern faktor. Dette kan for eksempel være kjemiske faktorer som grader i vannmiljøet, pH, O₂, CO₂ og lignende samt fysisk påkjenning som støy, transport, sykdom og lignende. Det kan også utløses som en reaksjon på miljøet, der frykt, predatorer og lignende er utløsende faktorer(stressorer) (12). Den fysiologiske reaksjonen på stress hos laks er at nervesignal fra HPI-aksen (Hypotalamus/ hypofyse/ interrenal-aksen) initierer en aktivering av de sympatiske fibrene, som videre utløser katekolaminer som adrenalin, noradrenalin og kortisol. Disse vil da diffundere inn i blodbanen (13). Slike stressorer fremkaller effekter som forstyrrer fiskens homeostase, og utløser ulike fysiologiske og psykiske responser. Slike reaksjoner trigger det man kaller «fight or flight»(14), som er en direkte reaksjon der det blir ubalanse i kroppens sentralnervesystem. Blodsirkulasjonen til skjelettmuskulaturen øker, glykogenlagrene i leveren vil reduseres og dermed øke innholdet av glukose ut til blodet, og blodsukknivået stiger. Lungene vil utvide seg for å øke tilgangen på mer oksygen, og redusert blodsirkulasjon til fordøyelsessystemet (15). Normale hvilenivåer av CA kan måles ved blodprøver av fisken, og ligger normalt på <5nM. Plutselige økninger i CA oppstår gjerne som respons etter at fisken utsettes for stressorer. Da kan nivåene komme opp i >1,000nM innen 1-3 min.(16). Dette kalles den «primære responsen» (17) og vil utløse den «sekundære responsen» , som vil føre til en rekke metabolske, cellulære, osmoregulatoriske og hematologiske endringer, samt immunologiske reaksjoner; Kortisol vil øke hjerterefrekvensen og gjelleoverflaten vil også økes, noe som gjør at oksygenopptaket stiger (12).

Plasmaglukose er en mye brukt indikator på sekundære stressresponser, da fisk mobiliserer substrater for å kunne håndtere økt behov for energi i stressituasjoner. Glukose er en veldig viktig del av dette mobiliseringsapparatet, og spesielt hjerne, hjerte, blodceller og nerver er avhengige av glukose til dette(1)



Figur 2.0: Inndeling av de fysiske, kjemiske og psykiske stressorene som påvirker fisk. Viser inndeling av primær, sekundær og tertiære responser (18).

De tertiære stressresponsene er irreversible og medfører fysiologiske og adferdsmessige endringer.

Tabell 2.1 Sympathetic-Adrenal Medullary Components of the Fight-or-Flight Response - Handbook of Stress Series Volume 1(15)

System	Fysisk effekt	Konsekvens av den fysiske effekten
Hjerte	Økt hjerterytme Utvidede hjerte blodkar	Øker blodsirkulasjonen Øker tilgang på O2 og energi til hjertemuskelceller
Sirkulasjon	Utvidede blodkar Sammentrekning av blodkar Milten trekker seg sammen	Økt tilgang på O2 til skjelettmuskel celler Tilrettelegger for tilgang på blod til skjelettmuskler og hjernen. Økt levering av O2 til metabolsk aktive celler.
Lunger	Utvidelse av bronkiene Økt pustefrekvens	Økt tilgang på O2 i blod
Lever	Øker omdanning av glykogen til glukose	Øker tilgangen på glukose til skjelettmuskulatur og hjerneceller

Stressrespons er en funksjon som hjelper fisken til å takle endringer i homeostasen, og er en naturlig og nødvendig reaksjon hos fisk. En kortvarig stressor kan føre til forbedret ytelse i fremtiden, bedre immunforsvar og bedre evne til å beskytte seg mot predatorer. Blir stressresponsen langvarig kan dette føre til redusert vekt, reproduksjonsevne, svekket immunforsvar, endret adferd og økt dødelighet (18, 19).

Ved å utsette fisken for stress, vil det føre til en rekke fysiologiske endringer;

- CRF, ACTH, kortisol, katekolaminer, serotoner/dopaminer, prolaktin, somatolaktin, stressproteiner, blodtrykk og hjerterate, glukose i blod, laktat og hematokrit, vil stige
- pH i blod, plasmaklorid og immunfunksjonen vil synke (20).

Stress over lang tid kan også føre til at kroppen tilpasser seg for å tåle den langvarige påkjenningen. Blodparameterne kan da «normaliseres» (21).

2.6. Glukose og laktat som indikator på stress

Stress hos fisk fører til økte konsentrasjoner av glukose i plasma. Frigjøringen av glukose i sirkulasjonen foregår etter aktivering av den primære stressresponsen via HPI-aksen ved utskillelsen av katekolaminer og kortisol ut i blodomløpet (2). Plasmanivået av katekolaminer øker relativt raskt og fører til økning i plasmaglukose via glykolysen. Leveren antas å være det viktigste glykogenlager hos fisk og mobilisering av glykogenlagrene i leveren under stress forårsaker plasma hyperglykemi (10). Frigjøring av kortisol hos dyr er mer langvarig og relativt forsinket i forhold til katekolamin, og fører til økning i plasmaglukose via glukoneogenese (22). Økningen i plasmaglukose etter stress medieres hovedsakelig via kortisol som stimulerer lever glukoneogenese (23).

Plasmaglukose er en mye brukt biomarkør for å studere den sekundære stressresponsen i fisk (1), men man må være forsiktig ved bruk av denne indikatoren. Ernæringsstatus er en faktor som kan ha en effekt i glukoseresponsen, og det skjer også variasjon mellom arter og utviklingsstadium (1, 22). Det er derfor viktig å standardisere organismer før stress undersøkelser (23). Plasmaglukose bør sammenlignes med ustresset fisk i stedet for noen standard stressnivåer. Det er foringsstatus, livsstadium og andre faktorer som bestemmer hvilke standard stressnivåer som kan brukes (2). I et stress forsøk med laks økte plasmaglukose langsomt etter eksponering for stressorer, og maks verdi ble nådd etter cirka tre til seks timer (2, 10). I sultet fisk kom nivået tilbake til utgangsnivået etter to timer og i

førede fisk forble nivået høyt i mer enn tolv timer etter stress på grunn av et høyere nivå av leverglykogen (2, 10).

Laktat produseres fra glukose i en anaerob glykolyse når det ikke er tilstrekkelig med oksygen tilgjengelig for en aerob cellemetabolisme. Plasma laktat øker når muskellaktat dannet under anaerobiose frigjøres til plasmaet (22). Det tar litt tid før økningen vises i plasma, og responsen er forsinket med noen timer (2). Plasma laktat øker kraftig etter høy muskelaktivitet og lufteksponering, men økningen er ikke så signifikant under vanlige stressfaktorer som transport og håndtering (2). Laktat blir også påvirket av generelle metabolske prosesser utenom stressresponsen, og det kan være vanskelig å bestemme standard stressnivåer (10, 22). Økningen i plasmalaktat etter en stressende hendelse toppe mellom en til to timer etter hendelsen. I de fleste tilfeller vil verdiene returnere til utgangsnivåene etter mellom seks og ti timer (10, 17).

Glukose og laktat er meget nyttige for å vurdere responsen på spesifikke stressorer. Disse er også billig og enkle å måle med bærbar instrumenter. Men hvileverdier kan være vanskelig å bestemme fordi nivåer påvirkes av metabolsk status (2).

2.7. Pentra C400 - Kolorimetrisk analyse av glukose og laktat

Pentra C400 analysemetodene for glukose og laktat baserer seg på kolorimetri. Kolorimetri, eller fotometri, er en kvantitativ, optisk metode for å bestemme et fargestoffs konsentrasjon basert på stoffets evne til å absorbere synlig lys. Kolorimetri utnytter Beer's lov, som sier at konsentrasjonen til en substans er direkte proporsjonal med mengden lys absorbert. Formelen er:

$$A = abc$$

A = absorbans, a = proporsjonalitets konstant definert som absorptivitet, b = lysvei i centimeter og c = konsentrasjon av det absorberende stoffet (24, 25).

Både glukose- og laktatanalysene er enzymatiske. Det blir da tilsatt reagenser med enzymer som reagerer kjemisk med prøvene, og det dannes farge. Fargens intensitet er proporsjonal med glukose-/ laktatmengden i prøven (26, 27)

2.8. Kvalitetssikring av laboratoriemetoder

Pentra C400 er beregnet for humant plasma, og metoden er vel etablert. Ved bruk av plasma fra andre arter må det vurderes hvordan et nytt prøvemateriale fungerer til denne metoden. Før en ny analysemetode tas i bruk på et laboratorium, må metoden enten valideres, verifiseres eller evalueres.

- Validering defineres slik: *Bekreftelse fra en undersøkelse og fremskaffing av objektive bevis på at spesielle krav for tilsiktet bruk er innfridd* (28). Gjelder ved innføring av ny målemetode eller endring av analysemetode, analyseutstyr eller andre større endringer.
- Verifisering innebærer å dokumentere at metoden fungerer som forventet i eget laboratorium. Det er en noe enklere undersøkelse enn validering, og er aktuell ved implementering av en ny målemetode/ målesystem hvor valideringsdokumentasjon foreligger eller ved mindre metodeendringer som kan tenkes å gi endret analysekvalitet.
- Ved evaluering undersøkes det samme som ved validering, men det settes ingen krav på forhånd. Aktuell ved blant annet publisering av en ny metode eller som ledd i utvikling av metode hos en produsent (28).

For en validering må flere sjekkpunkter gjennomgås, og det første som bør undersøkes er om det er et biologisk grunnlag for denne analysen. Altså om analytten endrer seg ved sykdom på en slik måte at analyseresultatet kan gi viktig informasjon om tilstanden. Det er da også viktig å ha kjennskap til biologisk variasjon. Det neste som må sjekkes er om metoden måler det den skal, at målingen er riktig og reproducerbar. Et annet viktig punkt er om undersøkelsen er nyttig, det vil si om resultatet kan bedre eller forenkle diagnostikk eller behandling. Denne nytten må stå i forhold til innsatsen, både organisatorisk og økonomisk, ved å utføre analysen. Preanalytiske kvalitetskrav må være avklart. Her må det undersøkes hvilken type prøvemateriale som skal benyttes og dets holdbarhet, samt om fremgangsmetoden er praktisk og anvendelig. Analytiske kvalitetskrav må være tilfredsstillende. Det er krav om presisjon, riktighet, linearitet, måleområde, deteksjonsgrense, analytisk spesifisitet, interferens, referanseintervall og sporbarhet (25, 28, 29).

- Presisjon: fordeling av gjentatte målingers resultater rundt gjennomsnittet. Her inngår repeterbarhet og reproducerbarhet. Repeterbarhet sjekkes over en kort periode med 10-15 prøver, mens måling av reproducerbarhet pågår i minst ett år med alle prøver.

- Riktighet: gjennomsnittet av den målte verdien er mest mulig lik «sann» verdi
- Linearitet: lineær sammenheng mellom størrelsen av det som skal måles og måleresultatet. Det lages da en fortynningsrekke av en prøve matrix som måles, og det undersøkes, enten visuelt eller statistisk, om resultatene endres proporsjonalt som forventet.
- Måleområde: målingen må ha en øvre og nedre kvantifiseringsgrense som alle kvalitetskrav havner innenfor
- Deteksjonsgrense: laveste detekterbare analyttkonsentrasjon
- Analytisk spesifisitet, interferens: analysemetoden er ikke nødvendigvis helt spesifikk for det stoffet den skal måle, men lar seg påvirke av beslektede substanser eller metabolitter av analytten. Andre komponenter som for eksempel lipider eller hemolyse kan interferere med målingen, og gi galt resultat.
- Referanseintervall: Vanligvis et intervall med 95% av verdiene hos friske personer (25, 28, 29).
- Sporbarhet: Begrep som brukes om å opparbeide en referanseverdi for en analytt for rutine metoder. Metoden baserer seg på en ubrutt kjede av sammenligninger av målinger (25).

2.9. Preanalytiske feilkilder

Det kan være en del preanalytiske feilkilder, og det bør alltid tas en kvalitetsvurdering av prøvematerialet før analysering. Det kan være faktorer som hemolyse, viskositet, koagel og prøveutstyr. Dette er faktorer som kan innvirke på resultatet.

2.9.1. Viskositet

Viskositet beskrives som seighet. Væsker med høy viskositet er mer tyktflytende enn væsker med lav viskositet (30). I blodplasma finnes blant annet proteiner, salter, metabolitter, aminosyrer og hormoner løst i vann (31). Plasma med høy viskositet inneholder flere av disse stoffene enn normalt plasma. Det kan gjøre at det ved spektrofotometriske og kolorimetriske målinger gir feil resultater på grunn av interferens.

2.9.2. Hemolyse

Hemolyse er ødeleggelse av cellemembranen på erythrocytter og andre blodceller, som fører til at cellekomponentene frigjøres til plasma. I erythrocyttene er det rikelig med hemoglobin, og etter frigjøring er det dette proteinet som gjør plasma eller serum rødt etter sentrifugering. Hemolyse blir synlig ved en konsentrasjon på 0,3 – 0,5 g/L av fritt hemoglobin. Det er den mest vanlige preanalytiske feilen og årsaken til prøveavvisning. Hemolyse kan imidlertid også gjelde andre komponenter enn hemoglobin, da alle typer blodceller kan lysere og frigjøre sine komponenter. I blodprøver som blir oppbevart kjølig vil småmolekylære komponenter, som for eksempel elektrolytter, diffundere ut av cellene. Det er to hovedårsaker til hemolyse: *in vivo* og *in vitro* hemolyse. *In vivo* hemolyse inntreffer inne i kroppen, før prøvetaking, og skyldes en patogen tilstand. Kun 3% av alle hemolyserte prøver skyldes *in vivo* hemolyse, så det er ikke så vanlig. *In vitro* hemolyse inntreffer utenfor kroppen grunnet forskjellige preanalytiske faktorer, som for eksempel blodprøvetaking, prøvehåndtering, distribusjon, lagring/ oppbevaring (25).

Hemolyse kan påvirke plasma/serum komponenter på to måter:

1. Økt tetthet i prøven på grunn av frigjøring av hemoglobin til omgivelsene.
2. Lekkasje av erythrocyttkomponenter, som er mer konsentrert inne i erythrocyttene enn i omgivelsene (plasma/serum) (25, 32). Denne lekkasjen vil gi falskt for høyt resultat for disse komponentene.

Hemolyse kan forårsake spektrofotometriske forstyrrelser fordi hemoglobin absorberer lys på enkelte bølgelengder (415, 540 og 570 nm), og kan gi både falskt for høyt og falskt for lavt resultat, avhengig av analytten og metoden.

Noen analytter, som for eksempel albumin, bilirubin, natrium og glukose har høyere konsentrasjon i plasma enn i erythrocyttene, så hemolyse vil da fortynne disse parameterne.

Hemolyse kan også føre til kjemisk interferens, spesielt innen immunokjemisk assay

In vivo hemolyse kan ikke forhindres, men *in vitro* hemolyse kan reduseres eller forhindres hvis de preanalytiske faktorene blir utført på riktig måte. Det er viktig med kvalifisert personell for riktig og skånsom prøvetaking, og som innehar kunnskap om hvordan prøvene skal behandles og oppbevares videre (25).

2.9.3. Koagel

Hvis prøven ikke blir blandet godt med antikoagulerende middel rett etter prøvetaking, vil det dannes koagel i prøven. Det kan gi interferens ved kolorimetrisk analyse, og dermed feil resultat. I tillegg vil koaglene samle celler og komponenter, så prøvene blir ikke representative for det faktiske innholdet.

2.9.4. Prøveutstyr

Riktig prøveutstyr er viktig for et godt analyseresultat. Prøveglass med feil tilsetning, eller uten tilsetning, kan ødelegge prøven. Til prøvene brukt i denne oppgaven ble det benyttet glass som var tilsatt natrium fluorid (NaF) og kaliumoksalat. Disse glassene blir benyttet for å hemme enzymsystemet som er involvert i glykolyse. Det er ikke ønskelig at det foregår glykolyse fordi det bryter ned blodglukosen. Hemmingen inntreffer ikke umiddelbart, så en del nedbrytning foregår den første timen etter prøvetaking. Uten denne tilsetningen ville nedbrytningen av blodglukose ha fortsatt med 100 mg/L per time ved 25°C (25).

Rask sentrifugering er også elementært når man jobber med blodprøver. Gelrør til analyse av serum-glukose skal sentrifugeres raskest mulig etter 30 min, og innen 1 time. Ved å sentrifugere blodprøven blir serum/ plasma separert fra blodcellene. Deretter inspiseres gelrøret etter sentrifugering, og det sees etter om gelen ligger som en kompakt barriere mellom blodlegemer og serum. For tidlig sentrifugering kan føre til hemolyse og fibrinrader i prøven. Mest utsatt er kalium, som da kan bli for høy og glukose som kan bli for lav(33).

Til laktat analysene benyttes ABX Pentra Lactic Acid. Her blir måleområdet 0,03 - 13,3 mmol/L oppgitt. Måleområdet utvides med automatisk fortynning fra 39,9 mmol/L.

Reagenslineariteten er vurdert opp til 13,3 mmol/L. Av interferenser oppgis blant annet at for hemoglobin er det ingen betydelig interferens observert opptil 290 µmol/L (500 mg/dL) og for triglyserider er det ingen interferens observert opptil 7 mmol/L (26).

Til glukose analysene benyttes ABX Pentra Glucose HK CP. Her er reagenslineariteten for serum og plasma bestemt som 0,11 mmol/L for lav linearitet og 50 mmol/L for høy linearitet. Måleområdet utvides med automatisk fortynning fra 150 mmol/L. Av interferenser oppgis blant annet at for hemoglobin er det ingen betydelig interferens observert opptil 290 µmol/L (500 mg/dL) og for triglyserider er det ingen interferens observert opptil 7 mmol/L (612,5 mg/dL) (27).

2.9.5. Triglyserider

Triglyserider er fettstoff og består av tre fettsyrer og glyserol. I blodet fraktes triglyseridene i kylomikroner (lipoproteiner) i plasmaet/serumet (34). Hvis det er høyt innhold av fett/ lipider (vanligvis over 600 mg/dL), kalles det lipemisk plasma/serum. Plasmaet/serumet blir da synlig blakket. Denne blakkingen kan påvirke absorbansen ved fotometrisk analysing, det kan gjøre at prøvesvarene blir enten for høye eller lave. Plasmavolumet kan bli fortrenget av lipemi (35). Plasma fra laksefisk kan inneholde varierende mengder lipider basert på diett, men verdiene er normalt innenfor; triglyserider 2,53 - 4.98 mmol og kolesterol 9.3-12-8 mmol (36).

2.10. Formler og statistiske grafer

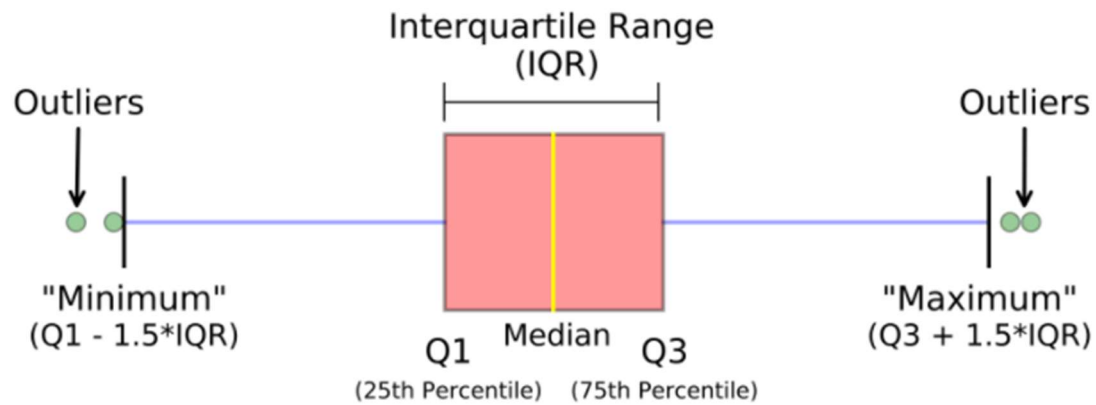
Et spredningsmål er et mål for spredningen av observasjonene i et observasjonsmateriale. De mest benyttede spredningsmål er varians og standardavvik. Empirisk standardavvik «s» er et mål for hvor stor spredningen er i forhold til gjennomsnittet. Den sier noe om hvor stor spredning (variasjon) det er i verdiene i et datasett (37).

Ligningen for «s» er $s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$ der \bar{x} er gjennomsnittet og n er utvalgsstørrelsen.

Korrelasjon betyr samsvar eller samvariasjon mellom variabler. Den lineære korrelasjonskoeffisienten «r» måler hvor sterk er den lineære sammenhengen mellom to datasett av to variabler x og y. Ligningen for «r» er $r = s_{xy} / s_x s_y$ der s_{xy} er empirisk kovarians og $s_x s_y$ er empirisk standardavvik for henholdsvis x-verdiene og y-verdiene.

Korrelasjonskoeffisienten «r» blir alltid et tall mellom -1 og 1. $r = 1$ betyr perfekt positiv korrelasjon, $r = -1$ betyr perfekt negativ korrelasjon og $r = 0$ betyr at det ikke er noen lineær sammenheng mellom datasettene (37).

En nyttig måte for å få oversikt over måledata er å lage et grafisk plot. Et boksplott er en standardisert måte å vise distribusjonen av data på, basert på femtall: "minimum", første kvartil (Q1), median (Q2), tredje kvartil (Q3) og "maksimum".



Figur 2.1: Deler av et boksploott

Området i boksen IQR (Interquartile Range) beregnes som $Q3 - Q1$ og det kalles spredningen. Utliggere (outliers) er verdier som er mindre enn $Q1 - 1,5 * IQR$ (minimum) eller større enn $Q3 + 1,5 * IQR$ (maximum) (38).

Et boksploott er nyttig når man sammenligner distribusjoner mellom mange grupper eller datasett. I tillegg indikeres verdiene som er avvikende (outliers), og dette gjør det enkelt å identifisere verdiene som er for langt fra gjennomsnittet.

3.0. Materialer og Metoder

3.1. Prøveinnsamling

Til forsøket ble det brukt natrium fluorid, kaliumoksalat glass (BD vacutainer/cat.nr.367921). Røret er sprayet innvendig med en forstøvet blanding av glykolysehemmer (natriumfluorid) og antikoagulant (kaliumoksalat) og blir brukt for å forhindre glykolyse (39).

Atlantisk laks ble avlivet før innsamling av prøvematerialet, og det er derfor ikke et krav om godkjenning fra mattilsynet ifølge Forsøksdyrforskriften § 16 annet ledd (40).

Prøvematerialet er ikke blitt brukt tidligere, men inngår i en forskningsstudie som undersøker anvendelsen av ikke-innvasive analysemetoder for stress, som også inkluderer analyse av kortisol.

Prøvene som er benyttet i denne oppgaven er blodprøver tatt av laks før og under avlusingsoperasjon, noe som er svært stressende og en stor påkjenning for laksen. Prøvene ble tatt 15.12.2019, og har vært dypfrost (-80°C) siden. Prøvene ble tint på is for skånsom tineprosess. Prøvene ble analysert innen 15 min etter at prøven er tint.

3.2. Analyse av Glukose og Laktat på Pentra C400

Pentra C400 ble brukt til å analysere glukose og laktat i NaFl/Kox plasma.. Dette er et kompakt helautomatisk benkinstrument som har stor kapasitet og brukes til rutine medisinsk biokjemi parametere i tillegg til spesialanalyser. Denne kan analysere ulike parametre som laktat og glukose, som gjort i denne oppgaven, men har stor fleksibilitet med hensyn til bruksområder.

For å gjennomføre en analyse på Pentra C400 trengs det et reagens som reagerer med det stoffet i prøven som man ønsker å måle konsentrasjonen av. Det trengs kalibratorer med kjent konsentrasjon, for å justere en analyse for best mulig riktighet, og det trengs kvalitetskontroller med kjent konsentrasjon. Pentra C400 kan kjøre spektrofotometri; kolorometri, UV, turbidimetri, latex-agglutinerings, og potensiometri – direkte (serum og plasma) og indirekte (urin) (41).

Analyse av glukose og laktat ble gjennomført i henhold til produsentens prosedyre (vedlegg 1 og 2).

3.3. Prosedyre for Laktat og Glukose

Diagnostisk reagens for kvantitativ *in vitro*-bestemmelse av melkesyre og glukose i plasma ved hjelp av kolorimetri(26).

Det ble først tillaget reagens etter brukermanual; ABX Pentra Acid (vedlegg 1 og 2), som deretter ble satt inn i Pentra C400. Kontroller på laktat (ABX Pentra N Control / ABX Pentra N MultiControl (A11A01653 / 1300054414) og glukose (ABX Pentra P Control / ABX Pentra P MultiControl (A11A01654 / 1300054415) analyseres gjennom samtidig som kalibratorer til laktat (ABX Pentra Multical (A11A01652) og glukose (ABX Pentra MultiCal, Ref. A11A01652).

Kontrollene aksepteres og prøvene blir tatt ut av fryser og tint opp på is. Etter nøye merking av prøveglass og nye microtainerne, ble 200µL prøvemateriale pipettert over i de nye, merkede microtainerne og satt inn i Pentra C400 for analysering.

Etter analysering ble de godkjente prøver fjernet fra raket, og de som var utenfor referanseområdet ble fortynnet: 50% fortynning: 200 µL plasma + 200 µL destillert vann. Deretter ble prosessen gjentatt for de prøver som fremdeles var utenfor referanseområdet. Disse fortynnes med 25 % fortynning: 100 µL 50% fortynnet prøve + 100 µL destillert vann. Disse ble satt i rack og analysert på nytt, før de godkjennes.

4.0. Resultat

Til dette forsøket ble det tatt 25 prøver av laks før selve stressituasjonen (B prøver) – avlusingen. Prøvene ble alle samlet på NaFl/Kox plasma glass, og det tok 226 minutter fra første til siste blodprøve var gjennomført. Under prosessen (U prøver) ble det tatt 24 prøver. Prøvene ble alle samlet på NaFl/Kox plasma glass, og det tok 230 minutter fra første til siste blodprøve er gjennomført. Alle prøvene ble analysert på Pentra C400. Etter første analyse på Pentra C400 ga analysering av glukose et godkjent resultat, der alle prøvesvar lå innenfor referanseområdet. Laktatanalysen lå over referanseområdet (måleområde: 0,3-13,3 mmol/L), og måtte derfor fortynnes og analyseres på nytt (merket med grønn i Tabell 4.0 og Tabell 4.2). Her ble det først brukt fortynning $\frac{1}{2}$ med 200ml prøvemateriale og 200 ml destillert vann. De prøvene som fremdeles lå utenfor referanseområdet ble fortynnet $\frac{1}{4}$ og analysert på nytt (Tabell 4.0). For å kunne gruppere prøvene etter hemolysegraden ble det benyttet en referanseinndeling (bilde 4.0).



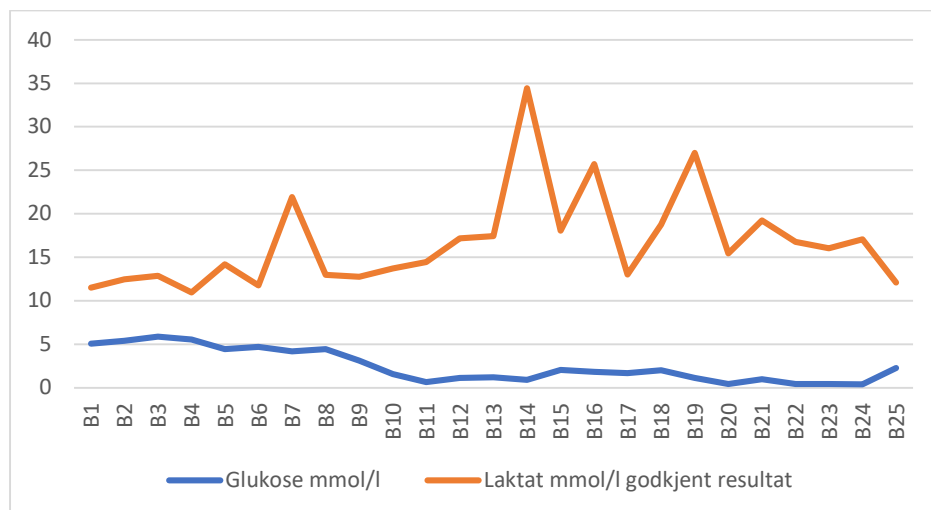
Bilde 4.0: Referanseinndeling på hemolysegrad

I tabellen nedenfor (tabell 4.0) vises B prøver kronologisk ordnet etter prøvetidspunkt. I første kolonne vises det prøvetidspunkt for prøvene der informasjonen var tilgjengelig. I kolonne “merknader” angis prøvene som har koagel eller er seige. Det vises også glukose verdier, laktat verdier uten fortynning, fortynnet laktat verdier, godkjente laktat verdier og hemolysegrad-verdier etter referanseinndeling (bilde 4,0).

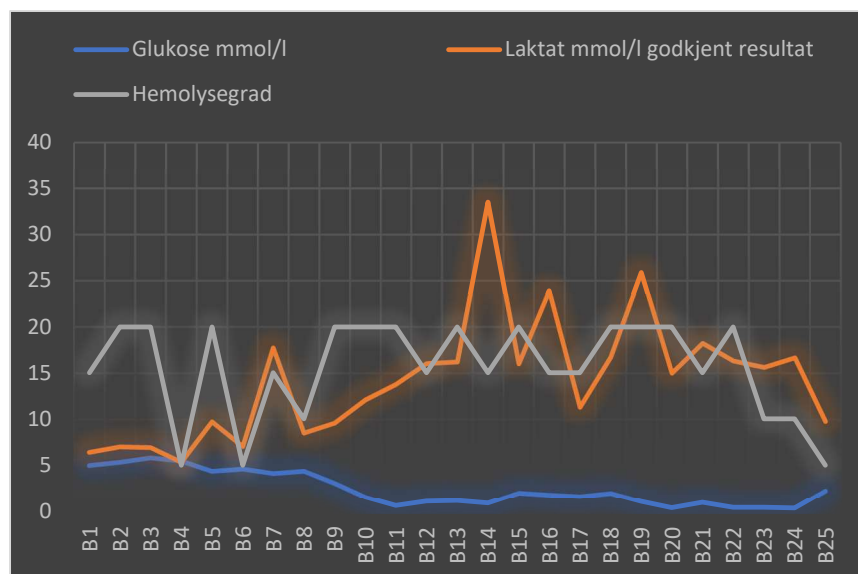
Tabell 4.0: Glukose, laktat og hemolysegrad – verdier for prøver tatt før stressituasjon (B prøver)

Prøve tids-punkt	Prøve	Merknad	Glukose mmol/L	Laktat mmol/L ikke fortyning	Laktat fortyning 1/2	Laktat fortyning 1/4	Laktat mmol/L godkjent resultat	Hemolyse grad
	B1		5,04	6,46757			6,46757	høy
	B2		5,39	7,06952			7,06952	veldig høy
	B3	koagel	5,88	6,98625			6,98625	veldig høy
	B4		5,54	5,41505			5,41505	Lav
	B5		4,42	9,75813			9,75813	veldig høy
11:51	B6		4,67	7,08601			7,08601	Lav
	B7		4,17	13,42897	8,88013		17,76026	høy
12:12	B8		4,43	8,54446			8,54446	middels
	B9		3,11	9,64404			9,64404	veldig høy
	B10		1,57	18,11618	6,06738		12,13476	veldig høy
	B11		0,64	14,00874	6,90114		13,80228	veldig høy
	B12	seig	1,12	16,02118	8,02009		16,04018	høy
	B13	seig	1,19	16,53408	8,10865		16,2173	veldig høy
13:43	B14		0,91	30,89069	16,27143	8,38426	33,53704	høy
	B15		2,03	15,24831	8,01544		16,03088	veldig høy
14:00	B16		1,81	23,27502	11,94973		23,89946	høy
	B17		1,66	11,3372			11,3372	høy
	B18		2	16,17786	8,3739		16,7478	veldig høy
14:37	B19		1,11	25,17339	12,94751		25,89502	veldig høy
15:55	B20		0,41	14,5334	7,50669		15,01338	veldig høy
	B21		0,98	19,19333	9,12666		18,25332	høy
	B22		0,42	17,17098	8,17019		16,34038	Ekstrem høy
	B23		0,42	19,98506	7,81128		15,62256	middels
	B24		0,38	18,20269	8,33629		16,67258	middels
	B25		2,26	9,81711			9,81711	Lav

Figur 4.1 er en grafisk fremstilling av glukose og laktatverdier på prøver tatt før stressituasjon. Figur 4.2 viser hvordan til analysesvar er koblet til hemolysegraden. Grafene er basert på analyseresultat for glukose og laktat fra Pentra C400 (Tabell 4.0)



Figur 4.1: Glukose og laktat verdier for B prøver. Prøvene er ordnet etter prøvetidspunkt



Figur 4.2: Glukose, laktat og hemolysegrad verdier for B prøver. Prøvene er ordnet etter prøvetidspunkt

Det ble laget en tabell (tabell 4.1) der både B prøver og U prøver ble sortert sammen etter hemolysegrad ved hjelp av referanseinndeling (Bilde 4.0). Hensikten er å bruke denne

tabellen senere for å kunne analysere hvordan glukose og laktat verdier oppfører seg i hver gruppe.

Tabell 4.1: Sortering av hemolysegrad av prøver tatt før og under

Hemolysegrad	B Prøver	U Prøver	Grader
Lav	4,6,25	4	5
middels	8,23,24	2,3,11,12,13,14,15,19,20,21,22,23,24	10
høy	1,7,12,14,16,17,21	1,5,9,10,16,17,18	15
veldig høy	2,3,5,9,10,11,13,15,18,19,20	6,7,8	20
Ekstrem høy	22		25

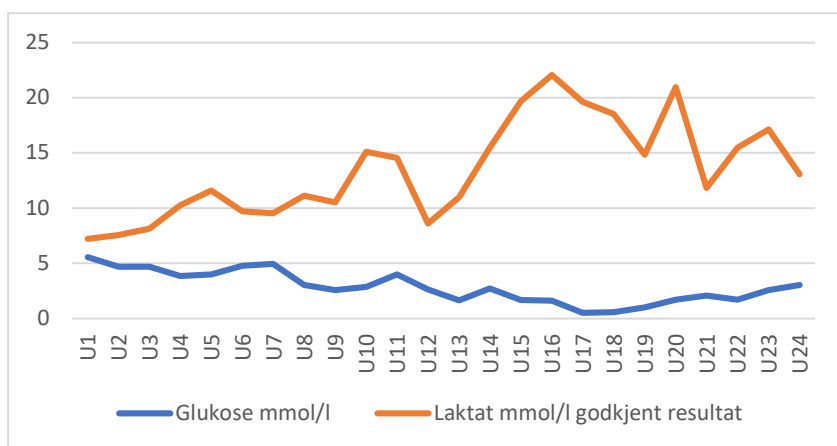
I tabellen nedenfor (tabell 4.2) vises U prøver kronologisk ordnet etter prøvetidspunkt. I første kolonne vises det prøvetidspunkt for prøvene der informasjonen var tilgjengelig. I kolonne “merknader” angis prøvene som har koagel eller er seige. Det vises også glukose verdier, laktat verdier uten fortynning, fortynnet laktat verdier, godkjente laktat verdier og hemolysegrad-verdier etter referanseinndeling (bilde 4,0).

Tabell 4.2: Glukose, laktat og hemolysegrad – verdier for prøver tatt under stressituasjon.

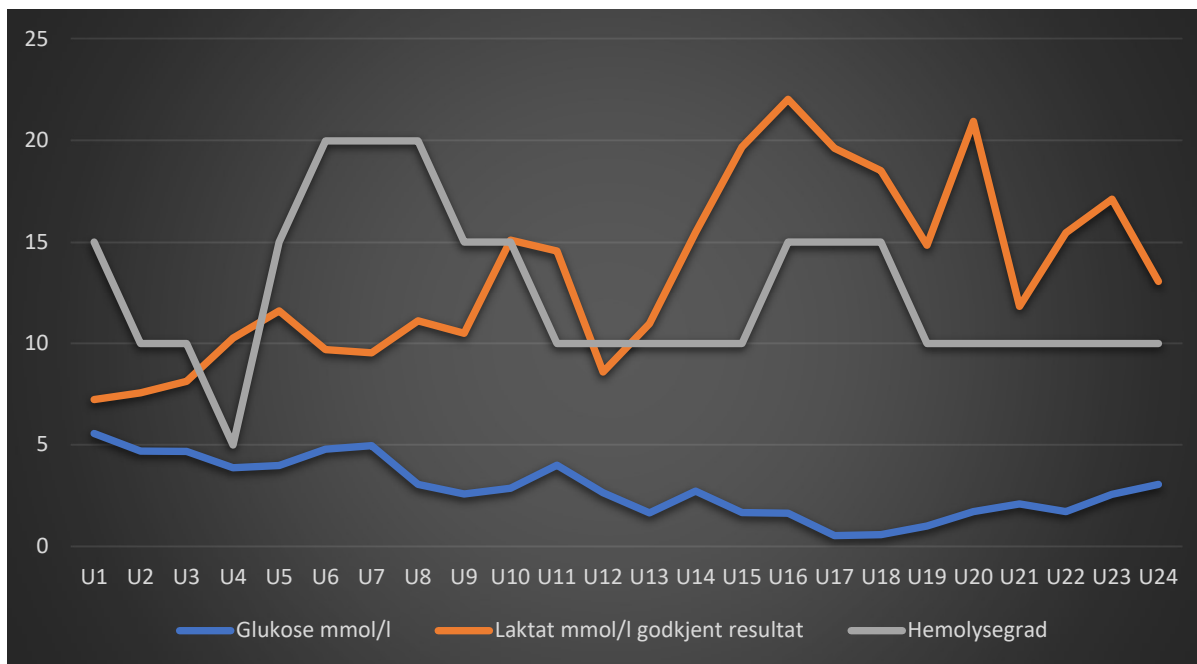
Prøvetids punkt	Prøve	Merknad	Glukose mmol/L	Laktat mmol/L ikke fortynning	Laktat fortynning 1/2	Laktat mmol/L godkjent resultat	Hemolyse grad
	U1		5,57	7,23002		7,23002	høy
	U2		4,69	7,55722		7,55722	middels
17:50	U3		4,68	8,13683		8,13683	middels
	U4		3,86	10,25662		10,25662	Lav
	U5	Litt seig	3,98	11,5978		11,5978	høy
	U6		4,78	9,68835		9,68835	veldig høy
	U7		4,96	9,53185		9,53185	veldig høy
	U8		3,05	11,11504		11,11504	veldig høy
	U9		2,58	10,50342		10,50342	høy
19:02	U10		2,85	15,35805	7,54489	15,08978	høy

	U11		4	14,8971	7,27589	14,55178	middels
	U12		2,63	8,58706		8,58706	middels
	U13		1,64	10,97369		10,97369	middels
19:44	U14		2,72	15,82514	7,73406	15,46812	middels
20:00	U15		1,66	19,56606	9,83963	19,67926	middels
	U16		1,62	21,63612	11,02407	22,04814	høy
20:20	U17		0,53	19,54055	9,80907	19,61814	høy
	U18		0,57	18,4413	9,25702	18,51404	høy
	U19		1	14,81508	7,42107	14,84214	middels
	U20		1,7	20,71043	10,47834	20,95668	middels
	U21		2,08	16,18349	5,91227	11,82454	middels
	U22		1,71	16,94268	7,72952	15,45904	middels
	U23		2,56	19,62747	8,55963	17,11926	middels
	U24		3,05	15,0922	6,52709	13,05418	middels

Ved hjelp av data fra tabellen ovenfor ble det satt opp en kurve som representerer glukose og laktatverdier på prøver tatt under stressituasjon (Figur4 .3) og en kurve der også hemolysegraden er inkludert. (Figur 4.4)



Figur 4.3: Glukose og laktat verdier for U prøver. Prøvene er ordnet etter prøvetidspunkt



Figur 4.4: Glukose, laktat og hemolysegrad verdier for U prøver. Prøvene er ordnet etter prøvetidspunkt

Ved data fra tabellen 4.0 og 4.2 ble de beregnet korrelasjonskoeffisienten mellom glukose og hemolysegraden og mellom laktat (godkjente resultater) og hemolysegraden. Resultatene vises i tabell 4.3.

Tabell 4.3 Korrelasjonskoeffisienten mellom glukose og hemolysegraden, og mellom laktat og hemolysegraden for B og U prøver.

	Korrelasjonskoeffisienten	
	Glukose/hemolyse	Laktat/hemolyse
B prøver	-0,198	0,223
U prøver	0,200	-0,084

Ved hjelp av data fra tabell 4.0, 4,1 og 4,2 ble det laget nye tabeller for å evaluere påvirkning av hemolysegraden i spredningen av glukose verdier (Tabell 4.4) og laktat verdier (tabell 4.5). Disse tabellene ble også brukt for å grafikere glukose boksploott (Figur 4.5) og laktat boksploott (Figur 4.6).

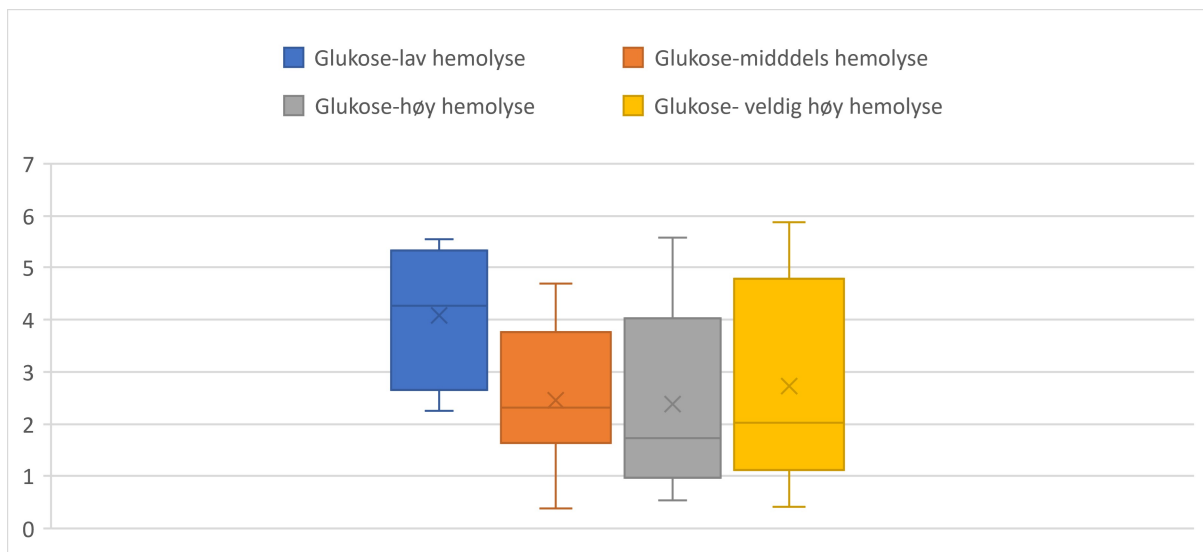
Tabellen nedenfor (tabell 4.4) viser glukose verdier for B og U prøver som er grupper sammen etter hemolysegraden. Det er beregnet for hver gruppe første kvartil, tredje kvartil, differansen mellom tredje og første kvartil (IQR), gjennomsnitt, median og standardavvik.

Tabell 4.4: Oversikt over glukoseverdi og hemolysegrad

GLUKOSE	Glukose-lav	Glukose-middels	Glukose-høy	Glukose- veldig høy
	hemolyse	hemolyse	hemolyse	hemolyse
	5,54	4,43	5,04	5,39
	4,67	0,42	4,17	5,88
	2,26	0,38	1,12	4,42
	3,86	4,69	0,91	3,11
		4,68	1,81	1,57
		4	1,66	0,64
		2,63	0,98	1,19
		1,64	5,57	2,03
		2,72	3,98	2
		1,66	2,58	1,11
		1	2,85	0,41
		1,7	1,62	4,78
		2,08	0,53	4,96
		1,71	0,57	3,05
		2,56		0,42
		3,05		

1 kvartil	2,7	1,6	1,0	1,1
3 kvartil	5,3	3,8	4,0	4,8
Differanse 3-1 kvartil	2,7	2,1	3,1	3,7
Gjennomsnitt	4,1	2,5	2,4	2,7
Median	4,3	2,3	1,7	2,0
Standardavvik	1,4	1,4	1,7	1,9

Ved bruk av data fra tabellen ovenfor ble det satt opp en boksplott (figur 4.5) som representerer glukose verdier med ulike hemolysegrad.



Figur 4.5: Boksplott. Glukose verdier med forskjellige hemolysegrad

Tabellen nedenfor (tabell 4.5) viser laktat verdier for B og U prøver som er grupper sammen etter hemolysegraden. Det er beregnet for hver gruppe første kvartil, tredje kvartil, differansen mellom tredje og første kvartil (IQR), gjennomsnitt, median og standardavvik.

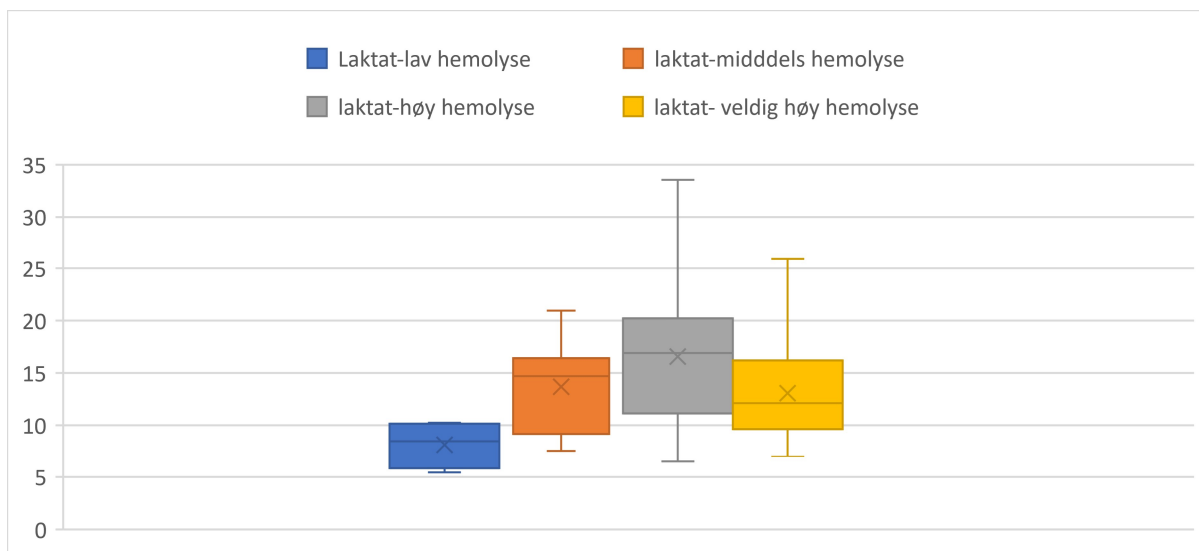
Tabell 4.5: Oversikt over laktatverdi og hemolysegrad

LAKTAT	Laktat-lav hemolyse	Laktat-middels hemolyse	Laktat-høy hemolyse	Laktat- veldig høy hemolyse
	5,41505	8,54446	6,46757	7,06952
	7,08601	15,62256	17,76026	6,98625
	9,81711	16,67258	16,04018	9,75813
	10,25662	7,55722	33,53704	9,64404
		8,13683	23,89946	12,13476
		14,55178	11,3372	13,80228
		8,58706	18,25332	16,2173
		10,97369	7,23002	16,03088
		15,46812	11,5978	16,7478
		19,67926	10,50342	25,89502
		14,84214	15,08978	15,01338

		20,95668	22,04814	9,68835
		11,82454	19,61814	9,53185
		15,45904	18,51404	11,11504
		17,11926		16,34038
		13,05418		

1 kvartil	5,8	9,2	11,1	9,6
3 kvartil	10,1	16,4	20,2	16,2
Differanse 3-1 kvartil	4,3	7,2	9,1	6,6
Gjennomsnitt	8,1	13,7	16,6	13,1
Median	8,5	14,7	16,9	12,1
Standardavvik	2,3	4,1	7,2	4,9

Ved hjelp av data fra tabellen ovenfor ble det satt opp en boksplott (figur 4.6) som representerer laktat verdier med ulike hemolysegrad.



Figur 4.6: Boksplott. Laktat verdier med forskjellig hemolysegrad

5.0. Diskusjon

Målet med denne oppgaven er å finne ut hvordan preanalytiske faktorer som hemolyse, viskositet og koagler påvirker måling av glukose og laktat ved bruk av frosset plasma fra laks hvor man forventer at gruppen før avlusing har lavere stressnivå enn gruppen under avlusing.

Vil graden av hemolyse kunne påvirke analysesvaret på Pentra C400, og er da denne analysemetoden egnet til bruk av analysering av glukose og laktat i prøver tatt av laks?

49 frosne plasmaprøver ble brukt for å gjennomføre forsøket. 25 prøver ble tatt av laks før en stressituasjon, mens 24 prøver ble tatt under selve stressituasjonen. Etter analysering på Pentra C400 ble prøvene gruppert etter hemolysegrad. Det ble funnet at de fleste prøvene hadde laktatnivå som var høyere enn maskinens måleområde, de måtte derfor fortynnes for å få et målbart resultat (tabell 4.0 og 4.2).

For å kunne se hvordan hemolyse påvirker måling av glukose og laktat ble prøvene sortert etter hemolysegraden og tildelt en numerisk verdi til hver hemolysegrad. Det ble laget 5 grupper fra lav hemolyse til ekstrem høy hemolyse (tabell 4.1). Sortering ble gjort visuelt ved hjelp av en referanseinndeling (bilde 3.0).

Først ble kurvene som representerer glukose, laktat og hemolysegrad før stressituasjon (figur 4.2) og under selve stressituasjon, satt opp (figur 4.4). Det sees på figuren at det ikke ser ut til å være noen korrelasjon mellom glukose og hemolysegraden og mellom laktat og hemolysegraden. Korrelasjonskoeffisienten mellom både glukose og hemolysegraden, og mellom laktat og hemolysegraden, er også ganske lav, både til B prøver og U prøver (tabell 4.3)

Boksplokk ble så brukt for å studere om det finnes sammenheng mellom hemolyse og spredning. Tabell 4.5 og 4.6 viser henholdsvis glukose og laktat verdier til både B og U prøver sortert i grupper etter hemolysegraden.

Glukose boksplokk (figur 4.5) viser at spredningen øker når hemolysegraden øker fra middels til veldig høy. Dette viser også tabell 4.4, her øker både differansen mellom 3. og 1. kvartil (IQR) og standardavvik. Men resultatet er litt inkonsekvent fordi spredningen går ned fra lav hemolyse til middels hemolyse. Både middelværdi og median går ned når hemolysen øker fra lav til høy, før de stabiliserer seg.

Laktat boksploott (figur 4.6) viser at spredningen øker når hemolysegraden går fra lav til høy, før spredningen går ned igjen. Tabellen 4.5 viser også at både differansen mellom 3. og 1. kvartil og standardavvik øker. Middelerverdi og median følger samme trenden. De går opp når hemolysen øker fra lav til høy, før de går ned.

Et viktig poeng å huske på når man vurderer effekten av hemolyse på måling av glukose- og laktat, er effekten av biologisk variasjon. Det finnes ikke informasjon om hva som er den biologiske variasjonen i laks for glukose og laktat. Denne variasjonen kan være veldig stor, noe som kan vanskeliggjøre vurdering av resultater. Den metabolske statusen til hver enkelt fisk har også en avgjørende rolle i glukose- og laktatverdier. Det er ukjent om fiskebestanden hadde blitt matet på samme måte og den var relativt homogen, eller om tvert imot fiskene hadde veldig forskjellige metabolske statuser.

Når det gjelder laktatnivået hos laks før stress, uten å ta hensyn til feilkilder, ble det antatt at det ville være lavere enn under selve stressituasjonen, siden laktatnivået er forventet å øke under stress. Ifølge teorien er det også antatt at det vil bli en gradvis økning som når toppunkt etter cirka to timer, før nivået gradvis synker igjen. Her ble det funnet noe interessant, som figur 4.2 og 4.4, samt tabell 4.0 og 4.2 viser. Laktatnivået hos de to gruppene er noenlunde like ved start, og hos begge gruppene blir det en gradvis økning, før det igjen begynner å synke litt. Sammenlignes det med tidspunktene for prøvetaking, kan det sees at toppene er nådd etter cirka to timer hos begge gruppene, før det begynner å synke igjen. Det kan vise at laksene ble stresset av selve prøvetakingen. Laksen merket at noe var i ferd med å skje, og at den ene laksen etter den andre ble fjernet. For U-gruppen var nivået litt høyere i starten enn for B-gruppen, men ikke så mye som først forventet. Det kan skyldes at laksen hadde vært så lenge stresset på grunn av avlusingen, at den hadde nedregulert stressresponsen for å overleve, som beskrevet i teorien. Prøvetakingen stresset den så på nytt.

Forventningen til glukosenivået hos laksen, uten å ta hensyn til feilkilder, var at det skulle stige ved stress. Glukosenivået antas å stige langsomt under stress, før det når toppen etter tre til seks timer. Også her starter begge gruppene på ganske likt nivå, men istedenfor gradvis økning, synker nivåene gradvis og forsiktig. For B-gruppen blir det en avflating av kurven etter cirka 1,5 time, mens det for U-gruppen blir en liten bunn etter cirka tre timer, før den stiger igjen. Det er altså ingen topp etter tre timer, som teorien antyder. Men det er uvisst hvor lenge avlusingen hadde pågått før prøvene ble tatt. Det er imidlertid også en del tilleggskjortorer å ta hensyn til ved plasmaglukose som gjør denne vurderingen litt

vanskeligere. Det er blant annet foringsstatus og livsstadium som vil bestemme nivået for hver enkelt laks. Med andre ord finnes der altså ikke en fast standard for glukosenivå hos laks. Som beskrevet i teoridelen, vil hemolyse fortynde glukosekonsentrasjonen. Det kunne derfor forventes å finne lavere konsentrasjoner av glukose hos de hemolyserte prøvene. Figur 4.2 og 4.4 viser at der hemolysegraden topper, er det tendenser til at glukosenivået synker, men det er ikke signifikant, og kan være tilfeldig. Det kan hende at prøvene ikke ble sentrifugert innen de anbefalte rammene som nevnt i teoridelen (tabell 4.0 og 4.2), og dette kan ha påvirket prøveresultatene siden det vises til at nedbryting av glukose er svært høy første timen og videre utover, og kan dermed gi falsk lav glukoseverdi på prøveresultatene.

Hemolyse er, som beskrevet i teorien, ofte en stor feilkilde og grunn til at prøver må avvises, og nye prøver må tas. Dette gjelder også for lipemiske prøver. Ofte er det nok å se på prøvene med det blotte øyet, for å avgjøre om prøvene er for hemolysert eller lipemisk, men for å være sikker, må prøvene analyseres for hemoglobin og triglyserider. Det er ikke gjort med lakseprøvene, men ingen av prøvene så lipemiske ut, alle prøvene var fine og «gjennomsiktige». Det antas derfor at triglyserider ikke var en interferens for disse prøvene. Derimot var prøvene hemolyserte i mer eller mindre grad. Siden det ikke ble målt hemoglobin, er det usikkert om prøvene er godkjente eller om de burde ha blitt avvist. Grensen for å avvise hemolyserte prøver er hemoglobinnivå på 500 mg/dL plasma.

For feilkildene koagel og viskositet ble det kun observert en prøve med koagel og tre viskøse prøver. Det var altfor få prøver til å kunne avgjøre om de påvirket analysene av laktat og glukose. Når det gjelder B prøver (tabell 4.0) er det en prøve med koagel og to prøver som har viskositet. Glukose og laktatverdiene for disse prøvene ser ut til å være helt normale og følger samme trend som nærliggende verdier (figur 4.1). For U prøver er det kun en prøve som har viskositet (tabell 4.2). Laktat og glukose verdier er også her normale sammenlignet med nærliggende verdier (figur 4.3).

Prøvene har vært frosset i nesten to år. Det vites ikke hva det har gjort med kvaliteten på prøvene, om det har hatt noen innvirkning på resultatene, siden det ikke tidligere er foretatt målinger med disse parameterne. Det anbefales derfor at man gjennomfører et lagringsforsøk spesifikt for disse blodparameterne for å se på effekt av lagring.

6.0. Konklusjon

Resultatene i denne studien ser ut til å indikere at det ikke er noen direkte sammenheng mellom glukose- og laktatverdier og hemolysegraden, og det er få prøver med koagel og viskositet. Det er mange faktorer som kan påvirke de endelige resultatene, og som er vanskelige å vurdere. Det kan nevnes tidspunkt for prøvetaking, metabolsk status, den biologiske variasjonen og sentrifugeringstid.

Vi vet ikke om de preanalytiske faktorene av prøvematerialet er forskriftsmessig utført, og resultatene kan derfor være påvirket av disse forholdene. Dette gjør at vi ikke med sikkerhet kan støtte oss til de resultatene som vi har fått med vår oppgave. Dette bør i senere studier tas hensyn til, og gjennomføring av prøvetaking og sentrifugering bør følge de anbefalte retningslinjer i henhold til tidsbruk og oppbevaring.

Det er ikke målt nøyaktighet ved å analysere på ulike instrument i denne oppgaven, kun vurdering av Pentra C400 som analysemetode, og våre resultat er spesifikk rettet mot denne.

Til eventuelle senere studier av preanalytiske faktorer som kan påvirke analyse av laktat og glukose anbefales det å ha et langt større prøvevolum, slik at de aktuelle feilkildene er representert i tilstrekkelig mengde til å kunne gi et representativt svar. Det anbefales også at hemoglobinnivåer og triglyseridnivåer måles kvantitativt slik at konklusjonene støttes i objektive data.

Undersøkelsene utført i denne oppgaven tyder på at analyse av laktat på Pentra C400 kan gi en indikasjon på stressnivå og dataene ser ut til å indikere at laktat øker under stressituasjonen.

Analyse av glukose på Pentra C400 kan derimot ikke påvise en indikasjon på stressnivå i utgangspunkt i gitt prøvemateriale, med de preanalytiske feilkilder som er oppgitt.

Resultatene er ikke i samsvar med det som forventes ifølge teorien siden glukose ikke øker under stressituasjonen.

7.0. Referanser

1. Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in fish biology and fisheries*. 1999;9(3):211-68.
2. Noble C, Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J. & Gismervik, K. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. Tromsø2018. Available from: <https://nofima.no/wp-content/uploads/2016/06/Velferdsindikatorer-for-oppdrettslaks-2018.pdf>.
3. Wennevik V, Hansen T. Tema: Laks www.hi.no: Havforskningsinstituttet; 2019 [cited 2021 19.04.2021]. Available from: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks>.
4. Misund B. Fiskeoppdrett. Store norske leksikon. www.snl.no: Store norske leksikon; 2021.
5. Hansen T. Tema: Laks i oppdrett www.hi.no: Havforskningsinstituttet; 2019 [Available from: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks/laks-i-oppdrett>].
6. Winther U. Verdiskaping fra sjømatnæringa har nådd 100 milliarder. www.sintef.no: SINTEF; 2019.
7. Martins CIM, Galhardo L, Noble C, Damsgård B, Spedicato MT, Zupa W, et al. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2012;38(1):17-41.
8. Lov om dyrevelferd, (2009).
9. Berg JP. stoffskiftet i Store medisinske leksikon på snl.no2019. Available from: <https://sml.snl.no/stoffskiftet>.
10. Olsen RE, Sundell K, Hansen T, Hemre G-I, Myklebust R, Mayhew TM, et al. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish physiology and biochemistry*. 2002;26(3):211-21.
11. Hauge JGB, Erling Reinholdt. melkesyre i Store norske leksikon på snl.no.2013. Available from: <https://snl.no/melkesyre>.
12. Heggland G, Jenssen I. Åkerblå - Kunnskapsbasert havhelse. [Educational]. In press 2017.
13. Madaro A, Olsen RE, Kristiansen TS, Ebbesson LOE, Flik G, Gorissen M. A comparative study of the response to repeated chasing stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*

- L.) parr and post-smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2016;192:7-16.
14. Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev*. 1997;77(3):591-625.
 15. McCarty R. Chapter 4 - The Fight-or-Flight Response: A Cornerstone of Stress Research. In: Fink G, editor. *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 33-7.
 16. Bonga SEW. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 1997;77(3):591-625.
 17. Hatløy T. Effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus –hypofyse - interrenal aksene, og dets betydning på dyrevelferden hos diploid og triploid atlantisk laksesmolt (*Salmo salar* L.) [Masteroppgave i havbruk]: Nord Universitet; 2015.
 18. Ottestad BH. Effekten av lufteksponering og trenging på primære og sekundære stressresponser hos atlantisk laksesmolt (*Salmo salar* L.) [Master]. www.nord.no: Nord Universitet; 2020.
 19. Dmitrieva.A.A. Kortisolnivå i feces hos laks som velferdsindikator i lakseoppdrett. [Bacheloroppgave]: NTNU; 2016.
 20. Eriksen MS. Velferdsindikatorer hos fisk 2016. Available from: <http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2007/114.pdf>.
 21. Svartdal F, Malt U. Stress. Store norske leksikon. www.snl.no: Store norske leksikon - snl.no; 2021.
 22. Pankhurst NW. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *Gen Comp Endocrinol*. 2010;170(2):265-75.
 23. Martinez-Porchas M, Martinez-Cordova LR, Ramos-Enriquez R. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 2009;4:158-78.
 24. Lausund S, Kjøbli E. Kolorimetrisk metode. MedTekipedia. www.ntnu.no: Atlassian Confluence; 2018.
 25. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT, editors. *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics, eighth edition*. Eighth edition ed. United States of America: Elsevier, Inc; 2019.
 26. ABX Pentra Lactic Acid. www.horiba.com: www.horiba.com. ABX Pentra Lactic Acid - Diagnostisk reagens for kvantitativ in vitro-bestemmelse av melkesyre i plasma ved hjelp av kolorimetri.

27. ABX Pentra Glucose HK CP. www.horiba.com: www.horiba.com. ABX Pentra Glucose HK CP - Diagnostisk reagens for kvantitativ *in vitro*-bestemmelse av glukose HK i serum, plasma og urin ved hjelp av kolorimetri.
28. NKK. Validering/ verifisering av klinisk kjemiske analyser. NKK - Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll: Noklus; 2002.
29. Bolann BB, Sandberg S. Evaluering av nye laboratorieanalyser. Tidsskriftet Den Norske Lægeforening. 2003;3:337-9.
30. Holtebekk T. Viskositet. Store norske leksikon - snl.no. www.snl.no: Store norske leksikon; 2019.
31. Evensen SA. Blodplasma. Store medisinske leksikon. <https://sml.snl.no>: Store norske leksikon - snl.no; 2021.
32. Mirghaed AT, Ghelichpour M, Hoseini SM, Amini K. Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators. Fish Physiology and Biochemistry. 2017;43(4):1143-51.
33. Fürst. Gode rutiner ved prøvetaking. Available from: https://www.furst.no/globalassets/pdf/furst_temahefte_05_web.pdf.
34. Lande B, Tonstad S, Svihus B. Triglyserider. Store medisinske leksikon. www.sml.snl.no: Store norske leksikon - www.snl.no; 2018.
35. Lausund S. Lipemi (preanalytisk feilkilde). MedTekipedia. www.ntnu.no/wiki/: Confluence; 2018.
36. Sandnes K, Lie Ø, Waagbø R. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. J Fish Biol. 1988;32:129-36.
37. M. H. Statistikk for kjemikere. 2 opplag 2016 ed. Bergen: Fagbokforlaget; 2001.
38. H. A. Litt statistikk: Universitetet i Oslo; 2006. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/matematikk/stat.pdf>.
39. AS MK. Glukose/Laktatrør <https://med-kjemi.no/2021> [Available from: <https://med-kjemi.no/produkter/provetaking/venos-provetaking/glukose-laktatrør/>].
40. Hvilke forsøk må du ikke søke om?, § 16 annet ledd (2020).
41. ABX H. Brukermanual Pentra C400. Montpellier, France: HORIBA ABX.

8.0 Vedlegg

8.1 Vedlegg 1. Pakningsvedlegg ABX Pentra Glucose HK CP

ABX Pentra
Glucose HK CP

Intended use
Diagnostic reagent for quantitative *in-vitro* determination of Glucose HK in serum and plasma by colorimetry.

Clinical Interest (1)
Glucose is the main source of energy for human body. Glucose of food origin is converted either in glycogen in order to be stocked in liver, or in triglycerides in order to be stocked in the adipose tissues. The level of blood glucose is regulated by the effect of different hormones of which two antagonism ones are insulin and glucagon. The blood sugar dosage is used to diagnostic affections of the carbohydrate metabolism as diabetes, neonatal or idiopathic hypoglycaemia and pancreatic pathologies. The main physiological troubles are linked with the appearance of hyperglycaemia (type I mellitus diabetes and type II mellitus diabetes). The type I diabetes is insulin-dependent and appears principally before 30 years. The type II diabetes is insulin-dependent, and appears often after 40 years. However, it could appear earlier among obese subjects. Other diabetes types come of secondary origin and appear following endocrinal or hepatic diseases.

Method(1)
Enzymatic method (hexokinase)
Determination of glucose using the following reactions:

$$\text{D-glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$
$$\text{Glucose-6-phosphate} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{D-gluconate-6-phosphate} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

(HK = Hexokinase, G-6-PDH = Glucose-6-phosphate-dehydrogenase)

Reagents
ABX Pentra Glucose HK CP is ready-to-use.

Reagent 1:	Pipes Buffer, pH 7.60	100 mmol/l
	NAD	3.8 mmol/l
	ATP	2.2 mmol/l
	Sodium azide	< 0.1 %
Reagent 2:	Hexokinase	≥ 8500 U/l
	G-6-PDH	≥ 8500 U/l
	Magnesium sulphate	20 mmol/l
	Sodium azide	< 0.1 %

ABX Pentra Glucose HK CP should be used according to this reagent notice. HORIBA ABX cannot guarantee its performances if used otherwise.

2007/05/29
A90A010320 US


REF A11A01667

REAGENT 1 46 ml

REAGENT 2 12 ml

IVD CE

HORIBA ABX
BP 7290
34184 Montpellier - cedex 4 - France



Handling
Remove the caps of the cassette, place in the refrigerated ABX Pentra 400 reagent compartment.
If present, remove foam by using a plastic pipette.

Calibrator
For calibration, use:
ABX Pentra MultiCal, Ref. A11A01652 (not included)
10 x 3 ml (lyophilisate)

Control
For internal quality control, use:
ABX Pentra N Control, Ref. A11A01653 (not included)
10 x 5 ml (lyophilisate)
ABX Pentra P Control, Ref. A11A01654 (not included)
10 x 5 ml (lyophilisate)
Each control should be assayed daily and/or after each calibration. The frequency of controls and the confidence intervals should correspond to laboratory guidelines and country-specific directives. The results must be within the range of the defined confidence limits. Each laboratory should establish a procedure to follow if the results exceed these confidence limits.

Materials required but not provided

- Automated clinical chemistry analyser
- Standard laboratory equipment

Specimen⁽¹⁾

- Non-haemolysed serum
- Plasma in heparin-Lithium

The stability of glucose in specimen depends on the storage temperature, bacterial contamination and glycolyse.

The plasma or serum specimen without preservative should be separated from cells or blood clot in the half hour following the taking. In the uncentrifuged blood, at room temperature, the average decrease of glucose in serum is about 7 % per hour (0.28 to 0.56 mmol/l or 5 to 10 mg/dl). This decrease results from glycolyse.

Reference range⁽²⁾⁽⁷⁾

Each laboratory should establish its own reference ranges. The values given here are used as guidelines only.

Serum, plasma:

- 0.74 - 1.06 g/l
- 74 - 106 mg/dl
- 4.10 - 5.90 mmol/l

Storage and Stability

Reagents, in unopened cassettes, are stable up to the expiry date on the label if stored at 2-8° C.

Stability after opening: refer to the paragraph "Performance on ABX Pentra 400".

Assay Procedure

Test instructions for other automated systems than ABX Pentra 400 are available on request (not available in the USA).

Waste Management

1. Please refer to local legal requirements.
2. This reagent contains less than 0.1 % of sodium azide as a preservative. As sodium azide may react with lead and copper to form explosive metal azides, this reagent should be disposed of by flushing with copious amounts of water.

General Precautions

1. Reagent, for professional *in-vitro* diagnostic use only.
2. Gently agitate any turbid reagents.
3. The reagent cassettes are disposable and should be disposed of in accordance with the local legal requirements.
4. Please refer to the MSDS associated with the reagent.

Performance on ABX Pentra 400

The performance data listed below have been obtained on the ABX Pentra 400 analyser.

Number of tests: 200 tests.

On board Reagent Stability:

Once opened, the reagent cassette placed in the refrigerated ABX Pentra 400 compartment is stable for 55 days.

Sample volume: 2 µl/test

Detection limit:

The detection limit is determined according to the Valtec protocol (3) and equals 1,98 mg/dl.

Accuracy and Precision:

- Repeatability (within-run precision)
3 specimens of low, medium and high concentration and 2 controls are tested 20 times according to the recommendations found in the Valtec protocol (3).

	Mean value mg/dl	CV %
Normal control	96.90	0.66
Pathological control	251.90	0.81
Specimen 1	31.15	1.18
Specimen 2	94.35	0.52
Specimen 3	253.45	0.74

• Reproducibility (total precision)

2 specimens of low and high levels and 2 controls are tested in duplicate for 20 days (2 series per day) according to the recommendations found in the NCCLS, EP5-A protocol (4).

	Mean value mg/dl	CV %
Normal control	98.18	2.00
Pathological control	252.88	1.19
Specimen 1	99.86	2.03
Specimen 2	273.38	1.48

Linearity and Measuring Range:

The reagent linearity is determined according to the recommendations found in the NCCLS, EP6-A protocol (5).

Low linearity: 1.98 mg/dl

High linearity: 900 mg/dl, with automatic post-dilution: 2700 mg/dl.

Correlation:

103 patient samples are correlated with a commercial reagent taken as reference according to the recommendations found in the NCCLS, EP9-A2 protocol (6).

The equation for the allometric line obtained is:

$$Y = 0.93 x + 2.70 \text{ with a correlation coefficient } r^2 = 0.9958.$$

Interferences:

Haemoglobin: No significant influence is observed up to 500 mg/dl

Triglycerides: No significant influence is observed up to 613 mg/dl (as Intralipid®, representative of lipemia)

Total Bilirubin: No significant influence is observed up to 36 mg/dl

Direct Bilirubin: No significant influence is observed up to 36 mg/dl

Conversion factor:

mmol/l \times 0.18 = g/l

mmol/l \times 18 = mg/dl

Calibration stability:

The reagent is calibrated on Day 0. The calibration stability is checked by testing 2 control specimens.

The calibration stability is at least 14 days.

Note: A recalibration is recommended when reagent lots change, and when quality control results fall outside the range established.

Application release³: 2.03**Warning**

It is the user's responsibility to verify that this document is applicable to the reagent used.

Reference

1. G. Siest, J. Henny, F. Schiele, *Références en biologie clinique*, chap.18.
2. Tietz. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Chap.23.447 (2001).
3. Vassault A., Grafmeyer D. Naudin C. et al., *Protocole de validation de techniques (document B)*, *Ann. Biol. Clin.*, 1986, **44**, 686-745.
4. *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices, Approved Guideline*, NCCLS document EP5-A, Vol. 19, No. 2, february 1999.
5. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods, Approved Guideline*, NCCLS document EP6-A, Vol. 23, No. 16, april 2003.
6. *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, Approved Guideline*, 2nd ed., NCCLS document EP9-A2, Vol. 22, No. 19, 2002.
7. Tietz, N.W., *Clinical guide to laboratory tests*. 3ème Ed., (W.B. Saunders eds. Philadelphia USA), (1995), 268.

8.2. Vedlegg 2. Pakningsvedlegg ABX Pentra Lactic Acid

Klinisk kjemi

ABX Pentra Lactic Acid

■ Pentra C400

2020/05/18
A11A012340ND

REF A11A01721

REAGENT 1 103 mL

REAGENT 2 10 x 10 mL

IVD 

HORIBA ABX SAS
Parc Euro Médical
Rue du Caducée
BP 7290
34194 Montpellier Cedex 4
FRANCE



Diagnostisk reagens for kvantitativ *in vitro*-bestemmelse av melkesyre i plasma ved hjelp av kolorimetri.

Applikasjonsversjon

Plasma: Lact

1..xx

Tilsiktet bruk

Reagensen **ABX Pentra Lactic Acid** er tiltenkt brukt til kvantitativ *in vitro*-diagnostisk bestemmelse av melkesyre i plasma ved hjelp av kolorimetri. Melkesyremålinger som evaluerer syre/base-statusen brukes til diagnostisering og behandling av laktacidose (abnormalt høy surhetsgrad i blodet).

Klinisk interesse (1)

Melkesyre er et sluttprodukt av anaerob glykolyse og er den viktigste energikilden i enkelte vev. Det anises å være den beste markøren på vevenes oksygeneringstilstand. Det brukes hovedsakelig til gjenopplivning ved behandling av sjokktilstander, både ved hypovolemisk sjokk, toksisk sjokk og kardiogent sjokk, samt for behandling av neonatale luftveisacidoser. Denne bestemmelsen benyttes også innen sportsmedisin for å forbedre idrettsutøvernes prestasjoner.

Metode (2, 3)

Enzymatisk kolorimetrisk metode. Trinder-metoden. Laktat er en intermediær metabolitt av glykolyse som bidrar til å opprettholde blodets pH-verdi. Laktatoksidase utløser frigjøringen av hydrogenperoksid, som sammen med 4-aminoantipyrin og ESPAS reagerer på et farget kompleks i peroksidens nærvær. Fargens intensitet er proporsjonal med laktatmengden i prøven.



(4 AAP = 4-aminoantipyrin, ADPS = N-etyl-N-(3-sulfopropyl)-m-anisidin)

Reagenser

ABX Pentra Lactic Acid er lyofilisert.

Reagens 1:	
Fosfatbuffer pH 7,50	100 mmol/L
ADPS	0,94 mmol/L
Natriumazid	< 0,1%

Reagens 2:	
Laktatoksidase	≥ 450 U/L
Peroksidase	≥ 2000 U/L
4-aminoantipyrin	0,40 mmol/L

ABX Pentra Lactic Acid må brukes i henhold til dette pakningsvedlegget. Produsenten kan ikke garantere for produktets ytelse hvis det brukes på annen måte.

Håndtering i rack

- Løs opp reagens 2 i 10 mL av reagens 1 som vist på glasset til reagens 2.
- Sett hetten på glasset og homogeniser blandingen ved å vende den lett. Løsningen vil være klar for bruk etter 15 minutter.
- Hell det nødvendige volumet for én arbeidsdag over i et reagensglass på 15 eller 10 mL.

ABX Pentra Lactic Acid

Referanseområde (5)

Hvert laboratorium bør etablere egne referansespektra. Verdiene som oppgis her er kun veiledende.

0,50-2,20 mmol/L (4,5-20 mg/dL).

Oppbevaring og stabilitet

Stabilitet før åpning:

Stabil opptil utløpsdatoen på etiketten ved oppbevaring mellom 2-8°C.

Stabilitet etter utblanding:

Stabil i:

- 8 timer ved 20-25°C
- 7 dager ved 2-8°C

Stabilitet oppnås når reagensflaskene forsegles godt umiddelbart etter bruk og hvis kontaminering er unngått.

Avfallshåndtering

- Vennligst overhold lokale lover og regler.
- Dette reagenset inneholder mindre enn 0,1% natriumazid som konserveringsmiddel. Natriumazid kan reagere med bly eller flasker og danne svært eksplosive metallazider.

Generelle forholdsregler

- Dette reagenset må kun brukes til profesjonell *in vitro*-diagnostikk.
- Må kun brukes som foreskrevet.
- Denne reagensen er klassifisert som ufarlig i samsvar med forskrift (EF) nr. 1272/2008.
- **EUH208:** Inneholder laktat 2-monooksygenase. Kan gi en allergisk reaksjon.
- Unngå enhver kontakt mellom reagenset og hud for å forhindre kontaminering via laktat i svette.
- Må ikke svelges. Unngå kontakt med hud og slimhinner.
- **Reagens 2 (R2):**
Advarsel: Dette reagenset er fremstilt av substanser av animalsk opprinnelse. Kontrollmiddelet bør derfor behandles som potensielt smittebærende, og håndteres med forsiktighet i henhold til god laboratorieskikk (6).

- Laboratoriets standardforholdsregler for bruk må overholdes.
- Reagensflaskene er for engangsbruk og må kastes i samsvar med lokale forordninger.
- Vennligst les produktdatabladet som gjelder for reagenset.
- Ikke bruk produktet i tilfeller hvor det finnes synlig bevis på biologisk, kjemisk eller fysisk nedbryting.
- Det er brukerens ansvar å forsikre seg om at dette dokumentet gjelder for det reagenset som benyttes.

Ytelse på Pentra C400

Serum, plasma

Ytelsesdataene nedenfor har blitt innhentet på analyseapparatet HORIBA Medical Systems.

Antall tester: cirka 260 tester

Reagensstabilitet i maskinen ⁶

Etter åpning må reagensen i den åpne beholderen plasseres i den nedkjølte seksjonen av Pentra C400 seksjonen er stabil i 1 uke.

Prøvevolum: 3,0 µL/test

Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrensen er fastsatt i henhold til Valtec-protokollen (7) og tilsvarer 0,03 mmol/L (0,3 mg/dL).

Nøyaktighet og presisjon

Repeterbarhet (innen serie-presisjon)

Repeterbarhet i henhold til anbefalingene i Valtec-protokollen (7) med prøveeksemplarer testet 20 ganger:

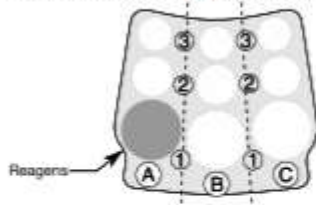
- 2 kontroller
- 3 prøveeksemplarer (lave / medium / høye nivåer)

	Middelverdi mmol/L	Middelverdi mg/dL	CV %
Kontrollprøve 1	1,62	14,6	0,6
Kontrollprøve 2	3,24	29,2	0,7
Prøveeksemplar 1	1,05	9,5	0,8
Prøveeksemplar 2	3,47	31,2	0,4
Prøveeksemplar 3	7,56	68,1	0,5

⁶Modifisering: reagensstabilitet i maskinen lagt til.

ABX Pentra Lactic Acid

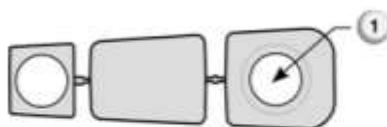
4. Plasser glasset i en tilgjengelig posisjon på raket.



5. Fjern eventuelt skum ved hjelp av en plastpipette.
6. Plasser reagensraket i den nedkjølte reagenskarusellen på Pentra C400.

Håndtering i kassett

1. Løs opp reagens 2 i 10 mL av reagens 1 som vist på glasset til reagens 2.
2. Sett hetten på glasset og homogeniser blandingen ved å vende den lett. Løsningen vil være klar for bruk etter 15 minutter.
3. Identifiser kassetten ved hjelp av de spesielle reagensetikettene med strekkode (604).
4. Overfør den reagensmengden som behøves for én arbeidsdag til del 1 (kapasitet på 30 mL) på den medfølgende 30/10-kassetten (se diagrammet nedenfor). Beholder 2 på kassetten vil forbli ubrukt.



5. Fjern eventuelt skum ved hjelp av en plastpipette.
6. Plasser reagenskassetten i den nedkjølte reagenskarusellen på Pentra C400.

Kalibrator

For kalibrering, bruk:
ABX Pentra Multical (A11A01652) (ikke inkludert)
10 x 3 mL (lyofilisat)

Kontroll ^a

For intern kvalitetskontroll, bruk:

- **ABX Pentra N Control / ABX Pentra N MultiControl** (A11A01653 / 1300054414) (ikke inkludert)
10 x 5 mL (lyofilisat)
- **ABX Pentra P Control / ABX Pentra P MultiControl** (A11A01654 / 1300054415) (ikke inkludert)
10 x 5 mL (lyofilisat)

Hver kontroll skal testes daglig og/eller etter kalibrering. Hyppigheten av kontrollene og konfidensintervallene må stemme overens med laboratoriets retningslinjer og det aktuelle landets direktiver. Du må følge føderale, statlige og lokale retningslinjer for testing av kvalitetskontrollmateriale. Resultatene må befinne seg innenfor området for de definerte konfidensgrensene. Hvert laboratorium bør etablere en prosedyre som skal følges dersom resultatene overstiger disse konfidensgrensene.

Nødvendige men ikke medfølgende materialer ^a

- Automatisert klinisk kjemianalyseapparat: Pentra C400
- Kalibrator: **ABX Pentra Multical** (A11A01652)
- Kontroller:
ABX Pentra N Control / ABX Pentra N MultiControl (A11A01653 / 1300054414)
ABX Pentra P Control / ABX Pentra P MultiControl (A11A01654 / 1300054415)
- Standard laboratorieutstyr.

Prøveeksemplar (4)

- Plasma i litiumheparin.

Andre antikoagulanter enn de som er oppført her har ikke blitt testet av HORIBA Medical og anbefales derfor ikke for bruk sammen med dette assayet.

Stabilitet:

- Ved 20-25°C: 3 dager
- Ved 4-8°C: 3 dager
- Ved -20°C: 3 dager

^aModifisering: ny kontroll.

ABX Pentra Lactic Acid

Reproduserbarhet (total presisjon)

Reproduserbarhet i henhold til anbefalingene i CLSI (NCCLS), protokoll EP5-A (8) med prøveeksemplarer testet i duplikat i 20 dager (2 serier per dag):

- 2 kontroller
- 2 prøveeksemplarer (medium / høye nivåer)

	Middelverdi mmol/L	Middelverdi mg/dL	CV %
Kontrollprøve 1	1,67	15,1	1,16
Kontrollprøve 2	3,31	29,8	1,16
Prøveeksemplær 1	3,48	31,4	1,29
Prøveeksemplær 2	7,41	66,8	1,65

Måleområde

Assayet bekreftet et måleområde fra 0,03 mmol/L (0,3 mg/dL) til 13,3 mmol/L (120 mg/dL).

Måleområdet utvides fra 39,9 mmol/L (360 mg/dL) med automatisk etterfortynning.

Reagenslineariteten er vurdert opp til 13,3 mmol/L (120 mg/dL) i henhold til anbefalingene fra CLSI (NCCLS), protokoll EP6-A (9).

Korrelasjon

Pasientprøver: Plasma

Antall pasientprøver: 100

Prøvene har blitt korrelert med en kommersiell reagens som referanse i henhold til anbefalingene i CLSI (NCCLS), protokoll EP9-A2 (10).

Ligningen for den allometriske linjen ved hjelp av regresjonsprosedyren Passing-Bablok (11) er:

$$Y = 1,04 X + 0,04 \text{ (mmol/L)}$$

$$Y = 1,04 X + 0,36 \text{ (mg/dL)}$$

med korrelasjonskoeffisient $r^2 = 0,9986$.

Interferenser

Hemoglobin: Ingen betydelig interferens observert opptil 290 $\mu\text{mol/L}$ (500 mg/dL).

Triglyserider: Ingen betydelig interferens observert opp til en Intralipid®-konsentrasjon (representativt for lipemi) på 7 mmol/L (612,5 mg/dL).

Totalbilirubin: Ingen betydelig interferens observert opptil 615 $\mu\text{mol/L}$ (36,0 mg/dL).

Direkte bilirubin: Ingen betydelig interferens observert opptil 513 $\mu\text{mol/L}$ (30,0 mg/dL).

N-Acetylcystein (NAC): Pasienter behandlet med N-Acetylcystein (NAC) for paracetamoloverdose kan gi et falskt, lavt resultat.

Andre begrensninger er gitt av Young som en liste over medikamenter og preanalytiske variabler som er kjent for å påvirke denne metodologien (12, 13).

Kalibreringsstabilitet

Reagenset kalibreres på dag 0. Kalibreringsstabiliteten kontrolleres ved å teste 2 kvalitetskontroller.

Kalibreringsstabiliteten er på 1 uke.

Merk: En rekalkibrering anbefales når reagenslotnummer endres, og når resultatene fra kvalitetskontrollen faller utenfor det fastsatte området.

Konversjonsfaktor

mmol/L x 9,01 = mg/dL

Referanser

1. Thomas L. Lactate. In: Thomas L, editor. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, (1998): 160-166.
2. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. (1969) 6: 24.
3. Sacks DB. Carbohydrates. In: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 5th Ed., Burtis CA, Ashwood ER (WB Saunders eds., Philadelphia, USA), (2001): 427.
4. Guder WG, Zawta B. The Quality of Diagnostics Samples. Samples: From the Patient to the Laboratory. 1st Ed. Guder WG, Narayanan S, Zawta B. (WILEY-VCH, Darmstadt, Germany) (2001): 43.
5. Toffaletti J, Hammes ME, Gray R, Lineberry B, Abrams B. Lactate measured in diluted and undiluted whole blood and plasma: comparison of methods and effect on hematocrit. Clin. Chem. (1992) 38: 2430-2434.
6. Council Directive (2000/54/EC). Official Journal of the European Communities. No. L262 from October 17, 2000: 21-45.
7. Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C et al. Protocole de validation de techniques (document B). Ann. Biol. Clin. (1986) 44: 686-745.
8. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline, CLSI (NCCLS) document EP5-A (1999) 19 (2).
9. Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods. Approved Guideline, CLSI (NCCLS) document EP6-A (2003) 23 (16).
10. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. Approved Guideline, 2nd ed., CLSI (NCCLS) document EP9-A2 (2002) 22 (19).

ABX Pentra Lactic Acid

11. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1983) **21**: 709-20.
12. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*. 4th Edition, Washington, DC, AACC Press (1997) **3**: 143-163.
13. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd Edition, Washington, DC, AACC Press (1997) **3**: 120-132.

