

Kandidatnummer: 10003, 10009, 10010, 10032

Samanlikning og haldbarheit av PT- INR i EDTA- og citrat-plasma

Bacheloroppgåve i Bioingeniørfag BI301305

Rettleiar: Lutz Schwettmann & Ida Kristin Dyrkorn

Mai 2022

Kandidatnummer: 10003, 10009, 10010, 10032

Samanlikning og haldbarheit av PT-INR i EDTA- og citrat-plasma

Bacheloroppgåve i Bioingeniørfag BI301305
Rettleiar: Lutz Schwettmann & Ida Kristin Dyrkorn
Mai 2022

Noregs teknisk-naturvitskaplege universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund

Samandrag

Føremålet med oppgåva var å undersøke om EDTA-plasma kan nyttast alternativt til citrat-plasma ved måling av PT-INR, samt verifisere haldbarheita til prøvemateriala i romtemperatur og ved 2-8 °C. Det blei utført ein studie med to ulike problemstillingar. Den første tek for seg ei metodesamanlikning for å finne ut om det er ein signifikant ulikheit i PT-INR analysert i EDTA- og citrat-plasma. Den andre omhandlar ein haldbarheitsundersøking for å verifisere haldbarheita til PT-INR i EDTA- og citrat-plasma oppbevart i ulik temperatur.

Til samanlikningundersøkinga var det totalt 57 deltakarar, der det blei samla inn eit citrat-røyr og eit EDTA-røyr frå kvar deltakar. Prøvemateriala blei sentrifugert og analysert fortløpande etter innsamling. Til haldbarheitsundersøkinga var det totalt 33 deltakarar. Frå kvar deltakar blei det samla inn to citrat-røyr og eit EDTA-røyr. Prøvane vart analysert ved fem ulike tidspunkt (1, 5, 8, 12 og 24 timar) etter prøvetaking. Til begge problemstillingane deltok pasientar som blei behandla med antikoagulerande medikament, samt deltakarar med INR i normalområde. Til innsamling og analysering av prøvemateriala blei det nytta batch-metoden. I denne studien blei det brukt Sysmex CS-5100 til analysering av prøvane. Statistiske metodar legg grunnlag for å vurdere resultata.

Metodesamanlikninga viste ikkje ein statistisk signifikant forskjell av INR i EDTA- og citrat-plasma. Den gjennomsnittlege differansen er 0,0693. Resultata frå samanlikninga viste at EDTA-plasma kunne nyttast alternativt til citrat-plasma ved analysering av PT-INR.

Haldbarheitsundersøkinga viste at PT-INR i citrat- og EDTA-plasma oppbevart i romtemperatur er haldbart opp til 24 timar. Citrat-plasma lagra ved 2-8 °C er haldbart opp til 12 timar, medan EDTA-plasma oppbevart ved same temperatur er haldbart opp til 8 timar. Resultata viste dermed at prøvemateriala hadde betre haldbarheit oppbevart i romtemperatur, kontra oppbevaring ved 2-8 °C.

Abstract

The purpose of this study was to examine if EDTA-plasma can be used as an alternative to citrate-plasma when measuring PT-INR, as well as to verify the stability of the sample material stored in room temperature and 2-8 °C. The study included two research questions concerning PT-INR. For the first research question we did a method comparison to see if there were any significant differences in PT-INR analyzed in EDTA- and citrate-plasma. The second research question concerns the stability of PT-INR in EDTA- and citrate-plasma stored in different temperatures.

For the method comparison there were 57 participants in total. To compare the difference between PT-INR in EDTA- and citrate-plasma, one citrate-tube and one EDTA-tube were collected from each participant. The test tubes were centrifuged and analyzed within an hour of sampling. For the stability question there were 33 participants, where two citrate-tubes and one EDTA-tube were collected per person. The plasma were analyzed in five intervals (1, 5, 8, 12 and 24 hours). People with normal and abnormal INR were included for both research questions. The batch-method was used to collect and analyze the sample material. The instrument used in this study was Sysmex CS-5100. Statistical methods were used to evaluate the data collected from the study.

The results from the method comparison showed that there were no statistically significant differences between PT-INR in EDTA- and citrate-plasma. The average difference is 0,0693. The results showed that EDTA-plasma could be used as an alternative for measuring INR. The stability results showed that PT-INR in citrate- and EDTA-plasma stored at room temperature were stable up to 24 hours. PT-INR in citrate-plasma stored at 2-8 °C were stable up to 12 hours, and EDTA-plasma stored at the same temperature were stable up to 8 hours.

Forord

Bachelor-oppgåva markerer avslutninga på bioingeniørstudie ved NTNU i Ålesund, våren 2022. Resultatet speglar utviklinga gjennom tre studieår, og eit produkt av ei problemstilling som vil vere relevant kunnskap å ha på laboratoriet. Temaet vi skriv om har vore av alle sine interesser, då føremålet med denne oppgåva kan fremje pasientomsorg.

Vi vil takke Avdeling for medisinsk biokjemi ved Ålesund sjukehus for moglegheita til å utføre oppgåva, og stor takk til Ida Kristin Dyrkorn for rettleiing og hjelp med det praktiske arbeidet. Vi retter også stor takk til Lutz Schwettmann for fagleg rettleiing gjennom det skriftlege arbeidet, samt gode råd og tilbakemeldingar. Vi vil takke tilsette ved Ålesund sjukehus som har tatt omsyn, hjelpt til undervegs og tatt oss godt i mot. Til slutt vil vi også takke deltakarar i studien.

Ålesund, 20.05.2022

Innholdsliste

1 INTRODUKSJON.....	3
1.1 INNLEIING	3
1.2 PROBLEMSTILLING OG AVGRENSING	3
1.3 TIDLEGARE STUDIAR.....	4
1.4 TEORI.....	5
1.4.1 Hemostase	5
1.4.2 Primær hemostase.....	7
1.4.3 Sekundær hemostase	7
1.4.4 Fibrinolyse	9
1.4.5 Danning av koagulasjonsfaktorar.....	10
1.4.6 Koagulasjonshemmande medikament	11
1.4.7 PT-INR	11
1.4.8 Prøveglas	12
1.4.9 Preanalytiske faktorar for PT-INR	13
1.4.10 Statistiske metodar	14
2 MATERIALE OG METODE	16
2.1 INNSAMLING AV MATERIALE OG SENTRIFUGERING	16
2.2 SAMANLIKNING	17
2.3 HALDBARHEIT	17
2.4 SYSMEX CS-5100	17
2.5 REAGENS, KONTROLL OG KALIBRATOR.....	19
2.6 STATISTISKE METODAR.....	19
3 RESULTAT	21
3.1 KONTROLLAR	21
3.2 SAMANLIKNING	21
3.2.1 Passing-Bablok Plot.....	21
3.2.2 Bland-Altman Plot	22
3.3 HALDBARHEIT	23

3.3.1 Citrat.....	23
3.3.2 EDTA.....	25
4 DISKUSJON.....	27
4.1 SAMANLIKNING	27
4.2 HALDBARHEIT	29
4.2.2 Citrat-plasma	29
4.2.3 EDTA-plasma.....	30
5 KONKLUSJON.....	32
5.1 SAMANLIKNING	32
5.2 HALDBARHEIT	32
5.3 VIDARE ANBEFALINGAR	32
6 REFERANSAR.....	33
7 VEDLEGG.....	38

1 Introduksjon

1.1 Innleiing

Protrombin International Normalized Ratio (PT-INR) er ein koagulasjonsanalyse som i hovudsak blir nytta til vurdering og oppfølging av antikoagulante medikament. Analysen blir tatt på citrat-røyr og målar koagulasjonsfaktorane sin effektivitet til å koagulere blodet. PT-INR definerer tida det tek å danne fibrinkoagel. Dette utførast ved å tilsetje vevstromboplastin og kalsiumklorid for å initiere trombingenerering (1, 2).

På sjukehus blir det teke blodprøvar til bestemte tidspunkt kvar dag, blant anna ved morgonrunde. Vanlegvis blir det rekvirert analyser på EDTA-røyr på dei fleste inneliggjande pasientar som ein kontrollprøve. EDTA-røyr vil dermed vere lettare tilgjengeleg kontra citrat-røyr. Avdeling for medisinsk biokjemi ved Ålesund sjukehus får ofte etterbestilling av PT-INR på inneliggjande pasientar. For å kunne utføre analyser av prøvar som ikkje er ferske, er det dermed nødvendig å vite haldbarheita til analysen, samt korleis ein kan optimalisere oppbevaring av prøveglasa. Prøvar frå friske og sjuke personar kan endre seg ulikt *in vitro*, og dermed skal det utførast ein haldbarheitsundersøking for å følgje desse endringane. Dersom ein kan nytte EDTA-røyr til etterbestilling av PT-INR, skjermar ein pasientar for ein ekstra blodprøve. Dette vil også vere tidssparande for bioingeniørar.

Teori om hemostase, prøverøyr og vitamin K-antagonistar byggjer opp under diskusjonen om resultata som er oppnådd i studien. Planlegging, prøvebehandling, analysering og instrument som er tatt i bruk er skildra under material og metode. Resultata er presentert ved hjelp av statistiske grafar. Oppgåva avsluttar med refleksjon rundt resultat i ein diskusjonsdel, og ei oppsummering av problemstillingane i konklusjon.

1.2 Problemstilling og avgrensing

A: Samanlikning av PT-INR i fersk EDTA- og citrat-plasma

Det er gjennomført ei metodesamanlikning for å studere PT-INR i EDTA- og citrat-plasma. Hensikta med oppgåva er å finne ut om det er samsvar mellom metodane, og om ein alternativt kan nytte EDTA-plasma til analysering av PT-INR.

Det vart nytta deltakarar som blei behandla med antikoagulerande medikament, samt deltakarar som hadde verdiar i normalområdet. Personar som blei behandla med medikament vart inkludert for å studere om dette påverkar PT-INR. Det blir ikkje nytta ulike referanseverdiar basert på kjønn ved Ålesund sjukehus. Det er dermed ingen grunn til å skilje mellom kvinner og menn. Alle deltakarar var over 18 år, slik at det ikkje var behov for samtykkje frå føresette. Det er også avgrensa kor mange deltakarar som var med, for at det skulle vere praktisk overkomeleg.

B: Verifisering av haldbarheit for PT-INR i fersk EDTA- og citrat-plasma ved oppbevaring i romtemperatur og ved 2-8 °C

Det er utført ei haldbarheitsundersøking for å vurdere og verifisere haldbarheita til PT-INR i EDTA- og citrat-plasma i ulik temperatur over tid. Hensikta med haldbarheitsundersøkinga er å studere korleis PT-INR i prøvar endrar seg over tid, samt om oppbevaringstemperatur er ein faktor som påverkar analysen.

Haldbarheitsundersøkinga er avgrensa til eit tidsintervall på 24 timar. Det er størst sannsyn for at PT-INR blir etterbestilt innan dei første 12 timane etter morgonrunde, og fokuset ligg dermed mellom 1 til 12 timar. Det er gjennomført ei analysing etter 24 timar for å bekrefte eller avkrefte om ein kan nytte prøveglasa i eit heilt døgn, eller om ny prøve må takast. Tal på deltakarar blei avgrensa for at det skulle vere mogleg å gjennomføre praktisk. I tillegg til normalprøvar blei det nytta prøvar frå pasientar som blei behandla med antikoagulerande medikament. Dette for å sjå om prøvar med verdiar i terapeutisk område hadde lik haldbarheit som prøvar i normalområde.

1.3 Tidlegare studiar

Det har tidlegare blitt utført studiar for samanlikning av PT-INR i EDTA- og citrat-plasma, samt haldbarheit over tid. Fire av studiane som tek for seg dette temaet er gjennomført i Kristiansund, Trondheim, Bodø og Bergen.

Studien frå Kristiansund blei utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi i 2016. I samanlikningsstudiet blei det konkludert at differansen i normalområde mellom PT-INR i EDTA- og citrat-plasma ikkje var stor nok til å kunne gi ein klinisk skilnad. Dermed blei bruk av EDTA-plasma eigna som alternativt prøvemateriale. For pasientar med INR i det terapeutiske området konkluderte dei med at differansen var for stor, og dermed gav det ei klinisk tyding for pasientane. I haldbarheitsstudien blei det konkludert at EDTA var haldbart inntil 24 timar, før det gav ei signifikant tyding. Prøvar oppbevart ved 2-8 °C hadde betre haldbarheit enn prøvar i romtemperatur (3).

Bioingeniøren har publisert ein studie som er basert på ei bacheloroppgåve frå 2011, utført i Trondheim. Dei tok for seg haldbarheit og oppbevaring i ulike temperaturar av INR i citrat-plasma. Dei konkluderte med at citrat-plasma oppbevart i 2-8°C held seg meir stabilt enn i romtemperatur (4).

Studien utført ved Sentrallaboratoriet ved Nordlandssykehuset HF (NLSH) i Bodø såg på haldbarheit av koagulasjonsanalyser, der PT-INR var ein av dei. Det blei konkludert med at PT-INR hadde haldbarheit på 24 timar, der avpipettert citrat-plasma hadde betre haldbarheit enn plasma ståande på blodlekamar (5).

Studien ved Haukeland i Bergen tok for seg samanlikning og haldbarheit. Dei kom fram til var at PT-INR i EDTA-plasma låg systematisk lågare enn i citrat-plasma. Dei fann óg ut at citrat-plasma var haldbart i 24 timar, men at høg INR vil redusere haldbarheita (6).

1.4 Teori

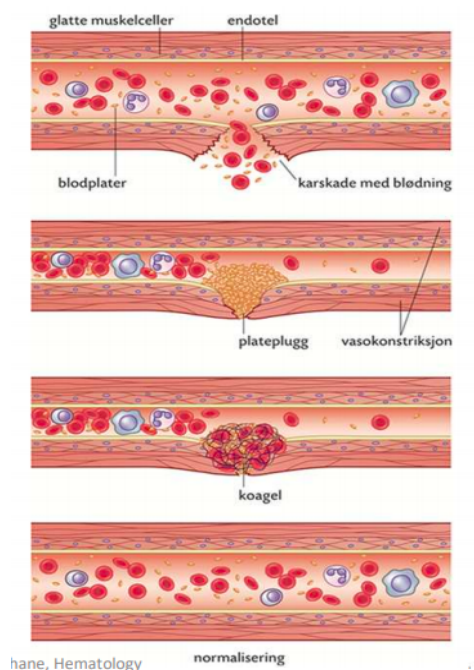
1.4.1 Hemostase

Skade i karveggen kan føre til bløding, og kroppen vil respondere ved å setje i gong ein fysiologisk koagulasjonsprosess. Dette omfattar at skaden blir tetta, at blodet held fram med å vere i væsketilstand og at koagelet blir fjerna. Desse funksjonane bidreg til å hindre stort blodtap. Karveggen er bygd opp av ei rekkje komponentar, der ein inst finn endotelceller.

Desse har ein barrierefunksjon ved at det skil komponentane i karveggen og blodet frå kvarandre, og dermed hindrar spontan hemostasereaksjon. Laga utanfor desse cellene er elastisk fiber og ekstracellulær matrix. Den ekstracellulære matrixen består av glatt muskulatur, fibroblastar og kollagen (7). Det dominerande strøymingsmønsteret i blodkara er laminær. Raude og kvite blodlekamar sirkulerer i midten av karet, medan blodplatene blir pressa ut mot karveggen. Dette gir blodplatene optimal plassering for å feste seg (adherere) ved skade i karveggen (8).

Ubalanse i koagulasjonssystemet, som til dømes ved bløding, kan vere livstrugande. Mangel på koagulasjonsfaktorar kan resultere i forlenga bløding, transfusjonsavhengigheit og kronisk inflammasjon. Fråvær av eit av proteina som kontrollerer koagulasjonssystemet, vil kunne føre til ukontrollert koagulasjon som vidare kan føre til slag og kardiovaskulære komplikasjonar (7).

Hemostase blir delt inn i fire hovudfasar, som vist på figur 1.4.1.1. Desse er vasokonstriksjon, primær hemostase, sekundær hemostase og fibrinolyse. Vasokonstriksjon er kontraksjon av musklane i åreveggen, og inngår i primær hemostase (8).



Figur 1.4.1.1: Hovudtrinn i ein hemostaseprosess (7).

1.4.2 Primær hemostase

Ein liten skade i karveggen aktiverer vasokonstriksjon, og dermed primær hemostase. Vidare vil kontraksjonen halde fram av stoff som blant anna serotonin frå aktiverte blodplater. Dette vil føre til reduksjon i arteriens diameter, gjennomstrøyminga i blodåra minimerast og avgrensar dermed blødinga (8, 9).

For å tette skaden vil det bli sett i gong ein adhesjonsprosess. Dette skjer ved at von Willebrands faktor (vWF) blir skilt ut frå endotelcellene i karveggen. Kofaktoren vWF blir skilt ut i plasma, samt i subendotellaget der vWF bind seg til kollagen og dannar eit kompleks. VWF blir aktivert av vasoaktive agens som til dømes trombin. Når trombocytar kjem i kontakt med vWF-kollagen-komplekset, så vil reseptorar på vWF bli eksponert. Trombocytane kan dermed feste seg til reseptorane, og vidare adherere til skadestaden på karoverflata og danne ein plateplugg. Samstundes vil endotelcellene skilje ut og dekkje seg sjølv med blant anna P-selektin, som fremjar trombocytbinding (7, 10).

Når karoverflata er dekkja av trombocytar vil det vidare skje ei aggregering, der trombocytane bind seg til kvarandre og dannar ein meir stabil plateplugg. Granula i trombocytane vil kunne skilje ut fleire substansar som deltek og forsterkar prosessane i hemostasen. Dette er til dømes vWF, fibrinogen, kalsium og adenosindifosfat (ADP). Etter at blodplatepluggen er danna, vil plasmamembranen til trombocytane translokere negativt lada fosfolipid frå innsida av cella til utsida. Fosfolipidet gjer at overflata til trombocytten verkar katalytisk, slik at koagulasjonsfaktorane seinare kan feste seg til blodplatepluggen og danne trombin (7, 10).

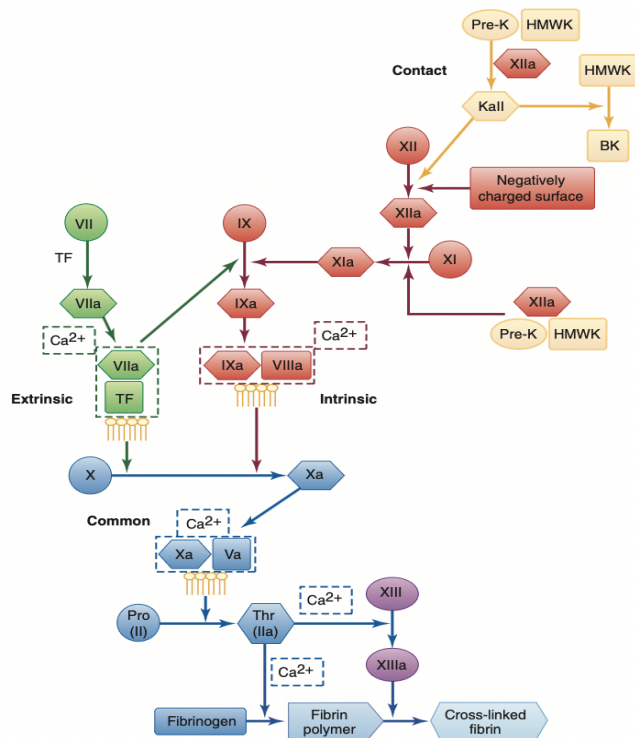
1.4.3 Sekundær hemostase

Sekundær hemostase fører til ei forsterking av blodplatepluggen ved større skadar på årevegg og omliggjande vev. Dette er ein kaskadereaksjon som førekjem etter aktivering av trombocytane i primær hemostase. Kaskaden omfattar fleire koagulasjonsfaktorar som aktiverer kvarandre, der sluttproduktet er fibrin (7). Koagulasjonsfaktorane verkar som kofaktorar ved å indusere aktiviteten til enzym i hemostaseprosessen, og skiljast ut frå blant anna endotelceller. Faktorane kan òg vere enzym som katalyserar reaksjonar. For å lettare forstå koagulasjonssystemet delast det inn i indre, ytre og felles veg, ut frå kvar

komponentane oppheld seg (8). *In vitro* vil prosessane skje samstundes, og ein kan sjå samanhangen av den komplekse prosessen på figur 1.4.3.1.

Ein viktig aktivator som deltek i koagulasjonen er vevsfaktor (VF), som ein finn på fibroblastane og den glatte muskulaturen i karveggen. Når skaden oppstår vil faktor VII, som ein finn i blodet, lekkje inn og aktivere VF. Aktivert VF og kofaktor V vil danne eit kompleks og fremje danning av faktor X, som ein kallar den ytre koagulasjonsvegen. Vidare vil komplekset aktivere trombin som spelar ei sentral rolle i omdanninga av fibrinogen til fibrin. Prosessane frå aktivering av faktor X til danning av fibrin kallast felles koagulasjonsveg, og er merka med "common" på figur 1.4.3.1 (7).

Prekallikrein (Pre-K) nyttar High-molecular-weight kininogen (HMWK) som kofaktor i den indre koagulasjonsvegen. Prekallikrein-HMWK-komplekset aktiverast av faktor XIIa, som igjen bidreg til aktivering av faktor XI. Denne faktoren aktiverer faktor IX, som også kan bli aktivert av trombin og VF-VIIa-komplekset frå den ytre veggen. Trombin aktiverer FVIII og ein får FVIIIa som bind FIXa og kalsiumion. FIXa-VIIIa-Ca²⁺-komplekset aktiverer FX, som er starten på felles koagulasjonsveg. Sluttproduktet i koagulasjonsprosessen er fibrin som bidreg til å stabilisere blodplatepluggen som blei danna i primærhemostasen (7).



Figur 1.4.3.1: Koagulasjonskaskaden frå start til det blir danna fibrin. Bokstaven "a" bak koagulasjonsfaktorane tyder at faktoren er i aktivert form. (11).

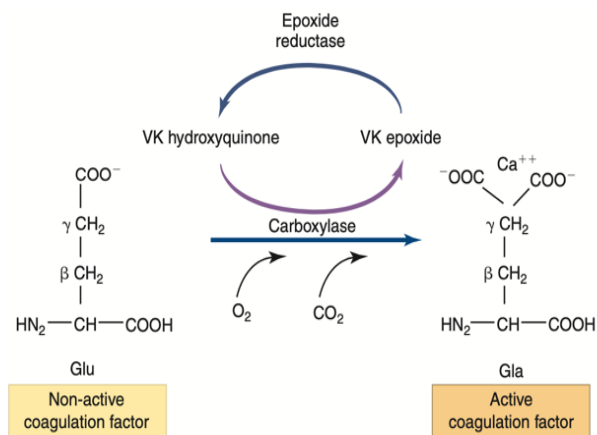
1.4.4 Fibrinolyse

Fibrinolyse er den siste delen av hemostaseprosessen. Etter kvart som normal karveggstruktur blir regenerert vil den tidlegare danna fibrinkloten bli fjerna. Som ein respons på koagulering vil endotelcellene i karveggen skilje ut enzymet Tissue Plasminogen Activator (TPA), som aktiverer fibrinolyseprosessen. Enzymet omdannar fibrin-bunden plasminogen til enzymet plasmin. Vidare vil plasmin spalte fibrin ein finn i koagelet, og blodstrøymen i blodåra vil gå tilbake til normalen etter kvart som koagelet blir nedbrote (7).

Endotelcellene vil òg skilje ut ulike inhibitorarar, som til dømes PAI-1. Den inhiberer TPA slik at den ikkje dannar for mykje plasmin, og dermed unngår ein rask nedbryting av fibrin. Dette gjer at såret får tid til å gro. På den andre sida vil utilstrekkeleg fibrinolyse kunne føre til blant anna trombose. Det er difor viktig at ein har god balanse mellom aktivatorar og inhibitorar som deltek i prosessen (7).

1.4.5 Danning av koagulasjonsfaktorar

Vitamin K er eit feittløyselig vitamin, og er nødvendig for produksjon av protrombin og ei rekkje andre protein som koagulasjonsfaktorane II, VII, IX, X og proteina C, S og Z (12). Koagulasjonsfaktorane og proteina inneheld glutaminsyre, som allereie har ei ionisert karboksylsyregruppe. Ei rekkje kjemiske prosessar fører til at glutaminsyra får enda ei ionsiert karboksylsyre frå vitamin-K, slik at den totalt har to (sjå figur 1.4.5.1). Glutaminsyre med to ioniserte karboksylsyrer blir kalla gammakarboksylglutaminsyre. Den får dermed danna ei netto negativ lading, som gjer at den kan binde seg til ionisert kalsium (Ca^{2+}). Bindinga til kalsium vil resultere i ei netto positiv ladning, og komplekset kan då binde seg til negativt lada fosfolipid. Kompleksbindinga mellom gammakarboksylglutaminsyre, kalsium og fosfolipidoverflata vil gjere at dei kan danne kompleks med andre koagulasjonsfaktorar. Vitamin K-mangel gjer at komplekset ikkje kan dannast (11).



Figur 1.4.5.1 Posttranslasjonell γ -karboksylering av dei vitamin K-avhengige koagulasjonsproteina (11).

Vitamin K-mangel eller bruk av vitamin K-antagonistar, som til dømes warfarin (Marevan), påverkar koagulasjonsfaktorane ved at glutaminsyra ikkje blir omdanna til gammakarboksylglutaminsyre. Koagulasjonsfaktorane (II, VII, IX, X) og essensielle protein vil dermed ikkje bli aktivert, som resulterer i fråverande deltaking i koagulasjonsprosessen (11, 13).

1.4.6 Koagulasjonshemmande medikament

Ulike medikament kan påvirke PT-INR, og blir i hovudsak nytta til å overvake pasientar som blir behandla med Marevan. Marevan er blodfortynnande medikament, og blir nytta blant anna for å førebyggje blodpropp (14). Verkestoffet til Marevan er warfarin, og effekten kan vurderast ved hjelp av PT-INR. Di høgare INR, di mindre evne har blodet til å levre (15). Blodet si evne til å koagulere blir nedsett, og warfarin har dermed ein antikoagulerande effekt. Pasientar som blir behandla med Marevan blir følgt nøye opp ved å kontrollere PT-INR, slik at pasienten ligg på ein akseptabel verdi i forhold til dosering. Effekten av medikamentet held fram 4-5 dagar etter seponering, og det tek 4-7 dagar etter Marevan-start før pasienten er i terapeutisk antikoagulasjonsnivå (8, 16).

Andre antikoagulerande medikament som Albyl-E, Acetylsalisylsyre, Klexane, Lixiana og Elquis påverkar ikkje INR i same grad som Marevan. Albyl-E og Acetylsalisylsyre inneheld verkestoffet acetylsalisylsyre som hemmar blodplatene ved å hindre aktivering og aggregering (16, 17). Klexane inneheld verkestoffet enoksaparin, Lixiana inneheld verkestoffet edoksaban og Eliquis inneheld apixaban. Alle desse medikamenta hemmar faktor Xa og trombinaseaktivitet (18, 19, 20).

1.4.7 PT-INR

PT-INR er ein analyse som brukast til å definere pasientens protrombintid, og reagenset som nyttast inneheld ikkje faktor II, VII og X. INR speglar koagulasjonstida, og er avhengig av at ein har tilstrekkeleg med desse faktorane i plasma. Reagenset inneheld derimot optimale mengder av alle andre koagulasjonsfaktorar og tromboplastin. Dersom pasienten manglar éin eller fleire av desse faktorane, vil det resultere i lang koagulasjonstid. Motsett vil høgt faktornivå gi kort koagulasjonstid. Koagulasjonstida ein målar ved PT-INR blir påverka av koagulasjonshemmande medikament (7). Terapeutisk område er mellom 2,0 – 3,0, medan referanseområde for pasientar som ikkje får antikoagulasjonsbehandling er 0,9 – 1,2 (21). Formel 1.4.7.1 viser korleis ein reknar PT-INR frå sekund til ISI.

$$PT - INR: \frac{\text{pasientens protrombintid(sek)}}{\text{protrombintid(sek) i normalplasma}} ISI$$

Formel 1.4.7.1: Viser utrekning av PT-INR frå sekund til ISI (8).

ISI-verdien (Internasjonal sensitivitets indeks) uttrykkjer følsamheita til tromboplastinreagenset for reduksjon i aktiviteten til koagulasjonsfaktorane. Tromboplastin kan har ulik ISI-verdi avhengig av produsent. WHO har eit reagens definert ISI lik 1 som tromboplastin-plasmastandard, og produsentane må kalibrere reagens opp mot denne. Noreg og Sverige kalibrerar PT-INR med kalibratorar frå EQUALIS (8).

1.4.8 Prøveglas

Avhengig av kva analyse som skal utførast, krev ein røyr med ulik tilsetning for optimalt prøveresultat. Til blodprøvetaking kan ein nytte mange typar glas, som til dømes citrat- og EDTA-røyr. Citrat-røyr er standard prøveglas for PT-INR.

Citrat-røyr er har blå kork, og er vanlegvis fylt med 3,2% flytande natrium-citrat. Det verkar antikoagulerande ved at det bind kalsiumion i plasma, og blokkerer danning av trombe. På laboratoriet har ein fleire typar citrat-røyr. Til koagulasjonsanalyse nyttar ein vanlegvis 9NC-røyr som indikerer at den antikoagulerande løysninga blir blanda med blod for å framstille eit 9:1 forhold. Med ni delar fullblod og ein del antikoagulant blir det blanda 0,3 mL antikoagulant med 2,7 mL fullblod (7).

EDTA-røyr har lilla kork, og blir vanlegvis nytta til hematologiske analysar. Røyrret inneheld dikalium etylendiamintetraacetat (K₂EDTA), som i likskap med natrium-citrat verkar antikoagulerande. EDTA bind seg til kalsiumion og hemmar koagulering. Citrat- og EDTA-røyr har ulik fortynning grunna væsketilsetjinga i citrat-røyrret. K₂EDTA er tørrstoff og vil ikkje påverke fortynningsforholdet i EDTA-røyrret. Bruk av EDTA-plasma til PT-INR gjer at ein må multiplisere INR i EDTA-plasma med 1,1 for å få same fortynning som citrat-plasma

(7).

1.4.9 Preanalytiske faktorar for PT-INR

Det er viktig at helsepersonell som utfører blodprøvetaking er klar over dei preanalytiske faktorane som kan påverke analysesvara. Det er viktig å nytte riktig prøveglas ved blodprøvetaking. Dersom ein til dømes nyttar EDTA-røyr til PT-INR, vil klottingtida bli forlenga. EDTA vil binde kalsiumion i blodet, og kan gi falskt for høge prøveresultat (22).

Hemolyse er ein av dei viktigaste preanalytiske faktorane ein helst skal unngå. Dette kan oppstå ved til dømes for lang stasebruk, om ein blandar prøva for hardt eller nyttar nål med for liten diameter. Ulike membran- og intracellulære komponentar vil lekkje ut av erytrocyttar ved hemolyse. Dette vil aktivere koagulasjonsfaktorar, og dermed påverke analyseresultata. Samstundes vil hemolyse kunne gi høg bakgrunnsabsorbans når ein nyttar metodar med lystransmittering, og på den måten påverke avlesinga (22, 23).

Det er viktig at ein forsikrar seg om at prøverøyret er fylt til det angjeve merket, for å sikre riktig forhold mellom blodmengde og antikoagulant. Underfylling av røyret kan gi falskt forhøga prøveresultat grunna feil fortytning og auka binding av kalsium (14). Ein må nytte kasteglas ved bruk av butterfly-nål, sidan luft i slangen vil påverke blandingsforholdet. Kasteglaset må vere eit glas utan tilsetjing eller eit citrat-glas, for å unngå forureining som kan påverke koagulasjonsanalysa (22). Grunna tilsetjingar i røyra er det viktig å blande dei godt etter prøvetaking, for å unngå feil fortytning (10). Oppbevaring utan kork resulterer i tap av CO₂ og auka pH, som også kan påverke INR (23).

Prøvar som inneheld natrium-citrat skal sentrifugerast ved romtemperatur (15-25 °C), då temperaturar under 15 °C kan aktivere blodplatene (22). Haldbarheita av citrat-plasma etter sentrifugering er 48 timar, og skal oppbevarast i temperaturar mellom 20-25 °C (sjå vedlegg 3).

1.4.10 Statistiske metodar

Lineær regresjon er ein statistisk metode for å undersøke om det er ein lineær samanheng mellom to ulike metodar. Lineariteten skildrar samanhengen mellom datasetta x og y .

Regresjonsanalysar gir ei oversikt over verdiar frå ein testmetode (y) ut frå ein gitt referansemetode (x). Regresjonsanalyse gir ei likning der skjeringpunktet målar systematisk differanse, medan stigningstalet i likninga målar proporsjonal differanse mellom to metodar (24).

Passing-Bablok plot er ein regresjonsanalyse som nyttast for å samanlikne to analytiske metodar. Det er ein ikkje-parametrisk metode, og er robust for slengarar. Slengarar er punkt som avviker sterkt, og ein mistenker at det har oppstått ein feil. Metoden tek omsyn til måleusikkerheit både i x - og y -verdiar. Den er mindre presis i rekninga av regresjonslikninga, og kan dermed ikkje nyttast om samanhengen mellom x - og y -verdiane ikkje er rettlinja.

Regresjonslikninga er oppgitt som $y = b + ax$, der b er skjeringpunktet og a er stigningstalet.

Dersom stigningstalet er forskjellig frå ein er det proporsjonalitet mellom metodane.

Skjeringpunkt ulikt frå null tyder at det er eit konstant avvik i ein av metodane.

Konfidensintervallet seier om avvika er signifikante eller ikkje (25, 26).

Det er ein del av metodevalidering å samanlikne to metodar for å finne ut om den eine metoden kan erstatte den andre, eller om dei kan nyttast om kvarandre. Etter parallellanalysering av dei to metodane, skal differansen mellom metodane ideelt sett vere lik null. Parvise differansar nyttast dermed til å sjå om målemetodane gir systematisk ulikt resultat. For å vurdere verdiar frå to metodar kan ein nytte differanseplot, som til dømes Bland-Altman. Dette plottet presenterer gjennomsnittet og differansen mellom to metodar, og viser om verdiane ligg innanfor gitte grenser, limit of agreement (LoA). Punkt som ligg til høgre på x -aksen har høg gjennomsnittsverdi, medan punkt som ligg lågt på y -aksen har låg differanse. Positiv differanse tyder at testmetoden målar høgare enn referansemetoden, medan negativ differanse tyder at referansemetoden målar høgare enn testmetoden (25).

Haldbarheitsstudiar tek for seg evna eit prøvemateriale har til å oppretthalde den opphavlege måleverdien over eit gitt tidsintervall ved definerte forhold. Det finst to ulike metodar for innsamling av prøvemateriale til haldbarheitsstudiar, batch- og bukse-metoden. Batch-metoden går ut på å samle inn materiale frå individ, og å fordele prøvane på dei oppbevaringstemperaturane og tidene som er gitt. Metoden tilseier at ein skal fryse ned prøvane etter at dei har stått ut gitt tid, deretter tine prøvane for å analysere alle samstundes. Buksemetoden er ein metode som nyttast når oppbevaringsmetoden for materialet er usikkert (27).

For å vurdere haldbarheita til eit prøvemateriale set ein akseptgrenser. Det finst tre ulike modellar for setjing av akseptgrenser, og desse er klinisk utfall, biologisk variasjon og state-of-the-art. Modellen om klinisk utfall omhandlar korleis effekten til analysen kan påverke det kliniske utfallet. Biologisk variasjon har som hensikt å minimere forholdet mellom analytisk støy og det biologiske signalet. Denne modellen er streng og gir smale grenser. Modellen for state-of-the-art går ut på å strekkje det tekniske nivået høgast mogleg for å betre kvaliteten på analysen (27, 28).

Ein set to akseptgrenser i form av tillat bias og tillat totalfeil for å vurdere om endringa over tid er signifikant. Tillat bias omfattar gjennomsnittsverdien til prøvane, og er den største prosentvise endringa dei kan ha frå ei tid til ei anna. Denne akseptgrensa nyttast til vurdering ved at det blir sett eit 90% konfidensintervall basert på gjennomsnittet av prøvane. Ein kan vurdere prøvematerialet som haldbart dersom heile konfidensintervallet ligg innanfor akseptgrensene for tillat bias. Dersom konfidensintervallet ligg utanfor tillat bias kan ein ikkje vurdere prøvemateriale haldbart. Fleire prøvar vil gi større sannsyn for at ein trekkjer riktig konklusjon, og ein vil då kunne få eit smalare konfidensintervall. Tillat totalfeil er basert på enkeltverdiar, og er den største prosentvise endringa dei kan ha for å vere haldbare. Dersom 5% av enkeltverdiane ved analysetidspunktet ligg utanfor tillat totalfeil, burde ein vurdere materialet som ikkje haldbart. For at ein skal trekkje ein sikker konklusjon frå studien er det viktig at ein vurderer både gjennomsnittsverdiane og enkeltverdiane i ein heilskap (27).

2 Materiale og metode

2.1 Innsamling av materiale og sentrifugering

Innsamlinga av materialet føregjekk på Ålesund sjukehus ved Avdeling for medisinsk biokjemi, og blei gjennomført over seks dagar. Det blei samla inn totalt 57 prøvar frå tilsette ved laboratoriet, pasientar på poliklinikken og av inneliggjande pasientar. Pasientar som behandlast med antikoagulerande medikament blei inkludert i studien for å få god spreing av resultat. Alle deltakarar fekk munnleg og skriftleg informasjon om studien, samt måtte dei signere på eit samstykkeskjema (sjå vedlegg 2). 45 prøvar vart teke på poliklinikk, kvar éin av deltakarane kom etter invitasjon frå rettleiar (sjå vedlegg 7). Ni prøvar blei teke av inneliggjande pasientar og tre av tilsette.

Det blei tatt omsyn til preanalytiske faktorar som kan påverke citrat-røyr og INR-analysen. Blodprøvane blei teke i høve med prosedyrane til Ålesund sjukehus for venøs blodprøvetaking (sjå vedlegg 6), og anonymisert før analysering. Til metodesamanlikninga blei følgjande røyr blei teke per deltakar: eit EDTA-røyr (4 mL) og eit citrat-røyr (4 mL). I haldbarheitsundersøkinga blei det nytta eit EDTA-røyr (6 mL) og to citrat-røyr (4 mL) per deltakar. Vacuette-røyra er produsert av Greiner Bio-one. Etter anonymisering blei røyra nummerert for å separere røyr og deltakar. Det blei også skilt mellom pasientar med normale verdiar og pasientar som blei behandla med antikoagulante medikament (sjå vedlegg 4).

Prøvane blei sentrifugert i 15 minutt ved 22°C innan 30 minutt etter prøvetaking med eit slingringsmon på ± 10 minutt. Det blei nytta sentrifuga Kubota 5922. Prøvane blei analysert raskast mogleg etter sentrifugering, med ei grense på ein time etter prøvetaking for å kunne analysere fleire prøvar samstundes.

2.2 Samanlikning

Totalt var det 57 deltakarar som deltok i metodesamanlikninga, kvar 33 av prøvane vart analysert som nullprøva ved haldbarheitsundersøkinga. 28 av 57 som deltok blei behandla med antikoagulerande medikament. 10 av dei 28 som blei behandla med medikament fekk behandling med Marevan (sjå vedlegg 5). Prøvene blei sentrifugert og analysert fortløpande etter prøvetaking.

2.3 Haldbarheit

Til innsamling og analysering blei Batch-metoden nytta, med unntak av nedfrysing. I haldbarheitsundersøkinga deltok 33 personar, der 17 av deltakarane blei behandla med antikoagulerande medikament (sjå vedlegg 6). Over 24 timar blei det undersøkt haldbarheita av INR i EDTA- og citrat-plasma ved oppbevaring i romtemperatur, samt ved 2-8 °C. I løpet av eit døgn blei det gjennomført fem analyseringar per prøve. Første prøve blei analysert innan ein time etter prøvetaking og blir rekna som nullprøve. Vidare blei analyseringane gjort etter 5, 8, 12 og 24 timar.

Materialet i citrat-røyret blei oppbevart sentrifugert på blodlekamar i tråd med prosedyra for oppbevaring av citrat-røyr ved Ålesund sjukehus (sjå vedlegg 3). EDTA-blodet blei avpipettert til 10 plast-røyr, der fem av røyra blei oppbevart ved 2-8 °C og fem i romtemperatur. I undersøkinga blei EDTA-blod oppbevart usentrifugert i plast-røyr fram til analysering, for at lagringa av fullblodet skulle vere i samsvar med Ålesund sjukehus sine retningslinjer. EDTA-røyr blei sentrifugert like før analysering og avpipettert til nye mikrotainer-røyr. Alle prøvar blei bestilt manuelt på Sysmex CS-5100 (sjå vedlegg 10).

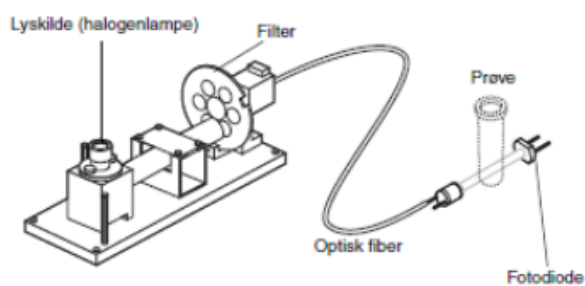
2.4 Sysmex CS-5100

Sysmex CS-5100 er eit instrument produsert av Siemens Healthineers, og blir nytta til ei rekkje koagulasjonsanalysar som blant anna PT-INR. Dette instrumentet blir nytta ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Ålesund sjukehus, sjå figur 2.4.1. Analysemaskina har fire analyseprinsipp, avhengig av kva analyse den skal gjennomføre: klotting-, kromogen-, aggregering- og immunologisk metode (29).



Figur 2.4.1 – Sysmex CS-5100 (29).

Instrumentet nyttar klottingmetoden når den skal analysere PT-INR i pasientprøvar ved at den målar endring i prøva sin optiske tettleik. Det blir gjort ved å sende polykromatisk lys inn mot ein kollimator som skal minimere lysets spreining. Det parallelle lyset sendast gjennom eit filter slik ein får ynskja bølgelengd. Gjennom optiske fiber transporterast lyset til ei linse som fokuserer strålane mot kyvetta som inneheld prøvematerialet og reagens. Lyset treff fibrinrådar i prøva og spreier seg. Dermed blir det detektert mindre lys av fotodioden, sjå figur 2.4.2. Dette resulterer i auka optisk tettleik og mindre lysabsorbans. Høg lysdeteksjon kjem av lite fibrin i plasma, noko som gir lengre klottingtid og høg INR (7).



Figur 2.4.2 – Optisk klotting metode (5).

2.5 Reagens, kontroll og kalibrator

Reagens som nyttast til analysen PT-INR er Owrens PT, Owrens buffer og CaCl₂, og leverast av Simens Healthineers. Sjå tabell 2.5.1 for lot-nummer til reagensa. Utfyllande informasjon om reagens finn ein i vedlegg 3.

Tabell 2.5.1 – Reagens og lot-nummer

Reagens	Lot
Owrens PT	21438 og 21627
Owrens buffer	22026 og 22026
CaCl ₂	563894 og 563894

Analysemetoden for PT-INR blei kontrollert med intern kvalitetskontroll i samsvar med avdelinga sine prosedyrar. Kontrollar som blei nytta var Abnormal Multi Control OKP (MediRox) og Control Plasma N (Siemens). Sjå vedlegg 8 for lot, reell verdi og akseptgrenser. Til kalibrering blei det brukt Equalis PT-INR kalibrator (Equalis, Sverige) med lotnummer 37, 38 og 39. Kontrollane blei analysert etter at kalibrering blei godkjent.

2.6 Statistiske metodar

Ein kan nytte ulike grafar for å vurdere samsvar mellom to metodar. Passing-Bablok og Bland-Altman eignar seg godt til dette, og desse blei difor nytta. Til rekning av plotta tok ein i bruk Analyze it i Excel. I Passing-Bablok blei PT-INR i citrat-plasma rekna som referanse, medan PT-INR i EDTA-plasma vart rekna som testmetode. Regresjonsanalysen blei rekna med 95% konfidensintervall. Det forventast at metodane som samanliknast har ein lineær samanheng med god korrelasjon. Til Bland-Altman plot nyttar ein gjennomsnittsverdi av INR i EDTA- og citrat-plasma på x-aksen, og blei rekna ved å addere INR i citrat- og EDTA-plasma for kvar enkelt pasient og dividere på to. På y-aksen finn ein differansen mellom INR i citrat- og EDTA-plasma. Her er INR i citrat-røyra subtrahert frå INR i EDTA-røyra. Dette plottet har også 95% konfidensintervall, og viser kvar pasient-resultata ligg i forhold til gjennomsnittet. I plottet blir det framstilt absolutte verdiar då dette gav betre oversikt enn relative verdiar rekna i prosent.

For haldbarheitsstudiar finst det, som tidlegare nemnt, tre ulike metodar for å fastsetje akseptgrenser. I denne undersøkinga vart det teke i bruk modell nummer tre fastsett i konsensusdokumentet, som tar utgangspunkt i state-of-the-art (28). Det blei sett to kliniske akseptgrenser, tillat bias og tillat totalfeil. I dialogg med rettleiar blei det sett maks tillat bias på 5%, og maks tillat totalfeil på 10%. Desse grensene vart sett av legegruppa i Midt-Norge, og er basert på tidlegare haldbarheitsstudiar. I undersøkinga vart det teke i bruk ein Excel-mal henta frå Noklus kalla “Holdbarhet Batch vs. A” (30). Dette gav to ulike plot som framstilte haldbarheita til prøvane ved analysing av PT-INR over 24 timar.

2.6 Ethiske vurderingar

I studien blei det gjort ei rekkje etiske vurderingar. Pasientar med mange analysebestillingar, samt dei som var ukomfortable med prøvetaking blei ikkje inkludert i studien. Deltakarane i studien skreiv under på eit samtykkjeskjema som informerte om prøvebehandlinga og anonymisering. Prøvematerialet blei brukt opp, og blei dermed ikkje lagra i biobanken. Studien er anonymisert og dermed finst det ingen koplingsnøkkel mellom prøvenummer og deltakar. Dette var ein studie angående kvalitetssikringsarbeid i laboratoriet, og innebar ikkje pasientinformasjon og helseforskning. Det blei difor ikkje søkt om godkjenning for utføring av studien frå NSD og REK (31).

3 Resultat

Innsamla data til studien blei presentert i ulike plott, og vidare nytta til å svare på problemstillinga presentert i innleiingskapittelet. Verdiane blei grafisk framstilt, og gav grunnlaget for diskusjonen i oppgåva.

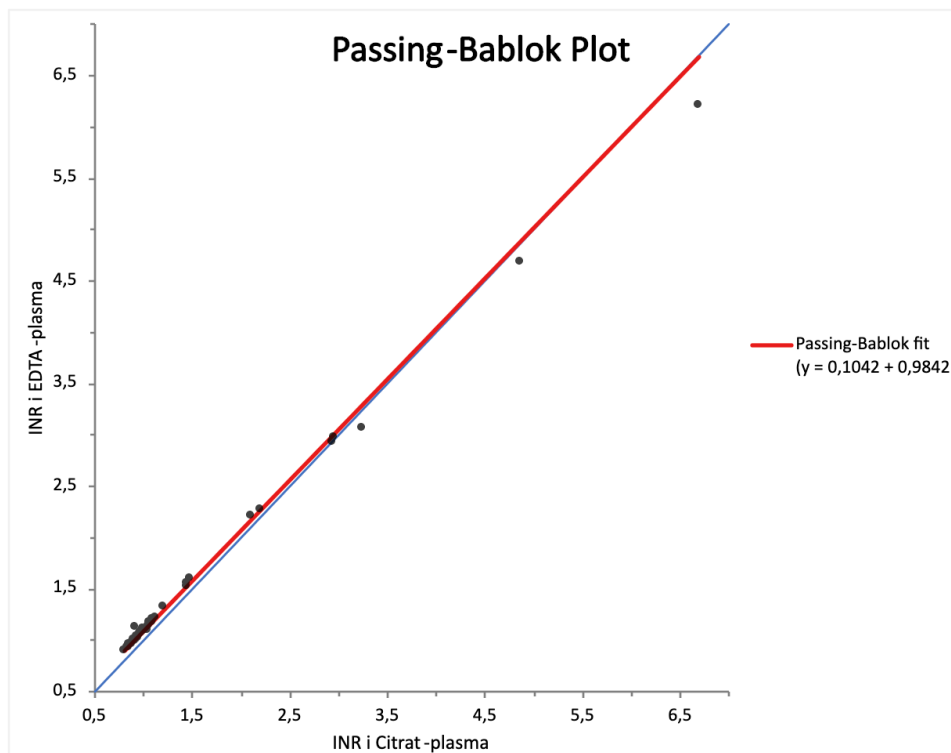
3.1 Kontrollar

Analysing av kontrollar blei utført jamnleg, og godkjent før analysing av pasientprøvar. Detaljert oversikt over kontrollresultat og akseptgrenser, samt klokkeslett og dato finn ein i vedlegg 8. Alle kontrollane låg innanfor akseptgrensene.

3.2 Samanlikning

3.2.1 Passing-Bablok Plot

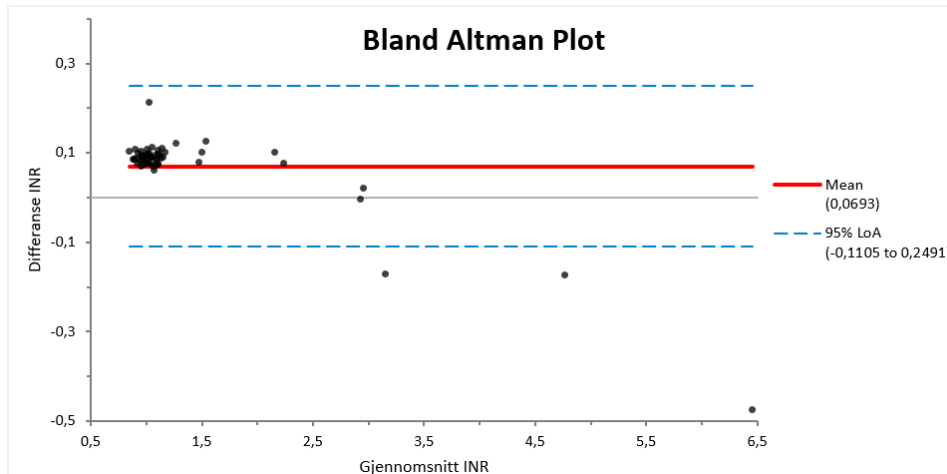
Figur 3.2.1.1 viser Passing-Bablok plot for PT-INR. Regresjonslinja er oppgitt som $y = 0,1042 + 0,9842 x$, der stigningstalet er 0,9842 og skjæringspunktet er 0,1042. Konstantledd og stigningstal har ikkje dei ideelle verdiane 0 og 1. På denne grafen er det nytta øvre og nedre grenseverdier med konfidensintervall på 95%. Metoden er sensitiv for slengarar, men alle punkta ligg i nærleiken av regresjonslinja. Regresjonslinja ligg litt over den blå, ideelle linja.



Figur 3.2.1.1 - Passing-Bablok-plot. På X-aksen finn ein INR i citrat, medan på Y-aksen ligg INR i EDTA. Regresjonslinja er raud og den ideelle linja er blå.

3.2.2 Bland-Altman Plot

Figur 3.2.2.1 viser eit Bland-Altman plot for PT-INR. Dei fleste verdiane ligg innanfor grenseverdiane som er 95%, medan tre av verdiane ligg utanfor grensene. Den gjennomsnittlege differansen av INR i dei to ulike prøvemateriala er 0,0693.



Figur 3.2.2.1 – Bland-Altman plot. X-aksen representerer gjennomsnitt i INR mellom EDTA- og citrat-plasma, og er oppgitt i INR-einingar. På Y-aksen ligg differansen i INR mellom EDTA- og citrat-plasma i absolute verdiar. Den grå linja indikerer y-verdi lik null.

3.3 Haldbarheit

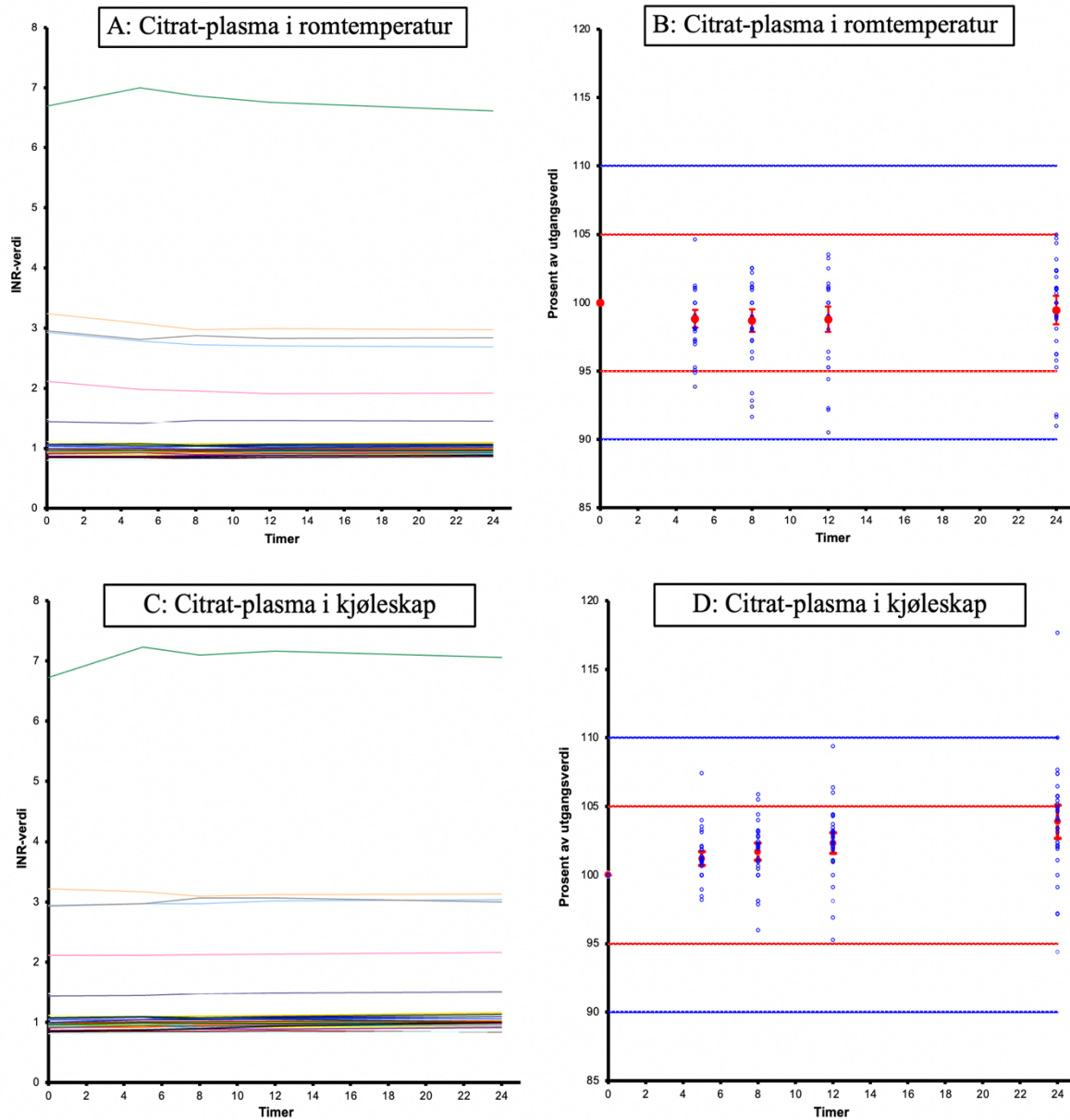
Resultatet av haldbarheitsundersøkinga er presentert i plot. Plotta til venstre viser endringa av PT-INR til kvar enkelt prøve over eit gitt tidsintervall, som i denne undersøkinga var opp til 24 timar. I plotta til høgre presenterast ei prosentvis endring av prøvane ut frå utgangsverdien (100%) over det gitte tidsintervallet. Dette gjeldt både for enkeltprøvane samt for gjennomsnittet av dei.

3.3.1 Citrat

Figur 3.3.1.1 A og B presenterer PT-INR analysert i citrat-plasma oppbevart i romtemperatur. På figur A ser ein at deltakarar med verdiar for INR i normalområdet hadde liten endring over det gitte tidsintervallet. Prøvar med verdiar som ligg over normalområdet viser større variasjon over tid. Gjennomsnittet av prøvane og tilhøyrande 90% konfidensintervall ligg innanfor tillat bias for alle timane, som vist i figur B. Enkeltprøvane ligg innanfor tillat totalfeil.

Figur 3.3.1.1 C og D viser PT-INR analysert i citrat-plasma oppbevart ved 2-8 °C. Figur C viser at prøvar med INR innanfor normalområdet ligg stabilt over 24 timar. Det viser óg at INR over normalområdet held seg mindre stabilt over tid. Figur D viser at prøvane har ei

jamn auking over tid. Gjennomsnittet ligg innanfor tillat bias opp til 12 timar, men nærmar seg den øvre grensa for tillat bias etter 24 timar. Tilhøyrande 90% konfidensintervall ligg rett over den øvre grensa for tillat bias etter 24 timar.



Figur 3.3.1.1 - A og B: citrat-plasma oppbevart i romtemperatur. C og D: citrat-plasma oppbevart ved 2-8 °C. I figur A og C vil kvar linje i diagrammet representere ein pasient sin INR ved analysering over 24 timar. Figur 3.3.1.1 B og D: enkeltprøvene visast som lyseblå prikkar og maksimal tillat totalfeil er presentert som blå, horisontale linjer. Tillat bias er dei raude, horisontale linjene, medan gjennomsnittet av pasientprøvene er dei raude prikkane i diagrammet. Konfidensintervall visast som raude, vertikale linjer.

3.3.2 EDTA

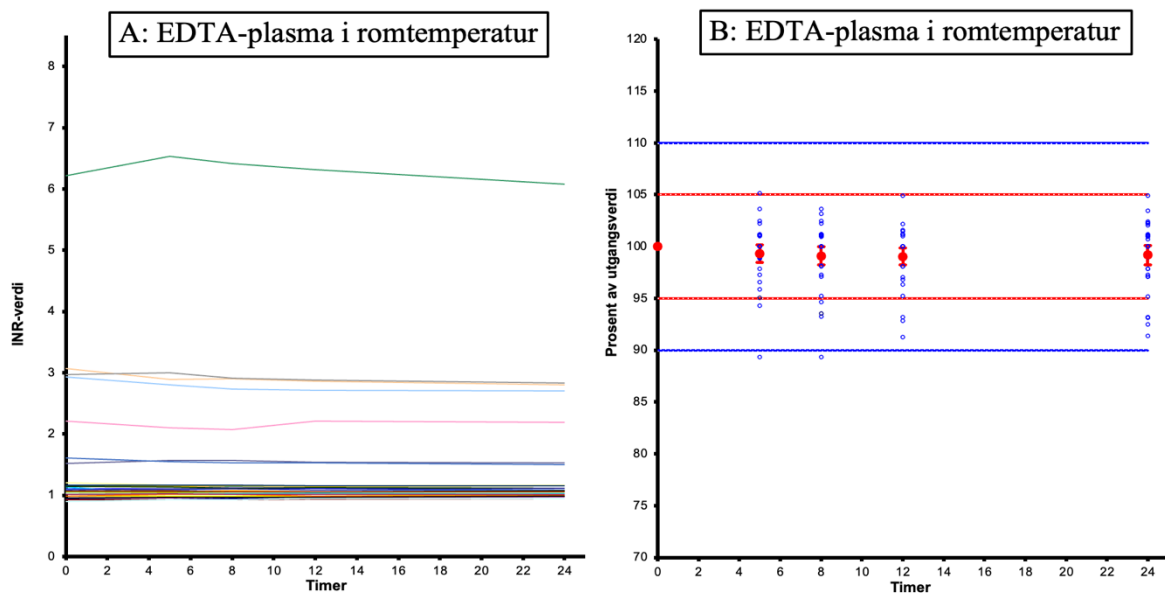
Figur 3.3.2.1 A og B presenterer INR analysert i EDTA-plasma oppbevart i romtemperatur.

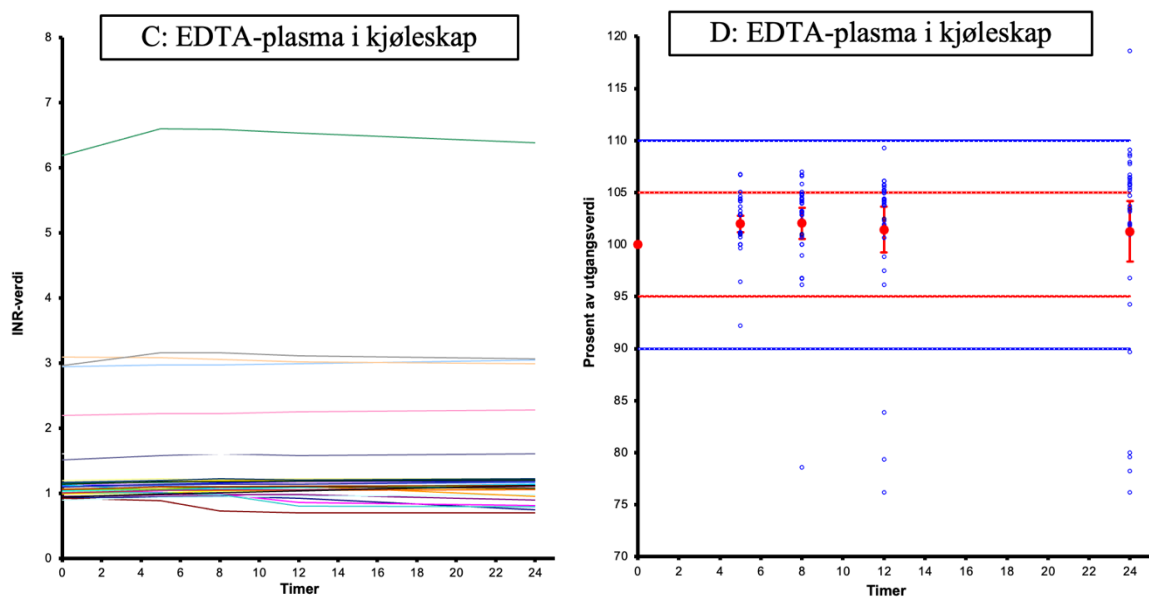
Figur A viser at prøvane som ligg innanfor normalområdet er stabile over 24 timar, og at prøvane ser meir ustabile ut di høgare INR deltakaren har. Figur B viser at gjennomsnittet av prøvane og tilhøyrande 90% konfidensintervall ligg innanfor tillat bias. Alle utanom éin prøve ligg innanfor grensa for tillat totalfeil.

Figur 3.3.2.1 C og D presenterer INR analysert i EDTA-plasma lagra ved 2-8 °C. Figur C viser at deltakarar med normalverdiar generelt er stabile over tid, med unntak av éin prøve.

Prøvar med INR over normalområdet er meir ustabile over tid. Figur 3.3.2.1 D viser at gjennomsnittsverdiar og gitt konfidensintervall ligg innanfor tillat bias opp til 24 timar.

Konfidensintervallet blir breiare over tid, og nærmar seg den øvre grensa etter 24 timar. Tal på prøvar som ikkje oppfyller kravet for tillat totalfeil aukar over tid, og endar med at 5 av 33 prøvar ligg utanfor grensa etter 24 timar.





Figur 3.3.2.1 - A og B: EDTA-plasma oppbevart i romtemperatur. C og D: EDTA-plasma oppbevart ved 2-8 °C. Figur A og C viser INR for kvar pasient over tid. Figur 3.3.2.1 B og D viser gjennomsnitt av pasientane sin INR per analyseringstime og presenterast som ein raud prikk. Enkeltprøvane er blå prikkar. Tillat totalfeil er ei blå, horisontal linje, medan dei raude, horisontale linjene er tillat bias. Konfidensintervalla blir framstilt som ei raud, loddrett linje.

I vedlegg 9 kan ein sjå verdiar for INR og plot frå haldbarheitsundersøkinga, medan i vedlegg 1 kan ein sjå Excel-dokumentet som blei nytta til metodesamanlikninga. Vedlegg 4 viser detaljerte tabellar med alle verdiane som er resultatet av studien. Der er det også oppgitt kva medikament pasienten eventuelt går på ved sida av prøvenummeret for dei ulike problemstillingane.

4 Diskusjon

Studien består av to problemstillingar. Den første omhandlar ei metodesamanlikning av INR i EDTA- og citrat-plasma, og den andre omhandlar verifisering av haldbarheita for prøvemateriala over 24 timar. Under blir resultatata frå undersøkingane diskutert med bakgrunn i statistiske metodar som er skildra i teori.

I følgje ein rapport frå Noklus er citrat-plasma nytta til PT-INR ikkje haldbart ved låge temperaturar, fordi faktor VII kan bli aktivert og resultere i forhøga INR (23). Prøvene i vår studie vart ikkje fryst ned slik det eigentleg skal gjerast ved bruk av batch-metoden. Dette fordi det ikkje er optimalt å fryse citrat-plasma som blir nytta til koagulasjonsanalysar (32). Nedfrysing ville ført til større usikkerheit av prøveresultatata. Prøvene blei analysert kontinuerleg etter innsamling, og gir grunnlag for dag til dag variasjon. Laboratoriet ved Ålesund sjukehus lagrar citrat-plasma på blodlekamar i romtemperatur, og dermed vart prøvene behandla slik. Citrat-blodet blei sentrifugert og oppbevart på blodlekamar i originalglaset med kork, fordi lagring utan kork kan auke INR (23). Ein tidlegare studie utført i Bodø viste at avpipettert citrat-plasma oppbevart i romtemperatur hadde betre haldbarheit enn plasma lagra på blodlekamar (5). Det er då mogleg at ein kunna betra haldbarheita ved å avpipettere plasma over i sekundærglas.

Etter vurdering av prøveresultatata vart det sett opp ein innsamlingsdag ein måned etter opphavleg prøveinnsamling, grunna for få prøvar. Fleire prøvar gav betre grunnlag for riktig vurdering av det totale resultatet. For å unngå maskinell variasjon blei det nytta same instrument for alle analyseringane. Det blei brukt reagens med ulike lot-nummer for prøveinnsamlingane, men dette gav ikkje ei klinisk tyding for prøveresultatata.

4.1 Samanlikning

Resultata frå undersøkinga viste låg differanse i PT-INR mellom EDTA- og citrat-plasma. INR i EDTA-plasma er høgare enn i citrat-plasma, då regresjonslinja ligg rett ovanfor den ideelle linja. Dette tyder ein positiv differanse, og kan skyldast at EDTA bind kalsiumion som

gir lengre klottingtid samanlikna med citrat-plasma. Regresjonslinja er ikkje parallell med den ideelle linja, noko ein også kan observere i regresjonslikninga. Sidan stigningstalet og konstantleddet ikkje har ideelle verdiar, kan ein sei at metodane målar ulikt. Det var ingen slengarar, som tyder ingen store avvik.

For å vidare vurdere samsvaret mellom metodane blei det nytta Bland-Altman plot. Plottet viser at den gjennomsnittlege differansen er 0,0693, som indikerer at det systematisk avviket er lågt, og har ingen klinisk betyding. Plottet har litt spreiding, men dei fleste verdiane ligg innanfor konfidensintervallet. Tre prøvar har negativ differanse, som vil sei at INR i citrat-plasma er høgare enn i EDTA-plasma. Desse har også høg gjennomsnittsmåling av PT-INR, og kan kome av at pasientane blei behandla med Marevan. Dette resulterer i at enkelte resultat ligg utanfor 95% konfidensintervall. Det er ukjent årsak til kvifor INR i citrat-plasma ligg høgare enn i EDTA-plasma, men desse prøveverdiane avvik frå dei andre resultatata. Det kan dermed fastslåast at EDTA-plasma er brukbart til analysing av PT-INR i normalområde. Ein ser at pasientar med høge verdiar gir høgare differanse samanlikna med verdiar i normalområdet. Dette gir likevel ikkje ei klinisk tyding ved totalvurdering av resultatet.

Fleire studiar har også kome fram til at EDTA-plasma kan nyttast til å analysere PT-INR. Ein studie frå Kristiansund har observert større differanse i PT-INR mellom EDTA- og citrat-plasma for verdiar i terapeutisk område, samanlikna med normalprøvar. Dersom INR låg i det terapeutiske området, ville differansen mellom EDTA- og citrat-plasma vere av klinisk tyding for pasienten. Dei konkluderte med at EDTA berre kan nyttast til analysing av PT-INR dersom verdiane låg i normalområdet. Det blei også observert at PT-INR i citrat-plasma hadde høgare verdiar enn i EDTA-plasma. Resultata frå Kristiansund er ikkje i samsvar med denne studien. Dette kan kome av at dei nytta STA-R Evolution i motsetning til Sysmex, samt at dei skilde mellom normale og terapeutiske verdiar i plotta (3). Ein anna studie publisert i Bioingeniøren har også konkludert med at EDTA-plasma målar lågare INR enn i citrat-plasma, men kan likevel nyttast til PT-INR. Dette er ikkje i samsvar med vår studie. I terapeutisk område blei det observert slik som i denne studien at differansen auka med aukande PT-INR. Studien nytta også STA-R Evolution til analysing (6).

4.2 Haldbarheit

Til vurdering av haldbarheitsundersøkinga blei det først teke i bruk akseptgrenser basert på biologisk variasjon, som var sett til 2% tillat bias og 5,3% tillat totalfeil. Med bakgrunn i metodens analytiske upresisjon blir krav basert på biologisk variasjon for strenge. Fleire studiar har basert seg på grenser som er breiare enn desse, og det blei dermed teke i bruk akseptgrenser på 5% tillat bias og 10% tillat totalfeil i vår studie.

4.2.2 Citrat-plasma

Resultata av prøvane oppbevart i romtemperatur ligg innanfor akseptgrensene, sjølv om det observerast auka speiing over tid. Ein av prøvane var hemolysert ved time 12 utan avvikande prøveresultat. Sidan hemolyse påverkar INR er det valt å sjå vekk frå denne prøva i totalvurderinga av resultata. Ein observerer at INR i normalområdet ligg stabilt over tid, medan INR over 1,2 varierer meir. Dette ser ein ved at differansen i PT-INR er større mellom tidsintervalla samanlikna med verdiar i normalområde. Resultatgrunnlaget for pasientar med INR over 1,2 er vanskeleg å vurdere grunna få prøvar med verdiar i dette området.

PT-INR analysert i citrat-plasma oppbevart i romtemperatur vurderast haldbare opp til 24 timar. Resultata bekreftar haldbarheita på minst 24 timar, medan prosedyra ved Avdeling for medisinsk biokjemi oppgir 72 timar. Studien i Bodø hadde fleire prøvar som ikkje oppfylte kravet for tillat totalfeil etter 24 timar, og skyldast bruk av akseptgrenser basert på biologisk variasjon (5). Likevel blei det konkludert at citrat-plasma i romtemperatur er haldbart i 24 timar, og er i samsvar med våre funn.

Alle enkeltprøvane som blei oppbevart ved 2-8 °C ligg innanfor tillat totalfeil, med unntak av to prøvar. Den eine prøva var hemolysert og det er valt å sjå vekk frå denne ved totalvurdering av resultatet. Den andre prøva har bratt stigning i verdiar over tid, og endar dermed utanfor 10% tillat totalfeil etter 24 timar. Denne pasienten blei behandla med Klexane som kan ha påverka resultatet. Prøvar med INR over 1,2 verkar meir ustabile over tid samanlikna med prøvane i normalområdet. Dette ser ein ved at enkeltresultata varierer generelt med positiv og negativ differanse i forhold til utgangsverdien mellom tidsintervalla.

Resultata viser aukande gjennomsnittsverdi over tid, og konfidensintervallet er dermed over den øvre grensa for tillat bias ved 24 timar. Dette kan kome av at koagulasjonsfaktor VII blir aktivert ved låge temperaturar. For å kunne vurdere prøvematerialet som haldbart opp til 24 timar må ein ha fleire prøvar slik at konfidensintervallet eventuelt blir smalare. Dette gjev grunnlag for å vurdere prøvematerialet haldbart i 12 timar.

Ein tidlegare studie publisert i Bioingeniøren konkluderte med at citrat-plasma oppbevart ved 2-8 °C var haldbart opp til 72 timar. Dei observerte ei spreining av enkeltprøver proporsjonalt med oppbevaringstid etter 4 timar, men endringane var ikkje signifikante. Studien i Bioingeniøren har nytta akseptgrenser på 10% tillatt bias og 15% tillatt totalfeil, og dermed aukar sjansen for at fleire prøver låg innfor grensene over tid (4). Funna i studien stemmer ikkje overeins med resultata frå vår studie, då vi har vurdert prøvematerialet haldbart opp til 12 timar.

4.2.3 EDTA-plasma

Prøvane oppbevart i romtemperatur har verdier som ligg innanfor akseptgrensene. Spreinga av resultata aukar minimalt over tid, som indikerer at presisjonen er god. Ein av prøvane viser større avvik enn 10% ved time 5 og 8, og ligg dermed utanfor akseptgrensa for tillat totalfeil. I totalvurdering av resultata ser ein vekk frå enkeltprøva sidan det berre er éin av 33 prøvar som ikkje oppfyller kravet til tillat totalfeil. Dette kan skuldast preanalytiske feil, som til dømes utilstrekkeleg blanding før sentrifugering eller bakgrunnsabsorbans. Verdier i normalområde ligg stabilt ved at dei har liten endring i INR over tid, medan verdier over normalområde har større endringar. EDTA-plasma oppbevart i romtemperatur blir vurdert haldbart opp til 24 timar.

PT-INR i EDTA-plasma oppbevart ved 2-8 °C viser gode resultat. Gjennomsnittleg differanse samt tilhøyrande konfidensintervall er innanfor tillat bias opp til 24 timar.

Konfidensintervallet blir breiare over tid, og kjem av at det blir større spreining av enkeltverdiane. I likskap med citrat-plasma oppbevart ved 2-8 °C kan denne spreinga kome av at prøvematerialet er oppbevart i kjølig temperatur, og aktiverer koagulasjonsprosessen

over tid. Spreiinga gjer og at tal på prøvar som ligg utanfor tillat totalfeil aukar over tid. Etter 8 timar er det éin prøve som ikkje oppfyller kravet for tillat totalfeil, og utgjer 3,3% av prøveresultata ved dette tidspunktet. Etter 12 timar ligg 9% av prøveresultata utanfor tillat totalfeil, og ein kan dermed ikkje vurdere prøvematerialet haldbart ved dette tidspunktet. Dermed vurderast INR i EDTA-plasma oppbevart ved 2-8 °C haldbart inntil 8 timar.

Ein studie frå Kristiansund har konkludert med at INR i EDTA-plasma var haldbart opp til 24 timar både i romtemperatur og ved 2-8 °C. Resultatet viste mindre avvik i INR for EDTA-plasma oppbevart ved 2-8 °C samanlikna med plasma oppbevart i romtemperatur. Haldbarheitsvurderinga frå Kristiansund er ikkje i samsvar med denne studien. Dette kan kome av ulikt tal på prøvar, då dei nytta fem prøvar der deltakarane hadde INR i det terapeutiske området. Vurderingsgrunnlaget var for lite for å kunne trekkje ein sikker konklusjon. I vår studie er det nytta fleire prøvar, samt prøvar med INR i normalområdet. Skilnadane kan også kome av maskinell variasjon då dei nytta STA-R Evolution. Dei har og oppbevart avpipettert EDTA-plasma i staden for fullblod (3).

5 Konklusjon

5.1 Samanlikning

Målet med metodesamanlikninga var å finne ut om ein kan nytte EDTA-plasma til å analysere PT-INR alternativt til citrat-plasma. Resultatet av samanlikninga viser låg differanse mellom metodane, og ein kan konkludere med at EDTA-plasma kan nyttast til analysing av PT-INR. Verdiar i terapeutisk område viser større differanse og dermed større usikkerheit. Få prøvar ligg utanfor konfidensintervallet og ved totalvurdering av samanlikninga tek ein ikkje med desse prøvane som er diskutert tidlegare.

5.2 Haldbarheit

Haldbarheitsundersøkinga blei utført for å undersøke kor lenge ein kan nytte prøvematerialet før endringa i PT-INR er klinisk relevant, samt kva som er den optimale oppbevaringstemperaturen for dei ulike prøvemateriala. Ein kan konkludere med at citrat- og EDTA-plasma oppbevart i romtemperatur er haldbare opp til 24 timar for analysing av PT-INR. Citrat-plasma som er oppbevart ved 2-8 °C konkluderast haldbart opp til 12 timar, medan EDTA-plasma ved oppbevart ved same temperatur er haldbart opp til 8 timar.

5.3 Vidare anbefalingar

I denne studien blei det samla inn få prøver som låg over normalområdet. Ein vil anbefale til vidare studiar å samle inn fleire prøver med PT-INR i terapeutisk område for å få eit større vurderingsgrunnlag. Vi oppfatta det som vanskeleg å få tak i deltakarar som blei behandla med Marevan, og vil dermed også anbefale at ein sett av god tid til innsamling av prøvar.

6 Referansar

1. PT-INR, B/P [Internett]. Nasjonalbrukerhåndbok i Medisinsk Biokjemi; 2021 [henta 11-03-2022] Tilgjengeleg frå:
<https://www.brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=0d780faf262e05234bd6>
2. Protrombintid [Internett]. Analyseoversikten; 2021 [henta 15-03-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://analyseoversikten.no/analyser/100>
3. Mohammed SD, Gunapalan M, Mchaina EK. Sammenlignings- og holdbarhetsstudie av citrat-plasma mot EDTA-plasma med hensyn til PT-INR analyse [Bacheloroppgåve]. Ålesund: NTNU Ålesund; 2016. Antal sider: 102.
4. Hunjet S, Podsada U, Bratberg K, Thommesen L. Holdbarhet og oppbevaring av blodprøver til PT-INR, Bioingeniøren [elektronisk artikkel] 2011 12 [henta 22-03-2022]; 2011;des. s. 15-17. Tilgjengeleg frå:
<https://www.bioingenioren.no/contentassets/4380c4194b4e40a99f9cd410240f5d95/holdbarhet-og-oppbevaring-av-blodprover-til-pt-inr.pdf?fbclid=IwAR1YgPmZseBOaRL0hwbOqVuVs3gtngPyusbUSSy0eqz0NRGMGMxQynkrfw>
5. Pathan N. Verifisering av holdbarhet for rutine koagulasjonsanalyser (PT-INR, APTT, fibrinogen, D-dimer) [Bacheloroppgåve]. Bodø: NTNU Ålesund; 2021. Antal sider: 49
6. Botnevik I, Dahll C, Karstad MV. Metodeverifisering av PT-INR. Bioingeniøren. [Elektronisk artikkel]. 2011, 12. [henta 16-04-2022]. Tilgjengeleg frå:
<https://www.bioingenioren.no/contentassets/ae968786bf69411ca62d347e193d8dbc/metodeverifisering-av-inr.pdf>

7. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. Rodak's Hematology: Clinical principles and applications. 5th ed. St.Louis: Elsevier/Saunders; 2016. Antall sider: 898
8. Hagve TA, Berg JB, Wiseth R. Klinisk biokjemi og fysiologi. 6.utgave. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag; 2019. Antall sider: 464.
9. Hemostase [Internett]. Interaktiv hematologi: UiO. [henta 23-03-2022]. Tilgjengeleg frå:
<https://studmed.uio.no/elaring/fag/anatomi/dlophp5/hematologi/index.php?articleID=1780>
10. Hagve TA, Berg JB, Maizels D. Klinisk biokjemi og fysiologi. 5.utgave. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag; 2015. Antall sider: 443
11. Keohane EM, Otto CN, Walenga JM. Rodak's Hematology: Clinical principles and applications. 6th ed. St.Louis: Elsevier/Saunders; 2020. Antall sider: 887
12. Drevon CA, Henriksen HB, Sanderud M, m.f. Biologiske effekter av vitamin K og forekomst i norsk kosthold. Tidsskriftet, den norske legeförening [Elektronisk artikkel]. 2004. juni. [henta 23-03-2022]; 124:1650-4. Tilgjengeleg frå:
<https://tidsskriftet.no/2004/06/tema-ernaering/biologiske-effekter-av-vitamin-k-og-forekomst-i-norsk-kosthold>
13. Pardo Jr MC, Miller RD. Basics of Anesthesia. 7th ed. England: Elsevier; 2017. Antal sider: 936
14. Marevan [Internett]. Noreg: Felleskatalogen; 2021 [henta 02-04-2022] Tilgjengeleg frå: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/pasienter/pil-marevan-orifarm-healthcare-561229>

15. Marevan [Internett]. Noreg: Felleskatalogen; 2022 [henta 02-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/marevan-orifarm-healthcare-561230#footnote3>
16. Acetylsalisylsyre [Internett]. Noreg: NHI; 2021 [henta 02-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://nhi.no/sykdommer/hjertekar/lakemedel/acetylsalisylsyre/?page=2>
17. Acetylsalisylsyre [Internett]. Noreg: Norsk legemiddelhandbok; 2021 [henta 02-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://www.legemiddelhandboka.no/L4.5.7.1/Acetylsalisylsyre>
18. Enoksaparin [Internett]. Noreg: Norsk legemiddelhandbok; 2021 [henta 02-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://www.legemiddelhandboka.no/L4.5.1.2.2/Enoksaparin>
19. Edoksaban [Internett]. Noreg: Norsk legemiddelhandbok; 2021 [henta 02-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://www.legemiddelhandboka.no/L4.5.1.2.2/Enoksaparin>
20. Apiksaban [Internett]. Noreg: Norsk legemiddelhandbok; 2021 [henta 02-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://www.legemiddelhandboka.no/L4.5.3.1/Apiksaban>
21. INR (International Normalized Ratio) [Internett] Helse Møre og Romsdal; 2019 [henta 16-03-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://helse-mr.no/fag-og-forskning/tenester/medisinsk-biokjemi/analyser-og-undersokelser/molde-og-kristiansund/inr-international-normalized-ratio>
22. Andreassen, T. Preanalyse for de mest vanlige hemostaseparametere. Bioingeniøren [Elektronisk artikkel] 2011, 12. [henta 20-03-2022]: Tilgjengeleg frå: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/488962f2ce714d19be4e35ccf007d5b4/pre-analyse-for-de-mest-vanlige-hemostaseparametrene.pdf>
23. Kristensen G, Kristoffersen AH, RAPPORT NKKs PREANALYTISK EKV-PROGRAM 2012 – Preanalytiske forhold vedrørende koagulasjonsanalysene APTT,

INR, Fibrinogen og D-dimer[Internett] Bergen: NKK; 2012 [henta 19-04-2022]. 2012.
Tilgjengeleg frå:

<http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Preanalytiske%20EKV-program%202012.pdf>

24. Passing-Bablok regression [Internett]. Belgia: MedCalc; 2022 [henta 21-04-2022].

Tilgjengeleg frå: <https://www.medcalc.org/manual/passing-bablok-regression.php>

25. Bolann BJ, Åsberg A. Riktig svar på biokjemiske analyser. 1. ed. Oslo: Cappelen Damm akademisk; 2020. 139 s.

26. Passing-Bablok metode (regresjon) [Internett]. NTNU; 2018 [henta 21-04-2022].

Tilgjengeleg frå:

<https://www.ntnu.no/wiki/plugins/servlet/mobile?contentId=121670390&fbclid=IwAR25R6bUPldQUoZaTeMACE7L63UcVh88iEFVvJ5BYS62ylANhm8ty4ksgQ4#content/view/121670390>

27. Nasjonalt prosjekt for standardisering av haldbarheitsforsøk [Internett]. Bergen:

Noklus; 2014 [henta 18-04-2022]. Tilgjengeleg frå:

https://www.noklus.no/media/3wsftsfz/22_holdbarhet-protokoll_hvordan-utf%C3%B8re-holdbarhetsfors%C3%B8k.pdf

28. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, et al. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med [Elektronisk artikkel], 2015, mai [henta 20-04-2022];

53(6): 833-835. Tilgjengeleg frå: https://www.eflm.eu/files/efcc/3.5%20CCLM-Consensus%20Statement.pdf?fbclid=IwAR0dGMNkC-OAYT_btCc4eieBymlOZ4yDXb3pKV0N7TXqaQulpSAzYKIZVhk

29. CS-5100 [Internett]. Tyskland: Sysmex; 2022 [henta 04-05-2022]. Tilgjengeleg frå:

<https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/cs-5100.html>

30. Holdbarhet Batch vs A. [Internett]. Bergen: Noklus. 2022 [henta 22-04-2022].
Tilgjengeleg frå: https://www.noklus.no/media/poehdqgl/23_holdbarhet-batch-vs-a.xlsx

31. Fylle ut meldeskjema for personopplysninger. [Internett]. Noreg: NSD; 2022 [henta 22-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://www.nsd.no/personverntjenester/fylle-ut-meldeskjema-for-personopplysninger/>

32. Blodprøvetaking og sentrifugering [Internett]. Sykehuset-Innlandet; 2022 [henta 23-04-2022]. Tilgjengeleg frå: <https://sykehuset-innlandet.no/seksjon/laboratorie/Documents/veileder-blodpr%C3%B8vetaking%20og%20sentrifugering.pdf>

7 Vedlegg

Vedlegg 1: Excel-ark – Samanlikningsundersøking

Vedlegg 2: Samtykkjeskjema

Vedlegg 3: Sysmex CS: PT-INR

Vedlegg 4: Tabell med detaljert resultat og merking – Samanlikning- og haldbarheitsundersøking

Vedlegg 5: Tabell med oversikt over kva pasient som går på kva medikament for studien

Vedlegg 6: Prosedyre for venøs blodprøvetaking ved Helse Møre og Romsdal

Vedlegg 7: Informasjonsskriv til Marevan-brukarar

Vedlegg 8: Tabell med lot, akseptgrenser og resultat av kontrollar

Vedlegg 9: Excel-ark – Haldbarheitsundersøking

Vedlegg 10: Sysmex CS: Analysering av prøver

