



**FAKULTET FOR NATURVITENSKAP**

**Institutt for bioingeniørfag**

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet  
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

**Verifisering av NORIP sitt referanseområde for  
kalium i serum**

**Verification of the NORIP reference interval for  
Potassium in serum**

*Av / by*

Lars T. Stokkan, Bartosz P. Lukomski & Caroline B. Rogstad

**Trondheim, 2021**

## Forord

Denne bacheloroppgaven er gitt av seksjon Generell kjemi, avd. Medisinsk biokjemi ved St. Olavs hospital, Trondheim. Oppgaven er skrevet i forbindelse med avsluttende bachelorutdanning innen bioingeniørfag ved NTNU Trondheim. Til tross for pågående pandemi, så er vi godt fornøyde med gjennomføringen av både det praktiske og det teoretiske. Bacheloroppgaven har vært særdeles lærerik, hvor vi har fått innblikk i flere ulike deler av bioingeniøryrket.

Ønsker i denne forbindelse å først og fremst rette en stor takk til veiledere, som har bistått med god hjelp, veiledning, og støtte gjennom hele oppgaveperioden. Takk til faglig veiledere Randi Nersund, Ingrid A. Lian og Arne Åsberg. Takk til prosessveileder Ragnhild Bach for god veiledning underveis i selve skrivingen av oppgaven. Vi ønsker også å takke alle frivillige som har bidratt med viktig prøvemateriale til oppgaven vår. Til slutt ønsker vi å takke seksjon Prøvetaking og pasientnær analyse, PPNA for god hjelp til blodprøvetaking.

Trondheim, mai 2021



Bartosz P. Lukomski



Caroline B. Rogstad



Lars T. Stokkan

## Sammendrag

Kalium er et grunnstoff som har viktige funksjoner i menneskekroppen. Det er derfor av særlig betydning at verdien i serum i blodet holder seg innenfor gitte grenser, for at disse funksjonene skal kunne fungere optimalt. Referanseområder er grenser som er gitt for å kunne definere hva som er vanlige verdier for friske individer. Det er et viktig verktøy bla. ved utgivelse av prøvesvar til rekvirenten; for å vurdere helsetilstand, ved utredning, og for eventuell behandling. Dagens referanseområde for kalium i serum, brukt ved St. Olavs hospital er utarbeidet av Nordic Reference Interval Project, NORIP. Prosjektet har brukt flere tusen referanseindivider for å etablere referanseområder for mange ulike analyser; deriblant kalium.

I denne oppgaven verifiseres og etterprøves NORIP sitt referanseområde for kalium i serum, da det er mistanke om at øvre grense ligger for lavt. Kalium i serumglass tas som regel i primærhelsetjenesten, og i den forbindelse vil derfor preanalytiske faktorer være noe som legges vekt på under utførelsen av bacheloroppgaven. Så godt det lar seg praktisk gjøre, blir det forsøkt å etterligne hvordan prøver blir håndtert fra de blir tatt i primærhelsetjeneste, til de ankommer laboratoriet for analyse. Slike faktorer er bla. oppbevaring og transport av prøver. Når prøvene deretter ankommer laboratoriet, blir de analysert på instrumentet Siemens Advia Chemistry XPT ved seksjon Generell kjemi.

Etter analyse, blir resultatene videre brukt i statistiske beregninger i dataprogrammet MedCalc. Her utføres beregningene for å kunne undersøke om dagens referanseområde for kalium i serum fortsatt kan brukes, eller om det eventuelt burde gjøres endringer. For bacheloroppgaven brukes robust metode for beregning av bla. referanseområde, mens det for NORIP sitt datamateriale brukes ikke-parametrisk metode.

Statistikkberegninger for både NORIP og bacheloroppgavens datamateriale utføres, og sammenlignes med hverandre. Bacheloroppgavens datamateriale vurderes med tanke på alder- og kjønnsfordeling, størrelse på referansepopulasjon, tid mellom prøvetaking og analyse, samt ulike transportmetoder av prøvemateriale.

Resultatene viser at øvre grense i referanseområdet for bacheloroppgaven ligger litt høyere enn NORIP sitt referanseområde. Ved å sammenligne medianer og deres konfidensintervall, ses det også her en signifikant forskjell i kaliumkonsentrasjonene. Generelt sett ligger bachelorprosjektets kaliumkonsentrasjoner høyere enn NORIP sine. Ved hjelp av statistiske beregninger ses det en svak sammenheng mellom økende kaliumkonsentrasjon, og økende alder. I tillegg er det en liten forskjell i kaliumkonsentrasjon mellom kvinner og menn. Dette er så små forskjeller at NORIP har valgt å unnlate å lage klassedelte referanseområder.

## Abstract

Potassium has important functions in the human body. It is therefore vital that the Potassium concentration in the blood stays within given limits, for these functions to work optimally. Reference intervals are limits given to help define what is normal values for healthy individuals. It is an important tool, e.g., by issuing test results to the requester; to assess the state of health, during investigation of disease, and in any case of treatment. The current reference interval for Potassium in serum, used at St. Olav's hospital was established by the Nordic Reference Interval Project, NORIP. The project included thousands of individuals to establish reference intervals for various analytes, including Potassium.

In this thesis, NORIP's reference interval for Potassium in serum is verified and tested. Potassium in serum test tubes is usually taken in primary health care service, and in this regard, preanalytical factors will therefore be emphasized during the work with the Bachelor Thesis. As far as practicable, attempts are made to mimic how samples are handled from the time they are taken in primary health care, until they arrive at the laboratory for analysis. Such factors are e.g., storage and transport of samples. When the samples then arrive at the laboratory, they are analyzed on the instrument Siemens Advia Chemistry XPT in the section of Generell kjemi.

After the analysis, the results are further used in statistical calculations through the computer program MedCalc. Here, the calculations are performed to be able to investigate whether the current reference interval of Potassium in serum still can be used, or if any changes should be made. For the Bachelor Thesis, a robust method is used for calculating of e.g., reference area, while a non-parametric method is used for NORIP's data material.

Statistical calculations for both NORIP and the Bachelor Thesis data material are performed and compared with each other. The Bachelor Thesis' data material is studied regarding age and gender distribution, size of reference population, time between sampling and analysis, as well as various transport methods of sample material.

The results show that the upper limit in the reference interval for the Bachelor Thesis is slightly higher than NORIP's reference interval. By comparing medians and their confidence intervals, a significant difference in the Potassium concentrations is also seen here. In general, the Bachelor project's Potassium concentrations are higher than NORIP's. Using statistical calculations, a weak correlation is seen between increasing Potassium concentration and age. In addition, there is a slight difference between Potassium concentration in women and men. These are such small differences that NORIP has chosen not to create class-divided reference intervals.



# Innholdsfortegnelse

Forord.....	II
Sammendrag .....	III
Abstract.....	IV
Innholdsfortegnelse.....	VI
Forkortelser .....	IX
1.0 Innledning .....	1
1.1 Kalium.....	1
1.2 Klinisk relevans .....	2
1.2.1 Lave kaliumverdier .....	3
1.2.2 Høye kaliumverdier.....	3
1.3 Preanalytiske feil.....	4
1.3.1 Hemolyse .....	4
1.3.2 Muskelkontraksjon.....	5
1.4 Prøvetaking .....	5
1.5 Referanseområde.....	5
1.6 Normalfordeling.....	6
1.7 Validering og verifisering .....	8
1.8 NORIP og andre gjeldende referanseområder .....	8
1.9 Siemens Advia Chemistry XPT .....	9
1.10 Serumindeks.....	9
1.11 Problemstilling.....	10
2.0 Materiale og metode .....	11
2.1 Prøvemateriale og preanalytisk behandling .....	11
2.2 Instrumentkomponenter og reagens .....	12
2.3 Kalibrator- og kontrollmateriale .....	13
2.4 Målemetode.....	14
2.5 MedCalc.....	15
2.6 Statistiske metoder og beregninger .....	15
3.0 Resultater .....	17
3.1 Resultater fra serumprøver analysert på Siemens Advia Chemistry XPT .....	17
3.2 Databehandling av eget prøvemateriale .....	17
3.3 Resultatsammenligning for ulike transportmetoder .....	21
3.4 Resultater fra Nordic Reference Interval Project .....	24
3.5 Databehandling av materialet til Nordic Reference Interval Project .....	24

3.6 Etablering av referanseområde for serum basert på eget datamateriale.....	27
3.7 Etterprøving av referanseområdet til Nordic Reference Interval Project.....	28
3.8 Direkte sammenligning av eget datamateriale og Nordic Reference Interval Project .....	29
3.9 Sammenligning av referanseområde for plasma basert på eget og NORIP sitt datamateriale ....	31
4.0 Diskusjon .....	33
5.0 Konklusjon.....	38
Referanser .....	39
Vedlegg.....	43
Innhold.....	43





## Forkortelser

AMB	Avdeling for medisinsk biokjemi
CV	Variasjonskoeffisient
HBND	Hente- bringe neste dag
HBSD	Hente- bringe samme dag
ISE	Ioneselektiv elektrode
KI	Konfidensintervall
LIS	Laboratory Information System
NOKLUS	Norsk kvalitetsforbedring av laboratorieundersøkelser
NORIP	The Nordic Reference Interval Project
PND	Post neste dag
PPNA	Prøvetaking og pasientnær analyse
SD	Standardavvik

## 1.0 Innledning

Bacheloroppgaven er en oppgave gitt av St. Olavs Hospital ved Avdeling for medisinsk biokjemi (AMB), seksjon Generell kjemi. Bakgrunnen for oppgaven er at det stilles spørsmål om referanseområdet for kalium i serum ikke er helt korrekt. Det er mistanke om at den øvre verdien i referanseområdet burde vært høyere. Serumprøvene tas hovedsakelig i primærhelsetjenesten, og her er det flere faktorer som sannsynligvis kan påvirke et analysesvar. Eksempelvis kan prøvetakingsrutiner, samt andre preanalytiske forhold, som transport, og henstand før sentrifugering, ha påvirkning på kaliumverdiene.

I dette kapittelet gis en introduksjon til kalium, og den kliniske relevansen til hypo- og hyperkalemi, målt i serum. I tillegg presenteres feilkilder som kan oppstå ved prøvetaking- og behandling.

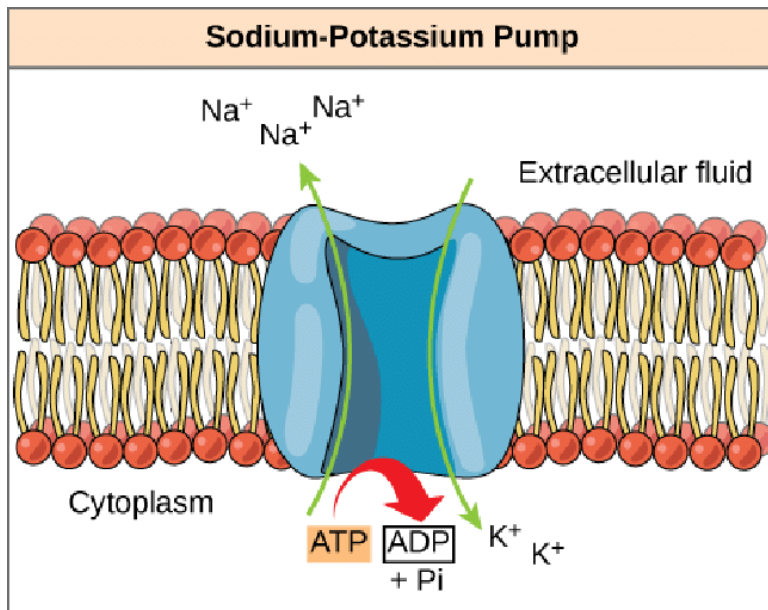
Bakgrunnen for oppgaven er å etterprøve referanseområde for kalium som er etablert gjennom Nordic Reference Interval Project, NORIP.

### 1.1 Kalium

Kalium er et essensiell elektrolytt som spiller en viktig rolle i opprettholdelse av cellenes normale funksjon i menneskekroppen, samt regulering av væskebalansen i cellene (1). Kalium kan ikke produseres in vivo, og må derfor inntas gjennom kosten, hvor det i hovedsak tas opp i blodet gjennom tynntarmen (2). Deretter tas kalium raskt opp av cellene. Daglig inntak av kalium for å dekke behovet til et friskt menneske er 50-100 mmol (3).

Total mengde kalium i kroppen varierer fra person til person, og påvirkes i stor grad av muskelmasse, men også av alder og kjønn (2). På grunn av muskelmasse vil menn i gjennomsnitt ha en større mengde kalium totalt i kroppen sammenlignet med kvinner. Kaliumkonsentrasjon intra- og ekstracellulært mellom kjønnene vil fortsatt være det samme. Intracellulært er kalium det vanligste kationet, hvor en frisk voksen person har en kaliumkonsentrasjon på 100-150 mmol/L, sammenlignet med omtrent 4 mmol/L ekstracellulært (2,3). Totalt vil intracellulært kalium stå for ca. 98% av kroppens totale kaliummengde (2,4).

Regulering av kroppens og cellenes kaliumkonsentrasjon, samt opprettholdelse av konsentrasjonsgradienten intra- og ekstracellulært, styres hovedsakelig av natrium-kaliumpumpen ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen) i cellemembranen (2). På grunn av at kalium har høyest konsentrasjon intracellulært, og natrium har høyest konsentrasjon ekstracellulært, vil konsentrasjonsgradienten føre til at kalium diffunderer ut, og natrium inn i cellen via passiv transport. For å motvirke denne transporten, og for å opprettholde det intracellulære kaliumnivået, vil  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen pumpe natriumioner ut av cellen, samtidig som den pumper kaliumioner inn.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen fungerer som en form for aktiv transport, som betyr at den forbruker energi i form av adenosin trifosfat, ATP.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen sin virkemåte og oppbygging er illustrert i figur 1 (5).



Figur 1: Illustrering av hvordan Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpen er oppbygd og plassert, samt grunnleggende funksjon.

Videre regulering av kalium skjer ved hjelp av aldosteron, et viktig hormon som produseres i, og utskilles fra binyrebarken (6,7). Reguleringen av aldosteron skjer som følge av konsentrasjonen av kalium ekstracellulært, som igjen påvirker sekresjonen av aldosteron fra binyrebarken. Aldosteron fungerer ved å øke retensjonen av natrium og vann i distale tubuli, og ved å stimulere distale tubuli til å øke utskillelsen av kalium til urinen. Aldosteron vil på den måten påvirke nyrene i økende grad, som følge av økende ekstracellulære nivåer av kalium. Ved lave ekstracellulære verdier av kalium vil det motsatte skje; at sekresjonen av aldosteron minker. Dermed vil mindre kalium bli sluppet ut gjennom urinen, ved at nyrene senker utskillelsen av kalium (6).

## 1.2 Klinisk relevans

Kalium rekvireres ofte som en rutineanalyse ved alle typer av vann-, elektrolytt-, og syre-base-forstyrrelser (3). Årsaken er at det er et konstant forhold mellom intra- og ekstracellulære kaliumkonsentrasjoner. En endring i ekstracellulært kalium vil kunne gi en indikasjon på tilstanden til pasienten. Store endringer i kaliumbalansen kan forekomme uten endring av den totale kaliummengden i kroppen (6). Slike endringer kan forekomme som følge av et transcellulært skift, blant annet ved større nekroser, acidoser, og metabolske alkaloser (3). Klassifisering av hypo- og hyperkalemi skjer derfor på grunnlag av kaliumkonsentrasjonen i serum, i stedet for høye eller lave nivåer av totalt kalium i kroppen (6).

For at muskulatur og nerver skal fungere optimalt, må den ekstracellulære kaliumkonsentrasjonen være innenfor et forholdsvis begrenset område (7). Muskel- og nervevev er særlig sensitivt for endringer i kaliumkonsentrasjon. Store endringer kan føre til flere ulike tilstander, hvor noen kan være livstruende; f.eks. paralyse og hjerterytmeforstyrrelser.

### 1.2.1 Lave kaliumverdier

Lave kaliumverdier er definert som hypokalemi. Ifølge Elektrolyttveilederen og Den nasjonale brukerhåndboken i medisinsk biokjemi, er lett hypokalemi når kaliumkonsentrasjonen ligger mellom 3,0 og 3,5 mmol/L (3,8). Tilstanden kalles moderat hypokalemi når konsentrasjonen ligger mellom 2,5 og 2,9 mmol/L, og alvorlig hypokalemi når den ligger under 2,5 mmol/L.

Hypokalemi påvirker først og fremst nevronale og muskulære funksjoner, ved at forholdet mellom intra- og ekstracellulært kalium endres (9). Videre kan dette resultere i hypotensjon og myokardisk nekrose i hjertemuskulaturen, samt polyuri og natriumretensjon i nyrene (3). Endringer i nyrefunksjon som følge av hypokalemi påvirkes også gjennom det endokrine system. Først og fremst skjer endringene gjennom kalium som bestemmer mengden av hormonene renin, aldosteron, og insulin som sekreseres (6).

Hypokalemi forekommer som følge av flere ulike årsaker, blant annet ved lavt inntak, som ses ved feilernæring, økt utskillelse, og tilstander som fører til at kalium transporteres intracellulært (2). Gitelmans syndrom er en sjelden årsak til hypokalemi, og forekommer hos 1 av 40 000 personer. Syndromet kjennetegnes hovedsakelig med metabolsk alkalose, lavt blodtrykk og hypokalemi (10). Disse symptomene er følger av funksjonstap i natrium-klor-kotransportkanalen i nefronets distale tubuli. Denne kotransportkanalen er den viktigste mekanismen for reabsorpsjon av salt i distale tubuli (11).

### 1.2.2 Høye kaliumverdier

Forhøyede kaliumverdier er definert som hyperkalemi. Ifølge Elektrolyttveilederen og Den nasjonale brukerhåndboken i medisinsk biokjemi, er lett hyperkalemi når kaliumverdiene ligger mellom 5,1 og 5,9 mmol/L (3,8). Tilstanden kalles moderat hyperkalemi når konsentrasjonen ligger mellom 6,0 og 6,9 mmol/L, og alvorlig hyperkalemi når den er lik, eller ligger over 7,0 mmol/L.

Konsentrasjoner over 7 mmol/L vil kunne føre til nevrologiske konsekvenser, og nivåer som overstiger 8,5 mmol/L kan lede til ånderettslammelse, og i verste fall hjertestans. (6,12). Personer med hyperkalemi er ofte asymptomatiske, men de med symptomer rapporterer å ha opplevd slapphet, muskelsmerter, og kvalme som de vanligste symptomene (12). Hyperkalemi påvirker i størst grad nyrene. Det kjennetegnes ved at det blir en økt retensjon av natrium for å opprettholde homeostase. I tillegg skjer det en redusert reabsorpsjon av bikarbonat i distale tubuli i nyrene, samt redusert mengde renin, og økt aldosteron- og insulinsekresjon (6).

Hyperkalemi skyldes i mange tilfeller endring i kaliumkonsentrasjonsgradienten fra intracellulært til ekstracellulært, samt høyt inntak av kalium, og redusert utskillelse av kalium i nyrene. Forhøyede kaliumkonsentrasjoner i serum/plasma kan også skyldes pseudohyperkalemi (6). Dette fenomenet er ofte forbigående, og kan forårsakes av frigjørelse av intracellulært kalium forårsaket av hemolyse ved

blodprøvetaking, leukocytose, eller hyperkalsemi (2,13,14). Andre årsaker kan også være at blodprøvene blir stående for lenge før sentrifugering. Dette kan føre til at kalium begynner å lekke ut av erytrocyttene og leukocytene, og over i serumet. Det er også viktig å vurdere pasientens tilstand ved vurdering av hyperkalemi. Det er fordi pseudohyperkalemi ofte observeres hos pasienter med leukocytose (antall leukocytter  $>100 \times 10^9/L$ ), som ved leukemi. I tillegg kan det ses hos pasienter med trombocytose, der platetallet overstiger  $1000 \times 10^9/L$  (6,12). Pseudohyperkalemi er likevel et preanalytisk fenomen, og en av de vanligste feilene som inntreffer i laboratoriearbeid. Det bør derfor vurderes som feilkilde dersom det ikke er bevis for å støtte diagnose av ekte hyperkalemi (15). Pseudohyperkalemi er ofte forbundet med påvirkende faktorer, som mekaniske påkjenninger (stase, muskelaktivitet), kjemiske faktorer, temperatur, og tid.

### 1.3 Preanalytiske feil

Preanalytiske feil forekommer før analysering av en prøve i laboratoriet (16). Dette inkluderer feil som kan oppstå før, under og etter prøvetaking. Ved vurdering av analyseresultat for kalium er det ønskelig å finne ut hva høye eller lave kaliumkonsentrasjoner kommer av. Disse kan komme av feil i prøvetaking og/eller prøvebehandling, eller en bakenforliggende, mulig patologisk årsak. Falske lave kaliumverdier, pseudohypokalemi, er mindre vanlig enn pseudohyperkalemi, men kan forekomme i noen tilfeller. Dette kan for eksempel skje dersom en pasient har et svært høyt leukocyttnivå, og prøven blir stående på benk før sentrifugering. Leukocytene vil da kunne ta opp kaliumet i blodet, slik at resultatet blir lavere enn den reelle verdien (6). Det finnes flere årsaker til falskt forhøyet kalium, hvor den vanligste årsaken er lekkasje av intracellulært kalium fra blodcellene. Dette skjer ofte pga. hemolyse, samt lekkasje fra muskelceller lokalt.

#### 1.3.1 Hemolyse

Hemolyse er en av de mest vanlige preanalytiske feilkildene, og omtrent 60 % av alle prøver som må forkastes har hemolyse (16,17). Hemolyse defineres som ruptur av erytrocyttens membran, med lekkasje av intracellulære komponenter som bl.a. hemoglobin og elektrolytter (16,18). Hemolyse kan forekomme *in vivo*, som ofte er relatert til en klinisk-patologisk tilstand, eller *in vitro*, mer relatert til preanalytiske feil. Hemolyse kan observeres visuelt som en rødlig farge i serum eller plasma, med varierende fargeintensitet, og skyldes at hemoglobin har lekket ut av erytrocyttene (17). Fargen kan observeres allerede når kun 0,5% av erytrocyttene i prøven er hemolysert (16).

I sammenheng med bachelorprosjektet er det først og fremst snakk om *in vitro* hemolyse. *In vitro* hemolyse kan skje under selve prøvetakingen, eller under prøvebehandling før analyse (16). Årsaken er i stor grad forårsaket av mekaniske forstyrrelser som fører til ødeleggelse av erytrocytter.

Eksempelvis er langvarig bruk av stasebånd og bruk av kanyler med liten diameter, faktorer som kan forårsake denne typen hemolyse (19). Hvordan prøven behandles i etterkant av prøvetakingen kan også forårsake hemolyse. Det kan for eksempel være for rask eller hard blanding av prøvemateriale

direkte etter prøvetaking, eller for kraftig sentrifugering av prøven. Transport av usentrifugert materiale kan også forårsake hemolyse (18). *In vivo* hemolyse er sjeldnere enn *in vitro*, og er nesten alltid patologisk. Dette kan forekomme som følge av biokjemiske mekanismer i kroppen som fører til defekter i erytrocyttenes membran; sigdcelleanemi, fysiske mekanismer som kunstige hjerteklaffer (17). Dessuten kan autoimmun hemolytisk anemi også være en årsak (20).

### 1.3.2 Muskelkontraksjon

En annen viktig årsak til falskt forhøyet kalium i serum er muskelkontraksjon før prøvetaking (21). Muskelceller er celler med veldig høy intracellulær kaliumkonsentrasjon og inneholder mer enn 90% av kroppens kaliumreserver (22). Gjennom kontraksjon av muskler, såkalt muskelpumping, vil kalium lekke ut av det intracellulære rom, slik at en merkbar økning av ekstracellulært kalium kan registreres (21,23).

Muskelaktivitet alene kan føre til en økning i plasmakonsentrasjon med så mye som 1 mmol/L ved muskelaktivitet under prøvetaking, uten at forskriftsmessig bruk av stase (< 1 minutt) virker inn på konsentrasjonen (24). Her er det viktig å bemerke at plasmakonsentrasjonen av kalium øker lokalt i armen, eller der hvor prøven tas, og ikke systematisk i kroppen (21,25).

### 1.4 Prøvetaking

Prøvetakingen av serumprøver for kalium skjer i hovedsak i primærhelsetjenesten. Der blir serumprøvene sentrifugert, før de pakkes, og sendes til seksjon felles prøvemottak ved St. Olavs Hospital. Mange legekontor i primærhelsetjenesten benytter seg av Norsk kvalitetsforbedring av laboratorieundersøkelser, NOKLUS, sine prosedyrer for prøvetaking og prøvehåndtering (26). NOKLUS kan også holde kurs, samt bidra med opplæring av personale i eksempelvis blodprøvetaking. I tillegg til å bistå primærhelsetjenesten med kvalitetsarbeid, samarbeider NOKLUS med samtlige av de fire regionale helseforetakene i Norge.

### 1.5 Referanseområde

Referanseområder er essensielle når man skal vurdere om et analyseresultat faller innen- eller utenfor det man forventer å finne hos friske individer, og beskriver hvilke verdier som er vanlige i en populasjon (27). Blodprøvesvar danner et viktig grunnlag i de fleste medisinske beslutninger om utredning, behandling og oppfølging. Basert på referanseområde kan helsepersonell vurdere resultat i lys av etablerte grenser. Et blodprøvesvar har i seg selv liten verdi hvis man ikke har en fasit å sammenligne med, som et referanseområde. Verdier innenfor referanseområdet tolkes ofte som normale, og verdier utenfor som unormale. Fordi referanseområder er så grunnleggende, er det viktig at disse er riktige for å sikre god pasientbehandling. Korrekt behandling av referanseindivider i forkant av og under materialeinnsamling, på lik linje med utvelgelse av korrekt analysemetode, er viktig. Retningslinjer fra CLSI legger vesentlig vekt på det første aspektet (27,28). Dette er faktorer

som potensielt kan påvirke distribusjonen av oppnådde verdier, som igjen er med på å påvirke referanseområdet validitet.

Et referanseområde er definert av nedre og øvre referansegrenser, ofte betegnet som 2,5- og 97,5-persentilen. Et slikt referanseområde sees på som et sentralt intervall hvor en kan forvente å finne verdier for 95% av analyser (27), og er ofte basert på og tilpasset gjeldende analysemetode for den aktuelle analytt. Ved verifisering av referanseområdet for voksne som St. Olavs benytter seg av, må det utarbeides ett referanseområde som omfavner et utvalg av menn og kvinner over 18 år. De oppnådde verdiene i verifiseringsstudiet skal danne grunnlag for et referanseområde som skal avgrense 95% av de sentrale verdiene i den utvalgte gruppen. Definisjonsmessig vil 2.5% av alle friske individer ha verdier under referanseområdet og 2.5% vil ha verdier over.

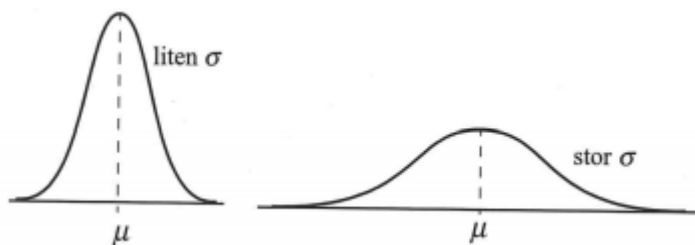
Ved utarbeidelse av et referanseområde med 2,5 og 97,5-persentiler er 40 referanseindivider det påkrevde minimumsantallet, ved bruk av anbefalte ikke-parametriske statistiske metoder. Likevel er 120 et antall som kan sikre oppnåelse av mer pålitelige estimat for 2,5 og 97,5-persentilene (17). For dette prosjektet er ikke denne metoden anbefalt av retningslinjer utgitt i «CLSI Guidelines C28-A3» (29). I en studie om estimering av referanseintervall er det funnet ut at en robust metode er bedre egnet for populasjoner med et fåtall antall målinger, eller en populasjon med lite pålitelige resultat, sett i forhold til ikke-parametriske metoder (30,31). Dette forutsatt at det på forhånd bestemmes at datamaterialet er verken skjevfordelt eller bimodalt fordelt. Metodene ligner på hverandre, ved at begge antar at datamaterialet ikke følger normalfordeling, og at observasjonene er statistisk uavhengig av hverandre. Robust metode er dermed den anbefalte metoden for verifisering av referanseområde ved et lite utvalg av referanseindivider. Metoden minsker faren for potensielt store feil og usikkerheter i oppnådde estimat og konfidensintervall. Robust metode beregner konfidensintervall, KI for referansegrensene ved hjelp av såkalt bootstrapping (32). Dette er en statistisk teknikk for beregning av standardfeil og KI for datamateriale (33). Dette skjer ved en gjentagende trekking av data, såkalt resampling av det originale materialet. En datamaskin kan gjøre dette såpass mange ganger, at et nytt mer omfattende datamateriale blir laget ut ifra utgangsmaterialet.

## 1.6 Normalfordeling

Analyser utført på et laboratorium vil i stor grad være beheftet med tilfeldige feil, blant annet analytisk og preanalytisk variasjon, og biologisk variasjon (34). Analytisk variasjon innebærer verdienes avhengighet av analysemetodens og analyseinstrumentets evne til å utgi korrekt analyseresultat. Preanalytisk variasjon innebærer feilkilder knyttet til prøveinnsamling og oppbevaring. Biologisk variasjon tar høyde for at verdier kan variere fra individ til individ, og at samme individ kan ha biologiske variasjoner. Tilfeldige feil kan føre til at noen resultat blir liggende utenfor resten av datamaterialet. Slike utenforliggende verdier skiller seg fra populasjonen ved å ligge relativt langt unna resten av dataene i populasjonen, enten ved å ligge enkeltvis eller i mindre

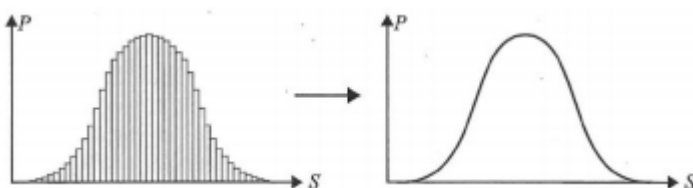
ansamlinger (27). Systematiske feil kan trekke i samme retning. Eksempelvis kan langvarig stasebruk gi opphav til forhøyede kaliumverdier, og resultere i et skjevfordelt datamateriale.

Kontinuerlige, stokastiske, variabler har en tendens til å følge en bestemt matematisk modell; normalfordeling, også kalt gaussisk distribusjon (35). En gunstig normaldistribusjonskurve er klokkeformet og symmetrisk. Den stokastiske variabelens distribusjon er determinert av to parametere. Den første parameteren er forventningsverdien,  $\mu$ , som angir fordelings høyeste punkt. Forventningsverdien kan også defineres som det teoretiske gjennomsnittet (36). Den andre parameteren er variansen,  $\sigma$ , også kjent som spredningsmål (35). Denne verdien angir normalfordelingens bredde (37). Gaussisk distribusjon kan variere i form avhengig av parameterens størrelse. Formens variasjon er illustrert i figur 2.



Figur 2: Figuren viser at en kan oppnåes ulike normalfordelingskurver ved å variere verdiene for  $\mu$  og  $\sigma$  (37). Dessuten viser figuren symmetrisk normalfordeling til en stokastisk variabel.

Gitt at ingen systematiske feil foreligger, vil gjentak av flere målinger gi spredning rundt forventningsverdien (37). Det betyr altså at ved å øke antall målinger, som ved etablering av referanseområde, vil det oppnås en symmetrisk kurvefasong på normalfordelingskurven. Dette illustreres i figur 3.



Figur 3: Figuren viser hvordan normalfordelingskurven (t.h.) vil se ut ved å øke antall målinger (t.v.) (37).

Når en fordeling ikke er normal, kan ikke parametere som gjennomsnitt og standardavvik brukes til å beskrive fordelingen. Vurderingen må da baseres på median, typetall, kvartiler og persentiler for å kunne si noe om fordelingen. En studie, basert på 237 referanseindivider, har funnet ut at kalium hos friske individer ikke er normalfordelt (38).



## 1.7 Validering og verifisering

Ved anvendelse av et referanseområde innen klinikken er validering og verifisering viktig (39). Dette er med på å sikre et representativt og mest mulig korrekt referanseområde. Hensikten med validering er å undersøke om referanseområdet egner seg til formålet, noe som er viktig når et nytt referanseområde skal utarbeides. Verifisering går ut på å dokumentere om referanseområder fungerer som forventet i eget laboratorium, blant annet ved å etterprøve det, som er tilfellet i denne oppgaven. Verifisering er mindre ressurskrevende, da det ikke er behov for like mange referanseindivider som ved validering. Minimum antall prøver for en verifisering i sammenheng med oppgaven er 40, men 20 kan være tilstrekkelig under bestemte kriterier (28,40,41).

## 1.8 NORIP og andre gjeldende referanseområder

Referanseområde for kalium i serum ved St. Olavs Hospital er utarbeidet gjennom Nordic Reference Interval Project, NORIP. Dette var et nordisk samarbeidsprosjekt som samlet inn prøvemateriale ved 102 ulike klinisk biokjemiske laboratorier, og etablerte referanseområder for 25 av de mest vanlige plasma- og serum- analysene (42). Alt datamateriell er samlet i en sentral database, og ut ifra dataene er det utarbeidet referanseområder for de ulike analysene (43). Disse referanseområdene er ment å kunne brukes ved de klinisk biokjemiske laboratoriene i hele Norden (42). Nåværende referanseområde for kalium i serum for voksne er 3,6-4,6 mmol/L (44). Dette er et sentralt 95-prosent referanseområde, med 2,5- og 97,5-persentiler. Referanseområdet, både for serum og plasma, er basert på en referansepopulasjon på 2608 tilsynelatende friske, nordiske individer. Den analytiske variasjonskoeffisienten er 1,1 % ved 4,2 mmol/L kalium. Den intraindividuelle biologiske variasjonskoeffisienten er 4,8 %, mens totalvariasjonskoeffisienten er 4,9 %. Til sammenligning er totalvariasjonskoeffisienten for f.eks. klorid i plasma/serum 1,4 %. Andre laboratorier i Norge som har valgt å benytte NORIP sitt referanseområde for kalium, er vist i tabell 1.

Tabell 1: Tabellen viser oversikt over ulike laboratorier i Norge som bruker NORIP sitt referanseområde for kalium, og hvilke aldersgrupper disse verdiene gjelder (8,40,41)

<b>Norske laboratorier som benytter referanseområdet til NORIP</b>		
<b>Helseforetak/laboratorium</b>	<b>Referanseområde (mmol/L)</b>	<b>Gjelder</b>
<b>Universitetssykehuset i Nord-Norge</b>	3,6-4,6	>18 år
<b>Nasjonale brukerhåndbok</b>	3,6-4,6	Ikke oppgitt
<b>Nordlandssykehuset</b>	3,6-4,6	>18 år

Selv om NORIP er et samarbeid mellom flere nordiske laboratorier, er det flere sykehus og laboratorier i Norge som bruker andre referanseområder til vurdering av pasientprøver. Laboratoriet ved Haukeland Universitetssykehus og Først er to laboratorier som har en del høyere øvre grense for

referanseområdet, sammenlignet med St. Olavs og NORIP sin øvre grense. I tillegg til Først og Haukeland, er det også flere laboratorier som har høyere referanseområde enn NORIP. Dette er vist i tabell 2.

Tabell 2: Tabellen viser en oversikt over laboratorier i Norge med referanseområder for kalium i serum, og hvilke aldersgrupper referanseområdet gjelder (45–50).

<b>Norske laboratorier som benytter egne referanseområder</b>		
<b>Helseforetak/laboratorium</b>	<b>Referanseområde (mmol/L)</b>	<b>Gjelder</b>
<b>Haukeland Universitetssykehus (Helse Bergen)</b>	3,5-5,0	>18 år
<b>Først Medisinsk Laboratorium</b>	3,6-5,0	≥1 år
<b>Helse Møre og Romsdal</b>	3,5-5,1	Ikke oppgitt
<b>Unilabs</b>	3,5-5,0	Ikke oppgitt
<b>Sykehuset Østfold</b>	3,6-5,0	≥1 år
<b>Stavanger Universitetssykehus</b>	3,5-5,0	Ikke oppgitt

Disse laboratoriene kan ha brukt en annen referansepopulasjon enn NORIP, altså referanseindivider som kan ha hatt generelt høyere kaliumverdier, for eksempel egne produksjonsdata som kan stamme fra både friske og syke individer.

### 1.9 Siemens Advia Chemistry XPT

Det finnes ulike analysemetoder og forskjellige instrumenter for måling av kalium i serum og plasma ved ulike laboratorier. De siste årene har ISE-metoden blitt mest brukt rundt om ved ulike klinisk medisinske laboratorier (17). Ved St. Olavs hospital i Trondheim brukes instrumentet Siemens Advia Chemistry XPT, som også ble benyttet ved utførelsen av dette prosjektet. Instrumentet er en klinisk, automatisert kjemianalysator for analysering av kalium, samt serumindeks og en rekke andre analytter. Siemens Advia Chemistry XPT kan i tillegg til serum og plasma utføre tester på cerebrospinalvæske og urin (51). I tillegg til vanlige analyser har instrumentet mulighet til å analysere serumindeks, som er et mål for interferens som følge av ikterus, lipemi og hemolyse. Instrumentets kapasitet er avhengig av analysemetoden. 1800 fotometriske tester og 600 elektrolyttprøver kan bli analysert i løpet av én time, altså en total på 2400 prøver i timen (51).

### 1.10 Serumindeks

Hemolyse er den vanligste årsaken til falskt forhøyet kalium ved analysering i plasma og serum. For å sikre lik behandling av prøver med unormal egenfarge beregner Siemens Advia Chemistry XPT en serumindeks basert på prøvenes egenfarge. Analysen av serumindeks er en kvalitativ analyse og brukes til å bestemme graden av interferens forårsaket av hemoglobin, bilirubin, og turbiditet som følge av lipemi. Førstnevnte er mest relevant ved analysering av kalium. Likevel må serumindeksen

for lipemi vurderes for kalium. Årsaken er at hemolyse-indeksen må korrigeres for interferens av lipemi i prøven for å kunne gi et korrekt resultat (52).

Instrumentet måler serumindeks basert på konsentrasjon av ulike interferenter i prøvematerialet. På basis av denne målingen vil Siemens Advia Chemistry XPT konvertere avleste absorpsjonsmålinger til egendefinerte grader. For hemolyse konverteres absorpsjonsavlesninger til numeriske hemoglobinkonsentrasjoner. Disse blir deretter oversatt til følgende grader: -, +, ++, +++, +++++, ++++++ (52). De ulike gradene, samt tilsvarende konsentrasjon av hemolyse er vist nedenfor i tabell 3.

Tabell 3: Viser oversikt over hvordan Siemens Advia Chemistry XPT vurderer grad av hemolyse ut ifra ulike konsentrasjoner av hemoglobin i prøvematerialet. Vurderingsgrader er oppgitt etter instrumentets fastsatte grenser og hemolyse måles i mg/dL hemoglobin (50).

Analyseinstrumentets egendefinerte grader av hemolyse						
Vurderingsgrad	-	+	++	+++	++++	+++++
Hemolyse (mg/dL)	0	45	70	140	235	445

Basert på signifikante økninger i kaliumverdier som følge av hemolyse, har avdeling for generell kjemi ved AMB valgt å sette en grenseverdi for hemolyse på ++, tilsvarende 70- 140 mg/dL hemoglobin i prøven (52). Det vil si at kaliumverdier fra prøver som overskrider grenseverdien på 70 mg/dL vil rapporteres med kommentar om at hemolyse er påvist, og at kalium kan være falskt for høyt.

### 1.11 Problemstilling

Formålet med denne oppgaven er å verifisere referanseområdet til kalium, noe som gjøres ved å samle inn prøvemateriale, og analysere kalium i en populasjon av friske individer. De preanalytiske forholdene standardiseres etter det som er gjeldende både i primærhelsetjenesten, og er i henhold til St. Olavs Hospitals eksisterende prosedyrer. Analyseresultatene bearbeides statistisk, og vurderes etter gjeldende krav og regler.

*Kan nåværende referanseområde for kalium i serum ved St. Olavs Hospital fortsatt brukes?*

## 2.0 Materiale og metode

### 2.1 Prøvemateriale og preanalytisk behandling

Innsamling av prøvemateriale til bacheloroppgaven ble fordelt mellom egen prøvetaking, og prøvetaking med hjelp fra en intern poliklinikk tilhørende St. Olavs hospital, seksjon Prøvetaking og pasientnær analyse, PPNA. Egen prøvetaking baserte seg hovedsakelig på prøvetaking av studenter og lærere ved bioingeniørstudiet, samt noen bekjente utenfra som stilte frivillig. Med hjelp fra avdelingsledere på medisinsk biokjemi ved LMK, stilte også en del frivillige ansatte opp til blodprøvetaking. Ansatte som meldte seg ble sendt til prøvetakingspoliklinikken på Bevegelsessenteret (tilhørende Seksjon PPNA), hvor prøvetakere ved poliklinikken stod for blodprøvetakingen.

Basert på at oppgaven omhandler utarbeidelse og etterprøving av referanseområde, var hensikten å få samlet prøvemateriale som er mest mulig sammenlignbart med NORIP sin referansepopulasjon. Av den grunn var det ønskelig å få en mest mulig lik fordeling mellom kjønn og alder. I tillegg var kravet at individene ikke brukte noen form for blodtrykksregulerende medikamenter. Disse medikamentene er kjent for å kunne gi hyperkalemi. Totalt ble det samlet inn prøvemateriale fra 65 frivillige og tilsynelatende friske personer, hvorav 49 var kvinner og 16 var menn. Alderen til de frivillige varierte fra 20 til 65 år, hvor alderen til 40 av de 65 frivillige lå mellom 20 og 30 år, grunnet større tilgjengelighet av studenter enn andre grupper. Av de 65 prøvene som ble samlet inn, ble 62 brukt videre til databehandling. Årsaken til dette var at to prøver ble fjernet grunnet lettere identifiserbare prøver og en ble fjernet pga. for høy hemolysegrad.

Under prøveinnsamling ble det tatt prøver på to ulike prøveglass; 5 mL serumrør med gel, og 3 mL Li-heparinrør. Prøver tatt på Li-heparinrør ble behandlet etter St. Olavs egne prosedyrer for intern prøvetaking, slik det gjøres til vanlig på sykehuset. De fleste av serumprøvene ble forskriftsmessig satt til henstand mellom 30 og 60 minutter før sentrifugering. I tillegg ble det etter avtale med veiledere bestemt at noen serumprøver skulle ha en henstand på 60 til 75 minutter. Årsaken var fordi det er mistanke om at tiden for henstand for kaliumprøver i primærhelsetjenesten noen ganger overskrider 60 minutter. Serumglass ble deretter fordelt på hente-bringetjenesten og postsending samme dag. Det sistnevnte innebar forsendelse av serumglass med Postens tjenester, fra laborariesenteret ved St. Olavs, og tilbake. Hente-bringetjenesten følger St. Olavs prosedyrer, og fulgte ruten til Orkdal Sykehus 2 ganger daglig (53). Tur 1 henter prøver fra prøvemottaket St. Olavs for transport til Orkdal sykehus kl. 7 på dagtid, og ankommer St. Olavs igjen kl. 11 samme dag. Prøver blir analysert fortløpende etter ankomst. Tur 2 forlater St. Olavs kl. 11 og er tilbake rundt kl. 14:30.

Halvparten av det totale antallet prøver ble sendt med Postens tjenester på prøvetakingdagen, og analysert påfølgende dag. Andre halvpart ble fordelt tilnærmet likt mellom hente-bringe-tjenesten, slik

at én del av prøvene ble sendt med Tur 2 kl. 11 på prøvetakingsdato, og analysert samme dag etter kl. 14. Den andre delen av prøvene ble sendt ut med Tur 1 påfølgende dag kl. 7, etter å ha blitt oppbevart kjølig over natten.

## 2.2 Instrumentkomponenter og reagens

Under analysering av prøvemateriale ble det benyttet instrumentkomponenter i form av kaliumspesifikke ISE og referanseelektroder. Tabell 4 gir opplysninger om disse.

Tabell 4: Tabellen gir oversikt over og opplysninger om instrumentkomponenter benyttet under analysering av prøvematerialer, for hvert instrument. Tabellopplysninger i kursiv viser til at komponenter ble skiftet ut i løpet av innsamlings- og analyseringsperioden.

<b>Instrumentkomponenter benyttet i perioden 22. - 26. mars 2021</b>				
	<b>Siemens Advia Chemistry XPT 1</b>		<b>Siemens Advia Chemistry XPT 2</b>	
	<b>K<sup>+</sup>-ISE</b>	<b>Referanseelektrode</b>	<b>K<sup>+</sup>-ISE</b>	<b>Referanseelektrode</b>
<b>Dato tatt i bruk</b>	10. mar. 2021	10. mar. 2021	4. feb. 2021 <i>25. mar. 2021</i>	4. feb. 2021 <i>25. mar. 2021</i>
<b>Serienummer</b>	53346	28578	52298 <i>53375</i>	27248 <i>28643</i>
<b>Lotnummer</b>	2007	2006	2006 <i>2007</i>	2005 <i>2006</i>
<b>Utløpsdato</b>	31. jul. 2021	30. jun. 2021	30. jun. 2021 <i>31. jul. 2021</i>	30. mai. 2021 <i>20. jun. 2021</i>

Bufferløsninger som ble anvendt under utførelsen av analysene, er spesifikke for målemetoden. Opplysninger om brukte reagenser er oppgitt i tabell 5.

Tabell 5: Tabellen viser produsentopplysninger om bufferløsninger benyttet under analyse av innsamlet prøvemateriale.

<b>Opplysninger om benyttede bufferløsninger i perioden 22.-26. mars 2021</b>				
	<b>ISE Buffer 2</b>		<b>ISE Baseline Solution</b>	
	<b>Siemens Advia Chemistry XPT 1</b>	<b>Siemens Advia Chemistry XPT 2</b>	<b>Siemens Advia Chemistry XPT 1</b>	<b>Siemens Advia Chemistry XPT 2</b>
<b>Lotnummer</b>	FM047A	FM058A	UA034AA	UA040AA
<b>Dato tatt i bruk</b>	3. feb. 2021	3. mars 2021	16. feb. 2021	31. jul 2021
<b>Holdbarhet uåpnet, oppbevaring</b>	31. des. 2021, romtemperatur	28. feb. 2022	31. jul. 2021	31. aug. 2021

## 2.3 Kalibrator- og kontrollmateriale

For kalibrering av analysen for kalium i serum på instrumentet benyttes ADVIA Chemistry ISE Serum Standard Set. Kalibrering skal utføres hver dag, når lotnummeret til bufferløsningen endres, når ISE og/eller hydrauliske komponenter blir skiftet ut. Dessuten kreves kalibrering av analysen når kvalitetskontrollprosedyrer krever dette.

Ved kalibrering av ISE fremstilles kalibreringskurver på to eller flere nivå (54). For serum blir elektrodene kalibrert i to nivå med hensikt om å bestemme konstantene  $s$ , kalibreringskurvens helningsvinkel, og  $E_0$ , spenning i referanseelektroden - såkalt referansespenning jf. Nernst ligning  $E = E_0 + s \cdot \log C$ .  $E$  er målt spenning i målelektroden og  $C$  er konsentrasjonen til analytten.

Kalibreringskurvens helning, elektrodesloopen, blir fastsatt gjennom bruk av kalibratorer på både lavt og høyt nivå.

Kalibreringskurvens helning vil ha høyest verdi når elektroden er ny, og har krav om å ligge mellom faktorene 38 og 65. Ved faktor under 38 vil kalibreringen bli underkjent og flagget L for «Low», og det vil være nødvendig å skifte ut elektroden. Ved faktor over 65 vil kalibreringen også bli underkjent og flagget H for «High». Det vil da være nødvendig å kondisjonere elektroden. Helning utenfor intervallet mellom faktor 35 og 63 vil få kalibreringen godkjent, men tyder på at elektroden må bli utskiftet (54,55).

Kaliumanalyser på begge instrument kalibreres med kalibratorløsning på to nivå, ISE Serum Standard Low og ISE Serum Standard High. Opplysninger om kalibratorløsninger som ble benyttet under utførelsen av prosjektet er presentert i tabell 6 (54). Tabellen presenterer kalibratorløsningenes kaliumkonsentrasjoner, samt opplysninger om bl.a. produsent, lotnummer og holdbarhet.

Tabell 6: Tabellen viser opplysninger om kalibratorer benyttet for ISE-metoden for kalium.

<b>Kalibratorløsninger for ISE-metoden</b>	
<b>ISE Serum Standard Set</b>	1 flaske á 100 mL
<b>ISE Serum Standard Low</b>	K: 3,5 mmol/L
<b>ISE Serum Standard High</b>	K: 6,0 mmol/L
<b>Produsent</b>	JEOL Ltd., Japan
<b>Leverandør</b>	Siemens Healthineers
<b>Lotnummer</b>	HS013AA
<b>Dato tatt i bruk</b>	10. feb. 2021
<b>Holdbarhet åpnet</b>	10. apr. 2021
<b>Holdbarhet uåpnet, oppbevaring</b>	31. mai 2021, romtemperatur

Hyppigheten på utførelse av kvalitetskontroll vil variere basert på flere faktorer og laboratoriets interne kvalitetskontrollprosedyrer. I situasjoner ved bruk av nytt lotnummer for bufferløsning, vedlikehold, rengjøring, feilsøking, og ny kalibrering kreves kontrollering av analysene. Instrumentet blir rutinemessig kontrollert med hensyn til alle analytter ved enhver daglig oppstart av instrumentet. Kontrollmaterialet er kommersielt, og analyseres minimum én gang per dag.

Seksjon generell kjemi ved AMB benytter seg av kontroller på nivå 2 og nivå 3, som vist i tabell 7. Meanverdi etableres over 5 dager der det analyseres 2 paralleller per dag på begge instrumenter; totalt 20 paralleller. CV på 1,0 mmol/L er presisjonskravet som stilles for kontrollene, og sammen med antall s gir det konstante verdier som kontrollregler er basert på. Analytiske middelverdier og grenseverdier er etablert av laboratoriet ved St. Olavs. Kalibrering og kontrollresultater for dagene prøvene til bachelorprosjektet ble analysert, er godkjent.

Tabell 7: Tabellen viser opplysninger om benyttet kontrollmateriale på to nivå.

<b>Kontrollmateriale for ISE-metoden</b>		
	<b>Test</b>	
	<b>Autonorm Clin Chem Lv. 2</b>	<b>Autonorm Clin Chem Lv. 3</b>
<b>Lotnummer</b>	2001804	2001805
<b>Dato tatt i bruk</b>	12. aug. 2020	11. aug. 2020
<b>Holdbarhet</b>	Sept. 2022	Sept. 2022
<b>Enhet</b>	mmol/L	
<b>Nedre grense</b>	3,88	5,82
<b>Øvre grense</b>	4,12	6,18
<b>Mean</b>	4,0	6,0
<b>CV</b>	1,0	1,0
<b>1SD</b>	0,04	0,06
<b>Antall SD</b>	3	3
<b>3SD</b>	0,12	0,18

## 2.4 Målemetode

Analysemetoden benytter seg av ioneselektive elektroder, ISE, for å kunne basere seg på indirekte potensiometri, en metode hvor måling foregår i en fortynt prøve (56). ISE er elektroder som selektivt reagerer med en bestemt type ioner og er av stor betydning ved måling av de mest kritiske analysene på et laboratorium. Humant serum eller plasma blandes med en buffer. Bufferen skaper et optimalisert miljø for analytten, med konstant pH og ionestyrke. Denne løsningen forflyttes gjennom

en ISE, hvor det dannes endringer i det elektriske potensialet i målelektroden. Endringene er målt opp mot potensialet i en referanselektrode for å kunne kalkulere verdien for prøven.

Membranpotensialet i analyttløsningen er proporsjonal med logaritmen til konsentrasjonen til det gitte ionet. Basert på disse målingene av prøvematerialet beregnes og rapporteres resultatene ut ifra kalibreringsverdier til kalibratoren (54). Kaliumkonsentrasjonen beregnes automatisk og angis i mEq/L eller mmol/L. Omregningsfaktoren er 1, slik at 1.0 mEq/L tilsvarer 1.0 mmol/L.

Til tross for at de fleste ISE-metoder anvendt i klinisk praksis har tilstrekkelig selektivitet, og ikke trenger korrigering for interfererende ioner, er faktumet likevel at det kan oppstå tilstrekkelig interferens fra uønskede ioner. Potensielt interfererende kationer med lignende egenskaper som kalium er blant annet  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  og  $\text{Ca}^{2+}$  (17).

## 2.5 MedCalc

MedCalc er et statistikkprogram utgitt av MedCalc Software som er designet for bruk innen medisinsk forskning og databehandling (57). I denne oppgaven ble MedCalc brukt til utføring av statistiske beregninger på NORIP sitt og bachelorprosjektets datamateriale, samt grafisk sammenligning av oppnådde resultat. I tillegg ble MedCalc brukt til å vurdere hvorvidt kaliumkonsentrasjonene er normalfordelt, og om datamaterialet dermed kan brukes i oppgaven. Dessuten ble programmet brukt til å beregne referanseintervall ved bruk av robust metode for prosjektets datamateriale, mens ikke-parametrisk metode for datamaterialet til NORIP. Det sistnevnte materialet ble lastet ned NORIP sin database (43).

## 2.6 Statistiske metoder og beregninger

Vurdering av NORIP og bacheloroppgaven sitt datamateriale ble basert på statistiske beregninger oppnådd i MedCalc, versjon 20.0 (57). Microsoft Excel ble brukt til beregning av tid fra prøvetaking til analysetidspunkt. Det ble fremstilt regresjon for kaliumverdier opp mot ulike variabler som alder, og tid mellom prøvetaking og analysetidspunkt, for å kunne undersøke korrelasjon mellom variablene. Histogram ble brukt til å vurdere om noen uteliggende verdier skiller seg ut fra resten av populasjonen. Slike verdier kunne også bli observert gjennom beregning av referanseområde, ved å benytte seg av Tukey-metode. Den vil automatisk kunne vise frem uteliggende verdier. Gjennom fremstilling av histogram ble normalfordeling visualisert for å undersøke om data var fordelt symmetrisk eller normalt, eller om fordelingen var asymmetrisk eller skjev. Andre statistiske metoder som ble benyttet er Mann-Whitney-test, for uavhengige målinger for sammenligning av variablene. Et Box-Whisker-diagram ble fremstilt for å visualisere oppsummerende statistikk av variabler som median, kvartiler, og range. De to sistnevnte metodene ble også benyttet til å illustrere spredning av uteliggende verdier.



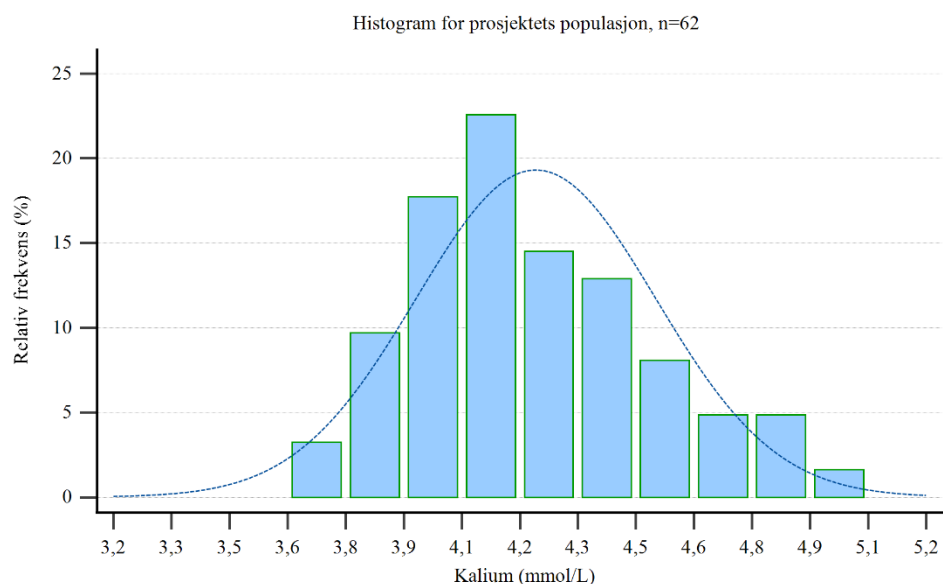
Når datamaterialet ikke er normalfordelt, kan ikke parametere som gjennomsnitt og standardavvik brukes til å beskrive fordelingen. Vurderingen må da baseres på median, kvartiler og persentiler for å kunne si noe om fordelingen. Til dette ble ikke-parametrisk og robust metode anbefalt av CLSI brukt for beregning av referanseområde.

## 3.0 Resultater

### 3.1 Resultater fra serumprøver analysert på Siemens Advia Chemistry XPT

Det ble tatt prøver av totalt 65 referanseindivider, hvorav 62 verdier, på grunnlag av ulike faktorer ble brukt videre under behandling av datamateriale. Under prøvetaking ble prøvetakingstidspunkt, kjønn og alder registrert for hvert referanseindivid. Deretter ble prøvene behandlet på ulike måter før analysering. Serumprøvene ble analysert på Siemens Advia Chemistry XPT ved seksjon Generell kjemi, St. Olavs hospital. Videre ble kaliumkonsentrasjonene, hemolyseindekser, og analysetidspunkt hentet direkte ut fra laboratoriets datasystem, og ført inn i en tabell. Prøvetakingstidspunkt og analysetidspunkt ble omgjort til  $\Delta$ Tid. Rådata brukt videre i statistisk beregning er vist i vedlegg 1.

I figur 4 er datamaterialet presentert i form av histogram, som viser hvordan kaliumverdiene fordeler seg. Hemolysert prøve er ekskludert.



Figur 4: Figuren viser et histogram basert på innsamlet resultat fra Siemens Advia Chemistry XPT.

Histogrammet i figur 4 vises med relativ frekvens (%) og normal distribusjonskurve for populasjonen, fordelt på 14 klasser. Den laveste og høyeste målte verdien er 3,68 og 5,01 mmol/L.

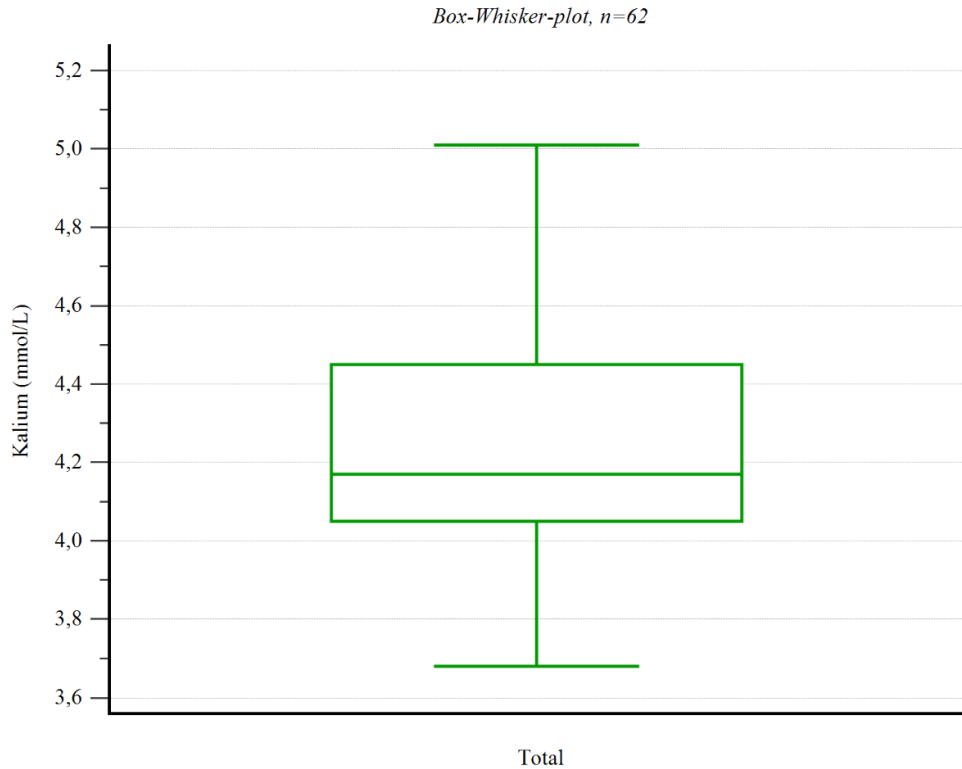
### 3.2 Databehandling av eget prøvemateriale

Til beregning av referanseområde for kalium i serum ble MedCalc benyttet, med utgangspunkt i datamaterialet fra vedlegg 1. Tabell 8 viser oppsummerende parametere for de 62 kaliumkonsentrasjonene. Tabellen inkluderer antall prøver, med prosentvis fordeling, gjennomsnitt, median, aldersgruppe med gjennomsnittsalder, og range. Range er differansen mellom minste og høyeste verdi.  $\Delta$ tid beskriver hvor lang tid det i gjennomsnittet gikk mellom tidspunkt for prøvetaking og analyse.

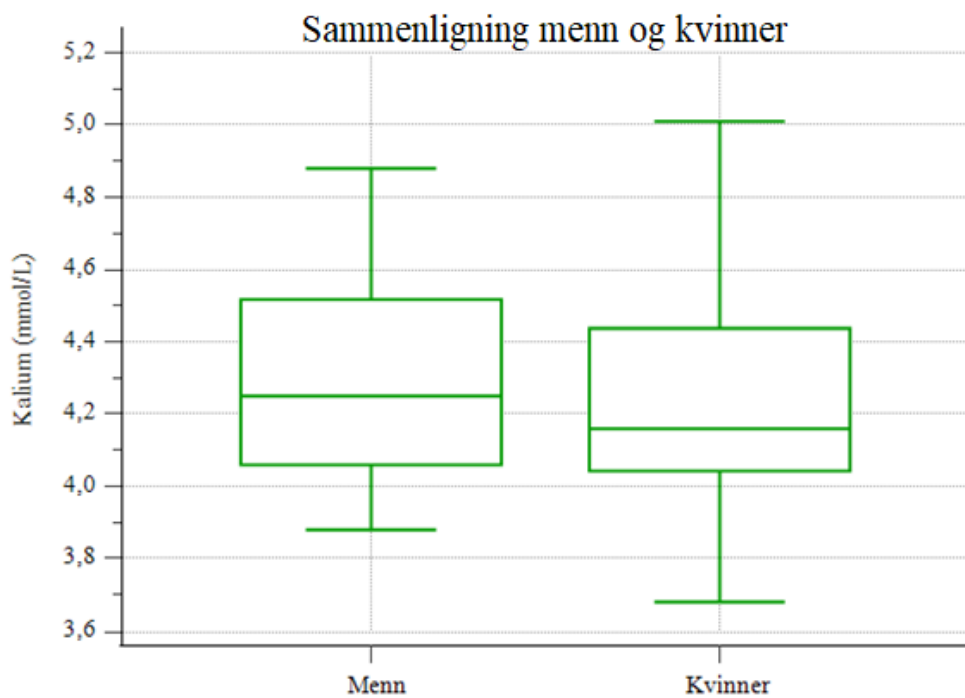
Tabell 8: Tabellen viser statistiske beregninger utført på hele datamaterialet for referansepopulasjonen i bachelorprosjektet, i tillegg til separate beregninger for menn og kvinner.

<b>Oppsummerende statistikk, bachelorprosjekt</b>			
	<b>Total</b>	<b>Menn</b>	<b>Kvinner</b>
<b>Populasjonsstørrelse (%-andel)</b>	62	15 (24%)	47 (76%)
<b>Aldersgruppe (gjennomsnittsalder)</b>	20- 61 (31)	20- 57 (31)	20- 61 (34)
<b>ΔTid (timer;minutt)</b>	17;20	13;66	18;34
<b>Gjennomsnitt kalium (mmol/L)</b>	4,24	4,31	4,22
<b>Range, Lav - Høy (mmol/L)</b>	3,68 – 5,01	3,88 – 4,88	3,68 – 5,01
<b>Standardavvik (mmol/L)</b>	0,30	0,32	0,29
<b>Median (mmol/L)</b>	4,17	4,25	4,16
<b>95 % KI for median (mmol/L)</b>	4,12- 4,32	4,06- 4,52	4,10- 4,30
<b>Interkvartil bredde (mmol/L)</b>	4,05-4,45	4,06-4,52	4,04 – 4,44

Figur 5 viser Box-Whisker-plot fremstilt basert på hele populasjonen. Figur 6 viser Mann-Whitney-test (MW-test) utført på kaliumverdier for menn og for kvinner, som er en grafisk fremstilling av resultatene i tabell 8. Felles for figurene er at de sentrale boksene representerer verdier fra den nedre til øvre kvartilen, såkalt interkvartil bredde fra 25 til 75-persentil. Horisontale ytterlinjer viser laveste og høyeste observerte verdi (range). Medianen er synlig i midten av boksene.



Figur 5: Figuren viser er Box-Whisker-plot utført på kaliumverdier for totalen, basert på innsamlet datamateriale bestående av 62 individer i bachelorprosjektets referansepopulasjon.



Figur 6: Figuren viser Mann-Whitney-test utført på kaliumverdier basert på innsamlet datamateriale, bestående av 15 mannlige og 47 kvinnelige individ i bachelorprosjektets referansepopulasjon.

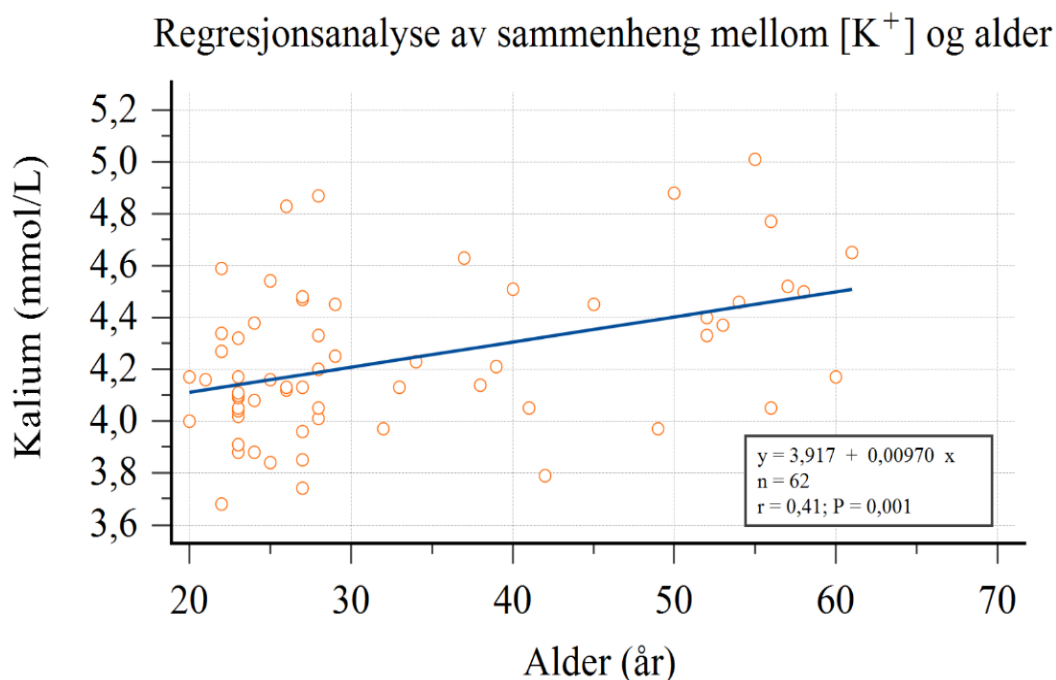
Tallresultatet for MW-testen i figur 6, inkludert p-verdi for vurdering av statistisk ulikhet mellom menn og kvinner, er vist i tabell 9. Mediandifferansen med dens 95% KI – for to uavhengige populasjoner med størrelse n og m, er mediandifferansen medianen av alle  $m \cdot n$  parede differansen

mellom observasjoner i begge utvalg, kalkulert som  $n_1 - m_2$ . p-verdien forteller om det foreligger statistisk signifikant forskjell mellom to utvalg.

Tabell 9: Tabellen viser oppnådde verdier fra utført Mann-Whitney-test på sammenligning av den mannlige og kvinnelige populasjonen i bachelorprosjektets.

Mann-Whitney testresultat, kjønnsbasert for bachelorprosjektet		
Holden-Lehmann mediandifferanse	-0,08000	95% KI -0,2600 til 0,10000
p-verdi	P = 0,3320	

For den totale populasjonen ble det utført regresjonsanalyse med formål om å undersøke mulig sammenheng mellom kaliumverdier og alder. I figur 7 er det vist et lineært regresjonsplot for kaliumkonsentrasjon og alder.

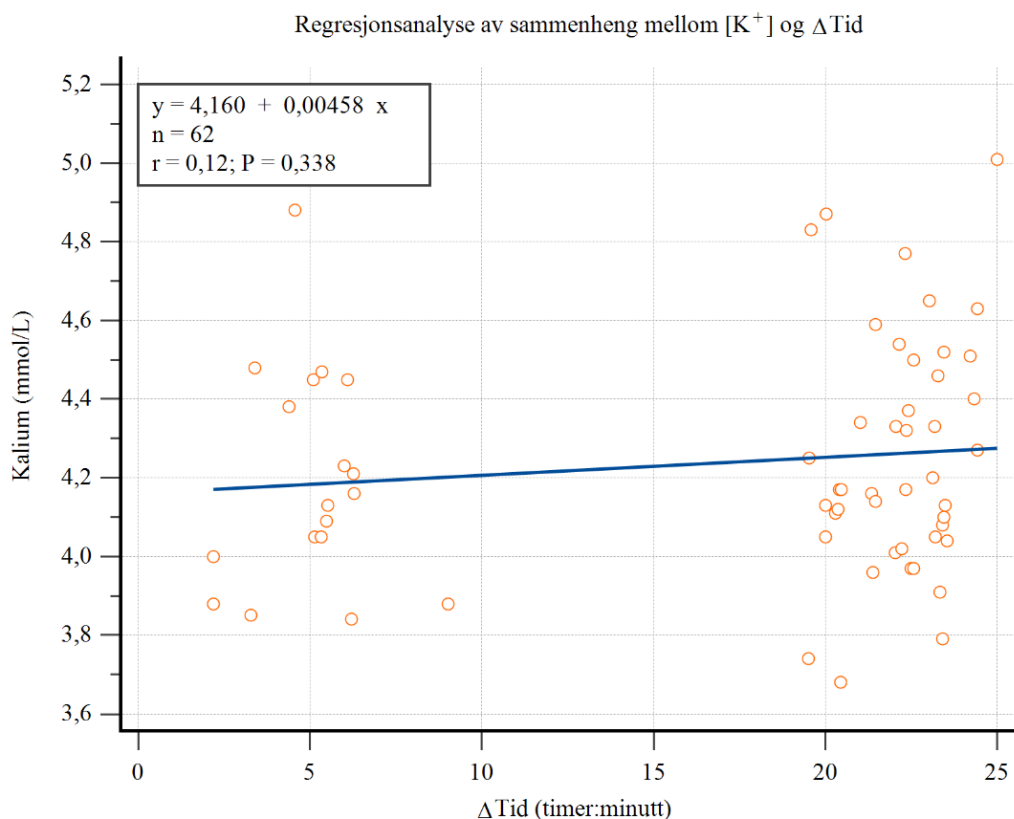


Figur 7: Figuren viser lineær regresjon utført på to variabler, kaliumverdi og alder for de 62 referanseindividene i bachelorprosjektet. Hvert punkt representerer ett individ.

I figur 7 illustrerer den heltrukne linjen at det foreligger en positiv sammenheng mellom økning i kaliumverdi og alder. Korrelasjonskoeffisienten,  $r = 0,41$ , noe som tyder på en korrelasjon av moderat styrke mellom punktene. P-verdi på  $<0,05$  bekrefter at koeffisientene a og b i regresjonsligningen er signifikant forskjellige fra 0.

Det var også ønskelig å undersøke om det foreligger en sammenheng mellom økning i kaliumverdier og økt tid fra prøvetaking til analysen ble utført. Dette ble gjort gjennom regresjonsanalyse.

Regresjonsplottet er vist i figur 8. Plottet viser at sammenhengen er svakt positiv. R-verdier viser svært svak lineær sammenheng mellom kaliumverdi og  $\Delta$ tid.



Figur 8: Figuren illustrerer regresjonsplot for sammenheng mellom kaliumverdier og  $\Delta$ tid for de 62 referanseindividene i bachelorprosjektet.

I figur 8 tilsier korrelasjonskoeffisienten,  $r$ , at det er stor spredning av målinger. Samtidig viser figuren at  $p > 0,05$ . Dette tyder på stor usikkerhet rundt koeffisientene  $a$  og  $b$  i regresjonsligningen, og det ikke foreligger noen signifikant sammenheng mellom kaliumkonsentrasjonene og  $\Delta$ Tid.

### 3.3 Resultatsammenligning for ulike transportmetoder

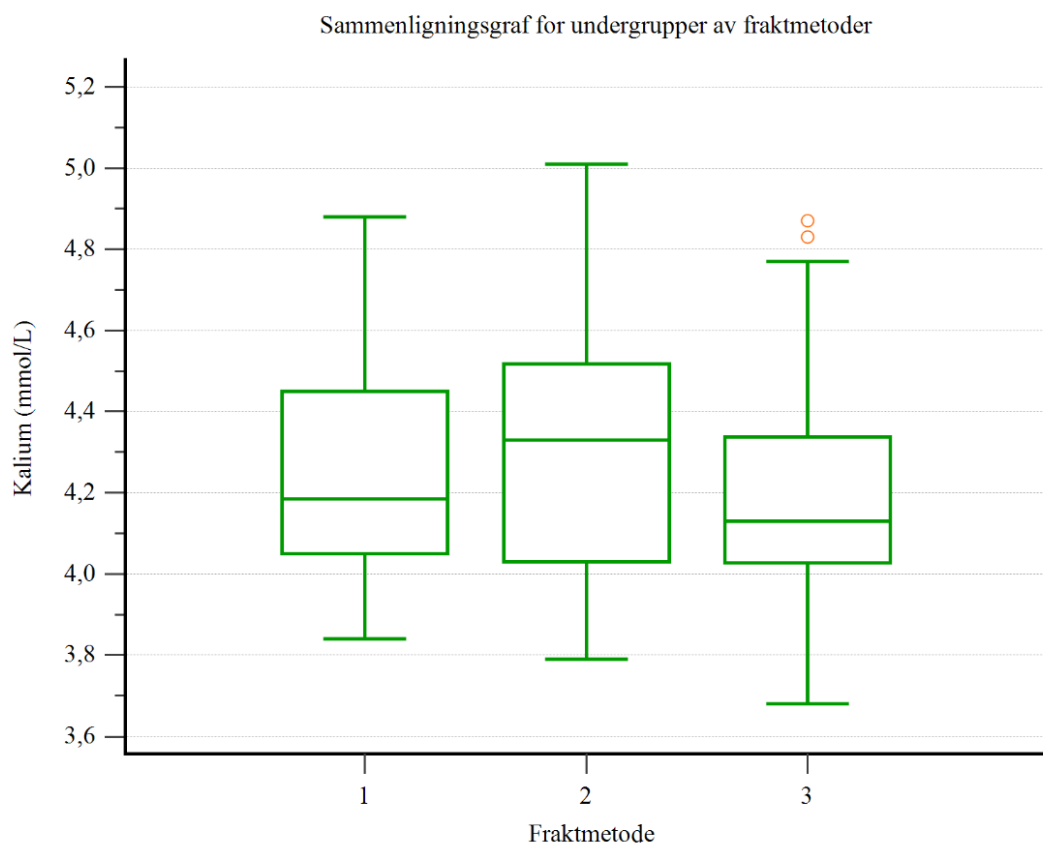
Videre var det ønskelig å undersøke om det oppsto forskjeller i kaliumverdier mtp. på hvordan prøvene ble behandlet preanalytisk etter prøvetaking. Om lag én tredel av prøvene ble analysert samme dag som prøvetakingen, mens om lag to tredeler ble analysert følgende dag etter å ha vært gjennom ulike transportmetoder. Halvparten av prøvene ble sendt med hente-bringetjenesten, fordelt på analysering samme dag, og analysering dagen etter prøvetaking. Prøver sendt med hente-bringetjenesten og analysert samme dag er heretter kalt HBSD. Tilsvarende er prøver sendt med hente-bringetjenesten og analysert  *neste*  dag kalt HBND. Den andre halvdel som ble sendt med posten og analysert dagen etter er kalt PND. Fordelingen for de ulike transportmetodene er presentert i tabell 10, med prøvenes kaliumkonsentrasjoner i vedlegg 1.  $\Delta$ Tid for hver av transportmetodene er også presentert i tabellen.

Tabell 10: Tabellen viser statistiske beregninger av datamaterialet fordelt mellom prøver som ble analysert samme dag som de ble tatt, og prøver som ble analysert dagen etter prøvetaking. HBSD = Hente-bringe samme dag, HBND = Hente-bringe neste dag, PND = post neste dag. PND innebærer å sende prøver i post på prøvetakingsdagen, med analysering neste dag.

	<b>HBSD</b>	<b>HBND</b>	<b>PND</b>
<b>Populasjonsstørrelse (%-andel)</b>	14 (23%)	17 (27%)	31(50%)
<b>Aldersgruppe (gjennomsnittsalder)</b>	23-50 (31)	20-60 (35)	20-61 (33)
<b>ΔTid (timer:minutt)</b>	6:16	18:18	22:13
<b>Gjennomsnitt kalium (mmol/L)</b>	4,23	4,29	4,21
<b>Range, Lav - Høy (mmol/L)</b>	3,84 – 4,88	3,79 – 5,01	3,68 – 4,87
<b>Standardavvik (mmol/L)</b>	0,27	0,33	0,29
<b>Median (mmol/L)</b>	4,19	4,33	4,13
<b>95 % KI for median (mmol/L)</b>	4,05 – 4,45	4,04 – 4,51	4,07 – 4,29
<b>Interkvartil bredde (mmol/L)</b>	4,05 – 4,45	4,03 – 4,52	4,03 – 4,34

Av tabellen er det mulig å lese av at 95% KI for medianene for HBSD, HBND og PND overlapper hverandre. Det kan tyde på at det ikke foreligger noen signifikant forskjell mellom medianene.

For å visualisere resultat presentert i tabell 10, ble det fremstilt et Box- and Whiskerplot, en sammenligningsgraf vist i figur 9. I denne figuren er fraktmetode HBSD vist til 1, fraktmetode HBND til 2, og fraktmetode PND til 3. Felles for grafene er at sentrale bokser illustrerer den interkvartile bredden, med observerte medianer i midten. Nedre og øvre horisontale strek illustrerer range.



Figur 9: Figuren viser Box- and Whisker-plot av fraktemetoder. 1= HBSD, 2= HBND og 3= PND. Tallverdier lagt il grunn for figuren jf. tabell 9.

Figur 9 viser at fraktmetode PND har to uteliggende observasjoner, illustrert ved to oransje ringer. Disse punktene har verdier på henholdsvis 4,83 og 4,87 mmol/L, noe som skiller seg litt ut fra resten av populasjonen. Av figuren er det synlig at interkvartile bredder overlapper hverandre i stor grad.

Med utgangspunkt i testresultat i figur 9, ble det utført tre separate Mann-Whitney-tester. I disse ble fraktmetode 1 sammenlignet med fraktmetode 2, fraktmetode 1 med fraktmetode 3, og fraktmetode 2 med fraktmetode 3. Statistiske resultat for de tre sammenligningstestene er presenter i tabell 11. På bakgrunn av p-verdiene bekreftes det at det er ingen signifikante forskjeller mellom fraktmetodene.

Tabell 11: Tabellen viser resultat oppnådd gjennom utførelse av Mann-Whitney-tester, hvor alle fraktmetoder er sammenlignet med hverandre.

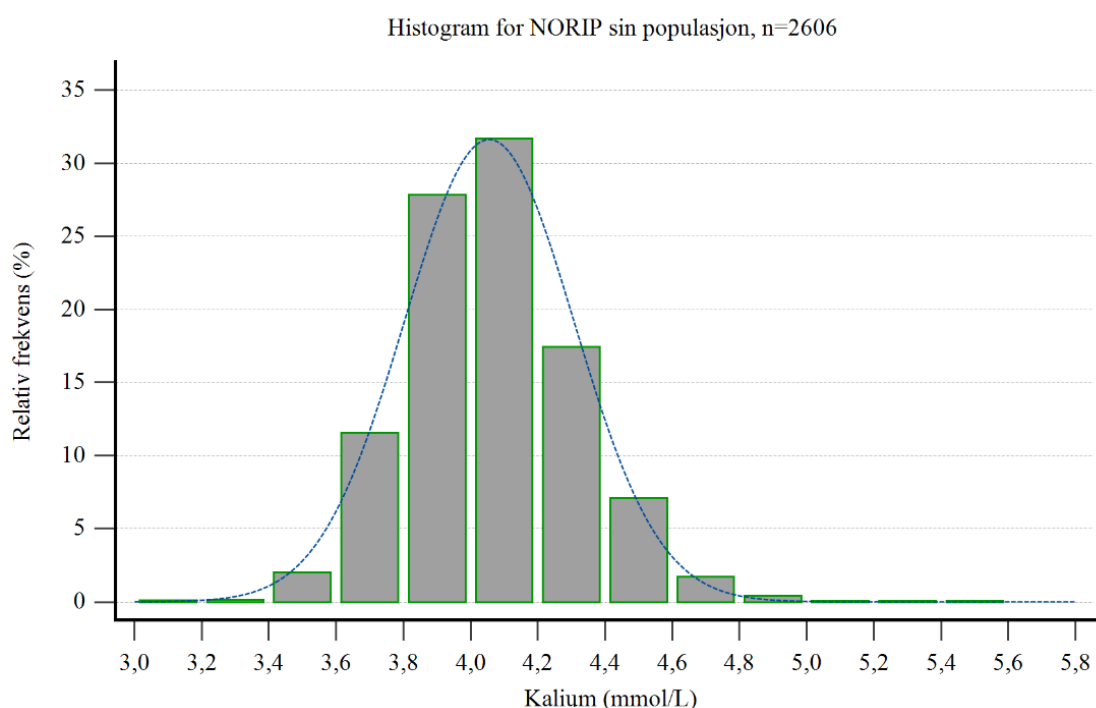
Mann-Whitney testresultat		
	Hodges-Lehmann mediandifferanse med 95% KI	p-verdi
Fraktmetode 1 og 2	0,06500, 95% KI -0,1900 – 0,3000	P = 0,4996
Fraktmetode 1 og 3	-0,04000, 95% KI -0,1900 – 0,1400	P = 0,6947
Fraktmetode 2 og 3	-0,09000, 95% KI -0,3000 – 0,1200	P = 0,3767



### 3.4 Resultater fra Nordic Reference Interval Project

Gjennom NORIP ble det samlet inn 2608 serumprøver til etablering av referanseområdet til kalium. 2606 verdier ble brukt videre til databehandling pga. manglende opplysninger om kjønn på to av prøvene. Kjønn- og aldersfordeling for denne populasjonen er presentert i tabell 10. Populasjonen består av individer fra fem ulike nordiske land; Norge, Danmark, Sverige, Finland og Island, med henholdsvis et antall på 775, 489, 537, 721 og 84 (42). Alderen for hele populasjonen er mellom 18 og 90 år. Prosjektet har ikke opplyst om eventuelle preanalytiske forhold, som transportmetoder, eller om eventuelle hemolyserte prøver, ol.  $\Delta$  tid, altså tid mellom prøvetaking og analyse, er det heller ikke opplyst om. Av den grunn har det derfor ikke blitt anvendt statistiske metoder som ser på disse variablene.

Kaliumverdiens klassevise fordeling for NORIP sin populasjon er presentert som et histogram i figur 10.



Figur 10: Figuren viser histogram for kaliumverdier fra 2606 serumprøver samlet inn og analysert gjennom NORIP. Det er vist relativ frekvens i %-på y-aksen og kaliumkonsentrasjon i mmol/L på x-aksen, med datamaterialet fordelt over 14 klasser.

Histogrammet viser hvordan klassene er spredt innenfor normalfordelingskurven, med noe som ligner en normalfordeling. Den laveste og høyeste målte verdier er 3,03 og 5,57 mmol/L.

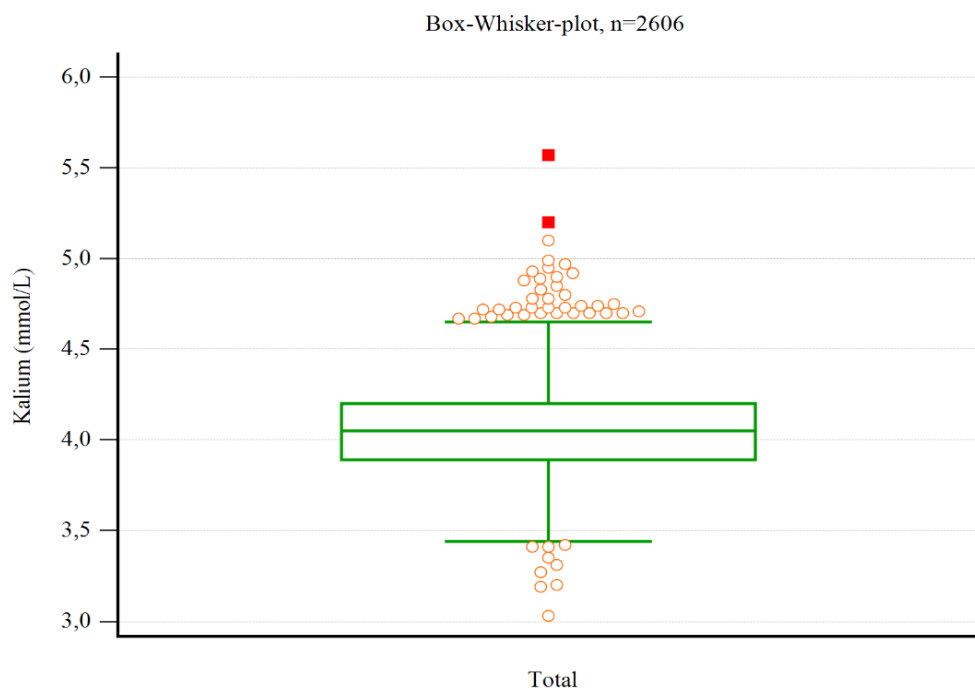
### 3.5 Databehandling av materialet til Nordic Reference Interval Project

Statistiske beregninger ble utført på datamaterialet hentet fra NORIP, basert på kaliumverdier sett opp mot kjønn. Oppnådde resultat, presentert i tabell 12, viser blant annet at kjønnsfordelingen hos denne populasjonen er i stor grad jevn. Samtidig kommer det frem at aldersfordelingen hos hvert av kjønnene er forholdsvis like.

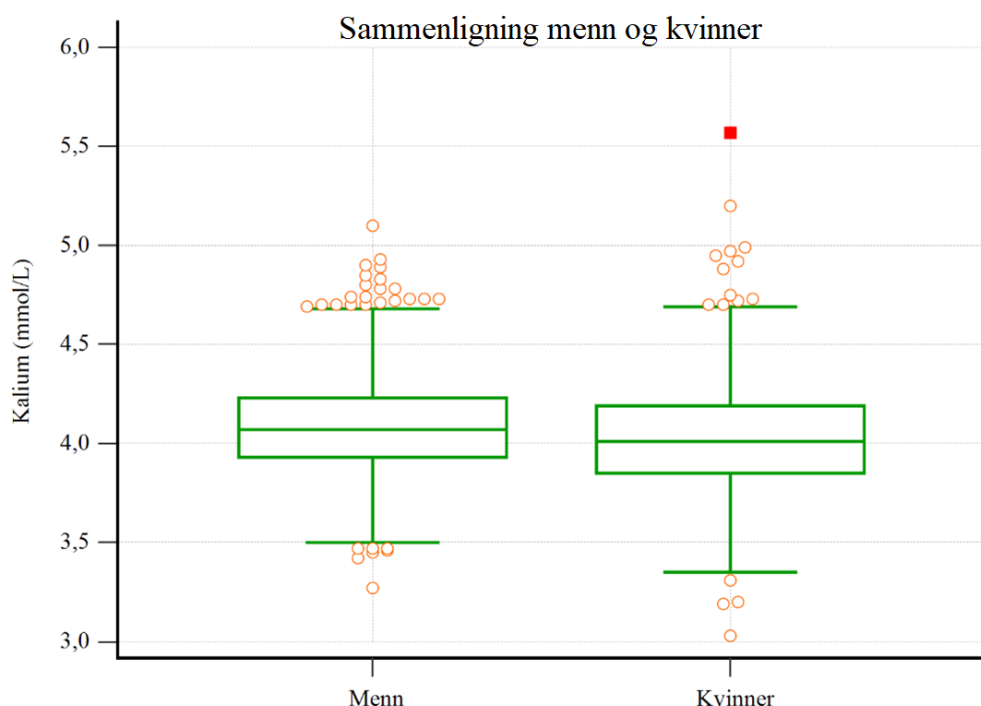
Tabell 12: Tabellen viser oppnådde resultat for populasjonsstørrelse med prosentvis fordeling, gjennomsnitt, median og range. Dette er presentert for den NORIP sin totale populasjon, samt for menn og kvinner.

	<b>Totalt</b>	<b>Menn</b>	<b>Kvinner</b>
<b>Populasjonsstørrelse (%-andel)</b>	2606	1226 (47%)	1380 (53%)
<b>Aldersgruppe (gjennomsnittsalder)</b>	18-90 (47)	18-89 (46)	18-90 (47)
<b>Gjennomsnitt kalium (mmol/L)</b>	4,06	4,09	4,03
<b>Range, Lav - Høy (mmol/L)</b>	3,03 – 5,57	3,27 – 5,10	3,03 – 5,57
<b>Standardavvik</b>	0,25	0,25	0,25
<b>Median (mmol/L)</b>	4,05	4,07	4,01
<b>95 % KI for median (mmol/L)</b>	4,03- 4,06	4,05- 4,09	4,00- 4,03
<b>Interkvartil bredde (mmol/L)</b>	3,89 – 4,20	3,93 – 4,23	3,85 – 4,19

En grafisk fremstilling av resultat oppnådd i tabell 10 ble satt opp. Det ses i figur 11 og 12, hvor figur 11 viser resultat for alle kaliumverdiene, og figur 12 viser klassesdelte resultater for menn og kvinner.



Figur 11: Figuren viser en Mann-Whitney-test utført på kaliumverdier for totalpopulasjonen, basert på NORIP sitt datamateriale bestående av 2606 referanseindivid. Oransje sirkler viser til uteliggende verdier.



Figur 12: Figuren viser to Mann-Whitney-tester utført på kaliumverdier for den mannlige og kvinnelige andelen i NORIP sin populasjon. Oransje sirkler illustrerer verdier som er betydelig lavere og høyere enn resten av populasjonen, altså uteliggende verdier.

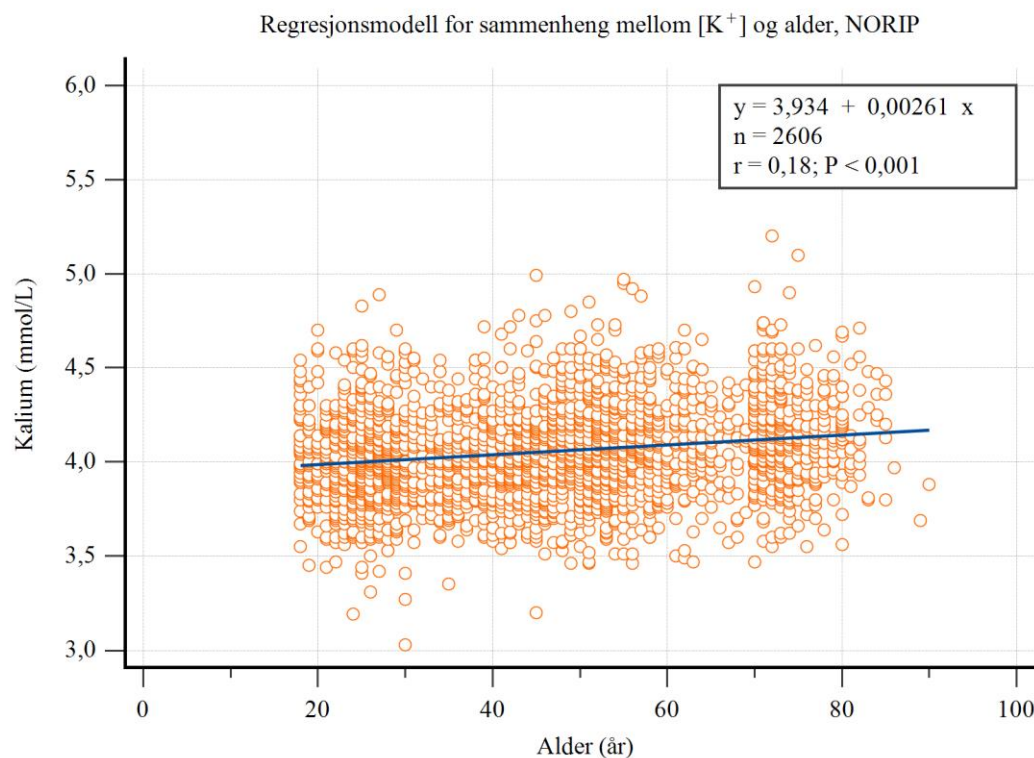
Felles for figur 11 og 12 er at den sentrale boksen representerer verdier for den nedre til den øvre kvartilen, interkvartil bredde fra 25 til 75-persentil. Horisontale ytterlinjer viser laveste og høyeste observerte verdi (range). Medianene er synlig som en horisontal linje i midten av boksene.

Tabell 13 viser testresultat for Mann-Whitney-test i figur 12 for å undersøke om ranktestene er signifikant forskjellig fra hverandre.

Tabell 13: Tabellen presenterer resultat av oppsummerende statistikk for utført MW-test basert på NORIP sin mannlige og kvinnelige populasjon. Hodges-Lehmann mediandifferansen med dens 95% KI – for to uavhengige populasjoner med størrelse  $n$  og  $m$ , er mediandifferansen medianen av alle  $m \cdot n$  parede differansen mellom observasjoner i begge utvalg, kalkulert som  $n_1 - m_2$ .  $p$ -verdien forteller om det foreligger statistisk signifikant forskjell mellom to utvalg.

Mann-Whitney testresultat		
Kjønnsfordelt NORIP		
Hodges-Lehmann mediandifferanse	0,06000	95% KI 0,04000 – 0,08000
p-verdi	< 0,0001	

I likhet med dette studiets datamateriale, ble også NORIP sitt datamateriale undersøkt med hensikt om å vurdere om det foreligger sammenheng mellom kaliumverdier til referanseindividene, og alder. Dette er illustrert i figur 13.



Figur 13: Figuren viser regresjonsanalyse utført på NORIP sitt datamateriale for kalium, som illustrerer korrelasjonen mellom kalium og alder.

Basert på 2606 observasjoner, sees en svak korrelasjon gitt ved  $r = 0,18$ . Det er likevel en observerbar positiv sammenheng, gitt ved ligningen  $y = b + ax$ , som tilsier at kaliumverdier øker med populasjonens økende alder.  $P < 0,001$  bekrefter at koeffisientene  $a$  og  $b$  i ligningen er signifikant forskjellige fra 0 og 1.

### 3.6 Etablering av referanseområde for serum basert på eget datamateriale

For å kunne danne et grunnlag for sammenligning og etterprøving av referanseområdet til NORIP, ble det utført utregning av referanseområde basert på data innsamlet fra de 62 referanseindividene.

Resultatet av den statistiske beregningen er vist i tabell 14.

Tabell 14: Tabellen viser statistiske beregninger av eget datamateriale, basert på 62 innsamlede prøver. Her presenteres laveste og høyeste verdi, gjennomsnitt og median, samt standardavvik for kaliumverdiene. Verdiene er avrundet.

<b>Prøvemengde (n)</b>	62
<b>Range, Lav - Høy (mmol/L)</b>	3,68 – 5,01
<b>Gjennomsnitt kalium (mmol/L)</b>	4,24
<b>Median (mmol/L)</b>	4,17
<b>Standardavvik (SD)</b>	0,30

Det ble deretter utført beregning av referanseområde vha. robust metode. Basert på resultatene ble referanseområdet for kalium i serum estimert til å være 3,6 (90% KI 3,5-3,7) - 4,8 (90% KI 4,7-4,9) mmol/L, som vist i tabell 15.

Tabell 15: Tabellen viser resultatet ved bruk av robust metode, utført for utarbeidelse av referanseområde, basert på 62 kaliumkonsentrasjoner. Både nedre og øvre grense, samt 90% KI for grensene er oppgitt som avrundede verdier.

<b>Robust metode (CLSI C28-A3)</b>	
<b>Nedre grense (mmol/L)</b>	3,60
<b>90% KI (mmol/L)</b>	3,50 - 3,71
<b>Øvre grense (mmol/L)</b>	4,82
<b>90% KI (mmol/L)</b>	4,68 - 4,94

Etter etablering av referanseområde for kalium i serum ved bruk av robust metode, var det deretter ønskelig å etablere referanseområde for kalium i serum vha. ikke-parametrisk metode. Dette var for å undersøke om metodevalg har i noen grad innvirkning på resultatet. Tabell 16 presenterer resultatet oppnådd gjennom analyse ved bruk av ikke-parametrisk metode.

Tabell 16: Tabellen viser resultatet ved bruk av ikke-parametrisk metode, utført for utarbeidelse av referanseområde, basert på 62 kaliumverdier i serum. Både nedre og øvre grense er oppgitt som avrundede verdier.

<b>Ikke-parametrisk metode</b>	
<b>Nedre grense (mmol/L)</b>	3,72
<b>90% KI (mmol/L)</b>	-
<b>Øvre grense (mmol/L)</b>	4,94
<b>90% KI (mmol/L)</b>	-

Tabell 16 viser verdier for nedre og øvre grense for referanseområde, men mangler 90% KI på grunn av et lavt antall verdier.

### 3.7 Etterprøving av referanseområdet til Nordic Reference Interval Project

For å se nærmere på det etablerte referanseområdet, er det utført statistiske beregninger med hensyn på referanseintervall. Data som er lagt til grunn er 2606 enkeltmålinger, som omfavner både mannlige og kvinnelige klassepopulasjoner. Grunnleggende resultat basert på NORIP sine data er vist i tabell 17 (43).

Tabell 17: Tabellen viser statistiske beregninger utført på NORIP sine 2606 kaliumverdier. I tabellen presenteres også laveste og høyeste verdi blant de 2606 prøvene, samt gjennomsnitt og median av datamaterialet. Verdiene er avrundet.

<b>Prøvemengde (n)</b>	2606
<b>Range, Lav - Høy (mmol/L)</b>	3,03 – 5,57
<b>Gjennomsnitt kalium (mmol/L)</b>	4,06
<b>Median (mmol/L)</b>	4,05
<b>Standardavvik (SD)</b>	0,25

Videre ble 95% referanseområde beregnet med 90% KI for NORIP sitt datamateriale for å beregne det eksisterende referanseområdet til NORIP. Dette ble gjort for å bekrefte at utregning av referanseområde basert på egne data ble gjort på samme måte som utregningen av NORIP sitt eksisterende referanseområde. NORIP sine nedre og øvre grenser er presentert i tabell 18.

Tabell 18: Tabellen viser resultatet av ikke-parametrisk persentilm metode utført på NORIP sitt datamateriale. Her er 95% referanseområdets nedre og øvre grense presentert, med deres 90% KI. Alle verdier er avrundede.

<b>Ikke-parametrisk persentilm metode (CLSI C28-A3)</b>	
<b>Nedre grense (mmol/L)</b>	3,60
<b>90% KI (mmol/L)</b>	3,58 - 3,61
<b>Øvre grense (mmol/L)</b>	4,59
<b>90% KI (mmol/L)</b>	4,56 - 4,60

Basert på opplysningene i tabell 18, blir det beregnede referanseområdet 3,6 (90%KI 3,58 – 3,61) - 4,6 (90%KI 4,56-4,60) mmol/L.

NORIP har gitt ut opplysninger om deres kalkuleringer, basert på hvilket deres foreslåtte referanseområde er 3,61 (90%KI 3,60-3,63) - 4,64 (90%KI 4,61-4,66) mmol/L, avrundet til 3,6-4,6 mmol/L (43). Foreslåtte verdier er basert på 2.5 og 97.5 persentiler, utregnet i dataprogrammet SAS 8.2 og verifisert i dataprogrammet RefVal.

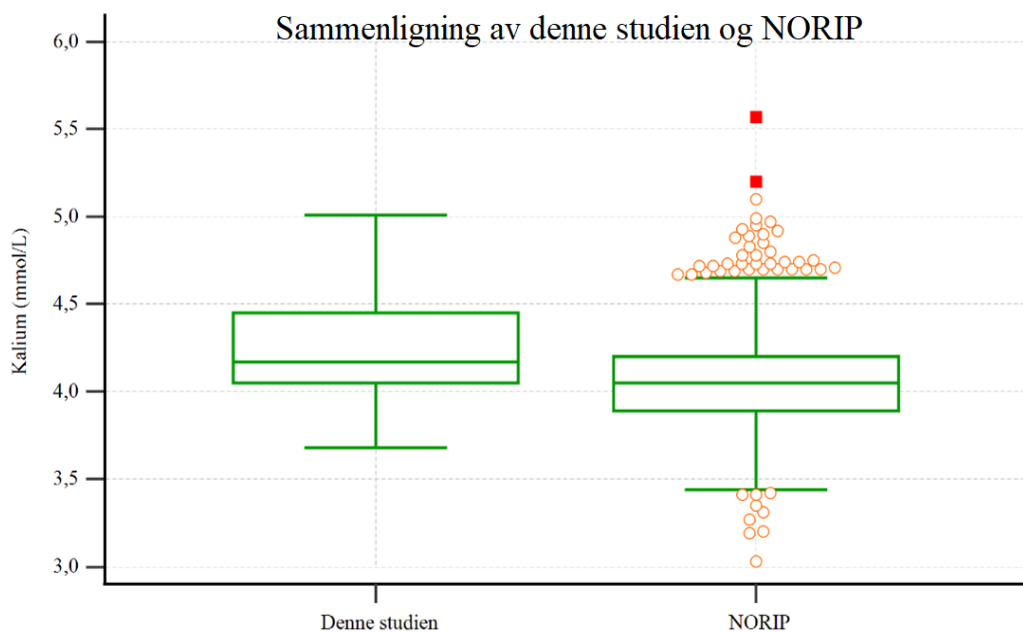
### 3.8 Direkte sammenligning av eget datamateriale og Nordic Reference Interval Project

Det ble satt opp en oppsummering med direkte sammenligning av oppnådde verdier fra dette studiets, og NORIP sin populasjon. Tabell 19 viser denne sammenligningen.

Tabell 19: Tabellen viser en oppsummering av generelle statistiske beregning og referanseområder for både NORIP sitt og denne studiens datamateriale. I tillegg er 95% KI for kvartilene lagt inn i tabellen.

<b>Direkte sammenligning av populasjoner</b>		
<b>Generell statistikk</b>	<b>Denne studien</b>	<b>NORIP</b>
<b>Prøvemengde (n)</b>	62	2606
<b>Gjennomsnitt kalium (mmol/L)</b>	4,24	4,06
<b>Range, Lav - Høy (mmol/L)</b>	3,68 – 5,01	3,03 – 5,57
<b>Standardavvik (SD)</b>	0,30	0,25
<b>Median (mmol/L)</b>	4,17	4,05
<b>95% KI for median (mmol/L)</b>	4,12- 4,32	4,03- 4,06
<b>Interkvartil bredde (mmol/L)</b>	4,05 – 4,45	3,89 – 4,20
<b>95% KI for 25-kvartil</b>	3,97 – 4,11	3,88 – 3,90
<b>95% KI for 75-kvartil</b>	4,33 - 4,53	4,20 - 4,22
<b>Referanseområder</b>	<b>Denne studien</b>	<b>NORIP</b>
<b>Nedre grense (mmol/L)</b>	3,60	3,60
<b>90% KI (mmol/L)</b>	3,50 - 3,71	3,58 - 3,61
<b>Øvre grense (mmol/L)</b>	4,82	4,59
<b>90% KI (mmol/L)</b>	4,68 - 4,94	4,56 - 4,60

For direkte sammenligning av medianer og deres 95 % KI, ble det utført en Mann-Whitney-test. Dette er vist i figur 14.



Figur 14: Figuren viser en Mann-Whitney-test utført på begge populasjoners kaliumverdier. Øvre og nedre horisontale linjer viser høyeste og laveste observerte verdi (range). Boksenes øvre og nedre kanter viser til interkvartile bredder for hver populasjon, med medianene i sentralt boksene.

MW-testen for NORIP sin populasjon viser uteliggende observasjoner over og under resten av populasjonen.

Tabell 20 viser statistiske resultater for Mann-Whitney-testen, hvor blant annet p-verdi er presentert. Hodges-Lehmann mediandifferansen med dens 95% KI, for to uavhengige populasjoner med størrelse  $n$  og  $m$ , er mediandifferansen av alle  $n$  og  $m$  parede differanser mellom observasjoner i begge utvalg, kalkulert som  $n_1 - m_1$ . P-verdien forteller om det foreligger statistisk signifikant forskjell mellom to utvalg. Denne parameteren er viktig ved sammenligning av to grupper.

Tabell 20: Tabellen presenterer resultat av oppsummerende statistikk for utført MW-test basert på dette prosjektets og NORIP sin populasjon.

<b>Mann-Whitney resultat, Sammenligning av prosjekter</b>		
<b>Hodges-Lehmann mediandifferanse</b>	-0,1700	95% KI -0,2400 – 0,10000
<b>P-verdi</b>	< 0,0001	

Den grafiske fremstillingen illustrerer godt hvordan prosjektets verdier sprer seg og ligger i forhold til NORIP sine verdier. I tabell 19 er det blant annet synlig at 95% KI for medianen til NORIP er smalere enn for bachelorprosjektet.

### 3.9 Sammenligning av referanseområde for plasma basert på eget og NORIP sitt datamateriale

Det ble også opprettet et referanseområde for kalium i plasma på innsamlet materiale. Hensikt var å kunne se på dette lys av NORIP sitt referanseområde for plasma. Statistisk fremgangsmåte er tilsvarende som for kaliumverdier oppnådd i serum, med det unntak at to ytterligere prøver ble ekskludert fra analysen på grunn av hemolyse. Statistisk analyse for referanseområdet er derfor utført på 61 plasmaprøver, og oppnådde resultat er vist i tabell 21. Rådata for plasmaprøvene ligger vedlagt i vedlegg 2.

Tabell 21: Tabellen presenterer data oppnådd gjennom utarbeidelse av 95% referanseområde for kalium i plasma. Resultatene er basert på 61 innsamlede prøver. Tabellen viser range, gjennomsnittlig verdi og median, samt standardavviket til kaliumverdiene.

<b>Plasmamateriale, Bachelorprosjekt</b>	
<b>Prøvemengde (n)</b>	61
<b>Range, Lav - Høy (mmol/L)</b>	3,39 – 4,79
<b>Gjennomsnitt kalium (mmol/L)</b>	3,93
<b>Median (mmol/L)</b>	3,91
<b>Standardavvik (SD)</b>	0,26



Informasjonen i tabell 2 gir grunnlag for etablering av 95% referanseområde for kalium i plasma, estimert til 3,4 (90% KI 3,3-3,5) - 4,4 (90% KI 4,3-4,5) mmol/L, som vist i tabell 22.

Tabell 22: Tabellen viser resultater oppnådd med robust metode, utført på 61 referanseindivid, for kalium i plasma. Tabellen presenterer 95% referanseområde med 90% KI for både nedre og øvre grense. Nedre og øvre grense, samt 90% KI for grensene, er oppgitt som avrundede verdier.

<b>Referanseområde for kalium i plasma, Bachelorprosjekt</b>	
<b>Statistisk metode</b>	<b>Robust metode</b>
<b>Nedre grense (mmol/L)</b>	3,38
<b>90% KI (mmol/L)</b>	3,27 - 3,49
<b>Øvre grense (mmol/L)</b>	4,41
<b>90% KI (mmol/L)</b>	4,30 - 4,53
<b>Foreslått referanseområde (mmol/L)</b>	3,4 – 4,4

NORIP har også etablert referanseområde for kalium i plasma, som er tatt i bruk ved St. Olavs Hospital (44). Det anvendte referanseområdet til NORIP er 3,5 – 4,4 mmol/L. Tabell 24 viser verdier NORIP har oppnådd ved etablering av referanseområdet for kalium i plasma, utført med ikke-parametrisk metode (43).

Tabell 23: Tabellen viser NORIP sine kalkuleringer ved etablering av referanseområde for kalium i plasma, som inneholder ikke avrundet tallmateriale. Basert på kaliumverdier til 1172 referanseindivid, har NORIP funnet en nedre og øvre grense for p-kalium, med grensenes respektive 90% KI (The Nordic Reference Interval Project 2000).

<b>Referanseområde for kalium i plasma, NORIP</b>	
<b>Statistisk metode</b>	<b>Ikke- parametrisk metode</b>
<b>n</b>	1172
<b>Nedre grense (mmol/L)</b>	3,47
<b>90% KI (mmol/L)</b>	3,45 – 3,49
<b>Øvre grense (mmol/L)</b>	4,38
<b>90% KI (mmol/L)</b>	4,32 – 4,43
<b>Foreslått referanseområde (mmol/L)</b>	3,5 – 4,4

## 4.0 Diskusjon

Formålet med oppgaven var å undersøke om NORIP sitt eksisterende referanseområde for kalium i serum bør brukes videre, eller om et nytt referanseområde bør innsettes ved St. Olavs hospital.

Etterprøvingen ble gjort på bakgrunn av at det mistenkes at den øvre verdien i referanseområdet er for lav, og i stedet burde settes høyere, i likhet med flere andre laboratorier i Norge. For å kunne etterligne preanalytiske faktorer som gjelder ved prøvetaking og prøvebehandling i primærhelsetjenesten, ble det laget en plan for hvordan prøvetakingen skulle foregå, samt hvordan prøvene skulle behandles i etterkant, før analysering. NOKLUS sine prosedyrer for prøvetaking og prøvebehandling ble undersøkt, og disse var omtrent helt like St. Olavs hospitals egne prosedyrer.

Denne studiens populasjon består av totalt av 65 referanseindivider, bestående av medstudenter, lærere og ansatte ved AMB, hvorav 62 referanseindivid ble tatt med videre i studiet. Det ble fjernet tre prøver, hvor to ble fjernet for å sikre anonymisering. Én hemolysert prøve ble tatt bort for å unngå at denne skulle påvirke sluttresultatet. Det er vist at hemolyse kan øke kaliumkonsentrasjonen i pasientprøver.

Denne populasjonens gjennomsnittsalder på 33 år skiller seg fra NORIP sin populasjon med en gjennomsnittlig alder på 47 år. Dessuten er aldersspredningen for de to populasjonene hhv. 20 – 61 og 18 – 90 år, og burde ikke sammenlignes direkte da populasjonen i dette prosjektet ikke er representativt nok i forhold til NORIP. På bakgrunn av dette vil ikke de innsamlede prøvene være helt sammenlignbare med NORIP sin populasjon. Likevel viser litteratur og andre laboratorier, i tillegg til NORIP at det ikke er behov for klassevise referanseområder, med unntak av nyfødte/spedbarn.

Ifølge anbefalinger fra Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, kan et referanseområde verifiseres med så lite som 20 prøver under visse kriterier, for en populasjon med representative referanseindivider. I denne oppgaven er det mest hensiktsmessig å bruke et minimum på 40 referanseindivider, da preanalytiske forhold skal vurderes. NORIP var et prosjekt som hadde som formål å *etablere* referanseområder. Til dette formålet trengs større mengder referanseindivider. Da bachelorprosjektet kun gikk ut på å verifisere et referanseområde, så kan det sies at antallet referanseindivider på 62 er tilstrekkelig til dette formålet. Likevel vil det være vanskelig å gjøre sikre nok klassevise statistiske beregninger på datamaterialet. I bacheloroppgavens referansepopulasjon er antallet menn lavt. I tillegg vil det være vanskelig å analysere hvert av de ulike transportmetoder separat, da alle metodene hadde mindre enn 40 referanseindivider.

For å kunne utarbeide et mest mulig representativt referanseområde, er det hensiktsmessig å ha en jevnest mulig kjønnsfordeling blant referanseindividene. Hvis det i tillegg er ulikhet i kaliumverdier mellom kvinner og menn, så vil dette kunne påvirke referanseområdet og medianen til referansepopulasjonen totalt. NORIP sin fordeling av kjønn i referansepopulasjonen er jevn, med

47% menn og 53% kvinner. I motsetning er kjønnsfordelingen i bachelorprosjektets referansepopulasjon skjevt fordelt. Med kun 24 % menn og 76% kvinner, kan det tenkes at populasjonen ikke er sammenlignbar med NORIP sin populasjon. Ved vurdering av medianen for kvinner og for menn, er den i prosjektets resultater ulik for klassene (se figur 6). For menn er medianen høyere enn for kvinner, i likhet med NORIP (se figur 12). 95% KI sjekkes for hver av medianene. For bachelorprosjektet observeres det at disse overlapper hverandre, og medianene kan på grunnlag av dette sies å *ikke* være signifikant ulike. Likevel er det et faktum at klassepopulasjonen for menn er for liten til å kunne si noe som referanseområde og dets parametere med stor nok sikkerhet. Dette underbygges også av observert p-verdi (se tabell 9). Dersom man ser på 95 % KI for medianene til kvinner og menn i NORIP, så overlapper disse *ikke* hverandre. Her kan medianene derfor sies å være signifikant ulike. Likevel har ikke NORIP valgt å bruke klassesdelte referanseområder for kjønn. Man kan derfor anta at forskjellen på medianene er såpass liten at et felles referanseområde for menn og kvinner er godt nok å anvende i klinikken.

For denne studiens populasjon ble det observert en normalfordeling, som tilsa at populasjonen var skjevt normalfordelt, med p-verdi  $> 0.05$  (se figur 4). I motsetning avdekket testing av datamaterialet til NORIP, at materialet ikke er normalfordelt, med p-verdi  $< 0,0001$ . Dette til tross for langt flere målinger. En tenkelig årsak til at materialet ikke er normalfordelt, er referansepopulasjonens størrelse. Populasjonen kan være så stor at det gjør testene mer sensitiv og nøyaktig, slik at resultatet kommer ut som uforenelig med normalfordeling. At dette prosjektets datamateriale viser seg å være normalfordelt, antas å være feilaktig. Populasjonsstørrelsen ses på som mulig feilkilde. En tidligere nevnt studie viser at kalium ikke er normalfordelt hos friske individer, et funn som er i overensstemmelse med resultat oppnådd for NORIP. Det er derfor tenkelig at utfallet for dette prosjektet ville vært det motsatte dersom populasjonen hadde vært betydeligere større enn 62 individer. Dessuten kan det lave antallet ha ført til populasjonens standardavvik, med  $SD = 0,30$  mmol/L som er noe høyere enn for NORIP, med  $SD = 0,25$  mmol/L. Se tabell 19.

MedCalc kan benytte seg av tre statistiske metoder med ulike egenskaper for å kalkulere referanseområder; normalfordeling, ikke-parametrisk persentilm metode og robust metode. Valget av statistisk metode var avgjørende for dette prosjektet, for å korrekt kunne utgi 95% referanseområde med 2.5 og 97.5- persentiler. Fordi NORIP sitt datamateriale ikke er normalfordelt, og det er mer enn 120 referanseindivider, ble ikke-parametrisk persentilm metode valgt. Dessuten anbefales også denne metoden av CLSI. Pga. bachelorprosjektets distribusjon av datamateriale, ble robust metode brukt. Metoden er velegnet for et lavt antall målinger, og tar hensyn til uteliggende verdier. I tillegg utgir metoden et noe smalere, og dermed sikrere 90% KI for referansegrenser.

Dette prosjektets referanseverdier ble vurdert mtp.  $\Delta$ Tid, kjønn, alder, og transportmetode, i et forsøk på å kunne se på eventuelle sammenhenger. Det samme ble gjort for NORIP, med unntak av  $\Delta$ Tid, da

dette ikke var opplyst. Regresjonsanalysen for kaliumverdier opp mot  $\Delta$ Tid i bachelorprosjektet viste ingen klar sammenheng (se figur 8). Det antas derfor at prøvematerialet analysert dagen etter prøvetaking ikke har noen markant betydning for kaliumverdien. Dette er positivt i tilfellene der prøven tas i primærhelsetjenesten, og ikke ankommer laboratoriet før dagen etter prøvetaking. I tillegg stemmer dette med holdbarhetsdata for kalium i serum.

Regresjonsanalysen av kaliumverdier opp imot alder på referanseindividene viser en liten sammenheng, for begge referansepopulasjoner. Regresjonsplottene viser en liten økning av kaliumverdier ved økende alder (se figur 7). Økningen er liten, dvs. omtrent 0,01 mmol/L pr. år for bacheloroppgavens referansepopulasjon. P- verdien er mindre enn 0,05. For NORIP er p-verdien mindre enn 0,001. Dermed bekreftes det at det er en viss lineær korrelasjon mellom kaliumkonsentrasjon og alder. Selv om konsentrasjonen i serum øker for hvert år, så er økningen såpass liten, at NORIP har unnlatt å lage klassevise referanseområder. Også som tidligere beskrevet, viser litteratur og andre laboratorier at det ikke er behov for klassevise referanseområder, som for eksempel alder. På bakgrunn av dette ble det ikke tatt hensyn til alder i bachelorprosjektet. Samtidig vil dette funnet sees på som en potensiell feilkilde, ved at en populasjon med betydelig overvekt av eldre individer vil kunne få høyere kaliumverdier. Denne feilkilden kan være av neglisjerbar betydning, dersom det tas hensyn til god aldersfordeling.

Statistiske beregninger har vist at det foreslåtte referanseområdet for kalium basert på denne studiens populasjon er 3,6 (90% KI 3,5-3,7) til 4,8 (90% KI 4,7-4,9) mmol/L. For NORIP viste etterprøvingen et referanseområde på 3,6 (90% KI 3,58-3,61) til 4,6 (90% KI 4,56-4,60) mmol/L. Disse 90% konfidensintervallene ligger ikke helt i overensstemmelse med hva NORIP foreslår, som er 3,60 – 3,63 (nedre referansegrense på 3,61 mmol/L) og 4,61 – 4,66 (øvre referansegrense på 4,64 mmol/L). Årsaken til dette ligger i etterprøving av NORIP sitt referanseområde i denne oppgaven. Et viktig funn i denne sammenligningen er at denne studiens øvre grense i referanseområdet ligger 0,2 mmol/L over NORIP sin øvre grense, med like nedre grenser. Dette avviket kan skyldes at prøvene til NORIP er sentrifugert kortere tid etter koagulering. Mekanismen er at kalium i mindre grad frigjøres fra blodcellene.

2,5- og 97,5- persentilene i referanseområdet til bachelorprosjektet har større usikkerhet enn tilsvarende persentiler til NORIP. Derfor er det hensiktsmessig å sammenligne medianer, som har 95% KI. I tillegg kan kvartilene fra Mann-Whitney-testene sammenlignes, da de også har 95% KI. Direkte sammenligning av populasjoner er gjort i figur 14 og tabell 19. Oppnådde medianer er 4,17 mmol/L (95% KI 4,12 – 4,32 mmol/L) for bachelorprosjektet, og 4,05 mmol/L (95% KI 4,03 – 4,06 mmol/L) for NORIP. Visuell vurdering av Mann-Whitney-test viser en differanse i medianer. 95% KI for medianene overlapper ikke, slik at det er underliggende å tro at medianene er signifikant ulike. Denne påstanden bekreftes gjennom p-verdien fra Mann-Whitney-testen som er lavere enn 0.0001.

Det kan derfor aksepteres at det foreligger en statistisk signifikant forskjell mellom medianene, og dermed også populasjonene. I tillegg overlapper de interkvartile breddene, noe som viser at populasjonene har en viss likhet. Likevel overlapper ikke 95% KI for verken 25- eller 75-kvartilene, noe som tyder på at det foreligger en signifikant forskjell mellom kvartilene.

Det er også hensiktsmessig å undersøke de ulike transportmetodene, for å se om det foreligger noen forskjell i resultater. Tabell 10 viser fordelingen av prøvene, og figur 9 viser sammenligning av metodene. I disse ses en ulikhet mellom medianene. Det observeres at prøver sendt med PND er tilnærmet dobbelt så mange som de to andre transportmetodene, men under 40 referanseindivider anbefalt for verifisering.

PND har to uteliggende verdier på 4,83 og 4,87 mmol/L. Ekskludering av de to verdiene resulterer i en uforandret median (4,13 mmol/L), men et smalere 95% KI for medianen som blir 4,05 – 4,26 mmol/L, mot tidligere 4,07 – 4,29 mmol/L. Virkningen på KI blir som forventet når uteliggende verdier ekskluderes. Likevel er verdiene så nært resten av populasjonen, at det dermed blir uhensiktsmessig å ekskludere dem. For øvrig har disse verdiene en neglisjerbar innvirkning på 95% KI for median, med 0,01 mmol/L. Et annet argument for å beholde uteliggere er at de statistiske metodene er utviklet for å ikke la seg påvirke av dem.

I figur 9 kan det observeres en betydelig overlapping mellom KI for alle de tre transportmetodene. Resultatet i denne figuren er i seg selv ikke nok til å kunne påstå at differansen ikke er signifikant ulik. Statistiske beregninger i tabell 11 er et godt supplement for sammenligning. Ut ifra tabellen kan det trekkes teori om at differansen mellom fraktmetoder ikke er signifikant ulik. P-verdier i tabell 11 oppnådd ved utførelse av Mann-Whitney-test for transportmetodene opp mot hverandre, viser p-verdier mellom 0,38 og 0,70. P-verdiene er betydelig høyere enn  $\alpha = 0.05$  for 95% KI. På grunnlag av dette kan det sies at differansen mellom transportmetodene ikke er signifikant ulike. Det vil med andre ord ikke være av særlig betydning for kaliumverdier hvilke måter serumaterialet fraktes på. Samtidig er det uvisshet om alle transportmetodene samlet vil gi signifikant høyere kaliumverdier. For å kunne si noe om dette, ville det ha vært hensiktsmessig å sammenligne med serumprøver som blir analysert umiddelbart etter sentrifugering.

Hemolyse er den største og viktigste feilkilden ved kaliumanalyse. Kun én serumprøve viste hemolyse, som var mellom 70 – 140 mg/dL (++) i hemoglobin med en kaliumkonsentrasjon på 4,38 mmol/L. Nøyaktig verdi på hemoglobinkonsentrasjon i mg/dL er ikke tilgjengelig, pga. manglende informasjon fra absorpsjonsmålingen på instrumentet. Kaliumverdien ligger 0,21 mmol/L over medianen for populasjonen. Den hemolyserte prøven påvirket totalresultatet i svært liten grad; avrundet, forble medianen og referanseområdet med deres 90% KI uforandret. Det er uvisst hvilken kaliumkonsentrasjon prøve ville ha hatt uten hemolyse. Derfor er det lite hensiktsmessig å inkludere hemolyseprøven i beregninger.

Referanseområdet beregnet for kalium i plasma sammenlignes med tilsvarende referanseområde til NORIP. Dette gjøres hovedsakelig for å sjekke om referansepopulasjonene er sammenlignbare. Dette kan ses på som en slags kontroll av bachelorprosjektet. Det er tidligere nevnt at bachelorprosjektets populasjoner både har skjev kjønnsfordeling, i tillegg til en gjennomsnittsalder som er lavere enn NORIP sin populasjon. Sammenligning av referanseområdene for plasma vil derfor være en slags kontroll om disse ulikhetene har en innvirkning på referanseområdet. Tabell 22 viser resultatene for bachelorprosjektet, og tabell 24 for NORIP. Som en følge av manglende tilgang til NORIP sine rådata for kalium i plasma, undersøkes derfor kun referanseområdene de har etablert.

Referanseområdet for begge populasjoner er tilnærmet like. For dette studiet ligger referanseområdets nedre grense 0,1 mmol/L under NORIP sin nedre grense. De øvre grensene er identiske. Grunnen til den lille ulikheten i nedre grense kan tenkes å være tilfeldig, eller størrelsen på populasjonene. Referanseområdenes tilnærmede likhet kan derfor være en indikator på at referansepopulasjonen til bachelorprosjektet er sammenlignbar med NORIP.

Gitt tilegnet kunnskap om at kaliumverdier i plasma har tendens til å ligge noe lavere enn kaliumverdier i serum, sammenlignes plasma og serum. Hensikten er å undersøke om denne teorien er sann for dette studiet. Utgangspunktet for sammenligning av plasma og serum tas i medianen for disse to. Medianen for plasma ligger 0,26 mmol/L under medianen for serum. Basert på oppnådd p-verdi på  $<0.0001$ , kan en anta at det er en signifikant forskjell mellom medianene. Dette funnet er i overensstemmelse med etablert teori. Det stemmer med litteratur som konkluderer med at serumverdier kan ligge mellom 0.2 og 0.5 mmol/L over plasma.

Det ble undersøkt eventuelle likheter eller ulikheter mellom referanseområder etablert ved bruk av robust og ikke-parametrisk metode. Tabell 15 og 16 viser resultatene for hver av de statistiske metodene. Det observeres at både nedre og øvre referansegrense for serum er økt med omtrent 0,1 mmol/L. Ikke-parametrisk metode oppgir ingen 90% KI for referansegrensene, da målingene er for få for denne metoden. Dette er årsaken til at robust metode er den mest anbefalte metoden for denne oppgaven.

## 5.0 Konklusjon

NORIP var et prosjekt som etablerte referanseområder, og brukte derfor en større referansepopulasjon med flere tusen individer, med jevn kjønnsfordeling. I motsetning til NORIP sin populasjon, har bachelorprosjektet en skjev kjønnsfordeling og ulik alder på individene.

Bachelorprosjektets referansepopulasjon oppfyller anbefalt krav om antall referanseindivider for verifisering. Basert på populasjonenes størrelse, normalfordeling og anbefalinger fra fagmiljø, anvendes robust metode for bachelorprosjektets populasjon, og ikke-parametrisk metode for NORIP.

Basert på median og deres 95% KI for menn og kvinner, er det for dette prosjektets populasjon ingen signifikant ulikhet mellom kjønnene. For NORIP sin populasjon er det derimot vist signifikant ulikhet. Ulikheten er av mindre betydning for å kunne etablere klassevise referanseområder.

Undersøkelser viser at det ikke er noen sammenheng mellom kaliumkonsentrasjoner og  $\Delta$ Tid innenfor sykehusets holdbarhetsdata. Derimot viser resultatene at kaliumkonsentrasjoner øker i liten grad med alder. Denne økningen er så lav at det i følge NORIP ikke er behov for aldersfordelte referanseområder.

Etter prøvetaking ble prøvene fraktet på ulike måter. Dette for å etterligne primærhelsetjenestens måte å transportere prøvene på. Metodene ble sammenlignet, men viste ingen signifikant ulikhet. Likevel kan transportmetodene i helhet ha bidratt til høyere kaliumkonsentrasjoner.

I bachelorprosjektet er én prøve hemolysert, og ble derfor ikke tatt med i beregningene, da usikkerheten på kaliumkonsentrasjonen er for stor. Tilleggsberegninger har vist at denne prøven ikke påvirket de statistiske variablene i stor grad.

Sammenligning med NORIP sitt referanseområde for kalium i plasma viser tilnærmet samme referanseområde. Dette viser at bachelorprosjektets populasjon kan antas å være sammenlignbar med NORIP sin populasjon. Samtidig ble det vist at kaliumkonsentrasjoner i plasma faktisk ligger lavere enn for serum.

Referanseområdene for begge populasjonene er ulike. Nedre grenser er tilnærmet like, men øvre grense for bachelorprosjektet ligger høyere enn NORIP sin øvre grense. Dette bekreftes av oppnådde resultat for referansegrensenes 90% KI. Denne observasjonen støttes ved å se på medianene og deres 95% KI. Til slutt er det nærliggende å påstå at dagens referanseområde til NORIP trolig er for lavt. Endring av referanseområde for kalium i serum kan ikke kun baseres på denne oppgaven, men benyttes som støtte og eventuelt bevis.

## Referanser

1. Potassium | The Nutrition Source | Harvard T.H. Chan School of Public Health [Internett]. [sitert 29. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/potassium/>
2. Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 5. utgave. Mosby Elsevier; 2009. 1200 s.
3. Urdal P, Brun A, Åsberg A. *Brukerhåndbok - Medisinsk Biokjemi*. 4. utgave. Akademisk Forlag AS; 2009. 635 s.
4. Sterns RH, Cox M, Feig PU, Singer I. Internal Potassium Balance and the Control of the Plasma Potassium Concentration. *Medicine*. september 1981;60(5):339–54.
5. Sodium-Potassium pump [Internett]. ResearchGate. [sitert 24. mai 2021]. Tilgjengelig på: [https://www.researchgate.net/figure/Sodium-Potassium-pump-which-uses-ATP-to-pump-sodium-ions-out-of-the-cell-The-hydrolysis\\_fig2\\_273751706](https://www.researchgate.net/figure/Sodium-Potassium-pump-which-uses-ATP-to-pump-sodium-ions-out-of-the-cell-The-hydrolysis_fig2_273751706)
6. Marshall WJ, Bangert SK. *Clinical Biochemistry: Metabolic and clinical aspects*. 2. utgave. Churchill Livingstone; 2008. 984 s.
7. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. *Essentials of Anatomy and Physiology*. 6. McGraw- Hill; 2007.
8. Amundsen EK, Apelsest TO, Aslaksen EH, Averina M, Berg JP, Berg JA, mfl. Kalium, S. I: Nasjonal brukerhåndbok i medisinsk biokjemi [Internett]. [sitert 19. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=0d1754ea656512219f19&highlight=true>
9. Lederer E. Hypokalemi. Medscape [Internett]. 8. januar 2021 [sitert 19. mars 2021]; Tilgjengelig på: <https://emedicine.medscape.com/article/242008-overview#a1>
10. Hovland A, Bjørnbæk E, Leren TP. Gitelmans syndrom – en differensialdiagnose ved hypokalemi. *Tidsskrift for Den norske legeförening* [Internett]. 22. april 2004 [sitert 19. mars 2021]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2004/04/aktuelt/gitelmans-syndrom-en-differensialdiagnose-ved-hypokalemi>
11. Gamba G. The thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. *Am J Physiol Renal Physiol*. oktober 2009;297(4):F838–48.
12. Lederer E. Hyperkalemi. Medscape [Internett]. 6. desember 2020 [sitert 19. mars 2021]; Tilgjengelig på: <https://emedicine.medscape.com/article/240903-overview>
13. Šálek T. Pseudohyperkalemi - Potassium released from cells due to clotting and centrifugation - a case report. *Biochem Med (Zagreb)* [Internett]. 15. februar 2018 [sitert 19. mars 2021];28(1). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5806620/>
14. Feilkilder ved analyse og vurdering av kalium [Internett]. Helse Møre og Romsdal. [sitert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://helse-mr.no/avdelinger/klinikk-for-diagnostikk/feilkilder-ved-analyse-og-vurdering-av-kalium>
15. Asirvatham JR, Moses V, Bjornson L. Errors in Potassium Measurement: A Laboratory Perspective for the Clinician. *N Am J Med Sci*. april 2013;5(4):255–9.
16. Husøy A-M. *Blodprøvetaking i praksis*. 2. utg. Cappelen Damm Akademisk; 2014.



17. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics. 8. utg. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018.
18. Imke C.A. Munnix, Martien Schellart, Cecile Gorissen, Henne A. Kleinveld. Factors reducing hemolysis rates in blood samples from the emergency department. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2011;49:157–65.
19. Gode rutiner ved prøvetaking- Anbefalinger og praktiske tips for rekvirering, tapping og merking av prøver til laboratoriet [Internett]. [sitert 6. mai 2021]. Tilgjengelig på: [https://www.furst.no/globalassets/pdf/furst\\_temahefte\\_05\\_web.pdf](https://www.furst.no/globalassets/pdf/furst_temahefte_05_web.pdf)
20. G. Garratty. The James Blundell Award Lecture 2007: Do we really understand immune red cell destruction? *Transfus Med*. 29. april 2008;321–34.
21. Van Elslande J, Dominicus T, Toelen J, Frans G, Vermeersch P. A case of severe pseudohyperkalaemia due to muscle contraction. *Biochem Med (Zagreb)* [Internett]. 15. juni 2020 [sitert 30. april 2021];30(2). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7271752/>
22. McDonough AA, Youn JH. Role of Muscle in Regulating Extracellular [K+]. *Seminars in Nephrology*. 1. september 2005;25(5):335–42.
23. Clausen T. Quantification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pumps and their transport rate in skeletal muscle: Functional significance. *J Gen Physiol*. oktober 2013;142(4):327–45.
24. Prøvetaking (blod, urin, spinalvæske, feces) [Internett]. St. Olavs hospital. [sitert 26. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/provetaking-blod-urin-spinalveske-feces>
25. Don BR, Sebastian A, Cheitlin M, Christiansen M, Schambelan M. Pseudohyperkalemia Caused by Fist Clenching during Phlebotomy. *New England Journal of Medicine*. 3. mai 1990;322(18):1290–2.
26. Om Noklus [Internett]. NOKLUS. [sitert 8. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.noklus.no/om-noklus/>
27. Harris, Eugene K., Boyd, James C. Statistical bases of reference values in laboratory medicine. Bd. 146. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc.; 1995.
28. Horowitz GL, Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline [Internett]. 2010. Tilgjengelig på: [https://clsi.org/media/1421/ep28a3c\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1421/ep28a3c_sample.pdf)
29. Eichelmann MA, Lewbart GA. Hemolymph chemistry reference ranges of the chilean rose tarantula *grammostola rosea* (Walkenaer, 1837) using the vetscan biochemistry analyzer based on IFCC- CLSI C28-A3. *zamd*. september 2018;49(3):528–34.
30. Horn PS, Pesce AJ, Copeland BE. A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clinical Chemistry*. 1. mars 1998;44(3):622–31.
31. Lanzante JR. Resistant, Robust and Non-Parametric Techniques for the Analysis of Climate Data: Theory and Examples, Including Applications to Historical Radiosonde Station Data. *International Journal of Climatology*. 1996;16(11):1197–226.

32. Schoonjans F. Reference interval [Internett]. MedCalc. [sitert 14. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.medcalc.org/manual/referenceinterval.php>
33. Bootstrap - Institutt for biovitenskap [Internett]. [sitert 14. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/matematikk/bootstrap.html>
34. Odd O. Aalen. Innføring i statistikk med medisinske eksempler. 2. utgave. Ad Notam Gyldendal; 1994.
35. Gunnar G. Løvås. Statistikk for universiteter og høyskoler. 3. utgave. Universitetsforlaget; 2015.
36. Store norske leksikon. Normalfordeling. I: Store norske leksikon [Internett]. 2019 [sitert 7. mai 2021]. Tilgjengelig på: <http://snl.no/normalfordeling>
37. Morten Helbæk. Statistikk for kjemikere. Trondheim: Tapir; 2001.
38. Feldman M, Dickson B. Plasma Electrolyte Distributions in Humans-Normal or Skewed? Am J Med Sci. november 2017;354(5):453–7.
39. Validering/verifisering av klinisk kjemiske analyser [Internett]. [sitert 9. mai 2021]. Tilgjengelig på: [http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val\\_NKK.pdf](http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val_NKK.pdf)
40. Ozarda Y, Higgins V, Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 1. januar 2019;57(1):30–7.
41. Reference intervals Noklus 2019 [Internett]. [sitert 21. mai 2021]. Tilgjengelig på: [https://www.noklus.no/media/afxbortx/reference-intervals-noklus\\_2019.pdf](https://www.noklus.no/media/afxbortx/reference-intervals-noklus_2019.pdf)
42. Rustad P, Felding P, Franzson L, Kairisto V, Lahti A, Mårtensson A, mfl. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. juni 2004;64(4):271–84.
43. NORIP: Nordic Reference Interval Project [Internett]. [sitert 20. mai 2021]. Tilgjengelig på: <http://nyenga.net/norip/index.htm>
44. Analyser medisinsk biokjemi og immunologi, St. Olavs Hospital, Trondheim [Internett]. [sitert 9. april 2021]. Tilgjengelig på: [https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk\\_biokjemi/ask/TestFinder.html](https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html)
45. Laboratorietjenester i Sykehuset Østfold [Internett]. Sykehuset Østfold. [sitert 2. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://sykehuset-ostfold.no/laboratorietjenester>
46. Kalium - Stavanger uni [Internett]. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: [https://labhandbok.sus.no/docs/doc\\_17582/index.html](https://labhandbok.sus.no/docs/doc_17582/index.html)
47. Kalium (P-Kalium) - Unilabs [Internett]. Unilabs Labhåndbok. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://labhandbok.no/labhaandbok/kalium-2/>
48. Kalium - Helse Møre og Romsdal [Internett]. Helse Møre og Romsdal. [sitert 27. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://helse-mr.no/fag-og-forskning/tenester/medisinsk-biokjemi/analyser-og-undersokelser-molde-og-kristiansund/kalium>

49. S-Kalium Fürst [Internett]. [sitert 27. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.furst.no/analyse-og-klinikk/analyser/kalium/>
50. Kalium - Helse Bergen [Internett]. [sitert 27. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://analyseoversikten.no/analyse/179>
51. Graven K, Nersund R. Advia Chemistry XPT- Oppstart, bruk og vedlikehold. AMB. I: EQS. 1.28. Trondheim: Avdeling for medisinsk biokjemi; 2020.
52. Nersund R. Serumindeks på Advia Chemistry XPT. AMB. 2021.
53. Åsbø-Berge C. Rutiner for Hente/bringe-tjenesten. LMK. I: EQS. 1.69. Trondheim: Avdeling for medisinsk biokjemi; 2021.
54. Graven K. Advia Chemistry XPT; Kalibratorer og kalibreringsrutiner.AMB. I: EQS. 1.9. Trondheim: Avdeling for medisinsk biokjemi; 2021.
55. Pakningsvedlegg Siemens ADVIA Chemistry XPT, Kalium (K).
56. Nersund R. Kalium i serum og plasma, Advia Chemistry XPT. AMB. I: EQS. 3.3. Trondheim: Avdeling for medisinsk biokjemi; 2020.
57. Schoonjans F. MedCalc statistical software [Internett]. MedCalc. [sitert 20. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.medcalc.org/>

## Vedlegg

### Innhold

Vedlegg 1: inneholder bacheloroppgavens rådata for kalium i serum. Data er brukt som utgangspunkt for statistiske beregninger i oppgaven.

Vedlegg 2: inneholder bacheloroppgavens rådata for kalium i plasma. Data er brukt for å se på plasmaprøvene sitt referanseområde.

Vedlegg 1: tabellen viser rådataene for kalium i serum. HBSD= Hente-bringe samme dag, PND= Post neste dag, og HBDE= Hente-bringe dagen etter. Løpenummer 1 og 2 er ikke tatt med, da disse kun var test-analyser. Prøve nr. 5 og 22 er fjernet med hensyn til anonymitet. Prøve nr. 25 inneholdt hemolyse, og ble derfor ikke brukt videre i statistiske beregninger.

Serum							
Løpenummer	Kjønn	Alder	Δtid (timer:min)	Kaliumverdi (mmol/L)	Hemolyseindeks	Transportmetode	Kommentar
3	Mann	24	09:01	3.88	-	HBSD	
4	Kvinne	39	06:26	4.21	-	HBSD	
5			06:14	4.54	-	HBSD	fjernet pga. anonymitet
6	Kvinne	45	06:09	4.45	-	HBSD	
7	Mann	34	06:00	4.23	-	HBSD	
8	Mann	23	05:47	4.09	-	HBSD	
9	Kvinne	41	05:32	4.05	-	HBSD	
10	Kvinne	61	23:02	4.65	-	PND	
11	Kvinne	54	00:27	4.46	-	HBDE	
12	Kvinne	49	22:56	3.97	-	PND	
13	Mann	40	00:21	4.51	-	HBDE	
14	Kvinne	42	23:42	3.79	-	HBDE	
15	Kvinne	28	22:03	4.01	-	PND	
16	Kvinne	28	23:18	4.33	-	HBDE	
17	Kvinne	22	20:45	3.68	-	PND	
18	Kvinne	23	20:30	4.11	-	PND	
19	Kvinne	27	19:51	3.74	-	PND	
20	Mann	22	21:45	4.59	-	HBDE	
21	Kvinne	21	21:35	4.16	-	HBDE	
22			23:15	3.94	-	PND	fjernet pga. anonymitet
23	Kvinne	60	00:40	4.17	-	HBDE	
24	Mann	24	23:17	4.40	-	PND	
25	Mann	24	04:38	4.38	++	HBSD	fjernet pga. hemolyse
26	Mann	50	04:56	4.88	-	HBSD	
27	Kvinne	24	23:42	4.08	-	PND	
28	Kvinne	23	23:44	4.10	-	PND	
29	Kvinne	23	05:13	4.05	-	HBSD	
30	Kvinne	33	23:49	4.13	-	PND	
31	Kvinne	56	22:32	4.77	-	PND	
32	Kvinne	32	22:50	3.97	-	PND	
33	Kvinne	20	20:46	4.17	-	PND	
34	Kvinne	25	22:15	4.54	-	HBDE	
35	Mann	29	19:53	4.25	-	PND	
36	Mann	22	21:01	4.34	-	PND	
37	Kvinne	52	22:05	4.33	-	PND	
38	Mann	28	20:00	4.05	-	PND	
39	Kvinne	23	23:54	4.04	-	HBDE	
40	Kvinne	26	19:59	4.83	-	PND	
41	Mann	57	23:44	4.52	-	PND	
42	Kvinne	26	20:01	4.13	-	PND	
43	Kvinne	29	05:09	4.45	-	HBSD	
44	Mann	38	21:45	4.14	-	HBDE	
45	Kvinne	55	01:00	5.01	-	HBDE	
46	Kvinne	28	23:12	4.20	-	PND	
47	Mann	28	20:03	4.87	-	PND	
48	Kvinne	56	23:20	4.05	-	PND	
49	Kvinne	37	00:42	4.63	-	HBDE	
50	Kvinne	58	22:56	4.50	-	PND	
51	Kvinne	52	00:33	4.40	-	HBDE	
52	Kvinne	27	05:52	4.13	-	HBSD	
53	Kvinne	27	05:34	4.47	-	HBSD	
54	Kvinne	53	22:42	4.37	-	PND	
55	Kvinne	22	00:42	4.27	-	PND	
56	Kvinne	25	06:27	4.16	-	HBSD	
57	Kvinne	25	06:21	3.84	-	HBSD	
58	Kvinne	23	23:33	3.91	-	PND	
59	Kvinne	23	22:36	4.32	-	PND	
60	Kvinne	23	22:34	4.17	-	PND	
61	Kvinne	23	22:22	4.02	-	PND	
62	Kvinne	27	21:38	3.96	-	PND	
63	Kvinne	27	03:28	3.85	-	HBDE	
64	Kvinne	26	20:36	4.12	-	PND	
65	Kvinne	27	03:38	4.48	-	HBDE	
66	Mann	20	02:18	4.00	-	HBDE	
67	Mann	23	02:19	3.88	-	HBDE	

Vedlegg 2: tabellen viser rådataene for kalium i plasma. Løpenummer 1 og 2 er ikke tatt med, da disse kun var test-analyser. Prøve nr. 5 og 22 er fjernet med hensyn til anonymitet. Prøve nr. 8 og 61 inneholdt hemolyse, og ble derfor ikke brukt videre i statistiske beregninger.

Plasma						
Løpenummer	Kjønn	Alder	Kaliumverdi (mmol/L)	Hemolyseindeks	Transportmetode	Kommentar
3	Mann	24	3,67	-	Rørpost	
4	Kvinne	39	4,03	-	Rørpost	
5			4,09	-	Rørpost	fjernet pga. anonymitet
6	Kvinne	45	4,16	-	Rørpost	
7	Mann	34	4,02	-	Rørpost	
8	Mann	23	4,01	++	Rørpost	fjernet pga. hemolyse
9	Kvinne	41	3,77	-	Rørpost	
10	Kvinne	61	4,33	-	Rørpost	
11	Kvinne	54	4,18	-	Rørpost	
12	Kvinne	49	3,77	-	Rørpost	
13	Mann	40	4,25	-	Rørpost	
14	Kvinne	42	3,66	-	Rørpost	
15	Kvinne	28	4,01	-	Rørpost	
16	Kvinne	28	4,26	-	Rørpost	
17	Kvinne	22	3,39	-	Rørpost	
18	Kvinne	23	3,81	-	Rørpost	
19	Kvinne	27	3,67	-	Rørpost	
20	Mann	22	4,26	-	Rørpost	
21	Kvinne	21	3,87	-	Rørpost	
22			3,61	-	Rørpost	fjernet pga. anonymitet
23	Kvinne	60	3,86	-	Rørpost	
24	Mann	24	4,07	-	Rørpost	
25	Mann	24	3,80	-	Rørpost	
26	Mann	50	4,44	-	Rørpost	
27	Kvinne	24	3,93	-	Rørpost	
28	Kvinne	23	3,69	-	Rørpost	
29	Kvinne	23	3,78	-	Rørpost	
30	Kvinne	33	3,87	-	Rørpost	
31	Kvinne	56	4,39	-	Rørpost	
32	Kvinne	32	3,70	-	Rørpost	
33	Kvinne	20	3,93	-	Rørpost	
34	Kvinne	25	3,97	-	Rørpost	
35	Mann	29	3,97	-	Rørpost	
36	Mann	22	3,83	-	Rørpost	
37	Kvinne	52	3,99	-	Rørpost	
38	Mann	28	3,92	-	Rørpost	
39	Kvinne	23	3,55	-	Rørpost	
40	Kvinne	26	4,35	-	Rørpost	
41	Mann	57	4,21	-	Rørpost	
42	Kvinne	26	3,81	-	Rørpost	
43	Kvinne	29	4,07	-	Rørpost	
44	Mann	38	3,76	-	Rørpost	
45	Kvinne	55	4,79	-	Rørpost	
46	Kvinne	28	3,89	-	Rørpost	
47	Mann	28	4,40	-	Rørpost	
48	Kvinne	56	3,73	-	Rørpost	
49	Kvinne	37	3,91	-	Rørpost	
50	Kvinne	58	4,09	-	Rørpost	
51	Kvinne	52	4,00	-	Rørpost	
52	Kvinne	27	3,81	-	Rørpost	
53	Kvinne	27	3,76	-	Rørpost	
54	Kvinne	53	4,08	-	Rørpost	
55	Kvinne	22	4,01	-	Rørpost	
56	Kvinne	25	3,76	-	Rørpost	
57	Kvinne	25	3,50	-	Rørpost	
58	Kvinne	23	3,69	-	Rørpost	
59	Kvinne	23	3,92	-	Rørpost	
60	Kvinne	23	3,94	-	Rørpost	
61	Kvinne	23	4,29	++	Rørpost	fjernet pga. hemolyse
62	Kvinne	27	3,67	-	Rørpost	
63	Kvinne	27	3,47	-	Rørpost	
64	Kvinne	26	3,71	-	Rørpost	
65	Kvinne	27	3,99	-	Rørpost	
66	Mann	20	3,86	-	Rørpost	
67	Mann	23	3,79	-	Rørpost	