

Kandidatnummer: 10027, 10003, 10033

# Holdbarhet av protein C og APC-resistens i plasma og fullblod ved romtemperatur og frysetemperatur

Bacheloroppgave i bioingeniørfag BI301305

Veileder: Lutz Schwettmann

Medveileder: Ida Kristin Dyrkorn

Mai 2023

BI301305 Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Kandidatnummer: 10003, 10027, 10033

Innleveringsdato: 16.05.2023

Antall sider: 62

Teoretisk veileder: Lutz Schwettmann

Praktisk veileder: Ida Kristin Dyrkorn

Tittel: Holdbarhet av protein C og APC-resistens i plasma og fullblod ved romtemperatur og frysetemperatur.

## Sammendrag

Denne bacheloroppgaven er en holdbarhetsstudie på protein C og APC-resistens. Målet var å undersøke om frysing påvirker aktiviteten til protein C og APC-resistens etter oppbevaring i romtemperatur i 24 timer. Disse to analysene gjennomføres på plasma tilsendt fra eksterne legekontor på ukentlig basis ved Ålesund sykehus. Det var ønskelig fra Ålesund sykehus og Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet i Ålesund for å undersøke om nåværende prosedyre for oppbevaring av prøvene før analyseringen er akseptabel.

Det ble tatt to citratglass av hver av de 27 deltakerne. Glassene ble delt opp slik at en del ble oppbevart i fullblod og resten ble avpipettert og analysert rett etter sentrifugering i plasma. Prøvene ble analysert igjen åtte timer etter prøvetakingen, og enda en gang etter 24 timer. Ved siste analysen ble både plasma og fullblod analysert. Forsøket ble utført etter kriteriene, basert på biologisk variasjon, som totalfeil på 9,9 % og 2,4 % for protein C og APC-resistens, respektivt, og tillat bias for protein C på 4,4 % og APC-resistent på 1,2 %.

Resultatet ble at protein C har en holdbarhet på over 24 timer ved romtemperatur i både plasma og fullblod. Analyseresultatene til APC-resistens viser at gjennomsnittsendringen er innen akseptgrensen på 0,8 % under de samme betingelsene for analysering ved åtte timer i romtemperatur, men med flere verdier for langt utenfor akseptgrensene til at det kan regnes som holdbart.

Eksposering for frysetemperaturer over tid viser at frysing påvirker holdbarheten til protein C negativt, men viser seg til å ha en litt bedre evne til å bevare holdbarheten til APC-resistens. Prosedyrene for oppbevaring av protein C og APC-resistens ved Ålesund sykehus er ikke akseptable om en baserer holdbarhetskriteriene kun på biologisk variasjon, men at praksisen i dag kan bli ansett som akseptabel om holdbarheten blir basert på kriteriene for klinisk relevante endringer.

## Abstract

This bachelor's thesis is a stability study of protein C and APC resistance. The aim was to determine whether freezing affects the activity of protein C and APC resistance after storage at room temperature for 24 hours. These two analyses are performed on plasma sent from general practitioners' offices on a weekly basis at Ålesund Hospital. It was requested from Ålesund Hospital and the Norwegian University of Science and Technology in Ålesund to investigate whether the current procedure for storing the samples before analysis is acceptable for the stability of the plasma.

Two citrate tubes were taken from each of the 27 participants. Tubes were divided so that some were stored in whole blood and the rest was pipetted and analyzed immediately after centrifugation. The samples were reanalyzed eight hours after sampling, and one more time after 24 hours. After 24 hours, both plasma and whole blood were analyzed. The experiment was carried out according to the criteria of total error of 9.9 % and 2.4 % for protein C and APC resistance, respectively, and allowable bias for protein C of 4.4 % and APC resistance of 1.2 %.

The result was that protein C is stable over 24 hours at room temperature in both plasma and whole blood. The APC resistance analysis results show the average change is less than the acceptance limit of 0.8 % using same conditions for analysis after eight hours in room temperature, but there are several values too far outside the acceptance limits to be considered sustainable.

Exposure to freezing temperatures over time shows that freezing negatively affects the stability of protein C but appears to have a slightly better ability to preserve the stability of APC resistance. The storage procedures for protein C and APC resistance at Ålesund Hospital are not acceptable if the stability criteria are based solely on biological variation, but the current practice may be considered acceptable if stability is based on the criteria for clinically relevant changes.

## Forord

Denne praktiske bacheloroppgaven i emnet BI301305 er delen av bioingeniørstudiet våren 2023. Oppgaven markerer avslutningen av vår treårige utdanning i bioingeniør ved NTNU i Ålesund.

Vi har fått mulighet til å fordype oss i et tema som vi har en stor interesse for og ha en lærerik forskningsprosess. Det endelige resultatet er svaret på en problemstilling som Ålesund sykehus har kommet med. Vi håper at forskningen vår vil bidra til å hjelpe å sikre riktige prøvesvar og være til nytte for bioingeniører, bioingeniørstudenter og andre.

Takk til våre fantastiske veiledere, Ida Kristin Dyrkorn og Lutz Schwettmann, for hjelp ved den praktiske gjennomføringen og det skriftlige arbeidet, samt gode råd og tilbakemeldinger. Vi vil takke Avdeling for medisinsk biokjemi og blodbank ved Ålesund sykehus, og alle tilsette for muligheten til å bruke laboratoriet og andre fasiliteter for å gjennomføre forsøket. Ikke minst takk til alle deltakere i studien.

## Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon.....	1
1.1 Innledning .....	1
1.2 Problemstilling og avgrensing .....	1
1.3 Tidligere studier .....	2
1.4 Teori.....	3
1.4.1 Hemostase .....	3
1.4.2 Danning av koagulasjonsfaktorer og inhibitorer.....	6
1.4.3 Protein C og APC .....	7
1.4.4 APC-resistens og faktor V Leiden mutasjon .....	8
1.4.5 Protein C mangel og medikamentbruk.....	9
1.4.6 Citratglass og preanalytiske faktorer .....	10
1.4.7 Kriterier for holdbarhet og statistiske metoder .....	10
2. Materiale og metode.....	12
2.1 Innsamling av materiale og sentrifugering .....	12
2.2 Lagring og frysing .....	12
2.3 Analysering.....	13
2.4 Reagens, intern kvalitetskontroll og kalibrator .....	14
2.5 Statistiske metoder .....	15
2.6 Etske vurderinger .....	16
3. Resultat.....	17
3.1 Internkontroller .....	17
3.2 Holdbarhet .....	17
3.2.1 Protein C i romtemperatur.....	18
3.2.2. APC-resistens i romtemperatur .....	21
3.2.3 Frysing .....	24
4. Diskusjon .....	25
4.1 Holdbarhet i plasma og fullblod .....	25
4.1.1 Romtemperatur.....	26
4.1.1.2 APC-resistens .....	27
4.2.1 Frysing .....	27
4.2.1.1 Protein C .....	28
4.2.1.2 APC-resistens .....	28

5. Konklusjon .....	30
5.1 Sammenlikningen av plasma og fullblod .....	30
5.2 Holdbarheten etter frysing .....	30
5.3 Videre anbefaling.....	30
6. Referanse.....	31
7. Vedlegg .....	34

# 1. Introduksjon

## 1.1 Innledning

Protein C er en koagulasjons-inhibitor og APC-resistens er en tilstand i koagulasjonssystemet som skyldes en mutasjon. Disse to kan analyseres i blodet for å utrede personer om de har koagulopati, det vil si forstyrrelser i koagulasjonssystemet sitt. Analysene har en dårlig dokumentert holdbarhet, spesielt i kombinasjon med frysing. Ved Ålesund sykehus, avdeling for medisinsk biokjemi og blodbank, er dette ikke analyser som gjennomføres hver dag og blir bare analysert en gang i uken, noe som fører til at prøvene blir frosset ved mottagelse og oppbevart slik fram til analysering. Forsøket har blitt satt opp for å måle aktiviteten på de to analyttene, først i romtemperatur, deretter etter at prøvene har vært frosset, for å undersøke holdbarheten. Det ble valgt å sette tiden i romtemperatur til 24 timer, da dette er en forventet transporttid for en prøve fra legekantoret til sykehuset. For å kunne komme med en anbefaling for fremtidig håndtering av prøvemateriale har det blitt undersøkt om ubehandlet blod fra prøveglass med citrattilsetning hadde tolerert transportveien bedre enn plasma med citrattilsetning. For å skape klarhet i denne oppgaven vil det bli referert til de nevnte materialene som fullblod og plasma.

## 1.2 Problemstilling og avgrensning

Ettersom det finnes få tidligere holdbarhetsstudier for protein C og APC-resistens, var dette et ønske fra avdelingen for medisinsk biokjemi og blodbank. Det ble satt følgende avgrensninger:

### **A. Holdbarhet av protein C og APC-resistens etter 24 timer i romtemperatur i plasma.**

Avgrensningen var å finne et passende tidsrom for å være tilnærmet likt til hvordan prøvene blir transportert fra legekantoret ved dagens praksis. Det vil si antall timer for at det ikke skulle bli for omfattende og vanskelig å gjennomføre med begrenset tid og ressurser.

### **B. Holdbarhet av protein C og APC-resistens etter 24 timer i romtemperatur i fullblod.**

Samtidig som holdbarhetsanalyseringen av analyttene med tidsintervaller i plasma, har det blitt gjennomført en ekstra analysering av begge analyttene fra etter 24 timer



i romtemperatur i fullblod. Dette har vært på grunn av resultat på tidligere studier og for å kunne sammenligne og se om hva som ønskes å bli anbefalt videre.

### **C. Forsøk på holdbarhet av protein C og APC-resistens oppbevart 24 timer i romtemperatur i plasma påfulgt med noen dager i fryser.**

Prøvene ble satt i fryseren etter 24 timer, slik som er dagens praksis når det blir mottatt prøver fra legekantor (EQS prosedyrer 5003 og 6014). Før de skal analyseres, blir de tint opp ved hjelp av vannbad i fem minutter på 37 °C. Dette er for å finne ut om frysing etter lengre opphold i romtemperatur påvirker aktiviteten, samtidig bekrefte om dette er en praksis som en kan fortsette med.

#### 1.3 Tidligere studier

Det har blitt gjennomført flere studier for holdbarhet for protein C i romtemperatur, men få har blitt gjennomført i plasma. I informasjonssamlingen «Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing» vises det til at det er anbefalt å gjennomføre analysering av protein C innen fire timer etter prøvetaking om prøven blir oppbevart i plasma, men at det ideelt bør analyseres innen en time (1). Dette er en internasjonal standard. En annen kilde har vært Noklus, Nordisk kvalitetsforbedring av laboratorieundersøkelser, sin holdbarhetsdatabase. Der har det blitt notert at det er 48 timer holdbarhet for protein C i plasma. Holdbarhetsforsøket på protein C var ikke gjennomført med ferskt materiale da plasmaet var fryst to ganger, i tillegg til at datasettet ikke var fullstendig. Produsenten til reagensen for protein C har oppgitt at prøvene har en holdbarhet på 8 timer ved +15 °C. til + 25 °C (2). Tidligere funn fra det amerikanske laboratoriesenteret, MUSC Laboratory Services, har fastsatt at det anbefales at analyseringen av protein C bør skje innen fire timer fra prøvetaking. Forfatterne har ikke vist til hvilken referanse de har brukt til å fastsette dette (vedlegg 10).

Det har ikke blitt funnet holdbarhetsstudier i romtemperatur for APC-resistens i plasma ved søk i PubMed sin database. Noklus sin holdbarhetsdatabase hadde heller ikke inkludert APC-resistens.

Det har blitt gjennomført flere studier på protein C og APC-resistens med tanke på holdbarhet i fullblod. En grundig gjennomført studie som har blitt utført av Zürcher et al. har funnet ut at protein C og APC-resistens har lang holdbarhet i fullblod da den ikke har mer enn 10 % endring fra den første analyseringen til analyseringen etter 48 timer (3).

## 1.4 Teori

### 1.4.1 Hemostase

Hemostase er definert som prosessen for å stoppe blødning. Ved en eventuell skade på blodårene har kroppen en måte å hele dette på for å forhindre at det tapes for mye blod. Skadestedet blir tettet, men bare rundt der skaden har skjedd og ikke mer enn nødvendig. Resten av blodet forblir flytende slik at andre deler av kroppen blir forsynt med det den skal og overflødig koagel blir fjernet.

Endotellaget innerst i karveggen virker som en barriere. Den forhindrer kontakt med for eksempel serotonin som kommer fra skadet vev eller skadde blodplater. Uten denne barrieren ville hemostasereaksjonen skjedd konstant, da en reaksjon mellom disse starter hele forløpet (4). I blodårene finnes det blodplater ut mot kanten av blodårene, og sentrert er hvite og røde blodceller. Dette er best mulig plassering for å kunne feste seg fort for å stoppe en eventuell blødning. En skade kan fort bli livsfarlig om ikke kroppen har funksjonen til å stoppe blødningene. Derfor er det viktig å ha en balanse mellom prokoagulerende og antikoagulerende faktorer i koagulasjonssystemet. Andre farer er at en får kronisk inflammasjon eller blir avhengig av transfusjoner om balansen ikke er bevart. Prosessen er delt inn i tre faser som blir omtalt mer under.

### Primær hemostase

Hovedoppgaven til den primære hemostasen er å aggregere blodplater og danne en midlertidig plateplugg for å stoppe blødningen. Når en skade på en blodåre skjer, blir vasokonstriksjon aktivert.

Vasokonstriksjonen er når blodåren trekker seg sammen, slik at mindre blod klarer å komme seg gjennom til skadestedet. Dette skjer gjennom blant annet nervereflekser.

Videre blir blodplatene aktivert ved kontakt med den skadde karveggen og von Willebrands faktor (vWf) blir aktivert. VWF er et protein som bidrar til å binde blodplater der en skade har skjedd, slik at det dannes en stabil plugg. Denne funksjonen kalles plateadhesjon.

Plateadhesjonen fungerer ved at trombocytene endrer form slik at de forstørker sin overflate. De utvikler også pseudopodier, som kan beskrives som små utløpere. Endringene gjør at trombocytene dekker skadestedet bedre enn om de hadde forblitt flate og runde. Dessuten blir det uttrykt reseptorer på plateoverflaten, slik at de kan koble seg sammen med andre blodplater ved hjelp av fibrinogen. Blant annet er det også granula innimellom disse

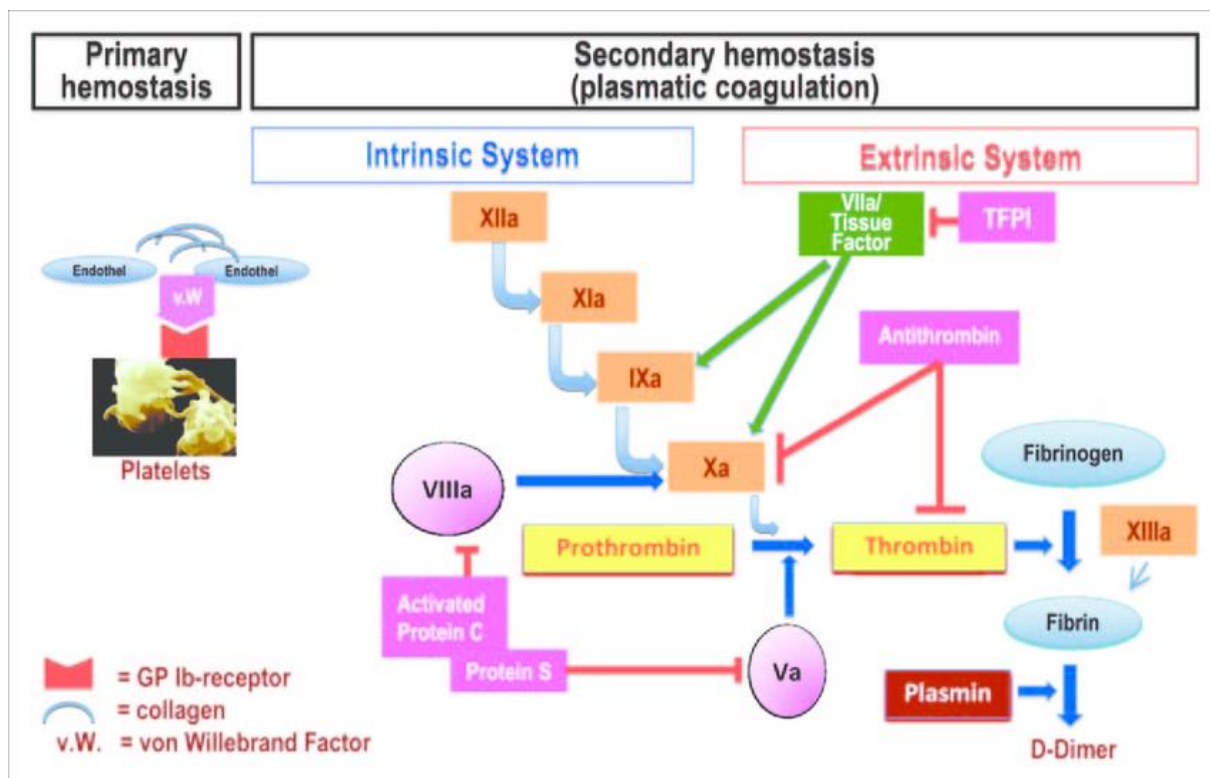
plateaggregasjonene og så får en uttrykt vWf og fibrinogen på overflaten. Faktorene spiller en stor rolle for blodplate-adhesjoner og –aggregasjoner videre, for koagulasjonen, karsammentrekking og videre aktivering av nye blodplater. Det siste som skjer i aktiveringen, er at negativt ladde fosfolipid blir flyttet fra det indre til det ytre fosfolipidlaget. Endringen i ladning gir en overflate som katalyserer dannelsen av trombin (5).

## Sekundær hemostase

Begrepet sekundær hemostase refererer til den reaksjonskaskaden av enzymer og faktorer som leder fram til dannelse av fibrin. Under sekundær hemostase samhandler koagulasjonsfaktorene og danner et fibrinnettverk. I denne prosessen vil naturlig forekommende inhibitorer i blodet hemme aktiveringen av koagulasjonsfaktorene slik at omfattende koagulering ikke oppstår. Koagulasjonsfaktorer vil også transporteres til og fra de skadde områder. Når en koagel har dannet seg, vil en langsom nedbrytning av koagelen starte, og den endelige reparasjonen av det skadede området vil finne sted (4).

Sekundær hemostase omfatter det indre og det ytre koagulasjonssystemet. Det indre koagulasjonssystemet består av faktorene XII, XI, IX, VIII, X, V og II som befinner seg i blodet. Det ytre koagulasjonssystemet består av vevsfaktor (TF), faktorene VII, X, og V. Disse faktorene befinner seg utenfor blodbanen. Faktorene X, V, samt protrombin og trombin er felles for det indre og ytre koagulasjonssystemet. Disse to systemene samhandler og danner et felles koagulasjonssystem senere i reaksjonskjeden.

Koagulasjonskaskaden settes i gang når det oppstår en skade i endotelceller og trombocytter aktiveres. Figur 1 viser oversikten over det indre og det ytre koagulasjonssystemet. Den ytre reaksjonsveien aktiveres først. Dette skjer ved at faktor VIIa binder seg til TF og aktiverer faktorene IX og X. Faktor IXa aktiverer faktor X med støtte fra faktor VIIIa som kofaktor. Faktor Xa, som befinner seg på overflaten av trombocytter binder seg til faktor V og omdanner protrombin til trombin. Trombin omdanner fibrinogen til fibrin, som sammen med faktor XIII danner et nettverk av koagel som styrker blodplatepluggen og stopper blødningen. I tillegg til å danne fibrin, har trombin en rekke andre viktige funksjoner, blant annet å aktivere trombocytter videre. Trombin gir også en positiv respons på faktor XI for mer fibrindannelse, og gir en negativ respons til protein C som deaktiverer koagulasjonen og hemmer koagulasjonskaskaden (4).



Figur 1: En forenklet skjematisk fremstilling til de prosessene som er ansvarlige for å stoppe blødningen, den primære og sekundære hemostasen (4).

## Fibrinolyse

Koagulasjonsprosessene avbalanseres av hemmere og det fibrinolytiske systemet. Fibrinolyse er den siste fasen i hemostatisk aktivering, som innebærer oppløsningen av fibrintråder og fibrinkoagel. Den fibrinolytiske prosessen aktiveres noen timer etter fibrinpolymerisering og trombedannelsen i respons på blant annet betennelse og koagulasjon. Dette skjer ved å frigjøre to aktiverende stoffer, nemlig vevsplasminogenaktivator (TPA) og urokinaseplasminogenaktivator (UPA). Disse aktivatorene omdanner fibrinbundet plasminogen til hovedenzymet i det fibrinolytiske systemet, plasmin. Systemet opprettholder en fin balanse mellom aktiverende og hemmende faktorer. Fibrinolyse bryter ned fibrin, og bidrar til å gjenopprette normal blodstrøm under vaskulær reparasjon. Dessuten kan overdreven fibrinolyse forårsake blødninger som følge av fibrinogenforbruk og for tidlig nedbrytning av koagelen før sårheling er oppnådd. Imidlertid kan utilstrekkelig fibrinolyse føre til koagelforlengelse og trombose (4).

Det er viktig å merke at fibrinolyse og trombololyse er to relaterte, men forskjellige prosesser

som refererer til oppløsningen av tromber. Fibrinolyse er en endogen prosess der tromber løses opp ved hjelp av plasmin. Derimot er trombolyse en prosess der det benyttes medikamenter for å løse opp tromber. Trombolytiske midler virker ved å aktivere plasmin, som bryter ned fibrin og løser opp blodproppen.

#### *1.4.2 Danning av koagulasjonsfaktorer og inhibitorer*

Plasma transporterer minst 16 prokoagulanter som også kalles for koagulasjonsfaktorer. De fleste er av glykoproteinnatur som blir dannet i lever. Generelt kan man si at deres oppgave er å danne trombin som skal omdanne fibrinogen til fibrin, slik at hemostaseprosessen kan fortsette. Fosfolipider i cellemembranen kan være positivt og negativt ladet.

Plasmakoagulasjonssystemet krever en slags katalytisk overflate, slik at enzymer kan sette i gang nødvendige hemostasereaksjoner. Det skjer når negativt ladet fosfolipid blir flyttet ved hjelp av serin-protease fra den indre til den ytre delen av blodplatens membran. Slik vil overflaten på blodplater omdannes til en «lipid-madrass», hvor koagulasjonsfaktorer kan samles inn i ulike komplekser.

Koagulasjonsfaktorene og inhibitorer deles inn i ulike grupper. Zymogener er inaktiverte proenzymer. Kofaktorer er prokoagulanter som binder seg, stabiliserer og stimulerer aktiviteten av andre enzymer. Aktivisering fra proenzym til aktivt enzym eller fra inaktiv kofaktor til aktiv kofaktor skjer dels ved endring av kjemiske bindinger i molekylet, dels ved avspaltning av små deler av molekylet. Man betegner en aktivert koagulasjonsfaktor ved å tilføye en «a» etter navnet, for eksempel FXa. Det finnes også kontroll proteiner. Deres hovedfunksjon er både å aktivere og hemme alle koagulasjonsprosesser.

Proenzymer FIX, FX, FVII, FII og kontrollproteiner C, S og Z er avhengige av K-vitamin for å bli aktivert. De kalles også for protrombin-gruppe på grunn av strukturelle likheter med protrombin.  $\text{Ca}^{2+}$  ioner vil styrke binding mellom proenzymer og negativt ladet fosfolipidmembran på blodplatens overflate. Pasienter som bruker medikamenter som hemmer dannelsen av vitamin K, produserer likevel nevnte faktorer, men uten bindingsevne. De kan derfor ikke feste seg til lipid-madrassen.

Faktor V er et glykoprotein som befinner seg i plasma og i alfa-granuler i blodplater. Den og faktor VIII aktiveres av trombin og hemmes av protein C (4). Koagulasjonsinhibitor protein C mobiliseres av trombin-trombomodulin kompleks, som er beskrevet nærmere i avsnitt 1.4.3.

De tre viktigste koagulasjonsinhibitorer er protein C, vevsfaktor TFPI og antitrombin. De danner ulike komplekser med kofaktorer for å hemme koagulasjonsprosesser. De syntetiseres etter behov og for å regulere arbeidet til for eksempel faktor V og trombin.

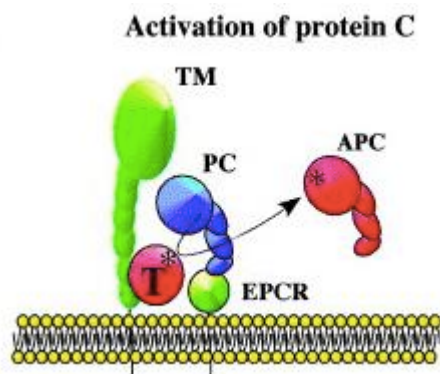
#### *1.4.3 Protein C og APC*

Tidligere omtalt er protein C, sammen med protein S, vitamin K-avhengige koagulasjonsinhibitorer som begrenser koagulasjonen ved å inaktivere faktorene Va og VIIa, sammen med protein S som kofaktor i reaksjonen. Protein C er et plasmaprotein som blir aktivert av enzymet trombin i kompleks med trombomodulin, som vist i figur 2.

Trombomodulin finnes på overflaten av intakte endotelceller. Aktivert protein C (APC) er en serinprotease, fordi den inneholder aminosyren serin i sitt aktive sete. Når trombin binder seg til overflate på trombomodulin, mister proteinet evne til å danne fibrin, men aktiverer protein C. Endotelprotein C-reseptor (EPCR) på overflatemembranen binder seg Gla-domene til protein C. Domenet fungerer som en slags moderator for K-avhengige proteiner som skal bevare sin konsentrasjon av Ca-ioner ved bindingen til andre substrater eller molekyler. EPCR hjelper også til å orientere protein C til trombin-trombomodulinkomplekset for videre aktivering (4). APC virker hovedsakelig for å hindre trombindannelse på uskadete endotelceller, noe som kunne ført til trombose (6). Ved en oppstått skade er det ønskelig å ikke danne flere koagler enn nødvendig og heller ikke at koagler skal forflyttes med blodet til andre steder i kroppen. For å forhindre dette har kroppen en mekanisme som kalles koagulasjonsinhibering der protein C og S er sentrale.

I tillegg til sine antitrombotiske egenskaper, har APC en rekke antiinflammatoriske aktiviteter. Det demper inflammatorisk cytokinproduksjon, samt minimerer hypotensjon ved sepsis, hemmer leukocytadhesjon og kjemotakse, reduserer endotelcelleapoptose og bidrar til å opprettholde barrierefunksjonen til endotelceller. Protein C systemet spiller dermed en viktig rolle i å kontrollere upassende eller overdreven aktivitet av både koagulasjons- og inflammatoriske responser (6).

Referanseområde for protein C ligger mellom 77-150 % ifølge Helse Møre og Romsdal (7). Indikasjon for analysering av protein C er oppfølging av pasienter med koagulasjonsforstyrrelser, pasienter etter gjennomgått blodpropp (en eller flere) eller ved familiehistorikk med blodpropper. Resultatet tolkes sammen med andre koagulasjonsanalyser som APC-resistens og protein S.



*Figur 2: Aktivering av protein C (8).*

#### *1.4.4 APC-resistens og faktor V Leiden mutasjon*

APC-resistens begrepet innebærer at protein C ikke klarer å regulere koagulering slik at faren for blodproppdannelse øker gjennom at faktor V ikke blir deaktivert av protein C, noe som kan være arvelig eller ervervet gjennom en punktmutasjon. Dette punktmutasjonen i faktor V kalles for faktor V Leiden mutasjon (9). Mutasjonen resulterer av at aminosyre arginin 506R blir erstattet med glutamin (Q) i faktoren V (vedlegg 4).

Andre årsaker som er mindre vanlige er feil i selve proteinet C, mutasjoner i genet Cambridge og Hong Kong i faktor V-genet (vedlegg 4). APC kan også være inaktivert av heparin-avhengig inhibitor og alfa-1-antitrypsin (10). Mutasjoner er mest utbredt i heterozygotform 3-5 % i den kaukasiske populasjonen og er mindre vanlig hos etniske grupper med afrikansk og asiatisk opprinnelse. Cirka 7 % av den norske befolkningen har genmutasjon i faktor V. Hos alle pasienter med venøs trombose vil cirka 20 % ha påvist faktor V Leiden mutasjon. De som har noen slektninger med tidligere historie av blodproppdannelse, har 50 % sjanse å arve mutasjonen (11).

Ifølge Helse Møre og Romsdal er referanseområdet for APC-resistens ratio  $\geq 1,7$ . Analysen utføres ved mistanke om protein C resistens hos pasienter med venøs trombose eller lungeemboli hos pasienter i ung alder (under 45 år) som ikke kan forklares, samt hos de med repeterte venøs trombose (12). Det finnes ingen spesiell behandling mot Leiden mutasjon eller APC-resistens. Generelt er sjansen for å danne blodpropp liten, selv om man er i risikogruppe. Antageligvis de med familiehistorikk for venøs trombose vil få tilbud om profylakse med antikoagulerende medisiner som warfarin, direkte antikoagulerende middel (DOAC) eller heparin i lavdose. Valg av en slik behandling bestemmes mellom lege og pasient. Pasientens

evne til å overholde riktig medisinbruk, muligens mage- og tarmforstyrrelser, økt tendens til blødninger er viktige faktorer som påvirker denne beslutningen (9).

#### *1.4.5 Protein C mangel og medikamentbruk*

Arvelig protein C-mangel assosiert med trombose er forårsaket av mange mutasjoner. Genmutasjoner kan oppstå enten i en eller begge kopier av genet. På grunn av at denne forandringen skjer i ett gen, kalles det for heterozygot tilstand. Da har personen et friskt og et patogent gen. Det finnes også en homozygot mutasjonsvariant som gir kraftig økt risiko for trombose. Homozygot vil si at en har fått to kopier av det patogene genet og dette er nesten ikke forenlig med livet. Denne mutasjonsvarianten er sjelden, med kun noen få pasienter i verden. Disse pasientene får mange livstruende tromboembolier allerede i de første dagene etter fødselen (6).

Dyp og overfladisk venøs trombose, ofte i uvanlige steder, er et vanlig symptom på protein C mangel. Homozygot protein C mangel med nivåer mindre enn 1 % av det normale forårsaker neonatal purpura filiminans og massiv trombose hos spedbarn. Hos pasienter som bruker warfarin, kan heterozygot protein C mangel føre til warfarin-hudnekrose, der det oppstår nekrose på store deler av kroppen. Ved denne tilstanden, fører vitamin K-antagonisten raskt til en reduksjon i protein C aktivitet til svært lave nivåer på grunn av halveringstiden til protrombin (omtrent åtte timer). Halveringstiden til protrombin, faktor IX og faktor X er mye lengre, derfor kan dette føre til en forbigående trombofili i begynnelsen av behandlingen med warfarin. Å diagnostisere arvelig protein C mangel hos pasienter som tar warfarin er spesielt vanskelig. Protein C antigenivåer kan sammenlignes med antigenivåer av andre vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorer. Imidlertid må det etableres nøyaktige kontrollområder for forholdet mellom protein C og andre vitamin K-avhengige faktorer for at sammenligningen skal være gyldig (6).

De fleste laboratorier bruker en svært spesifikk slangegiftprotease for å aktivere protein C ved screening for protein C mangel. Resultater på mindre enn 55 % tyder på protein C mangel, mens nivåer mellom 55 % og 70 % må anses på grensen, og analysen bør gjentas (6).



#### *1.4.6 Citratglass og preanalytiske faktorer*

Innholdet til citratglass er vanligvis 3.2 % flytende natriumkonsentrat som binder kalsiumion i plasma (13). Denne blokkerer trombedanning og er slik antikoagulerende. For å få ønsket forhold, som er 9:1, der ni deler blod er med en del løsning. Et 3mL citratglass vil da inneholde 0.3mL med antikoagulant og det blir tilsatt 2.7mL med fullblod (4). Er det ønsket å kun bruke plasma, er det anbefalt å avpipettere plasmaet over i et plastrør uten tilsetning.

For å kunne analysere både protein C og APC-resistens er det viktig å ikke ha for mye interferens. Eksempel på dette er mye bilirubin, fett eller hemolyse i plasmaet. Noen av disse kan ikke unngås, men hemolyse kan blant annet forhindres ved å unngå langvarig stasebruk. Det er også viktig å unngå preanalytiske feil som kan påvirke resultater. For at resultatene kan bli riktig representert, er det viktig å vite om deltakere/pasienter har tatt blodfortynnende medikamenter som Warfarin/Marevan. Disse er vitamin K-antagonister og påvirker aktiviteten som kan føre til et lavere resultat enn normalt. Feil rekkefølge på glass kan gi overføring av andre antikoagulanter (for eksempel EDTA). Dette vil påvirke analysen. Derfor må man benytte citratglass før alle andre glass. Ved bruk av «butterfly kanyle», bør man bruke et «kasteglass» for å unngå at røret fylles med luftbobler, noe som vil påvirke mengden av blod og dermed konsentrasjonen av natriumcitrat. Dermed er det viktig å sikre at glassene blir fylt helt opp, samt sørge for at glassene er godt blandet for å oppnå en jevn fordeling av natriumcitratet i prøven.

#### *1.4.7 Kriterier for holdbarhet og statistiske metoder*

Holdbarhet kan defineres som evne til prøvematerialet å beholde den gunstige egenskapen i en tidsperiode. Holdbarhetsstudier undersøker endringer over tid og ved ulike lagringsforhold. I dette forsøket skal det undersøkes om holdbarhet til protein C og APC-resistens, nemlig om brukt prøvemateriale - fullblod og plasma – beholder sine opprinnelige egenskaper under fastsatte forhold for lagring, håndtering og bruk. Faktorer som kan påvirke holdbarheten er blant annet temperatur og eksponering til luft. For å begrense forskjeller i temperatur over døgnet i romtemperatur og uken i fryseren, har det blitt tatt temperaturkontroller hver morgen. Plasseringen av prøveglassene ble gjort strategisk ut ifra at det skal være lite forskjell fra dag og natt og generell variasjon utover de ulike dagene.

De to ulike måtene som anbefales for gjennomføring av holdbarhetsstudier er Batch- og Buksemetoden. Batch-metoden går ut på å samle inn materiale og fordele det over tid i angitt

temperatur og betingelser. Denne metoden sier at alle prøvene skal fryses etter at de har stått i gitt tid, for å så analysere dem i batch. Metoden er nyttig når en vil sikre at alle prøvene blir behandlet likt og redusere variasjonen mellom prøvene.

Buksemetoden kan brukes for å estimere usikkerheten i en analyse ved å skape flere tilfeldige utvalg fra en prøve og analysere hvert utvalg for å beregne et estimat. Metoden blir ofte brukt til forsøk der holdbarheten er ukjent (14).

For holdbarhetsstudie må en sette en akseptgrense for å definere holdbarheten. Dette kan gjøres gjennom klinisk utfall, biologisk variasjon og «state-of-the-art». «State-of-the-art» er der for å få best mulig kvalitet gjennom å strekke det tekniske nivået så høyt som mulig. Klinisk utfall er hvordan effekten til analysen kan påvirke det kliniske utfallet. Biologisk variasjon uttrykker en forskjell mellom biologisk utvalg og mulige analytiske avvik (15).

Det blir satt to akseptgrenser som hjelper med vurderingen av resultat. Disse er tillat totalfeil og tillatt bias. Grensene kan settes opp på ulike måter. I dette forsøket ble det valgt å fokusere på biologisk variasjon. Enkelte verdier vurderes mot den tillatte totalfeilen, der en ser på hvor mange prosent av de enkelte verdiene er utenfor den totalfeilen. Om mer enn 5 % er større enn tillatt totalfeil, tolkes dette som at materialet ikke er holdbart. 95 % av alle resultater må altså ligge innom satte grenser for tillatt totalfeil.

Konklusjonen kan først bli dratt når en vurderer enkeltverdiene og gjennomsnittsverdiene sammen. Tillatt bias er systematiske feil der en ser på prosentvis endring mellom disse. Gjennomsnittet samt konfidensintervallet skal være innenfor denne akseptgrensen for å kunne anses som holdbar. På samme måte er det ikke holdbart om konfidensintervallet til gjennomsnitt ligger utenfor tillatt bias (14).

## 2. Materiale og metode

Den praktiske delen av oppgaven for analysering av holdbarheten til protein C og APC-resistens ble utført på laboratoriet ved avdelingen for medisinsk biokjemi i Ålesund sykehus. Det ble anvendt fullblod og plasma fra anonymiserte pasienter som prøvemateriale.

### 2.1 Innsamling av materiale og sentrifugering

Forsøket begynte med å samle inn prøver fra pasienter. Det ble utført venøs blodprøvetaking, da dette er den standardiserte metoden som benyttes for valgte analyttene. Materialet ble samlet inn fra personer som hadde meldt seg frivillig til å delta i undersøkelsen. Hver pasient ble spurt om eventuell bruk av blodfortynnende medisin. Hver pasient har også signert et samtykkeskjema for å bekrefte at deres blod kunne bli brukt i studien. Til sammen var det samlet inn prøver av 27 personer. Personene anså seg selv som friske, og meldte ingen bruk av blodfortynnende legemidler.

Til dette forsøket ble det brukt Na-citratglass produsert av Greiner Bio-one. Det ble samlet opp to koagulasjonsrør fra hver pasient. Rett etter prøvetakingen ble prøvene anonymisert og nummerert. På denne måten kunne en holde oversikt over hvilke glass kom fra samme deltaker for å kunne sammenligne resultater senere. En av de to glassene ble blandet godt ved å snurre røret fem til ti ganger og ble alikvotert i to glass før sentrifugering. Det ene halve glasset forble ubehandlet, mens den andre halvdelen og det hele andre glasset ble sentrifugert, og plasmaet ble deretter avpipettert i et plastrør.

Sentrifugering ble utført på Hettich Universal 320 ifølge prosedyren til Ålesund sykehus, ved 1500G i 15 minutter, innen 30 minutter etter prøvetaking med variabilitet på  $\pm 10$  minutter. Etter sentrifugering ble prøvene analysert så fort som råd, men med en grense på en time etter prøvetaking for å kunne analysere flest mulig prøver til samme tidspunkt.

### 2.2 Lagring og frysing

Materialet ble samlet i batcher med to puljer om dagen, der daglig sum var rundt ti personer. Prøveglassene ble oppbevart i form av plasma og fullblod i 24 timer i romtemperatur. Rommet ble valgt etter at det ikke var store temperaturendringer i løpet av et døgn, slik at prøvene var utsatt for de samme kondisjonene gjennom hele forsøket.

Etter siste analyseringen ble plasmaet frossen i  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  og lagret fryst i noen dager. Prøvene ble så tatt ut og tint i varmebad på  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i fem minutter for å så bli satt rett til analysering.

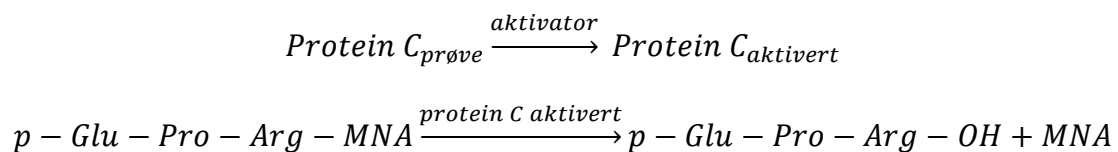
### 2.3 Analysering

Instrumentet av type Sysmex CS-5100 som blir brukt ved medisinsk biokjemi og blodbank Ålesund er produsert av Sysmex. Det benytter kromogen analysering for å måle absorbansforskjellen i undersøkelsen av protein C og for APC-resistens. Koaguleringstiden påvirkes av bruk av aktivator.

Det ble gjennomført en opplæring på instrumentet før den ble tatt i bruk i samråd med praktisk veileder.

#### Protein C

Protein C blir analysert gjennom å aktivere protein C der det blir gjennomført en kinetisk test og absorpsjonsendringen er proporsjonal med protein C-aktiviteten. Aktivatoren som blir brukt er giften til slangen *Agkistrodon contortrix*. Likningen til denne reaksjonen er:



Det kromogene substratet blir spaltet og absorbansmålingen ved 405 nm vil da øke. Endringen er proporsjonal med protein C-aktiviteten i prøven og setter en tallverdi på hvor mye protein C som er i prøven (EQS prosedyre 5003).

#### APC-resistens

Metodeprinsipp for APC-resistens baserer seg på aktiveringen av endogent protein C i plasma inkubasjon ved hjelp av slangegift *Agkistrodon contortrix*. Deretter vil slangeaktivator bli påført plasmaet, fortynnet «Russells Viper gifttid» (DRVVT) som er sensitiv for konsentrasjonsendringer av APC.

Reaksjonen går ut på å måle tid som brukes for at konsentrasjonen av aktivert protein C skal øke. Hos friske individer vil konsentrasjonen bli forlenget til det dobbelte eller tredobbelte sammenlignet med plasma uten aktivator. Hos individer med faktor V Leiden mutasjon vil konsentrasjons vekst bli vanligvis mindre enn 1,5 uten aktivator.

Resultat kan uttrykkes ved hjelp av ligning:

$$\text{ProC AC R – forhold} = \frac{\text{Koaguleringstid PR3V med aktivator}}{\text{Koaguleringstid PR3V med saltløsning eller Dade Ca System – buffer}}$$

Testresultater med aktivator tilstedes skal være to til tre ganger lengre enn de uten aktivator.

På instrumentet Sysmex CS-5100 vil forholdet som er mindre enn 1,5 indikere Faktor V Leiden mutasjon. Forhold mellom 1,5 og 2,1 kan anses som lav konsentrasjon av aktivert protein C og bør undersøkes videre. Da snakker man om gjennomføring av analyse på nytt eller utføring av genetiske tester (EQS prosedyre 6014).

Hemolyse, lipemi og ikterus påvirker prøveresultater. Slike prøver bør ikke brukes for denne typen analyse. Starten av medikament behandling med antikoagulanter kan også gi falske lave verdier.

## 2.4 Reagens, intern kvalitetskontroll og kalibrator

Reagens, internkontroller og kalibrator ble testet for samtlige analytter før analyseringen. Dette ble utført under tilsyn av praktisk veileder.

### Protein C

#### REAGENS

Reagenset Berichrom blir levert av Siemens Healthcare Diagnostics og er tredelt. Det består av en aktivator for å aktivere protein C, et substrat og en aktivator-diluent. Aktivatoren blir løst opp med diluenten, i 5.0mL, og substratet blir løst i 3.0mL avionisert vann. Disse blandes forsiktig en gang før bruk og kan oppbevares i instrumentet i opp til 96 timer. Detaljert informasjon om reagenset finnes i vedlegg 4.

#### KALIBRATOR

Kalibratoren som benyttes er SHP som står for Standard Human Plasma. Det var ikke behov å bruke kalibratoren i dette forsøket. Kalibratoren er sporbar etter WHO 02/342-referansemateriale (EQS prosedyre 5003).

## INTERNKONTROLLER

Siemens Healthineers sine kontroller blir brukt som internkontroller; Control Plasma N for normalområdet og Control Plasma P for patologiske område.

## APC-resistens

### REAGENS

For APC-resistens analyse benyttes det ProC® Ac R reagens levert av Siemens Healthcare Diagnostics. Detaljert informasjon om reagensene finnes i vedlegg 4.

## INTERNKONTROLLER

Det brukes Control Plasma N for det normale området og Control ProC for det patologiske området. Begge to er levert fra Siemens Healthineers. Kvalitetskontrollene må analyseres for positiv og negativ kontroll for Leiden mutasjonen før en kan utføre pasientprøvene.

## 2.5 Statistiske metoder

For å kunne si noe om holdbarheten har det blitt brukt akseptgrenser for å ha et punkt å skille mellom holdbar og ikke holdbar. Det har blitt valgt å bruke biologisk variasjon for dette.

Verdiene som blir brukt har blitt hentet fra European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) sin database for biologisk variasjon (16). Krav til tillatt bias og til tillatt totalfeil er brukt fra deres tabell og de spesifikke verdiene er de som kalles ønskelige, «desirable». Tillatt bias er gjennomsnittet av alle prøvene mot utgangsprøvene.

Ved tillatt totalfeil, for hvert enkelte resultat, skal minimum 95% av alle analyseringer ligge innen  $\pm 9\%$ . Helst skal også alle ligge i en retning. Dersom det er noen som ligger over og andre under, kan det vise til at det er andre faktorer som påvirker resultatet og at flere variabler bør undersøkes.

Kravene protein C skal overholde er en tillatt bias på 4,4 % og en tillatt totalfeil på 9 %.

Kravene APC-resistens skal overholde er en tillatt bias på 1,2 % og en tillatt totalfeil på 2,4 %. Dette er veldig strenge krav grunnet lite biologisk variasjon. Det bemerkes at andre publiserte studier har definert holdbarhet som tillatt totalfeil på  $\pm 10\%$  basert på klinisk signifikans.

## 2.6 Etiske vurderinger

Underveis har det blitt gjort etiske vurderinger. Blant disse var det å ikke inkludere deltakere som var redde eller ukomfortable med blodprøvetaking og dermed ble det kun valgt deltakere som meldte seg frivillig til studien. Før prøvetakingen var det også bedt om at deltakeren fylte ut et samtykkeskjema. Deltakeren ble informert om at prøvesvar ble anonymisert og ikke brukt utenfor studiet. Ettersom at studiet ikke inneholder pasientinformasjon og helseforskning, ble det ikke søkt om godkjenning fra Norsk senter for forskningsdata (NSD) og Regional forskningsetisk komité (REK). Prøvematerialet ble av de fleste brukt opp og resten ble kastet i risikoavfall da det ikke skulle brukes til andre formål. Det har ikke blitt laget en koblingsnøkkel til de anonymiserte prøvene, dermed kan en ikke koble deltaker med prøveresultat.

### 3. Resultat

Innsamlet data er fremstilt i form av differensialplott for hver analytt i både romtemperatur og etter frysing. Rådata er samlet inn i vedlegg 1.

#### 3.1 Internkontroller

Internkontroller ble analysert hver morgen før bestillingen av prøver. Internkontrollene og reagens ble satt inn i instrumentet på morgenen hver analyseringsdag. Alle verdiene til internkontrollene lå innenfor akseptgrensen utenom en gang. Etter den gangen ble reagenset byttet, kontrollene ble reanalysert og var så aksepterte. Lot nummer og detaljert oversikt over kontrollresultat finnes i vedlegg 2.

Mellom analyseringer oppbevares prøvene på samme plass under hele forsøket. For å sikre kontroll over lufttemperatur under lagring, ble det ført kontroll over temperaturmålingene, hvor ble det registrert minimums, -maksimums og nåværende temperatur på oppbevaringsrommet. Termometeret som ble brukt var godkjent av laboratoriet for bruk. Optimal oppbevaring for prøvemateriale ble fastsatt mellom 18 – 25 °C.

Fryseprøvene settes i fryseren etter analyseringen ved 24 timers opphold i romtemperatur. Temperaturen i fryseren varierte mellom – 18,6 °C og – 31,2 °C. Om det blir registrert en betydelig forandring blir medisinsk teknisk sentral ved Ålesund sykehus kontaktet. Oversikt over alle temperaturene finnes i vedlegg 3.

#### 3.2 Holdbarhet

Plottene nedenfor presenterer resultater av holdbarhetsundersøkelsen av protein C og APC-resistens (figur 3-10). Det ble utarbeidet et sett med to grafer til hver analytt. I de lineære grafene tilsvarende hver farge en pasient. Y-aksen viser måleverdi i prosent i forhold til antall timer på x-aksen.

Punktdiagrammene fremstiller prosent av utgangsverdi (y-aksen) i forhold til antall timer prøven ble oppbevart (x-aksen). De røde punktene i viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt i prosent av utgangsverdi. De røde, horisontale linjene er grenser for tillatt bias, mens området mellom de blå, horisontale linjene er tillatt totalfeil. De blå punktene markerer de enkelte verdiene i prosent av utgangsverdien for de som var oppbevart i det materialet som grafen viser til. De røde, vertikale linjene viser det 90 % konfidensintervallet. Grensene som har blitt satt ble hentet av EFLM sin tabell over biologisk variasjon og det ble brukt verdier for

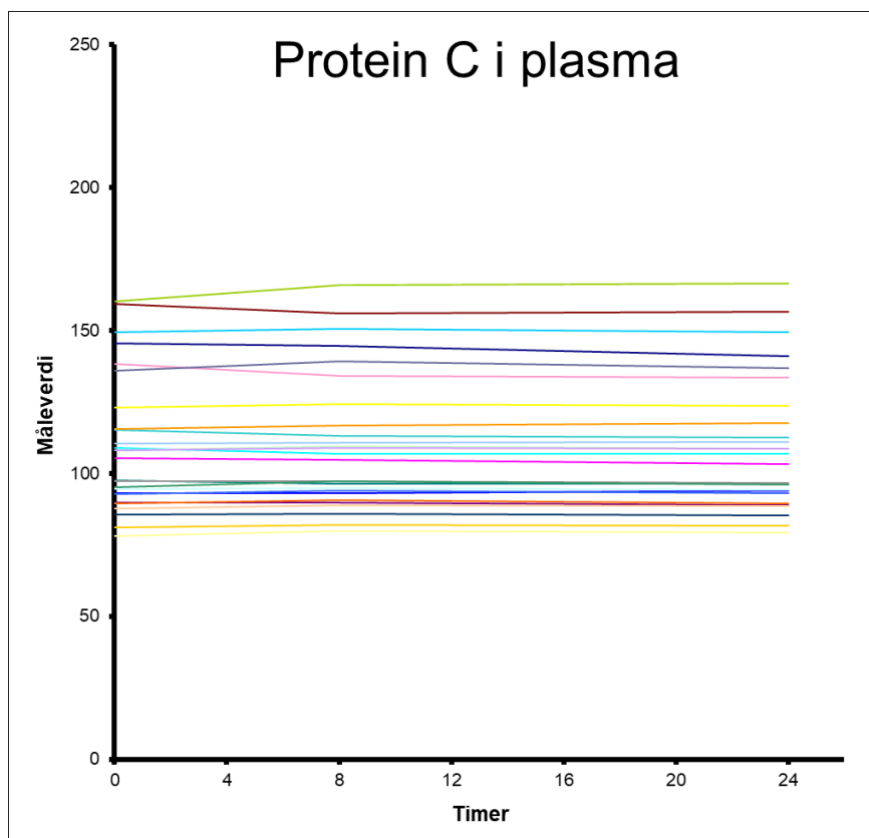


«desirable». Alle resultatene for protein C og APC-resistens fra undersøkningen finnes i vedlegg 1.

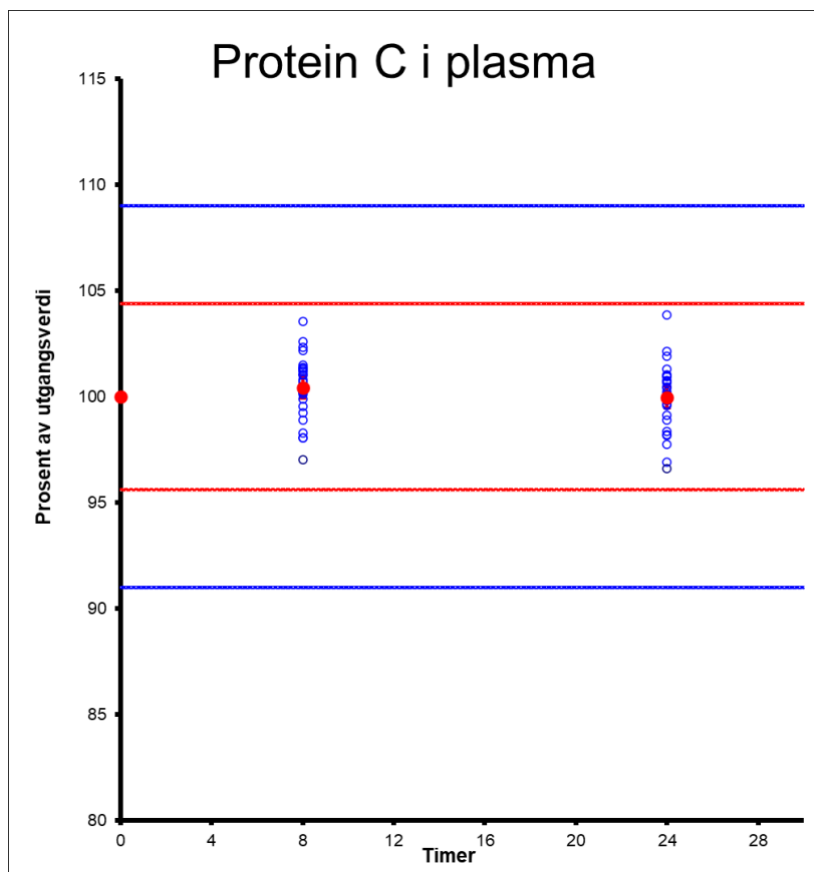
### 3.2.1 Protein C i romtemperatur

Figur 3 og 4 viser de enkelte resultatene til protein C i plasma som ble oppbevart i romtemperatur i løpet av 24 timer. Diagrammet i figur 3 viser at verdiene forblir ganske stabile og det er lite endring i forhold til den første prøven. Det kan observeres større variasjon i plasma i prøvene med høyere verdier. Alle verdiene ligger innenfor tidligere nevnt referanseområde for protein C (77-150 %).

En kan se at gjennomsnitt samt det 90 % konfidensintervallet ved alle tidspunkt ligger innenfor tillat bias (se figur 4). Vedlegg 6-9 viser detaljerte Excel-dokumenter som ble benyttet til metodesammenlikning (14).

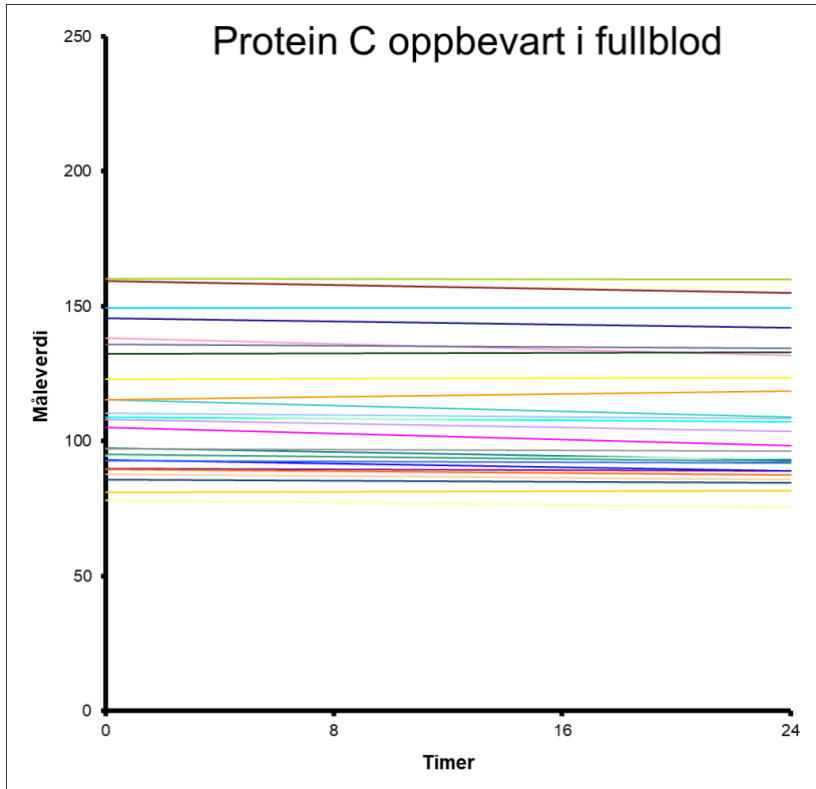


Figur 3: Lineær presentasjon av protein C oppbevart i plasma i romtemperatur. Hver linje representerer en prøve.

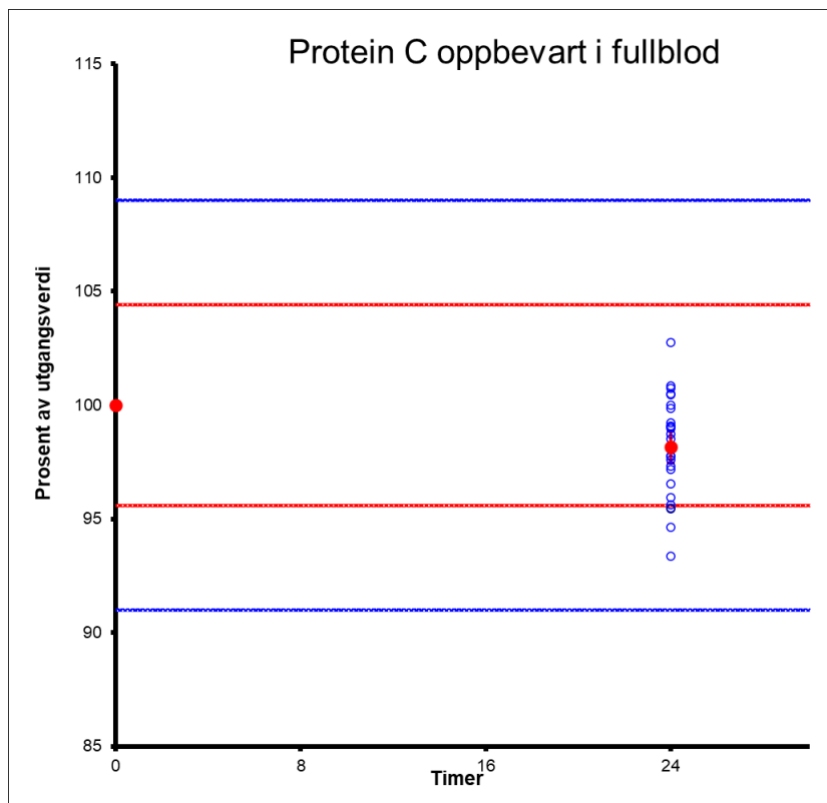


Figur 4: Presentasjon av deltakerne sine verdier over tid ved de ulike analyseringstidspunktene.

Figur 5 og 6 viser resultatene til protein C i fullblod oppbevart i romtemperatur over 24 timer. I figur 5 kan en observere både stigende og synkende trend i prøvene. Figur 6 viser at noen av resultatene ligger utenfor grensene for tillatt bias, men fortsatt innen grensene for tillatt totalfeil. Gjennomsnittsverdier er innenfor tillatt bias.



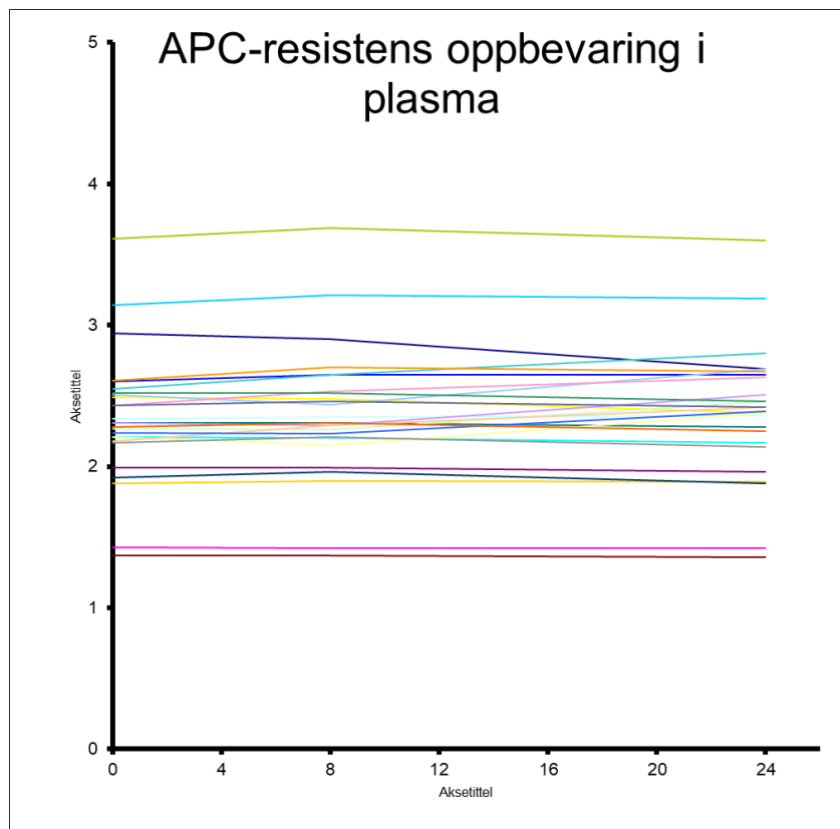
Figur 5: Lineær presentasjon av protein C oppbevart i fullblod i romtemperatur. Hver linje representerer en prøve.



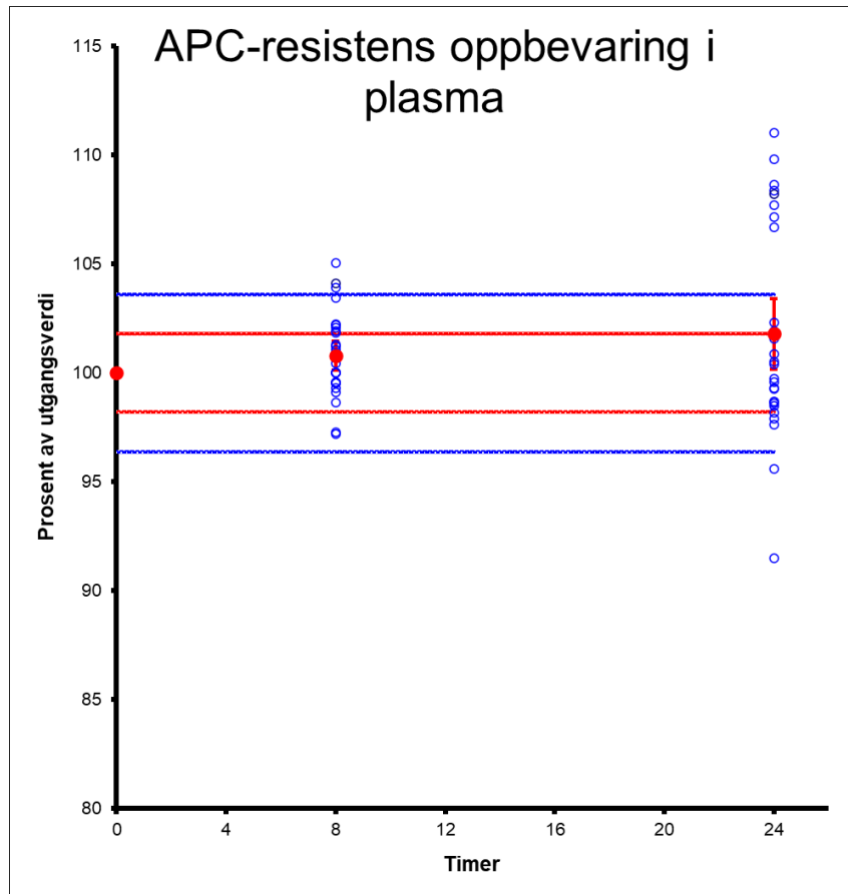
Figur 6: Presentasjon av deltakerne sine verdier over tid ved de ulike analyseringstidspunktene.

### 3.2.2. APC-resistens i romtemperatur

Figur 7 og 8 presenterer resultatene til APC-resistens oppbevart i plasma i løpet av 24 timer. Graf i figur 7 viser høyere variasjon ved høy APC-resistens. I diagrammet i figur 8 kan en se at gjennomsnittsverdi for analysering ved åtte timer måling ligger innenfor tillatt bias, mens gjennomsnittsverdi for analysering ved 24 timer måling ligger på den øverste grensen for tillatt bias. Det tilhørende 90 % konfidensintervallet er utenfor tillatt bias, men innenfor tillatt totalfeil for analyseringen ved 24 timer. I tillegg ligger noen av resultatene utenfor grenser for tillatt totalfeil.

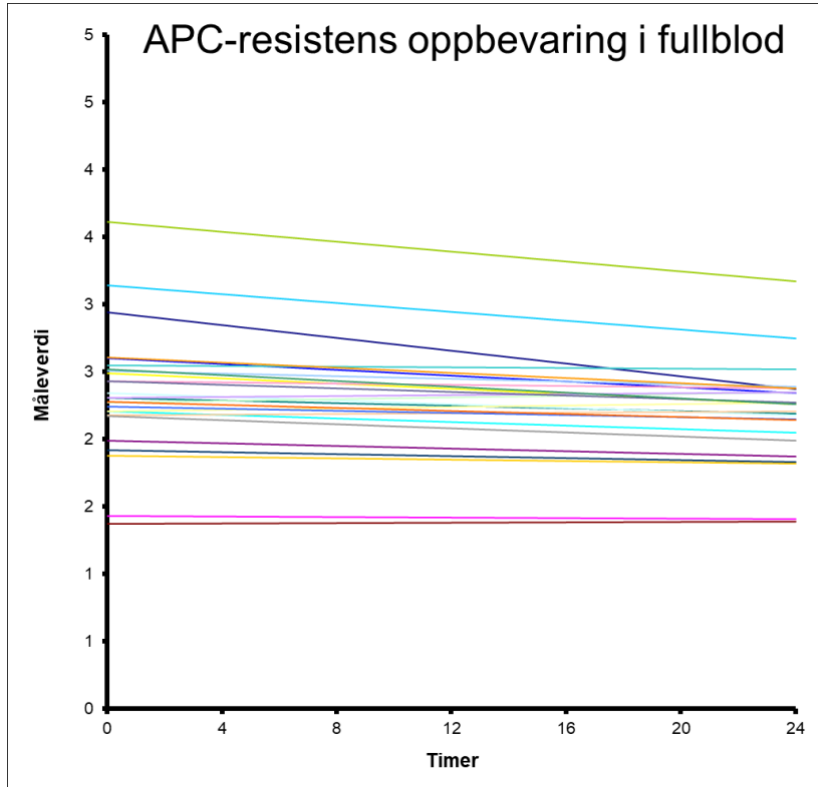


Figur 7: Lineær presentasjon av APC-resistens oppbevart i plasma i romtemperatur. Hver linje representerer en prøve.

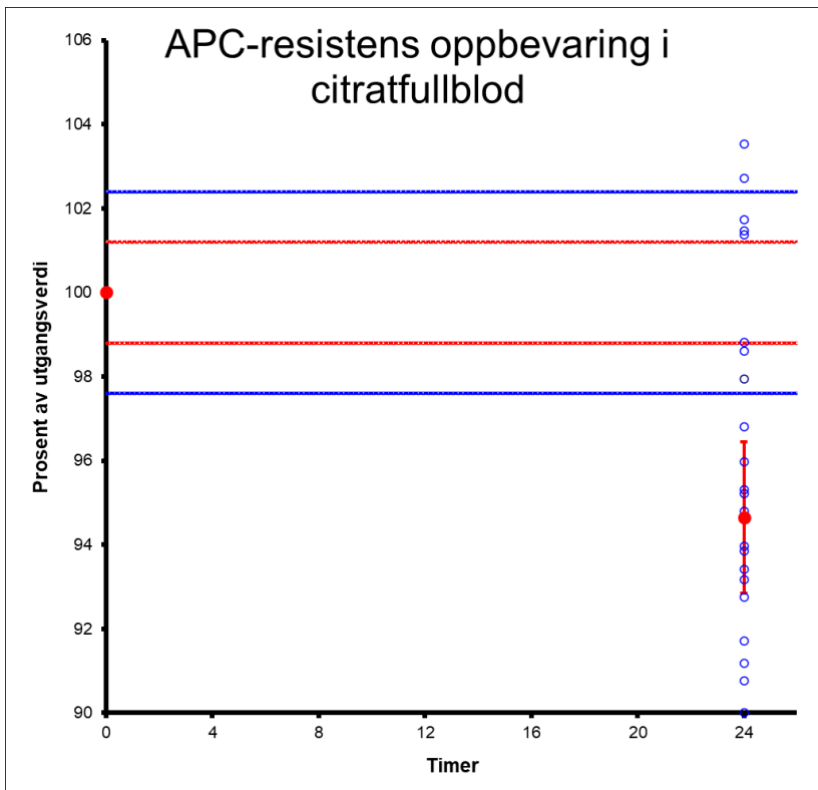


Figur 8: Presentasjon av deltakerne sine verdier over tid ved de ulike analyseringstidspunktene.

Figur 9 og 10 gjenspeiler resultatene til APC-resistens oppbevart i fullblod. Det lineære diagrammet viser størst nedgang hos deltakere med høy APC-resistens. I diagrammet i figur 10 kan en observere at alle prøvene ligger utenfor tillatt bias. Noen ligger innenfor grenser for tillatt totalfeil. Gjennomsnittsverdien er utenfor gitte grenser og konfidensintervallet er mye bredere.

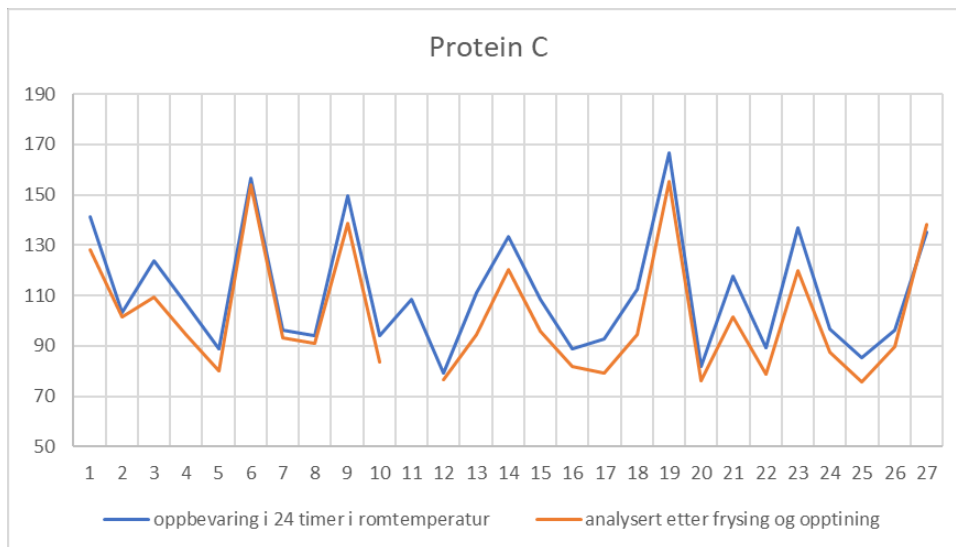


Figur 9: Lineær presentasjon av APC-resistens oppbevart i ullblod i romtemperatur. Hver linje representerer en prøve.

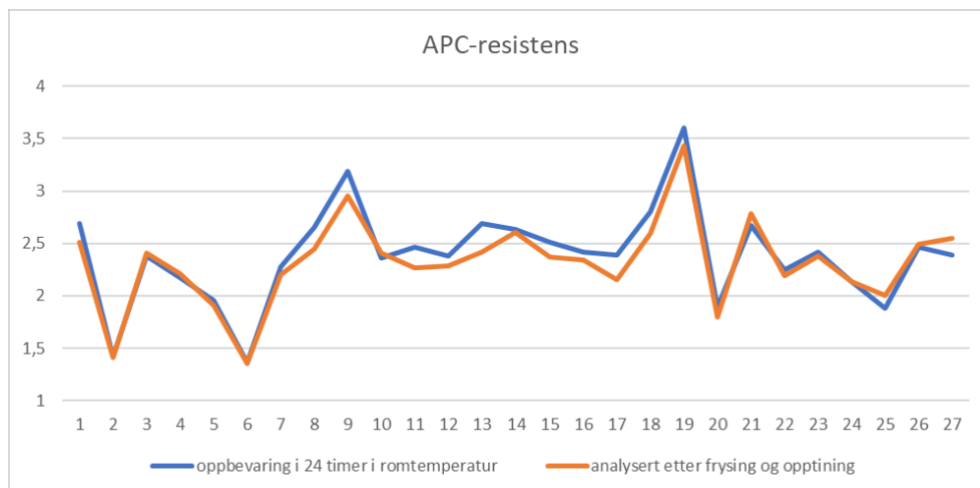


Figur 10: Presentasjon av deltakerne sine verdier over tid ved de ulike analyseringstidspunktene.

### 3.2.3 Frysing



Figur 11: Linjediagrammet presenterer forskjellen på analyseresultatene mellom analysering ved 24 timer, som er rett før prøvene ble satt i fryseren og analysering rett ut fra fryseren. Diagrammet viser at trenden etter en periode i fryseren er lavere enn det fra før frysingen.



Figur 12: Linjediagrammet presenterer forskjellen på analyseresultatene mellom analysering ved 24 timer, som er rett før prøvene ble satt i fryseren og analysering rett ut fra fryseren. Diagrammet viser en variabel trend der noen verdier er høyere og andre lavere enn ved analyseringen etter 24 timer i romtemperatur. Her kan det observeres at linjene overlapper.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Holdbarhet i plasma og fullblod

I denne oppgaven ble det undersøkt holdbarheten til prøvemateriale over tid ved bestemte lagringsforhold. For å kontrollere mulig forandring ble prøvematerialet jevnt brukt til å analysere protein C og APC-resistens. Forsøket ble utvidet med å analysere både i fullblod og plasma. Med tanken på tidsbruk og relevant informasjonssamling ble plasma analysert etter null, åtte, 24 timer og etter frysing. Fullblod ble kun analysert etter 24 timer.

I artikkelen publisert i magasinet «Clinical Chemistry and Laboratory Medicine» i 2023 ble det anbefalt å tenke på både deltakerne, oppbevaringsposisjonen til prøveglassene og temperatur (17). Det anbefales å benytte pasienter til forsøk for å få et bredere spekter av de prøvesvarene som er av interesse. Dette har vært vanskelig å overholde ettersom analysene i dette forsøket ikke er av en grunn for innleggelse og de er heller ikke så vanlige. På grunn av dette har deltakere i forsøket vært friskmeldte menn og kvinner. Det er også fortalt om at temperaturer påvirker de kjemiske reaksjonene og gir dårligere holdbarhet, og at de derfor anbefaler å benytte de samme rutinene som ved daglig rutine. På grunn av problemstillingen har det blitt valgt å benytte romtemperatur for å gi mest mulig like forhold som samsvarer med artikkelen. Prøveglassene har blitt satt stående på en hylle uten forstyrrelser. I problemstillingenes gang fra legekantor til sykehuset hadde prøveglassene ikke fått de samme forholdene ettersom postgangen hadde gitt mer bevegelse underveis. Studien nevnte også at det er viktig at rør blir fylt helt opp og at hemolyse kan være en grunn til at prøver får redusert holdbarhet. Dette har blitt overholdt ved at det ble sjekket at alle rør ble fylt helt opp og det ikke ble brukt plasma med mye hemolyse.

Vurdering av holdbarheten baserer seg på biologisk variasjon og de ulike akseptgrensene. For protein C ble det fastsatt tillat bias på 4,4 % og tillatt totalfeil på 9,0 %. For APC-resistens brukes det andre verdier som 1,2 % tillat bias og 2,4 % tillat totalfeil. I belysning av brukte analytiske metoder kan man se at kravene er strenge, spesielt for APC-resistens analyse. For eksempel i artikkelen skrevet av Gosselin R.C. og Dwyre D.W. beskrives det holdbarhet av plasma til flere koagulasjonsanalyser som APTT, fibrinogen og andre. Resultatene av alle analysene baserer seg på tillat bias på 10 % (18). Dette standardiserer holdbarheten til plasma for flere koagulasjonsanalyser samtidig, siden de har felles krav til tillat bias.



#### *4.1.1 Romtemperatur*

Plasma og fullblod oppbevares i samme rom under hele forsøket. Der ble det ført temperaturregistrering med hjelp av en godkjent termometer. Temperaturkontroller ble gjennomført hver morgen før analysering i løpet av dagene med praktisk arbeid. Ut ifra målingene, som finnes i vedlegg 3, kan en påstå at temperaturforskjell er innenfor fastsatte grensene og bevaring av plasma og fullblod er godkjent.

##### *4.1.1.1 Protein C*

Resultatet for protein C på Sysmex CS-5100 registreres i form av tallverdi, og indikerer protein C aktivitet i forhold til normalplasma. Målområdet er definert som 0-150 %. I løpet av eksperimentet var det ingen resultater under eller over rapporteringsgrenser, se vedlegg 1.

Resultatene til protein C analyse oppbevart i plasma er innenfor akseptgrensene og ligger jevnt rundt gjennomsnittet. Gjennomsnittsendring inkludert alle 27 prøver i plasma er på -0,02 % som er mindre enn tillat bias og totalfeilen for denne type analyse. Resultater bekrefter at holdbarhet etter åtte og 24 timer i romtemperatur er akseptabelt og stemmer med rammene for prøvens stabilitet ved Ålesund sykehus som er på sju dager i romtemperatur (19). Med tanke på andre kilder og anbefalinger for prøvenes holdbarhet i romtemperatur over 24 timer, ble vurderingen ikke utført i løpet av dette forsøket.

Resultatene til protein C analyse i fullblod lagret i romtemperatur i 24 timer er illustrert under avsnitt 3.2.1. Mengden av prøvemateriale var begrenset, på grunn av at det ble avpipettert halvparten fra primært citratglass til sekundær rør for oppbevaring. Det ble derfor ikke analysert ved åtte timer. Første analysering etter prøvetaking er da den samme analyse som gjennomføres på plasma senest en time etter blodprøvetaking. Resultatet viser at fullblod mister stabiliteten etter 24 timer. Gjennomsnittsendring ble regnet ut til 1,85 % som er under akseptgrensene. Dermed kan fullblod være et mulig prøvemateriale, men plasma har en bedre holdbarhet over samme tid som tyder på at det er ingen grunn å endre dagens praksis ved laboratoriet.

#### *4.1.1.2 APC-resistens*

APC-resistens analyse går ut på å måle koagulasjonstid med og uten aktivator og konsentrasjon av aktivert protein C. Konsentrasjonøkning med aktivator tilstedes skal være to til tre ganger høyere enn den uten aktivator. Målområde for AcR OVD og AcR Act er mellom 0-250 sekunder, samtidig som nedre deteksjonsgrense er 16 sekunder. Resultatet rapporteres som APC-resistens ratio som er da sammenligning mellom koagulasjonstid med aktivator (Act) og koagulasjonstid uten aktivator (OVB).

Prøveresultatene viser at prøvene oppbevart i plasma i romtemperatur for APC-resistens analysert ved åtte timer passerer både tillatt bias på 1,2 % og totalfeil på 2,4 %. Dette er veldig strenge grenser ettersom APC-resistens har lite biologisk variasjon, og gir derfor slike krav. Ved analysering etter åtte timer er de fleste analysesvarene innenfor akseptgrensene og gjennomsnittsendringen er 0,8 %. Dette er innenfor, men slik prøvene er fordelt er det for mange verdier langt utenfor akseptgrensene og derfor blir det ikke ansett som at de er holdbare etter 8 timer oppbevaring i romtemperatur. Ålesund sykehus opererer med hjelp av retningslinjer for oppbevaring av citratglass til protein C i romtemperatur i opptil sju dager (19). Denne kilden har ingen anbefaling for APC-resistens og derfor har heller ikke Ålesund sykehus satt en holdbarhet for denne analysen. Ut ifra resultatene kan man påstå at plasma ikke er brukbart for denne type analyse etter mer enn åtte timer lagring. Samtidig som aktuelle akseptgrenser kan være strengt etterholdt av biologisk variasjon som gjør at plasmaet er mer holdbart. Resultatene har vist at det er bedre holdbarhet i plasma enn i fullblod.

Fullblod ble analysert etter 24 timer oppbevaring i romtemperatur. Resultatene indikerer at fullblod ikke er holdbart etter gitte omgivelser, og kan derfor ikke brukes til analysering. Ingen av verdiene er innenfor 1,2 % bias, og bare noen få under 2,4 % totalfeil. Gjennomsnittet på -5,5 % er svært høyt i forhold til plasma. Dette kan skyldes at fullblod ikke er egnet til oppbevaring i romtemperatur og bør sentrifugeres raskest mulig etter blodprøvetaking.

#### *4.2.1 Frysing*

Etter analyseringen ved 24 timer ble prøvene satt i en fryser som er montert med overvåking slik at en ble varslet om temperaturen ble for høy. Prøvene ble samlet opp og lagret fram til de ble analysert i fellesskap noen dager senere.

Når fryseprøvene ble analysert ble prøvene delt i puljer på fem til seks prøver i hver. Hver

pulje ble satt i vannbad på 37 °C i fem minutter og ble så satt på benken imellom 10 og 15 minutter for å få prøvene til romtemperatur. Prøvene ble behandlet ulikt etter hvem som tok prøvene ut av vannbadet. Noen ble snurret noen ganger i handflaten, andre ble vendt opp-ned en til to ganger. Dette har blitt vurdert som en usikkerhetskilde, men en kan ikke si noe om det er en årsak for en dårlig holdbarhet. Herfra ble prøvene satt rett i instrumentet for videre analysering.

#### *4.2.1.1 Protein C*

Analyseresultatene viser en trend der protein C aktiviteten minker mellom analysering før og etter frysing. Gjennomsnittlig endring mellom analyseringene før frysing og etter frysing var på -8.7 %. Dette er en forholdsvis høy prosent og dette er over satte akseptgrensen på 4,4 %. Til sammenligning benytter andre studier en klinisk grense ovenfor den biologiske variasjonen og denne er ved flere tilfeller 10 % (20). Ut ifra en slik grense hadde resultatet vært innenfor og blitt omtalt som holdbar.

Det var begrenset utvalg av lignende studier for protein C. Det ble gjennomført en studie av Amar Das Gupta og Anup Sharma, der forfatterne har testet hvor stor effekt frysing har på protein C, hvor man benyttet seg av sandwich ELISA metoden (21). I dette forsøket ble det brukt kromogen metode. Dessuten, i forsøket til Das Gupta og Sharme tyder resultatet at verdiene synker om prøvematerialet er oppbevart i fryseren i to uker. Endringen i verdiene var -6,4 %, som er betydelig, men ifølge deres kriterier på 6,6 % er dette innenfor.

Det kom en «outlier» fram blant resultatene som var helt ulik alle andre resultatene. Denne viste en endring på -21,3 %. Denne ble så blandet mer ved bruk av pipette for å se om det kunne være at den hadde blitt blandet for lite før den ble reanalysert. Reanalysering viste en endring på bare 7,2 %. Dette tyder på at det muligens ikke var blandet nok da resultatet minket ved reanalyseringen, men en kan ikke finne den direkte årsaken til at de ikke følger trenden. Den andre outlier hadde en økende endring på 2,37 %. Dette er en liten stigning og er innenfor metodens upresisjon og blir derfor ikke antatt som at den bryter ut av trenden.

#### *4.2.1.2 APC-resistens*

Resultatet viser overlapping mellom linjene over store deler av grafen, noe som er svært positivt. Gjennomsnittet på den prosentvise endringen er -2,5 %. Dette er en liten endring,

men ifølge de satte grensene er dette over det ønskede 1,2 %. Det har også blitt prøvd å utvide grensene litt og det ble valgt grenser som var navnsatt «minimal». Grensene ble da satt på 1,8 % for bias og 3,6 % for totalfeil. Dette utvidet grensene litt, men var likevel ikke nok. Grensene er veldig strenge i forhold til andre studier som utforsker holdbarhet. Foshat et al. har i sitt forsøk sett på effekten på APC-resistens ved frysing fra to timer til to uker. Der ble det brukt 10 % grense som klinisk signifikant endring, og det ble ikke satt en grense for tillatt bias for å vurdere holdbarheten. I deres forsøk ble prøvene analysert etter 48 timer i fryseren. Resultatet viser at det var gjennomsnittlig prosentvis endring på 5,2 % i forhold til analyseringen gjort etter to timer i fryseren. Standardavviket ved dette tilfellet var 8,5 % (20). I forhold til den gjennomsnittlige endringen var standardavviket veldig stort. Med tanke på grensene som ble satt i vår oppgave, er det en veldig stor forskjell da standardavviket til denne oppgaven var 1,2 %.

Her gjelder det samme som ved protein C, «outlieren» som ble oppdaget ble reanalysert etter en ny runde med blanding, gjennomført med pipette, der det nye resultatet samsvarer mer med de andre svarene fra analyseringsrunden etter frysing og tining.

## 5. Konklusjon

### 5.1 Sammenlikningen av plasma og fullblod

I denne studien ble holdbarheten av protein C og APC-resistens i både plasma og fullblod undersøkt over et tidsrom over 24 timer i romtemperatur, 18-25 °C, for å undersøke hvilket prøvemateriale som gir best holdbarhet. Resultatet viser at protein C har lite forskjell mellom verdiene for oppbevaring av plasma og fullblod, men at plasma likevel har en bedre holdbarhet. Selv om det ene materialet viser mer stabilitet enn det andre er protein C holdbart i 24 timer i romtemperatur i både plasma og fullblod.

Holdbarheten for APC-resistens er under åtte timer i romtemperatur for plasma og det har blitt observert dårligere holdbarhet i fullblod enn plasma.

### 5.2 Holdbarheten etter frysing

Frysing har vist en betydelig endring av resultatene, men med kriterier basert på klinisk relevant endring slik som andre liknende studier har benyttet, hadde resultatene vært innenfor og blitt anerkjent som holdbare. For protein C var den gjennomsnittlige endringen -8.7 % der biologisk variasjon var 4,4 %. APC-resistens har en biologisk variasjon på 1,2 % og endringen fra før frysing til etter frysing var -2,3 %.

### 5.3 Videre anbefaling

Ut ifra resultatet vil anbefalingen være at en undersøger hvilke kriterier en vil bruke for å vurdere holdbarheten til plasma for protein C og APC-resistens i romtemperatur og etter frysing. Protein C viser seg til å være holdbar i plasma i over 24 timer. Biologisk variasjon fremstår med å ha altfor strenge akseptgrenser, spesielt for APC-resistens, som tyder på at prøvematerialet ikke er holdbart etter åtte timer i romtemperatur.

## 6. Referanse

1. Adcock Funk DM, Lippi G, Favalaro EJ. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(6):576–85.
2. Holdbarhetsdatabase | Noklus.no [Internett]. [sitert 16. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/holdbarhetsdatabase/>
3. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost.* februar 2008;99(2):416–26.
4. Keohane EM, Smith L, Walenga J. *Rodaks's Hematology, Clinical Principles and Applications*, 5th edition.
5. Interaktiv Hematologi - Medisinsk Fakultet - UiO [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://studmed.uio.no/elaring/fag/anatomi/dlophp5/hematologi/index.php?articleID=1780>
6. Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology* [Internett]. 8th utg. 2010 [sitert 2. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.amazon.com/Williams-Hematology-Eighth-Kenneth-Kaushansky/dp/0071621512>
7. Protein C (aktivitetsanalyse) - Helse Møre og Romsdal [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://helse-mr.no/fag-og-forsking/tenester/medisinsk-biokjemi/analyser-og-undersokelser-molde-og-kristiansund/protein-c-aktivitetsanalyse>
8. Hemostase.doc [Internett]. [sitert 15. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.uio.no%2Fstudier%2Femner%2Fmedisin%2Fmed%2FMEDSEM3A%2Fh05%2Fundervisningsmateriale%2Fhemostase%2FHemostase.doc&wdOrigin=BROWSELINK>
9. APC resistens og FV Leiden - NHI.no [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://nhi.no/sykdommer/blod/blodningssykdommer/apc-resistens-og-fv-leiden/>

10. 'Kogan AE 'Strukova, SM. Protein C: mechanisms of activation and anticoagulant effect. [sitert 28. februar 2023]; Tilgjengelig på:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8364108/#:~:text=The%20activated%20protein%20C%20inhibits,and%20prevents%20excessive%20thrombin%20generation>
11. Factor V Leiden Mutation - PubMed [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30521223/>
12. APC-resistens - Helse Møre og Romsdal [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://helse-mr.no/fag-og-forskning/tenester/medisinsk-biokjemi/analyser-og-undersokelser-molde-og-kristiansund/apcresistens>
13. Vakuumrør citrat 3,5ml Lys blå | BLODANALYSE RØR | LEGEKONTOR, LABORATORIEUTSTYR | MEDISINSKTEKNISK UTSTYR | HELSE | S4Root | Norengros AS [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://www.norengros.no/vakuumror-citrat-3-5ml-lys-bla/p/248340>
14. Utføre holdbarhetsforsøk? | Noklus.no [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på:  
[https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/utfore-holdbarhetsforsok/?fbclid=IwAR17JvVqZhSvPqpHf7N2cdO5xYeUoUjOOLKTY7vG380Is1kooLq4dDrf\\_Q8](https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/utfore-holdbarhetsforsok/?fbclid=IwAR17JvVqZhSvPqpHf7N2cdO5xYeUoUjOOLKTY7vG380Is1kooLq4dDrf_Q8)
15. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, mfl. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. I: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Walter de Gruyter GmbH; 2015. s. 833–5.
16. EFLM Biological Variation [Internett]. [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på:  
[https://biologicalvariation.eu/search?query=Activated%20protein%20C%20resistance%20\(APCR](https://biologicalvariation.eu/search?query=Activated%20protein%20C%20resistance%20(APCR)
17. Gomez-Rioja R, Von Meyer A, Cornes M, Costelloe S, Vermeersch P, Simundic AM, mfl. Recommendation for the design of stability studies on clinical specimens. Clin Chem Lab Med [Internett]. 2023 [sitert 2. mai 2023]; Tilgjengelig på:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37021544/>

18. Gosselin RC, Dwyre DW. Determining the effect of freezing on coagulation testing: Comparison of results between fresh and once frozen-thawed plasma. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* [Internett]. 13. januar 2015 [siteret 5. mai 2023];26(1):69–74. Tilgjengelig på:  
[https://journals.lww.com/bloodcoagulation/Fulltext/2015/01000/Determining\\_the\\_effect\\_of\\_freezing\\_on\\_coagulation.11.aspx](https://journals.lww.com/bloodcoagulation/Fulltext/2015/01000/Determining_the_effect_of_freezing_on_coagulation.11.aspx)
19. Alt C, Banfi G, Bauer IK, Buchberger M, Greiner C, Gross H, mfl. Quality of Diagnostic Samples Corresponding members and industry representatives : Quality of Diagnostic Samples. 2010.
20. Foshat M, Bates S, Russo W, Huerta A, Albright K, Giddings K, mfl. Effect of freezing plasma at -20°C for 2 weeks on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, dilute Russell viper venom time, activated protein c resistance, and d-dimer levels. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 4. januar 2015;21(1):41–7.
21. Das Gupta A, Sharma A. Impact of reduced levels of protein C, free protein S and antithrombin in normal frozen plasma on the interpretation of patients' results. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. januar 2012;23(1):51–5.



## 7. Vedlegg

1. Rådata
2. Interkontroller
3. Temperaturoversikt
4. ProC® Ac R reagens
5. Risikoanalyse
6. Protein C i plasma
7. Protein C i fullblod
8. APC-resistens i plasma
9. APC-resistens i fullblod
10. MUSC Health Laboratory services
11. Samtykkeskjema

1. Rådata

Rådatatabell

	0-timer / Analysering etter prøvetaking	8-prøve / Analysering 8 timer etter prøvetaking	24-prøve / Analysering 24 timer etter prøvetaking	24-prøve FB / Analysering 24 timer etter prøvetaking i fullblod	Etter frysing plasma oppbevart i romtemperatur
1	145.6% 2.94R	144.5% 2.90R	141.1% 2.69R	142.1% 2.37R	128,2 2,51
2	105.2% 1.43R	104.7% 1.42R	103.3% 1.42R	98.2% 1.41R	101,6 1,41
3	123.4% 2.49R	124.1% 2.48R	123.6% 2.38R	123.7% 2.26R	109,6 2,41
4	108.8% 2.21R	106.7% 2.20R	106.8% 2.17R	107.2% 2.05R	94,4 2,21
5	89.8% 1.99R	89.9% 1.99R	89.0% 1.96R	89.1% 1.87R	80,1 1,91
6	159.2% 1.37R	156.1% 1.37R	156.6% 1.36R	154.9% 1.39R	154,0 1,35
7	97.6% 2.31R	96.5% 2.31R	96.5% 2.28R	93.2% 2.19R	93,2 2,20
8	93.2% 2.60R	93.1% 2.65R	94.1% 2.65R	89.1% 2.34R	90,9 2,45
9	149.5% 3.14R	150.5% 3.21R	149.5% 3.19R	149.5% 2.75R	138,7 2,95
10	94.5% 2.34R	94.9% 2.35R	94.3% 2.36R	93.6% 2.18R	83,4 2,41
11	107.9% 2.27R	109.5% 2.26R	108.7% 2.46R	108.7% 2.35R	(85,5) 116,5 (1,78) 2,27

12	78.2% 2.21R	79.9% 2.15R	79.2% 2.38R	75.5% 2.27R	76,8 2,29
13	110.5% 2.51R	110.8% 2.44R	111.0% 2.69R	108.4% 2.39R	94,5 2,42
14	138.2% 2.43R	134.1% 2.53R	133.5% 2.63R	131.9% 2.38R	120,2 2,61
15	107.9% 2.31R	109.0% 2.29R	108.6% 2.51R	103.5% 2.35R	95,7 2,37
16	87.8% 2.18R	88.9% 2.29R	88.7% 2.42R	85.8% 2.21R	81,8 2,34
17	92.8% 2.24R	93.9% 2.23R	93.0% 2.39R	91.9% 2.15R	79,1 2,15
18	115.2% 2.55R	113.2% 2.65R	112.6% 2.80R	109.0% 2.52R	94,5 2,60
19	160.2% 3.61R	165.9% 3.69R	166.4% 3.60R	160.0% 3.17R	155,4 3,43
20	81.0% 1.88R	82.1% 1.90R	81.8% 1.89R	81.7% 1.82R	76,4 1,80
21	115.4% 2.61R	116.6% 2.70R	117.6% 2.67R	118.6% 2.38R	101,4 2,78
22	89.4% 2.28R	90.6% 2.31R	89.5% 2.25R	87.4% 2.14R	78,9 2,19
23	135.8% 2.43R	139.3% 2.46R	136.8% 2.42R	134.4% 2.27R	119,7 2,38
24	97.2% 2.17R	97.4% 2.21R	96.8% 2.14R	96.3% 1.99R	87,4 2,14
25	85.6% 1.92R	85.8% 1.96R	85,3 1,88	84,5 1,83	75,9 2,00
26	95.2% 2.52R	97.4% 2.52R	96,1 2,46	92,5 2,26	89,6 2,49

27	132.3% 2.38R	-- på grunn av lite materiale	135,1 2,39	132,9 2,17	138,3 2,55
----	-----------------	----------------------------------	---------------	---------------	---------------

## Reagens

### Protein C

		LOT nummer
Aktivator		552931
Substrat		552931
Diluent		563405
Kontroller	N-kontroll	507920A
	P-kontroll	23174

### APC-resistens

		LOT nummer
PR3V lyofilisat		500129
Aktivator lyofilisat		500229
Buffer OVB		569929
Kontroller	Control Plasma N	507920A
	Control ProC	524480A

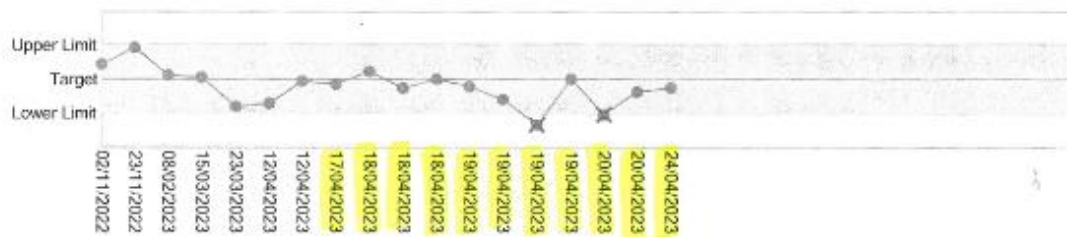
## 2. Internkontroller

CS-5100 CS 2

user : user

\*\*\*\*\* Quality Control Data Graph \*\*\*\*\*

Control	CtIN	Number of Data	18
Control Lot No.	507920	Mean	99.3
Control Lot Exp. Date	22/09/2024	SD	4.2
Control Lot Status	Current	CV	4.2
Assay Group	Prot C	Upper Limit	108.9
Assay Parameter	PC~%	Target	101.0
		Lower Limit	93.1

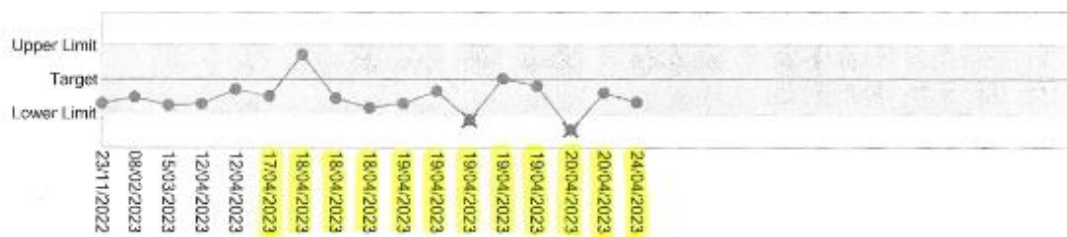


CS-5100 CS 2

user : user

\*\*\*\*\* Quality Control Data Graph \*\*\*\*\*

Control	CtIP	Number of Data	17
Control Lot No.	556736	Mean	33.9
Control Lot Exp. Date	13/02/2024	SD	1.9
Control Lot Status	Current	CV	5.6
Assay Group	Prot C	Upper Limit	39.9
Assay Parameter	PC~%	Target	36.0
		Lower Limit	32.1

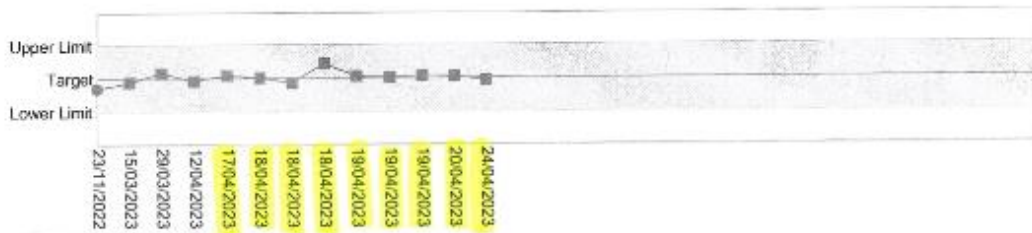


CS-5100 CS 2

user : user

\*\*\*\*\* Quality Control Data Graph \*\*\*\*\*

Control	CtIN	Number of Data	13
Control Lot No.	507920	Mean	90.3
Control Lot Exp. Date	22/09/2024	SD	3.5
Control Lot Status	Current	CV	3.9
Assay Group	AcR Act_1	Upper Limit	110.0
Assay Parameter	AcR Act_1~sec	Target	90.0
		Lower Limit	70.0

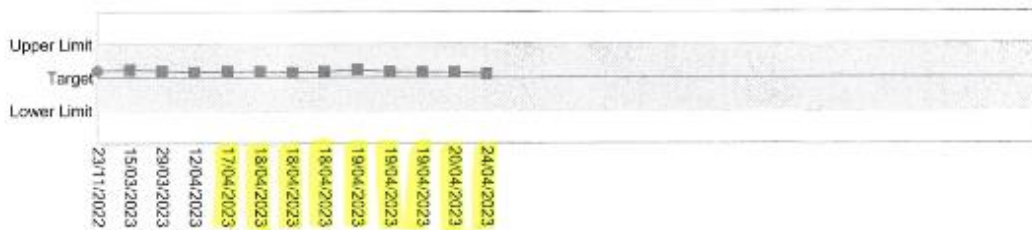


CS-5100 CS 2

user : user

\*\*\*\*\* Quality Control Data Graph \*\*\*\*\*

Control	CtIN	Number of Data	13
Control Lot No.	507920	Mean	33.6
Control Lot Exp. Date	22/09/2024	SD	0.7
Control Lot Status	Current	CV	2.1
Assay Group	AcR OVB_1	Upper Limit	50.0
Assay Parameter	AcR OVB_1~sec	Target	30.0
		Lower Limit	10.0

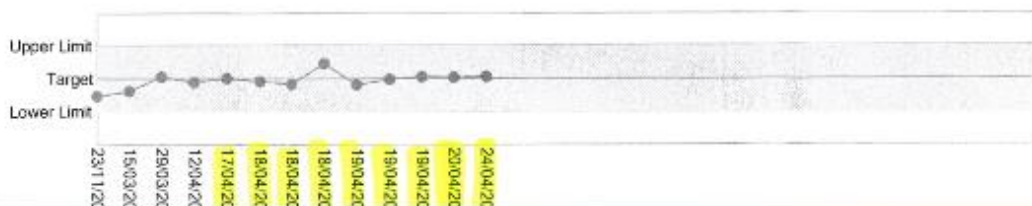


CS-5100 CS 2

user : user

\*\*\*\*\* Quality Control Data Graph \*\*\*\*\*

Control	CtIN	Number of Data	13
Control Lot No.	507920	Mean	2.69
Control Lot Exp. Date	22/09/2024	SD	0.12
Control Lot Status	Current	CV	4.5
Assay Group	AcR R_1	Upper Limit	3.23
Assay Parameter	AcR R_1	Target	2.72
		Lower Limit	2.21



### 3. Temperaturoversikt

#### Oversikten over romtemperatur

	Minimum temperatur	Maksimum temperatur	Nåværende temperatur
17.04.23 07:48	21.3°C	21.3°C	21.3°C
18.04.23 07:52	20.7°C	22.2°C	21.0°C
19.04.23 07:00	20.9°C	22.3°C	20.9°C
20.04.23 07:34	20.9°C	22.5°C	21.0°C
20.04.23 10:30	21.0°C	21.9°C	21.9°C

#### Oversikt over frysetemperatur

	Minimum temperatur	Maksimum temperatur	Nåværende temperatur
18.04.23	-30.7°C	-24.1°C	-29.2°C
19.04.23	-30.7°C	-24.7°C	-29.3°C
20.04.23	-30.7°C	-23.3°C	-29.2°C
21.04.23	-30.9°C	-18.6°C	-27.2°C
22.04.23	-31.0°C	-25.7°C	-29.5°C
23.04.23	-31.2°C	-28.8°C	-30.0°C
24.04.23	-31.0°C	-28.9°C	-29.9°C

## 4. ProC® Ac R reagens

SIEMENS



### ProC® Ac R

Revideringssøyle indikerer oppdatering til tidligere versjon.

#### Produktets hensikt

The ProC® Ac R-testen er en Russel Viper giftbasert funksjonell koaguleringsstest for screening av resistens mot Aktivert protein C (APC) i plasma fra individer med Faktor V (Leiden) gen-defekten. Det kan også utføres på plasma fra pasienter på stabilisert oral antikoagulant eller heparinbehandling.

#### Sammendrag og forklaring

Aktivert Protein C-resistens (APC-resistens) er forbundet med punktmutasjon i faktor V-genet [f.eks. Faktor V (Leiden)]. Mutasjonsresultatene i erstatningen av aminosyrearginin 506 (R) med glutamin (Q) i Faktor V-proteinet<sup>1</sup>. Denne mutasjonen senker hastigheten til inaktivering av faktor Va av APC, og fører til en hyperkoagulerbar tilstand. Forekomsten av Faktor V (Leiden) er den vanligste årsaken til arvelig trombofili, og utgjør 20 til 50 % av alle tilfeller<sup>2</sup>.

#### Metodeprinsipp

ProC® Ac R-testen er basert på aktiveringen av endogent protein C ved inkubasjonen av plasma med *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) gift. En fortennet "Russells Viper gifttid" (DRVVT, slangegiftaktivator for Faktor X) blir deretter utført på plasmaet. DRVVT er sensitiv for endringer i konsentrasjon av Aktivert protein C. I normale individer, forlenger aktivering av deres protein C resultatet til det dobbelt eller tredobbelte, sammenlignet med plasma uten aktivator. I individer med Faktor V (Leiden), fremkaller giftaktiveringen av Protein C bare marginal forlengelse av resultatet (vanligvis mindre enn 1,5 ganger plasmaet uten aktivator). For å minimere effekten av andre koagulerende variabler, bør et forhold av koaguleringsstider oppnådd med og uten Protein C, bestemmes.

Aktivert Protein C-resistens kan også skyldes andre mutasjoner i faktor V-genet [f.eks. FV (Cambridge) og FV (Hong Kong)].

#### Reagenser

**Merk:** ProC® Ac R kan brukes manuelt eller på automatiske koagulasjonsinstrumenter. Siemens Healthcare Diagnostics utarbeider referansemanualer (applikasjonsbeskrivelse) for mange koagulasjonsinstrumenter. Referansemanualene (applikasjonsbeskrivelsene) inneholder instrument/metode- spesifikk håndterings og ytelses informasjon, som kan være forskjellig, fra det som er oppgitt i denne brukerinstruksjonen. Hvis dette er tilfelle, vil informasjonen i referansemanualen (applikasjonsbeskrivelsen) gjelde fremfor informasjonen i denne brukerinstruksjonen. I tillegg, sjekk med brukermanualen til instrumentet.

#### Materialer som medfølger

ProC® Ac R, **REF** OPBC med

5 x → 4,0 ml **REAGENT** PR3V-reagens

5 x → 2,0 ml **ACTIVATOR**, Aktivator-reagens

Nok til å utføre 100 manuelle koaguleringsanalyser (100 tester med aktivator og 100 tester uten aktivator).



**Merk:** Antallet tester som er oppnådd med spesifikke koagulasjonsinstrumenter, kan variere.

### Sammensetning:

#### Aktivatorreagens:

Lyofilisat, inneholder *Agkistrodom contortrix contortrix*-gift (< 0,1 g/l) i stabiliserende bufferløsning.

Konserveringsmiddel: natriumazid (< 1 g/l)

#### PR3V-reagens:

Lyofilisat, inneholder fortynnet Vipera Russell-gift med høyt innhold av fosfolipid (< 1 mg/l), plantederiverte fosfolipider (< 10 g/l), kalsium og en heparinhemmer (< 0,5 g/l).

Konserveringsmiddel: natriumazid (< 1 g/l)

### Advarsler og forholdsregler

Kun for *in vitro*-diagnostisk bruk.

Inneholder natriumazid (< 1 g/l) som konserveringsmiddel. Natriumazid kan reagere med kobber- eller blyrør i avløpsledninger og danne eksplosive stoffer. Avhendes i samsvar med lokale forskrifter.

### Klargjøring av reagenser

- Rekonstituer **ACTIVATOR** i 2,0 ml destillert eller avionisert vann uten konserveringsmidler. Det rekonstituerte produktet skal være en klar, svakt gul løsning uten synlige partikler.
- Rekonstituer PR3V **REAGENT** i 4,0 ml destillert eller avionisert vann uten konserveringsmidler. Det rekonstituerte produktet skal være en gjennomsiktig, blek løsning uten synlige partikler.
- Snu forsiktig for å blande. **Må ikke ristes!**
- Inkuber i 10 minutter ved romtemperatur (15 til 25 °C) før bruk.
- Bland reagenser på nytt forsiktig før bruk.

### Oppbevaring og stabilitet

Frysetørrede reagenser må lagres ved 2 til 8 °C og er stabile frem til utløpsdatoen som står på etiketten.

### Stabilitet etter rekonstitusjon (lukket flaske):

Temperatur	<b>ACTIVATOR</b>	<b>REAGENT</b>
ved 2–8 °C	2 uker	2 uker
ved 20–25 °C	12 dager	12 dager
ved 37 °C	6 timer	6 timer
ved –20 °C	2 uker	2 uker

Informasjon om holdbarhet på instrumentet er spesifisert i referansemanualen (applikasjonsbeskrivelsen) for de forskjellige koagulasjonsinstrumentene.

### Indikasjon på utløp:

Hvis det ikke er tegn til vakuum når **REAGENT**-flasken åpnes og/eller **REAGENT** ikke fremstår som tørt, skal det returneres til Siemens. Hvis rekonstituerte produkter viser tydelige tegn til partikler eller kontaminasjon eller hvis de ikke løses opp helt innen 15 minutter av tilsetningen av destillert eller avionisert vann, vennligst ta kontakt med Siemens eller din distributør.

Ikke frys og tin på nytt mer enn én gang etter rekonstituering!

### Materiale som er nødvendig men som ikke medfølger

Natriumcitrat (0,11 M eller 3,2 %) for blodprøvetaking

Kontrollplasma N, **REF** ORKE

ProC® kontrollplasma, [REF](#) OQKE  
 Destillert eller avionisert vann uten konserveringsmidler  
 Testrør av plast  
 Pipetter for nøyaktig måling av 100 µl, 2,0 ml og 4,0 ml  
 Vannbad, opprettholdt ved 37 °C  
 Tidtaker eller stoppeklokke  
 Fysiologisk saltløsning (0,15 M natriumklorid) til bruk med BCS® koagulasjonsinstrument  
 Dade® CA System-buffer til bruk med SYSMEX CA Systems, [REF](#) B4265 eller  
 Dade® Owren's veronal buffer, [REF](#) B4234  
 Koagulasjonsinstrument

## Prøvetakning og klargjøring

Viktig: Behandle alle plasmaer som potensielt smittsomme!  
 For å få plasma, bland forsiktig 1 del natriumsitratløsning (0,11 M) med 9 deler frisktappet veneblod og unngå skumdannelse. Sentrifuger blodprøven så raskt som mulig ved 1,500 x g i minst 15 minutter i romtemperatur. Ved avpipetering av plasma, pass på at ikke Trombocytter kommer i plasmaet. Hvis prøven skal fryses; sentrifuger plasmaet igjen og frys umiddelbart. Se i CLSI dokument H21-A5<sup>3</sup> for generelle retningslinjer for prøvepreparering og lagring.

### Prøvenes stabilitet

ved 2 til 8 °C	4 timer (ferskt plasma)
ved -30 °C	6 måneder (hvis blodplatene fjernes ved dobbel sentrifugering før frysing).

## Prosedyre

### Manual:

#### Test med aktivator:

1. Forvarm nok **PR3V-reagens**, med 0,1 ml per test, til 37 ±1 °C i en reagensbeholder.
2. Dispenser 0,1 ml testplasma i et testrør.
3. Tilsett 0,1 ml **aktivatorreagens** til testplasmaet og inkuber i nøyaktig 5 minutter ved 37 ±1 °C.
4. Tilsett 0,1 ml av **PR3V-reagenset** forvarmet til 37 ±1 °C, start stoppeklokken straks og finn koaguleringstiden.
5. Gjenta målingen for dobbel måling og rapporter gjennomsnittet av begge målinger som resultat.

#### Test uten aktivator:

1. Forvarm nok **PR3V-reagens**, med 0,1 ml per test, til 37 ±1 °C i en reagensbeholder.
2. Dispenser 0,1 ml testplasma i et testrør.
3. Tilsett 0,1 ml **saltløsning** til testplasmaet og inkuber i nøyaktig 5 minutter ved 37 ±1 °C.
4. Tilsett 0,1 ml av **PR3V-reagenset** forvarmet til 37 ±1 °C, start stoppeklokken straks og finn koaguleringstiden.
5. Gjenta målingen for dobbel måling og rapporter gjennomsnittet av begge målinger som resultat.

### Intern kvalitetskontroll

Normalt område:	Kontrollplasma N
Patologisk område:	ProC® kontrollplasma

2 kontroller [en FV (Leiden) negativ og en FV (Leiden) positiv] må måles ved hver analysering. Et normalt kontrollplasma kan fastsettes med en pool med nylig tatt normale plasmaer, alle

testet og påvist negative for Faktor V (Leiden)-mutasjonen. Plasmaene skal samles på dagen de ble tatt, og fryses i små alikvoter til senere bruk. En positiv kontroll kan klargjøres fra alikvoter av et kjent Faktor V Leiden-positivt individ.

Plasma skal fryses ved  $-70^{\circ}\text{C}$  til bruk.

Kontrollene skal klargjøres og håndteres på samme måte som prøvene.

Akseptable grenser skal angis for hvert kontrollplasma ved å utføre presisjonsstudier i samsvar med CLSI-retningslinjer. Hvert laboratorium skal måle sitt eget kvalitetskontrollområde for begge kontroller, enten ved hjelp av målverdier og områder gitt av produsenten av kontrollene eller ved hjelp av kontrollverdier målt i laboratoriet, med hver lot av ProC® Ac R-testen. Dette beløper seg normalt til  $\pm 2,5$  standardavvik fra middel kontrollverdi.

Hvis de målte kontrollverdiene er utenfor det forhåndsbestemte kontrollområdet, må ikke pasientresultatene rapporteres til problemet er identifisert, korrigert og dokumentert. Finn hvilken del av instrument-/reagens-/kontrollsystemet ikke fungerte på riktig måte og korrigere den. Etter at korrigerende tiltak er implementert og dokumentert i samsvar med god laboratoriepraksis (GLP), skal kontrollene testes på nytt. Hvis de nå er innenfor konfidensområdet, kan pasientprøver testes og resultatene rapporteres.

## Resultater

Resultater bør uttrykkes som et forhold:

$$\text{ProC}^{\circ} \text{ Ac R-forhold} = \frac{\text{Koaguleringsstid PR3V med aktivator}}{\text{Koaguleringsstid PR3V med saltløsning eller Dade}^{\circ} \text{ CA System-buffer}}$$

ProC® Ac R Test-resultater på samlet, normalt plasma med Aktivatorreagens til stede, skal være 2 til 3 ganger lenger enn resultater på samlet, normalt plasma uten Aktivatorreagens (se forventede verdier).

## Prosedyrens begrensninger

Tester med ProC® Ac R ble utført med prøver fra pasienter på stabilisert oral antikoagulantterapi, pasienter på heparin- og lavmolekyl-heparinterapi og pasienter med lupus antikoagulant.

Prøver fra slike pasienter kan vise betydelig lengre koaguleringsstider enn prøver fra normale individer. Da koaguleringsstidene med saltløsning eller Dade® CA System-buffer også er forlenget er imidlertid kvotienten fra koaguleringsstiden med/uten aktivator fortsatt pålitelig og den diagnostiske signifikansen opprettholdes.

Terapeutiske doser hirudin eller andre direkte trombinhemmere fører til forlengede koaguleringsstider.

Siemens har validert bruken av disse reagensene på forskjellige analysatorer for å optimere produktets metodeegenskaper og overholde produktspesifikasjonene. Brukerdefinerte modifikasjoner støttes ikke av Siemens da de kan påvirke systemets egenskaper og analyseresultatene. Det er brukerens ansvar å godkjenne modifikasjoner av disse instruksjonene eller bruk av reagenser på andre analysatorer enn de som inngår i Siemens applikasjonsbeskrivelser og bruksanvisninger.

Resultater av denne testen skal alltid tolkes i sammenheng med pasienthistorikken, klinisk tilstand og andre funn.

## Interferenser

Ikteriske, lipemiske og hemolytiske prøver og prøver med lavt hematokritt skal ikke brukes med denne testen, da de kan føre til feil resultater (se CLSI H21-A5 for videre klargjøring<sup>3</sup>).

Lave aktiviteter av faktor VII, VIII, IX og XII virker ikke forstyrrende på ProC® Ac R-testen.

Aktiviteter av faktor II og V på mer enn 10 % og Faktor X på mer enn 20 % har heller ingen effekt på testen. I begynnelsen av behandling med orale antikoagulanter, dvs. før stabilisering, kan ProC® Ac R-testen gi forhold som er for lave. Det samme gjelder Protein C-konsentrasjoner på mindre enn 50 %.

Anestesimiddelet propofol (Diprivan, 2,6-diisopropylfenol, CAS-nr. 2078-54-8) kan indusere falskt lave koaguleringstider i aktivatoranalysen, noe som kan føre til tall under cut-off-verdien (falskt positive resultater)<sup>4</sup>.

### Forventede verdier

Verdier (forhold) for sunne individer varierer fra laboratorium til laboratorium, avhengig av prosedyren som brukes. Derfor skal hvert laboratorium bestemme sine egne referanseområder på grunnlag av metodene og koagulasjonsinstrumentene som brukes.

Generelt sett indikerer forhold som er mindre enn eller lik 1,5, Faktor V (Leiden)-varianten. En studie med BCS® System, SYSMEX CA-7000 og CA-1500-systemene ga en beslutningsgrense på 1,8 for disse analyseapplikasjonene.

Forhold mellom 1,5 og 2,1 kan tyde på lave konsentrasjoner av Protein C og bør undersøkes nærmere. Disse undersøkelsene kan inkludere spesifikke tester for Protein C- og DNA-tester. Prøver med positive eller tvetydige resultater skal bekreftes ved genetisk analyse.

### Spesifikke metodeegenskaper

#### Diagnostisk sensitivitet og diagnostisk spesifisitet

ProC® Ac R-testen ble validert med et Stago STA-instrument mot DNA-analysemetoden og en cut-off-verdi på 1,57 ble målt med ROC-analyse.

En klinisk evalueringsstudie ble deretter utført på tre uavhengige testsentre for å evaluere ProC® Ac R-testens evne til å måle Faktor V (Q506)-mutasjonen. ProC® Ac R-testen ble sammenlignet med COATEST APC Resistance V-test og DNA-analysen, med totalt 164 prøver (82 normale og 82 Faktor V (Leiden)-positive) fra pasienter fra 2 til 87 år. Populasjonen inkluderte pasienter med følgende kliniske tilstander: ubehandlet (49), DVT/PE eller andre protrombotiske tilstander (58), orale antikoagulanter (36), heparin/LMW heparin (21), lupus antikoagulant (12) eller familiestudier (39). 163 av 164 pasienter ble riktig identifisert med en cut-off-verdi på 1,57 på alle laboratorier, og ga en sensitivitet på 100 % (konfidensgrenser: 95,6 til 100 %) og en spesifisitet på 98,8 % (konfidensgrenser 93,4 til 99,8 %) i forhold til DNA-metoden. Validering ble utført med en Stago STA, en Organon Teknika MDA 180 og ved manuelt å vippe røret frem og tilbake.

En ytterligere klinisk evaluering av ProC® Ac R-testen med BCS® System, SYSMEX CA-7000 og CA-1500-systemene definerte beslutningsgrensen med ROC-analyse som 1,8. Den diagnostiske sensitiviteten og diagnostiske spesifisiteten for disse analyseapplikasjonene ble evaluert. Minst 198 ferske eller frosne prøver fra uvalgte frivillige, sunne bloddonorere bekreftet negative for Faktor V (Leiden) med PCR, og fra pasienter med forskjellige sykdomstilstander bekreftet positive for Faktor V (Leiden) med PCR ble testet. Se Tabell 1 for resultatene.

**Tabell 1:** Resultater av den diagnostiske sensitivitets- og diagnostiske spesifisitetsstudien for ProC® Ac R

	N	Cut-off	Spesifisitet [%]	Sensitivitet [%]	NPV [%]	PPV [%]
CA-1500	198	1,8	97,2	98,9	99	96,8
CA-7000	214	1,8	98,0	99,1	99	98,2
BCS®	231	1,8	98,1	99,2	99	98,4

ProC® Ac R-testapplikasjonene med BCS® System, SYSMEX CA-7000 og CA-1500-systemene ble sammenlignet med COATEST APC Resistance V med ACL 9000. Totalt 139 ferske eller frosne prøver fra uvalgte, frivillige sunne bloddonorere bekreftet negative for Faktor V (Leiden) med PCR, og fra pasienter med forskjellige sykdomstilstander bekreftet positive for Faktor V (Leiden) med PCR ble testet. 138 av de 139 prøvene ble riktig identifisert med ProC® Ac R-testen med BCS® System, SYSMEX CA-7000 System og COATEST APC Resistance V med ACL 9000. 137 av 139 ble riktig identifisert med ProC® Ac R-analysen med SYSMEX CA-1500 System.

**Merk:** Sensitiviteten og spesifisiteten til ProC® Ac R-testen for ikke-FV (Leiden) APC-resistensscreening er ikke fastsatt. På grunn av forskjellene i prøvepopulasjonene, innsamlingsteknikkene og instrumenteringene, bør hvert testlaboratorium etablere sin egen cut-off verdi.



















### Presisjon

Innen serie-presisjonsmaksimum (intraanalyse variasjonskoeffisient) var 1,9 %. Det totale presisjonsmaksimum variasjonskoeffisient var 8,9 % med to laboratorier, instrumenter og operatører med tre plasmaer, testet i duplikat i 20 dager dager.

### Bibliografi

1. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-7.
2. Dahlback B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest* 1994; 94:923-7.
3. CLSI Guideline H21-A5: Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition (ISBN 1-56238-657-3). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne, PA 19087-1898 USA, 2008.
4. Parsons L, et al. Propofol Interference in Coagulation Testing. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: A285.

### Symbolforklaring

	Ikke til gjenbruk		Holdbar til
	Lot nummer		Katalognummer
	Advarsel, konsulter tilhørende dokumenter		Produsent
	Autorisert representant i EU		Inneholder tilstrekkelig for <n> tester
	Biologiske risikoer		In Vitro diagnostisk medisinsk utstyr
	Temperaturbegrensninger		Konsulter instruksjoner for bruk
	Ikke-sterilt		CE merke
	Innhold		Rekonstitueringsvolum
	Nivå		Hold unna sollys og varme

BCS, Dade og ProC er varemerker for Siemens Healthcare Diagnostics.

SYSMEX er et varemerke for SYSMEX CORPORATION.

STA er et varemerke for Diagnostica Stago.

APC og COATEST er varemerker for Chromogenix AB.

MDA er et varemerke for Organon Teknika B.V..

© 2008 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH.

Med enerett.



Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH  
Emil-von-Behring-Str. 76  
35041 Marburg/Germany

**Siemens Healthcare Headquarters**

Siemens Healthcare GmbH  
Henkestraße 127  
91052 Erlangen/Germany  
Phone: +49 9131 84-0  
[siemens.com/healthcare](http://siemens.com/healthcare)

## 5. Risikoanalyse

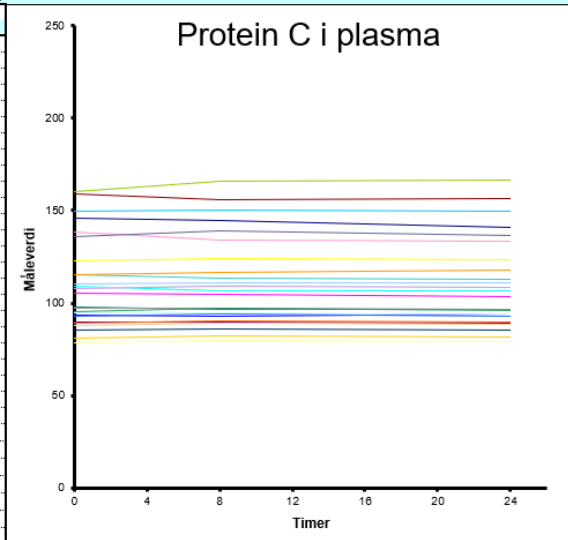
RISIKOANALYSE (alternativ til bruk av RiskManager)												
Enhet/institutt:							Dato opprettet:					
Ansvarlig linjeleder (navn):							Sist revidert:					
Ansvarlig for aktiviteten som risikovurderes (navn):												
Deltakere (navn):												
Beskrivelse av den aktuelle aktiviteten, området mv.:												
Eks: Risikoanalysen omfatter studentarbeidsoppgave i sammenheng med bacheloroppgåva. Dette omfatter blandt anna prøvetaking og analysering ved Ålesund sjukehus, medisinsk biokjemi og blodbank ved seksjon hematologi												
Aktivitet/arbeidsoppgave	Mulig uønsket hendelse	Eksisterende risikoreducerende tiltak	Vurdering av sannsynlighet (S)	Vurdering av konsekvens (K)				Risikoverdier (S x K)	Forslag til forebyggende og/eller korrigerende tiltak Prioriter tiltak som kan forhindre at hendelsen inntreffer (sannsynlighetsreducerende tiltak) foran skjerpet beredskap (konsekvensreducerende tiltak)	Restrisiko etter tiltak (S x K)		
			(1-5)	Menneske (1-5)	Øk/materiell (1-5)	Ytre miljø (1-5)	Omdømme (1-5)					
Eksempel: Bruk av vinkelsliper	Øyeskade p.g.a. sprut av slipstøv/partikler	Vernebriller er alltid tilgjengelig i verkstedet	3	3				9	Før oppstart: Gjennomføre dokumentert HMS-opplæring med studentene (bruk av håndverktøy og pålagt verneutstyr)	3 (S = 1)		
Blodprøvetaking	Stikkskade	Ta seg god tid, forberede utstyret godt, bruke sikkerhetshette rett etter ferdiggjort prøvetaking	1	2				2	Før ein settar igang med prøvetaking skal alt utstyret gjøres klart, sikre at nåla har sikkerhetshette og at ei risikoavfallsbøtte tenkt for nåler er tilgjengelig.	2		
Uffulstending fylling av citrat-rør	uønsket hemolyse i plasma. Feil resultat på grunn feil forhold mellom Na-Citratløsning og blod	Fyll glasset helt opp/til strekken med blod under prøvetaking	3	2	4			24	Før blodprøvetaking sjekk alle preanalytiske forhold og utfør punksjon av vene etter prosedyret. Ikke ta røret ut før det er fylt opp. Eventuelt ta ny runde med blodprøvetaking.	6		
Uffulstendig blanding av glass	Dannelse av fibrin i prøven	Glass bør vendes 8-10 ganger for å få jevn fordeling av bufret Na-Citratløsning og blod	3	2	4			3	27	Glass bør vendes minst 7-10 ganger for å	9	
Blodprøvetaking	Falskt forhøyet konsentrasjon av komponenter i blodet pga langvarig bruk av stase.	Løse stasen snart etter man har kjørt stikkstedet; stramme stasen rett før stikking, løse med en gang blodet strømmer godt i glasset.	3	2	1			2	15	Dersom man bruker lang tid på å kjenne vene til punksjonen (>3 minutt), løse stasen og vente et par minutt før stikking.	5	
Blodprøvetaking	Uffulstendig blanding med citrat pga luft i slangen ved bruk av butterfly nål.	Unngå bruk av butterfly nål; bruk kasteglass før fylling av citratrør for å fjerne luft i slangen.	3	1	1			2	12	Finne god vene som kan stikkes med grønn kanyle; bruke kasteglass.	4	
Serum indeks	uønsket hemolyse, ikretus, og lipemi	noen prøver kan være påvirket av de tre faktorer, på grunn av prøvetaking og forhøyet bilirubin eller lipidlager hos pasienten	2	1	4				10	Riktig prøvetaking for å unngå hemolyse, eventuelle spørsmål til pasienten om relevante sykdommer, eventuell vekt.	5	
Systematisk analysering av prøver	Feil tidspunkt for analysering	Å følge nøye tidsintervall og prøveplan til hver dag	2	2	4				12	Å lage en felles plan for gjennomføring av lab og sørge for at alle deltakere er trygge på alle trinn.	6	
Sentrifugering av prøve	feil sentrifugeringsinstillinger: temperatur og hastighet	Sjekk nøye før oppstart om sentrifuge står på riktige instillinger	2	2	4				16	Før sentrifugering: sjekk om alle innstillingene stemmer med manualen for denne type analysen: temeperatur, hastighet, eventuelt type glass.	6	
Plassering av ferdigsentrifugerte prøver i instrumentet	Rør skal plasseres riktig vei på rekka slik at Symex maskina kan lese tall/pasientnummer Ellers vil prøverøra komme ut uten å være analysert riktig. Som kan gi forskinket eller blandet resultat	Sette rør på riktig måte inn i instrumentet og med korrekt pasientnummer	2	2	1				6	Sjekk alle rør i rekka før man setter de i maskina, slik at alle skal være vanda riktig med pasientnummer synnlig.	3	
Oppbeivring av ferdiganalyserte prøver	Det er uønsket at prøver skal oppbevares ved feil temperatur enn det som er planlagt under forsøket. Ved slik hendelse kan ikke de brukes videre og resultater må annulleres.	Ha et system som alle følger med og dobbelsjekk om alle rør er satt på riktig plass før og etter analysering	2	2	4				4	20	Alle rør skal settes på plass enten i fryser eller i stativet som skal oppbevares i romtemperatur	10
Forversking av fullblodplasma-prøver (FB) og citratplasma-prøver (CP)	Etter avpipitering av plasma bør alle glassa merkes ekstra godt. Fordi at plasma fra fullblod-oppperaring og plasma fra citratplasma-oppbeivring ser likt ut. Viktig å ikke forveksle disse to, fordi dette kan gi feil svar i vårt holdbarhetsforsøket	Å ha et system som separerer glass med ulike materiale opp i. Markering av glass er viktig.	3	2	4				5	33	Å ha to/fleire separate staviver med prøver som skal merkes som FB og CP plasma og dobbelsjekk alltid før man setter prøverør på plass	11

## 6. Protein C i plasma – Excel-ark

### Holdbarhet av Protein C i plasma

Tillatt bias 4,4 %, og tillatt totalfeil 9,0 %

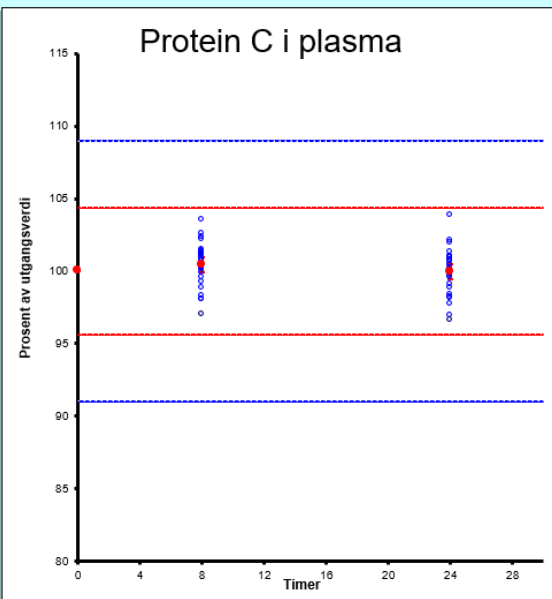
Timer	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
Prøve nr	Målte verdier								
1	145,60	144,50	141,10						
2	105,20	104,70	103,30						
3	123,10	124,10	123,60						
4	108,80	106,70	106,80						
5	89,80	89,90	89,00						
6	159,20	156,10	156,60						
7	97,60	96,50	96,50						
8	93,20	93,10	94,10						
9	149,50	150,50	149,50						
10	94,50	94,90	94,30						
11	107,90	109,50	108,70						
12	78,20	79,90	79,20						
13	110,50	110,80	111,00						
14	138,20	134,10	133,50						
15	107,90	109,00	108,60						
16	87,8	88,9	88,7						
17	92,8	93,9	93,0						
18	115,2	113,2	112,6						
19	160,2	165,9	166,4						
20	81,0	82,1	81,8						
21	115,4	116,6	117,6						
22	89,4	90,6	89,5						
23	135,8	139,3	136,8						
24	97,2	97,4	96,8						
25	85,6	85,8	85,3						
26	95,2	97,4	96,1						
27	132,3		135,1						
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									



Figur 1. Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve.

### Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)

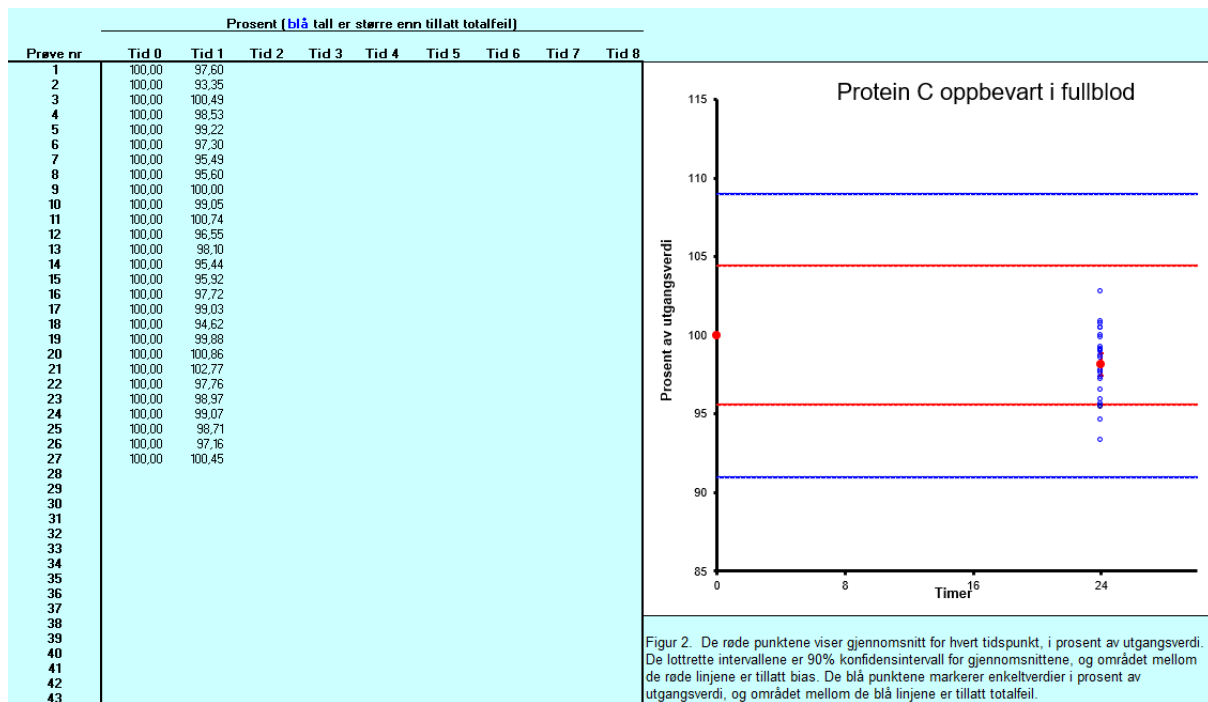
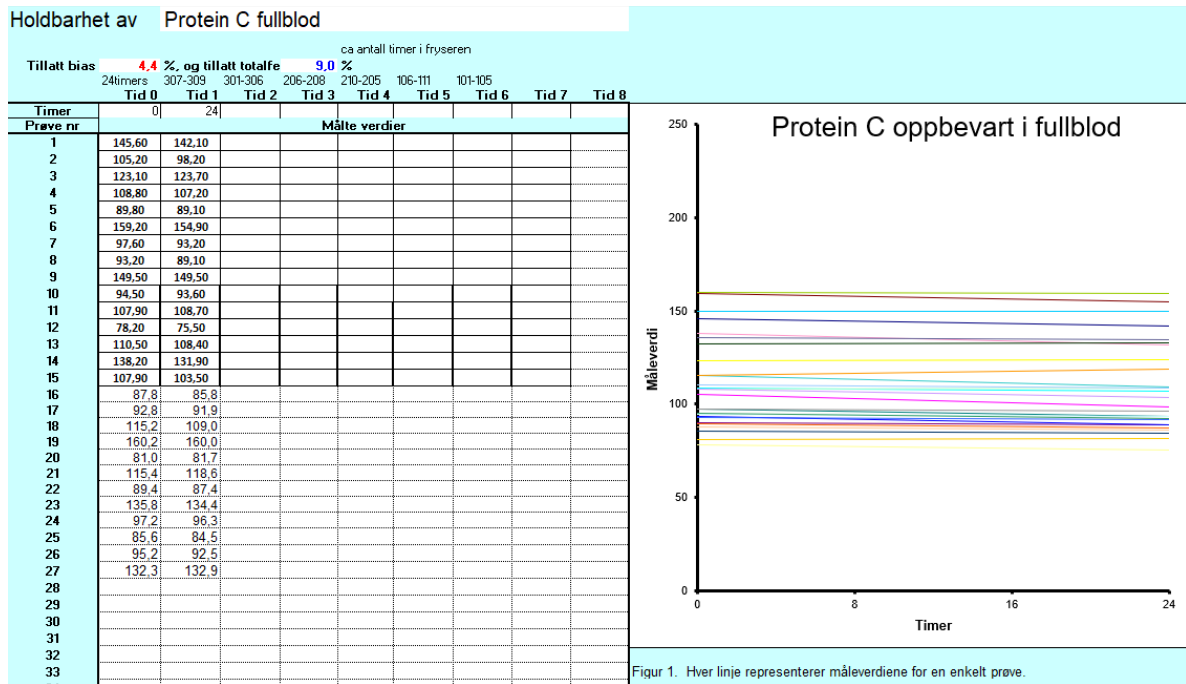
Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
1	100,00	99,24	96,31						
2	100,00	99,52	98,19						
3	100,00	100,81	100,41						
4	100,00	98,07	98,16						
5	100,00	100,11	99,11						
6	100,00	98,05	98,37						
7	100,00	98,87	98,87						
8	100,00	99,89	100,37						
9	100,00	100,67	100,00						
10	100,00	100,42	99,79						
11	100,00	101,48	100,74						
12	100,00	102,17	101,28						
13	100,00	100,27	100,45						
14	100,00	97,03	96,60						
15	100,00	101,02	100,65						
16	100,00	101,25	101,03						
17	100,00	101,19	100,22						
18	100,00	98,26	97,74						
19	100,00	103,56	103,87						
20	100,00	101,36	100,39						
21	100,00	101,04	101,31						
22	100,00	101,34	100,11						
23	100,00	102,58	100,74						
24	100,00	100,21	99,59						
25	100,00	100,23	99,65						
26	100,00	102,31	100,95						
27	100,00		102,12						
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									



utgangsverdi. De lottrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil.



## 7. Protein C i fullblod – Excel-ark

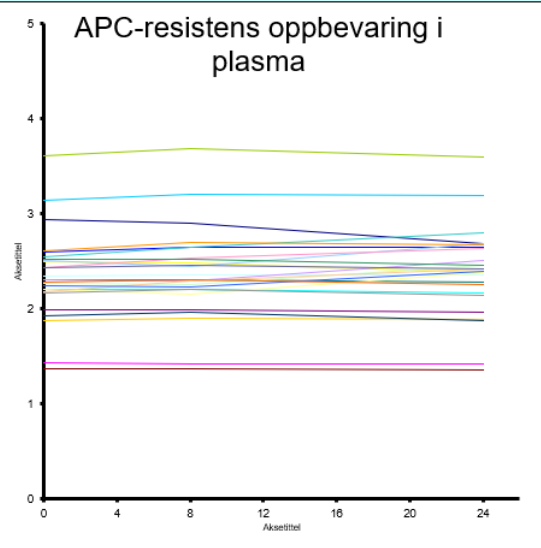


## 8. APC-resistens i plasma - Excel-ark

Holdbarhet av APCR

Tillatt bias 1,8 %, og tillatt totalfeil 3,6 %

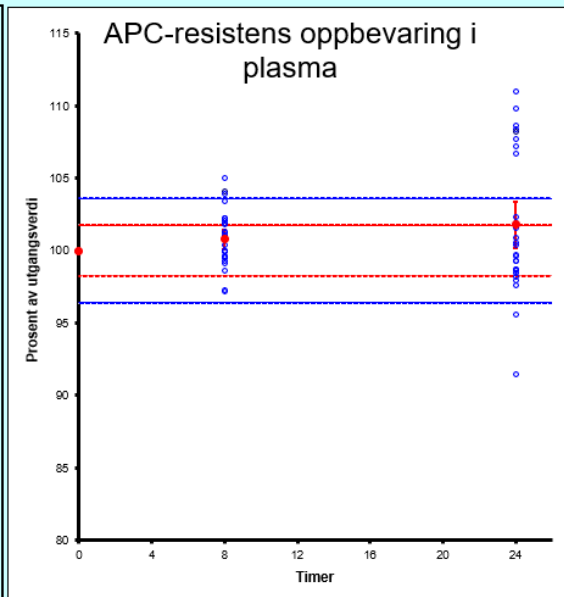
Timer	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3 FB	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
Prøve nr	Målte verdier								
1	2,94	2,90	2,69						
2	1,43	1,42	1,42						
3	2,49	2,48	2,38						
4	2,21	2,20	2,17						
5	1,99	1,99	1,96						
6	1,37	1,37	1,36						
7	2,31	2,31	2,28						
8	2,60	2,65	2,65						
9	3,14	3,21	3,19						
10	2,34	2,35	2,36						
11	2,27	2,26	2,46						
12	2,21	2,15	2,38						
13	2,51	2,44	2,69						
14	2,43	2,53	2,63						
15	2,31	2,29	2,51						
16	2,2	2,3	2,4						
17	2,2	2,2	2,4						
18	2,6	2,7	2,8						
19	3,6	3,7	3,6						
20	1,9	1,9	1,9						
21	2,6	2,7	2,7						
22	2,3	2,3	2,3						
23	2,4	2,5	2,4						
24	2,2	2,2	2,1						
25	1,9	2,0	1,9						
26	2,5	2,5	2,5						
27	2,4		2,4						
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									



Figur 1. Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve.

Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)

Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
1	100,00	98,64	91,50						
2	100,00	99,30	99,30						
3	100,00	99,60	95,58						
4	100,00	99,55	98,19						
5	100,00	100,00	98,49						
6	100,00	100,00	99,27						
7	100,00	100,00	98,70						
8	100,00	101,92	101,92						
9	100,00	102,23	101,59						
10	100,00	100,43	100,85						
11	100,00	99,56	108,37						
12	100,00	97,29	107,69						
13	100,00	97,21	107,17						
14	100,00	104,12	108,23						
15	100,00	99,13	108,66						
16	100,00	105,05	111,01						
17	100,00	99,55	106,70						
18	100,00	103,92	109,80						
19	100,00	102,22	99,72						
20	100,00	101,06	100,53						
21	100,00	103,45	102,30						
22	100,00	101,32	98,68						
23	100,00	101,23	99,59						
24	100,00	101,84	98,62						
25	100,00	102,08	97,32						
26	100,00	100,00	97,62						
27	100,00		100,42						
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									



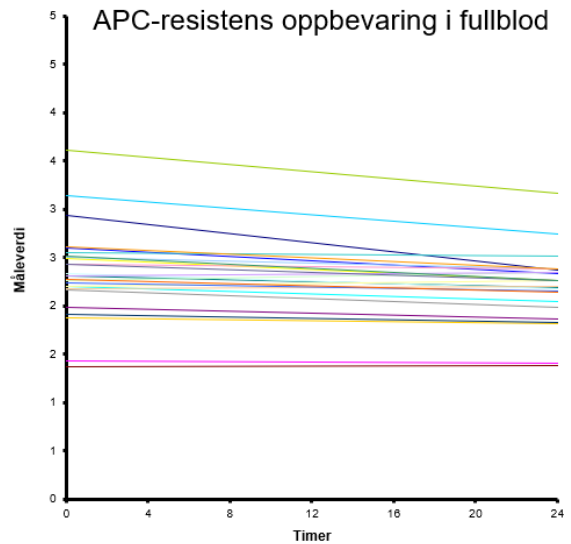
Figur 2. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De lottrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias. De blå punktene markerer enkelverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil.

## 9. APC-resistens i fullblod - Excel-ark

Holdbarhet av APCR i fullblod

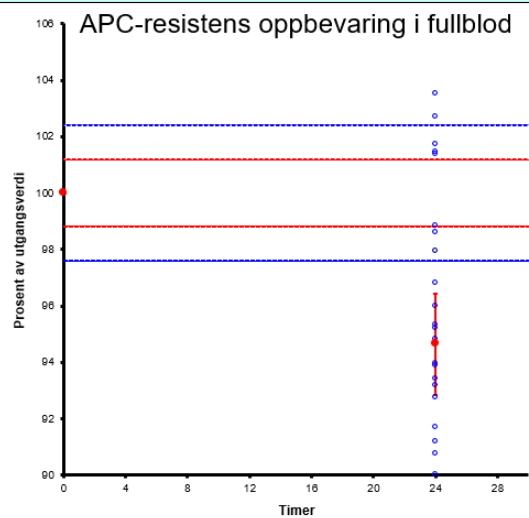
Tillatt bias 1.2 %, og tillatt totalfeil 2.4 %

Timer	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
Prøve nr	0	24							
	Målte verdier								
1	2.94	2.37							
2	1.43	1.41							
3	2.49	2.26							
4	2.21	2.05							
5	1.99	1.87							
6	1.37	1.39							
7	2.31	2.19							
8	2.60	2.34							
9	3.14	2.75							
10	2.34	2.18							
11	2.27	2.35							
12	2.21	2.27							
13	2.51	2.39							
14	2.43	2.38							
15	2.31	2.35							
16	2.21	2.21							
17	2.21	2.21							
18	2.61	2.51							
19	3.61	3.21							
20	1.91	1.81							
21	2.61	2.41							
22	2.31	2.11							
23	2.41	2.31							
24	2.21	2.01							
25	1.91	1.81							
26	2.51	2.31							
27	2.41								
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									



Figur 1. Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve.

Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
	Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)								
1	100,00	80,61							
2	100,00	98,60							
3	100,00	90,76							
4	100,00	92,76							
5	100,00	93,97							
6	100,00	101,46							
7	100,00	94,81							
8	100,00	90,00							
9	100,00	87,58							
10	100,00	93,16							
11	100,00	103,52							
12	100,00	102,71							
13	100,00	95,22							
14	100,00	97,94							
15	100,00	101,73							
16	100,00	101,36							
17	100,00	95,98							
18	100,00	96,82							
19	100,00	87,81							
20	100,00	96,81							
21	100,00	91,19							
22	100,00	93,86							
23	100,00	93,42							
24	100,00	91,71							
25	100,00	95,31							
26	100,00	89,68							
27	100,00								
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									



Figur 2. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsværdi. De lottrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsværdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil.

## 10. MUSC Health Laboratory services



165 Ashley Avenue, Room 318  
Charleston, SC 29425  
Phone (843) 792-0707  
Fax (843) 792-4896

### MUSC Laboratory Services Hemostasis / Coagulation Guidelines

#### Suggested Tests for Monitoring Anticoagulant Therapy

Anticoagulation Medication	Monitoring Assay Suggested	EPIC Lab #
Direct Thrombin Inhibitors	aPTT	LAB325
Coumadin	PT (INR)	LAB320
Hirudin	APTT	LAB325
Low Molecular Weight Heparin	Anti-Xa (Heparin, Low Molecular Weight)	LAB316
Unfractionated Heparin	aPTT	LAB325
	Anti-Xa (Heparin, Unfractionated)	LAB2815

#### Anti-Xa (Heparin) Assays

There are currently two chromogenic assays offered in-hospital to measure Anti-Xa (Heparin) therapy. It is imperative the correct assay is ordered for the type of anticoagulant the patient is receiving. Chromogenic measurement is possible for Unfractionated Heparin (LAB2815) and Low Molecular Weight Heparin (LAB325). At this time Rivaroxaban and Apixaban cannot be measured by current in-hospital Anti-Xa assays.

#### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE GUIDELINES

The *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline 5<sup>th</sup> H21-A5* states "Many variables including anticoagulant amount and concentrations; specimen and sample storage; and surface of containers may affect test results".

- The following are guidelines for Collection, Transport and Storage of Coagulation Specimens as stated in CLSI H21-A5.
- Clotted specimens and specimens not collected and transported according to the guidelines below are unsuitable for testing and are rejected.

#### A. COLLECTION

It is recommended that blood specimens for coagulation testing be collected by venipuncture using a blood collection system that collects the specimen directly into a tube containing the anticoagulant. All specimens should be collected in a nonactivating surface container.

1. The recommended anticoagulant for coagulation assay should be 3.2 % (105 - 109 mmol/L) Sodium citrate.
2. Suitable needle gauges for coagulation tests range from 21 to 19. For the pediatric patient, a 21-23 gauge needle may be used. A winged blood collection set of the same gauge can also be used.  
**Note: Smaller gauge needles (25 gauge or smaller) may result in hemolysis.**

3. The proportion of blood to anticoagulant volume is 9:1. Inadequate filling of the collection device will decrease this ratio, and may lead to inaccurate results. **Over/underfilled tubes will be rejected.**
4. The citrate concentration in the final blood mixture must be adjusted in patients who have hematocrit values > 55%. For hematocrits <20%, there are no current data available to support a recommendation for adjusting the citrate concentration; however, it is the recommendation of this laboratory to adjust citrate concentration for hematocrits which are <20% or >55%.
5. Immediately after the specimen is drawn, the tube should be inverted gently at least 5 times and then, as soon as possible, mixed thoroughly to avoid clotting. Avoid vigorous mixing which could result in hemolysis and/or platelet activation, leading to erroneous results.
6. Studies have shown that the PT (INR) and APTT results are not affected if tested on the first tube drawn. Proof of necessity of drawing a discard tube for other coagulation testing is circumstantial at best, but there are no current published data to suggest that this practice is unnecessary.
7. The following guidelines for syringe, winged blood collection set (e.g. butterfly), catheter or indwelling line specimens should be strictly followed to avoid clotting, hemolysis, tissue thromboplastin contamination, heparin contamination and over/under filling tube.

#### **Transfer of blood into Vacutainer tube**

Blood must be immediately added to the appropriate volume of anticoagulant (sodium citrate) and quickly but gently inverted at least 5 to 6 times end-over-end to assure thorough mixing.

- The blood should be added to the appropriate volume of anticoagulant within one minute of completion of draw.
- As soon as possible, mix thoroughly to avoid clotting.
- Avoid vigorous mixing which could result in hemolysis.
- If a syringe is used, the needle should be removed and the blood allowed to run down the side of the tube. Mixing should not be vigorous.
- The proportion of blood to anticoagulant volume is 9:1. Inaccurate filling of the collection device will alter this ratio and may lead to invalid results. **Over/under filled tubes will be rejected.**

#### **Winged blood collection set**

- Winged blood collection sets, because of their longer path length between vein and anticoagulant when used in combination with smaller-gauge needles should be used with caution to avoid platelet and coagulation activation.
- When using a winged blood collection set for venipuncture and a coagulation tube is the first tube to be drawn, a discard tube should be drawn first.
- The discard tube must be used to fill the blood collection tubing dead space and to assure maintenance of the proper anticoagulant/blood ratio; it need not be completely filled.
- The discard tube should be a non-additive or a coagulation tube. In the case of any unexpected results, a new specimen should be obtained from a different location.

#### **Syringe**

Using a hypodermic needle/syringe may have limitations because of the increased risk of hemolysis and apparent safety issues.

- **Do not collect specimen in heparinized syringe** (e.g. as used for blood gas specimens)
- With larger syringes, there is an increased chance that clotting may occur.
- A small volume syringe ( $\leq 20$  mL) is recommended.
- If a double syringe technique is used, blood from the **second syringe** should be used for the coagulation specimen.

#### **Vascular Access Device (VAD)**

Under certain circumstances, blood specimens for coagulation testing may be drawn from a vascular access device (VAD) using a blood collection system or a syringe.

- When obtaining a blood specimen from a VAD, the components of the blood collection system (VAD, connecting device, syringe, needle, and collection device) should be checked to ensure compatibility to avoid air leaks which may cause hemolysis and incorrect draw volumes.
- Collection of the blood through lines that have been previously flushed with heparin should be avoided, if possible.
- If the blood must be drawn through a VAD, possible heparin contamination and specimen dilution should be considered. In this case the line should be flushed with 5 ml of saline and the first 5 mL of blood or six dead space volumes of the VAD discarded.
- If blood is obtained from a normal saline lock, two dead space volumes of the catheter and extension set should be discarded.

## **B. SPECIMEN STORAGE AND TRANSPORT**

Specimens should be transported to the laboratory for testing as soon as possible adhering to the guidelines below:

### **PT assays ONLY**

- Uncentrifuged or centrifuged with plasma remaining on top of the cells in an unopened tube kept at 18 to 24°C should be tested within 24 hours from time of specimen collection. Specimens may also be stored at 2-4°C; however, storage at 2-4°C may result in cold activation of Factor VII and therefore alter PT results.
- If the patient is on both heparin and oral anticoagulant therapy, the PT may vary with time of storage.

### **APTT assays on nonheparinized patients**

- Uncentrifuged or centrifuged with plasma remaining on top of the cells in an unopened tube kept at 2 to 4 °C or 18 to 24°F should be tested within four hours from time of specimen collection.

### **APTT assays suspected to contain unfractionated heparin**

- Specimens should be kept at 2 to 4 °C or 18 to 24°C and centrifuged within one hour of collection, plasma removed from the cells, and stored at 2-4°C.
- The plasma should be tested within four hours from time of specimen collection.

### **D-DIMER**

- Uncentrifuged or centrifuged with plasma remaining on top of the cells in an unopened tube kept at 2 to 4 °C or 18 to 24°F should be tested within 8 hours from time of specimen collection.

### **Other assays**

- Thrombin Time, Fibrinogen, Protein C, Protein S and Factor Assays kept at 2 to 4 °C or 18 to 24°F, should be centrifuged and tested within four hours from time of specimen collection.

Specimens which cannot be transported to the laboratory according to the guidelines above should be centrifuged to yield platelet poor plasma and the specimen sent frozen on dry ice.

Rev. 1/2015

## **Samtykkeskjema**

Vi er tredje års bioingeniørstudenter ved NTNU i Ålesund. Vi gjennomfører en bacheloroppgave som handler om holdbarheten til protein C og APC resistens. I forbindelse med dette trenger vi blod for å kunne gjennomføre den praktiske delen av bacheloroppgaven.

Hvis du vil, kan blodet vi tar av deg brukes til dette formålet. Dette er helt frivillig.

Ditt blod brukes kun til undersøkelsen av holdbarheten til protein C og APC resistens og vil være helt anonymisert. Laboratoriet kan derfor ikke gi ut prøvesvar og avskriver seg ansvar for å informere om eventuelle patologiske funn.

-----

Jeg sier ja til at blodprøven som tas av meg i dag, kan brukes til bacheloroppgaven.

Dato:

Signatur:

