

Serumproteiners holdbarhet ved romtemperatur

Av **MARI MYREN SKÅRVOLD**¹, **THEA BERG**², **MARI MESLO LIEN**² og **ELI KJØBLI**³

E-post: eli.kjobli@hist.no

1) Bachelorstudent 2009 – 2012 ved Program for bioingeniørfag, Høgskolen i Sør-Trøndelag (HIST). 2) Fagansvarlig bioingeniør, Avdeling for medisinsk biokjemi (AMB), St. Olavs Hospital. 3) Høgskolelektor, Program for bioingeniørfag, Høgskolen i Sør-Trøndelag

Artikkelen er basert på en bacheloroppgave utført våren 2012.

FOR AT ANALYSERESULTATENE fra medisinske laboratorier skal kunne benyttes i diagnostikk og behandling er det av største betydning at analyseresultatet for den enkelte blodprøve gjenspeiler konsentrasjonen av analytten i pasientens blod ved prøvetakingstidspunktet. Prøvetaking, oppbevaring, prøvebehandling og valg av analysemetode er faktorer som alle virker inn på analyseresultatet.

Et systematisk kvalitetsarbeid i medisinske laboratorier har ført til at feilfrekvensen på rapporterte analysesvar er meget lav. I de tilfeller der feil oppstår, har de fleste sitt opphav i den preanalytiske fasen (1). Lagring av prøvemateriale er en av flere årsaker til at den målte konsentrasjonen kan avvike fra konsentrasjonen ved prøvetaking, da både lagringstid og temperatur kan påvirke analytten (2).

Informasjon om en analytts stabilitet ved lagring hentes oftest fra publiserte holdbarhetsstudier. En samling av slike studier er å finne i «Quality of Diagnostic Samples» (QDS) av Guder et al. (3). I enkelte tilfeller har produsenten av et analysesystem testet analytts stabilitet og presentert dette i reagensvedleggene. Det kan likevel være nødvendig for et laboratorium å utføre egne holdbar-

hetsstudier tilpasset lokale forhold og analysesystem. Dette gjelder spesielt når tidligere beskrevne holdbarhetsstudier er utført med en annen metode enn den laboratoriet benytter, eller når lagringsbetingelser (tid eller temperatur) som er av interesse ikke er undersøkt tidligere. Det enkelte laboratorium bør kjenne til analyttkonsentrasjoners endring under lagring for å kunne håndtere lagringsbetinget instabilitet på en best mulig måte (4). For eksempel kan analyttens holdbarhet ved immunologiske kvantitative tester avhenge av det spesifikke antistoffet som benyttes, siden stabiliteten til enkeltepitoper kan variere.

Avdeling for medisinsk biokjemi (AMB) ved St. Olavs Hospital kvantiterer enkelte serumproteiner med en immun-nefelometrisk metode levert av Siemens Healthcare Diagnostics. Prøvematerialet som ankommer laboratoriet for analyse kan være flere dager gammelt på grunn av sen postgang, helger og høytider. Normalt tar postforsendelse ett til to døgn, men det kan ta opptil sju døgn i høytider som jul og påske. Blodprøvene kan i verste fall ha vært oppbevart ved romtemperatur i sju døgn før de ankommer laboratoriet. Holdbarhetsdata for oppbevaring av

Sammendrag

Siden prøvemateriale tilsendt per post kan ha vært oppbevart i romtemperatur over flere dager, trenger diagnostiske laboratorier kunnskap om prøvenes og analyttenes holdbarhet. Man forholder seg vanligvis til data fra tidligere holdbarhetsstudier. Dersom det ikke finnes god dokumentasjon for holdbarheten, må det enkelte laboratorium utføre egne holdbarhetsstudier, noe som var bakgrunnen for denne studien.

I denne holdbarhetsstudien ble det analysert serum fra 30 blodgivere. Prøvene ble lagret i inntil sju døgn i romtemperatur. For hvert lagringstidspunkt, 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 og 168 timer, ble serumproteinene Apo A-1, Apo B, komplementfaktorene C3 og C4, transferrin, CDT, FLC- κ og FLC- λ , prealbumin og β_2 -mikroglobulin kvantitert med immun-nefelometrisk metode (BN ProSpec, Siemens). I tillegg ble CDT % og FLC- κ /FLC- λ -ratio beregnet. Alle resultatene ble sammenlignet med utgangsverdi og vurdert mot tillatt totalfeil. Gjennomsnittlig avvik fra utgangsverdi med 90 % KI ble vurdert mot tillatt systematisk feil (bias).

Resultatene viste at Apo A-1, Apo B og prealbumin var holdbare i minimum sju døgn i romtemperatur. C3 var holdbar i ett døgn og C4 i sju døgn. FLC- κ og FLC- λ hadde en holdbarhet på to døgn, mens FLC- κ /FLC- λ -ratio kan benyttes på serumprøver oppbevart i inntil fire døgn ved romtemperatur. β_2 -mikroglobulin og CDT % ble vurdert som holdbare i tre døgn. Konklusjonen er basert på at Siemens Healthcare Diagnostics analysesystem og antistoffer er benyttet.

Nøkkelord: Holdbarhetsstudie, immun-nefelometri, tillatt bias, tillatt totalfeil

Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

TABELL 1: Oversikt over årsakene til at ti serumproteinparametere ble utvalgt til undersøkelse av holdbarhet i romtemperatur i opp til sju døgn.

| | Apo A-1 | Apo B | C3 | C4 | CDT % | FLC-κ | FLC-λ | FLC-κ/ λ-ratio | Pre-albumin | β ₂ -mikroglob |
|--|---------------|---------------|----|----|-------|---------------|---------------|-------------------|---------------|---------------------------|
| Ikke oppgitt fra leverandør for aktuell metode | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Oppgitt i litteraturen, men for annen analysemetode (3) | x (1 døgn) | x (1 døgn) | | | | x (7 døgn) | x (7 døgn) | | x (3 døgn) | x (3 døgn) |
| Nylig lansert metode tatt i bruk (17) | | | | | | x | x | | | |
| Erfaring tilsa annen holdbarhet enn oppgitt for annen metode | x | x | | | | x | x | | | |
| Økning ved lagring kjent, økningens størrelse ukjent | | | x | x | | | | | | |

serumproteiner i romtemperatur var ikke oppgitt fra leverandøren av det aktuelle analysesystemet. Ved literatursøk ble det heller ikke funnet holdbarhetsstudier som inkluderte disse betingelsene. Med bakgrunn i dette fant AMB ved St. Olavs Hospital at det var nødvendig å undersøke holdbarheten av et utvalg serumproteiner oppbevart i romtemperatur.

Følgende serumproteiner ble inkludert i studien; apolipoprotein A-1 og B (Apo A-1, Apo B), komplementfaktor C3 og C4 (C3, C4), transferrin, karbohydratfattig transferrin (CDT), frie lette kappa- og lambda-kjeder (FLC-κ og FLC-λ), prealbumin og β₂-mikroglobulin. Det ble også undersøkt hvilken innvirkning lagring i romtemperatur har på de kalkulerede parametrene «Prosent karbohydratfattig transferrin» (CDT %) og «FLC-κ / FLC-λ-ratio». Begrunnelsen for at akkurat disse ni proteinene ble inkludert i studien er oppsummert i tabell 1.

Formålet med studien var å undersøke hvor lenge de utvalgte serumproteinene og kalkulerede parametrene er holdbare ved oppbevaring i romtemperatur når Siemens Healthcare Diagnostics analysesystem benyttes til kvantitering.

Materiale og metode

Prøveinnsamling og prøvebehandling

Protokollen for innsamling, fordeling og oppbevaring av prøvemateriale til bruk i holdbarhetsundersøkelser ved St. Olavs Hospital ble fulgt (6). Fullblod fra 30 blodgivere ble tappet (erklært samtykke innhentet) på blodposser uten tilsetning. Blodet ble fordelt i gelrør (5 mL, Vacuette) innen 30 minutter fra tapping. Gelrørene ble sentrifugert i fem minutter ved 3000 g og 18 °C innen to timer etter tapping. De sentrifugerte gelrørene fra hver blodgiver ble oppbevart ved romtemperatur (18 - 25 °C) i inntil sju døgn, varierende fra 0 - 24 - 48 - 72 - 96 - 120 - 144 - 168 timer. Etter henstand i romtemperatur ble serumet fordelt i alikvoter på 0,5 mL i «cryorør» (1 mL, Thermo Scientific) og frosset ved - 20 °C. Etter dag sju ble alle «cryorørene» oppbevart ved - 80 °C til analysetidspunktet. For denne studien vil det si mellom fire og fem måneder. Konsentrasjonsspennet for analyttene som inngikk i studien er vist i tabell 2.

For å få en indikasjon på om et antall på 30 individer var stort nok til å vurdere prøvenes gjennomsnittlige endring fra utgangsverdi mot største tillatte systematiske feil for analytten (bias), ble et minimumsantall (n) beregnet ved hjelp av en modifisert formel basert på Brown og Hollanders formel (7) (se tabell 3, formel 1).

I formel 1 er CV_a metodens analytiske variasjon, mens % B er tillatt % bias for en gitt analytt. Faktoren f settes > 1, og velges ut fra en avveining mellom hvor høy

Abstract

Diagnostic laboratories require knowledge of the stability of various sample components to assess sample quality. A significant proportion of patient samples are sent by post. Those samples may have been stored in ambient temperature for several days. Stability data of a compound is usually found in the literature. If not, the laboratory needs to obtain such information by carrying out their own studies, which was the background for this study.

Serum samples from 30 blood donors were stored for up to seven days in room temperature. Apo A-1, Apo B, prealbumin, β₂-microglobulin, complement factors C3 and C4, FLC-κ and FLC-λ were analysed after 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours by BN ProSpec system (Siemens Healthcare Diagnostics), with an immuno nephelometric method. Two parameters, CDT % and FLC-κ / FLC-λ-ratio were calculated. The deviations from initial value were compared with the allowable total error. The average differences from the initial value for all 30 samples, and the 90 % CI, were compared with the allowable systematic error (bias).

Apo A-1, Apo B and prealbumin were stable for seven days at room temperature. C3 was stable for one day, while C4 was stable for seven days. FLC-κ and FLC-λ were stable for two days, while FLC-κ/FLC-λ ratio was found to be stable for four days when stored in room temperature. β₂-microglobulin and CDT % were stable for three days. These conclusions are based on using Siemens nephelometric analysis system and antibodies for quantification.

Keywords: Stability Study, Immuno nephelometry, Allowable bias, Allowable total error

TABELL 2: Analytisk variasjon (CV_a) for angitt konsentrasjonsnivå, tillatt % bias, tillatt totalfeil i % og beregnet minimum antall individer som bør inkluderes i studien for hver av analyttene. Høyre kolonne viser konsentrasjonsspennet på prøvene som inngikk i holdbarhetsstudien.

| Analytt | Analytisk variasjon CV_a (%) | Nivå | Tillatt bias (%) | Tillatt totalfeil (%) | Minimum antall individer ⁴⁾ , n | Konsentrasjonsintervall i studien |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------|-------------------|-----------------------|--|-----------------------------------|
| Komplement C3 | 2,4 | 1,68 g/L | 4,1 ¹⁾ | 8,4 ¹⁾ | 11 | 0,82 - 1,28 g/L |
| Komplement C4 | 3,7 | 0,31 g/L | 8,6 ¹⁾ | 16,0 ¹⁾ | 6 | 0,14 - 0,26 g/L |
| Prealbumin | 6,5 | 0,31 g/L | 5,5 ¹⁾ | 14,5 ¹⁾ | 43 | 0,19 - 0,41 g/L |
| Apo A-1 | 3,5 | 1,60 g/L | 3,7 ¹⁾ | 9,1 ¹⁾ | 27 | 1,18 - 2,01 g/L |
| Apo B | 3,4 | 0,87 g/L | 6,0 ¹⁾ | 11,6 ¹⁾ | 10 | 0,65 - 1,61 g/L |
| Beta ₂ -mikroglobulin | 3,9 | 1,7 mg/L | 4,0 ¹⁾ | 9,0 ¹⁾ | 28 | 1,38 - 2,12 mg/L |
| CDT % | 8,5 | 1,6 % | 8,7 ²⁾ | 12,6 ²⁾ | 29 | 1,32 - 2,78 % |
| Frie kappakjeder | 6,4 | 13,1 mg/L | 7,0 ³⁾ | 30,0 ⁵⁾ | 26 | 6,86 - 19,40 mg/L |
| Frie lambda-kjeder | 3,0 | 11,9 mg/L | 7,0 ³⁾ | 30,0 ⁵⁾ | 6 | 9,59 - 25,10 mg/L |
| Kappa/lambda-ratio | 4,2 | 1,10 | 7,0 ³⁾ | 30,0 ⁵⁾ | 11 | 0,60 - 1,29 |

1) Ricos et al (9). 2) Helander et al (10). 3) Beregnet 1/16 av referanseområdet (12). 4) Beregnet etter modifisert Brown og Hollanders formel (7). 5) Katzmann et al (11)

statistisk styrke som trengs i undersøkelsen og kostnader i utførelsen. f i formelen ble her satt til 2. Beregnet minimumsantall for den enkelte analytt er vist i tabell 2.

Serumaliquotene ble tint i romtemperatur (30 - 60 minutter), blandet på vippe i 5 - 10 minutter og analysert innen 3 timer etter tining. Prøver fra alle lagringstidspunkt fra en og samme blodgiver ble analysert i samme analyseserie.

Kvantitering av serumproteiner

Serumkonsentrasjonene av proteinene Apo A-1, Apo B, C3 og C4, CDT, transferrin, FLC- κ og FLC- λ , prealbumin, og β_2 -mikroglobulin ble bestemt ved immun-nefelometrisk metode utført på BN ProSpec nefelometer med software versjon 1.1, Assay protocol 2.8 (Siemens Healthcare Diagnostics, Tyskland).

Samtlige reagenser og kalibratorer var fra samme leverandør; N Latex β_2 -mikroglobulin, N Antistoff mot human Apolipoprotein A-1, N Antistoff mot human Apolipoprotein B, N Antistoff mot human transferrin, N Latex CDT kit, N Antistoff mot human Prealbumin, N Latex FLC Kappa, N Latex FLC Lambda, N Antistoff mot human komplementfaktor C3c, N Antistoff mot human komplementfaktor C4, N Supplementreagens P, N Supplementreagens L og N FLC Supplementreagens. Følgende kalibratorer ble benyttet; N Apolipoprotein Standard Serum (Apo A-1 og Apo B), N Protein Standard SL (prealbumin, transferrin, β_2 -mikroglobulin, C3c og C4), N CDT Standard SL (CDT) og N FLC Standard SL (FLC- κ og FLC- λ).

CDT ble beregnet i prosent av målt transferrin (se tabell 3, formel 2). Konsentrasjonsratioen mellom FLC- κ og FLC- λ ble også beregnet (se tabell 3, formel 3).

Statistisk bearbeidelse, tillatt totalfeil og tillatt bias
Konsentrasjonsendring i % av nullprøven ble beregnet etter formel 4 (se tabell 3).

TABELL 3: Formeler som ble brukt i studien.

| | |
|----------|--|
| Formel 1 | $n > 7,68 \times f^2 \times (CV_a / \% B)^2$ |
| Formel 2 | $CDT \% = (CDT [g/L] / Transferrin [g/L]) \times 100$ |
| Formel 3 | $FLC-\kappa / FLC-\lambda\text{-ratio} = FLC-\kappa [mg/L] / FLC-\lambda [mg/L]$ |
| Formel 4 | $\% \text{ endring} = 100 \times [(R_0 - R_t) / R_0]$ |
| Formel 5 | $TF = 1,65 \times CV_t + \% \text{ bias}$ |
| Formel 6 | $\% \text{ bias} = 0,25 \times (CV_w^2 + CV_b^2)^{0,5}$ |

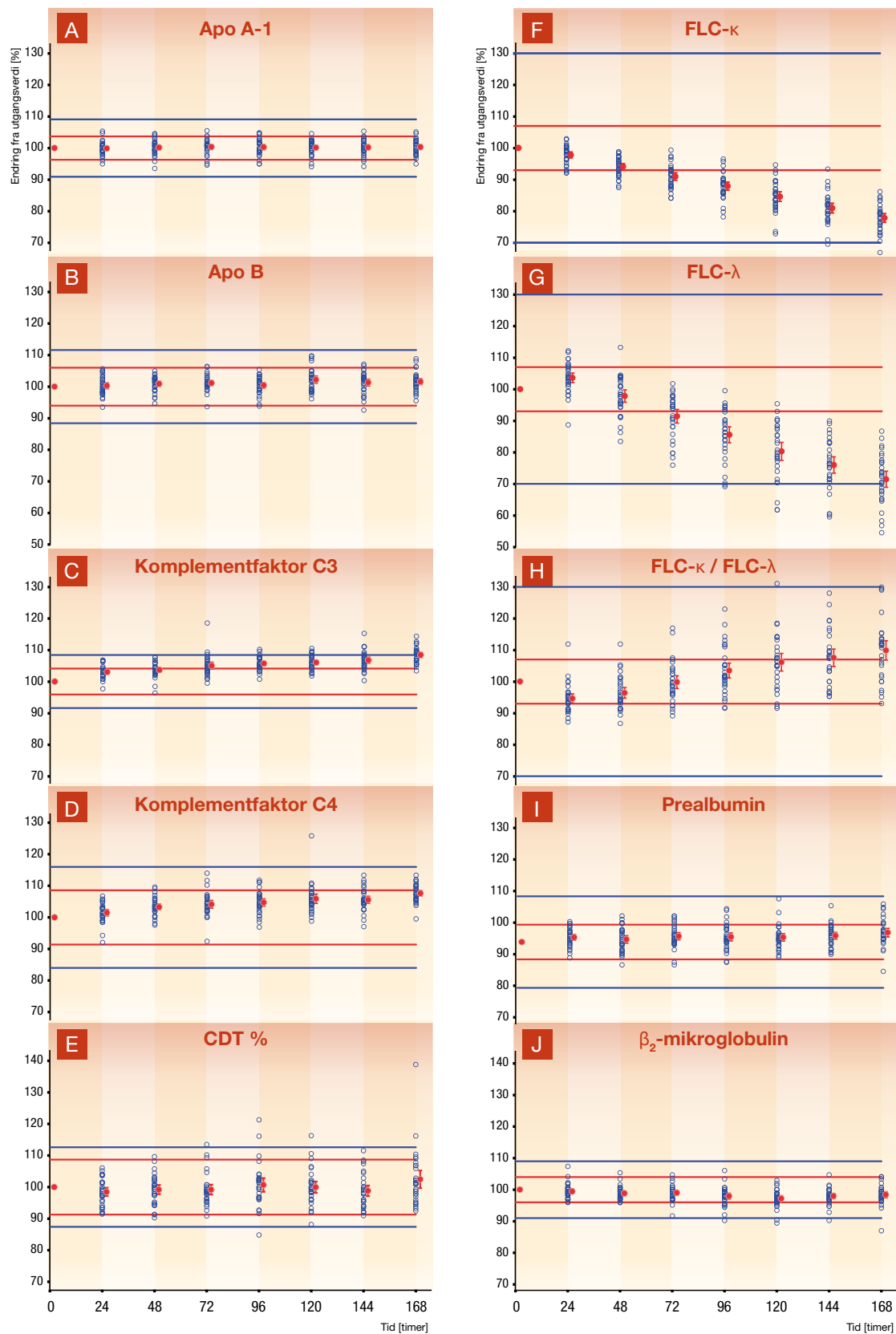
R_0 er konsentrasjonen i nullprøven, og R_t er konsentrasjonen i prøven oppbevart i t timer ved romtemperatur. Konsentrasjonsendring i % for hver enkelt prøve ble grafisk framstilt i et excelark og sammenlignet med tillatt totalfeil (4).

Tillatt totalfeil er det største avviket fra sann verdi en prøve kan ha og likevel beholde sin kliniske nytteverdi (8). Verdier for tillatt totalfeil ble hentet fra Ricos et al. (9) for Apo A-1, Apo B, prealbumin, β_2 -mikroglobulin, C3 og C4. For CDT %, FLC- κ , FLC- λ og FLC- κ / FLC- λ -ratio ble tillatt totalfeil (TF) beregnet etter formel 5 (tabell 3).

CV_t i formel 5 er tillatt impresisjon beregnet som $0,5 \times CV_w$, hvor CV_w er intraindividuell biologisk variasjon. CV_w for CDT % ble hentet fra Helander et al. (10), og CV_w for FLC ble hentet fra Katzman et al. (11). Tillatt totalfeil for analyttene er vist i tabell 2.

For hvert oppbevaringstidspunkt ble gjennomsnittlig % endring av konsentrasjon for de 30 individene og «standard error of mean» (SEM) beregnet, samt 90 % -konfidensintervall (KI) for den gjennomsnittlige % endringen, det vil si gjennomsnitt $\pm (t_{5,n-1} \times SEM)$. $t_{5,n-1}$ er den kritiske verdien i Student's t -distribusjon på 90 % KI (to-sidig) med n inkluderte. For 30 individer er $t_{5,n-1} = 1,7$. Gjennomsnittlig % endring med 90 % KI ble sammenlignet med tillatt % bias (4).

Tillatt % bias er den største systematiske feilen, eller gjennomsnittlige endring, som kan tillates for at analysen likevel skal beholde sin kliniske nytteverdi (8). Tillatt %



FIGUR 1: Prosentvis endring i serumkonsentrasjon for utvalgte proteiner oppbevart i romtemperatur i inntil sju dogn. De blå punktene viser enkeltverdier, mens de røde punktene viser gjennomsnittet for hvert måletidspunkt. De lodrette intervallene i rødt viser 90 % konfidensintervall for gjennomsnittsverdiene ($n=30$). De røde vannrette linjene markerer tillatt bias, mens de blå vannrette linjene markerer tillatt totalfeil.

bias for den enkelte analytt ble beregnet ut fra dennes CV_w og interindividuelle biologiske variasjon (CV_b), begge hentet fra Ricos et al. (9), etter formel 6 (tabell 3) (4, 12).

For FLC- κ og FLC- λ , der CV_w og CV_b ikke var kjent, ble tillatt % bias beregnet ut fra 1/16 av referanseområde for analytten (12). For CDT % ble tillatt % bias beregnet ut fra CV_w og CV_b hentet fra Helander et al. (10). Tillatt % bias for den enkelte analytt er vist i tabell 2.

Vurdering av holdbarhet

Der gjennomsnittlig % endring med 90 % KI ikke overskred \pm tillatt % bias og ingen av prøvene overskred \pm tillatt totalfeil, ble analytten vurdert som holdbar. Der gjennomsnittlig % endring og/eller 90 % KI overskred \pm tillatt % bias, og/eller der en eller flere prøver overskred \pm tillatt totalfeil, ble analytten vurdert som ikke holdbar. Holdbarhetsgrensen for hver analytt ble satt til siste tidspunktet der alle nevnte kriterier ble innfridd, dette i tråd med AMBs prosedyre om holdbarhet av prøvemateriale (6).

Resultater

For å undersøke holdbarheten av utvalgte proteiner i serum, oppbevart i romtemperatur, ble serumprøver fra 30 blodgivere analysert etter oppbevaring i romtemperatur i inntil sju døgn, se figur 1.

Apolipoprotein A-1 og B

Vi fant at proteinene Apo A-1 og Apo B i serum var stabile i minst sju døgn når de ble oppbevart ved romtemperatur (figur 1A og 1B). Serumkonsentrasjonene av Apo A-1 og Apo B hadde et gjennomsnittlig avvik fra utgangsverdiene på under henholdsvis 0,5 % og 2,5 % etter sju døgn. Gjennomsnittlig avvik for Apo A-1 og Apo B lå godt under tillatte bias på henholdsvis 3,7 og 6,0 %, og alle enkeltprøvenes resultater lå innenfor tillatt totalfeil på henholdsvis 9,1 og 11,6 % (tabell 2).

Komplementfaktor C3 og C4

For C3 var situasjonen en annen; resultatene viste at C3 kun var holdbar i ett døgn når serum var oppbevart ved romtemperatur. Allerede etter to døgn ble tillatt bias på 4,1 % overskredet, og konsentrasjonen av C3 økte tilnærmet lineært i måleperioden (figur 1C). Konsentrasjonene av C4 viste samme økende tendens (figur 1D), men siden tillatt bias på 8,6 % og tillatt totalfeil på 16,0 % for C4 er noe større enn for C3, ble C4 vurdert til å være holdbar i inntil sju døgn. Ett enkeltresultat ble målt høyere enn tillatt totalfeil etter fem døgns lagring på C4. Siden måleresultatene på denne prøven ikke overskred grensen for tillatt totalfeil etter seks og sju døgns lagring, ble dette betraktet som et utslag av tilfeldig feil i målemetoden.

CDT %

CDT % beregnet ut fra serumkonsentrasjonen av CDT og transferrin, ble vurdert å være holdbar i serum

oppbevart i romtemperatur i inntil tre døgn. Etter tre døgn overskred ett enkelt prøveresultat så vidt grensen for tillatt totalfeil på 12,6 %. Kravet til tillatt bias på 8,7 % ble ikke overskredet på noen tidspunkt (figur 1E). Først etter fire døgn overskred flere analyseresultater tillatt totalfeil. Holdbarheten til CDT % i serum ble derfor vurdert til tre døgn i romtemperatur.

Frie lette kappa- og lambdakjeder

Serumkonsentrasjonen av FLC- κ avtok jevnt når prøvene ble oppbevart i romtemperatur i ett til sju døgn (figur 1F). Konsentrasjonen av FLC- λ hadde en svak konsentrasjonsøkning etter ett døgn i romtemperatur, men den målte serumkonsentrasjonen sank jevnt fra dag to til dag sju (figur 1G). Verken FLC- κ eller FLC- λ var holdbare i mer enn to døgn basert på biaskravet på 7,0 %. Siden både FLC- κ og FLC- λ viste sammenfallende kinetikk, holdt den beregnede FLC- κ /FLC- λ -ratioen seg innenfor kravene til tillatt bias på 7,0 % og tillatt totalfeil på 30,0 % for prøver oppbevart i inntil fire døgn i romtemperatur (figur 1H).

Prealbumin og β_2 -mikroglobulin

Prealbumin var holdbar i minst sju døgn i romtemperatur. Det vil si at avvikene fra utgangsverdi på de målte serumkonsentrasjonene falt innenfor grensene for tillatt bias på 5,5 %, og alle resultater fra enkeltprøver falt innenfor tillatt totalfeil på 14,5 % selv etter sju døgn (figur 1I). β_2 -mikroglobulin ble vurdert som holdbar i tre døgn, basert på kravet til tillatt totalfeil på 9,0 %. Biaskravet på 4,0 % ble imidlertid innfridd i hele perioden på sju døgn (figur 1J).

Diskusjon

Hensikten med denne studien var å undersøke hvor lenge ni utvalgte proteiner i serum kan oppbevares i romtemperatur uten at det påvirker analyseresultatet. I enkelte tilfeller kan prøvematerialet ha vært oppbevart i flere døgn i romtemperatur før det ankommer laboratoriet. Studien viste at serumprøver var holdbare fra ett til over sju døgn avhengig av hvilket protein som ble analysert. Kunnskap om holdbarhet er viktig for å vite om resultatet på lagrede prøver kan vurderes mot gjeldende referanseområde.

Prøvematerialet

Hvor mange individer som bør inkluderes i en holdbarhetsstudie som denne er en avveining mellom hvor store kostnader en kan tillate seg og hvor sikker en kan være på studiens konklusjon. I protokollen som ble brukt i utførelsen av denne studien, henvises det til erfaringer med at 20 individer vil være et godt utgangspunkt, og at studien kan suppleres med flere individer hvis resultatene fra de 20 tilsier det (6). I denne studien ble det valgt å inkludere 30 individer. Ut fra en modifisert utgave av Brown og Hollanders formel (7), ble det også beregnet hvor mange prøver som måtte inkluderes

deres for hver analytt (se tabell 2). Dette beregnede antallet indikerer kun hvilket antall som er stort nok til å vurdere holdbarhet mot bias-kriteriet (4). Det beregnede minimumsantallet av inkluderte prøver var lavere enn 30 for alle undersøkte parametere med unntak av prealbumin. For prealbumin ble det beregnet at minst 43 individer burde inkluderes i studien. Alle de målte serumkonsentrasjonene av prealbumin lå imidlertid nær utgangsverdien for denne analytten. 30 inkluderte prøver ble derfor vurdert som akseptabelt for alle analytter i studien.

Vurderingskriteriene

I denne undersøkelsen ble resultatenes endring fra nullprøven, vurdert både mot tillatt % bias og mot tillatt totalfeil, i tråd med AMBs krav til holdbarhet (6). Ved fastsettelse av tillatt % bias for hver analytt i holdbarhetsundersøkelser inngår størrelsene på analyttens intraindividuelle og interindividuelle biologiske variasjon hos friske individer i beregningene. Tillatt % bias er det største systematiske avviket som kan tillates for resultatene. Når gjennomsnittsavviket fra utgangsverdi vurderes mot tillatt % bias, vil dette være tilstrekkelig strengt til at referansegrensene fremdeles er gyldige (4).

Tillatt totalfeil er den største feilen et analyseresultat kan ha og samtidig beholde sin kliniske nytteverdi. Når hver enkelt prøve vurderes mot tillatt totalfeil i holdbarhetsstudier, vil dette kunne fange opp alle faktorer i prøven som kan påvirke holdbarheten til analytten. Vårt serummateriale var utelukkende hentet fra egenerklærte friske blodgivere. Studien tok dermed utgangspunkt i serumprøver med normale analyttkonsentrasjoner. Analytter i patologiske konsentrasjonsnivåer i serum kan ved lagring endre seg i en annen hastighet enn den endringshastigheten man finner ved normale konsentrasjoner (2). Når holdbarheten i prøver med normale analyttkonsentrasjoner er kjent, bør senere studier undersøke i hvilken hastighet patologiske analyttkonsentrasjoner endres.

Uoverensstemmelser mellom våre og andres funn

Vi fant at for noen proteiner var det en stor grad av uoverensstemmelse mellom resultater fra vår studie og resultater som er funnet av andre. Dette kan skyldes at andre studier har benyttet andre analysesystemer, at antall prøver inkludert har variert mellom studier, eller at utprøvinger i sju døgn, som er i vår interesse, mangler. Divergerende resultater kan også skyldes at det er benyttet andre kriterier for å vurdere holdbarheten, for eksempel en annen tillatt % bias eller at andre studier ikke har benyttet totalfeil-kriteriet.

De største uoverensstemmelsene mellom våre resultater og anbefaling gitt i Guder et al. Quality of Diagnostic Samples Recommendations (QDS) (3) finner vi for serumproteinene Apo A-1, Apo B og prealbumin. Vår studie viser at disse serumproteinene er

holdbare i minst sju døgn ved romtemperatur. QDS anbefaler derimot at analyse av Apo A-1 og Apo B gjøres innen ett døgn, og at prealbumin analyseres innen tre døgn. Disse uoverensstemmelsene kan forklares ved at det i QDS-referansene er benyttet annen måleteknologi enn i vår studie, eller at studiene QDS baserer seg på ikke har pågått over sju døgn, og at andre vurderingskriterier er benyttet. Som eksempel på dette kan nevnes en studie av Pai et al. hvor holdbarheten av Apo B i serum oppbevart i romtemperatur i 36 timer ble testet (13). Her ble prøvene analysert med en immunturbidimetrisk metode fra Roche, og holdbarhetsgrensen ble satt til ett døgn. Siden det her ble benyttet en immunturbidimetrisk og ikke en immunefelometrisk metode, og siden studien testet holdbarhet kun i 36 timer i romtemperatur, er ikke resultatene fra denne studien gyldige for oss for kvantitering av Apo B.

En stor uoverensstemmelse fant vi også mellom våre resultater og QDS sine anbefalinger med hensyn til holdbarhet av FLC- κ og FLC- λ i serum. Vi fant at serumkonsentrasjonen av både FLC- κ og FLC- λ sank mer enn tillatt % bias når serum ble oppbevart i mer enn to døgn ved romtemperatur. QDS angir derimot en holdbarhet på sju døgn i romtemperatur for disse serumproteinene (3). Vi fant imidlertid at den beregnede FLC- κ /FLC- λ -ratio forble holdbar i fire døgn, noe som kan forklares med at proteinene har noenlunde samme halveringstid. For pasientgrupper der kun konsentrasjonen av FLC- κ eller FLC- λ måles, vil vi ut fra våre resultater og vurderinger anbefale at prøvene analyseres innen to døgn ved oppbevaring i romtemperatur. QDS sine grenser for tillatt % bias er satt til 1/12 av referanseområdet (3), mens vi satte tillatt % bias for FLC- κ og FLC- λ til 1/16 av referanseområdet. Dette medfører at QDS benytter en mindre streng grense for holdbarhet enn vi har gjort i vår studie. Dette kan forklare noe av uoverensstemmelsen mellom våre konklusjoner og QDS sine anbefalinger.

Holdbarhet kan være avhengig av antistoffet som benyttes. QDS sine anbefalinger er for de fleste analytter basert på studier utført på andre analysesystemer og med andre antistoffer enn de vår studie benyttet (3). Holdbarhet av serumproteiner kan avhenge av metoden som benyttes. Ved oppbevaring i romtemperatur vil endogen proteaseaktivitet forårsake nedbryting av proteiner i serum, og epitoper som antistoffene er rettet mot vil kunne degraderes. En slik degradering vil medføre at holdbarheten til den enkelte analytt bestemmes av holdbarheten til spesifikke epitoper som antistoffet er rettet mot. Kunnskap om nedbrytingskinetikken for ulike antigener, og dermed stabiliteten i analyseresultatet ved bruk av ulike antistoff, bør være av betydning ved valg av analysemetode.

Vi fant at serumkonsentrasjon av komplementfaktorene C3 og C4 viste en stigende tendens ved oppbe-

varing i romtemperatur. Økte konsentrasjoner av C3 og C4 ble målt ved alle lagringsintervallene. C3c-fragmentet spaltes fra C3-molekylet in vitro, en prosess som aktiveres allerede ved venepunksjonen (5). Siden antistoffet som benyttes ved nefelometrisk bestemmelse av C3 er rettet mot C3c-fragmentet, vil dette registreres som en økning i C3-konsentrasjon ved lagring av prøven over tid (14). Siemens Healthcare Diagnostics oppgir en økning i C3-konsentrasjon på inntil 17 % etter lagring av serum ved 4 °C i åtte døgn, eller i -20 °C i tre måneder (14). I vår studie fant vi at konsentrasjonsøkningen i prosent var omtrent lik for C3 og C4. Men siden tillatt % bias og tillatt % totalfeil for C4 er høyere enn for C3, henholdsvis 8,6 % mot 4,1 % og 16,0 % mot 8,4 % (se tabell 2), resulterte dette i at holdbarheten til C4 ble vurdert til sju døgn, mens den for C3 ble vurdert til ett døgn (figur 1C og 1D).

Komplementfaktor C3 og C4 analyseres vanligvis samtidig fra samme prøveglass, og vurderes sammen som markører ved inflammasjons- og infeksjonstilstander og ved mistanke om immunsykdommer (15, 16). Det enkelte laboratorium bør vurdere om det er hensiktsmessig å tillate en noe høyere usikkerhet for C3, for eksempel tillatt bias på 10 %, opp mot ulemper det vil medføre å avvise prøver som er eldre enn ett døgn.

I denne studien har vi undersøkt hvilken virkning lagringstemperatur og -tid har på utvalgte analytter. Andre faktorer som kan tenkes å endre holdbarheten for enkelte analytter, for eksempel mekanisk påvirkning under transport og lyspåvirkning (2), er ikke undersøkt. Egne studier er nødvendig for å undersøke dette.

Konklusjon

Denne studien konkluderer med at ved bruk av Siemens Healthcare Diagnostics analysesystem, vil konsentrasjonen av proteinene Apo A-1, Apo B og prealbumin i serum være stabile i minst sju døgn ved oppbevaring i romtemperatur. Konsentrasjonen av β_2 -mikroglobulin og beregnet CDT % ble vurdert å være holdbare i tre døgn. Konsentrasjonen av komplementfaktor C3 i serum ble funnet å være stabil i ett døgn, mens komplementfaktor C4 var stabil i sju døgn. Frie lette kappa- og lambda-kjeder var holdbare i to døgn, mens FLC- κ /FLC- λ -ratioen kan beregnes om serumprøven har vært oppbevart i inntil fire døgn ved romtemperatur. ■

Studien er finansiert av, og utført ved, Avdeling for medisinsk biokjemi (AMB) ved St. Olavs Hospital og Høgskolen i Sør-Trøndelag (HIST).

Vi vil takke AMB ved overlege Arne Åsberg og kvalitetskoordinator Kristine Solem, og Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved overlege Mona H Fenstad, for gode faglige innspill, samt bioingeniør Gry Sundin Hamstad og bioingeniør Ingvill Revheim for preparering av prøvematerialet. Vi vil også takke HIST ved programleder Randi Utne Holt for gode bidrag i skriveprosessen.

Referanser

1. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clinical chemistry*, 1997, 43(8 Pt 1): 1348-51.
2. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. *Samples: From the Patient to the Laboratory*. 2. ed. Darmstadt, Germany: Git Verlag, 2001.
3. Guder W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y et al. *Quality of Diagnostic Samples. Recommendations of the Working Group on Preanalytical Quality of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 3. ed. Darmstadt, Germany: GIT Verlag, 2010.
4. Åsberg A, Solem KB, Mikkelsen G. Prøvematerialets holdbarhet - kriterier og vurdering. *Klinisk Biokemi i Norden*, 2011, 4: 34-8.
5. Dati F, Metzmann E. *Proteins. Laboratory testing and clinical use*. Holzheim, Germany: DiaSys Diagnostic Systems GmbH, 2005.
6. St.Olavs Hospital. Holdbarhet av prøvemateriale. AMB, Versjon 1.5 EQS, 2012.
7. Brown BW, Hollander M. *Statistics. A Biomedical Introduction*. New York: John Wiley & sons, 1977.
8. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz: Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6 ed. St. Louis, Missouri: Saunders, 2008.
9. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. 7th update (2012). *Scand J Clin Lab Invest*, 1999, 59(7): 491-500.
10. Helander A, Vabo E, Levin K, Borg S. Intra- and interindividual variability of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume in teetotalers. *Clinical chemistry*, 1998, 44(10): 2120-5.
11. Katzmann JA, Snyder MR, Rajkumar SV, Kyle RA et al. Long-term biological variation of serum protein electrophoresis M-spike, urine M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implications for monitoring monoclonal gammopathies. *Clinical chemistry*, 2011, 57(12): 1687-92.
12. Bolann BJ. Riktig svar på biokjemiske analyser. Bergen: Fagbokforlaget, 2009.
13. Pai JK, Curhan GC, Cannuscio CC, Rifai N et al. Stability of novel plasma markers associated with cardiovascular disease: processing within 36 hours of specimen collection. *Clinical chemistry*, 2002, 48(10): 1781-4.
14. Siemens Diagnostics Healthcare. *N Antiserum to Human Complement Factors (C3c, C4) Reagensvedlegg*, 2010.
15. Urdal P, Brun A, Åsberg A. *Brukerhåndbok i Medisinsk biokjemi*. 4. utgave. Haugesund: Akademiske Forlag AS, 2009.
16. Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utgave. Bergen: Fagbokforlaget, 2006.
17. Siemens Diagnostics Healthcare. *N Latex FLC Kappa and N Latex FLC Lambda (NFLC Kappa and NFLC Lambda) Reagensvedlegg*, 2011.