

Holdbarhet og oppbevaring av blodprøver til PT-INR

Av SANDRA HUNJET¹, LINDA PODSADA¹, KARI BRATBERG², LIV THOMMESEN³
liv.thommesen@hist.no

Artikkelen er basert på bacheloroppgave utført våren 2011

WARFARIN er det medikamentet hvor det meldes om flest alvorlige og fatale bivirkninger. Nøyaktige og pålitelige prøvesvar er derfor svært viktig. Denne artikkelen tar opp hvorvidt preanalytiske faktorer som temperatur og tid påvirker prøvesvarene.

Warfarin er et legemiddel (kumarinderivat) med antikoagulerende effekt, og et av de viktigste orale antikoagulerende legemidlene vi har. I Norge markedsføres warfarin som Marevan (Nycomed Pharma). Warfarin brukes i behandling og forebygging av tromber og embolier i vener, for eksempel ved dyp venetrombose, lungeemboli, akutt hjerteinfarkt, hjerneslag og ved ortopedisk eller generell kirurgi (1-3).

Warfarin er en vitamin K -antagonist. Den antikoagulerende effekten skyldes hemming av produksjonen av vitamin-K-avhengige koagulasjonsfaktorer (Faktor II, VII, IX og X) i leveren. Den antikoagulerende effekten sees først etter flere dager fordi koagulasjonsfaktorene har ulike halveringstid.

I 2010 var antall warfarinbrukere i

- 1) Bachelorstudenter 2008 - 2011 ved Bioingeniørutdanningen, Avdeling for Teknologi, Høgskolen i Sør-Trøndelag.
- 2) Fagbioingeniør, Seksjon for generell biokjemi, St. Olavs hospital
- 3) Dr Philos, Professor, Bioingeniørutdanningen, Høgskolen i Sør-Trøndelag

Norge i underkant av 90 000. Warfarin er det enkeltmedikament som i mange år har vært forbundet med flest meldinger om alvorlige bivirkninger.

Blødning er den hyppigste og alvorligste bivirkningen. Risikoen for blødning øker gradvis med stigende INR-verdi, men med god kontroll av INR kan blødninger forhindres.

Warfarin er et medikament med en smal terapeutisk indeks. Det er derfor viktig at PT-INR analysesvar er pålitelige.

Hensikt med studien

Hensikten med studien var å undersøke hvordan preanalytiske forhold som tid og temperatur påvirker PT-INR-verdiene. Dagens prosedyre ved St. Olavs hospital innebærer oppbevaring i romtemperatur og analyse innen 48 timer. Prosedyren baserer seg på pakningsvedlegg fra STAGO SPA+ reagens som sier at prøver ikke skal oppbevares kjølig, samt en intern holdbarhetsstudie fra 2002 utført på prøver i romtemperatur, som konkluderer med at prøvematerialet er holdbart i 48 timer. Laboratoriet mottar prøver fra primærhelsetjenesten. Om vinteren hender det at disse prøvene er nedkjølt. Prøver som er oppbevart kjølig eller sentrifugert kjølig blir analysert, men svaret utleveres da med en merknad om at ny prøve anbefales.

Vi ønsket å undersøke hvilken innvirkning nedkjølingen har på analyseresultatene.

Materiale og metode

Analyseprinsipp

PT-INR bestemmes ved hjelp av et sammensatt tromboplastinpreparat. Reagenset inneholder både tromboplastin fra kaninhjerne og adsorbent bovint plasma som er kilde for koagulasjonsfaktor V og fibrinogen. Reagenset er ikke sensitivt for heparin i terapeutiske doser. PT-INR måler aktiviteten av koagulasjonsfaktorene II, VII, og X.

Analyseprinsippet er klotbasert. Reaksjonen starter ved at plasma for-

tyntet med buffer og tromboplastinreagens blandes i en kyvette. Kyvetten inneholder en magnetkule som beveger seg frem og tilbake ved hjelp av et elektromagnetisk felt. Strømstyrken måles, og i det koagelet er dannet, stopper kulen, strømmen brytes, og koagulasjonstiden måles elektronisk. Koagulasjonstiden vil være en direkte funksjon av INR-verdien.

Beregning av PT-INR

PT-INR bestemmes ved hjelp av normalverdi og ISI-verdi. INR er en ratio mellom pasientens protrombintid og protrombintid i normalplasma. Ratioen opphøyes i en eksponent, ISI (Internasjonal sensitivity index), som angir følsomheten av tromboplastinet. Tromboplastinet fra ulike produsenter kan ha ulike ISI-verdi. Hver batch av tromboplastinreagens har en ISI-verdi som er relatert til et internasjonalt referanseplasma. Definisjonsmessig er ISI = 1,0 for WHO's tromboplastinplasmastandard. Den aktuelle ISI-verdien kan også variere med analysemetode, instrument og prøvemateriale og må derfor bestemmes på nytt for hver batch av reagens.

I analysen ble det benyttet topunkts kalibrering med Equalis kalibratorer:

- INR-kalibrator lav, referanseverdi 1,08
- INR-kalibrator høy, referanseverdi 3,28
- Kontroll for protrombinkompleksaktivitet, referanseverdi 2,40.

Fremgangsmåte

Det ble benyttet blodprøver fra 24 pasienter med marevanbehandling. Pasienter som deltok i studien signerte en samtykkeerklæring.

Det ble tatt fire natriumcitratglass av hver pasient, alle ble tatt samme dag. Prøvene ble utsatt for ulike preanalytiske forhold:

A. Oppbevart i romtemperatur, sentrifugert, analysert ved null timer og etter to, fire, seks, 24, 48 og 72 timer. Prøvene ble hele tiden oppbevart på blodlegemer. Prøve A analysert ved null timer ble brukt som referanseprøve og

alle målinger ble sammenlignet med denne.

B. Oppbevart i kjøleskap, sentrifugert i kjølesentrifuge, analysert ved null timer og etter to, fire, seks, 24, 48 og 72 timer. Prøvene ble hele tiden oppbevart på blodlegemer.

C. Sendt i posten usentrifugert sammen med kjøleelement, sentrifugert og analysert ved mottak (24 timer).

D. Sendt i posten sentrifugert og avpipetert sammen med kjøleelement, analysert ved mottak (24 timer).

Samtlige prøver ble sentrifugert ved 2200G i 10 minutter.

Prøvene ble analysert i batcher på STAGO STA-R Evolution sammen med fire Scandipath-kontroller i hver batch. For å vite om endringer i verdiene skyldtes analysetekniske forhold eller preanalytiske forhold, ble resultatene justert i forhold til gjennomsnittet av de fire ulike målinger av Scandipath i hver batch.

Justeringen ble gjort slik:
 $\text{Måleresultat}_{\text{justert}} = \text{måleresultat} * (\text{kontrollverdi}_{\text{initial batch}} / \text{kontrollverdi}_{\text{aktuell batch}})$
 Kontrollverdi initial batch: Mean for Scandipath analysert sammen med referanseprøven.

Kontrollverdi aktuell batch: Mean for Scandipath analysert sammen med den aktuelle prøven måleresultatet gjelder for.

Kriterier

Holdbarhet ble vurdert etter de prinsip-

per som er foreslått i Åsberg og Solems artikkel i Klinisk Biokemi i Norden (4): Holdbarhet krever at 90%-konfidensintervallet rundt gjennomsnittet i sin helhet ligger innenfor gjennomsnittlig utgangsverdi \pm tillatt bias og at alle enkeltverdier ligger innenfor utgangsverdi \pm tillatt totalfeil. I denne undersøkelsen var tillatt bias satt til 10 % og tillatt totalfeil var 15 % av standardisert metode. Resultatene fra måleresultat_{justert} ble brukt for å fastsette prosentvis endring, middelverdi og standard error of mean (SEM).

Resultater

Hensikten med studien var å undersøke hvordan preanalytiske forhold som tid og temperatur påvirker PT-INR verdiene. Vi har sett på hvordan analysesvarene endret seg over tid. Det ble videre gjort en sammenligning mellom prøver oppbevart i romtemperatur og prøver oppbevart i kjøleskap, og det ble undersøkt om det var noen forskjell på om prøver tilsendt i posten ble avpipetert eller ikke.

Prøver oppbevart i romtemperatur

Figur 1A viser at samtlige verdier ligger innenfor tillatt bias, analysert ved angitt tidsintervall i opp til 72 timer. Det er en tendens til at verdiene synker de første 6 timene, i gjennomsnitt med ca 2 %. Deretter stabiliserer de seg for så å stige cirka

2-3 % i tidsrommet 48 til 72 timer. Den største forskjellen sees ved sene tidspunkt. Spredningen på enkelresultatene øker også som følge av lengre oppbevaringstid.

Prøver oppbevart ved 2-8 grader

Figur 1B viser at også samtlige verdier for prøver oppbevart kjølig ligger innenfor tillatt bias i samme periode (opp til 72 timer). Verdiene holder seg stabile de første 4 timene, etter 6 timer observeres en svak stigning og etter 72 timer ser vi en stigning på cirka 5 %. Også her ser vi at spredningen på enkeltresultatene stiger med økt oppbevaringstid.

Usentrifugerte prøver sendt som kjølig forsendelse

Figur 1C viser at prøver sendt usentrifugert og kjølig i posten oppfyller kriterier satt for tillatt avvik, med samme tendens til spredning.

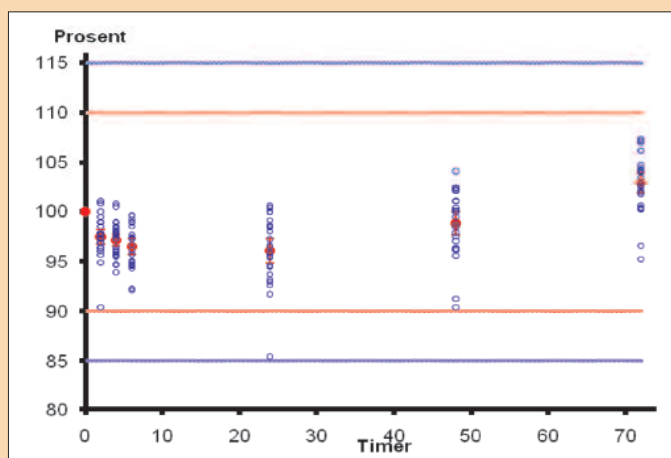
Plasma sendt som kjølig forsendelse

Figur 1D viser at prøver sendt som plasma og kjølig i posten oppfyller kriterier for tillatt avvik. Muligens sees en mindre tendens til spredning av verdiene sammenliknet med 1C.

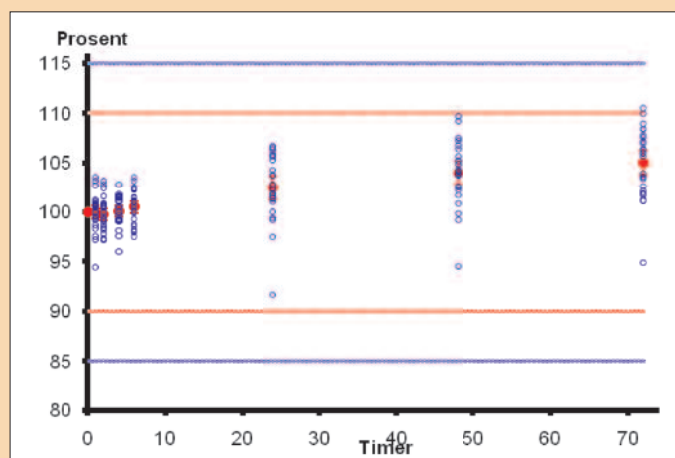
Diskusjon og konklusjon

Blodprøvene i denne studien ble tatt av pasienter ved sykehusets poliklinikker og pasienter innlagt ved Klinik for

Figur 1 (a,b,c,d). Individuelle målinger (blå sirkler), gjennomsnitt for hvert måletidspunkt (røde sirkler), 90 % konfidensintervall (røde lodrette linjer), tillatt bias (røde vannrette linjer) og tillatt totalfeil (blå vannrette linjer).



FIGUR 1a. Prosentvis endring av PT-INR-verdier for prøver oppbevart i romtemperatur inntil 72 timer.



FIGUR 1b. Prosentvis endring av PT-INR-verdier for prøver oppbevart og sentrifugert ved 40 C.

hjertermedisin ved St. Olavs hospital. Resultatene fra den standardiserte metoden som i dag benyttes ved Avdeling for medisinsk biokjemi ved St. Olavs hospital ble brukt som referanse, det vil si at prøvesvar målt påfølgende dager ble sammenlignet med disse verdiene. For at en prøves holdbarhet skal kunne godkjennes må kravene for tillatt bias og tillatt totalfeil være innfridd. Holdbarhet krever at 90 % konfidensintervall til gjennomsnittet i sin helhet ligger innenfor gjennomsnittlig utgangsverdi \pm tillatt bias, og at alle enkeltverdier ligger innenfor utgangsverdi \pm tillatt totalfeil (4).

Våre funn viser at prøvemateriale som er oppbevart ved 2-8 grader holder seg mer stabilt enn prøvemateriale oppbevart i romtemperatur. Denne forskjellen er tydeligst de første 6 timer etter prøvetakingen. Spredningen av enkeltresultater er omtrent lik for de to oppbevaringskriteriene. Etter 24 timer ser vi at verdiene stiger for begge oppbevaringskriteriene, men verdiene for prøver oppbevart ved 2-8 grader har en større stigning i forhold til referanseverdien. Grunnen til denne stigningen er vi usikker på, da vi forventet at resultatene skulle bli lavere på grunn av kuldeaktivering av koagulasjonsfaktor VII.

Våre funn når det gjelder innsendte prøver viser at det er en forskjell på om prøver sendes usentrifugert eller som plasma. Verdien for usentrifugerte

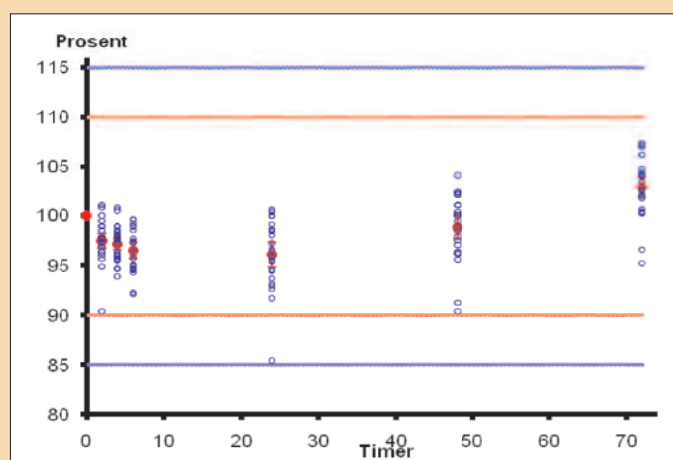
prøver synker, mens verdien for plasmaprøver stiger. Det er mindre spredning av enkeltresultater for plasmaprøver; plasmaprøvene holder seg mer stabile.

Denne studien har sine begrensninger. Antall pasienter er begrenset (N=24), og verdiene på prøvene lå mellom 1,3 og 3,0 med ett unntak; en prøve var på 10,4. Vi ser også at denne prøven varierer mer enn de andre prøvene. Det kan tenkes at høyere PT-INR-verdier lar seg påvirke mer av temperatur/tid enn PT-INR-verdier i det lave området. En mer omfattende studie med flere prøver i forskjellige nivåer vil derfor være nødvendig å gjennomføre før man kan konkludere. I en tilsvarende studie fra van Geest-Daalderop et al. (5) ble det undersøkt hvordan oppbevaring i romtemperatur påvirket PT-INR-resultater i tidsrommet 0-24 timer etter blodprøvetaking. I samsvar med våre resultater ble det heller ikke her påvist noen gjennomsnittlig endring som følge av oppbevaring i romtemperatur (5). Dette utelukker imidlertid ikke at oppbevaring over 24 timer kan føre til endrede verdier for enkeltpasienter.

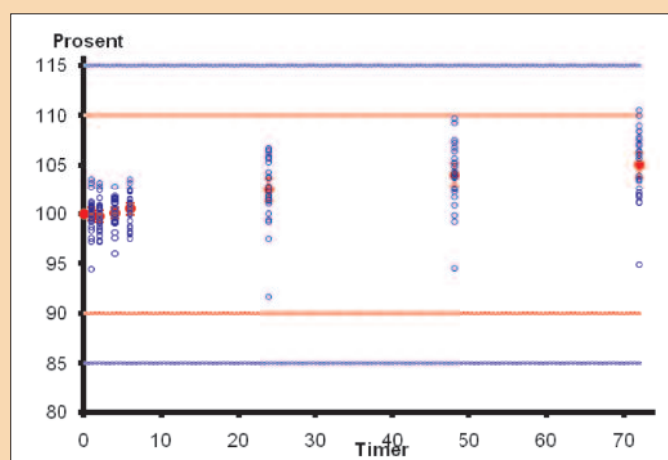
Resultatene fra studien er interessante, men det er et begrenset antall prøver med i den. Avdelingen har foreløpig ikke endret sine prosedyrer, og det blir vurdert om oppfølgingsstudier er nødvendig før prosedyrene eventuelt kan endres. ■

Referanser

1. Alhusban A, Fagan SC. Secondary prevention of stroke in the elderly: a review of the evidence. *Am J Geriatr Pharmacother.* 2011 Jun;9(3):143-52.
2. Prom R, Spinler SA. The role of apixaban for venous and arterial thromboembolic disease. *Ann Pharmacother.* 2011 Oct;45(10):1262-83.
3. Thakur NA, Czerwejn JK, Butera JN, Palumbo MA. Perioperative management of chronic anticoagulation in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg.* 2010 Dec;18(12):729-38.
4. Åsberg A, Solem KB, Mikkelsen G. Prøvematerialets holdbarhet – kriterier og vurderinger. *Klinisk Biokemi i Norden.* 2011; 23 (4): 34-8 (i trykking).
5. Van Geest-Daalderop JHH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJM., Hoekstra MMCL, van den Besselaar AMHP. Preanalytical Variables and Off-Site Blood Collection: Influences on the Results of the Prothrombin Time/International Normalized Ratio Test and Implications for Monitoring of Oral Anticoagulant Therapy, *Clinical Chemistry,* 2005; 51:3, 561-568.



FIGUR 1c. Prosentvis endring av PT-INR-verdier for prøver tilsendt usentrifugert og kjølig.



FIGUR 1d. Prosentvis endring av PT-INR-verdier for prøver tilsendt kjølig som plasma.