

Fyllingsgradens innvirkning på

HOVEDBUDSKAP

- Vi har undersøkt hvordan fyllingsgrad på 12,5%, 25% og 50% blod i K₂EDTA-rør påvirker konsentrasjonen av hematologiske parametere.
- Blod fra 30 friske deltakere og 15 pasienter ble undersøkt.
- Vi fant at middel erytrocyttvolum (MCV) er mest sensitiv for lave fyllingsgrader og at leukocytter og trombocytter er minst sensitive.

SAMMENDRAG

Å undersøke og evaluere prosedyrer for blodprøvetaking og prøvebehandling er viktig for å kvalitetssikre trinn i den preanalytiske fasen og sikre at pasientresultater som gis ut i størst mulig grad er korrekte.

I klinisk praksis aksepteres analysing av blod fra underfylte EDTA-rør. Dette prosjektet hadde som mål å undersøke hvordan hematologiske parametere ble påvirket av ulike fyllingsgrader av blod i K₂EDTA-rør. Blodprøvetaking ble gjennomført på friske deltakere (n=30) og pasienter (n=15). Fra hver deltaker ble det tappet fire 3,0 mL Vacuette® K₂EDTA-rør. Ett av rørene ble fylt optimalt med 3,0 mL blod mens de tre andre rørene ble fylt med henholdsvis 1,5 mL (fyllingsgrad 50 %), 0,750 mL (fyllingsgrad 25 %) og 0,375 mL (fyllingsgrad 12,5 %). Prøvene ble analysert innen samme serie og direkte fra primærør på CELL-DYN Sapphire.

Lineære mixed effects-modeller ble brukt til å estimere systematiske avvik mellom parameterverdier i underfylte rør og verdier i optimalt fylte rør. Konfidensintervaller for de systematiske avvikene ble sammenlignet mot analytiske kvalitetsspesifikasjoner basert på biologisk variasjon.

Resultatene tydet på at hematologiske parametere påvirkes ulikt ved samme fyllingsgrad. Middell erytrocyttvolum (MCV) er mest sensitiv og krever et blodvolum på 1,5 mL (50 % fyllingsgrad). For hemoglobin og erytrocytter kan blodvolum på 0,750 mL (25 % fyllingsgrad) aksepteres. Leukocytter og trombocytter er minst sensitive og krever kun 0,375 mL blod (12,5 % fyllingsgrad). Resultatene indikerer at samme fyllingsgrader kan aksepteres for friske personer og pasienter.

Nøkkelord: K₂EDTA, fyllingsgrad, preanalytisk usikkerhet, CELL-DYN Sapphire

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

Ingvild Fleten Sortland¹

Bioingeniør, master i helsevitenskap

Marit Sverresdotter Sylte¹

Overbioingeniør/ph.d.

Astrid-Mette Husøy^{1,2}

Spesialbioingeniør/ph.d.

1. Laboratorium for klinisk biokjemi (LKB), Haukeland universitetssjukehus

2. Institutt for bio- og kjemiingeniørfag, Høgskulen på Vestlandet

E-post: ingvild.fleten.sortland@helse-bergen.no

Introduksjon

Blodprøvetakingsrør til diagnostisk bruk har en anbefalt volummarkering og undertrykket i rørene gjør at de fylles med et forhåndsbestemt volum. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) anbefaler at produksjonen av prøverør gjennomføres slik at undertrykket i rørene sikrer fyllingsgrad på ± 10 % av oppgitt volum (1). De fleste rørtyper inneholder tilsetningsstoffer som skal stabilisere blodceller og biomarkører frem til analysing, eller separere serum/plasma. Fyllingsgrad i prøvetakingsrør er ansett som en viktig preanalytisk variabel. Det anbefales å følge retningslinjer om tilstrekkelig fylling av rør for å oppnå optimal konsentrasjon mellom tilsetningsstoff og blod og best mulig kvalitet på prøvematerialet (1). Tilstrekkelig fylling sikrer også at det er nok blod til å gjennomføre rekvirerte analyser. I utfordrende prøvetakings-situasjoner hvor venen kollapser, kan det imidlertid være vanskelig å få tappet tilstrekkelig mengde blod. Venen kollapser når det er for lite trykk i venen, for eksempel når staseslangen løsnes eller ved bruk av store vakuurrør eller for stor kanyle. Tynne, skjøre vener er spesielt utsatt (2). En norsk observasjonsstudie viste nylig

at 9 % av prøvetakere ikke fylte prøverør tilstrekkelig (3). Det tilsier at tapping av rør med feil fyllingsgrad (i hovedsak underfylte rør), forekommer relativt ofte. Cao et al. (4) fant at underfylling er årsak til 15,1 % av alle prøverør som forkastes.

Til hematologiske analyser i fullblod anbefales vakuurrør med tilsetningsstoffet dikaliumetylendiamin tetraacetat (K₂EDTA) med anbefalt konsentrasjon på 1,5-2,2 mg/mL (5). Ved underfylling av rørene, kan K₂EDTA-konsentrasjonen bli høyere enn det som er anbefalt. Tradisjonelt aksepteres analysing av hematologiske parametere selv om K₂EDTA-røret ikke er fylt optimalt. Dersom laboratoriet kan akseptere noe underfylte K₂EDTA-rør, unngår prøvetaker ny venepunksjon, noe som vil være tidsbesparende i den daglige rutinen. Ny prøvetaking kan kreve ekstra ressurser, gi forlenget svarrapporteringstid, samt resultere i at pasienten får økt ubehag.

Hensikten med dette prosjektet var å undersøke hvordan lave fyllingsgrader i K₂EDTA-rør påvirker de hematologiske parameterne hemoglobin (Hb), erytrocytt partikkelkonsentrasjon (EPK), middel erytrocyttvolum (mean corpuscular volume; MCV), trombocyt partikkelkonsentrasjon (TPK) og leukocyt partikkelkonsentrasjon (LPK), både i blod tappet fra friske deltakere og pasienter. Prosjektet ble gjennomført som et kvalitetssikringsprosjekt med et mål om at resultatene skulle ha overførbarhet til klinisk praksis.

Materiale og metode

Regional etisk komité (REK) definerte prosjektet som et kvalitetssikringsprosjekt og personvernombudet i Helse Bergen godkjente prosjektet.

Veiling av tomme og optimalt fylte K₂EDTA-rør
Som forberedelse til prosjektet veide vi 40 tomme 3,0 mL K₂EDTA-rør (Vacuette®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Østerrike) og 40 K₂EDTA-rør fylt optimalt med tilnærmet 3,0 mL blod. Gjennomsnitt-

Artikkelen er basert på et masterprosjekt fra 2017.

hematologiske parametre

TABELL 1: Gjennomsnittlig vekt av optimalt fylt K₂EDTA-rør med 3,0 mL blod og tomt K₂EDTA-rør, i tillegg beregnet vekt av 3,0 mL og 1,0 mL K₂EDTA-blod.

Veiinger	Vekt (gram)
K ₂ EDTA-rør fylt optimalt med 3,0 mL blod ^a	9,126
Tomt K ₂ EDTA-rør ^a	6,007
3,0 mL blod ^b	3,119
1,0 mL blod ^b	1,040

a. Basert på gjennomsnittsveiing (n=40)

b. Beregnet gjennomsnittsvekt for tilnærmede volumer K₂EDTA-blod.

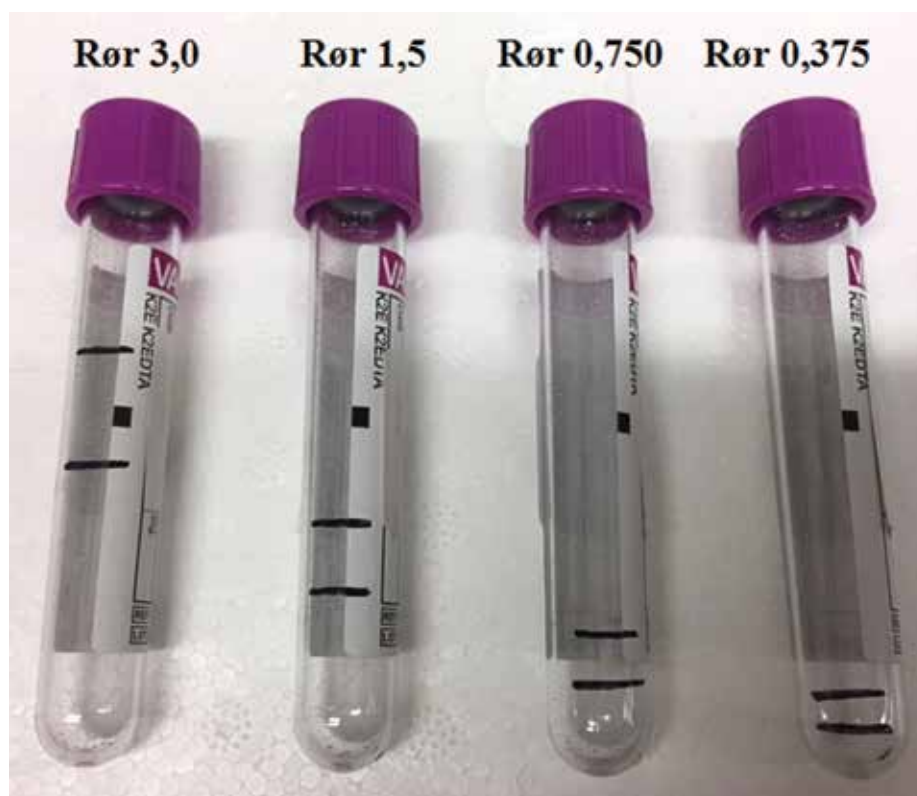
TABELL 2: Prosjektrør med ønsket blodvolum, fyllingsgrader og fyllingsintervaller.

Blodvolum (mL)	Fyllingsgrad (%)	Fyllingsintervall (mL)
3,0	100	2,5-3,5
1,5	50	1,25-2,0
0,750	25	0,6-1,0
0,375	12,5	0,28-0,5

lig vekt av tomt og fylt rør ble brukt til å beregne vekten av 1,0 mL blod (tabell 1). Denne vekten ble brukt til å beregne volum blod i tappede prosjektrør fra deltakere (formel 1).

Bruk av fyllingsintervaller i K₂EDTA-rør

Det ble valgt fire blodvolumer i K₂EDTA-rør som skulle tappes fra hver deltaker; 3,0 mL, 1,5 mL, 0,750 mL og 0,375 mL. Hvert blodvolum ble gitt et fyllingsintervall (tabell 2). Å tappe nøyaktige blodvolumer er vanskelig i praksis og intervallene skulle sikre ønskede volumer i størst mulig grad. Øvre og nedre grense i intervallene ble merket med tusj på rørene før tapping (figur 1). Intervallene ble valgt ut i fra hvilke øvre og nedre intervallgrenser som ga gjennomsnittlig ønsket fyllings-



FIGUR 1: K₂EDTA-rør med fyllingsintervaller markert; Rør 3,0 mL, Rør 1,5 mL, Rør 0,750 mL og Rør 0,375 mL.

grad, samt hva som var mulig praktisk i forbindelse med selve tappingen. Intervallene overlappet ikke med hverandre. For hvert av de fire fyllingsintervallene ble det beregnet tilhørende vektintervaller. Prosjektrør ble veid umiddelbart etter tapping som kontroll på at volum blod lå innenfor det aktuelle fyllingsintervallet.

Prøveinnsamling, prøvebehandling og analysering

Utvalget bestod av to grupper, en med friske deltakere (n=30) og en med pasienter (n=15), alle over 18 år. Prøvemateriale ble tappet ved venøs blodprøvetaking ved bruk av Vacutainer® veneprovetakingssett, vinget kanyle (21G×¾"×7", Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Fra hver deltaker ble det tappet blod i fire 3,0 mL Vacuette® K₂EDTA-rør

(Greiner Bio-One, Kremsmünster, Østerrike). Ett rør ble fylt optimalt med 3,0 mL blod i henhold til rørprodusentens anbefaling, mens tre rør ble underfylte med blodvolumer på 1,5 mL (50 % fyllingsgrad), 0,750 mL (25 % fyllingsgrad) og 0,375 (12,5 % fyllingsgrad) (tabell 2). All prøvetaking ble gjennomført av samme bioingeniør ved standardisert prøvetaking. Hver deltaker ble kun tappet én gang. De fire K₂EDTA-rørene med ulik fyllingsgrad ble alle tappet i randomisert rekkefølge fra samme venepunksjon. Blodprøvene ble oppbevart mellom 26 og 141 minutter ved romtemperatur før de ble analysert i duplikater på CELL-DYN Sapphire (Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA). Prøver fra samme deltaker ble analysert innen samme serie for å redusere grad av analytisk variasjon. ➤

Statistisk databehandling

Påvirkningen av fyllingsgrad ble undersøkt i datamateriale fra hele utvalget samlet, samt for friske og pasienter separat. Lineære mixed effects-modeller (LME-modeller) i statistikkprogrammet R (ved pakken nlme) ble benyttet til statistisk databehandling. LME-modeller er egnet til modellering av klyngedata og i dette prosjektet er det en tretrinns hierarkisk klyngestruktur ved at blod fra hver pasient ble tappet på fire rør og hvert rør ble analysert i duplikat. LME-modellen inkluderer både tilfeldige og faste effekter. Resultater for de tilfeldige effektene inkluderte, i henhold til den hierarkiske klyngestrukturen, kilder til tilfeldig variasjon på analyseresultatene som mellomperson-variasjon, mellom-rør-variasjon (innen én person) og analytisk variasjon.

De faste effektene ble beregnet ut i fra sammenhenger mellom forklaringsvariabler og avhengig variabel. Forklaringsvariabler var gruppe (alle/frisk/pasient) og fyllingsgrad (Rør 3,0 mL, Rør 1,5 mL, Rør 0,750 mL og Rør 0,375 mL), mens avhengig variabel var parameterverdi. Modellkjøring ble gjennomført med innlagt justering for volumavvik (grunnet bruk av fyllingsintervaller og ikke et nøyaktig tappevolum) og kjønn (for å redusere

effekten av kjønnsmessige forskjeller i parameterverdier). Det ble lagt inn samspill mellom fyllingsgrad og volumavvik fordi volumavvikene kan ha ulik betydning for rør med ulik fyllingsgrad, forskjellene mellom fyllingsgradene er rapportert ved volumavvik 0.

Dette prosjektet fokuserte mest på resultater for faste effekter, som ble vurdert ut fra de systematiske avvikene i parameterverdi ved lave fyllingsgrader, sammenlignet med optimalt fylte rør (3,0 mL). Statistisk signifikansnivå ble satt til 5 %. Konfidensintervallene (KI) til de systematiske avvikene ble sammenlignet med analytiske kvalitetsspesifikasjoner for systematisk avvik for hver enkelt parameter.

Resultater

Systematiske avvik i parameterkonsentrasjoner mellom underfylte rør og optimalt fylte rør ble vurdert mot kvalitetsspesifikasjoner for akseptabel analytisk kvalitet, basert på intra- og interindividuell biologisk variasjon (6). Kvalitetsspesifikasjonene ble omregnet fra prosent til parameterverdi (formel 2) ved bruk av estimerte gjennomsnittsverdier for Hb, EPK, MCV, TPK og LPK i Rør 3,0 mL i gruppen med alle (tabell 3).

Hemoglobin

Resultatene for Hb (tabell 4A) viser at fyllingsgrad på 0,375 mL ga statistisk signifikant forskjell i parameterverdi sammenlignet med Rør 3,0 mL i alle gruppene. Fyllingsgrad på 1,5 mL ga statistisk signifikant forskjell i verdi i gruppen med pasienter. Konfidensintervallet for systematiske avvik ved fyllingsgrad 0,375 mL i gruppen med alle og i gruppen med friske oversteg kvalitetsspesifikasjon for Hb på 0,24 g/dL.

Erytrocytter

Resultatene for EPK (tabell 4B) viser at fyllingsgrad på 0,375 mL ga statistisk signifikant forskjell i parameterverdi sammenlignet med Rør 3,0 mL i alle de tre gruppene. Fyllingsgrad på 0,750 mL ga statistisk signifikant forskjell i gruppen med alle og i gruppen med friske. Konfidensintervallet for systematiske avvik ved fyllingsgrad 0,375 mL i gruppen med friske oversteg kvalitetsspesifikasjon for EPK på $0,07 \times 10^{12}/L$.

Middel erytrocyttvolum

Resultatene for MCV (tabell 4C) viser at fyllingsgrad på 1,5 mL, 0,750 mL og 0,375 mL ga statistisk signifikant forskjell i MCV-verdi sammenlignet med Rør 3,0

Formler

$$\text{Formel 1:} \quad \text{Blodvolum i prosjektrør (mL)} = \frac{\text{Vekt prosjektrør (gram)} - \text{Vekt tomt rør (gram)}}{\text{Gjennomsnittlig vekt 1,0 mL blod (gram)}}$$

$$\text{Formel 2:} \quad \text{Kvalitetsspesifikasjon (verdi)} = \frac{\text{Est. gjennomsnittsverdi i Rør 3,0 mL (alle)}}{100 \%} \times \text{Kvalitetsspesifikasjon (\%)} \quad (6)$$

$$\text{Eksempel på utregning av kvalitetsspesifikasjon (verdi) for Hb:} \quad \frac{12,83 \text{ g/dL}}{100 \%} \times 1,84 \% = 0,24 \text{ g/dL}$$

TABELL 3: Estimerte gjennomsnittsverdier og måleområder for parameterverdier (range) for prosjektets parametere i de tre gruppene (alle, friske, pasienter). I tillegg er kvalitetsspesifikasjoner for akseptabelt systematisk avvik oppgitt i % og beregnet verdi for prosjektets parametere i gruppen med alle.

Parameter	Gruppe	Gjennomsnittsverdi Rør 3,0 mL ^a (Range ^b)	Kvalitetsspesifikasjon	
			Prosent ^c	Verdi ^d
Hb (g/dL)	Alle	12,83	1,84	0,24
	Friske	13,59 (11,4-17,3)		
	Pasienter	10,73 (7,6-13,7)		
EPK ($\times 10^{12}/L$)	Alle	4,11	1,7	0,07
	Friske	4,37 (3,63-5,67)		
	Pasienter	3,41 (2,30-4,97)		
MCV (fL)	Alle	93,18	1,26	1,17
	Friske	92,71 (83,9-111,0)		
	Pasienter	94,60 (83,4-118,0)		
TPK ($\times 10^9/L$)	Alle	238,98	5,9	14,1
	Friske	241,72 (181-356)		
	Pasienter	231,27 (25-415)		
LPK ($\times 10^9/L$)	Alle	6,87	6,05	0,42
	Friske	7,02 (3,96-11,60)		
	Pasienter	6,36 (0,09-105,00)		

a. Estimert gjennomsnittlig parameterverdi i Rør 3,0 mL fra LME

b. Deskriptiv range

c. Kvalitetsspesifikasjoner basert på biologisk variasjon (6)

d. Kvalitetsspesifikasjoner beregnet ved bruk av formel 2

mL i alle gruppene. Konfidensintervaller for systematiske avvik ved fyllingsgrad på 0,750 mL og 0,375 mL oversteg kvalitetsspesifikasjon for MCV på 1,17 fL i alle tre gruppene.

Trombocytter

Resultatene for TPK (tabell 4D) viser at fyllingsgrad 1,5 mL, 0,750 mL og 0,375 mL ikke ga statistisk signifikante forskjeller i noen av de tre gruppene sammenlignet med Rør 3,0 mL. Ingen av konfidensintervallene for systematiske avvik oversteg analytisk kvalitetsspesifikasjon for TPK på $14,1 \times 10^9/L$.

Leukocytter

Resultatene for LPK (tabell 4E) viser at fyllingsgrad på 0,750 mL ga statistisk signifikant forskjell i LPK sammenlignet med Rør 3,0 mL i gruppen med friske. Ingen av konfidensintervallene for systematiske avvik oversteg kvalitetsspesifikasjon for LPK på $0,42 \times 10^9/L$.

Diskusjon

Hensikten med prosjektet var å undersøke hvordan underfylling av K₂EDTA-rør

påvirket de hematologiske parametere Hb, EPK, MCV, TPK og LPK, samt å undersøke om effekten var ulik mellom friske personer og pasienter. Parameterverdier i underfylte K₂EDTA-rør med fyllingsgrad på 1,5 mL, 0,750 mL og 0,375 mL ble sammenlignet med optimalt fylte rør med 3,0 mL blod. Fyllingsgrad på 1,5 mL, 0,750 mL og 0,375 mL gir K₂EDTA-konsentrasjoner på henholdsvis 3,6 mg/mL, 7,2 mg/mL og 14,4 mg/mL. Det var nærliggende å anta at økt K₂EDTA-konsentrasjon i underfylte rør var hovedårsaken til påvirkningen av parameterverdiene. Det var imidlertid ikke et mål å undersøke årsaken til denne påvirkningen nærmere i dette prosjektet. Resultatene våre viste at effekten av forhøyet K₂EDTA-konsentrasjon var ulik mellom parameterne, med MCV som den mest sensitive parameteren for underfylling.

For Hb og EPK tilsa resultatene at 0,750 mL i 3,0 mL-rør (25 % fyllingsgrad og K₂EDTA-konsentrasjon på 7,2 mg/mL) var den laveste fyllingsgraden som ga akseptabel kvalitet for analysing ut fra analytiske kvalitetsspesifikasjoner basert på biologisk variasjon (6). Overlappende konfidensintervaller kunne indikere at

underfylling påvirket blod fra friske og pasienter likt. Resultatene tydet på at jo lavere fyllingsgrad, jo høyere positivt systematisk avvik (falskt forhøyede resultater) fra optimal fylling. Resultatene våre for Hb og EPK stemmer overens med andre lignende studier (7-9). Studiene til Xu et al. og Biljak et al. aksepterte begge 1,0 mL blod i 4,0 mL-rør (25 % fyllingsgrad og K₂EDTA-konsentrasjon på 7,2 mg/mL) mens Gupta et al. aksepterte 1,0 mL blod i 3,0 mL-rør (33,3 % fyllingsgrad og K₂EDTA-konsentrasjon på 5,4 mg/mL). Resultatene til Biljak et al. og Xu et al. viser også økt Hb og EPK ved forhøyet K₂EDTA-konsentrasjon.

For MCV var 1,5 mL (50 % fyllingsgrad og K₂EDTA-konsentrasjon på 3,6 mg/mL) den laveste fyllingsgraden som ga akseptabel kvalitet for analysing. At konfidensintervaller for systematiske avvik mellom friske og pasienter ikke overlappet ved fyllingsgrad 0,375 mL og 0,750 mL, ga en indikasjon på at MCV øker mer i gruppen med pasienter enn i gruppen med friske ved disse fyllingsgradene. Resultatene tyder på at jo lavere fyllingsgrad, jo høyere positivt systematisk avvik og falskt forhøyet MCV. Tidligere studier aksepterer analysing av MCV i underfylte prøverør selv ved tendens til økning i MCV. Xu et al. og Gupta et al. aksepterte imidlertid prøvemateriale med henholdsvis fire ganger så høy (14,4 mg/mL) og 1,5 ganger så høy (5,4 mg/mL) K₂EDTA-konsentrasjon enn den som ble akseptert i dette prosjektet.

For TPK og LPK ga den laveste fyllingsgraden på 0,375 mL (12,5 % fyllingsgrad og K₂EDTA-konsentrasjon på 14,4 mg/mL) akseptabel kvalitet for analysing.

Resultatene for TPK stemmer overens med tidligere studieresultater som viser at TPK kan analyseres i underfylte rør. Xu et al. aksepterte en fyllingsgrad på 0,5 mL i 4,0 mL-rør (12,5 % fyllingsgrad, K₂EDTA-konsentrasjon 14,4 mg/mL), den samme K₂EDTA-konsentrasjonen som ble akseptert i dette prosjektet. Biljak et al. og Gupta et al. aksepterte henholdsvis 1,0 mL i 4,0 mL-rør (25 % fyllingsgrad og K₂EDTA-konsentrasjon på 7,2 mg/mL) og 1,0 mL blod i 3,0 mL-rør (33,3 % fyllingsgrad og K₂EDTA-konsentrasjon på 5,4 mg/mL). Biljak et al. og Gupta et al. undersøkte imidlertid ikke lavere fyllingsgrader enn dette. ▶

TABELL 4: Systematiske avvik (95 % KI) mellom Rør 1,5 mL, Rør 0,750 mL og Rør 0,375 mL sammenlignet med Rør 3,0 mL for Hb (A), EPK (B), MCV (C), TPK (D) og LPK (E).

A					D				
Hb Gruppe	Sammenlignes mot Rør 3,0 mL ^a	Syst. avvik (g/dL) ^b	95 % KI ^c	p-verdi ^d	TPK Gruppe	Sammenlignes mot Rør 3,0 mL ^a	Syst. avvik ($\times 10^9/L$) ^b	95 % KI ^c	p-verdi ^d
Alle (n=45)	Rør 1,5 mL	-0,07	-0,14-0,01	0,09	Alle (n=45)	Rør 1,5 mL	-1,40	-3,18-0,38	0,12
	Rør 0,750 mL	0,07	-0,01-0,15	0,08		Rør 0,750 mL	-0,60	-2,51-1,31	0,54
	Rør 0,375 mL	0,38	0,30-0,46*	< 0,001		Rør 0,375 mL	1,13	-0,76-3,02	0,24
Friske (n=30)	Rør 1,5 mL	-0,05	-0,16-0,06	0,37	Friske (n=30)	Rør 1,5 mL	-0,97	-3,42-1,47	0,43
	Rør 0,750 mL	0,11	-0,001-0,22	0,05		Rør 0,750 mL	-0,06	-2,58-2,45	0,96
	Rør 0,375 mL	0,44	0,33-0,55*	< 0,001		Rør 0,375 mL	1,18	-1,31-3,68	0,35
Pasienter (n=15)	Rør 1,5 mL	-0,09	-0,18-0,003	0,04	Pasienter (n=15)	Rør 1,5 mL	-2,04	-4,56-0,49	0,11
	Rør 0,750 mL	0,001	-0,10-0,10	0,98		Rør 0,750 mL	-2,05	-4,93-0,83	0,16
	Rør 0,375 mL	0,25	0,15-0,34	< 0,001		Rør 0,375 mL	1,32	-1,52-4,15	0,35

B					E				
EPK Gruppe	Sammenlignes mot Rør 3,0 mL ^a	Syst. avvik ($\times 10^{12}/L$) ^b	95 % KI ^c	p-verdi ^d	LPK Gruppe	Sammenlignes mot Rør 3,0 mL ^a	Syst. avvik ($\times 10^9/L$) ^b	95 % KI ^c	p-verdi ^d
Alle (n=45)	Rør 1,5 mL	-0,01	-0,03-0,01	0,40	Alle (n=45)	Rør 1,5 mL	-0,03	-0,29-0,23	0,82
	Rør 0,750 mL	0,05	0,02-0,07	< 0,001		Rør 0,750 mL	-0,11	-0,39-0,16	0,42
	Rør 0,375 mL	0,09	0,07-0,12	< 0,001		Rør 0,375 mL	-0,07	-0,34-0,20	0,60
Friske (n=30)	Rør 1,5 mL	-0,003	-0,04-0,03	0,85	Friske (n=30)	Rør 1,5 mL	0,05	-0,08-0,17	0,44
	Rør 0,750 mL	0,07	0,03-0,10	< 0,001		Rør 0,750 mL	0,19	0,06-0,32	0,004
	Rør 0,375 mL	0,11	0,08-0,15*	< 0,001		Rør 0,375 mL	0,11	-0,01-0,24	0,08
Pasienter (n=15)	Rør 1,5 mL	-0,03	-0,06-0,001	0,05	Pasienter (n=15)	Rør 1,5 mL	-0,25	-0,99-0,49	0,50
	Rør 0,750 mL	-0,007	-0,04-0,03	0,70		Rør 0,750 mL	-0,81	-1,63-0,003	0,05
	Rør 0,375 mL	0,05	0,02-0,08	0,005		Rør 0,375 mL	-0,41	-1,20-0,38	0,30

C				
MCV Gruppe	Sammenlignes mot Rør 3,0 mL ^a	Syst. avvik (fL) ^b	95 % KI ^c	p-verdi ^d
Alle (n=45)	Rør 1,5 mL	0,40	0,17 - 0,62	< 0,001
	Rør 0,750 mL	1,73	1,50-1,96*	< 0,001
	Rør 0,375 mL	4,47	4,24-4,69*	< 0,001
Friske (n=30)	Rør 1,5 mL	0,32	0,09-0,55	0,007
	Rør 0,750 mL	1,48	1,25-1,71*	< 0,001
	Rør 0,375 mL	3,94	3,71-4,17*	< 0,001
Pasienter (n=15)	Rør 1,5 mL	0,58	0,28-0,87	< 0,001
	Rør 0,750 mL	2,18	1,87-2,49*	< 0,001
	Rør 0,375 mL	5,53	5,22-5,83*	< 0,001

a. Angir hvilket rør (Rør 1,5 mL, Rør 0,750 mL og Rør 0,375 mL) som sammenlignes mot Rør 3,0 mL

b. Systematisk avvik fra Rør 3,0 mL

c. 95 % konfidensintervall (KI) for systematisk avvik. KI overstiger kvalitetsspesifikasjon (*)

d. p-verdi for det systematiske avviket

Resultatene for LPK stemmer også overens med tidligere studieresultater som viser at LPK kan analyseres i underfylte rør. Xu et al. og Biljak et al. aksepterte imidlertid kun fyllingsgrad på 1,0 mL i 4,0 mL-rør (25 % fyllingsgrad). Det gir halvparten så høy K₂EDTA-konsentrasjon (7,2 mg/mL) som den som ble akseptert i dette prosjektet.

Resultatene for LPK stemmer også overens med tidligere studieresultater som viser at LPK kan analyseres i underfylte rør. Xu et al. og Biljak et al. aksepterte imidlertid kun fyllingsgrad på 1,0 mL i 4,0 mL-rør (25 % fyllingsgrad). Det gir halvparten så høy K₂EDTA-konsentrasjon (7,2 mg/mL) som den som ble akseptert i dette prosjektet.

Forskjeller i resultater mellom dette prosjektet og lignende studier kan blant annet skyldes valg av studiedesign, metode for statistisk databehandling samt vurdering av tillatt avvik. For eksempel har Xu et al. benyttet tillatt totalfeil som vurderingskriterium, mens dette prosjektet har brukt systematiske avvik. En annen mulig kilde til forskjeller er rørprodusent. Xu et al. benyttet en annen type K₂EDTA-rør enn i dette prosjektet. Det er funnet motstridende resultater for hvorvidt rørprodusent er kilde til både statistiske og klinisk signifikante forskjeller ved analysing av hematologiske

Resultatene for LPK stemmer også overens med tidligere studieresultater som viser at LPK kan analyseres i underfylte rør. Xu et al. og Biljak et al. aksepterte imidlertid kun fyllingsgrad på 1,0 mL i 4,0 mL-rør (25 % fyllingsgrad). Det gir halvparten så høy K₂EDTA-konsentrasjon (7,2 mg/mL) som den som ble akseptert i dette prosjektet.

parametere (10, 11). Eventuelle forskjeller i parameterverdier mellom prøverør fra ulike produsenter kunne tenkes å bli mer fremtredende ved lave fyllingsgrader.

I dette prosjektet ble alt prøvemateriale analysert direkte i K₂EDTA-primærrør for å gi resultatene av studien høyere overførbarhet til klinisk praksis og for å redusere den preanalytiske usikkerheten knyttet til overføring av blod til sekundærrør før analysering. Et design med pipettering av eksakte volumer fra primær- til sekundærrør, som brukt av Xu et al. og Gupta et al., gir resultater med nøyaktige volumangivelser. I dette prosjektet var hver fyllingsgrad basert på ulike volumer innen et fyllingsintervall. Imidlertid vil det i klinisk praksis aldri tappes eksakte volumer i prøverør fra pasienter. Ved å justere for volum-avvik i LME-modellen ble det tatt hensyn til variasjon i fyllingsgrad innen samme rørkategori (3,0 mL, 1,5 mL, 0,750 mL, 0,375 mL) grunnet bruk av fyllingsintervaller.

Siden det var én person som gjennomførte all prøvetaking, ble antall deltakere valgt ut i fra hva som var praktisk gjennomførbart. Et større antall pasienter ville ha økt både den interne og den eksterne validiteten av resultatene. Den interne validiteten er høyest i gruppen med friske (63,3 % kvinner). Pasientgruppen inkluderte kun pasienter med hematologiske tilstander tilknyttet en medisinsk avdeling på Haukeland universitetssjukehus. Det var forventet at denne gruppen hadde patologiske hematologiske analyseresultater. Valg av pasientgruppe kan imidlertid ha redusert overførbarheten av resultatene til andre pasientgrupper.

Hverken Xu et al. eller Biljak et al. oppga konfidensintervaller for de systematiske avvikene. Konfidensintervaller gir mer informasjon om usikkerheten til det estimerte systematiske avviket. I dette prosjektet ble resultatene tolket ut i fra både p-verdier og konfidensintervaller. Mens p-verdi gir en indikasjon på sannsynligheten for en forskjell minst like stor som i datamaterialet, forutsatt en nullhypotese, kan konfidensintervaller gi en indikasjon på størrelsen på det «sanne» avviket, samt om det er positivt eller negativt (12). Å ta utgangspunkt i biologisk variasjon for å angi kvalitets-spesifikasjoner for systematisk avvik, rangeres høyt i det medisinske fagmil-

jøet (13). Å basere klinisk beslutningstaking på kvalitets-spesifikasjoner gir imidlertid kun en generell fremgangsmåte for å vurdere om prøvemateriale kan aksepteres eller ikke. I enhver prøvetakingssituasjon bør prøvetaker vurdere kvaliteten på prøvematerialet. I utfordrende prøvetakingssituasjoner bør det imidlertid brukes skjønn i vurderingen om hvorvidt prøvematerialet skal forkastes, eventuelt i samråd med laboratorielege.

Resultatene i dette prosjektet må tolkes ut i fra at de baseres på en modell og at fyllingsgrad ikke undersøkes i sammenheng med totalvariasjon på analyseresultatene.

Konklusjon

De hematologiske parameterne Hb, EPK, MCV, TPK og LPK påvirkes ulikt ved underfylling av K₂EDTA-rør. Resultatene indikerte at Hb, EPK og MCV måles falskt forhøyet ved lave fyllingsgrader. Dette ble ikke påvist for TPK og LPK.

På bakgrunn av analytiske kvalitetskrav basert på biologisk variasjon kan laveste fyllingsgrad på 0,375 mL blod i 3,0 mL K₂EDTA-rør (12,5 % fyllingsgrad) kun aksepteres for TPK og LPK. For Hb og EPK vil laveste akseptable fyllingsgrad være 0,750 mL blod (25 % fyllingsgrad), mens for MCV kreves det en fyllingsgrad på 1,5 mL (50 % fyllingsgrad). Med unntak av MCV, var det ingen klare indikasjoner på systematiske forskjeller i effekten av fyllingsgrad mellom friske og pasienter.

Takk

En stor takk rettes til biostatistiker Tore Wentzel-Larsen for hjelp med utviklingen av design til prosjektet samt hjelp med statistisk behandling av data. Takk til professor emeritus Bjørn J. Bolann ved Haukeland universitetssjukehus for faglige innspill og veiledning under arbeidet. Takk til Olgunn Sivertsen Lid, seksjonsleder ved seksjon for hematologi- og koagulasjonsanalyser ved laboratorium for klinisk biokjemi (LKB) på Haukeland universitetssjukehus, for faglige innspill. En takk rettes også til bioingeniører ved samme seksjon for hjelp med analysering av prøvematerialet. Takk til ledelsen ved LKB for å ha dekket utgifter for utstyr til prøvetaking, samt kostnader til analyse-ring. ■

Referanser

1. CLSI. Tubes and Additives for Venous and Capillary Blood Specimen Collection; Approved Standard – Sixth Edition. CLSI document GP39-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
2. Husøy A-M. Blodprøvetaking i praksis. 2. utgave. Oslo: Cappelen Damm akademisk; 2012.
3. Kristensen GBB, Husøy A-M. Venøs blodprøvetaking i Norge – en observasjonsstudie. *Bioingeniøren*. 2016;51(2):19-26.
4. Cao L, Chen M, Phipps RA, Del Giudice RE, Handy BC, Wagar EA, et al. Causes and impact of specimen rejection in a clinical chemistry laboratory. *Clin Chim Acta*. 2016;458:154-8.
5. International Council for Standardization in Haematology. Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. *Am J Clin Pathol*. 1993;100(4):371-2.
6. Westgard QC. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (01.03.17).
7. Xu M, Robbe V, Jack R, Rutledge J. Under-filled blood collection tubes containing K₂EDTA as anticoagulant are acceptable for automated complete blood counts, white blood cell differential, and reticulocyte count. *Int J Lab Hematol*. 2010;32(5):491-7.
8. Biljak V, Božičević S, Krhač M, Lovrenčić M. Impact of under-filled blood collection tubes containing K₂EDTA and K₃EDTA as anticoagulants on automated complete blood count (CBC) testing. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(11):e323-6.
9. Gupta V, Shrivastav V, Negi G, Chandra H, Mittal S, Biswas D. Under-filled di potassium-ethylene di amine tetra acetic acid vacutainers and its effect on automated blood cell indices in healthy blood donors: Is there a need to re-investigate it as a rejection criterion? *J Appl Hematol*. 2014;5(3):101-6.
10. Langhelle A, Leikanger T, Løkkebakken H. Validering av K₂EDTA og Na-citrat prøverør: ulike volum og produsenter. Bacheloroppgave. Bergen: Høgskolen i Bergen; 2016.
11. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno G, Montagnana M, Poli G, Solero G, et al. Brand of dipotassium EDTA vacuum tube as a new source of pre-analytical variability in routine haematology testing. *Br J Biomed Sci*. 2013;70(1):6-9.
12. Du Prel J, Hommel G, Rohrig B, Blettner M. Confidence Interval or P-Value? Part 4 of a Series on Evaluation of Scientific Publications. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(19):335-9.
13. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington: American Association for Clinical Chemistry; 2001.