

Preanalyse for de mest vanlige hemostaseparametere

Av **TRINE ANDREASSEN**, leder ved Seksjon for hemostase og trombose ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus Rikshospitalet

Artikkelen bygger på innlegget "Preanalyse, prøvetaking og holdbarhet til de vanligste koagulasjonsanalysene" som ble holdt på kurset Koagulasjonsanalyser og Hemostase i regi av BFI.

PREANALYTISKE forhold er viktig for alle analyser. Jo mer man kan om slike forhold, jo større er sjansen for at prøvene behandles riktig.

Denne artikkelen viser hvordan ulike preanalytiske faktorer påvirker vanlige koagulasjonsparametre som INR, APTT, fibrinogen, D-dimer og antitrombin.

Hva skjer egentlig i prøveglasset (in vitro) for de mest vanlige hemostaseanalysene som INR, APTT (aktivert partiell tromboplastintid), fibrinogen, D-dimer og AT III (antitrombin) før de blir analysert? Hvilke faktorer kan de påvirkes av?

Denne artikkelen forsøker å gi noen svar.

Prøvemateriale

De fleste hemostaseanalyser er basert på bruk av citratplasma. Andre typer prøvemateriale kan påvirke resultatet.

– Serum vil påvirke alle hemostaseanalyser ved å forbruke fibrinogen og dermed gi falsk lav fibrinogen. Siden det ikke vil bli noen "klottedannelse" (dannelse av koagel) i serum, kan APTT- og INR-verdier bli sterkt falskt forhøyede.

– EDTA binder kalsiumioner, og siden kalsium er en viktig faktor for dannelsen av et klott, vil EDTA-plasma i teorien forlenge "klott-tiden" (tiden det tar før det dannes koagel) på INR/APTT og kan dermed gi falskt forhøyede resultater. Det vil gi lavere resultater for AT III, og

det kan også påvirke D-dimer og fibrinogen.

– Heparinplasma gir svært forhøyede resultater spesielt for APTT, men også for INR. Det kan gi falskt lav fibrinogen og AT III og det hemmer trombinaktivitet (1).

Konsentrasjon av Natriumcitrat

Ulike leverandører av laboratoriestyr leverer glass med ulik konsentrasjon av Natriumcitrat. 0,109 mM (3,2 %) og 0,129 mM (3,8 %) er vanligst i Norge.

3,8 % Na-citrat binder mer kalsium fra analysereagensene enn 3,2 % (2). Ved analysing av APTT tilsettes pasientplasmaet en kontaktaktivator og fosfolipid. Type kontaktaktivator og fosfolipidkilde er avhengig av hvilken type reagens som anvendes. Men likt for alle metoder er tilsetning av kalsiumklorid for å starte dannelsen av et klott. Ved bruk av 3,8 % Na-citrat vil klott-tiden være forlenget sammenlignet med plasma fra 3,2 % Nacitratglass.

Fibrinogen analysert i plasma fra glass med 3,8 % Na-citrat kan være lavere enn i glassene med 3,2 %.

Det er viktig å ikke veksle mellom de to ulike Na-citratkonsentrasjonene, men holde seg til en av dem (1, 3).

Hvor fullt skal glasset være?

Plasmabaserte hemostaseanalyser bygger på at forholdet mellom blod og Na-citratløsning er 9:1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) anbefaler at Na-citratglassene skal fylles til minst 90 % (3). Glass med Na-citratkonsentrasjon på 3,2 % påvirkes i mindre grad av hvor fullt det er enn glass med 3,8 %. Mange studier anbefaler derfor bruk av 3,2 % Na-citrat.

Hvor mye må prøveglasset fylles før endringen er klinisk signifikant?

Ved vår seksjon krever vi 90 % fyllingsgrad for de fleste analyser, men for APTT og INR er kravet 70 % (4). Siden det kan være en del blod igjen i korken som skal regnes med i volumet, måles fyllingsgraden etter sentrifugering. Vi har laget egne måleglass som vi sammenlikner med (se bilde side xx).

Bruker man glass med mindre volum enn 3 ml, bør glassene fylles helt, og til minst 90 %.

Det kan også være et problem at prøveglassene overfylles. Det blir da for lite Na-citratløsning i forhold til blod, klott-tiden kan synke og man får falske lave resultater for INR og APTT, mens fibrinogen blir falsk forhøyet.

Når det er mindre Na-citratløsning i forhold til blod, kan også antikoagulanteffekten bli dårligere og man risikerer at prøven inneholder mikrokoagler. Dette kan føre til forlenget klott-tid slik at APTT og INR blir falskt forlenget og at fibrinogen blir falskt lav.

Prøver aspirert i sprøyte som deretter overføres til Na-citratglass, kan lett overfylles dersom blodet "presses" ned i glasset. Det samme kan skje hvis prøven er tatt med åpen spiss. Det vil si at blodet dryppes ned i glasset enten fra kran eller kanyle.

Prøvetakning

Stase. Ideelt sett bør hemostaseanalyser tas uten stase. Brukes staseslange bør den sitte på maksimalt ett minutt (1). Forlenget bruk av stase kan gi aktivering av koagulasjonssystemet. Etter ett minutt øker EVF (Erytrocytt volum fraksjon), og FVII, FVIII og FXII får økt aktivitet. Det påvirker analyser som INR, fibrinogen og D-dimer. Etter tre minutter er endringen av klinisk betydning (5).

Hvor tykke nåler?

Den ideelle tykkelsen på nålen er 19-21 gauge (3). Tynnere nåler kan gi hemolyse

og bør derfor unngås. Tynne nåler kan likevel være nødvendig ved prøvetakning av barn og pasienter som er vanskelig å stikke.

Tynne nåler kan også forårsake plateaktivering og frigjøring av platefaktor 4, som igjen hemmer ufraksjonert heparin. Dette kan påvirke APTT analysert hos pasienter som får heparinbehandling (6).

Kasteglass.

Ved vanlig venøs prøvetakning er det ikke nødvendig å ta kasteglass, bortsett fra når prøven tas med butterfly. Kasteglasset som da brukes kan være uten tilsetning eller citratglass (3).

Glassrekkefølge:

1. Blodkultur
2. Glass uten tilsetning
3. Natriumcitrat
4. Serum m/gel
5. Heparin
6. EDTA
7. Øvrige.

På grunn av faren for krysskontaminering mellom prøveglassene skal Na-citratglass tappes før for eksempel heparin-glass. Blir Na-citratglasset kontaminert med heparin, vil det påvirke flere av hemostaseanalysene.

Flere av glasstypene som brukes til serum er tilsatt klottaktivator og kan derfor ikke regnes som glass uten tilsetning. Slike glass skal alltid tappes etter Na-citratglasset.

Blanding.

Citratglasset skal blandes ved rotasjon tre – seks ganger i 180° rotasjon og skal ikke ristes. Blandes prøven for hardt, kan det gi hemolyse og aktivering av hemostasefaktorene, noe som igjen kan påvirke analyseresultatene for klottbaserte analyser (1).

Prøvetakning med sprøyter.

Prøvematerialet kan aspireres i sprøyter, men det er viktig at sprøytene som brukes har en ikkeaktiverende overflate. Aspireres prøven i sprøyte, skal ikke blodet sprutes ned i citratglasset med stor kraft, det kan gi hemolyse og ødelegge blodplatene. I tillegg er risikoen for å overfylle glasset tilstede. Blodet må overføres til citratglasset innen ett minutt. Hvis ikke kan blodet koagulere (3).

Prøvetakning fra kran eller kateter.

Det skal tas kasteglass når prøver til hemostaseanalyser blir tatt fra arteriekran eller sentralt venekateter (CVK). Ved prøvetakning fra arteriekran med

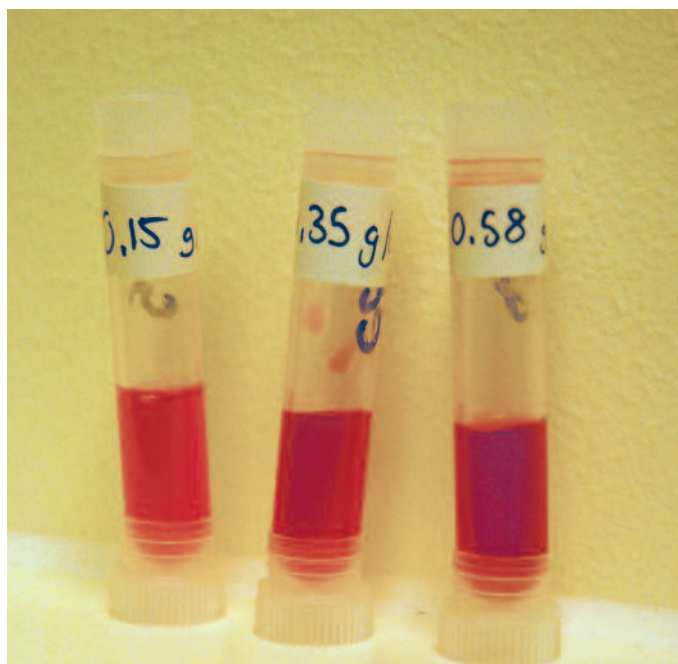
heparinlås skal det først skylles med saltvann og deretter skal det tas ut seks ganger dødvolumet på slangen før Na-citratglasset tappes (1). Praksisen ved Oslo universitetssykehus Rikshospitalet er å tappe seks milliliter blod i et glass uten tilsetning før Na-citratglasset tappes (voksne pasienter).

Fra kraner eller kateter med saltvannslås tappes to ganger dødvolumet på slangen eller kateteret (7).

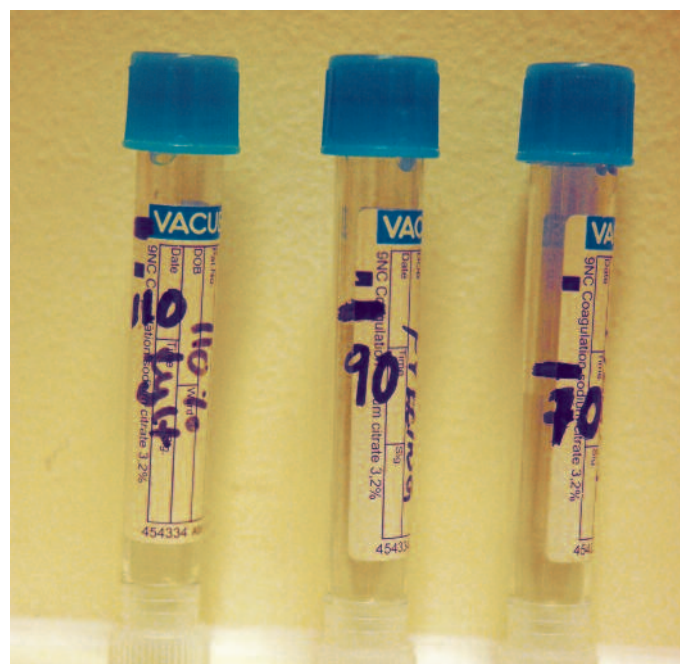
Tapping til hemostaseanalyser fra dialysekateter er ofte en utfordring. Det settes store doser med heparin i dialysekateteret etter at dialysebehandlingen er ferdig, og heparin blir stående i kateteret til neste gang pasienten kommer til dialyse. Heparin kan feste seg til veggen i dialysekateteret, og selv om man følger prosedyrer med saltvannsskylling og tapping av kasteglass, kan fremdeles Na-citratglasset bli forurenset med heparin. Dette kan spesielt påvirke APTT, men også andre hemostaseanalyser som INR og AT III kan påvirkes. Prøver til hemostaseanalyser bør derfor ikke tappes ved oppstart av en dialyse, men mot slutten.

Generelt.

Prøvene skal ikke settes på is på før sentrifugering. Det kan gi hemolyse, akti-



Plasma tilsatt hemolysat. Glasset til venstre har plasma Hb på 0,15 g/dl. Midterste glass Hb 0,35 g/dl. Glasset til høyre plasma Hb 0,58 g/dl.



Citratglass markert med fylningsgrad 110 %, 90 % og 70 %.



Hurtigsentrifuge Stat-spin Express 4 brukes kun til INR, APTT, D-dimer, fibrinogen og AT III.

vere F VII og ødelegge platene og von Willebrand faktor (3).

Før prøvene sentrifugeres bør de alltid sjekkes visuelt for koagler. Etter sentrifugering er et eventuelt koagel spunnet ned i glasset og nesten umulig å oppdage. Ved tvil om koagel, kan man røre to trepinner rundt i glasset. Koagelet vil da feste seg på trepinnene. Hvis det er koagel må prøven tas på nytt.

Sentrifugering

CLSI anbefaler sentrifugering ved 1500g (=RCF) i 10-15 minutter ved 15-22 °C (3). Mange laboratorier bruker såkalte "STAT-fuger" som er helt akseptable så lenge prøvene analyseres raskt etter sentrifugering (1,3). De bør ikke brukes på prøver som skal fryses eller videresendes til andre laboratorier.

Sentrifugetemperaturen må ikke være for lav. Det kan gi plateaktivering. Men dersom prøvene analyseres direkte etter sentrifugering, påvirkes ikke analyser som INR, APTT, fibrinogen og D-dimer (8).

For mange analyser er det viktig at

sentrifugehastigheten er så høy og sentrifugetiden så lang at man oppnår et platefattig plasma ($< 10 \times 10^9/L$ plater). APTT og INR tåler platetall opptil $200 \times 10^9/L$, men må da analyseres raskt.

Ved avpipettering av plasma til prøver som skal fryses eller videresendes til andre laboratorier er det viktig at det er igjen 0,5 cm plasma over blodlegemene.

Erytrocytt volum fraksjon (EVF)

Høy EVF ($> 0,55$) gir forlenget klott-tiden. Løsningen kan være å lage egne glass med mindre mengde Na-citrat. Da brukes en egen formel for å beregne mengden. Siden det er svært sjeldent at vi (ved Oslo universitetssykehus Rikshospitalet) har pasienter med så høy EVF, har vi ikke laget egne prosedyrer og rutiner for dette.

Hemolyse

Hemolyse kan både skyldes problemer ved prøvetakningen og tilstander hos pasienten som for eksempel autoimmun hemolytisk anemi.

Hemolyse kan gi falsk forhøyet INR og D-dimer, mens APTT, fibrinogen og AT III kan bli falsk for lav (1, 9). Dette gjelder spesielt lystransmitterende og kromogene metoder.

For lystransmitterende metoder vil hemolyse gi en høy bakgrunnsabsorbans, og kan derfor påvirke avlesningen av klottedannelsen.

Pilotstudie:

Ved Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet gjorde vi en liten pilot studie. Ti Na-citratglass ble behandlet i henhold til gjeldende prosedyrer. Plasma ble avpipettert. Resten av innholdet i Na-citratglasset ble frosset for å lage hemolysat. Hemolysatet ble så tilsatt avpipettert Na-citratplasma. Alle prøvene ble målt til plasma Hb $> 0,79$ g/dl.

INR, APTT, AT III, D-dimer og fibrinogen ble analysert både med og uten tilsatt hemolysat.

INR, APTT og fibrinogen er klottmetoder som måles mekanisk. I pakningsvedlegget til analysene er det ikke oppgitt interferensgrenser ved hemolyse. AT III måles kromogent, og grensen for interferens av hemolyse er 0,7 g/dl Hb. For D-dimer, som måles med en immunoturbidimetrisk metode, er grensen 0,5 g/dl Hb.

Det var ingen endringer i resultatene etter hemolysering for INR, APTT og fibrinogen, men resultatene for D-dimer og AT III ble lavere etter hemolysering. Et plasma med 0,5 g/dl Hb er svært rødt, nesten som bringebærsaft (se bilde side 21).

Lipemiske prøver

I lipemiske prøver kan APTT og INR bli falskt for lave, mens fibrinogen kan få falskt forhøyde verdier. Interferensen er mer uttalt for de optiske metodene enn de mekaniske (1, 3).

AT III blir falsk forhøyet, mens D-dimer blir falsk lav.

Ultrasentrifugering kan brukes til å fjerne fettstoffene, men anbefales ikke da det ikke finnes gode studier på effekten (3). Det er også en risiko for å store molekyler som fibrinogen og FVIII/von Willebrand-kompleks fjernes (10).

Det anbefales ikke å bruke Lipoclear for å fjerne lipider fra plasma.

Skal plasmaet fortynnes for å omgå problemet med lipemi, bør man bruke

samme fortynningsløsning som koagulasjonsinstrumentet bruker. For eksempel Owren koller dersom analyseinstrumentet er et STAGO-instrument. Fysiologisk saltvann kan også brukes som fortynningsløsning.

Ikteriske prøver

Ikteriske prøver kan påvirke optiske og kolorimetrisk metode (på grunn av egenfargen), mens mekaniske metoder ikke påvirkes. Årsaken til at plasma er ikterisk (nedsatt leverfunksjon) vil imidlertid ha effekt på mange hemostaseanalyser siden de fleste koagulasjonsfaktorene produseres i leveren.

Analysering av frosset plasma

Frosset plasma skal hurtigfryses i vannbad ved 37°C i 5-10 minutter (eller til plasma er tint). For høy temperatur og for lang henstand i vannbadet kan påvirke analyseresultatet. Plasma skal blandes godt og stå i fem minutter før analysering (1).

Oppbevaring og holdbarhet

Anbefalingene fra CLSI er "strengt" (se tabell 1) og det finnes mange artikler og studier som viser lengre holdbarhet på plasma i for eksempel romtemperatur. I pakningsvedleggene til de ulike analysene henviser noen leverandører til CLSI, mens andre leverandører har gjort egne holdbarhetsstudier. Så hvilke råd skal man følge?

Dette er mulighetene:

- CLSI guidelines
- Anbefalingene i leverandørens pakningsvedlegg
- Egne holdbarhetsstudier
- Anbefalinger fra andres artikler og studier.

TABELL 1. Anbefaling fra CLSI (3)

	Rom temp.	Kjøleskap	Fryser -20° C	Fryser -70° C
INR	Inntil 24 t	Nei	2 uker	12 mnd
APTT	4 t 2 t v/hep. beh.	4 t 2 t v/hep. beh.	2 uker	12 mnd
Andre	4 t	4 t	2 uker	6 mnd

Følger man anbefalinger fra artikler og studier som andre har utført, bør man være oppmerksom på at holdbarhet kan være avhengig av hvilken type reagens og instrument som brukes, og at studien bør inkludere plasma fra både normale og patologiske prøver. ■

Kilder

1. Favalaro E, Lippi G, Adcock D. Preanalytical and Postanalytical Variables: The Leading Cause of Diagnostic Error in Hemostasis? *Semin Thromb Hemost* 2008,34:612-634.
2. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol.* 1997 Jan;107(1):105-10. PubMed PMID: 8980376.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for testing Plasma-Based Coagulation Assay and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline- Fifth Edition; H21-A5.
4. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum Specimen Volume Requirement for Routine Coagulation Testing; *Am J Clin Pathol.* 1998 vol.109: 595-599.
5. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005 Sep;16(6):453-8. PubMed PMID: 16093738.
6. Kitchen S, Olson JD, Preston FE. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Published online 4 mars 2009: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444303575.fmatter/summary>.
7. Powers JM. Obtaining blood samples for coagulation studies from a normal saline lock. *AM J Crit Care* 1999;8:250-253.
8. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Influence of centrifuge temperature on routine coagulation testing. *Clin Chem* 2006;52:537-538.
9. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab med* 2006,130:181-184.
10. Donna D. Interference of Hemolysis, Icteric and Lipemia Coagulation Testing. *Advance for administrators of Laboratory.* 2011, Vol 20; 10:30.

Abstracts til IFBLS-kongressen i Berlin

Den 30. verdenskongressen for bioingeniører arrangeres i Berlin 18.- 22. august neste år. Abstracts må sendes inn **senest 15. februar 2012**.

Abstracts må skrives på engelsk, og være på maksimalt 250 ord.

Mer informasjon, og skjema for innsending, finnes på kongressens nettsider – www.ifbils-dvta2012.com

