



Examensarbete, 15 hp
Kandidatexamen i Biomedicinsk laboratorievetenskap
Vårterminen 2018

**Jämföra Protrombinkomplex
International Normalized Ratio, PK (INR)-
värdet, för plasma och helblod för
kapillärt tagna PK-prover på instrumentet
STA R Max (Stago).**

Oskar Olsson

Naturvetenskapliga Fakulteten

Populärvetenskaplig sammanfattning

Jämföra PK (INR)-värdet för centrifugerade och ej centrifugerade prover

Koagulationen hos människor är en process där flera olika system är inblandade för att skapa en propp då en skada har uppstått på blodkärlen. Detta är självklart livsnödvändigt eftersom man annars förblöder men kan också skapa problem eftersom blodproppar som lossnar och förflyttar sig kan fastna och täppa till blodflödet som i värsta fall kan leda till hjärtinfarkt, stroke och propp i lungorna. En stor grupp patienter som löper en ökad risk för blodproppsbildning är de med förmaksflimmer. En vanlig behandling för att minska risken är med läkemedel såsom warfarin vilket tunnar ut blodet så att det flödar bättre. Det finns dock svårigheter med att dosera warfarin eftersom läkemedlet påverkas av diet och levnadsvanor. Det krävs regelbunden provtagning och analysering för att se till så att patienten har tillräckligt tunt blod för att uppnå den önskade effekten men även så att blodet inte är för tunt och patienter får en alltför stor risk för blödningar.

Analysen som heter PK (INR) mäter protrombinkomplex halten vilket är ett mått på hur mycket warfarin har påverkat koagulationen. INR är enheten som är internationellt standardiserad för att alla laboratorier ska ge ut likvärdiga svar. Det vanligaste är att man tar provet med venöst blod men det går även att ta kapillärt i fingret. Provet centrifugeras och plasman analyseras. I den här studien undersöktes vad som händer om man inte centrifugerar de kapillära proverna och analyserar de direkt på helblod. Även hållbarheten undersöks. Det togs 2 kapillära PK på 35 individer där det ena centrifugerades och det andra inte. Totalt analyserades 60 kapillära prover från warfarinbehandlade patienter och 10 stycken från ej warfarinbehandlade patienter.

Resultaten från studien visade att det fanns en skillnad när metoderna jämfördes men den var dock inte så stor att den skulle påverka läkares bedömning av patientens värden. Hållbarheten var god, värdena minskade vid förvaring i rumstemperatur men låg under 10 %. Proverna kan hålla i 24 timmar. För att minska skillnaden på metoderna kan helblodsmetoden justeras genom att ändra en buffert som tillsätts vid provtagningen.

Författare/Author

Oskar Olsson

Svensk titel

Jämföra Protrombinkomplex International Normalized Ratio, PK (INR)- värdet, för plasma och helblod för kapillärt tagna PK-prover på instrumentet STA R Max (Stago)

English title

Comparing Prothrombin International Normalized Ratio, PT (INR)- value, for plasma and whole blood for capillary PT samples on STA R Max instrument (Stago)

Handledare/Supervisor

Cecilia Thege, Biomedicinsk analytiker, Klinisk Kemi Karlshamn.

Carin Lindqvist, Biomedicinsk analytiker, Klinisk Kemi Karlshamn.

Fariba Vaziri-Sani, Doktor i medicinsk vetenskap. Docent i experimentell autoimmun diabetes, Höskolan Kristianstad.

Examinator/Examiner

Bodil Hernroth, Professor i biomedicinsk laboratorievetenskap, Fakulteten för naturvetenskap, Höskolan Kristianstad.

Sammanfattning

Warfarin är ett läkemedel som används för att förhindra att högriskpatienter såsom de med förmaksflimmer får tromboembolism. Denna verkan uppnås genom att hämma de K-vitaminberoende faktorerna VII, X och protrombin och på så sätt minska blodets förmåga att koagulera. Att hitta rätt dosering av läkemedlet för warfarinbehandlade patienter har visat sig vara svårt eftersom det kräver regelbunden provtagning och påverkas av mat- och levnadsvanor. Det vanligaste sättet att mäta protrombinkomplexhalten är med venös plasma men det är även möjligt att använda sig av kapillär plasma. Helblod kan användas för mekaniska metoder som inte använder sig av optisk detektion. Fördelen är att helblod inte kräver centrifugering. Studiens syfte var att undersöka om det fanns en signifikant skillnad ($p \leq 0,05$) mellan helblod och plasma som används i den nuvarande metoden för kapillära prover och om det finns en skillnad i stabiliteten av dessa prov. Dubbla prover togs från 30 warfarinbehandlade patienter och 5 icke warfarinbehandlade individer. Ett av proven centrifugerades och analyserades på plasma, det andra analyserades på helblod. Resultaten visade att det fanns en signifikant skillnad ($p \leq 0,05$) mellan metoderna. Bland-Altman diagrammet visade att 95 % av helblodsproverna inte var högre än 0,25 INR och lägre än 0,14 INR. Detta har en låg klinisk inverkan.

Proverna förvarades i rumstemperatur i upp till 24 timmar och analyserades sedan om. Ingen förändring över 10 % kunde observeras i hållbarheten. Studien visade att trots att det finns en signifikant skillnad är det möjligt att ersätta den nuvarande metoden med plasma och använda helblod istället.

Ämnesord

Protrombin komplex, warfarin, helblod, kapillär, stabilitet.

Abstract

Warfarin is a drug used to prevent high-risk patients such as those with atrial fibrillation from thromboembolisms. This effect is achieved by suppressing vitamin-K dependent factors VII, X and prothrombin and therefore decreasing the blood's ability to clot. Finding the right dosage of the drug for warfarin treated patients has proven difficult, as it demands regular blood draws to monitor their prothrombin complex level, which is affected by dietary and living habits. The most common way to measure prothrombin complex levels is by using venous plasma but it is also possible to use capillary plasma. Whole blood can be used for mechanical methods, which don't use optical detection. The benefit is that whole blood doesn't require centrifugation. The aim of this study was to investigate if there was a significant difference ($p \leq 0,05$) between using whole blood and plasma which is the existing method for capillary sample and also if there are any differences between the stability of these samples. Double samples from 30 warfarin treated patients and 5 non-treated persons were taken. One of the samples were centrifuged and analyzed on plasma and the other analyzed on whole blood. The results showed that there was a significant difference ($p \leq 0,05$) between the methods. Bland-Altman plot comparison showed that 95 % of the whole blood samples would not be higher than 0,25 INR and lower than 0,14 INR. This has low clinical impact. The samples were stored at room temperature for up to 24 hours and reanalyzed. No changes over 10 % in INR values were observed. This study showed that even though there is a significant difference, it is possible to replace the existing method which using plasma with the whole blood instead.

Keywords

Prothrombin complex, warfarin, whole blood, capillary, stability.

Innehåll

1. Inledning	6
1.1. Koagulationen.....	6
1.2. Warfarin.....	7
1.3. PK (INR).....	8
1.4. Preanalys.....	8
1.5. Preanalytiska felkällor	9
1.6. Analys på helblod	10
1.7. Analysprincip PK (INR) STA R Max (Stago).....	10
1.8. Syfte och frågeställning	11
1.9. Hypotes	11
2. Material och metod	12
2.1. Urval	12
2.2. Provets väg i Sta R Max	13
2.3. Statistisk dataanalys.....	13
2.3.1. Bland-Altman	14
2.4. Etiska överväganden.....	14
3. Resultat	14
4. Diskussion.....	17
5. Slutsats.....	20
6. Tackord.....	20
7. Referenser	20
8. Bilagor	24
8.1. Tabell 1. Rådata för de 35 prover.	24
8.2. Tabell 2. Tidpunkt för analys och omanlys av helbod.....	25

1. Inledning

1.1. Koagulationen

Koagulation även känt som hemostas, är en process som aktiveras då blodkärlen skadas och blodet når ut till extravaskulära celler och bindväv. Många koagulationsfaktorer och celltyper är inblandade i processen och även cirkulationen påverkar då en dålig venös eller arteriell cirkulation ökar risken för en trombos (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012). I den primära hemostasen är trombocyter, plasmaproteiner och vävnadskomponenter inblandade, tillsammans bildar de en barriär för att stoppa blödningen i kärlväggen. Brist på dessa proteiner och trombocyter bidrar därför till rubbningar i den primära hemostasen och en försämrad koagulationsförmåga (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012). När trombocyterna aktiverats frisätter de substanser såsom vasokonstriktorer för att underlätta blodkoagulationen. Trombocyternas utseende och adhesionsförmåga förändras till följd av stimulering av den humoral hemostasen. Plasmaproteinet von Willerbrands faktor (VWF) är väsentligt för att trombocyterna ska fästa till kollagen och fungerar därför som en länk mellan kollagenet som exponeras i kärlväggen vid skada och trombocyterna (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012). Trombocyterna kan även binda in direkt till kollagen. Tromboxan A₂ är en produkt av arakodinsyra vars uppgift är att binda till en receptor på trombocytens yta och aktiverar då frisättning av Adenosin difosfat (ADP) som exponerar ytreceptorerna på trombocyter så att proteiner såsom fibrinogen, fibronektin, trombospondin och VWF kan binda in (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012). Detta får effekten av att fler trombocyter binder in och ett aggregat bildas. Den humoral koagulationen i plasma utgörs av ett stort antal faktorer som aktiveras och allt leder till aktiveringen av protrombin till trombin som i sin tur klyver fibrinogen så att ett nätverk av fibrin bildas. Den humoral koagulationen delas in i 2 system, intrinsic och extrinsic (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012). Faktor XII, prekallikrein och högmolekylärt kininogen initierar aktiveringen. Intrinsic-systemet har mindre betydelse *in vivo* utan den påverkas mest av extrinsic-systemet vilket initieras av ett makromolekylärt komplex av faktor VIIa och vävnadsfaktor (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012). För att aktiveringen av protrombin ska ske behöver ett antal faktorer

modifieras med K-vitaminberoende faktorer. Detta sker genom att de K-vitaminberoende faktorerna har en affinitet för calciumjoner vilket ger en modifiering hos ett antal faktorer. Vid warfarinbehandling hindras denna modifiering och koagulationsförmågan minskar (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012).

1.2. Warfarin

Warfarin är ett antikoagulantläkemedel som har varit i bruk hos människor sedan 1952 och är det vanligaste antikoagulantläkemedlet (Pirmohamed 2006). Dess effekt är att det hindrar bildningen av tromboembolism genom att hämma vitamin-K beroende koagulationsfaktorer och förlänga koagulationstiden. Denna effekt uppnås vid ett visst PK (INR) värde som vanligen är mellan 2,0-3,0, vilket är det terapeutiska värdet för en patient med ökad tromboembolismrisk som t. ex. förmaksflimmer (Pirmohamed 2006). Det krävs aktiv övervakning för att hålla sig inom intervallet 2,0-3,0 vilket görs genom regelbunden provtagning och uppföljning. Det är viktigt att inte ha ett värde under 2,0 då tromboembolismrisken ökar och inte över 3 då blödningsbenägenheten blir farligt hög (Pirmohamed 2006).

Det kan vara svårt att hitta en lämplig dosering. Exempelvis 50 % av patienterna i en brittisk studie hade ett värde utanför det terapeutiska intervallet (Boulangier et al. 2006). Tätt intervall mellan provtagningarna och korrekt information till patienter kan dock minska antalet individer med höga och låga värden. Det är viktigt att informera patienterna eftersom kosten, levnadsvanor och gener påverkar doseringen (Pirmohamed 2006). NOAK (Nya Orala Antikoagulantia) är antikoagulantia som kräver mindre övervakning och ger minst lika god minskning av risk för tromboembolism som warfarin (Komen et al. 2017). Patienten behöver inte regelbundet gå och ta prover såsom warfarinbehandlade patienter. Det finns dock inte en antagonist som kan ges vid behov för alla NOAK-läkemedel vilket är en nackdel. Patienter med dålig njurfunktion bör inte behandlas med NOAK-läkemedel, därför är det viktigt att se till att njurfunktionen är god (Komen et al. 2017).

1.3. PK (INR)

Aktiviteten hos faktorerna VII, X och protrombin mäts. Även hypervitaminos av vitamin K som påverkas av näringsintag, antibiotikabehandling och leverskada har visat sig påverka PK (INR) (Stago 2015). Svaren ges ut med enheten International Normalized Ratio (INR) vilket är en kvot för patientens värde och normalvärdet. 1,0 är normalvärdet och vid 2,0 är koagulationstiden alltså fördubblad. Metoden är internationellt standardiserad för att patientprover ska få samma värde oavsett var de analyseras (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012). INR använder sig av formeln $INR = (PK/Medel\ Normal\ PK)^{ISI}$ där ISI står för International Sensitivity Index vilket används för att justera känsligheten för just instrumentet och dess reagens (Favaloro et al. 2016). Referensintervall är <1,2. Svar >8 lämnas ut som > 8. Svar över 6,0 är larmvärden som rings direkt till rekvisenten (Landstinget Blekinge u.å.a).

För att alla laboratorier i Sverige ska visa samstämmiga resultat har External Quality Assurance in Laboratory Medicine In Sweden (EQUALIS) tagit fram nationella kalibratorer som har baserats på frystorkad citratplasma som har åsatta INR-värden. Dessa används av alla laboratorier för att utföra INR-kalibrering. Det finns en hög och en låg kalibrator och även kontroller, de körs 5 gånger och de uppmätta koagulationstiderna och INR-värden logaritmeras därefter. Värdena plottas på ett diagram och från linjens ekvation erhålls ISI-värdet. Dessa värden används sedan för att omvandla varje provs koagulationstid till ett INR-värde. ISI kan alltså beskrivas som ett verktyg för att kompensera för olika instruments känslighet. EQUALIS skickar sedan en tabell där de uträknade INR-värdena matas in i instrument (Hillarp, Fagerberg, Lindahl, Nordin & Stigendal 2002).

1.4. Preanalys

Dagens instrument ger överlag träffsäkra resultat. Interna kontroller körs dagligen för att säkerställa att instrumentet ligger inom givna referensintervall. Volymer kontrolleras för att spädningen ska bli korrekt. Även matriseffekter såsom lipemi, bilirubin och hemolys

kan kontrolleras. Dessa har dock låg påverkan på PK (INR) på Star Max (Stago, Frankrike) eftersom metoden är mekanisk och inte optisk. Även externa kontroller såsom EQUALIS analyseras och jämförs med andra sjukhus. I en resultatrapport jämförs resultaten med en egen rapportgrupp som använder sig av samma reagens och även med övriga metoder. Koagulationsinstrumentets analysfel är ovanliga. De vanliga felen är istället preanalytiska fel som ofta sker innan provet ankommit till laboratoriet och kan vara svåra att upptäcka (Favaloro, Dorothy, Funk & Lippi 2011).

1.5. Preanalytiska felkällor

Exempel på detta kan vara spädningsfel då bufferten tillsätts i röret manuellt vid kapillär provtagning. Även vid tillsats av blodet och vid blandningen kan spädningsfel uppstå då luftbubblor kan missas vilket medför en minskad blodvolym. Spädningsfelet kommer att ge ett felaktigt PK (INR) värde (Edström 2012).

Felaktig förvaring såsom överdriven värme och kyla påverkar även resultatet. Förvaring av helblod i kyl har visat sig påverka provet genom att faktorerna FVII, FVIII och VWF aktiveras (Favaloro, Dorothy, Funk & Lippi 2011). Vid längre förvaring än 24 h för PK (INR) prover bör plasman avskiljas och frysas vid minst -20°C för att provet ska vara oförändrat vid analys. Det är viktigt att provet tinas inom 5-10 minuter i 37°C vattenbad (Favaloro, Dorothy, Funk & Lippi 2011).

Generella provtagningsriktlinjer ska alltid följas. Vid förekomst av koagel ges inget svar ut, risken för koagelbildning ökar då provtagningen pågår under längre tid eller vid otillräcklig blandning. Vid hemolys ökar störningen av den spektrofotometriska absorbansen, optiska metoder kan därför vara känsligare för hemolys än en mekanisk metod. Även mekaniska metoder påverkas dock eftersom vävnadsfaktor ökar och koagulationen påverkas. Detta kan ge ett lägre PK (INR) värde (Favaloro, Dorothy, Funk & Lippi 2011). Vid analys på Star Max kontrolleras inte hemolys, ikterus och lipemi eftersom de inte märkbart påverkar analysen (Landstinget Blekinge u.å.a).

Konsekvenserna för ett falskt förhöjt PK (INR) kan för en patient innebära att en operation senareläggs i väntan på att PK (INR) ska sjunka och patienten löper en högre

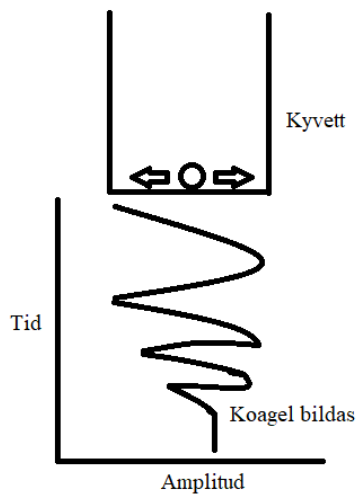
risk för en trombos då de egentliga PK (INR) värdet är lägre. Vid falskt låga värden löper patienten en högre risk för blödningar då det egentliga värdet är högre och patientens warfarindos kan justeras felaktigt (Pirmohamed 2006).

1.6. Analys på helblod

Tidigare studier har visat att det är möjligt att analysera kapillära PK (INR) på helblod istället för plasma. Beroende på instrumentet som används kan en justering av analysen behöva göras (Amukele, Ferrel & Chandler 2010). Venöst blod med tillsatt citratplasma är det vanliga provmaterialet som används och det är viktigt att det går att använda sig av samma reagens som de venösa proverna för att inte behöva lägga extra resurser på de kapillära proverna. Det krävs att metoden inte bygger på optisk koagulationsdetektering utan en mekanisk metod. Vid användning av helblod kan provvolymen behöva justeras eftersom helblodet har alla erythrocyter kvar (Bamford et al. 2000). På Klinisk Kemi Karlshamn var det tidigare ej möjligt att analysera kapillära prover på helblod eftersom koagulationsinstrumentet CS2100i (Sysmex, Japan) använder sig av en optisk mätmetod.

1.7. Analysprincip PK (INR) STA R Max (Stago)

Endast de K-vitaminberoende koagulationsfaktorerna VII, X och protrombin adsorberas bort från reagenset i denna metod. Alla övriga koagulationsfaktorer, vävnadsfaktor och kalciumjoner finns i överflöd eftersom koagulationstiden endast ska vara beroende av de K-vitaminfaktorerna som warfarin påverkar. Reagenset STA SPA + (Stago, Frankrike) består även av tromboplastin, kalcium och bovin plasma. Patientens serum tillsätts sedan och det blir K-vitaminberoende faktorerna och dess aktivitet (som är proportionell mot koagulationstiden) som avgör koagulationstiden. STA R Max instrumentets analysprincip är att variationen av en kulas svänghöjd mäts med elektromagnetiska sensorer. Kulan förflyttas i kyvetten (som innehåller provmaterialet) med pendelrörelse. Denna rörelse erhålls genom 2 krökta skenor i botten på kyvetten. Ett elektromagnetiskt växelfält upprätthålls med två oberoende drivspolar. Svängningsamplituden minskar när viskositeten i kyvetten ökar vid bildning av ett koagel i provmaterialet.



Figur 1. Metallkulans svängning minskar när ett koagel bildas (Egen illustrerad bild).

Koagulationstiden omvandlas till enheten International Normalized Ratio (INR) (Referanshandbok STA R Max 2016). Denna metod är även lämplig för att analysera PK (INR) på helblod för de kapillärt tagna proverna eftersom metoden bygger på mätning av viskositet istället för optisk detektion av koagel (Bamford et al. 2000).

1.8. Syfte och frågeställning

Syftet med denna studie var att undersöka om PK (INR) resultaten blir likvärdiga om PK-analysen görs på helblod (icke-centrifugerat prov) istället för plasma (centrifugerat prov) för kapillärt tagna prover? Framtida värden av denna studie är att om det visar sig att det inte finns en signifikant skillnad på PK (INR) värdena och hållbarheten mellan centrifugerade och icke-centrifugerade prover, kan Klinisk Kemi köra analysen direkt (utan centrifugering) vid ankomst till laboratoriet och på så sätt sparas 10 minuters centrifugering och väntan på ledig centrifug. Det innebär även mindre arbete för personalen.

1.9. Hypotes

Noll-hypotesen (H_0) är att det inte finns en signifikant skillnad mellan att analyserna, PK (INR) för kapillärt tagna prover, på helblod eller plasma. Förväntat resultat är en ej signifikant skillnad mellan de olika metoderna.

2. Material och metod

2 stycken kapillära-PK togs på 35 individer. Totalt 70 prover analyserades på STA R Max 2 på Klinisk Kemi Karlshamn varav 35 centrifugerades och 35 analyserades utan centrifugering. Hållbarheten undersöktes vidare för de icke-centrifugerade proverna genom att analysera om proverna inom ett spann på 2-24 timmar.

2.1. Urval

31 av de kapillära PK (INR) proverna togs på Klinisk Kemi i Karlshamn på provtagningen. 4 patientprover var från primärvården där dubbelprov hade tagits. Patienterna som tar PK-prover är warfarinbehandlade. 5 stycken var personal hos klinisk kemi i Karlshamn och var ej warfarinbehandlade, dessa valdes ut för att kunna erhålla normalvärden. Provtagarna var erfarna och har genomgått utbildning för just kapillär provtagning för PK (INR). Patienter som skulle ta ett venöst PK (INR) prov tillfrågades om ett kapillärt prov också kunde tas. Patienter som skulle ta ett kapillärt PK (INR) tillfrågades också, för dessa patienter behövde endast ett extra provrör fyllas.

Patientens fingrar värmdes vid behov upp för att säkerställa ett tillräckligt flöde, det utvalda fingret spritades och ett stick gjordes sedan med en 2,0 mm engångslancett (Onemed, Sverige). 4 kapillär rör (Vitrex, Danmark) med volymen 50 µl fylldes och tillsattes till två provrör som innehöll 400 µl spädningsbuffert SPA Buffert (Stago, Frankrike) vilket innebar en 1:5 spädning. Proven togs alltid under samma nålstick. Provrör märktes sedan upp med identifikationsnummer och information om det skulle centrifugeras eller inte. För proverna tagna hos Klinisk Kemi Karlshamn skedde centrifugering och analysering inom 30 minuter efter provet tagits och för proverna tagna hos primärvården skedde analys inom 6 timmar. För de prov som centrifugerades skedde det med 3600 x g (Labofuge 400 R, Thermo, USA) under 10 minuter i rumstemperatur.

Alla prover analyserades på samma instrument (Sta R Max 2, Stago, Frankrike). Inga ändringar i programmet på instrumentet gjordes oavsett på vilket provmaterial som

användes. Resultaten skrevs ut och i de fall där ett ordinarie patientprov analyserats ersattes LID-numret med ett specifikt identifikationsnummer för att avidentifiera patienten. Interna kontroller (2 nivåer) analyserades varje morgon och eftermiddag. Även vid reagensbyte analyserades 2 nivåer av kontroller. Kontrollerna som kördes var QC 1 och QC 3 (Bio Rad Lyphochek, Bio-Rad Laboratories, USA). Externa kontroller tillhandhålls av EQUALIS och analyseras 10 gånger per år för att säkerställa att värdena är jämförbara med övriga laboratorier. För att undersöka hållbarheten analyserades de ej centrifugerade proverna om vid olika tider upp till 24 timmar eftersom det är hållbarhetstiden för analys på plasma (Landstinget Blekinge u.å.b).

2.2. Provets väg i Sta R Max

Kapillära prover sätts på specifika rack där ingen vätskenivåkontroll görs vilket skulle ha underkänt resultaten eftersom vätskenivån skiljer sig från venösa prover. Instrumentet pipetterar över plasman eller helblodet till kyvetter som innehåller en magnetisk kula. Kyvetten förs över till en inkuberingsbrunn som håller 37°C. Pipetterna är förvärmade för att temperaturen ska hållas jämn. Kyvetten förflyttas till en avläsningsbrunn där stoppreagenset STA SPA + (Stago, Frankrike) tillsätts och koagulationstiden börjar då mätas (STA-R Evolution Reference Manual 2007).

2.3. Statistisk dataanalys

De två metodernas analysresultat jämfördes med ett parat t-test för att bekräfta eller förkasta H_0 . Då $p \leq 0,05$ kan H_0 förkastas. Vid normalfördelad data är då risken att H_0 förkastas av slumpen under 5 %. Det observerade t-värdet ($T_{(obs)}$) värdet beräknas och jämförs med värdet angivet i students t-test tabell där hänsyn tas till frihetsgraden som är antalet observationer-1. Då det $T_{(obs)} >$ det kritiska värdet $T_{(krit)}$ kan signifikansen utläsas. R^2 värdet beräknades genom att i utforma en regressionslinje med värdena från de olika metoderna. För alla beräkningar användes Microsoft Excel 2016.

2.3.1. Bland-Altman

Bland-Altman en statistisk metod som används vid jämförelse av 2 olika metoder där den ena är den etablerade och den andre den nya metoden. Jämförelsen görs för att undersöka om den nya metoden kan ersätta den gamla, jämförelsen görs inte med det sanna värdet utan det undersöks bara om metoden är bra nog för att ersätta den gamla (Myles & Cui 2007).

Två linjer skapas och i området inom dessa linjer finns 95 % av de två olika metodernas skillnader. Ett snävare område innebär att metoderna skiljer sig mindre åt, hur stor en acceptabel skillnad är beroende av vad det är för analys man undersöker. Om det högsta och lägsta värdena inom 95 % området inte påverkar tolkningen av svaret för mycket kan den nya metoden ersätta den gamla (Myles & Cui 2007).

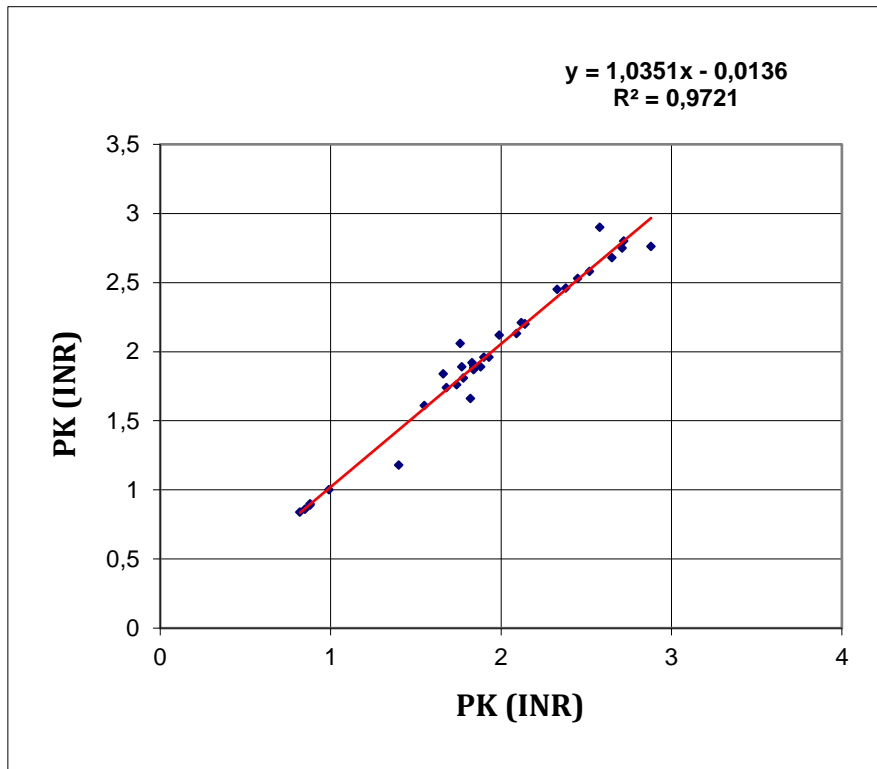
2.4. Etiska överväganden

Patienter på provtagningen på Klinisk Kemi tillfrågades om medgivande till att ytterligare ett kapillärt PK-rör kunde tas i forskningssyfte. Detta gällde för patienter som normalt sett tar kapillärt PK. Patienter som lämnade venöst prov tillfrågades om de ger sitt medgivande för att lämna 2 kapillära PK-rör i forskningssyfte utöver sitt venösa PK-prov. Även personal på Klinisk Kemi i Karlshamn tillfrågades. De prover som endast togs som kapillärt PK kördes med LID-nummer och när resultatet skrevs över till en Excelfil fick provet ett unikt ID istället. Därför är alla prover i studien avidentifierade och inga personuppgifter sparades med undantag av uppgifter om provet tillhör en warfarinbehandlad patient eller inte.

3. Resultat

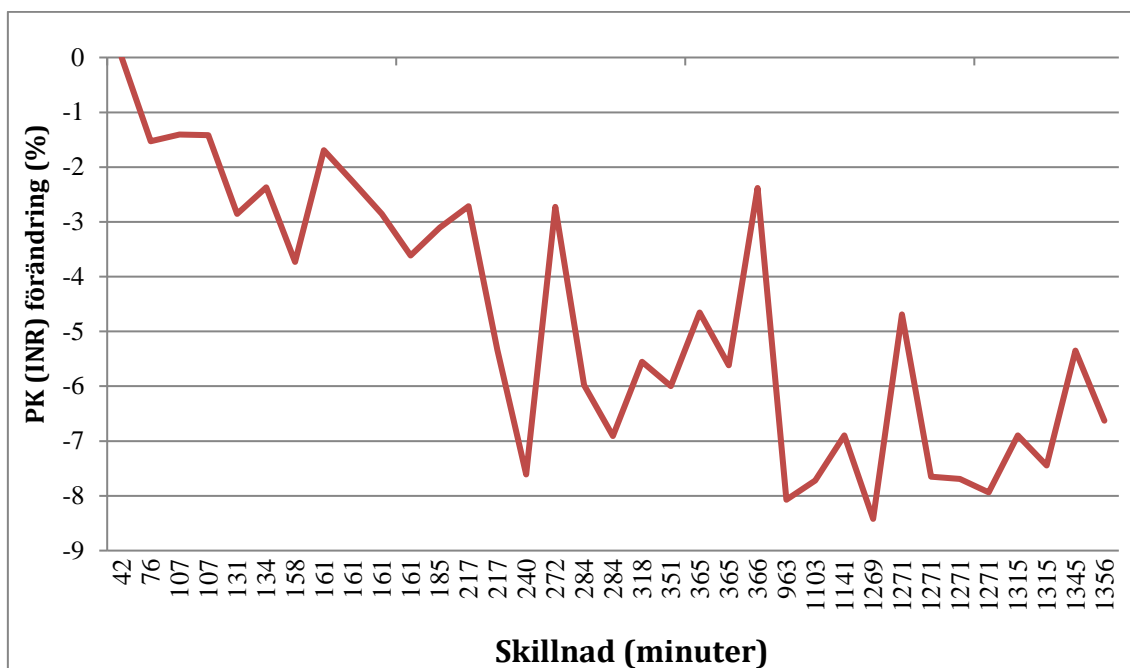
$T_{(obs)}$ beräknades i Microsoft Excel med parat t-test till 2,03. $T_{(krit)}$ för $p = 0,05$ signifikans är 1,69. Då $T_{(obs)} > T_{(krit)}$ är skillnaden mellan provserierna signifikant till $p = 0,05$.

De 35 centrifugerade och icke-centrifugerade kapillära PK (INR) provernas INR-värde (se Tabell 1 i Bilaga) jämfördes med hjälp av ett spridningsdiagram. Metodernas korrelation ($R^2 = 0,9721$) påvisas i Figur 2.



Figur 2. Spridningsdiagram där metoderna jämförs. Determinationskoefficienten är 0,9721. Regressionslinjens ekvation är $y = 1,0351x - 0,0136$.

Då helblod förvarades i rumstemperatur minskade PK (INR) värdet för alla 35 prover. Påverkan i hållbarheten upp till 24 timmar visades att inte vara mer än 8,4 % (Figur 3).



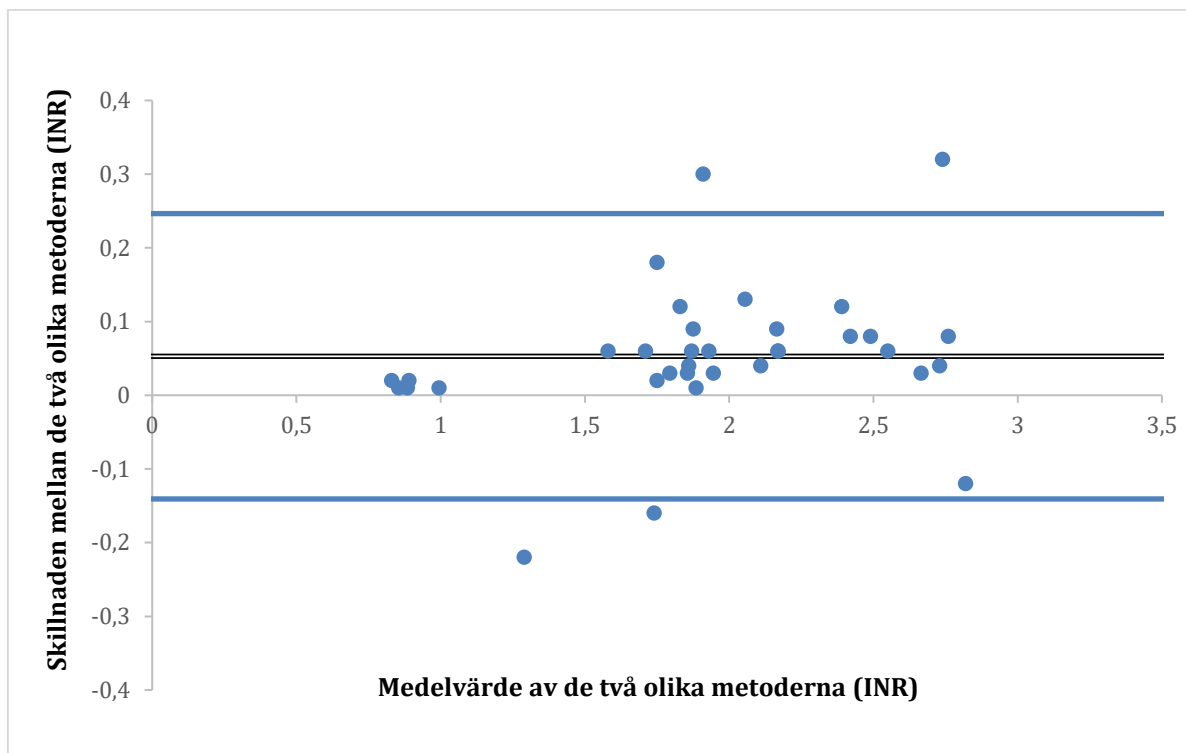
Figur 3. Hållbarheten för helblodsproverna visas i procentuell skillnad från den första mätningen.

Medelvärdet, standardavvikelsen och variationskoefficienten för båda metoder visas i Tabell 1.

Tabell 1. Båda två metodernas (plasma och helblod)- medelvärde (M), standardavvikelse (SD) och variationskoefficient (CV) visas i tabellen.

	Plasma	Helblod
M:	1,90	1,95
SD:	0,55	0,58
CV:	29,15	29,77

I Bland-Altman diagrammet (Figur 4) observerades att biasen är 0,05 INR högre för helblodsproverna. Övre limit of agreement i Bland-Altman diagram (Figur 4) var vid 0,25 och den lägre vid 0,14 INR.



Figur 4. Bland-Altman diagram där skillnaderna mellan metodernas resultat redovisas. Översta linjen är övre limit of agreement (95 %), mellersta är bias och understa är undre limit of agreement (95 %).

4. Diskussion

Plasma används främst som provmaterial för venösa och kapillära prover men helblod kan användas för kapillära prover för ett flertal instrument och metoder (Bamford et al. 2000). Användningen för helblod är främst till patientnära analyser. Fördelar med detta är enkelheten eftersom analysen kan ske direkt och patienten kan erhålla sitt PK (INR) värde i samband med själva provtagningen (Maddox, Bogo, McGregor, Pippard & Kerr 2007). Eftersom Sta R Max (Stago, Frankrike) metod är mekanisk och inte optisk är den lämplig för analysera kapillära PK på helblod (Bamford et al. 2000). Det har dock inte undersökts hur väl resultaten på helblod korrelerar vid analys av helblod och plasma med just metoden som används i detta instrument.

I denna studie jämfördes PK (INR) för helblod och plasma som tagits kapillärt. Detta gjordes genom att dubbelprov togs och det ena provet centrifugerades och analyserades

på plasma och det andra analyserades direkt på helblod. Proverna återanalyserades inom ett spann på 2-24 timmar för att undersöka hållbarheten. Statistiska jämförelser gjordes med hjälp av parat t-test för att undersöka om det fanns en signifikant skillnad ($p \leq 0,05$). Spridningsdiagram användes för att undersöka korrelationen och Bland-Altman diagram användes för att undersöka bias och konfidensintervall.

Resultaten från studien visade att metoderna hade en hög korrelation ($R^2 = 0,9721$). Korrelationen är god eftersom den vid tidigare studier där helblod jämförts med plasma vanligtvis har varit mellan 0,70-0,96 (Amukele, Ferrel & Chandler 2010). Medelvärde, SD och CV var alla högre för helblodsmetoden och skillnaden i medelvärde visade sig vara signifikant i ett parat t-test ($p \leq 0,05$).

I Bland-Altman diagrammet (Figur 4) observerades att 95 % av helblodsproverna inte kommer att vara mer än 0,25 INR högre eller 0,14 INR lägre i jämförelse med plasmaprovernas värde. En acceptabel skillnad brukar generellt sett vara 10 % (Toulon et al. 2017). Då medelvärdet för plasma var 1,9 (Tabell 1) är en 10 % förändring 0,19 INR vilket de flesta proverna är inom. Trots den signifikanta skillnaden ($p \leq 0,05$) är den kliniska påverkan med dessa variationer alltså låg. Skillnaden är liten men blir signifikant då helblodsvärdena konstant genererar högre värden. Påverkan av förvaring bör inte ha en klinisk påverkan då analyser genomförs inom ett dygn efter provet tagits (Landstinget Blekinge u.å.b). I tidigare studier där PK (INR) värdet på plasma och helblod jämförs på samma instrument har det framkommit att hematokrit, d.v.s. andelen röda blodkroppar, påverkar INR-värdet (Bamford et al. 2000). För att kompensera för hematokritens påverkan behöver helblodsmetoden justeras. Påverkan av hematokriten kvarstod dock fortfarande även efter justering eftersom patienter med mycket höga värden (polycytemi) eller med mycket låga värden (anemi) avviker från den normala värden när olika intervaller av hematokrit testades (Bamford et al. 2000).

I den här studien ökade inte bias vid höga eller låga INR-värden (Figur 4). I andra studier är påverkan av hematokrit störst vid höga INR-värden och även då korrigerade värden användes där hänsyn tas till hematokriten är skillnaden signifikant större då hematokriten avviker över 10 % från normal hematokritnivå (Amukele, Ferrel & Chandler 2010). Vid mer avvikande värden måste en enskild korrigerings göras vid varje prov för att erhålla

samma resultat som plasmavärdet vilket avsevärt ökar svarstiden (Amukele, Ferrel & Chandler 2010). För INR-värden under 4,0 bör helblodsmetoden vara tillräckligt noggrann (Maddox, Bogo, McGregor, Pippard & Kerr 2007).

Även resultat från plasma påverkas av hög hematokrit dock finns det inga rekommendationer om att justera resultaten (Marlar, Robyn, Potts & Audrey 2006). Effekten beror på att citratkoncentrationen ökar vid förhöjd hematokrit och fritt kalcium binds in vilket medför att koagulationsreaktionen förlängs och följderna blir ett högre INR-värde (Marlar, Robyn, Potts & Audrey 2006). Detta förklarar helblodets förhöjda medelvärde då helblodet har en avsevärt högre hematokrit. Detta problem påverkar även andra metoder och instrument såsom Coagu-Chek (Van den Besselaar, Witteveen & Van der Meer 2018). För att helblodsresultaten ska bli pålitligare behövs det sättas upp en ny metod där PK-buffertens citratnivå förändras så att likvärdiga resultat som vid plasmaanalys kan uppnås (Marlar, Robyn, Potts & Audrey 2006).

En bidragande faktor till att en skillnad kunde ses mellan metoderna kan vara att det med kapillär provtagning är svårt att erhålla likvärdiga resultat för varje prov då provet späds och blandas manuellt. Luftbubblor och dålig pipetteringsteknik kan ge mätbara skillnader mellan de olika proverna trots att de tagits samtidigt. Vid god provtagning ger dock inte kapillär provtagning sämre resultat (Lucas et al. 1987).

Hållbarhetsundersökningen visade att det sker en mycket liten förändring i INR-värde under 2 timmar (<2 %). Vid 2-24 timmar visar det sig att värdet sjunker men inte tillräckligt för att ge någon klinisk påverkan. Detta stämmer överens med riktlinjerna för hållbarhet i Landstinget Blekinge för plasma där hållbarheten anges till 24 timmar i rumstemperatur (Landstinget Blekinge u.å.b). Hållbarheten då analys sker på helblod har inte förändrats. Detta stämmer även överens med studier där rekommendationen som ges är att helblod ska analyseras inom 24 timmar men eventuellt är tillräckligt stabilt för att analyseras inom 48 timmar vid rumstemperatur (Rao, Okorodudu, Petersen & Elghetany 2000). PK (INR) har alltså en hög hållbarhet, de flesta studier använde gränsen 10 % förändring som gräns för vad som var acceptabelt (Toulon et al. 2017) vilket ingen av de observerade skillnaderna i denna studie överstiger.

5. Slutsats

H_0 kan förkastas eftersom det finns en signifikant skillnad mellan metoderna. Trots den signifikanta skillnaden är själva kliniska påverkan låg och det är möjligt att helblod utan justering av metoden kan ersätta plasma som provmaterial. För att erhålla mer lika värden behöver en justering göras. Detta kan göras genom att använda en PK-buffert med minskad citratkoncentration för att sänka koncentrationen i provet. Hållbarheten är god inga förändringar i riktlinjer skulle behöva göras angående hållbarheten.

6. Tackord

Jag vill tacka mina handledare på klinisk kemi i Karlshamn, Carin, Lindqvist och Cecilia Thege för all hjälp och stöd jag har fått under projektets gång. Jag vill också rikta ett stort tack till all personal som gjorde arbetet möjligt genom att ta sig tid och svara på frågor och ställa upp med provtagningen.

Tack till min skrivhandledare Fariba Vaziri-Sani för all hjälp och tack till kursansvarig Ann-Sofi Rehnstam-Holm för all information om hur man skriver ett examensarbete på bästa sätt.

7. Referenser

Amukele, T. K., Ferrell, C. & Chandler, W. L. (2010). Comparison of Plasma With Whole Blood Prothrombin Time and Fibrinogen on the Same Instrument. *American Journal of Clinical Pathology*, 133(4), ss. 550-556. DOI: 10.1309/AJCPLDT9OVX1TDGT

Bamford, E. J., Bowen, R. H., Broad, J. P., Hawken, A., Morgan, J., Owen, C. L., Powell, L., Sullivan, B. C., Tollick, H., Wakeman, L., Lewis, M. S. & Beddall, A. C. (2000). A capillary whole blood method for measuring the INR. *Clin Lab Haem*, 22(5), ss. 279-285. DOI: 10.1046/j.1365-2257.2000.00331.x

Boulanger, L., Kim, J., Friedman, M., Hauch, O., Foster T. & Menzin, J. (2006). Patterns of use of antithrombotic therapy and quality of anticoagulation among patients with non-valvular atrial fibrillation in clinical practice. *Int J Clin Pract*, 60(3), ss. 258–264. DOI: 10.1111/j.1368-5031.2006.00790.x

Edström, A. (2012). Provtagning, kapillär (bloduppsamling). Akademiska laboratoriet ID: AL7640-2.

<http://www.lul.se/Global/Kunskapsbanken/Sjukv%C3%A5rd/PV%20laboratorieinformation/Metodbeskrivningar/AL7640-2%20Ub%20Provtagning,%20kapill%C3%A4r.pdf>

Favaloro, E. J., Dorothy, M., Funk, M. D., Lippi, G. (2012). Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis. *Laboratory Medicine*, 43(2), ss. 1-10. DOI: 10.1309/LM749BQETKYPYPM

Favaloro, E. J., McVicker, W., Lay, M., Ahuja, M., Zhang, Y., Hamdam, S. & Hocker, N. (2016). Harmonizing the International Normalized Ratio (INR): Standardization of Methods and Use of Novel Strategies to Reduce Interlaboratory Variation and Bias. *Am J Clin Pathol*, 145(2), ss.191-202. DOI: 10.1093/ajcp/aqv022

Hillarp, A., Dahlbäck, B. & Strandberg, K. (red.) (2012). *Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin*. 9. uppl., Lund: Studentlitteratur.

Hillarp, A., Fagerberg, I., Lindahl, T. L., Nordin, G. & Stigendal, L. (2002). Mer samstämmiga laboratorieresultat efter övergången till INR. *Läkartidningen*, Nr 50 (99), ss. 5068-5079. <http://www.lakartidningen.se/OldArticlePdf/#!/2002/25889>

Komen, J., Forslund, T., Hjemdahl, P., Andersen, M. & Wettermark, B. (2017). Effects of policy interventions on the introduction of novel oral anticoagulants in Stockholm: an interrupted times series analysis. *Br J Clin Pharmacol*, 83(3), ss. 642-652. DOI:10.1111/bcp. 13150

Landstinget Blekinge. (u.å.a). Metodbeskrivning P-PK. Internt dokument. [2018-03-20]

Landstinget Blekinge. (u.å.b). Analysportalen NPU01685 PK, Protrombinkomplex – P. www.ltblekinge.se [2018-05-07]

Lucas, V. L., Duncan, A., Jay, R., Coleman, R., Craft, P., Chan, B., Winfrey, B. A., Mungall, D. R. & Hirsh, J. (1987). A Novel Whole Blood Capillary Technic for Measuring the Prothrombin Time. *Am J Clin Pathol*, 88(4), ss. 442-446. <https://doi.org/10.1093/ajcp/88.4.442>

Myles, P. S. & Cui, J. (2007). Using the Bland–Altman method to measure agreement with repeated measures. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 99(3), ss. 309–311. <https://doi.org/10.1093/bja/aem214>

Maddox, J. M., Bogo, P. H., McGregor, E., Pippard, M. J. & Kerr, R. (2007). Quality assurance for point-of-care testing of oral anticoagulation: a large-scale evaluation of the Hemochron Junior Signature Microcoagulation System. *Int J Lab Hematol*, 31(2), ss.142-150. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2007.01013.x.

Marlar, R. A., Robyn, M., Potts, M. D. & Audrey, A. (2006). Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol*, 126(3), ss. 400-405. DOI: 10.1309/RRQKT2JEYV33D19D

Pirmohamed, M. (2006). Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 62(5), ss. 509-511. DOI:10.1111/j.1365-2125.2006.02806.x

Rao, L. V., Okorodudu, A. O., Petersen, J. R. & Elghetany, M. T. (2000). Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. *Clinica Chimica Acta*, 300(1–2), ss. 13-21. [DOI:10.1016/S0009-8981\(00\)00288-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(00)00288-6)

Stago. (2015). Insert STA SPA +. REF 00330. <https://www.stago.com/products-services/instructions-for-use/>

Stago. (2007) STA-R Evolution Reference Manual. Artikelnummer 0931634-NT
<https://www.fda.gov.tw/MLMS/ShowFile.aspx?LicId=06020967&Seq=002&Type=9>

Toulon, P., Metge, S., Hangard, M., Zwahlen, S., Piaulenne S. & Besson, V. (2017). Impact of different storage times at room temperature of unspun citrated blood samples on routine coagulation tests results. Results of a bicenter study and review of the literature. *Int J Lab Hematol*, 39(5), ss. 458-468. DOI: 10.1111/ijlh.12660

Van den Besselaar, A. M., Witteveen, E. & Van der Meer, F. J. (2008). Influence of haematocrit on international normalised ratio (INR) differences between a whole blood point-of-care coagulation monitor and reference prothrombin time in plasma. *Thromb Haemost*, 100(6), ss.1181-1184.

8. Bilagor

8.1. Tabell 1. Rådata för de 35 prover.

	Plasma	Helblod
1	1,9	1,96
2	2,14	2,2
3	2,45	2,53
4	1,84	1,87
5	1,78	1,81
6	1,84	1,88
7	2,58	2,9
8	1,84	1,9
9	1,83	1,92
10	2,12	2,21
11	1,88	1,89
12	1,93	1,96
13	1,68	1,74
14	2,38	2,46
15	2,65	2,68
16	2,14	2,2
17	1,55	1,61
18	2,72	2,8
19	2,09	2,13
20	1,99	2,12
21	1,77	1,89
22	0,99	1
23	0,82	0,84
24	0,88	0,89
25	0,85	0,86
26	0,88	0,9
27	2,71	2,75
28	1,66	1,84
29	2,88	2,76
30	2,52	2,58
31	1,76	2,06
32	1,82	1,66
33	1,74	1,76
34	2,33	2,45

35	1,4	1,18
----	-----	------

8.2. Tabell 2. Tidpunkt för analys och omanalys av helbod.

	PK (INR) 1	PK (INR) 2	Tid 1	Tid 2
1	1,96	1,93	13:41	14:57
2	2,23	2,05	14:57	08:40
3	2,53	2,47	08:28	10:42
4	1,87	1,77	09:48	08:13
5	1,81	1,69	09:37	08:13
6	1,88	1,74	10:18	08:13
7	2,9	2,7	10:18	08:13
8	1,9	1,74	11:04	08:13
9	1,92	1,83	11:04	08:15
10	2,21	2,04	11:04	08:15
11	1,89	1,74	11:04	08:15
12	1,96	1,81	11:04	08:15
13	1,74	1,62	13:16	08:15
14	2,46	2,27	14:20	08:43
15	2,68	2,58	12:27	15:05
16	2,2	2,14	09:01	13:33
17	1,61	1,56	10:28	13:33
18	2,8	2,72	11:22	13:33
19	2,13	2,1	11:46	13:33
20	2,12	2,09	11:46	13:33
21	1,89	1,89	13:02	13:44
22	1	0,94	08:47	14:38
23	0,84	0,82	08:43	14:49
24	0,89	0,84	08:44	14:49
25	0,86	0,82	08:44	14:49
26	0,9	0,85	09:31	14:49
27	2,75	2,56	10:00	14:44
28	1,84	1,73	10:00	14:44
29	2,76	2,55	10:44	14:44
30	2,58	2,51	11:07	14:44
31	2,06	1,95	11:07	14:44
32	1,66	1,6	12:24	15:05
33	1,76	1,72	12:24	15:05

34	2,45	2,38	12:24	15:05
35	1,18	1,16	12:27	15:05