



**Examensarbete, 15 hp, Kandidatexamen i biomedicinsk
laborativvetenskap
HT 2015**

Påverkan på PK(INR)-värdet efter olika preanalytiska behandlingar i venöst humanblod

Sektionen för hälsa och samhälle

Författare: Khashayar Mahdavisabet

Titel: Påverkan på PK(INR)-värdet efter olika preanalytiska behandlingar i venöst humanblod.

Handledare: Fariba Vaziri-Sani, Doktor i Medicinsk Vetenskap, Docent i experimentell autoimmun diabetes, Högskolan Kristianstad.

Martin Masla, Biomedicinare, Klinisk kemi Helsingborg.

Karin Strandberg, Överläkare, Labmedicin i Skåne, Klinisk kemi.

Examinator: Ann-Sofi Rehnstam-Holm. Leg. BMA, professor i mikrobiologi

Sammanfattning

Venös tromboembolism orsakar blodproppar i blodkärl och försämrar blodcirkulationen. Detta kan bero på förändringar på en eller flera av koagulationsfaktorerna, II, VII, IX och X. Patienter som har haft tromboembolism eller hjärt-kärlsjukdomar behandlas med antivitamin-K (Waran®) som reducerar koagulationsfaktorer och förebygger recidiv. Waran används även som förebyggande behandling före sjukdomen. En överdosering av waran kan orsaka blödningskomplikationer medan en lågdosering riskerar bildning av blodproppar. Dosering av läkemedlet kontrolleras genom mätning av protrombinkomplex i plasma. På klinisk kemi i Helsingborg centrifugeras alla protrombinkomplex-prover som inkommer från primär- och slutenvård, men vissa av dessa prover centrifugeras även inom primärvården i Ängelholm. Detta innebär att dessa prover återcentrifugeras i Helsingborg. Syftet med denna studie var att undersöka hur protrombinkomplex-värdet påverkas vid återcentrifugering samt återanalys efter sex timmar.

I studien sorterades 50 venösa blodprover från waranbehandlade patienter i tre grupper, de med protrombinkomplex-värdet 2-4 (n=20), >4 (n=15) och <2 (n=15). Proverna analyserades efter direkt centrifugering (metod A), efter återcentrifugering (metod B) och efter återanalys efter sex timmar (metod C). Alla resultaten jämfördes med hjälp av Bland-Altman som utvärderar skillnader mellan två olika metoder enligt följande här: metod B mot metod A och metod C mot metod A. Bland-Altman plot Spridningsdiagrammet gav en stark korrelation, $R^2=0,9984$ mellan metod A och metod B respektive $R^2=0,9977$ mellan metod A och metod C. Resultat av t-test analys gav i båda fallen en signifikans på $p<0,001$ (statistiskt signifikansnivå= $p<0,05$). Studien visades att protrombinkomplex-värdet var stabilt efter återcentrifugering samt återanalys.

Nyckelord

Venös tromboembolism, protrombinkomplex, antivitamin-K, waran, återcentrifugering, blodproppar, koagulationsfaktorer.

Author

Khashayar Mahdavisabet

Title

The impact of the PT(INR)-value after different preanalytical treatments in venous human blood.

Supervisor

Fariba Vaziri-Sani, PhD at Medical Science, Associate Professor at Experimental Autoimmune Diabetes, Kristianstad University.

Martin Masla, Biomedical scientists, Clinical Chemistry Helsingborg.

Karin Strandberg, MD, Labmedicin in Skåne, Clinical Chemistry.

Examiner

Dr. Ann-Sofi Rehnstam-Holm, Registered Biomedical Scientist, Professor at Mikrobiology

Abstract

Venous thromboembolism that cause blood clotting in blood vessels, prevent blood circulation, depending on changes in one or more of the coagulation factors II, VII, IX and X. Patients who have had a blood clot or cardiovascular diseases are treated with oral anti-vitamin K (Warfarin®) to reducing and prevent relapse. Warfarin is also used as a preventive treatment before the disease. An overdose of Warfarin® may cause bleeding-complications and low dose cause blood clotting. The dosage of the drug is controlled by measuring prothrombin in plasma. The aim of this study was to investigate if prothrombin-complex value changes due to re-spinning and re-analysis after six hours.

Fifty whole blood samples from warfarin-treated patients were divided into three subgroups, those with prothrombin-complex-values of 2-4 (n=20), >4 (n=15) and <2 (n=15). The samples were centrifugated and measured (Method A), re-centrifugated and measured (Method B) or re-analysed after six hours (Method C). All results were compared in a Bland-Altman plot as follows: Method B vs. Method A and Method C vs. Method A. The scatter graph yielded a strong correlation between Method A and Method B ($R^2=0.9984$) and Method A and Method C ($R^2=0.9977$). The results from t-test showed a significance level ($p<0.001$) for both analyses (statistical significance= $p<0.05$). In this study we showed that prothrombin complex value were stable after re-centrifugation and re-measurement after six hours. Statistical calculations yielded a strong correlation between the methods (A, B, C), and there was no significance difference between the methods.

Keywords

Venous thromboembolism, prothrombin complex, Warfarin®, anti-vitamin K, re-spin, blood clotting, coagulation factors.

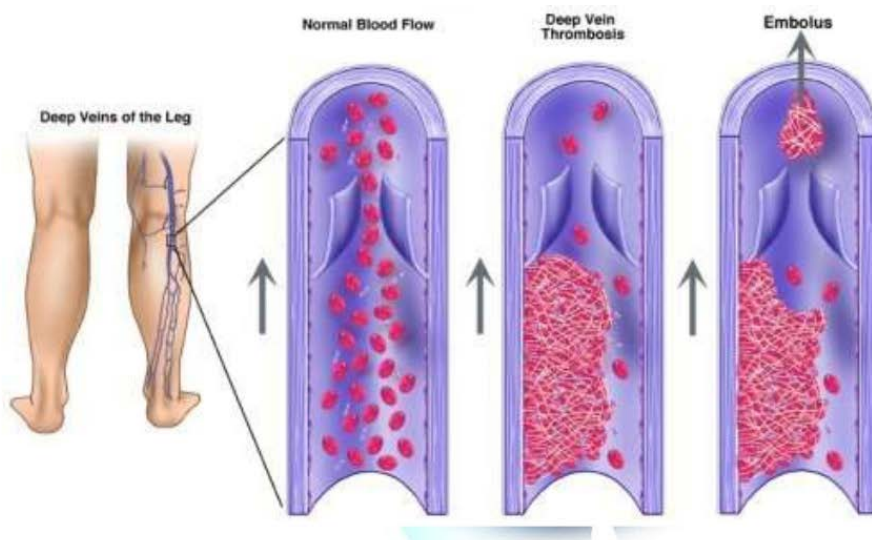
Innehåll

1.1 Introduktion	5
1.1.1 Tromboembolism	5
1.1.2 Waran	7
1.1.3 Owren- och Quick-analysmetoder.....	8
1.1.4 Syfte och frågeställningar.....	10
1.2 Material och metod.....	11
1.2.3 Statistisk bearbetning	12
1.3 Resultat.....	12
1.4 Diskussion	15
1.5 Konklusion	16
1.6 Tackord.....	17
1.7 Referenser.....	18
1.8 Populärvetenskaplig sammanfattning.....	22
1.9 Bilaga.....	24
1.9.1. Tabell I	24
1.9.2 Bilaga 2.....	25

1.1 Introduktion

1.1.1 Tromboembolism

Tromboembolism innebär bildningar av blodproppar som kan orsaka olika sjukdomar bland annat djup ventrombos (DVT) och lungemboli (LE). Båda tillstånden orsakas av samma patofysiologiska processer och kallas därför även för venös tromboembolism (VTE) (Kasthuri & Key, 2012). Vid VTE koagulerar blodet i vensystemet vilket kan resulterat i en DVT. Vid DVT är blodproppar belägna i vensystemet djup i benen eller bäckenet, med svullnad och måttlig smärta som symptom (Lavorini *et al*, 2013). DVT kan utvecklas till lungemboli (LE) genom att en trombos (blodpropp) lossnar från DVT för att sedan färdas via vensystemet och fastnar i en eller flera lungartärer. Detta leder till ett försämrat blodflöde och mer tryck på höger hjärtkammare vilket kan orsaka hjärt-kärlsjukdomar, till exempel förmaksflimmer. LE är ett livshotande tillstånd (Lavorini *et al*, 2013). Normalt blodflöde hos en frisk person jämförs med en patient som har DVT vilket kan leda till LE, figur 1 (Larriva 2014).



Figur 1. Normalt blodflöde (vänster) och ventrombos som orsakar venös tromboembolism (VTE) Larriva (2014).

Blodproppar som bildats hos patientens blodkärl orsakar av DVT försämrats blodflöde i vänsterbenet, figur 2 (Noble *et al*, 2008).



Figur 2. Djup ventrombos i vänsterben. Blodproppar fastnar i venerna och försämrar blodflödet Noble *et al.* (2008).

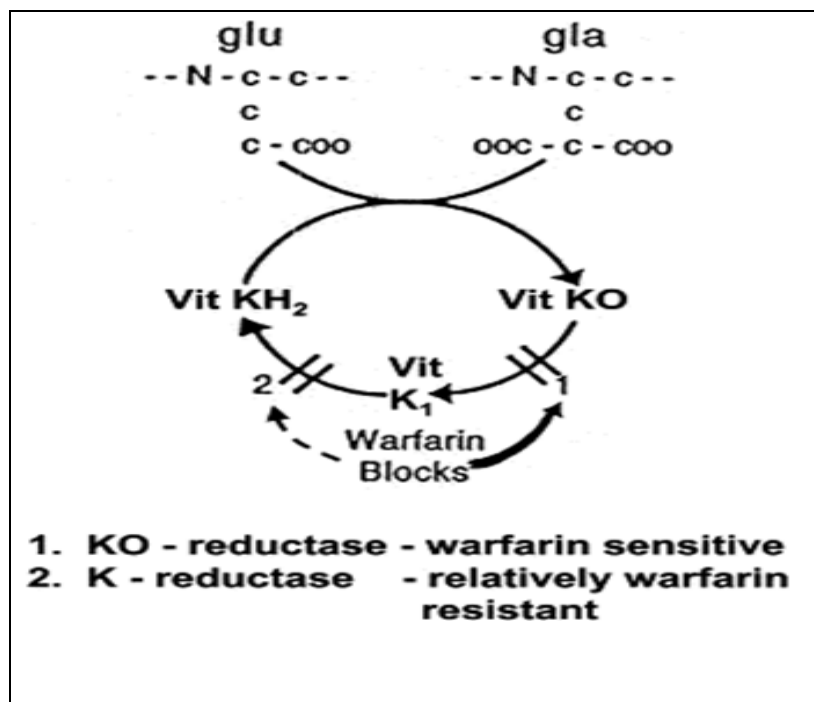
Venös tromboembolism kan antingen vara ärftlig (t.ex. vid trombofili) eller förvärvad. Ärftlig trombofili orsakas av genetiska förändringar i en eller flera av koagulations- eller antikoagulationsfaktorerna. Enligt Almawi *et al.* (2005) variationer i singla nukleotider polymorfism (SNPs) i de genetiska koderna på blod koagulationsfaktorer leder till förändringar i koagulationsfaktorer V Leiden (FVL) och protrombin mutation G20210A (PGM) som orsakas av mutation i protrombin (faktor II). I sin studie beskriver Kasthuri *et al.* (2012) att FVL är en aminosyra som tillsammans med enzymet protein C inaktiverar blodkoagulationen. Mutation i naturlig antikoagulationsfaktorer såsom Protein C (PC), Protein S (PS) och antitrombin (AT) orsakar förändringar i koagulationsfaktorer t.ex. VIII, IX, XI och fibrinogen (Kasthuri & Key, 2012).

Förvärvade riskfaktorer som orsakar VTE ökar med ålder, t.ex. är risken hos personer som är över 80 år 100 gånger större än hos barn. Kvinnor i barnafödande ålder har större risker än män för att utveckla VTE. Fetma och rökning är också andra riskfaktorer (Kasthuri & Key, 2012).

1.1.2 Waran

Waran (Warfarin®) är ett antivitamin- K läkemedel (AVK) som används för förebyggande behandling och vid behandling av tromboembolism (Lee *et al.*, 2014). Waran är ett effektivt läkemedel för att förebygga VET och LE. Läkemedlet använts t.ex. även för behandling av patienter som har hjärt-kärlsjukdomar, förmaksflimmer eller de som har fått mekanisk klaffprotes (Söderström & Nilsson, 2008).

K-vitamin är en kofaktor som karboxylerar glutaminsyra till γ - karboxylglutamat på N-terminalen i K-vitaminberoende proteiner (Hirsh *et al.*, 2003). K-vitaminberoende proteiner består bl.a. av koagulationsfaktorerna II, VII, IX och X. Aktivering av dessa faktorer kräver K-vitamin för γ -karboxylering. Waran inhiberar K-vitamin vilket leder till reducering av K-vitaminberoende koagulationsfaktorer. Waran reducerar bildning av vitamin K₁ till vitamin KH₂. Vitamin K₁ är ett vitamin som intas i kroppen via mat och vitamin KH₂ är ett substrat som deltar i K-vitamincykel, se figur 3.



Figur 3. Waran-verkningsmekanism i K-vitamincykel. I kroppen bildas K-vitamin till vit KH₂. Vit KH₂ aktiverar K-vitaminen beroende koagulationsfaktorer II, VII, IX och X genom att karboxylera glutamatsyra till γ -karboxylglutamat för att sedan bildas till vit KO. Waran blockerar K-vitamincykel (Hirsh *et al*, 2003).

Överdoserering av waran ökar risken för blödningskomplikationer medan en för låg dosering kan vara ineffektiv eller orsaka tromboembolism eller andra hjärt- och kärlsjukdomar (Lee *et al*, 2014). Den dosering av waran som krävs för optimal behandling varierar mellan olika individer vilket kan bero på flera faktorer t.ex. genetiska. Genetiska orsaker utgörs ofta av mutationer i cytokrom P450 2C9 (CYP2C9) som är ett enzym och påverkar kroppens metabolism av läkemedel, samt enzymet K-vitamin epoxide reductase complex, subunit 1 (VKORC1) som reducerar K- vitamin funktionen i kroppen (Lee *et al*, 2014). Andra faktorer som kan påverka är ålder, kroppsvolym, kost och andra läkemedel. Effekten av waran kan kontrolleras genom P-protrombinkomplex International Normalized Ratio (P-PK (INR)) analys. Högt PK (INR)-värde indikerar en överdosering av waran (Lee *et al*, 2014).

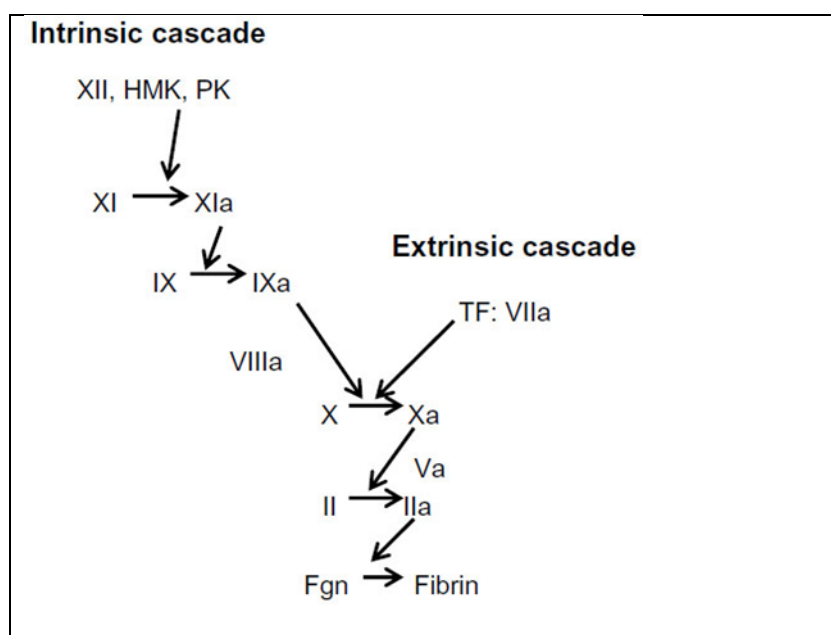
1.1.3 Owren- och Quick-analysmetoder

Vid PK(INR)-analys mäts den samlade aktiviteten av koagulationsfaktorerna II (protrombin), VII och X. Resultatet uttrycks i International Normalized Ratio (INR)

vilket rekommenderas av en arbetsgrupp inom kvalitetssäkringsorganet Equalis. INR är en kvot mellan patientens koagulationstid och koagulationstid i en normal plasma som beräknas enligt formeln: $INR = (KT_{prov}/KT_{normal})^{ISI}$, där KT_{prov} =koagulationstid per sekund för patientens prov, KT_{normal} =koagulationstid per sekund för normalt prov, ISI=reagens-/instrumentspecifik korrektionsfaktor (Egberg *et al.*, 1999).

Vid analys av P-PK(INR) kan två metoder användas, Owren och Quick. Metoden enligt Owren utvecklades av Paul Owren på 1950-talet (Owren, 1959). Metoden används i nordiska länderna, Belgien, Nederländerna och Luxemburg (Horsti, 2009). Owren är specifik för mätning av faktor II (protrombin) och faktor VII och X (Lindahl, 2012). Vid Quick mäts protrombin, faktor VII, X även fibrinogen och faktor V. Owrens reagens innehåller kalciumjoner, tromboplastin (faktor III och fosfolipider) från kanin och bovin plasma som saknar faktorerna II, VII och X. Quick reagens är en blandning av tromboplastin och kalciumjoner (Lindahl, 2012).

Koagulationskaskaden förklarar de två koagulationsvägarna intrinsic- respektive extrinsic-vägen vid aktivering av koagulationsprocess, figur 4 (Puetz, 2014). Vid P-PK (INR) analys enligt Owren mäts koagulationstid i extrinsic-vägen. Extrinsic- vägen är beroende av faktor III. Denna faktor binds till faktor VIIa och startar därmed aktivering av faktorerna X och IX (van den Besselaar *et al.*, 2010).



Figur 4. Koagulationskaskaden. Vid Owren-metoden mäts P-PK (INR) aktiviteten i extrinsic-vägen (Puetz, 2014).

Vid Owren-metoden analyseras blodprover i provtagningsrör med citrat tillsats. Röret innehåller natriumcitrat som förhindrar blodet att koagulera genom komplexbindning med blodets kalciumjoner. Plasma späds (1:7) med citratbuffert i t.ex. en Sysmex CS-2100i instrument reagenset, som innehåller bland annat faktor III, tillsätts och koagulationen via extrinsic-vägen startas. Den slutliga utspädningen av provmaterialet efter tillsättning av reagenset är 1:21 i Owren-metoden, medan slutspädningen i Quick-metoden är 1:3. Koagulationstiden mäts i sekunder och resultatet uttrycks i INR. PK(INR)-referensintervallen bestäms av Medicinservice (2015) och är $INR < 1,2$ för friska individer. Vid terapeutisk waran-behandling ska PK(INR) ligga mellan 2-4.

Owren- och Quick-metoderna jämfördes vid P-PK(INR)-analys i en studie av Horsti (2009). I studien analyserades 207 blodprover från waranbehandlade patienter. Enligt denna studie var Owren-metoden känsligare än Quick vid mätning av faktorerna II, VII och X. Känsligheten ökade bland waranbehandlade patienter med P-PK(INR)-värdet på >4 . Anledningen till att detta var en högre spädning vid Owren-metoden (1:21) jämfört med Quick-metoden (1:3) (Horsti, 2009).

1.1.4 Syfte och frågeställningar

Syftet med projektet var att undersöka P-PK(INR)-värdet för blodprover som transporteras till klinisk kemi Helsingborgs lasarett från primärvård i Ängelholm samt slutenvård och primärvård i Helsingborg. Målet var att ta reda på om och hur återcentrifugering kan påverka resultaten av P-PK(INR)-analyser. Vissa inom primärvården (från Ängelholm) centrifugerar PK(INR)-prover på plats, medan prover från andra primär- och slutenvård inte centrifugeras vilket innebär att det är svårt att avgöra vilka prover är centrifugerade eller inte när PK(INR)-analyser inkommer till klinisk kemi för analyser. Därför centrifugeras alla P-PK(INR)-prover på klinisk kemi. Enligt en tidigare studie ska prover endast centrifugeras en gång (Kitchen *et al*, 2013). De viktigaste frågeställningarna i denna studie var att ta reda på:

- Hur påverkas PK(INR)-värdet om proverna centrifugeras direkt kontra om proverna återcentrifugeras samt återanalyseras 6 timmar senare? Hur stor skillnad blir det i PK(INR)-värdet?
- Vad är skillnaden då PK(INR) ligger inom terapeutiskt område < 2 $2-4$ samt >4 ?

Resultaten från denna studie kommer att användas för att ta ställning till om återcentrifugering av prov är acceptabelt eller inte. Dosering av waran ska regelbundet kontrolleras hos behandlade patienter, därför är denna studie viktig för dessa patienter, eftersom ett förändrat PK(INR)-resultat potentiellt kan leda till en annan läkemedelsdosering.

1.2 Material och metod

PK(INR)-analysprover som undersöktes i denna studie var venösa blodprover ($n=50$) i citratrör 5,0 ml (4.5 mL BD Vacutainer®glass plasmatube, Lt. Blue BD Hemogard™ closure. Paper label. Additive: Buffered Sodium citrate, 0,109 M) från waranbehandlade patienter ($n=50$, >18 år gamla) varav $n=30$ från primärvård och $n=20$ från slutenvård.

PK(INR)-prover som inkom från primär- och slutenvård markerades med svart respektive röd penna och centrifugerades i centrifug (Rotanta 460 RS Hettich Zentrifugen, Team Medicin Service) vid $2200 \times g$ i 10 minuter och 20°C . Centrifugerade blodprover analyserades omedelbart i koagulationsinstrumentet, Sysmex CN-2100i (Sysmex Corporation, model CS-2100i Automaterd Blood Coagulation Analyzer, 11952, 2011, Sysmex Corporation, 1-5-1 Waleinohama-Kaigandori, Japan). Reagenset som används var Owren (Owren's PT med 5 dygn= 120h hållbarhet i instrumentet, Owren's Buffert med 1 dygn hållbarhet i instrumentet, Kalciumklorid $0,025\text{ mol/L}$ med 4 dygn hållbarhet i instrumentet). Kvalitetskontroll (interna- externa kvalitetskontroller) genomfördes enligt beskrivning: Interna kvalitetskontroll (NKP-162 GHI-162 och OKP-167B GHI-167B, Siemens Healthcare Diagnostics) genomfördes varje 8:e timme samt vid byte av reagensflaska. Externa kontroller utförs 10 gånger per år av External Quality Assurance in Laboratory Medicine In Sweden (EQUALIS) för tekniskt/medicinskt godkännande. Detta är ett kvalitetskontrollsystem som säkerställer att alla laboratorier inom regionen (med samma metod) ger samma resultat.

Resultatet skrevs ut efter denna analysmetod (metod A). Sedan sorterades analysprover enligt PK(INR)-värde 2-4 (n=20), >4 (n=15) och <2 (n=15). Proverna återcentrifugerades vid 2200×g, 10 minuter i 20°C och återanalyserades omedelbart (metod B). Till sist återanalyserades alla analysprover efter 6 timmar (metod C). Sammanfattningsvis tre olika analysmetoder ingick i denna studie: Metod A (direkt centrifugering och direkt analys), Metod B (direkt återcentrifugering) till följd av direkt analys, Metod C (återanalys efter 6 timmar). Prover som testades i denna studie var redan tagna och inkom till klinisk kemi på Helsingborgs lasarett, vilket ingick i rutinanalys. Därför en etisk övervägande för detta projekt inte var relevant.

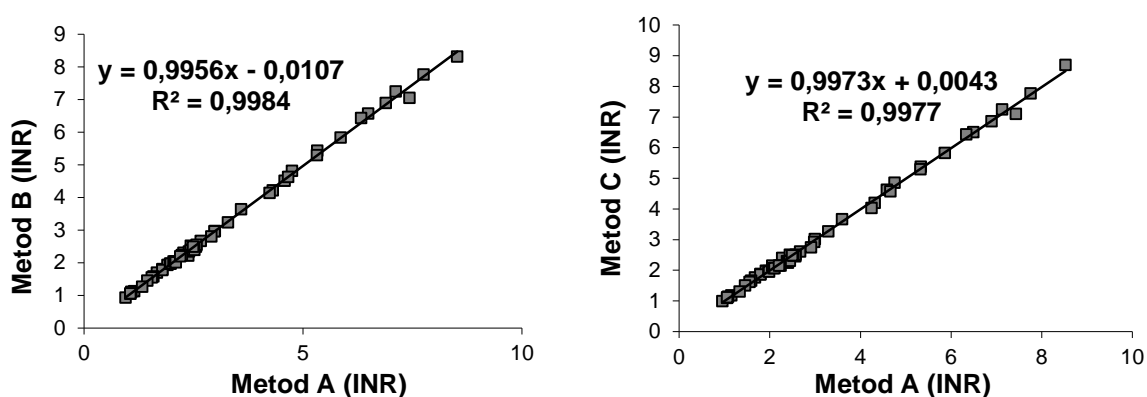
1.2.3 Statistisk bearbetning

Resultaten analyserades och statistiskt behandlades med hjälp av Bland-Altman plot (Bland & Altman, 1986). Mätvärden från två olika analyser jämfördes genom spridningsdiagram med regressionslinje, R-kvadrat. P-värde <0,05 beräknades som statistiskt signifikant i t-test. Diffanalysdiagram användes för att jämföra resultaten från metod A, B, och C med den tillåtna avvikelsen från EQUALIS (<10%).

1.3 Resultat

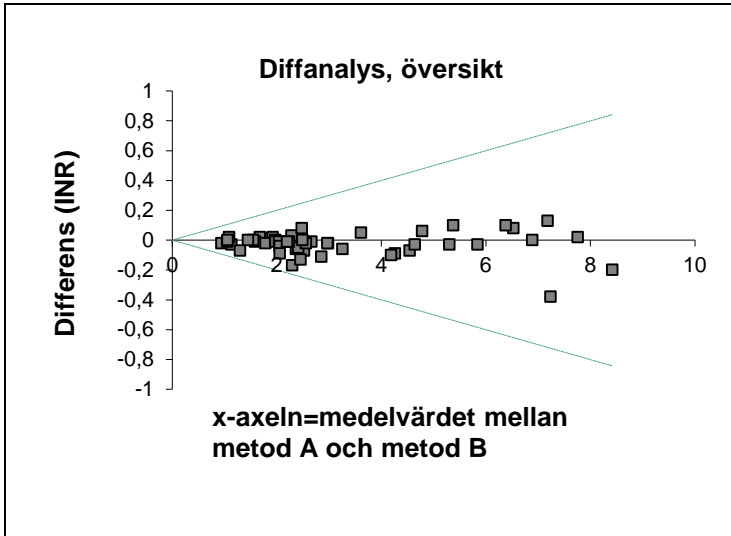
Venösa humanblod med olika PK(INR)-värdessintervall; <2 (n=15), 2-4 (n=20), och >4 (n=15) från waranbehandlade patienter (n=30 från primärvården, n=20 från slutenvård) analyserades med tre olika metoder. Vid statistiska beräkningar jämfördes resultaten från metod B (vid återcentrifugering) och metod C (återanalys efter 6 timmar.) mot metod A som referens där proverna centrifugerades en gång eller två gånger och analyserades direkt därefter. Rådata från resultaten presenteras i tabell I och tabell II i bilaga 1 och bilaga 2. Jämförelse mellan metod A (direkt analys efter första centrifugering) och metod B (direkt analys efter återcentrifugering) redovisas i figur 5 (spridningsdiagram till vänster). Detta bekräftade att PK (INR)-värdet var stabilt efter återcentrifugering vilket påvisades med en god korrelation ($R_2=0,9984$, $p<0,001$) och intercept ($y=0,9956x-0,0107$) för både metod A och B. Det fanns inga signifikanta skillnader mellan dessa två metoder (metod A och B) i figur 5 (till vänster). En stark korrelation mellan metod A och

metod C (analys efter 6 timmar) redovisas i figur 5 (spridningsdiagram till höger). Regressionsekvationen motsvarar lutningskoefficient och intercept ($y=0,9973x-0,0043$) samt determinationskoefficient ($R^2=0,9977$) och $p<0,001$ som visas i figur 5 (till höger) för alla prover ($n=50$). Det fanns inga signifikanta skillnader mellan dessa två metoder. Resultaten från jämförelse mellan dessa två metoder (metod A och C) bekräftade att PK (INR)-värde var stabilt vid återanalys efter 6 timmar.



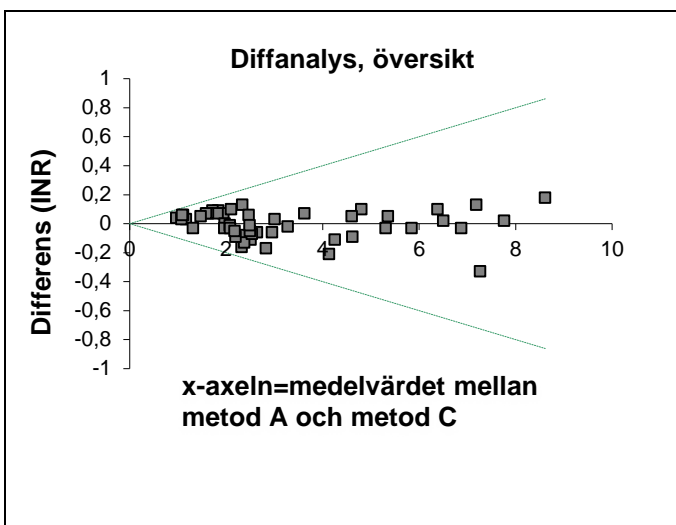
Figur 5. Spridningsdiagram med regressionslinje där korrelationskurvan vid jämförelse av metod B mot metod A motsvarar determinationskoefficient ($R^2=0,9984$), $p<0,001$ samt lutningskoefficient och intercept ($y=0,9956x-0,0107$) för 50 prover visas till vänster. Spridningsdiagram med regressionslinje där korrelationskurvan vid jämförelse av metod C mot metod A determinationskoefficient ($R^2=0,9977$), $p<0,001$ samt lutningskoefficient och intercept ($y=0,9973x-0,0043$) till höger.

Figur 6 visar den procentuella differens medelvärde av metod A och metod B, för 50 analysprover där x-axel visar medelvärden mellan metod A och metod B och y-axeln visar differens PK(INR)-värde mellan metod A och B. Resultaten låg innanför ”struten” vilket var i de allra flesta fallen långt under den tillåtna avvikelsen från EQUALIS (<10 %).



Figur 6: Den procentuella differensen av medelvärden mellan metod A och metod B, där x-axeln visar medelvärdet mellan metod A och metod B och y-axeln visar differens PK(INR)-värden mellan metod A och metod B för 50 analysprover. Resultaten som ligger innanför "struten" är <10%.

Figur 7 visar en procentuell differens medelvärdet av metod A och metod C, för 50 analysprover. x-axel visar medelvärden mellan metod A och metod C, och y-axeln visar differens PK (INR) mellan metod A och B. Resultaten låg innanför "struten" vilket var i de allra flesta fallen långt under den tillåtna avvikelsen från EQUALIS (<10 %).



Figur 7. Den procentuella differensen av medelvärden mellan metod A och metod C där x-axeln presenterar medelvärden mellan metod A och metod C och y-axeln visar differens PK(INR)-värde för 50 prover. Resultaten som ligger innanför "struten" är <10%.

1.4 Diskussion

I denna studie jämfördes påverkan av PK(INR)-värdet vid återcentrifugering samt återanalys efter 6 timmar. Tre olika metoder (metod A, B, C) jämfördes. Vid metod A centrifugerades blodprover och analyserades direkt samt sorterades enligt PK(INR)-värdet för vidare analys. Vid metod B återcentrifugerades och återanalyserades proverna direkt och till sist återanalyserades proverna efter 6 timmar. Resultaten från metod B jämfördes mot metod A samt metod C mot metod A. Statistiska beräkningar genomfördes för jämförelse med den tillåtna avvikelsen från EQUALIS (<10%). Resultatet från denna studie var långt under tillåtna avvikelsen från EQUALIS.

Enligt vår kännedom fanns inga relevanta studier om påverkning av återcentrifugering vid PK(INR)-analys, vid genomförandet av denna studie. Vid kommunikation med professor Giuseppe Lippi¹ (direktör vid avdelning för trombos och hemostasis, Universitetssjukhuset i Parma, Italien) och överläkare Karin Strandberg (processledare vid koagulation) diskuterades effekten av återcentrifugering av tidigare centrifugerade blodprover, vilket kan orsaka aktivering av trombocyter och frisättning av protrombin till följd. Han beskrev också att transporten av helblodprover skall ske inom 3 timmar.

För att påvisa hur PK(INR)-värdet påverkas av återcentrifugering samt återanalys efter 6 timmar, jämfördes metod C mot metod A. Resultaten gav en stark korrelation ($R^2=0,9977$, $p<0,001$). Det fanns inga signifikanta skillnader mellan metoderna vid t-test analys. Vid en tidigare studie med helblod beskrev Zhao och LV (2013) att PK(INR)-värdet var stabilt efter olika tidsintervall (0 timmar, 4 timmar, 8 timmar och 24 timmar) mellan blodprovstagning och centrifugering. Rao *et al.* (2000) jämförde PK(INR)-värdet

¹ Professor Giuseppe Lippi direktör för trombos och hemostasis vid laboratoriemedicin på Universitetssjukhuset i Parma och överläkare Karin Strandberg processledare koagulation, labmedicin i Skåne kommunikation via E-post. den, 13 december 2015.

i plasma som förvarats i 4°C, RT eller fryst efter tidsintervall på 6 timmar, 12 timmar och 24 timmar mellan centrifugering och analys. Resultaten visade inga signifikanta skillnader i PK(INR)-värden vilket överensstämmer med resultaten från denna studie. van Geest-Daalderop *et al.* (2005) analyserade blodprover efter 3 timmar, 6 timmar och 24 timmar. Resultaten visade att PK(INR)-värdet var stabilt vid de olika tidsintervallerna förutom analyser efter 24 timmar. I samma studie konstaterades att centrifugerade blodprover bör analyseras inom 6 timmar. Tidigare studier visar att tidsintervaller mellan centrifugering och analys kan öka i framtiden (Zhao & LV, 2013). Feng *et al.* (2014) visade i sin studie att PK(INR)-värdet var kliniskt relevant vid tidsintervaller upp till 24 timmar. I en annan studie rapporterade Zurcher *et al.* (2008) att helblod kan analyseras upp till 28 timmar efter provtagning och förvaring RT. Transporttiden från primärvård till klinisk kemi i Helsingborg tar upp till 4 timmar.

Även om resultaten från denna studie, liksom tidigare studier, visade att återcentrifugering och längre tidsintervall mellan centrifugering och analys inte påverkar PK(INR)-värdet, uppkommer flera frågeställningar beträffande hantering och centrifugering av proverna på vårdcentralen innan de transporteras vidare till nästa klinik samt kapaciteten, varvtal och tid hos olika centrifuger som används på olika vårdcentraler samt eventuella risker under transport av blodprover som kan orsaka blandning av blodceller med plasma och aktivering av koagulationsfaktorer som följd.

Framtida undersökningar kan genomföras för att uppnå ett pålitligare studieresultat med hjälp av ökade antal (>200) blodprover varav 100 st. från waranbehandlade patienter och 100 från friska som kan analyseras med en längre tidsintervall. Det kan även utföras en undersökning som inkluderar analys av aktiverad partiell tromboplastintid (APTT, activated partial thromboplastin time) som används för bedömning av kroppens förmåga att få blodet att koagulera (Senthil *et al.*, 2014).

1.5 Konklusion

I denna studie undersöktes påverkan av PK(INR)-värde vid återcentrifugering samt återanalyser efter 6 timmar. Studien utfördes på venösa blodprover från femtio waranbehandlade patienter. Resultaten i denna studie visade att PK(INR)-värdet var

stabil oavsett behandling. Statistiska jämförelser mellan tre olika metoder (A, B, C) visade inga signifikanta skillnader i PK(INR)-värde.

1.6 Tackord

Jag vill rikta ett stort tack till alla som har hjälpt mig med mitt Examensarbete;

Åse Sambergs, Heléne Arborelius, Mona Löyskä-Svensson, verksamhetschefer på klinisk kemi i Helsingborg.

Fariba Vaziri-Sani, huvudhandledare på Högskolan Kristianstad.

Martin Masla, handledare på klinisk kemi i Helsingborg.

Professor Giuseppe Lippi, direktör för trombos och hemostas vid laboriemedicin på Universitetssjukhuset i Parma, Italien.

Liz-Marie och andra personal på klinisk kemi i Helsingborg.

Ett stort tack till bihandledare (överläkare, Labmedicin i Skåne, klinisk kemi), *Karin Strandberg*.

1.7 Referenser

Bland, J.M., Altman, D.G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1:307-310.

Egberg, N., Hillarp, A., Johnsson, H., Lindahl, T. & Stigendal, L. (1999). Protrombinkomplexmätning bör anges som en kvot, inte i procent. *LÄKARTIDNINGEN* 96:2489-2491.

Feng, L., Zhao, Y., Zhao, H. & Shao, Z. (2014). Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *SCIENTIFIC REPORTS* 4:1-5.

Hirsh, J., Fuster, V., Ansell, J. & Halperin, J.L. (2003). AHA/ACC Scientific Statement, American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Guide to Warfarin Therapy. *Circulation* 107:1692–1711.

Horsti, J. (2009). A sensitivity comparison of the Quick and Owren prothrombin time methods in oral anticoagulant therapy. *Hematology Reviews* 1:87-91.

Kasthuri, R.S. & Key, N.S. (2012). Medical Management of Venous Thromboembolism: What the Interventional Radiologist Needs to Know. *Semin Intervent Radiol* 29:3–9.

Kitchen, S., Olson, J.D. & Preston, F.E. (2013). Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. *Chichester*: Wiley-Blackwell.

Larriva, M. (2014). *Venous Thromboembolism in the Cancer Patient*. www.slideshare.net [2015-12-17].

Lavorini, F., Di Bello, V., De Rimini, M.L., Lucignani, G., Marconi, L., Palareti, G., Pesavento, R., Prisco, D., Santini, M., Sverzellati, N., Palla, A. & Pistolesi, M. (2013). Diagnosis and treatment of pulmonary embolism: a multidisciplinary approach. *Multidisciplinary Respiratory Medicine* 8:1-8.

Lee, K., Woo, H.I, Bang, O.Y., On, Y-K., Kim, Y.S. & Lee S-Y. (2014). How to Use Warfarin Assays in Patient Management: Analysis of 437 Warfarin Measurements in a Clinical Setting. *Clinical Pharmacokinetics* 54:517–525.

Lindahl, T. (2012). *EQUALIS. Antikoagulantibehandling i primärvården*. www.equalis.se [2015-12-18].

Medicinsk service (2015). *P-PK (INR) (NPU01685)*. www.skane.se [2015-12-17].

Noble, S.I.R., Shelley, M.D., Coles, B., Williams, S.M., Wilcock, A., Johnson, M.J., (2008). Management of venous thromboembolism in patients with advanced cancer: a systematic review and meta-analysis Association for Palliative Medicine for Great Britain and Ireland. *Lancet Oncol* 9: 577–584.

Owren, P.A. (1959). Thrombotest a New Method For Controlling Anticoagulant Therapy. *THE LANCET* 274: 754-758.

Puetz, J. (2014). Overview of the use of recombinant factor VIIa in children. *Dovepress* 5:141-148.

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. *Clin Chim Acta* 300:13-21.

Senthil, M., Chaudhary, P., Smith, D.D., Ventura, P-E., Frankel, P.H., Pullarkat, V. & Vijay, T. (2014). A shortened activated partial thromboplastin time predicts the risk of catheter-associated venous thrombosis in cancer patients. *Thrombosis Research* 134:165-168.

Söderström, B. & Nilsson, C. (2008). *Värt att veta om Waranbehandling*. www.regionorebrolan.se [2016-01-08].

van den Besselaar, A.M.H.P., Chantarangkul, V. & Tripodi, A. (2010). Thromboplastin standards. *Biologicals* 38:430-436.

van Geest-Daalderop, J.H.H., Mulder A.B., Boonman-de Winter, L.J.M., Hoekstra, M.M.C.L. & van den Besselaar, A M.H.P. (2005). 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* 51:561–568.

Wassim, Y.A., Tamim, H., Kreidy, R., Timson, G., Rahal, E., Nabulsi, M., Finan, R.R. & Irani-Hakime, N. (2005). A Case Control Study on the Contribution of Factor V-Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations to the Genetic Susceptibility of Deep Venous Thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 19:189-196.

Zhao, Y. & LV, G. (2013). Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens. *International Journal of Laboratory Hematology* 35:566–570.

Zürcher, M., Sulzer, I., Barizzi, G., Lämmle, B. & Alberio, L. (2008). Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thrombosis and Haemostasis* 99:416-426.

1.8 Populärvetenskaplig sammanfattning

Påverkan på PK(INR)-värdet efter olika preanalytiska behandlingar i människoblod

Blodpropp är ett livshotande tillstånd som uppkommer när blodet lever sig i blodkärlen. Detta kan leda till att blodflödet försämras i kroppen vilket kan skada ett eller flera organ samtidigt t.ex. hjärtat. Bildning av blodproppar beror på förändringar på en eller flera faktorer som leverar blodet vid blödning t.ex. när vi skär oss. Hos patienter som har blodproppar aktiveras dessa faktorer i blodet p.g.a. förändringar på olika koagulationsfaktorer. Sjukdomen kan antingen vara ärftlig och/eller bero på andra faktorer som ålder, kön, miljö mm. Vanliga symptom är svullna vader, måttliga smärtor och ibland rodnad. För att förebygga sjukdomen ska patienten behandlas med läkemedlet waran. Läkemedlet förtunnar blodet och hjälper till så att blodflödet förbättras i blodkärlen. Påverkningen av läkemedlet kan variera mellan människor avseende på kroppsvolym, kost, ålder och fysiska aktiviteter. Överdoserering av läkemedlet kan orsaka blödningar i kroppen, vid skador eller vid en operation. För rätt dosering skall halten av läkemedlet kontrolleras med en så kallade P-PK(INR)-analys. Denna analys görs på blodplasma i ett automatiserat instrument på laboratorier bl.a. på klinisk kemi vid Helsingborgs lasarett. Hit skickas blodprover från primärvården. Innan analys ska blodet centrifugeras för att separera plasman från blodet. Vissa av primärvårdens mottagningar centrifugerar blodprover på plats. På laboratoriet återcentrifugeras dessa prover, men detta kan påverka analysen, anser en del forskare. För att undersöka problemet genomfördes en studie genom att centrifugera och analysera (metod A) respektive återcentrifugera och återanalysera (metod B) 50 st. av waranbehandlade patientprover. Till sist analyserades proverna igen efter 6 timmar (metod C). Resultaten jämfördes därefter med hjälp av statistiska beräkningar.

Resultaten visade att analysvärden på P-PK(INR) inte påverkas även om blodproverna centrifugerats igen, inte heller förändrades värdena efter 6 timmar. För att få en uppfattning om tidigare forskningsresultat studerades olika publicerade undersökningar, vilka överensstämde med resultaten från denna studie. Omfattande analyser av fler blodprover (>200 st. varav 100 st. från läkemedel behandlade patienter och 100 st. från

fiska patienter) skulle kunna genomföras för att uppnå ett ännu mer pålitligt undersökningsresultat.

1.9 Bilaga

1.9.1. Tabell I

Tabell I. Rådata som visar PK(INR)-värden från metod A och metod B samt skillnader mellan metoderna.

	Metod A (INR)	Metod B (INR)	B-A (INR)	(INR)
1	2,27	2,3	0,03	1,3%
2	1,15	1,12	-0,03	-2,6%
3	1,79	1,8	0,01	0,6%
4	1,67	1,69	0,02	1,2%
5	1,91	1,93	0,02	1,0%
6	3,59	3,64	0,05	1,4%
7	1,79	1,77	-0,02	-1,1%
8	1,97	1,97	0,00	0,0%
9	3,29	3,23	-0,06	-1,8%
10	1,98	1,97	-0,01	-0,5%
11	2,99	2,97	-0,02	-0,7%
12	0,95	0,93	-0,02	-2,1%
13	2,05	2,04	-0,01	-0,5%
14	1,08	1,1	0,02	1,8%
15	1,59	1,58	-0,01	-0,6%
16	1,55	1,55	0,00	0,0%
17	1,45	1,45	0,00	0,0%
18	1,06	1,05	-0,01	-0,9%
19	1,33	1,26	-0,07	-5,4%
20	1,06	1,06	0,00	0,0%
21	2,08	2,04	-0,04	-1,9%
22	2,38	2,21	-0,17	-7,4%
23	2,1	2,01	-0,09	-4,4%
24	4,31	4,22	-0,09	-2,1%
25	4,75	4,81	0,06	1,3%
26	6,49	6,57	0,08	1,2%
27	7,43	7,05	-0,38	-5,2%
28	5,33	5,43	0,10	1,9%
29	4,24	4,14	-0,10	-2,4%
30	2,56	2,49	-0,07	-2,8%
31	2,4	2,34	-0,06	-2,5%
32	2,44	2,52	0,08	3,2%
33	2,44	2,39	-0,05	-2,1%
34	2,67	2,66	-0,01	-0,4%
35	2,57	2,55	-0,02	-0,8%
36	2,24	2,23	-0,01	-0,4%
37	2,52	2,39	-0,13	-5,3%
38	2,2	2,19	-0,01	-0,5%
39	2,49	2,49	0,00	0,0%
40	2,98	2,96	-0,02	-0,7%
41	2,91	2,8	-0,11	-3,9%

42	4,58	4,51	-0,07	-1,5%
43	6,33	6,43	0,10	1,6%
44	6,89	6,89	0,00	0,0%
45	4,66	4,63	-0,03	-0,6%
46	7,12	7,25	0,13	1,8%
47	5,32	5,29	-0,03	-0,6%
48	5,86	5,83	-0,03	-0,5%
49	7,75	7,77	0,02	0,3%
50	8,52	8,32	-0,20	-2,4%

1.9.2 Bilaga 2

Tabell II. Rådata som visar PK(INR)-värden från metod A och metod C samt skillnader mellan metoderna.

	Metod A (INR)	Metod C (INR)	C-A (INR)	(INR) %
1	2,27	2,4	0,13	5,6%
2	1,15	1,18	0,03	2,6%
3	1,79	1,88	0,09	4,9%
4	1,67	1,76	0,09	5,2%
5	1,91	1,98	0,07	3,6%
6	3,59	3,66	0,07	1,9%
7	1,79	1,86	0,07	3,8%
8	1,97	1,97	0,00	0,0%
9	3,29	3,27	-0,02	-0,6%
10	1,98	1,95	-0,03	-1,5%
11	2,99	3,02	0,03	1,0%
12	0,95	0,99	0,04	4,1%
13	2,05	2,15	0,10	4,8%
14	1,08	1,14	0,06	5,4%
15	1,59	1,66	0,07	4,3%
16	1,55	1,62	0,07	4,4%
17	1,45	1,5	0,05	3,4%
18	1,06	1,09	0,03	2,8%
19	1,33	1,3	-0,03	-2,3%
20	1,06	1,12	0,06	5,5%
21	2,08	2,07	-0,01	-0,5%
22	2,38	2,3	-0,08	-3,4%
23	2,1	2,07	-0,03	-1,4%
24	4,31	4,2	-0,11	-2,6%
25	4,75	4,85	0,10	2,1%
26	6,49	6,51	0,02	0,3%
27	7,43	7,1	-0,33	-4,5%
28	5,33	5,38	0,05	0,9%
29	4,24	4,03	-0,21	-5,1%
30	2,56	2,45	-0,11	-4,4%
31	2,4	2,24	-0,16	-6,9%
32	2,44	2,5	0,06	2,4%

33	2,44	2,31	-0,13	-5,5%
34	2,67	2,61	-0,06	-2,3%
35	2,57	2,5	-0,07	-2,8%
36	2,24	2,15	-0,09	-4,1%
37	2,52	2,47	-0,05	-2,0%
38	2,2	2,15	-0,05	-2,3%
39	2,49	2,48	-0,01	-0,4%
40	2,98	2,92	-0,06	-2,0%
41	2,91	2,74	-0,17	-6,0%
42	4,58	4,63	0,05	1,1%
43	6,33	6,43	0,10	1,6%
44	6,89	6,86	-0,03	-0,4%
45	4,66	4,57	-0,09	-2,0%
46	7,12	7,25	0,13	1,8%
47	5,32	5,29	-0,03	-0,6%
48	5,86	5,83	-0,03	-0,5%
49	7,75	7,77	0,02	0,3%
50	8,52	8,7	0,18	2,1%