



UPPSALA
UNIVERSITET

Institutionen för kvinnors och barns hälsa

Biomedicinska analytikerprogrammet

Examensarbete vårterminen 2013

Evaluation of lithium- heparintube analyses performance

Linnéa Källberg

Studieort: Mittuniversitetet, Sundsvall

Handledare: Ulla Bryngelsson, Hudiksvalls sjukhus

Abstract

Today, some kind of laboratory results is required for around 70% of the diagnostics and follow-ups for diseases. In many of the cases the time from sampling to a result is very critical. Therefore the discussion of how to improve this situation has begun. For many analyses serum has been the routine choice for a long time but now it is disputed. After blood collection in a serum tube it is essential to wait 30-60 minutes before centrifugation and analysis of the sample, a long time for someone in an acute state. Other problems like post centrifugation clots of fibrin causing false results or time-consuming reruns of the sample have also been reported. These problems have initiated the laboratory in Hudiksvall's hospital to find out an alternative to the common serum sampling.

In this report, the differences between serum and lithium heparin plasma for 31 analyses has been evaluated. Paired blood samples, one serum and one plasma, were collected for routine, hormonal and for tumor markers analyses and analyzed in a Cobas c501, e411 or e601 (ROCHE). The results of the analyzed samples were compared to each other by statistical analysis.

The results prove that serum and lithium heparin plasma is equal for ALT, GGT, NT-proBNP, FT3, FT4, cobalamin, LH, prolactin, TSH, CA19-9, CEA and PSA. The results also prove that serum and lithium heparin plasma is not equal for 19 other analyses. Therefore, a shift between different types of sampling is not to be recommended without further evaluations.

Keywords: BD Vacutainer, Cancer markers, Cobas, Hormonal analyses, Routine analyses

Introduktion

Laboratoriemedicin spelar idag en stor roll när det gäller diagnostisering och uppföljning av sjukdomar. Vid de flesta diagnoser är någon typ av laboratorieresultat av stor vikt vilket sätter press på sjukhusens laboratorier. Förutom korrekt utförda analyser har sjukhusets avdelningar och mottagningar ett behov av att provsvaren ska vara dem tillhanda snabbt. Eftersom laboratoriemedicin försöker möta deras önskemål har intresset för omställning till plasmaprovtagning ökat. Idag används serum till många analyser men fler och fler laboratorier i landet har ändrat standardröret från serum till litiumheparinplasma (hädanefter kallad plasma) för ett flertal analyser.

En grundläggande orsak till övergången är att tiden från provtagning till provsvar kan minskas vid en övergång till plasma. Ett serumprov bör, enligt rådande provtagningsrutiner, stå 30-60 minuter efter provtagning innan det centrifugeras så att blodet koagulerar. Detta kan vara extra problematiskt om patienten får antikoagulerande medicin som kan bidra till att koagulationen fördröjs och i vissa fall delvis uteblir [1]. Förutom tidsaspekten vid koagulation är ett annat problem att fibrinkoagel kan bildas i serum efter centrifugering vilket i sin tur kan leda till störningar vid analys av provet [2]. Fibrinkoagel i serum riskerar att pipetteras upp i automatiserade instrument och därmed täppa till pipetten och förhindra en korrekt pipettering. Om utrustningen inte har förmåga att känna av detta så kan det i sin tur leda till ett felaktigt analysresultat. Idag finns automatsystem med inbyggda sensorer för att säkerställa att fel av denna typ inte uppstår, men pipetterat koagel innebär ändå extra arbete för personal och extra hantering av provet.

Flera studier har utförts där olika typer av provtagningsrör jämförts. Studierna har berört serum med och utan gel och med och utan koagulationsaktivator och plasma med och utan gel [3-5]. Tyvärr är det dock få studier där både ett serumrör med gel och ett plasmarör med gel har ingått.

Chance *et al.* undersökte hur analysresultaten för plasmaröret BD Vacutainer® PST™ tedde sig gentemot tre andra provtagningsrör och drog slutsatsen att plasmaröret BD Vacutainer® PST™ II tillhandahåller likvärdiga resultat gentemot serum och plasma utan gel för utvärderade analyser [3].

Även Giavarina *et al.* utvärderade BD Vacutainer® PST™ II. Denna utvärdering var för ett flertal vanliga immunologianalyser och författarna kom fram till blandade resultat. För vissa

av de utvalda analyserna vad plasmaröret ett godkänt alternativ medan det för andra analyser inte passade alls [4].

O'Keane *et al.* jämförde och undersökte analytstabilitet för serumrör med gel och serum- och plasmarör utan gel och kom fram till att serumrör med gel har övertaget vid de flesta av de valda analyserna [5].

Det intressanta med dessa jämförande studier är att de har kommit fram till olika slutsatser. Analysutrustning kan spela en stor roll vid dessa typer av utvärderingar, eftersom olika utrustningar använder olika analysmetoder för samma analyt kan interferenser vid en typ av metod spela mindre roll vid en annan typ av metod.

Landstinget Gävleborg innefattar två akutsjukhus och ett flertal mindre sjukhus.

Akutsjukhusen är belägna i Hudiksvall och i Gävle, sjukhuset i Gävle är även länssjukhus. Laboratieverksamhet bedrivs på flera av sjukhusen men alla analyser utförs inte på samtliga platser. Många prover varje dag fraktas till ett annat laboratorium, framförallt till laboratoriet på sjukhuset i Gävle. För hållbarheten kräver flera prover att de fryses innan transporten men många prover transporteras också i kyla och vissa även i rumstemperatur, allt beroende på vilken analys provet är avsett för.

Idag använder Landstinget Gävleborg serum för analys av rutinkemier, hormoner och tumörmarkörer. Från akutmottagningen godtas plasmaprover för analys akuta prover för att skynda på analysresultat. Intresset för en mer permanent och överskridande lösning efterfrågas då problemen med koagulationstid före och fibrinbildning efter centrifugering har uppmärksammats även där. Problemet med att serum ska stå minst en halvtimme innan centrifugering uppmärksammas främst vid provtagning inom sjukhuset. På avdelningarna tas proverna på rutin i serumrör och när det då uppstår en situation då ett snabbare analys svar krävs får de vänta. Trots att provet transporteras ner till laboratoriet är transporttiden från avdelningarna till laboratoriet alldeles för kort för att likställas som vilotiden för ett serumprov.

Eftersom laboratorerna är ackrediterade kan rutiner inte ändras utan en stabil grund att stå på. Kunskapen kring serum kontra plasma anses vara något för liten och inte direkt anpassad till landstingets egna förhållanden, därför har nu denna utvärdering gjorts i samarbete med laboratoriet på Hudiksvalls sjukhus.

Denna utvärdering inkluderade 31 olika analyser från följande tre olika analysområden; rutinkemi, hormoner och tumörmarkörer. Dubbla prover, ett serum med gel (BD Vacutainer® SST™ II) och ett litiumheparinplasma med gel (BD Vacutainer® PST™ II) för varje par, insamlades från frivilliga patienter. Dessa rörtyper var standardrör för laboratorierna där denna utvärdering gjordes. För att efterlikna Landstinget Gävleborgs förhållanden så mycket som möjligt valdes därför dessa rör till utvärderingen. Totalt samlades 120 provrör in; 60 provrör för rutinkemianalyser, 40 för hormonanalyser och slutligen 20 provrör för analys av tumörmarkörer.

Proverna analyserades i olika instrument från företaget Roche beroende på analys. För rutinkemianalyserna, som utfördes i Hudiksvall, användes Cobas c501 och Cobas e411. Cobas c501 använde fotometriska metoder för analysering av proverna och Cobas e411 använde elektrokemiluminescens. För analysering av hormonerna och tumörmarkörerna, som utfördes i Gävle, användes Cobas e601 som också använde elektrokemiluminescens för analysering av proverna.

Syftet med studien var således att med ett brett urval av analyser och statistiska uträkningar få svar på om det är någon skillnad mellan serum och litiumheparinplasma.

Material och metod

Studien utfördes med utgångspunkt från Hudiksvalls sjukhus laboratorium i samarbete med Gävle sjukhus laboratorium. Serum och litiumheparinplasma testades på tre grupper av analyser; rutinkemi, hormoner och tumörmarkörer. I gruppen rutinkemi ingick alaninaminotransferas (ALAT), alkaliskt fosfat (ALP), apolipoprotein a och b (APO A och APO B), bilirubin, c reaktivt protein (CRP), cystatin c, γ -glutamyltransferas (GT), järn, kalcium, kalium, kolesterol, kreatinin, pankreas- α -amylas, transferrin, triglycerid och hjärtmarkörerna NT pro-BNP och troponin T. Till denna grupp togs 30 provpar. I gruppen hormoner ingick ferritin, folat, follikelstimulerande hormon (FSH), fritt trijodtyronin, fritt tyroxin, kobalaminer, luteiniserande hormon (LH), prolaktin och tyreoidestimulerande hormon (TSH). Till denna grupp togs 20 provpar. I gruppen tumörmarkörer ingick CA 19-9, CA 125, carcinoembryonalt antigen (CEA) och prostataspecifikt antigen (PSA). Till denna grupp togs 10 provpar. Proverna tillhörande gruppen rutinkemi analyserades på provtagningsdagen i Hudiksvall och proverna tillhörande hormoner och tumörmarkörer analyserades i Gävle efter frysförvaring i Hudiksvall och transport till Gävle. Alla prover analyserades enligt laboratoriernas egna rutiner.

Provinsamling

Eftersom detta var en metodvalidering av användandet av olika provrör krävdes ingen etisk prövning. Dubbla venösa blodprover togs från frivilliga, anonyma patienter i Hudiksvall. Ett serumrör med gel och ett litium-heparinrör med gel (båda BD Vacutainer) insamlades från varje patient. Provrören märktes med löpnummer som kopplades samman så att varje provpar kunde hanteras samtidigt. Efter provtagning vaggades rören. Därefter fick serumröret stå minst en halvtimme innan centrifugering, allt enligt föreskrifter. Plasmaröret centrifugerades snarast efter vaggning. Serumröret och plasmaröret centrifugerades på samma sätt, 10 minuter vid 1800 G. Prover tillhörande grupperna hormoner och tumörmarkörer hälldes av och frystes (-20°C) i väntan på transport till laboratoriet i Gävle för analys. Proverna tillhörande gruppen rutinkemi ställdes i kylskåp (+4°C) efter centrifugering i väntan på analysering.

Analysering i Hudiksvall

Från varje prov som skulle köras i Hudiksvall pipetterades ca 500µl serum/plasma till en analyskopp för analysering av troponin T och NT pro-BNP i en Cobas e411. Kvarvarande serum/plasma i ursprungsröret analyserades i en Cobas c501 med avseende på ALAT, ALP, APO A, APO B, bilirubin, CRP, cystatin c, GT, järn, kalcium, kalium, kolesterol, kreatinin, pankreas- α -amylas, transferrin och triglycerid. Före körningarna av patientprover analyserades kontroller på båda instrumenten. Kontroller utfördes för att säkerställa att instrumentet och reagenser höll en given standard och därmed garanterade adekvata analysresultat av patientproverna. Dessutom kontrollerades mängden reagens i instrumenten för varje analyt. De reagenser som användes var enligt laboratoriets standardiserade metodik. För alla prover beställdes varje analys manuellt i instrumentets dator innan körning. För att minska eventuella felkällor analyserades provparen så tätt inpå varandra som möjligt.

Analysering i Gävle

Proverna som analyserades i Gävle fraktades frysta i frigolitboxar fyllda med is. Väl framme på laboratoriet tinades proverna i rumstemperatur och blandades noga innan de pipetterades upp i märkta analyskoppar. På samma sätt som vid tidigare analyseringstillfälle analyserades kontroller. Reagensmängden för alla analyter avstämde innan körning av proverna.

Analyserna beställdes manuellt även nu och provparen analyserades direkt efter varandra. Alla prover analyserades i en Cobas e601.

Statistisk utvärdering

Efter avslutade analyseringar parades provresultaten ihop, resultaten från serumprovet med resultaten från plasmaprovet. Differensen mellan varje serum/plasmapar och därefter medelvärdet och standardavvikelsen av alla differenser beräknades för varje analys. Med hjälp av medelvärdet och standardavvikelsen beräknades sedan t-värdet för varje analys som sedan jämfördes med ett tabellvärde för 95-procentigt konfidensintervall. Översteg det beräknade t-värdet tabellvärdet för samma antal prover var en metodskillnad påvisad. Dessa uträkningar var enligt litterära instruktioner.

Resultat

Denna utvärdering utfördes för att undersöka om serum och litiumheparinplasma gav olika analysresultat för utvalda analyser. Detta för att i sin tur utvärdera om det är lämpligt att byta ut serumrör mot litiumheparinplasmarrör för dessa analyser.

Av de 120 blodprover (60 par) som insamlades kunde resultat från 118 användas. Provresultat från ett provpar kunde inte användas på grund av felhantering vid analysen. Dessutom, vid analys av transferrin saknas resultat av ett provpar eftersom analysen inte blev beställd i instrumentet för dessa prover. För troponin T redovisas endast resultat av 21 provpar eftersom resterande 9 provpar hade ett eller två resultat $<3,00$ ng/L som är lägsta detektionsnivå. Detta gjorde att en jämförelse mellan proverna i varje par inte kunde göras och därför inte heller ingå i den statistiska beräkningen.

I gruppen rutinkemi fanns det för 15 av 18 analyser en skillnad mellan provrören (se tabell 1). De 3 analyser som inte visade någon skillnad mellan serum och plasma var ALAT, GT och NT proBNP.

Tabell 1. Rutinkemi - Beräknade t-värden jämfördes med tabellvärden för 95-procentigt konfidensintervall. Översteg det beräknade t-värdet tabellvärdet för samma antal prover är en metodskillnad påvisad. Medelvärdet av differens svaras med 3 decimaler om inte den fjärde decimalen har så lågt värde att svaret skulle bli 0 vid avrundning till 3 decimaler.

Analys och enhet	Medelvärde av differens Serum-Plasma	SD av differens	Antal prover (n)	$t_{(f=n-1),0,975}$	$t = \frac{\bar{x}}{SD} * \sqrt{n}$	
ALAT $\mu\text{kat/L}$	-0,001	0,009	30	2,045	-0,445	
ALP $\mu\text{kat/L}$	0,024	0,013	30	2,045	10,221	*
Apo A g/L	0,024	0,036	30	2,045	3,652	*
Apo B g/L	0,038	0,025	30	2,045	8,323	*
Bilirubin $\mu\text{mol/L}$	0,260	0,417	30	2,045	3,419	*
CRP mg/L	0,044	0,067	30	2,045	3,592	*
Cystatin C mg/L	0,020	0,040	30	2,045	2,715	*
GT $\mu\text{kat/L}$	0,0002	0,019	30	2,045	0,067	
Järn $\mu\text{mol/L}$	0,277	0,447	30	2,045	3,394	*
Kalcium mmol/L	0,026	0,025	30	2,045	5,737	*
Kalium mmol/L	0,187	0,091	30	2,045	11,251	*
Kolesterol mmol/L	0,132	0,063	30	2,045	11,558	*
Kreatinin $\mu\text{mol/L}$	1,600	1,773	30	2,045	4,942	*
NT proBNP ng/L	4,837	15,316	30	2,045	1,730	
Pankreas α -amylas $\mu\text{kat/L}$	0,004	0,009	30	2,045	2,115	*
Troponin T ng/L	0,340	0,680	21	2,086	2,291	*
Transferrin g/L	0,045	0,038	29	2,048	6,425	*
Triglycerid mmol/L	0,044	0,028	30	2,045	8,512	*

*En metodskillnad för analysen har påvisats.

I gruppen för hormoner fanns en skillnad mellan serum och plasma för 3 av 9 analyser (se tabell 2) . De 3 analyser som visade på en metodskillnad var ferritin, folat och FSH.

Tabell 2. Hormonanalyser - Beräknade t-värden jämfördes med tabellvärden för 95-procentigt konfidensintervall. Översteg det beräknade t-värdet tabellvärdet för samma antal prover är en metodskillnad påvisad.

Analys och enhet	Medelvärde av differens Serum-Plasma	SD av differens	Antal prover (n)	$t_{(f=n-1)0,975}$	$t = \frac{\bar{x}}{SD} * \sqrt{n}$	
Ferritin µg/L	2,242	3,178	19	2,101	3,075	*
Folat nmol/L	-0,514	0,681	19	2,101	-3,290	*
FSH IU/L	0,602	0,625	19	2,101	4,195	*
fT3 pmol/L	0,038	0,111	19	2,101	1,508	
fT4 pmol/L	0,030	0,235	19	2,101	0,557	
Kobalamin pmol/L	-1,058	10,404	19	2,101	-0,443	
LH IU/L	0,187	0,500	19	2,101	1,631	
Prolaktin mIU/L	0,596	3,763	19	2,101	0,690	
TSH mIU/L	0,021	0,047	19	2,101	1,924	

*En metodskillnad för analysen har påvisats.

I tabell 3 ses en skillnad i metoderna för 1 av 4 analyser i gruppen tumörmarkörer. Den enda tumörmarkören som visade på en skillnad var CA 125.

Tabell 3. Tumörmarkörer - Beräknade t-värden jämfördes med tabellvärden för 95-procentigt konfidensintervall. Översteg det beräknade t-värdet tabellvärdet för samma antal prover är en metodskillnad påvisad.

Analys och enhet	Medelvärde av differens Serum-Plasma	SD av differens	Antal prover (n)	$t_{(f=n-1)0,975}$	$t = \frac{\bar{x}}{SD} * \sqrt{n}$	
CA 19-9 kU/L	-0,003	0,243	10	2,262	-0,039	
CA 125 kU/L	0,434	0,407	10	2,262	3,372	*
CEA µg/L	0,014	0,046	10	2,262	0,975	
PSA µg/L	0,073	0,132	10	2,262	1,744	

*En metodskillnad för analysen har påvisats.

Diskussion

Denna utvärdering utfördes med utgångspunkt i Hudiksvall i samarbete med Gävle för att utvärdera om det fanns metodskillnader mellan serum och litiumheparinplasma för ett flertal analyser och för att utvärdera om man kunde byta standardrör från serum till plasma för dessa analyser för att förkorta tiden från provtagning till provsvar och slippa problem orsakade av fibrinkoagel.

Upplägget var utformat så att det efterliknade laboratoriets egna rutiner så mycket som möjligt. För analyserna i Hudiksvall uppnåddes detta men tyvärr fanns det en avvikande del när det gäller analyserna i Gävle. Proverna som fraktades till Gävle hölls frysta under en längre tidsperiod än vad som var normalt för patientprover. Dock hölls proverna frysta maximalt 15 dagar och både serumprovet och plasmaprovet i provparet hölls frysta lika länge. Eftersom ett flertal stabilitetsstudier av prover använder sig av fryst material som referensmaterial bör detta inte ha påverkat provresultaten [6]. Dessutom finns det studier på att infrysning av olika hormonprover inte påverkar analyten [7]. Emellertid bör man ha i åtanke att all extra hantering av prover kan ha en effekt på provresultaten.

Till skillnad mot för vad som antagits tidigare visade majoriteten av rutinkemianalyserna på en olikhet mellan serumrör och plasmarör. Därför bör uppföljande studier göras för att få fram nya referensintervall om en övergång från serumrör till litiumheparinplasmarör fortfarande är aktuell efter denna utvärdering.

Att det idag tas prover i litiumheparinrör för vissa akuta analyser utgör nog inget större problem. Det är få analyser som utförs och resultaten används främst för en första indikation av vad som kan orsaka problem hos patienten. När patienten har lagts in på rätt vårdavdelning är det rutin att nya prover tas och då i serum. Eftersom de påvisade skillnaderna mellan provrören för dessa analyser ändå är relativt små och plasmaproverna rutinmässigt följs upp av ett serumprov bör det inte vara ett problem att fortsätta med denna typ av verksamhet.

Resultaten av hormonanalyser och tumörmarkörer visade att det för de flesta analyser inte var någon metodskillnad mellan serum och plasma.

Vid studier av hormonanalyser används oftast EDTA-plasma istället för litiumheparinplasma och därför är det svårt att jämföra denna utvärdering med andra studier. Dock har Giavarina *et al.* visat att litiumheparinplasma inte passar vid analys av folat men

passar bra vid CA 19-9, CEA, ferritin, FSH, fT3, fT4, LH, PSA och TSH [4]. Förutom för ferritin och FSH stämmer deras resultat bra överrens med denna utvärderings resultat.

Vid en övergång till plasmarör bör provrutiner och provhantering utvärderas då stabiliteten för flera analyter varierar beroende på vilket rör som används och hur provhanteringen ter sig.

Eftersom många prover kommer från vårdinstanser utanför sjukhuset och kan få stå flera timmar innan transport till laboratoriet för analys bör analyternas stabilitet vara avgörande. Flera studier kring detta har gjorts och både Zwart *et al.* och Oddoze *et al.* har visat att många analyter i serum kan klara av upp till 24 timmars väntan innan analysering [8,9]. I kontrast till detta finns det studier som talar emot plasmaprover i just detta avseende. Boyanton *et al.* drog slutsatsen att serum är att föredra istället för plasma om direkt centrifugering av provet inte är möjligt eftersom analyterna är mer instabila i plasma[2].

Brandhorst *et al.* jämförde olika typer av litiumheparinplasmarör och kom fram till att plasmarör med separator inte passar vid förvaring och omkörning av prover [10]. Med detta i åtanke bör en övergång till plasma inte verkställas eftersom det i dagsläget är normalt att sjukhusets avdelningar beställer efteranalyser på redan befintliga rör som redan kan ha använts för analys en gång.

Om denna tjänst ska kvarvara vid en övergång till plasma är avhällning av prover nödvändig vilket skulle orsaka mycket extra arbete för personalen på laboratoriet.

Denna utvärdering visade att det var skillnader mellan litiumheparinplasma och serum vid ett flertal analyser, framförallt för de så kallade rutinkemianalyserna, och bör därför inte likställas. Vid en övergång från serum till plasma är det nödvändigt att utvärdera varje analys och dess referensområde separat.

Tack till:

Landstinget Gävleborg

Ulla Bryngelsson

Lars-Olof Hansson

Niclas Rollborn

Referenser

- [1] Dimeski G, Masci P.P, Trabi M, Lavin M.F, *et al.* Evaluation of the Becton-Dickinson rapid serum tube: does it provide a suitable alternative to lithium heparin plasma tubes? *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(5):651-657.
- [2] Boyanton B.L, Blick K.E. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem.* 2002;48(12):2242-2247.
- [3] Chance J, Berube J, Vandersmissen M, Blanckaert N. Evaluation of the BD Vacutainer® PST™ II blood collection tube for special chemistry analytes. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(3):358-361.
- [4] Giavarina D, Fortunato A, Barzon E, Church S, *et al.* Evaluation of BD Vacutainer® PST™ II tubes for a wide range of immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(2):237-241.
- [5] O’Keane M.P, Cunningham S.K. Evaluation of three different specimen types (serum, plasma lithium heparin and serum gel separator) for analysis of certain analytes: clinical significance of differences in results and efficiency in use. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(5):662-668.
- [6] Evans M.J, Livesey J.H, Ellis M.J, Yandle T.G. Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clin Biochem.* 2001;34:107-112.
- [7] Livesey J.H, Hodgkinson S.C, Roud H.R, Donald RA. Effect of time, temperature and freezing on the stability of immunoreactive LH, FSH, TSH, growth hormone, prolactin and insulin in plasma. *Clin Biochem.* 1980;13(4):151-155.
- [8] Zwart S.R, Wolf M, Rogers A, Rodgers S, *et al.* Stability of analytes related to clinical chemistry and bone metabolism in blood specimens after delayed processing. *Clin Biochem.* 2009;42:907-910.
- [9] Oddeze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem.* 2012;45:464-469.
- [10] Brandhorst G, Engelmayer J, Götze S, Oellerich M, *et al.* Pre-analytical effects of different lithium heparin plasma separation tubes in the routine clinical chemistry laboratory. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(9):1473-1477.