



UPPSALA  
UNIVERSITET

**Institutionen för kvinnors och barns hälsa**

Biomedicinska analytikerprogrammet

*Examensarbete 15 hp, VT-16*

# **Method verification for homocysteine and a sustainability study on glucose, homocysteine and lactate in different sampling tubes**

Emelie Bohjort

Handledare:

Maria Andersson, Klinisk kemi och transfusionsmedicin, norra Hälsingland

Examinator:

Anneli Stavreus-Evers

Adress: Institutionen för Kvinnors och Barns Hälsa, Akademiska sjukhuset, 751 85 Uppsala

Telefon: 018- 611 28 31

E-post: [anneli.stavreus-evers@kbh.uu.se](mailto:anneli.stavreus-evers@kbh.uu.se)

## ABSTRACT

The pre-analytical phase is known for being the most important step in the laboratory process to reach reliable test results. If handling, transport or preparation of the sample is performed incorrectly the results can deviate from the true value. Today, sampling tubes contains various additives to stabilize concentration levels. The aim of this study was to test a new sampling tube containing fluoride/citrate for glucose, lactate and homocysteine. It was also of interest to evaluate the stability of those three analytes in lithium-heparin, sodium-fluoride/potassium oxalate and fluoride/citrate tubes. To perform the sustainability study, a method verification was done for homocysteine in plasma.

The study was performed in a hospital laboratory on the routine instrument Roche Cobas 6000 analyzer. Blood was drawn from 20 patients and was analyzed at the hospital laboratory in Gävle. The blood samples were transported frozen to the laboratory in Hudiksvall and were used in the method verification. For the sustainability study, blood was drawn from 10 healthy volunteers in lithium-heparin, sodium-fluoride/potassium oxalate and fluoride/citrate tubes.

The method verification was approved. The results showed that glucose was stable for up to 72 hours in Vacuette Glycaemia tube with fluoride/citrate and this tube also gave more accurate results. Lactate and homocysteine were also stable in fluoride/citrate, but needs further studies. All three analytes were more stable if the sample tubes were centrifuged as soon as possible after blood collection. Fluoride/citrate tubes were stable without centrifugation directly.

## KEYWORDS

• Pre-analytical factors • Fluoride citrate • Cobas 6000 • Lithium heparin • Sodium fluoride/potassium oxalate •

## INTRODUKTION

Sjukvården är beroende av en väl fungerande och pålitlig laboratorieservice då det ger en stor fördel för diagnostik och uppföljning av patienter. Patientprover hanteras ofta i många olika steg och även av flera olika personer, vilket ökar risken för slumpmässiga fel. Provresultaten påverkas av preanalytiska, analytiska och postanalytiska fel. Dagens laboriemedicin har utvecklats till att bli mer automatiserat och elektroniskt, vilket bidrar till en lägre risk för analytiska fel. De största orsakerna till fel i analysprocessen är därmed preanalytiska faktorer<sup>1,2</sup> [1,2]. Den preanalytiska fasen kan indelas i in vivo-preanalytiska faktorer som innefattar till exempel ålder, diet och sjukdom, samt i in vitro-preanalytiska faktorer såsom provtagning, utrustning, transport och förvaring<sup>3</sup>.

Långa transportsträckor är ofta ett problem inom laboriemedicin när det gäller kvalitet på blodprover och analysresultat. Hälsocentraler och privat hälso- och sjukvård har vanligtvis inte möjlighet att kunna analysera prover på plats, utan behöver transportera proverna till närmsta centrala laboratorium. Även möjlighet och tid till centrifugering och rätt hantering av speciella prover är begränsat, vilket kan leda till förändrade koncentrationer av de analyter som ska mätas. Koncentrationsförändringar kan ske på grund av att blodkroppar fortsätter att vara aktiva i provtagningsrören och kan bland annat metabolisera eller släppa ifrån sig (vid cellskador eller celledöd) olika ämnen. En annan preanalytisk faktor är skumbildning i provröret efter transport, vilket kan störa nivåavläsningen av serum eller plasma vid provpipettering i vissa analysinstrument. Dessa faktorer leder i sin tur till sämre patientsäkerhet. Flera studier visar att separering av plasma och serum från blodkroppar så tidigt som möjligt efter provtagning förbättrar stabiliteten i provet [3,4]. Detta rekommenderas

---

<sup>1</sup> Stability of serum analytes depending on pre-centrifugation time and platelet count in three types of sample collecting tubes, Siri Vallin

<sup>2</sup> The preanalytic phase, An important component of laboratory medicine. Sheshadri Narayanan

<sup>3</sup> Vad var och en bör veta om preanalytiska faktorer. Benoit Dugué, professor i fysiologi vid fakulteten för idrottsvetenskap vid universitetet i Poitiers, Frankrike.

även av bland annat American Association for Clinical Chemistry (AACC), American Diabetes Association (ADA) och World Health Organization (WHO) vid pre-analys [5,6].

I den här studien undersöktes analyterna glukos, laktat och homocystein in vitro. Glukos kallas även blodsocker och analyseras vid misstanke på diabetes. Det transporteras normalt via blodet ut till kroppens alla celler och hormonet insulin som utsöndras från bukspottkörteln signalerar cellerna att ta upp glukoset från blodet. Vid diabetes producerar kroppen inte tillräckligt med insulin eller så har kroppen utvecklat sämre känslighet för hormonet, vilket kallas insulinresistens<sup>4</sup>. Dessa faktorer leder till att glukoskoncentrationen i blodet blir för hög, vilket kan orsaka skada i blodkärl, kroniska förändringar i olika delar av kroppen eller diabeteskoma vid uttalad insulinbrist. Referensområdet för glukos sträcker sig mellan 4 till 8 mmol/L.

Laktat är ett annat ord för mjölksyra. Det bildas från nedbrytning av glukos under syrebrist med hjälp av det katalyserande isoenzymet laktatdehydrogenas som normalt finns i skelettmuskler och erythrocyter. Ökning av laktatkoncentrationen i blod sker vid bland annat plötslig hypoxi och lever- eller njurinsufficiens på grund av försämrad elimination av laktat. Referensområdet för laktat i plasma är mellan 0,7 och 2,5 mmol/L.

Homocystein är en aminosyra som är beroende av vitamin B12, B6 och B9 för att kunna metaboliseras. Normalt bör koncentrationen av homocystein i plasma vara under 15 mmol/L för vuxna människor då det annars kan öka risken för trombos och andra kardiovaskulära sjukdomar. Höga koncentrationer av ämnet beror vanligtvis på funktionell vitaminbrist, men det kan även bero på till exempel njursvikt, hypotyreoos, malignitet, kost, alkohol och stress.

---

<sup>4</sup> <http://www.1177.se/Gavleborg/Fakta-och-rad/Undersokningar/P-Glukos--blodsocker/> 2016-05-11

Blodkroppar, framförallt leukocyter, och bakterier metaboliserar glukos. Glykolys i blodprover leder till falskt låga glukosvärden. Bildandet av koagel som sker i provrör innehållande koagulationsaktivator leder till en minskad glykolys då kontaktytan mellan serum och celler minskar. Tidigare studier har visat att koncentrationen då minskar med ungefär 0,2 mmol/L varje timme om provet förvaras i rumstemperatur, samt att glukoskoncentrationen minskar med 0,5 mmol/L per timme i rumstemperatur och med ungefär 0,1 mmol/L per timme i kylskåp (4 grader Celsius) i provrör som innehåller antikoagulans. Glykolys hämmas även av tillsatsen fluorid och natrium-fluorid som används i olika provtagningsrör, genom att ämnet fluorid hämmar det glukosmetabiliserande enzymet enolas som finns i cellernas cytoplasma<sup>5</sup>. Dock hämmas inte glykolysen totalt av enbart dessa tillsatser då enzymet förekommer först i slutet av glykolysen, vilket gör att glukoskoncentrationen kan minska med ungefär 0,6 mmol/L redan efter 4 timmar. Tillsats av citrat medför lägre pH-värde i blodprovet och hämmar det katalyserande enzymet fosfofruktokinas i det tredje stadiet i glykolysen [3,5,7].

Om metabolisering av glukos sker under syrebrist bildas produkten laktat. Laktat, 2-hydroxi-propansyra, är en karboxylsyra som har en stor roll inom biokemi. Direkt efter provtagning startar glykolys i blodprovet och eftersom att det råder syrebrist in vitro kan inte slutprodukten pyruvat gå vidare till citronsyracykeln, utan ombildas istället till laktat<sup>6</sup>. Detta sker framförallt i erythrocyter. Trots att pyruvat reduceras till bildning av laktat fortsätter glykolysprocessen genom oxidationen av NADH till NAD<sup>+</sup>. Detta gör att minskningen av glukoskoncentrationen är proportionell mot ökningen av laktatkoncentrationen [8]. Detta tyder på att laktat inte borde öka in vitro om glykolysen hämmas fullständigt. Seymour et al. beskriver att låga temperaturer fördröjer reduktionen av pyruvat till laktat i blodprover och att

---

<sup>5</sup> Många faller vid ”enkel” mätning av glukos i blod och plasma. Elvar Theodorsson, Läkartidningen 1998;95:5157:62

<sup>6</sup> [www.wiki.du.se](http://www.wiki.du.se) - Medicinsk vetenskap - Medicinsk baskurs-fysisk aktivitet och hälsa - Ordlista – Laktat – 2016-03-23

förvaringen av laktatprover på is är en väldigt viktig faktor [9].

Homocystein är en analyt som är känslig för preanalytiska fel som kan uppstå vid till exempel transport och förvaring. Det är en svavelhaltig aminosyra som bildas vid omsättningen av den essentiella aminosyran metionin. Homocystein kan metaboliseras på två olika biokemiska sätt, genom remetylering eller transsulfurering. Vid remetylering behöver enzymerna som ingår i processen tillgång till kofaktorerna folat och vitamin B12. Vid transsulfurering omvandlas homocystein irreversibelt till cystationin med hjälp av cystationin- $\beta$ -syntas och vidare till cystein och  $\alpha$ -ketobutyrat med hjälp av enzymet cystationin- $\gamma$ -las. De två enzymerna som ingår i transsulfureringen är beroende av kofaktorn vitamin B6. Brist på någon eller flera av dessa kofaktorer leder till förhöjda koncentrationer av homocystein på grund av hämmad ombildning<sup>7</sup> [10, 11]. Direkt efter provtagning börjar erythrocyter att frisläppa homocystein. Redan efter en timme kan koncentrationen ökat med 10 % och efter fyra timmar är det vanligt med en ökning på 35 %. Normalt bör homocysteinkoncentrationen vara under 15  $\mu\text{mol/L}$ , det är därför viktigt att ur ett preanalytiskt perspektiv centrifugera och separera plasman från blodcellerna inom 30 minuter då 10 % ökning påverkar resultatet markant. Vid inhibering av glykolysen dämpas produktionen av adenosintrifosfat (ATP)<sup>8</sup> och därmed ombildningen av metionin till S-adenosylmetionin, vilket i sin tur tros kunna bromsa koncentrationsökningen av homocystein in vitro<sup>9</sup>.

Klinisk kemi i Region Gävleborg analyserar idag P-glukos i natrium-fluorid/kaliumoxalatrör och litium-heparinrör. P-laktat analyseras i natrium-fluorid/kaliumoxalatrör och P-

---

<sup>7</sup> Hyperhomocysteinemia in patients with abdominal aortic aneurysm and the impact of vitamin B6 status, Carola Berg

<sup>8</sup> Adenosintrifosfat

<sup>9</sup> Usefulness of an antiglycolytic granular mixture of sodium fluoride and citrate for stabilizing plasma homocysteine levels, Els Dumoulin et al.

homocystein i litium-heparinrör. Flera laboratorier har gått över till att analysera P-glukos i fluorid/citratrör, vilket mer effektivt skall hämma glukosnedbrytningen. Denna hämning ger en lätt ökning av glukoskoncentrationen i plasma. Då det är en praktisk fördel att kunna analysera så många komponenter som möjligt i fluorid/citratrör, ville Region Gävleborg testa om det går att analysera de tre ovan nämnda analyterna i det nya fluorid/citratröret. Det var även av intresse att testa homocystein i natrium-fluorid/kaliumoxalatrör.

Syftet med denna studie var att utvärdera ett nytt provtagningsrör med tillsatserna fluorid/citrat för analyserna glukos, laktat och homocystein. Även hållbarheten av de tre analyterna i litium-heparinrör, natrium-fluorid/kaliumoxalatrör och fluorid/citratrör utvärderades. För att studien av hållbarheten för analyterna i de olika provtagningsrören skulle kunna genomföras, utfördes en metoduppsättning och verifiering på analysen av homocystein på Cobas 6000 c501.

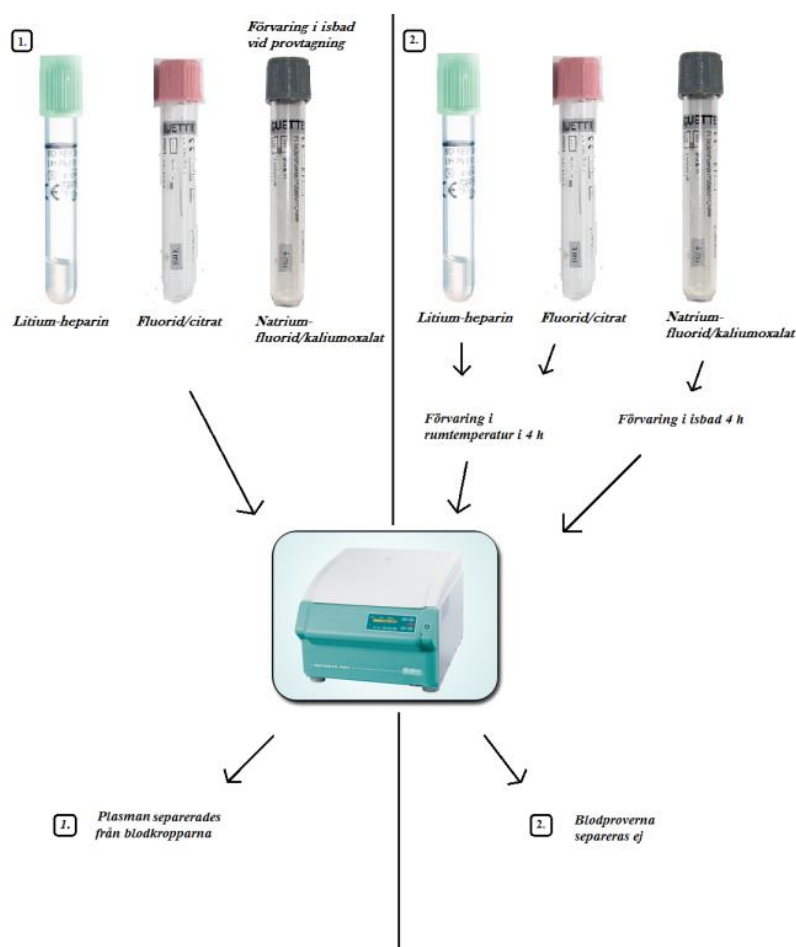
## MATERIAL OCH METOD

### **Studieupplägg**

Studien utfördes på Klinisk Kemi och transfusionsmedicin i Hudiksvall. Inför studien utfördes en metodverifiering för analysen homocystein, där 20 blodprover i litium-heparinrör samlades, analyserades och sedan transporterades från laboratoriemedicin i Gävle till Hudiksvall för jämförande analys. Proverna var avhållda och nedfrysta under transporten.

Inför studien av hållbarhet togs venösa blodprover från 10 frivilliga och friska personer i tre typer av provtagningsrör. Sammanlagt samlades 6 provrör per person, där 3 rör centrifugerades direkt och 3 stycken fick stå i 4 timmar före centrifugering (figur 1). Natrium-fluorid/kaliumoxalatrören placerades direkt i isbad vid provtagning och förvarades där fram

till centrifugering. Rören som centrifugerades direkt efter provtagning märktes med nummer 1 och rören som förvarades i rumstemperatur respektive isbad (natriumfluorid/kaliumoxalatrören) i 4 timmar före centrifugering märktes med nummer 2. Därefter analyserades samtliga prover efter 4, 24 och 72 timmar efter provtagning. Provrören med märkning 1 analyserades även direkt efter provtagning (0 timmar) och användes som referensvärde. Mellan analyserna förvarades alla prover i kylskåp, 4°C. Alla analyser utfördes på på Cobas 6000 c501 (Roche diagnostics)<sup>10</sup>.



*Figur 1:* Tre provrör (litium-heparin, natrium-fluorid/kaliumoxalat, fluorid/citrat) centrifugerades direkt efter provtagning. Natrium-fluorid/kaliumoxalatröret placerades i isbad vid provtagning. De andra proverna fick stå 4 timmar (h) före centrifugering i rumstemperatur respektive isbad. Proverna märkta med nummer 1 separerades från blodkropparna.

<sup>10</sup> Division Diagnostik, Laboratoriemedicin Region Gävleborg, Cobas 6000 Provhantering, Dokumentnr: 09-141072, Fastställare: Emma Göransson, Hämtad: 160310



## **Verifiering homocystein**

För att studien skulle kunna utföras behövdes en metodverifiering på analysen P-homocystein utföras. Vid verifieringen utfördes först en full kalibrering med Homocystein (HCYS) kalibrator kit och sedan utfördes en inomserieprecision där 15 prover bestående av kontrollmaterial analyserades vid samma mättillfälle på 2 olika koncentrationnivåer,  $13,84 \pm 0,48$  och  $40,81 \pm 2,11$   $\mu\text{mol/L}$ . Därefter utfördes en mellanserieprecision där kontrollmaterial på samma koncentrationnivåer analyserades, 4 prover per koncentrationnivå i 5 dagar. Slutligen utfördes en patientjämförelse där 20 patientprover analyserades i dubbelprov. Proverna var tagna i litium-heparinrör (BD Vacutainer) och analyserades på masterinstrumentet Cobas 6000 IH5 på laboriemedicin i Gävle. De hölls sedan av och frystes inför transport till Hudiksvalls laboratorium. Resultaten från Hudiksvall och Gävle sammanställdes och redovisades i dokument i Excel-format där medelvärden, precision, linjär regression och variationskoefficient (CV%) beräknades. Verifieringen godkändes av Lars-Olof Hansson, medicinsk rådgivare på Klinisk Kemi, Region Gävleborg<sup>11</sup>.

## **Analys av glukos, laktat och homocystein i plasma**

Inför analys av glukos, laktat och homocystein togs venösa blodprover i litium-heparinrör (BD Vacutainer 3 mL, ref: 367374, BD-Plymouth PL6 7BP, UK), natrium-fluorid/kaliumoxalatrör (BD Vacutainer 4 mL, ref: 368921, Franklin Lakes NJ, USA) och fluorid/citratrör (Vacuette Greiner Bio-one, 3mL, ref: 454513, Kremsmünster, Österrrike).

Natrium-fluorid/kaliumoxalatrören placerades i isbad direkt efter provtagning medan de andra rören förvarades i rumstemperatur fram till centrifugering. Natrium-fluorid/kaliumoxalatrören märkta med nummer 2 förvarades i isbad under 4 timmar före centrifugering. Övrig tid under

---

<sup>11</sup> Metodverifiering/validering klinisk kemi, Division diagnostik, dokumentnr: 09-01382, fastställare: Lars Olof Artur Hansson

studien förvarades proverna i kyl.

Varje morgon när prover skulle analyseras kördes kontroller och eventuella kalibreringar. 5-punktskalibrering med HCYS kalibrator kit utfördes vid metodverifiering och sedan var 28:e dag under studiens gång. Koncentrationsnivåer och variationskoefficient för kontroller redovisas i tabell 1.

*Tabell 1:* Kontrollmaterial, koncentrationsnivåer och variationskoefficient för analyserna glukos (mmol/L), laktat (mmol/L) och homocystein ( $\mu\text{mol/L}$ ).

<b>Kontrollmaterial</b>	<b>Koncentrationsnivå</b>	<b>CV%</b>
<b>Glukos, MQ2</b>	6,6	1,31
<b>Glukos, MQ3</b>	20	1,22
<b>Laktat, MQ2</b>	3,5	1,20
<b>Laktat, MQ3</b>	5,4	1,28
<b>Homocystein, HCYS2</b>	13,84	1,70
<b>Homocystein, HCYS3</b>	40,81	1,47

## **Etik**

Ingen etikprövning krävdes inför denna studie. De personer som deltog hade lämnat medgivande och var väl informerade om studien. Alla prover märktes med opersonliga LID-nummer (Lab-identitetsnummer) så att ingen personlig identitet avslöjades. Region Gävleborgs regler och förordningar kring sekretess och tystnadsplikt följdes under studiens gång.

## **Statistiska analyser**

För bearbetning av data användes programmet Microsoft Excel och minitab 17. Utifrån resultat från metodverifieringen beräknades medelvärden, standardavvikelse, variationskoefficient och linjär regression. För att se om det fanns någon statistisk skillnad mellan de olika provtagningsrören eller analysid för varje enskild analys användes 4-vägs ANOVA (variationsanalys), Tukey Pairwise Comparisons och parat t-test, samtliga med 95 % signifikansnivå. För att studera analyternas hållbarhet i de tre olika provtagningsrören användes beräkningar av medelvärden samt Tukey Pairwise Comparisons.

## **RESULTAT**

### **Metodverifiering**

För att kunna analysera P-homocystein på instrumentet Cobas 6000 på laboratoriet i Hudiksvall var det nödvändigt att utföra en metodverifiering, då analysen vanligtvis analyseras på masterinstrumentet Cobas 6000 IH5 på klinisk kemi i Gävle.

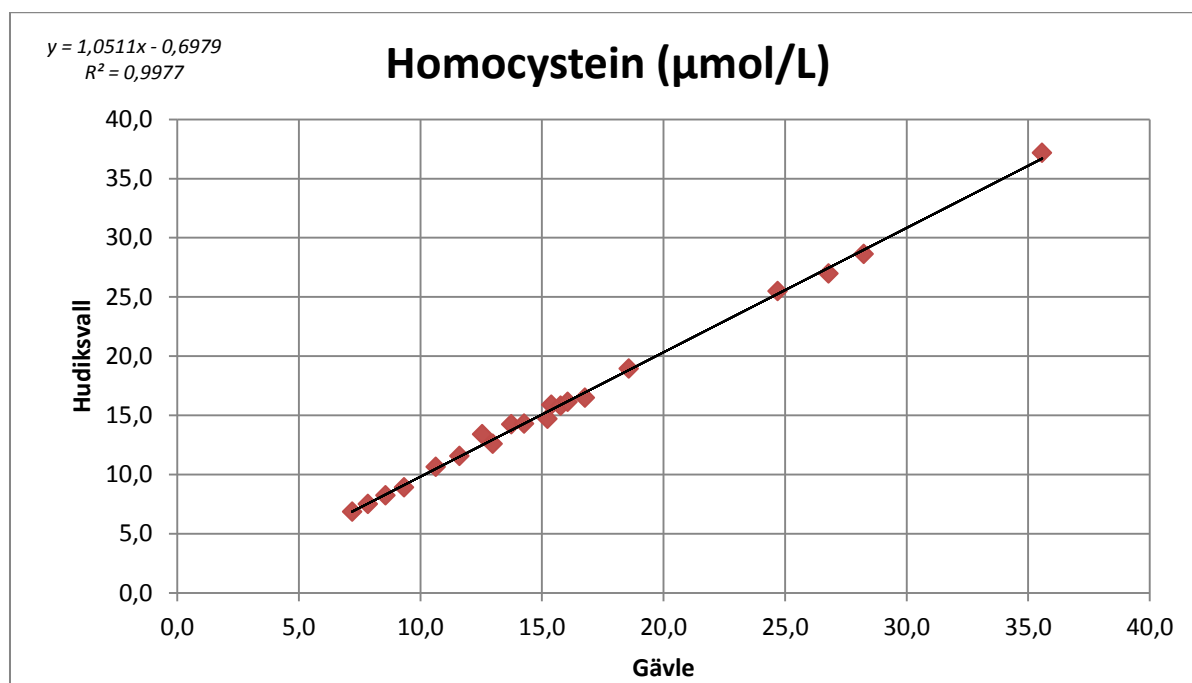
Variationskoefficienten för inomserieprecisionen var 1,70 för den låga kontrollen och 1,47 för den höga kontrollen. Variationskoefficienten för mellanserieprecisionen var 2,84 för den låga kontrollen och 2,65 för den höga kontrollen. Metodverifieringen godkändes.

Tabell 2: Medelvärde, standardavvikelse (SD) och variationskoefficient (CV) för inomserieprecision och mellanserieprecision, på en låg och en hög koncentrationnivå.

	<b>Koncentrationsnivå ± SD:</b>			<b>Koncentrationsnivå ± SD:</b>		
	<b>13,84 ± 0,48 µmol/L</b>			<b>40,81 ± 2,11 µmol/L</b>		
	Medelvärde	SD	CV %	Medelvärde	SD	CV %
<b>Inomserieprecision</b>	14,18	0,24	1,70	39,49	0,58	1,47
<b>Mellanserieprecision</b>	14,10	0,40	2,84	39,81	1,06	2,65

I patientjämförelsen jämfördes resultat på samma prover analyserade i Hudiksvall respektive Gävle. Medelvärdet för proverna var 16,22 µmol/L med en standardavvikelse på 0,27.

Variationskoefficienten var 1,66 och den linjära regressionen var 0,9977 (figur 2).



Figur 2: Patientprover analyserade i dubbelprov. Prover som analyserats i Gävle redovisas på x-axeln och prover som analyserats i Hudiksvall redovisas på y-axeln.

## Analys av glukos, laktat och homocystein i plasma

I den här studien undersöktes ett provtagningsrör från Vacuette med tillsatserna fluorid och citrat för analyserna glukos, laktat och homocystein. Även hållbarheten av dessa tre analyser undersöktes i litium-heparin, natrium-fluorid/kaliumoxalat och fluorid/citratrör. På 10 friska försökspersoner togs två blodprov av varje rörtyp, där en uppsättning av prover centrifugerades direkt efter provtagning och en uppsättning centrifugerades efter 4 timmar. Analysvärdena från provrören som centrifugerades och analyserades direkt användes som referensvärde. Med 4-vägs ANOVA och sedan Tukey Pairwise Comparisons med 95 % signifikansnivå, jämfördes de olika rören samt analystider för varje analys (tabell 3 och 4). Analysvärdena i jämförelsen mellan de tre olika provtagningsrören visar att det blev en signifikant lägre koncentration av glukos och en signifikant högre koncentration av laktat i litium-heparinröret. För homocystein blev det en signifikant lägre koncentration i natrium-fluorid/kaliumoxalatröret.

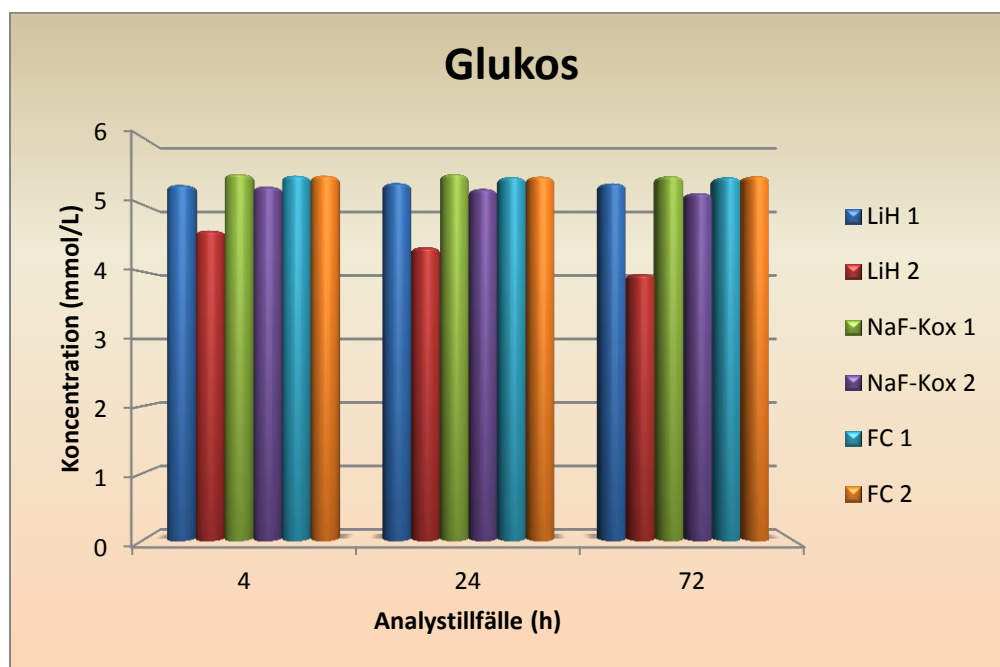
Tabell 3: Medelvärden från Tukey Pairwise Comparisons. De resultat med stjärnmarkering visar en signifikant skillnad från de andra provtagningsrören.

Provtagningsrör → Analyser ↓	Litium-heparin	Natrium- fluorid/kaliumoxalat	Fluorid/citrat
Glukos (mmol/L)	4,82*	5,34	5,43
Laktat (mmol/L)	2,29*	1,08	0,73
Homocystein ( $\mu$ mol/L)	11,88	3,95*	11,66

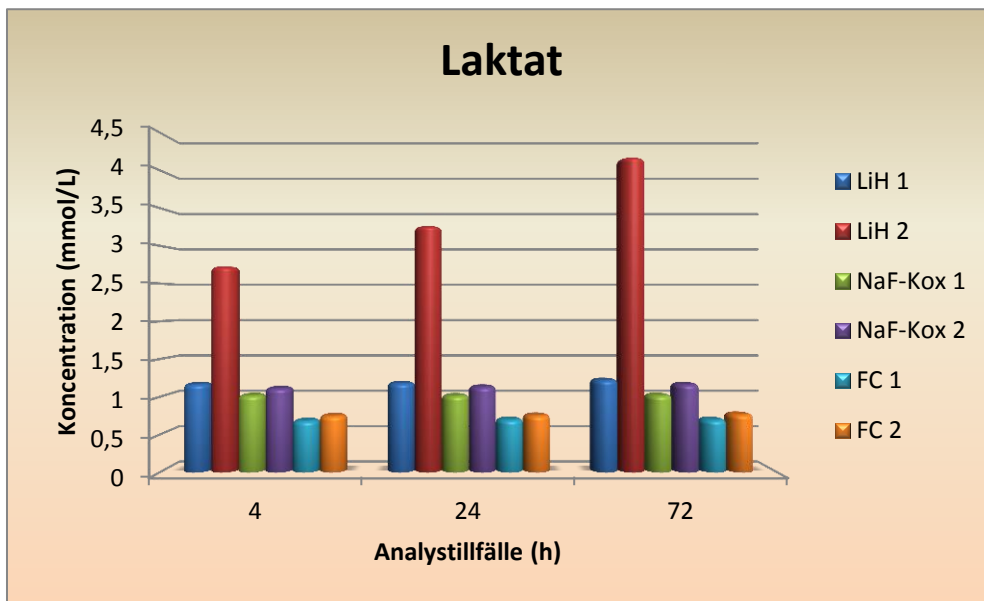
Tabell 4: Medelvärden från Tukey Pairwise Comparisons på en generell jämförelse av tid fram till analys för alla tre olika provtagningsrör. De resultat med stjärnmarkering visar en signifikant skillnad från de andra provtagningsrören.

Tid →	4 h	24 h	72 h
<b>Analyser ↓</b>			
<b>Glukos (mmol/L)</b>	5,26	5,21	5,13*
<b>Laktat (mmol/L)</b>	1,24	1,34	1,51*
<b>Homocystein (µmol/L)</b>	9,16	9,12	9,21

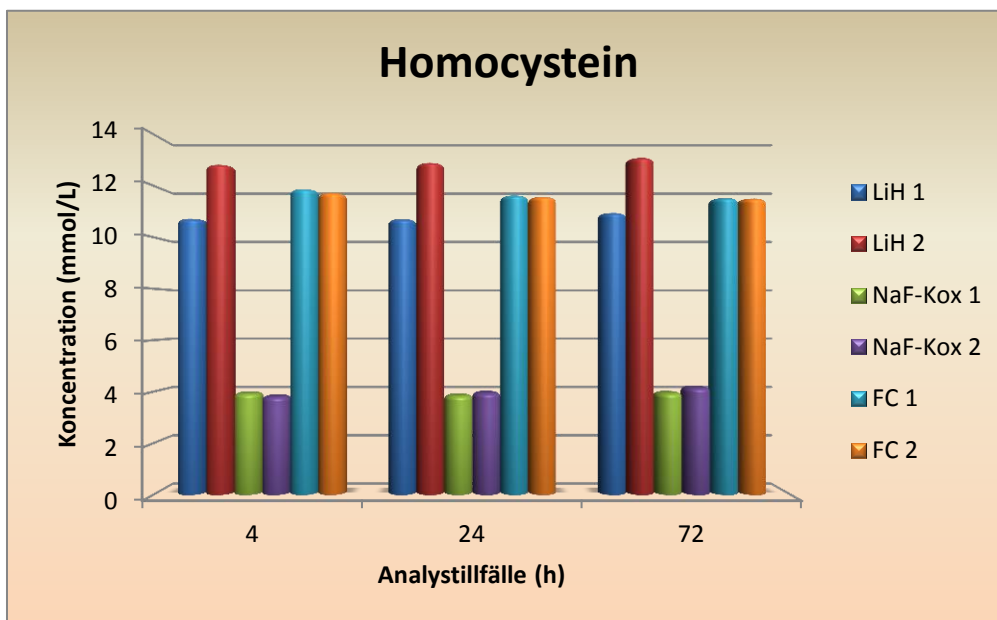
Eftersom varken ANOVA eller Tukey Pairwise Comparisons kunde förbise variationerna i hållbarhet om plasman separerades från blodkropparna eller inte, beräknades medelvärden för varje enskilt rör och analys (figur 3, 4 och 5).



Figur 3: Medelvärden för glukoskoncentrationerna (y-axel) i de olika provtagningsrören litium-heparin (LiH), natrium-fluorid/kaliumoxalat (NaF-Kox) och fluorid/citrat (FC) vid x timmar (h) efter provtagning (x-axel). Nummer 1 representerar direkt centrifugering och separerad plasma, medan nummer 2 representerar centrifugering efter 4 timmar och ej separerad plasma.



Figur 4: Medelvärden för laktatkoncentrationerna (y-axel) i de olika provtagningsrören litium-heparin (LiH), natrium-fluorid/kaliumoxalat (NaF-Kox) och fluorid/citrat (FC) vid x timmar (h) efter provtagning (x-axel). Nummer 1 representerar direkt centrifugering och separerad plasma, medan nummer 2 representerar centrifugering efter 4 timmar och ej separerad plasma.



Figur 5: Medelvärden för homocysteinkoncentrationerna (y-axel) i de olika provtagningsrören litium-heparin (LiH), natrium-fluorid/kaliumoxalat (NaF-Kox) och fluorid/citrat (FC) vid x timmar (h) efter provtagning (x-axel). Nummer 1 representerar direkt centrifugering och separerad plasma, medan nummer 2 representerar centrifugering efter 4 timmar och ej separerad plasma.

För att se om det fanns någon statistisk skillnad mellan direkt och fördröjd centrifugering utfördes Tukey Pairwise Comparisons och parat t-test med 95 % signifikansnivå (tabell 5) på analysresultat erhållna 4 timmar efter provtagning. Testets nollhypotes var att det inte fanns någon skillnad mellan grupperna och den förkastades om  $p < 0,05$ . Tukey Pairwise Comparisons visade signifikant bättre hållbarhet när proverna centrifugerades direkt. Då detta test inte kunde jämföra varje enskilt provtagningsrör beräknades även parat t-test. Resultaten har avrundats till 3 decimaler, ett värde avrundades till 4 decimaler då svaret annars hade blivit noll.

Tabell 5: P-värden av parat t-test med 95 % signifikansnivå på resultat erhållna 4 timmar efter provtagning. Resultaten visar alla tre analyserna i tre olika provtagningsrör. Märkning (#) visar signifikant skillnad mellan direkt och fördröjd centrifugering.

Provtagningsrör →	Litium-heparin	Natrium- fluorid/kaliumoxalat	Fluorid/citrat
Analys ↓			
Glukos	# $2,001 \cdot 10^{-07}$	# 0,003	0,982
Laktat	# $3,980 \cdot 10^{-08}$	# 0,0003	# 0,001
Homocystein	# $3,248 \cdot 10^{-07}$	0,269	0,633

## DISKUSSION

Vid hantering av patientprover är det väldigt viktigt att den preanalytiska fasen är väl fungerande, då det är där som de flesta fel som påverkar resultaten sker. Ofta är det patienten som drabbas om något går fel och det kan vara nödvändigt att ta om blodproverna, fel behandlingsmetoder kan ordinerats och ibland kan även sjukdomar förbises [12]. Två viktiga preanalytiska faktorer är transport och hantering av prover före analys. Flera analyser



påverkas lätt av omgivande miljö, men även av blodkroppar när blodet samlats i provtagningsrör, vilket kan leda till koncentrationsförändringar.

I Region Gävleborg ville man göra en utvärdering på det nya glukosröret med tillsatserna fluorid/citrat från Vacuette, samt studera hållbarheten av analyserna P-glukos, P-laktat och P-homocystein i litium-heparinrör, natrium-fluorid/kaliumoxalatrör och fluorid/citratrör. Att studera hållbarheten av de tre analyserna i plasmaprover som var separerad respektive plasmaprover som inte var separerad var intressant då centrifugering kan bli fördröjd på grund av till exempel brist på utrustning eller transport till ett laboratorium. Förvaringen av prover i 4 timmar före centrifugering skulle representera transporttid eller fördröjningstid fram till centrifugering. Detta för att se om det kan vara behov av att utforma riktlinjer för direkt centrifugering av prover med dessa analyser eller inte. Jämförelsen mellan separerade och ej separerade plasmaprover utfördes för att se om prover med dessa tre analyser håller sig stabilare vid snabb separering av plasma från blodkroppar eller om det räcker att proverna centrifugeras inom en viss tid.

Från början var det tänkt att undersöka om P-homocystein skulle hålla sig stabilare i ett provtagningsrör med tillsatserna natrium-heparin-fluorid då flera laboratorier har börjat gå över till det röret. Men på grund av en miss i planeringen användes istället natrium-fluorid/kaliumoxalatrör som redan fanns i lager på laboratoriet och vanligen används till analyserna glukos och laktat på klinisk kemi i Hudiksvall. Det ledde till ett intresse av att istället undersöka analytens stabilitet i alla tre olika provtagningsrören, med fokus på att jämföra om separering av plasman utgjorde någon signifikant skillnad på provresultaten i litium-heparinrören.

Metodverifieringen av P-homocystein utfördes på laboratoriet i Hudiksvall på grund av att prover med beställning av denna analys rutinmässigt transporteras till laboratoriet i Gävle och

analyseras där på masterinstrumentet på Klinisk kemi. För att studien skulle kunna utföras på laboratoriet i Hudiksvall sattes metoden tillfälligt upp på deras instrument. Då verifieringen var klar i Hudiksvall skickades elektroniska sammanställda resultat till Gävle, där Lars-Olof Hansson godkände verifieringsdokumentet och analysen kunde köras.

Instrumentet, centrifugerna och provtagningsrören som användes i studien är av samma typ som används i rutin för patientprover på laboratorier i Sverige. Analyserna och centrifuger var väl verifierade och kontroller och kalibreringar kördes kontinuerligt för att kontrollera att instrumentet och metoderna var stabila. Detta är en fördel då det kontrollerar att resultaten verkligen blir korrekta. Provtagning och hantering följde Region Gävleborgs rekommendationer och de personer som deltog i studien var friska, vars analysresultat hamnade inom datasystemets referensområden, vilket var smidigt att arbeta efter. För att få ett mer tillförlitligt resultat skulle fler försökspersoner inkluderas och analysresultaten varit mer spridd både inom och utanför referensområdet. För att kunna åstadkomma detta krävs mer tid för en bredare studie. Även tid för användning av instrument var bristande då det även användes till laboratoriets rutinprover under studiens gång.

Glukoskoncentrationen minskade markant i provtagningsrören med tillsatserna litium-heparin om de inte blev centrifugerade så fort som möjligt efter provtagning. Den minskade även med tiden om plasman inte blev separerad från blodkropparna. Koncentrationen höll sig stabil i upp till 72 timmar i litium-heparinrören om blodproverna centrifugerades och avhölldes så fort som möjligt efter provtagning. Tidigare studier har visat att hepariniserad plasma får lägre glukoskoncentrationer än plasma med tillsats av fluorid [13,14], vilket även kunde observeras i denna studie. Koncentrationerna höll sig någorlunda lika stabilt i natrium-fluorid/kaliumoxalatrören och fluorid/citratrören. I natrium-fluorid/kaliumoxalatrören

minskade koncentrationerna med tiden om de inte centrifugerades inom åtminstone 30 minuter. I de nya glukosrören med tillsatserna fluorid/citratrören höll sig koncentrationerna lika stabilt i proverna som centrifugerades direkt och de som fick stå ocentrifugerade i 4 timmar. Det fanns heller ingen skillnad mellan plasma som separerades från blodkropparna jämfört med de som inte separerades i fluorid/citratrören. Något som inte framkommer i de sammanställda resultaten var att i flera prover observerades högre glukoskoncentrationer i referensvärdena (analyserades direkt efter provtagning) för fluorid/citratrören, jämfört med natrium-fluorid/kaliumoxalatrören som används idag. Dock fanns det några prover som avvek och hade lika eller något lägre koncentrationer i fluorid/citratrören jämfört med natrium-fluorid/kaliumoxalatrören. Detta styrker att provtagningsrören med fluorid/citrat hämmar glykolysen mer effektivt än provtagningsrören med natrium-fluorid/kaliumoxalat [15].

Laktat är en analyt som ökar i koncentration proportionellt mot minskningen av glukoskoncentrationen genom glykolys [8]. Laktat visade vara oväntat stabilt i fluorid/citratrören, men koncentrationerna var lägre än i natrium-fluorid/kaliumoxalatrören som vanligtvis används för analysen. Man undrar då om det beror på att glykolysen hämmas effektivare så att det inte bildas lika mycket laktat in vitro eller om det har någon annan orsak. I natrium-fluorid/kaliumoxalatrören visade laktatkoncentrationerna inte någon signifikant skillnad om proverna centrifugerades direkt eller inte. Däremot observerades det att det successivt blev hemolys i dessa rör efter 12 timmar, vilket inte är optimalt. En annan sak som observerades med detta provtagningsrör var att blodkropparna gärna ville ”krypa upp” tillbaka i plasman efter cirka 12 timmar efter centrifugering, vilket gör att en extra centrifugering blir nödvändig innan analys. En extra centrifugering efter 24 timmar utfördes på några prover i denna studie, men ingen markant skillnad i resultaten kunde observeras. En nackdel med natrium-fluorid/kaliumoxalatrören är att prover med laktat måste placeras i isbad i samband med provtagning fram till provet centrifugeras. Om proverna blir för kalla kan det påverka

erythrocyterna negativt så att de faller sönder och orsakar hemolys. I denna studie användes isbad enbart till natrium-fluorid/kaliumoxalatrören, vilket betyder att fluorid/citratrören har mycket större praktisk fördel vid provtagning och övrig preanalytisk hantering eftersom att de inte behöver stå i isbad. Fluorid/citratrören var även någorlunda lika stabila med separerad plasma jämfört med plasma som inte var separerad från blodkropparna. Laktatkoncentrationen var stabil och blodkropparna stannade kvar och kröp inte upp i plasman efter centrifugering som det gjorde i natrium-fluorid/kaliumoxalatrören. Provtagningsrör med tillsatserna litium och heparin var inte optimala för att stabilisera laktatkoncentrationen då det blev signifikant högre resultat.

Homocystein analyseras vanligtvis i litium-heparinrör. I denna studie visade det sig att det var viktigt med centrifugering av litium-heparinrören så snart som möjligt efter provtagning för att erhålla bästa möjliga provresultat. Om centrifugeringen fördröjdes med 4 timmar ökade koncentrationen av analyten med 0,8 % i varje blodprov. Efter centrifugering höll sig homocysteinkoncentrationerna stabila vare sig de separerades från blodkropparna eller inte. Homocysteinkoncentrationerna var lika hållbara i både natrium-fluorid/kaliumoxalatrör och fluorid/citratrör, oberoende av direkt eller fördröjd centrifugering samt separering eller ingen separering. I natrium-fluorid/kaliumoxalat var koncentrationerna signifikant lägre än i de övriga två rören. Det hade varit intressant att även utvärdera betydelsen av isbad i samband med provtagning av röret innehållande natrium-fluorid/kaliumoxalat. Om det skulle finnas ett intresse av att byta provtagningsrör från litium-heparin till natrium-fluorid/kaliumoxalatrör för homocystein skulle en mer detaljrik studie behöva utföras, där även referensvärden skulle behöva redigeras. Varken natrium-fluorid/kaliumoxalatrören eller fluorid/citratrören visade någon signifikant skillnad om proverna centrifugerades direkt eller inte. I fluorid/citratrören var koncentrationerna en aning högre än i litium-heparinrören som centrifugerats direkt. Det höll sig någorlunda stabilt men koncentrationen sjönk med tiden istället för att öka som det

teoretiskt sätt bör göra [13,14]. En tidigare studie har gjorts på likande provtagningsrör för glukos, Venosafe Glycaemia provtagningsrör med tillsatserna natrium-fluorid/citrat. Den studien visade att homocystein var stabilt och hållbart upp till 72 timmar och analysen kunde med fördel tas tillsammans med glukos vid provtagning [16].

Slutsatsen för denna studie blev att glukos med fördel kan analyseras i det nya provtagningsröret från Vacuette med tillsatserna fluorid/citrat istället för röret med tillsatserna natrium-fluorid/kaliumoxalat. Även laktat och homocystein visade sig vara hållbara i detta rör, men det kan behöva undersökas ytterligare. Generellt för alla tre analyser var det bättre att centrifugera proverna direkt efter provtagning, med undantag för glukos och homocystein i fluorid/citrat och homocystein i natrium-fluorid/kaliumoxalat som var stabil åtminstone i 4 timmar utan centrifugering. Alla analyser var acceptabelt stabila i 72 timmar förutom de som analyserades i litium-heparinrör med fördröjd centrifugering.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Ett stort tack till Karin Jonsson, Maria Andersson och Emma Göransson för all er vägledande hjälp och att ni gjorde det möjligt för mig att få utföra mitt arbete på laboratoriet i Hudiksvall! Vill även tacka min fantastiska familj och pojkvän som har ställt upp för mig och pushat i svåra stunder under studiens gång.

## REFERENSER

- [1] Loeffen R. et al. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *JTH*. 2012; 10:2544-2554.
- [2] Baron M. J. et al. Detection of preanalytic laboratory testing errors using a statistically guided protocol. *Am J Clin Pathol*. 2012; 138:406-413.
- [3] Winter T., Greiser A., Nauck M., Petersmann. Long-term stability of glucose: 96-h study using terumo glycaemia tubes. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54(3):407-410.
- [4] Boyanton L. B., Jr., Blick E. K. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem*. 2002; 48(12):2242-2247.
- [5] Gupta S. et al. A study to compare the plasma glucose levels obtained in sodium fluoride and citrate buffer tubes at a tertiary care hospital in Punjab. *Int J App Basic Med Res*. 2016; 6:50-3.
- [6] Oddoze 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.
- [7] Heins M., Heil W., Withold W. Storage of serum or wholeblood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1995; 33:231-8.
- [8] Astles E., Williams P. C., Sedor F. Stability of plasma lactate in vitro in the presence of antiglycolytic agents. *Clin Chem*. 1994; 40:1327-1330.
- [9] Seymour W. C. et al. Temperature and time stability of whole blood lactate: implications for feasibility of pre-hospital measurement. *BMC Research Notes*. 2011; 4:169
- [10] Fratoni D., Brandi L. M. B-vitamins, Homocysteine and bone health. *Nutrients*. 2015; 7:2176-2192.

[11] Nauck M., Bisse E., Nauck M., Wieland H. Pre-analytical conditions affecting the determination of the plasma homocysteine concentration. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39(8):675-680.

[12] Satyavati V. No preanalytical errors in laboratory testing: a beneficial aspect for patients. *Indian J Clin Biochem.* 2012;27(4):319-321.

[13] Li G et al. Comparison of glucose determinations on blood samples collected in three types of tubes. *Ann Clin Lab Sci.* 2013; 43(3):278-284.

[14] Gambino R et al. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin Chem.* 2009; 55(5):1019-1021.

[15] Ridefelt P., Åkerfeldt T., Helmersson-Karlqvist J. Increased plasma glucose levels after change of recommendation from NaF to citrate blood collection tubes. *Clin Biochem.* 2014; 47:625-628.

[16] Dumoulin E et al. Usefulness of an antiglycolytic granular mixture of sodium fluoride and citrate for stabilizing plasma homocysteine levels. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50(12):2225-2227.