



AF BIOANALYTIKERUNDERVISER HELLE GLUD BINDERUP
FREDERICIA OG KOLDING SYGEHUSE
VEJLEDER: ADJUNKT ISA NEIMANN THOMASEN

ARTIKLEN ER SKREVET SOM EN EKSAMENSOPGAVE PÅ DIPLOMMODULET, KLINISK
BIOKEMI VED DEN SUNDHEDSFAGLIGE DIPLOMUDDANNELSE, CVU ØRESUND

Blodprøver fra primærsektoren

Opbevaring og transport af blodprøver kan medføre præanalytiske usikkerheder. Hvis fuldblod transporteres og opbevares ved 20-25 °C samt centrifugeres på laboratoriet inden 5-6 timer efter prøvetagning, kan kvalitetsmålet opfyldes

De biokemiske afdelinger på landets hospitaler analyserer dagligt rigtig mange blodprøver, som tages og indsendes af de praktiserende læger. Med den igangværende centralisering i sundhedsvæsenet må vi forvente en stigning i antallet af prøver, som skal transporteres til analysering.

For at minimere de præanalytiske fejl, der kan opstå i forbindelse med opbevaring og transport af blodprøverne, er det en fordel, at så mange af prøverne som muligt kan transporteres under de samme betingelser. Det er ønskeligt, at transporten forgår i primærglas, da man dermed udnytter fordelene ved et lukket prøvetagningssystem og nedsætter risikoen for ombytning af prøve-ID eller kontaminering af prøvematerialet.

Litteraturstudier fremlagt i denne artikel viser, at: Fuldblod, der transporteres med "hospitalsbil", opbevares opretstående ved 20-25 °C, ikke udsættes for rystelser og analyseres/centrifugeres inden for 6 timer efter prøvetagningen, udviser ingen klinisk relevante ændringer i koncentrationen af de mest almindelige biokemiske parametre.

Behov for at mindske fejlkilder

Praktiserende læger i Danmark tager årligt omkring 3 millioner blodprøver, som sendes til analysering på en biokemisk afdeling¹. De analysesvar, som lægerne får, er behæftet med en vis usikkerhed, hvoraf en stor del skyldes præ-

analytiske forhold. Det drejer sig om forhold omkring patienten (alder, køn, kost, døgnvariationer m.m.), forhold i forbindelse med prøvetagningen (stase, glasrækkefølge m.m.) og forhold relateret til behandling og opbevaring af blodprøven forud for analysering (temperatur, centrifugering, transport m.m.). Sammenlignet med blodprøver fra hospitalernes sengeafsnit og ambulatorier er der for prøverne fra lægepraksis typisk længere tid mellem prøvetagning og analysering og dermed en større usikkerhed på analyseresultaterne. Desuden kan lægernes prøver påvirkes af den valgte transportform og af, hvorvidt de centrifugeres i lægepraksis eller ej.

Med den igangværende centralisering i sundhedsvæsenet kan vi næppe forvente et fald i antallet af blodprøver, der skal transporteres forud for analysering. Jeg mener derfor, at det er vigtigt at sætte fokus på og arbejde for at mindske de fejlkilder, der ligger i opbevaring og transport af blodprøver. Jeg vil i denne artikel se på, hvordan vi skal organisere transporten af blodprøver fra lægepraksis for at tilgodese flest mulige analyseparametre.

Forhold af betydning for analyseresultatet

Transport

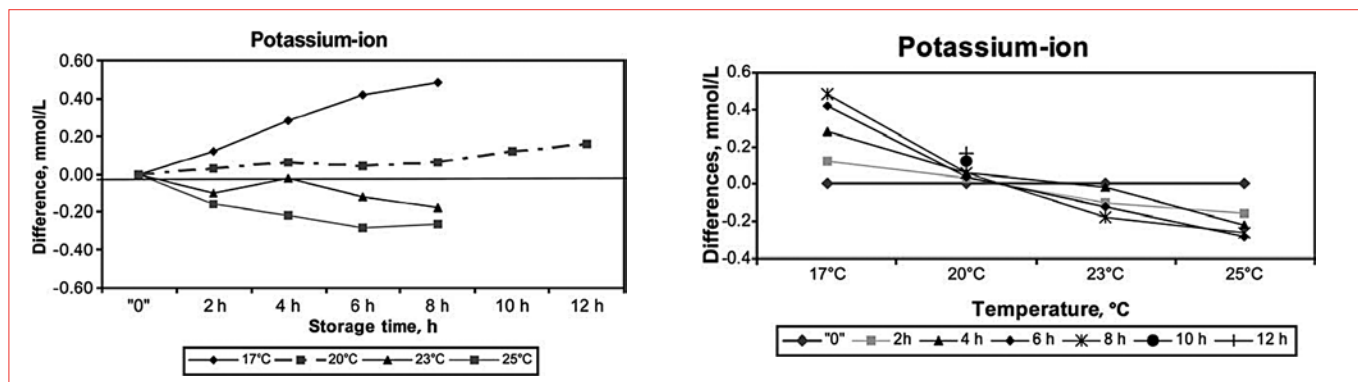
Der er stor forskel på, hvordan transporten af blodprøver fra lægepraksis til

de enkelte hospitalslaboratorier er organiseret. Jensen et al¹ beskriver forholdene for to danske laboratoriecentre.

Center A modtager prøver pr. post, med "hospitalsbil" eller med rutebil. De prøver, der transporteres via rutebil, afleveres af lægerne i specielle kasser opstillet ved busstoppestederne, medtages af buschaufførerne og afleveres til hospitalets portørafdeling. Alle prøver til Center A er i varierende grad udsat for udendørstemperaturer, hvilket betyder, at årstiden spiller en betydelig rolle i forhold til analyseusikkerheden.

Center B har udelukket denne årstidsvariation. De henter alle praksisprøver med en "hospitalsbil", og prøverne opbevares og transporteres i termostaterede kasser ved 21 ± 1 °C. Prøvernes orientering under transporten (stående/liggende) og de rystelser, de udsættes for undervejs til laboratoriet, er andre faktorer, som kan påvirke analyseresultaterne.

Van Geest-Daalderop et al.³ så stignende INR-værdier i prøver, der blev udsat for rystelser i horisontalt liggende position. Det ses af figur 2 forsøg 2a, at stort set alle prøver, efter 24 timer, havde en ændring i INR på mere end 10 %, når prøverne havde ligget på en "roller mixer". Til sammenligning ses af forsøg 2b, at rystelser i opretstående position medførte langt færre ændringer, og forfatterne anbefaler, at prøver til INR-bestemmelse transporteres opretstående³.



Figur 1²
Viser ændringer i kaliumkoncentrationen som følge af temperatur og tid før centrifugering.

De to forsøg er ikke umiddelbart sammenlignelige, da de er udført på tre forskellige laboratoriecentre og ved to forskellige temperaturer. Forsøgene viser dog en tydelig tendens, som det er let at tage højde for ved at transportere blodprøverne opretstående.

Centrifugering

Det øger holdbarheden af de fleste analyseparametre, hvis blodprøverne centrifugeres, og plasma/serum separeres hurtigst muligt efter prøvetagningen^{1,2,3,5,9}. Dette er imidlertid dyrt, da det kræver, at alle lægepraksis udstyret med centrifuger, at disse vedligeholdes, og at lægerne honoreres for håndteringen af prøverne. Desuden er der risiko for ombytning af prøve-ID og for kontaminering, når plasma/serum skal overføres til et nyt glas¹.

Ved forsendelse i centrifugerede gelglas får man plasma/serum separeret uden at skulle afpipettere prøvematerialet, men rystelser under transporten kan medføre gelfragmentationer. Den fragmenterede gel tillader passage af trombocytter, og der ses ændringer i kalium og LD over tid, som følge af koncentrationsforskellen mellem intra- og ekstracellulærvæsken^{1,5}. Disse ændringer ses også i ucentrifugerede prøver, og særligt udtalt, hvis der som følge af rystelserne er opstået hæmolyse.

Prøver til INR-bestemmelse, som centrifugeres umiddelbart efter prøve-

tagningen, og hvor plasma forbliver i primærglasset, er stabile ved stuetemperatur i 24 timer³. Hvis prøverne ikke centrifugeres, ses nedsat holdbarhed, afhængigt af opbevaringsbetingelser, prøvetagningssystem og analyse-princip. Heil et al.¹¹ så en nedsat holdbarhed af PT i plasma, som blev separeret fra de pakkede celler. Det kan være en følge af ændringer i pH, som skyldes tab af hæmoglobin-buffersystemet.

APTT er den af rutine-koagulationsanalyserne, som er mindst stabil. Det skyldes især inaktivering af koagulationsfaktorerne V og VIII, som medfører en forlænget APTT¹¹.

Ifølge Salvagno et al.¹² er de ændringer, der ses i ucentrifugerede prøver efter 6 timers opbevaring ved 4 °C eller stuetemperatur, dog stadig klinisk acceptable.

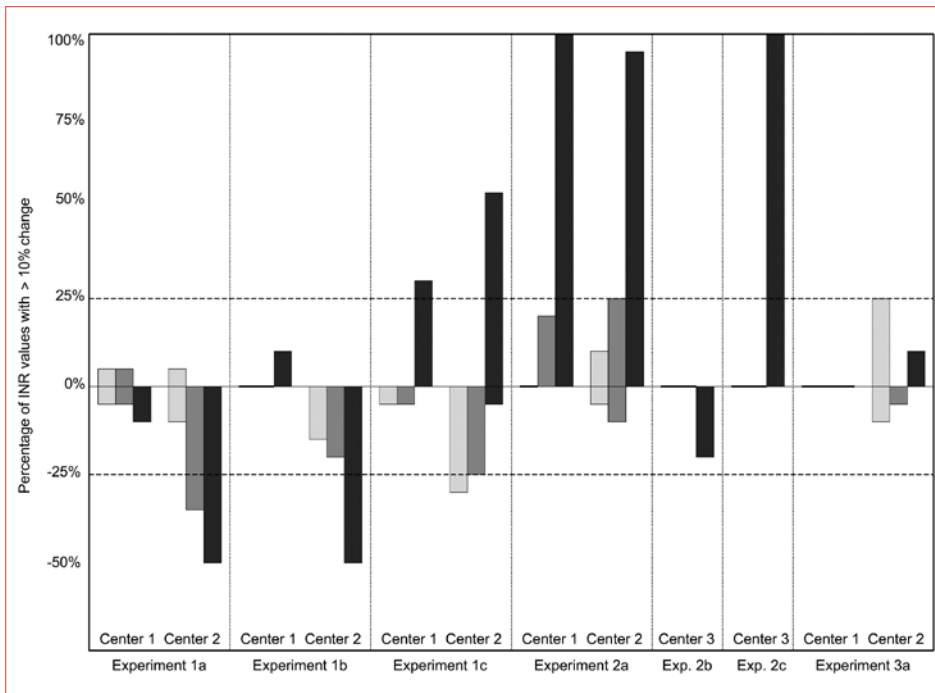
Temperatur

Jensen et al.¹ undersøgte 21 biokemiske parametre, heriblandt nogle af dem, som hyppigt rekvireres fra lægepraksis, som f.eks. natrium, kalium, creatinin, LD, ALT, GGT, CRP, basiske fosfatase, bilirubin og albumin. De fandt, at kalium, fosfat, alanin aminotransferase (ALT), α -glutamyl-transferase (GGT) og laktat dehydrogenase (LD) er de mest temperaturfølsomme, men at alle parametre, med undtagelse af fosfat, er stabile i fuldblod opbevaret ved 20-25 °C i op til 6 timer før centrifugering. Fosfat

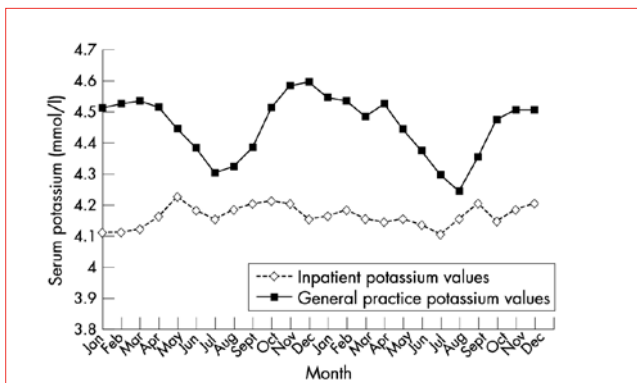
viste sig at være meget ustabil, og forfatterne anbefaler, at prøver til analyse af fosfat tages på hospitalet. En mulig forklaring på ændringerne i fosfat kan være hydrolyse af cellulært organisk fosfat vha. basiske fosfatase.

I et andet studie undersøgte Stahl og Brandslund stabiliteten af 27 biokemiske parametre, opbevaret ucentrifugeret ved temperaturer mellem 17 og 25 °C. De fandt, at kun kalium udviste klinisk relevante ændringer som følge af temperaturen i 8-12 timer². Stahl og Brandslund² så ikke den samme ustabilitet af fosfat som Jensen et al.¹, men observerede dog et fald i koncentrationen efter 8 timer. Denne forskel kan skyldes, at hvor Jensen et al.¹ benyttede blodprøver fra 406 patienter, som selv havde opsøgt egen praktiserende læge, så omfattede Stahl og Brandslunds² undersøgelse kun prøver fra 5 raske forsøgspersoner. 5 forsøgspersoner er et meget lille antal til en undersøgelse. Dertil kommer, at der kan være stor forskel på, hvordan blodprøver fra raske og syge påvirkes af omgivelserne, hvilket er en svaghed ved studiet.

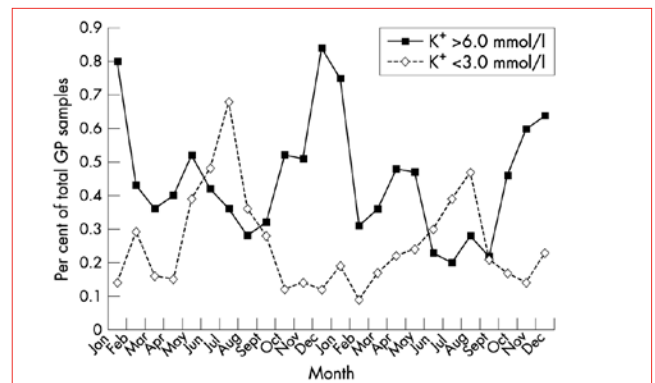
Af figur 1 ses, at kaliumkoncentrationen er mest stabil ved ca. 20 °C, og at det ved denne temperatur ikke er nødvendigt at centrifugere prøverne de første 8 timer efter prøvetagningen². (Se figur 1 ovenfor)



Figur 2³
 Figuren viser den procentvise andel af patienter med en ændring i INR på mere end 10 %
 1a-c i ucentrifugerede prøver ved henholdsvis 4 °C, stuetemp. og 37 °C.
 2a i prøver som har ligget på en "roller mixer" (imitation af transport)
 2b-c er mikset vertikalt og er opbevaret ved henholdsvis 4 °C og 37 °C
 3a i centrifugerede prøver (ikke afpipetterede)
 ■ 3 timer ■ 6 timer ■ 24 timer



Figur 3¹⁰ Gennemsnitlige kaliumkoncentrationer fra indlagte/praksis-patienter.



Figur 4¹⁰ Den procentvise andel af praksisprøver med kaliumkonc. <3,0 mmol/l eller >6.0 mmol/l

Sinclair et al.¹⁰ undersøgte årstidsvariationer i kaliumkoncentrationen på prøver fra henholdsvis indlagte patienter og patienter fra lægepraksis. Resultatet ses af figur 3, som viser store årstidsafhængige udsving på prøverne fra lægepraksis, udsving, som tilskrives temperaturen under transporten, da der ikke ses tilsvarende udsving på prøverne fra de indlagte patienter. (Se figur 3 og 4 ovenfor)

Figur 4 viser den procentvise andel af praksisprøver med henholdsvis hypo- og hyperkaliæmi (<3,0 mmol/l eller >6,0 mmol/l) hen over en 24 måneders periode¹⁰. Det ses, at antallet af patienter, der får konstateret en klinisk relevant ændring i kalium, svinger meget hen over året. Dette kan være meget kritisk for patienterne og f.eks. forårsage forstyrrelser i hjerterytmen.

Af figur 1, 3 og 4 ses tydeligt, at kaliumkoncentrationen stiger ved faldende temperaturer og falder ved stigende temperaturer. Disse udsving skyldes den temperaturafhængige Na⁺K⁺-AT-Pase-aktivitet, og prøver til bestemmelse af kalium bør derfor opbevares ved ca. 20 °C, hvor transporten af kalium ind og ud af cellerne er i balance^{2,5,10}.

Ifølge van Geest-Daalderup et al.³ kan prøver til INR-bestemmelse opbevares ucentrifugerede ved 4 °C eller ved stuetemperatur. Højere temperaturer (37 °C) nedsætter holdbarheden.

Froom et al.⁴ fandt, at prøver opbevaret ved stuetemperatur i 24 timer gav anledning til en rimelig konstant stigning i INR på 6 %. Opbevaring ved 4 °C gav ingen ændring i den gennemsnitlige INR-værdi, men man så stigende INR hos

nogle patienter og faldende INR hos andre. Forfatterne anbefaler derfor, at prøver til INR-bestemmelse opbevares ucentrifugerede ved stuetemperatur, og at analyseresultatet efterfølgende korrigeres med en faktor 0,94 (faktoren vil naturligvis afhænge af forholdene for det enkelte laboratorium).

Heil et al.¹¹ fandt også en bedre holdbarhed af PT ved stuetemperatur og begrunder det med, at faktor VII er ustabil under kolde betingelser.

Tid

Når blodprøver transporteres/opbevares som fuldblod, er nogle af de biokemiske parametre holdbare i maksimalt 6-8 timer. Ønskes en længere holdbarhed, må prøverne centrifugeres, og plasma overføres til et nyt glas, hvorefter det ikke længere er følsomt for hverken tid eller temperatur^{1,9}.

Ford og Berg⁸ undersøgte stabiliteten af Roché kinetiske Jaffa metode til creatininbestemmelse, en metode, som også er meget udbredt i Danmark. De fandt en stabil creatininkoncentration i ucentrifugerede prøver i op til 8 timer, men en signifikant stigning ($p < 0,001$) efter 16 timer. Ved analysering af afpipetterede prøver eller ved brug af en enzymatisk analysemetode (Ortho Vitros) fandt man ingen signifikante ændringer i creatininkoncentrationen.

Boyanton og Blick⁹ fandt også signifikante stigninger i creatinin målt med den kinetiske Jaffa metode, men først efter 24 timer, hvor koncentrationen var steget med 110 % i plasma og 60 % i serum.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (tidligere NCCLS) anbefaler, at prøver til bestemmelse af PT/INR analyseres inden 24 timer efter prøvetagning. Flere studier bekræfter, at der i op til 24 timer ikke ses klinisk relevante ændringer i den gennemsnitlige PT/INR-værdi^{3,11,12}.

Van Geest-Daalderop et al.³ undersøgte ændringer i INR som følge af tid og temperatur ved at måle på 20 patienter på hvert af to laboratoriecentre. Center 1, som brugte citratglas i plastik af mærket "Monovette" og thromboplastinet "Hepato Quick" på STA Rack, fandt langt mindre ændringer i INR end center 2, som brugte citratglas i plastik af mærket "Venocject II", thromboplastinet "Recombiplastin" på Electra 1600 C.

Som det ses af figur 2, fandt center 1, at prøverne er stabile i 24 timer ved 4 °C eller stuetemperatur, hvorimod prøver til analysering i center 2 højst må være 6 timer gamle, når man vurderer, at en ændring i INR på 10 % er klinisk relevant. Der er altså god grund til, at det enkelte laboratorium undersøger forholdene for netop deres kombination af prøvetagningssystem, reagens og analyse-udstyr, inden holdbarheden af INR-prøverne fastlægges. (Se figur 2 til venstre)

K3-EDTA-blod til antalsbestemmelse af erythrocytter, leukocyter og trombocytter er stabilt i 48 timer ved stuetemperatur. Der er derimod stor forskel på en automatiseret differentiering af leukocyter efter henholdsvis 4 og 48 timer. Der ses et fald i antallet af neutrofile granulocytter og monocytter og en stigning i lymfocytter og eosinofile granulocytter⁷. Ifølge Narayanan⁶ er holdbarheden af EDTA-blod, hvorpå der ønskes en 5-parts differentialtælling, maksimalt 6 timer ved stuetemperatur for de fleste hæmatologistyr. Dette skyldes morfo-

logiske ændringer i specielt de neutrofile granulocytter, som bl.a svulmer op, mister granulering af cytoplasma og får vacuoler i kerne og cytoplasma. Det anbefales, at blodudstrygninger til manuel differentialtælling præpareres 1-3 timer efter prøvetagning.

Den optimale løsning

Jensen et al.¹ fastsatte et kvalitetsmål for 21 biokemiske parametre, som gik ud på, at 95 % af analyseresultaterne skulle ligge inden for ± 2 SD fra en "0-prøve". 0-prøven blev centrifugeret og afpipetteret i lægepraksis inden for 45-60 minutter efter prøvetagningen. De fandt, at kvalitetsmålet blev opfyldt, når prøverne:

- sendes som heparinfuldblod i primærglas (for at sikre identitet og undgå kontaminering)
- opbevares og transporteres opretstående ved 20-25 °C
- centrifugeres på laboratoriet inden 5-6 timer efter prøvetagning.

For at opfylde kravene til den maksimale opbevaring inden centrifugering anbefaler forfatterne, at prøverne afhentes fra lægepraksis to gange dagligt.

Disse fund bekræftes af Stahl og Brandslund², som fandt, at de 27 undersøgte parametre var stabile i ucentrifugeret heparinblod i 8-12 timer ved 20-21 °C. Den længere holdbarhed i deres forsøg kan skyldes, at de kun benyttede blodprøver fra raske forsøgspersoner.

Salvagno et al.¹² anbefaler, at prøver til rutine koagulationsanalyserne opbevares ucentrifugerede i maksimalt 6 timer ved stuetemperatur eller 4 °C. De ændringer, man fandt i dette tidsrum, vurderes at være klinisk acceptable. Heil et al.¹¹ og Froom et al.⁴ fandt bedst holdbarhed af koagulationsanalyserne ved stuetemperatur.

For hæmatologiske rutineprøver er holdbarheden 6 timer ved stuetemperatur, hvis der ønskes en maskinel 5-parts-differentialtælling^{6,7}. Da det kan være nødvendigt at udføre en manuel kontrol af differentialtællingen, bør en udstrykning præpareres inden 1-3 timer efter prøvetagningen.

Det er med andre ord klinisk forsvarligt at sende "alle" praksisprøver samlet ved 20-25 °C, hvis prøverne kan analyseres/centrifugeres inden for 6 timer efter prøvetagning. Nogle analyseparametre har naturligvis en længere holdbarhed, og nogle kunne med fordel analyseres og/eller centrifugeres hurtigere, men under nævnte betingelser tilgodeses flest muligt af de mest anvendte rutineanalyser. ♦

LITTERATUR:

1. Jensen EA, Stahl M, Brandslund I, Grinsted P: Stability of heparin blood samples during transport based on defined pre-analytical quality goals. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(2): 225-234
2. Stahl M, Brandslund I: Controlled storage conditions prolong stability of biochemical components in whole blood. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(2): 210-215
3. Van Geest-Daalderop JHH, Mulder AB, et al: 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* 2005; 51(3): 561-568
4. Froom P, Abramova D, Bar-El M, Barak M: Reliability of delayed prothrombin time INR determinations in a central laboratory using off-site blood sampling. *Clin Chem Haem* 2001; 23: 189-192
5. Nybo M, Hansen AB, Pedersen B, Jørgensen PJ, Kristensen SR: Præanalytisk variation af P-kalium-ion, stofkonc. – relevans for primærsektoren?. *Klinisk biokemi i Norden* 2004; 1: 16-22
6. Narayanan S: Preanalytical Issues in Hematology. *J Lab Med* 2003; 27 (7/8):243-248
7. Vogelaar SA, Posthuma D, Boomsma D, Kluit C: Blood sample stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. *Vascular Pharmacology* 2002; 39: 123-125
8. Ford L, Berg J: Delay in separating blood samples affects creatinine measurements using the Roche kinetic Jaffa method. *Annals of Clinical Biochemistry* 2008; 45: 83-87
9. Boyanton BL, Blick KE: Stability Studies of Twenty-Four Analytes in Human Plasma and Serum. *Clinical Chemistry* 2002; 48(12): 2242-2247
10. Sinclair D, Briston P, Young R, Pepin N: Seasonal pseudohyperkalaemia. 2003; 56:385-387
11. Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M: Influence of Time and Temperature on Coagulation Analytes in Stored Plasma. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36(7): 459-462
12. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi C: Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2008 mar 25. (Epub ahead of print)