

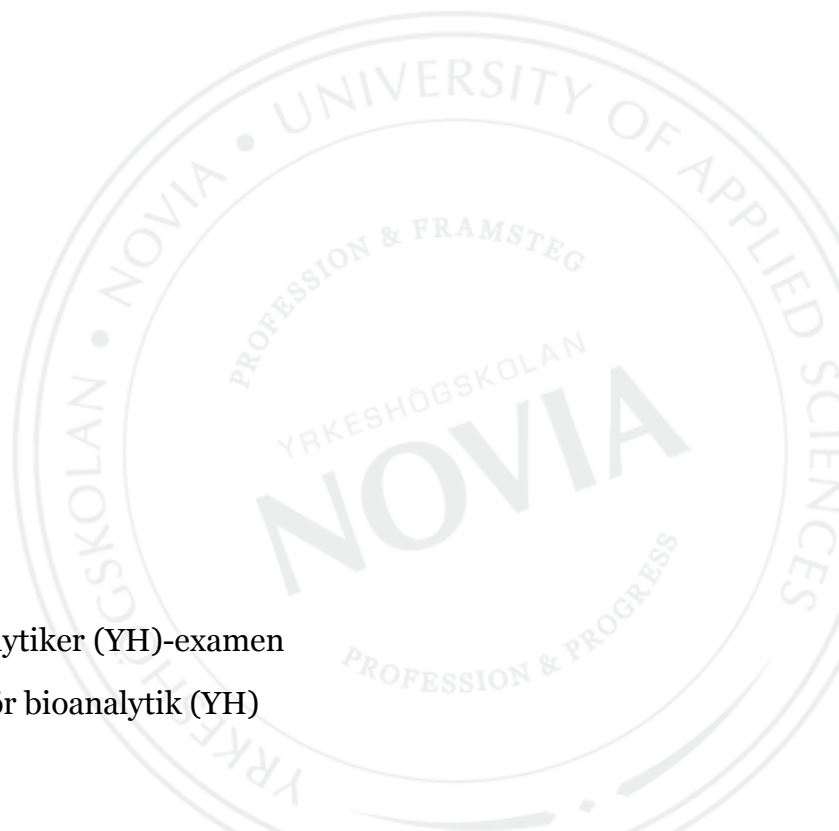
En metodjämförelse av analysinstrumenten Thrombolyzer Compact X och Start 4 vid analys av P-TT-INR

Marlene Friberg

Examensarbete för bioanalytiker (YH)-examen

Utbildningsprogrammet för bioanalytik (YH)

Vasa 2013



EXAMENSARBETE

Författare: Marlene Friberg

Utbildningsprogram och ort: Bioanalytik, Vasa

Handledare: Margareta Antus och Christian Jansson

Titel: En metodjämförelse av analysinstrumenten

Thrombolyzer Compact X och SStart 4 vid analys av P-TT-INR

Datum 6.12.2013 Sidantal 63 Bilagor 1

I laboratoriets kvalitetsarbete ingår valideringen av nya metoder. Detta kan göras genom att jämföra den nya metoden med en annan metod. Syftet med denna undersökning var att utreda om den automatiska Thrombolyzer Compact X kunde ersätta den semi-automatiska SStart 4 som analysinstrument i rutinarbetet på Ålands centralsjukhus laboratorium vid analys av P-TT-INR. Om en eventuell skillnad fanns skulle den kliniska betydelsen av denna utredas. Den teoretiska bakgrunden i detta arbete innefattar bl.a. hemostasen, antikoagulationsbehandling, laboratorieundersökningen tromboplastintid och analysinstrument.

Undersökningen genomfördes genom att samla in prover vid Ålands centralsjukhus och analysera dessa på Thrombolyzer Compact X och SStart4. Westgards tillvägagångssätt vid metodjämförelse utgjorde grunden för genomförandet. Korrelationen mellan dessa analysinstrument analyserades med hjälp av Passing- Bablok regressionsanalys och Bland-Altman Plot. Resultatet av denna undersökning påvisade en god korrelation mellan analysinstrumenten, och metoderna kan således användas omväxlande. En uppskattning av den interna variationen hos respektive analysinstrument gjordes och det konstaterades att båda analysinstrumenten har bra precision. Det fanns ingen skillnad som var av klinisk betydelse. Baserat på denna studie är Thrombolyzer Compact X ett bra val av analysinstrument för att ersätta SStart4 i rutinarbetet på Ålands centralsjukhus laboratorium.

Språk: Svenska

Nyckelord: metodjämförelse, P-TT-INR, SStart4, Thrombolyzer Compact X

BACHELOR'S THESIS

Author: Marlene Friberg

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science, Vasa

Supervisors: Margareta Antus and Christian Jansson

Title: A method comparison between the analyzers Thrombolyzer Compact X and SStart 4 in analyzing P-TT-INR

Date 6.12.2013 Number of pages 63 Appendices 1

Laboratory quality management includes the validation of new methods, which can be done by comparing a new method to a previously used method. The purpose of this study was to investigate whether the fully-automatic analyzer Thrombolyzer Compact X could replace the semi-automatic analyzer SStart 4 in the routine work on the Åland central hospital laboratory in analyzing P-TT-INR. In case a difference between the methods was detected, the clinical significance would be investigated. The theoretical background of this work includes the concepts of haemostasis, anticoagulant therapy, analysis of thromboplastin time and the analyzers.

The study was conducted by collecting samples at the Åland central hospital and analyzing the samples on Thrombolyzer Compact X and SStart 4. Westgard's approach to method comparison was the basis for implementation. The correlation between these analyzers was analyzed with Passing-Bablok regression and Bland Altman plot. The results of this study demonstrated a good correlation between the analyzers and their methods: the analyzers can, thus, be used interchangeably. An estimate of the internal variability of the respective analyzers was made and both analytical instruments were found to have good precision. There was no difference that was clinically significant. Based on this study, Thrombolyzer Compact X is a good analytical instrument to replace SStart4 in routine work at the Åland central hospital laboratory.

Language: Swedish

Key words: method comparison, P-TT-INR, SStart 4, Thrombolyzer Compact X

Innehållsförteckning

1 Inledning	1
2 Syfte och frågeställningar	3
3 Teoretisk bakgrund	4
3.1 Hemostas	5
3.1.1 Blodkärlen och deras betydelse i hemostasen	6
3.1.2 Trombocyter	7
3.1.3 Plasmakoagulationen	10
3.1.4 Trombocytaktivering	12
3.1.5 Koagulationshämmare	13
3.1.6 Fibrinolytiska systemet.....	14
3.2 Antikoagulansbehandling	15
3.2.1 Bakgrunden till antikoagulansbehandling	15
3.2.2 Warfarin.....	16
3.3 Tromboplastintid	18
3.3.1 Princip.....	18
3.3.2 Internationella standarder	19
3.3.3 Målvärden för P-TT-INR.....	20
3.3.4 Preanalytiska faktorer	21
3.4 Analysmetoder för bestämning av P-TT-INR	23
3.4.1. Viskositetsbaserad metod	24
3.4.2. Fotoptisk metod	25
3.5 Analysinstrument för bestämning av P-TT-INR	25
3.5.1 Val av analysinstrument	26
3.5.2 Reagens och kontroller	27
3.5.3 Thrombolyzer Compact X.....	27
3.5.4 SStart [®] 4 Hemostasis Analyzer	29

3.6 Kvalitetsparametrar	31
3.6.1 Analytisk sensitivitet och specificitet	31
3.6.2 Mätosäkerhet och mätfel	32
3.6.3 Precision, repeterbarhet och reproducerbarhet	33
3.7 Jämförelse av metoder	33
3.8 Tidigare forskning	34
4 Material och metoder	36
4.1 Metoder för undersökningen	36
4.1.1 Metoder för datainsamling	36
4.1.2 Westgards metod för metodjämförelse	37
4.2 Metoder för datanalys	38
4.2.1 Bland- Altman plot	39
4.2.2 Passing- Bablok regressionsanalys	39
4.3 Det praktiska genomförandet av undersökningen	40
4.4 Kvalitetsaspekter i utförandet	41
5 Resultat och tolkning	44
5.1 Beskrivning av materialet	44
5.2 Den interna variationen hos respektive instrument	45
5.3 Tolkning med hjälp av Bland- Altman plot	46
5.4 Tolkning med hjälp av Passing- Bablok regressionsanalys	47
5.5 Sammanfattning av resultaten	48
6 Kritisk granskning	50
7 Diskussion	53
Källförteckning	56
Bilagor	

1 Inledning

I Finland är hjärt- och kärlsjukdomar den sjukdomsgrupp som ligger till grund för nästan en tredjedel av alla dödsfall bland yrkesverksamma personer. Hjärt- och kärlsjukdomar är således ett betydande folkhälsoproblem i Finland (Kannas, Eskola, Räsänen & Mustajoki 2007, s. 49-59). Hjärt- och kärlsjukdomar leder till bl.a. hjärtinfarkt och stroke. En orsak till detta är trombosbildning i blodkärl (Ørn 2007, s. 170). Behandlingen av tromboser utgörs av antikoagulansläkemedel.

I Finland år 2011 uppgick användningen av antikoagulansläkemedel till 116,7 doser/1000 invånare/dag. Detta innebär behandling med acetylsalicylsyra, warfarin, heparin och nya antikoagulansmedel. Totalt berördes 281 800 patienter, vilket år 2011 utgjorde ca 5,2 % av Finlands befolkning (Fimea & FPA 2012, s. 36).

Warfarin har sedan 1940-talet utgjort grunden för antikoagulansbehandling och går i Finland under läkemedelsnamnet Marevan[®] (Lassila 2011). Warfarin är det näst mest använda läkemedlet inom antikoagulansbehandling i Finland idag. Användningen av warfarin i Finland år 2011 uppgick till 14,7 doser/1000 invånare/per dag, detta är en ökning med 6 % från år 2010 (Fimea & FPA 2012, s. 36). Enligt en finsk studie är den vanligaste orsaken till användning av antikoagulansläkemedel förmaksflimmer (Virjo m.fl. 2010, s.239).

Warfarin har många allvarliga biverkningar. En av dessa är okontrollerade blödningar. För att patienten inte skall drabbas av komplikationer till följd av behandling med warfarin måste hen genomgå regelbundna kontroller av P-TT-INR (Lassila 2011).

I dagens läge erbjuder Ålands hälso- och sjukvård (ÅHS) flera olika sätt för patienter att följa upp sitt TT-INR-värde. De sätt som finns tillgängliga är bestämning av P-TT-INR från venblod som utförs vid laboratoriet vid Ålands centralsjukhus (ÅCS) eller genom bestämning från kapillärblod vid antikoagulansmottagningen. Ett tredje alternativ är point-of-care-testing (POCT) där patienten själv kan mäta sitt TT-INR-värde hemma. INR, International Normalized Ratio, är standardiserad enligt internationella riktlinjer från World Health Organisation (WHO), för att kunna genomföra TT-INR resultaten mellan olika laboratorier oberoende av reagens och mätmetod.

Laboratorieenheten vid Ålands centralsjukhus har begärt en undersökning där man jämför analysinstrumenten Thrombolyzer Compact X (Behnk Elektronik) och STart 4 (Stago) i

deras känslighet för att bestämma P-TT-INR från blodprover som tas venöst. Den största skillnaden mellan dessa två analysatorer är mätmetoderna.

I februari 2012 byttes STart 4 ut till förmån för Thromobolyzer Compact X vid laboratorieenheten vid Ålands centralsjukhus. För patientsäkerheten är det viktigt att dessa två mätinstrument följs åt i analysresultaten då läkare utgår från analysresultaten från dessa då de ordinerar läkemedelsdosen för patienter med antikoagulansbehandling.

I dagens läge finns det inga studier gjorda med ett standardiserat koagulationsinstrument och en standardiserad reagens. Varje laboratorium avgör själv vilken typ av metod, instrument, reagens och tillverkare som föredras och har därmed ansvar för att de mätresultat som ges ut är riktiga. Varje laboratorium bör därför testa hur bra korrelation deras analysinstrument har i förhållande till det föregående instrumentet vid byte av instrument, reagens eller tillverkare. Därför måste en metodvalidering göras för att upprätthålla ett gott kvalitetsarbete i det egna laboratoriet.

2 Syfte och frågeställningar

Syftet med denna undersökning är att jämföra analysinstrumenten Thrombolyzer Compact X (Behnk Elektronik) med STart 4 (Stago) för analysen P-TT-INR för att undersöka om den ena metoden kan ersätta den andra. Analysatorerna skiljer sig åt i mätmetoderna genom att Thrombolyzer Compact X använder sig av en fotooptisk mätmetod medan STart 4 använder sig en elektromekanisk mätmetod.

I laboratoriets kvalitetsarbete ingår det att validera nya metoder. Då Thrombolyzer Compact X togs i bruk 2012 ersatte denna den befintliga rutinmetoden för P-TT-INR på STart 4.

Metoden bör valideras och detta görs i regel genom att jämföra den nya metoden med en annan metod. Då man jämför två rutinmetoder kan man inte fastställa om den ena metoden är bättre än den andra utan fokus ligger på att se om den ena metoden kan ersätta den andra metoden och om metoderna är utbytbara mot varandra.

Frågeställningarna lyder:

”Kan Thrombolyzer Compact X:s analysmetod ersätta STart 4:s analysmetod som rutinmetod för P-TT-INR?”

”Har instrumenten en signifikant skillnad i mätvärden vad gäller P-TT-INR?”

”Om det finns en signifikant skillnad, har den i så fall klinisk betydelse?”

3 Teoretisk bakgrund

I detta examensarbete utgör hemostasen en central roll för att läsaren skall kunna förstå de processer som ligger som grund för exempelvis antikoagulansbehandling. Antikoagulansbehandlingen är den viktigaste indikatorn för laboratorieundersökning av tromboplastintid. Analysprincipen och de preanalytiska faktorerna för P-TT-INR kommer även att behandlas. Koagulationsprocessen är också av vikt i förståelsen av metodprinciperna i analysinstrumenten Thrombolyzer Compact X och STart 4 som används i denna studie.

För att kunna förstå laboratoriearbetet i sin helhet och därmed också denna studie måste man ha en uppfattning om vad laboratorievetenskap innebär. Laboratorievetenskapens mest centrala del är laboratorieundersökningsprocessen som omfattar olika faser som man indelar i den preanalytiska fasen, analytiska fasen och postanalytiska fasen.

Den preanalytiska fasen avser de faktorer som påverkar provet och resultaten innan provet analyseras. Dessa faktorer kan finnas hos patienten själv så som kön, ålder, biologisk variation, miljöfaktorer och livsstilsfaktorer. Även farmakologiska effekter av läkemedel hör hit. Provtagningsituationen och provtagnings tekniken hör till den preanalytiska fasen (Ganrot & Tryding 2003, s.15-23).

Den analytiska fasen innebär själva analysen av provet. Hit räknas mätmetoden, apparaten, metodernas tillförlitlighet som analytisk sensitivitet och specificitet, mätosäkerhet och kvalitetskontroller, både interna och externa (Ganrot & Tryding 2003, s.24-27). Kvalitetsbegreppen är väldigt centrala i detta arbete då apparaten är i fokus och denna skall valideras.

Till den postanalytiska fasen hör utvärdering och bedömning av resultatet i förhållande till patienten och rådande referensvärden. En bioanalytiker måste ha förmågan att kunna bedöma om ett resultat är verkligt och se resultatet i förhållande till biologisk variation hos patienten och eventuell mätosäkerhet hos analysinstrumentet. (Ganrot & Tryding 2003, s. 42).

3.1 Hemostas

När ett blodkärl skadas börjar man blöda, men efter en kort tid stoppas blodflödet och ett koagel har bildats -blodet koagulerar. Alla de mekanismer som får blodet att koagulera hör till hemostasen (Sand & Oystein & Sjaastad & Haug & Bjålie 2006, s. 326). Kroppens förmåga att kunna stoppa en blödning och korrigera oönskad trombosbildning regleras av hemostasen. Hemostasen påverkas, rubbas, av medfödda eller förvärvade faktorer som kan leda till ökad blödningsbenägenhet eller trombosbenägenhet (Astermark 2012, s. 287-297). De viktigaste komponenterna i hemostasen är det vaskulära systemet d.v.s. blodkärlens hemostatiska egenskaper, trombocyter, koagulationsfaktorerna och koagulationshämmare, fibrinolys och bestående hemostas med fibrinbildning (Turgeon 1998, s.400).

Under 1960-talet utformades en modell för koagulationsprocessen. Denna modell innefattade en rad biologiska reaktioner och indelades i den interna och externa koagulationskaskaden som båda resulterade i den gemensamma koagulationskaskaden. Båda resulterade i att faktor X aktiverades, vilket i sin tur aktiverade protrombin till trombin. Trombin aktiverar sedan fibrinogen till fibrin som därefter formar en stabil fibrinklump (Fakhri m.fl. 2013, s. 163).

I dagens läge utgår man från en ny modell för koagulationsprocessen: den cellbaserade koagulationsmodellen. Denna cellbaserade koagulationsmodell baserar sig på att koagulation är en koordinerad cellaktivering som kulminerar i ett blodkoagel. Koagulationsmodellen kan indelas i initiering, amplifikation och propagation (Fakhri m.fl. 2013, s. 163-164).

Det forskas fortfarande mycket kring koagulationsprocessen och man har ännu inte kommit till full insikt om hur den fungerar. Sammanfattningsvis kan sägas att den nuvarande kunskap som finns gällande hemostasen består av en tvåstegsprocess som involverar trombocytaktivering genom ytreceptorer och lösliga ligander, samt en serie av biokemiska faktorer som initierar koagulationskaskaden och till sist formar ett nätverk av fibrin (Tran m.fl. 2013, s. 2).

I detta kapitel kommer båda modeller att tas upp för att göra det mera förståeligt för läsaren. Även blodkärlen, trombocyterna, koagulationsfaktorerna, det fibrinolytiska systemet, koagulationshämmare och K-vitaminets betydelse för hemostasen kommer att behandlas.

3.1.1 Blodkärlen och deras betydelse i hemostasen

Kroppens cirkulationssystem består av hjärtat och blodkärl. Cirkulationssystemets uppgift är transport av livsviktiga substanser i blodet till kroppens alla celler. Hjärtats funktion är att pumpa runt blodet med hjälp av muskelkontraktion och blodkärlens funktion är att försörja vävnaderna med blod (Sand m.fl. 2006, s. 268).

Artärerna är de blodkärl som transporterar blodet från hjärtat och har högt tryck, detta kan kännas vid palpation av artären och benämns då puls. Artärerna utmynnar i mindre kärl, arterioler, som därefter övergår till de minsta blodkärlen, kapillärer. I kapillärerna sker utbytet av näringsämnen, gaser och metaboliter med vävnaden genom diffusion och filtration (Sand m.fl. 2006, s. 268). Kapillärerna fungerar som en länk mellan artärerna och venerna, (Turgeon 1998, s. 400) som förenas därefter i venoler som övergår till vener (Sand m.fl. 2006, s. 285).

Vener är de blodkärl som transporterar blodet till hjärtat. Venerna har mycket lägre tryck än artärer. Venerna har klaffar vilket inte artärerna har. Klaffarna säkerställer att blodet inte strömmar i fel riktning. När skelettmuskulaturen kontraherar runt venerna ökar trycket och blodflödet och därmed pressas blodet mot hjärtat. När musklerna slappnar av hindrar klaffarna blodets återflöde. Venerna fungerar också som blodreservoar då det normalt finns två tredjedelar av blodet i venerna då en person är i vila. Blodreservoaren bidrar till att upprätthålla blodtrycket vid t.ex. en stor blodförlust eller vid fysisk aktivitet (Sand m.fl. 2006, s. 269, 285, 296).

Trots att artärer och vener har olika funktion är deras vävnad uppbyggd enligt samma princip. Kärlväggen består av tre lager vilka benämns tunica intima, tunica media och tunica adventitia (Sand m.fl. 2006, s. 285).

Tunica intima är det lager som ligger innerst i kärlväggen, lumen, och har direkt kontakt med blodet. Tunica intima består av ett lager plattepitel som kallas endotel vilket bildar en slät yta. Endotelet är förstärkt av subendotel bindvävnad som består av elastiska fibrer (Turgeon 1998, s. 400). Endotelet innehåller s.k. vasokonstriktionspeptider ("vasoconstrictor peptides") som endothelin-I och angiotensin II (Paredes&Chan 2013, s. 34).

Tunica media är det tjockaste lagret och består av glatt muskulatur och elastiska fibrer (Turgeon 1998, s. 400). Tunica media innehåller även mycket sympatiska nervfibrer. Vid

ökad aktivitet i dessa nervfibrer utlöses en kontraktion i muskelcellerna och därmed kan kärlets diameter reduceras (Sand m.fl. 2006, s. 291).

Tunica adventitia består av fibrös bindvävnad som omger blodkärlet och ett begränsande, elastiskt membran som gräns mellan tunica media och tunica adventitia. I bindväven finns autonoma nervändar och ett s.k. vasa vasorum som består av ett nätverk av små blodkärl som förser cellväggarna med syre och näring p.g.a. att blodflödet inuti blodkärlen är för högt för att tillgodose detta själv (Turgeon 1998, s. 400).

När ett större blodkärl, som en artär eller ven, skadas behövs kirurgisk assistans för att kunna åtgärda skadan så att inte patienten förblöder. Vid en skada på exempelvis en arteriol kan den minska sin diameter på kärlet, dra ihop sig, och därmed minska blödningen. Detta fenomen kallas vasokonstriktion (Turgeon 1998, s. 401). Vasokonstriktion styrs av ett vasomotoriskt centrum i hjärnan. Detta centrum tar emot information om blodtrycket via baroreceptorer som sitter i halsartären (*sinus caroticus*) och i aortabågen (*arcus aortae*). Hjärnan skickar ut en signal till sympatiska nervfibrer i den glatta muskulaturen i tunica media, vilket i sin tur utlöser en muskelkontraktion och därmed framkallas vasokonstriktion i blodkärlen (Sand m.fl. 2006, s. 291, 297).

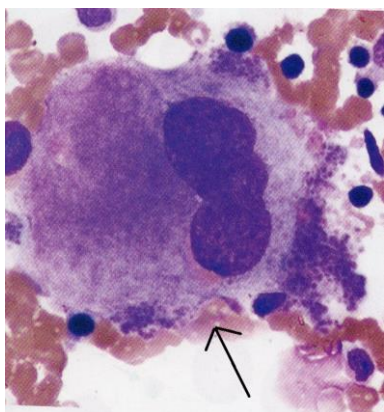
Förutom vasokonstriktion har blodkärlen också andra viktiga egenskaper för hemostasen. Endotelet tunica intima fungerar som en barriär mellan det cirkulerande blodet och den underliggande vävnaden och förhindrar att oönskade tromboser uppstår. Endotelet har egenskaper som är både pro- och antikoagulant och fibrinolytiska (Paredes&Chan 2013, s. 31, 37).

3.1.2 Trombocyter

Trombocyter är små, biologiskt aktiva cellfragment som cirkulerar i blodet. Vid skada i kärlväggen aktiveras trombocyterna. Aktiverade trombocyter genomgår en formförändring, sprider ut sig och formar stora aggregationsklumpar, en trombocytplugg, för att stoppa blödning. För att trombocyterna skall bli aktiverade och genomgå strukturella och funktionella förändringar måste en rad biokemiska reaktioner inträffa. (Turgeon 1998, s.405). För att kunna förstå hur dessa reaktioner fungerar måste man ha en insikt i trombocytens uppbyggnad och ursprung.

Trombocyter härstammar från megakaryocyters cytoplasma. Megakaryocyter finns i benmärgen och har differentierats från en megakaryoblast. Megakaryoblasten har i sin tur differentierats från en pluripotent stamcell, den hematopoetiska stamcellen, genom inverkan av cytokiner som t.ex. IL3, IL6, IL11, stamcellsfaktor och trombopoetin (TPO) (Wadenwik 2012, s. 309).

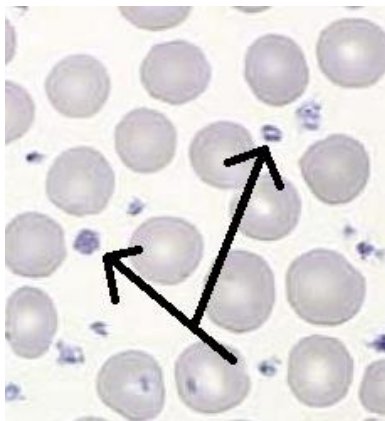
För att trombocyter skall bildas genomgår megakaryocyten en endomitotisk replikation av DNA. Denna replikation påminner om vanlig celldelning, mitos, men resulterar inte i två dotterceller. (Turgeon 1998, s.402). Istället fortsätter cellen att fördubbla sitt kärnmaterial och en polyploid cell uppstår med kromosomuppsättningar från 8n till 128n (Wadenwik 2012, s. 309). Megakaryocyten är därmed den största cellen som finns i benmärg och kan ha en storlek på 160 µm med en multiloberad kärna vilket illustreras i figur 1 (Turgeon 1998, s.403). Megakaryocyten genomgår efter den endomitotiska replikationen en cytoplasmisk mognad och granulering innan den är fullt mogen. När megakaryocyten är mogen bildar den långa utskott, protrombocyter, vilka sedan avknoppas till trombocyter. En megakaryocyt kan producera ca 4000 trombocyter och hela processen från megakaryoblast till trombocyt tar ca tio dagar (Wadenwik 2012, s. 309).



Figur 1. Megakaryocyt i benmärg. (Editerad: Rodak & Carr 2013, s.39).

Det normala trombocytantalet hos en frisk individ ligger mellan $150-360 \times 10^9$ st/l och varje dag produceras 20×10^{10} nya trombocyter (Wadenwik 2012, s.309). Trombocyter kan ses i blodutstryk och har då en ljusblå cytoplasma med små rödlila granula (Turgeon 1998, s.403). En inaktiv trombocyt är formad som en tunn, slät disk med en medeldiameter på 1,6–1,8 µm. I figur 2 kan man se normala trombocyter i ett blodutstryk. Dock förekommer större trombocyter s.k. megatrombocyter med en diameter på $> 2,5$ µm vilka utgör ca 10 % av de cirkulerande trombocyterna (Wadenwik 2012, s.309-310).

Trombocyterna har en livstid på 9 dagar \pm 1 dag i blodet och fagocyteras därefter av makrofager främst i levern och mjälten (Turgeon 1998, s. 405).



Figur 2. Trombocyter i blodutstryk. (Editerad från Advani & Theil 2011).

Eftersom trombocyterna är cellfragment saknar de cellkärna och ribosomer vilket gör att trombocyterna inte kan producera egna proteiner. Dock är de fullt kapabla att upprätthålla samma metabolism som övriga celler (Hillarp & Stenflo 2003, s. 267). Trombocyter kan både utföra oxidativ fosforylering och anaerob glykolys för att tillgodogöra sig energi, ATP (Wadenwik 2012, s. 310).

Trombocyternas cellmembran är omgivet av s.k. glycocalyx, vilken består av plasmaproteiner och glykoproteiner (Linden 2013, s.14;Turgeon 1998, s. 404). På ytan av trombocyterna finns viktiga receptorer som deltar i koagulationsprocessen genom aktivering av trombocyten, adhesion till den skadade cellväggen hos blodkärlet eller genom att påverka med andra trombocyter och celler (Linden 2013, s. 17). Receptorerna är glykoproteiner (GP). Några av de viktigaste receptorerna är GPIa, GPIb/IX/V och GPIIb/IIIa. En annan viktig komponent som finns i cellmembranet är membranfosfolipiden platelet factor 3 vilken aktiverar koagulationsfaktor X till Xa och protrombin till trombin (Wadenwik 2012, s.310). Förutom dessa finns det även receptorer för särskilda substanser t.ex. trombin, kollagen, ADP och serotonin (Hillarp & Stenflo 2003, s. 269).

I trombocyternas cytoplasma finns mikrotubuli och kontraktila filament. Dessa utgör cytoskelettet och upprätthåller trombocyternas cellform. De ansvarar också för trombocyternas förmåga att ändra form vid aktivering (Linden 2013, s.13; Wadenwik 2012, s.310). I anslutning till cytoskelettet finns ett öppet kanalsystem. Detta system står i förbindelse med cellmembranet och har en viktig roll i frisättandet av granula (Linden 2013, s. 14-15; Hillarp & Stenflo 2003, s. 267). Eftersom kanalsystemet står i förbindelse

med cellmembranet fungerar det också som en reaktiv yta för vissa koagulationsfaktorer. I cytoplasman finns även mitokondrier, glykogen, peroxisomer, lysosomer och granula (Linden 2013, s. 15; Wadenwik 2012, s.310).

Trombocyternas granula kan indelas i två typer: täta granula och α -granula. Dessa granula släpper ut sitt innehåll vid trombocytaktivering (Linden 2013, s. 15). De täta granula innehåller Ca^{2+} -joner, Mg^{2+} -joner, pyrofosfat, serotonin och adeninnukleotider (ADP, ATP och GTP) (Linden 2013, s. 15; Hillarp & Stenflo 2003, s.267). α -granula innehåller en mängd ämnen som krävs för normal hemostas. Dessa kan indelas i adhesionsmolekyler, kemokiner, koagulationsproteiner, proteiner som påverkar fibrinolysen, tillväxtfaktorer, immunologiska molekyler och andra proteiner (Linden 2013, s.15). De viktigaste molekylerna i α -granula är von Willebrand-faktorn, fibrinogen, fibronektin, trombospondin, faktor V, högmolekylärt kininogen, trombocytfaktor 4, β -tromboglobulin, ”platlet derived growth factor” (PDGF), multimerin och histidinrikt glykoprotein (Hillarp & Stenflo 2003, s. 267-268).

3.1.3 Plasmakoagulationen

Koagulationsfaktorerna är cirkulerande plasmaproteiner som deltar i en komplicerad kedjereaktion som slutligen leder till ett koagel tillsammans med trombocyterna och därmed stoppas blödningen. Koagulationsfaktorernas reaktion sker simultant med trombocytaktivering.

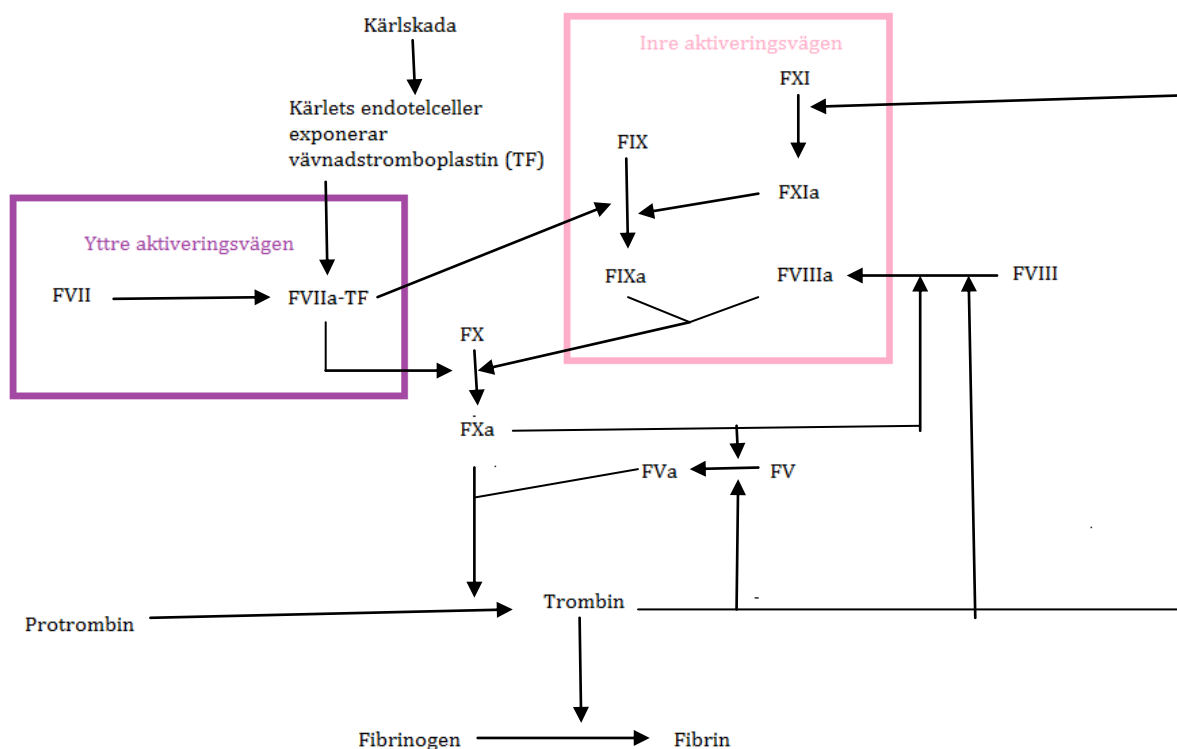
Koagulationsfaktorerna är namngivna med romerska siffror t.ex. protrombin är faktor II. Då faktorerna är aktiverade från proenzym till enzym får de ett suffix, -a, efter den romerska siffran (Turgeon 1998, s. 408).

Koagulationsprocessen initieras då ett blodkärl skadas, den yttre aktiveringsvägen. I blodkärllets epitelceller finns vävnadstromboplastin (tissue factor, TF) vilket, vid kärlskada, exponeras för koagulationsfaktor VII som cirkulerar i plasma. Faktor VII binder då till TF och skapar ett enzymkomplex, VIIa-TF. Enzymkomplexet aktiverar i sin tur faktor X i närvaro av Ca^{2+} och faktor IX till Xa och IXa. Faktorerna IXa och Xa aktiverar dessutom mera av faktor VIIa och därmed har en förstärkningsloop bildats. Faktor Xa aktiverar

faktor V till Va. Va är en kofaktor till Xa och tillsammans aktiverar de protrombin till trombin. (Astermark 2012, S. 287-297).

Förstärkningsloopen kan dock ej fortgå i all evighet, då skulle de övriga koagulationsfaktorerna ta slut. Inhibitorn, tissue factor pathway inhibitor (TFPI), ingriper och stänger av enzymkomplexet VIIa-TF. Faktor Xa kan därmed inte bildas via enzymkomplexet men kan istället bildas genom en alternativ aktiveringsväg, den inre aktiveringsvägen. Då trombin bildas aktiverar den faktor XI, faktor VIII och faktor V till faktor XIa, VIIIa respektive Va. Faktor XIa aktiverar faktor IX till IXa (vilken förut aktiverades av VIIa-TF). Faktor IXa och VIIIa kan därmed bilda mera faktor X. (Astermark 2012, s. 287-297).

Trombin aktiverar fibrinogen till fibrin. Fibrin är olösliga trådar kring vilka aktiverade trombocyter ansamlas och ett olösligt nätverk, som fångar upp erythrocyter har bildats. Då fibrin bildas sammanlänkas det med faktor XIII som gör att pluggen, koaglet, blir hållbart och läkningsprocessen underlättas. (Astermark 2012, s. 287-297). En schematisk bild över plasmakoagulationen ses i figur 3 nedan.



Figur 3. Schematisk bild över plasmakoagulationen. (Editerad från: Astermark 2012, s. 288).

3.1.4 Trombocytaktivering

Trombocyternas reaktionsförmåga vid kärlskada är mycket snabb. Trombocyternas viktigaste uppgift är att bilda en mekanisk plugg där kärlskada uppstår. Denna funktion kan indelas i adhesion till subendotelial bindvävnad i kärlväggen, sekretion av granula och aggregation. (Wadenvik 2013, s.311).

I likhet med initieringsfasen för koagulationsfaktorerna i plasma sätts trombocytaktiveringen igång genom vävnadsskada till blodkärl. Vid vävnadsskada blottläggs den subendoteliala bindvävnaden och därmed exponeras kollagen och von Willbrandfaktorn (Paredes&Chan 2013, s.37). Kollagenet tillsammans med von Willebrandfaktorn binder till flera receptorer i trombocytmembranet (Linden 2013, s. 22) vilket möjliggör celladhesion genom receptorkomplexet GPIb/IX/V (Wadenvik 2012, s. 311). Förutom GPIb/IX/V är även andra proteiner involverade i trombocyt-kärlväggsinteraktionen så som kollagenreceptorn GPIa/IIa (Wadenvik 2012, s. 311). Då adhesionsreaktionen är igångsatt aktiveras fibrinogenreceptorn GPIIb/IIIa och binder cirkulerande fibrinogen och åstadkommer därmed en trombocytaggregation (Wadenvik 2012, s. 311).

Då adhesionen till kärlväggen och trombinproduktionen är igångsatt stimuleras trombocyten att genomföra en rad biokemiska processer som involverar formförändring, frisläppande av granulainnehåll, bildning av protromboga trombocytpartiklar och syntes av tromboxan A₂. (Wadenvik 2012, s. 311).

Trombocyterna stimuleras med ADP, adrenalin och trombin. Dessa stimuli resulterar i att Ca²⁺-koncentrationen ökar intracellulärt och att trombocyten frisätter granula till trombocyternas omgivning. Denna reaktion kallas ”release reaction”. Granulainnehållet släpps ut via det öppna kanalsystemet (Wadenvik 2012, s. 310). Kanalsystemet förflyttar också receptorer som krävs för den biokemiska aktiveringen av koagulationsprocessen upp till ytan av cellmembranet. Systemet deltar även i att förändra strukturen hos receptorerna så att koagulationsfaktorer kan binda till dessa (Linden 2013, s. 15). Då trombocyterna har genomgått en formförändring exponeras platelet factor 3. Platelet factor 3 är en membranfosfolipid som utgör en katalytisk yta för bildningen av trombin genom koagulationsfaktorerna Xa, V och protrombin i plasmakoagulationen (Wadenvik 2012, s. 312).

Samtidigt som ”release reaction” äger rum sker syntes av tromboxan A_2 , vilken potentierar aggregationen av trombocyten och förstärker ”release reaction”. Dessutom har tromboxan A_2 en stark kärlkontraherande effekt (Wadenvik 2012, s. 311). Syntesen av tromboxan A_2 börjar med att arakidonsyra frigörs från membranfosfolipiderna och metaboliseras till tromboxan A_2 av enzymet cyklooxygenas (COX) (Linden 2013, s. 23; Wadenvik 2012, s. 311).

Då ADP och tromboxan A_2 frisläpps från trombocyten sätts en sekundär trombocyttaggregation igång genom att ytterligare trombocyter aktiveras och aggregeras till det skadade blodkärlet. Den sekundära trombocyttaggregationen är en kedjereaktion som slutligen åstadkommer till en lokal trombocytplugg (Linden 2013, s. 26; Wadenvik 2012, s.312). Fibrinet som bildas i plasmakoagulation stabiliserar och armerar trombocytpluggen. (Wadenvik 2012, s. 312).

3.1.5 Koagulationshämmare

Enzymaktiveringen av koagulationsfaktorerna måste regleras och balanseras av koagulationshämmare. Utan reglering eller med en bristande reglering av koagulationsfaktorerna uppstår en ökad trombosrisk (Astermark 2012, s. 289). Förutom koagulationshämmare är aktiveringen av koagulationsfaktorerna även begränsad till de membranreceptorer och kofaktorer som finns att tillgå (Hillarp & Stenflo 2003, s. 278).

Som redan nämnts i kapitel 3.1.3 Plasmakoagulationen är tissue factor pathway inhibitor (TFPI) en hämmare av koagulationsprocessen. TFPI integrerar med koagulationsfaktorerna FXa, FVIIa och TF. TFPI formar ett kvartärkomplex med FXa, FVIIa och TF och inhiberar därmed aktiviteten hos FXa (Chan&Paredes 2013, s.7).

En annan koagulationshämmare är antitrombin. Antitrombin har som uppgift att neutralisera trombin. Antitrombin kan dock endast binda till fritt trombin då det saknar förmågan att binda till trombin som redan är bundet till fibrin (Chan&Paredes 2013, s. 6). Antitrombin inaktiverar även faktorerna Xa, IXa och XIa. Heparin fungerar som en katalysator för antitrombin och när heparin är närvarande ökar bindningshastigheten mellan hämmare och enzymer markant (Hillarp & Stenflo 2003, s. 278; Paredes&Chan 2013, s. 38).

Protein C-systemet är också en viktig komponent för regleringen av koagulationssystemet. Dess uppgift är att inhibera koagulationsfaktorerna FVIIIa och FVa. Protein C aktiveras genom ett trombin-trombomodulinkomplex på endotelcellerna (Paredes&Chan 2013, s. 38; Astermark 2012, s. 289). Aktivering underlättas genom att en protein C- receptor på endotelcellen (EPCR) presenterar protein C för trombin-trombomodulinkomplexet. Slutligen kräver aktiverat protein C (APC) kofaktorn protein S för att kunna utföra inhiberingen av FVIIIa och FVa. (Astermark 2012, s.289).

3.1.6 Fibrinolytiska systemet

Då fibrin- och trombocytpluggen har bildats sätts läkningsprocessen igång. Fibrinklumpen fungerar som en temporär struktur för att stänga av det skadade området från blodflöde så att vävnaden kan repareras (Hillarp & Stenflo 2003, s. 281). Då vävnaden har läkt färdigt måste fibrinklumpen lösas upp, detta görs genom en process som kallas fibrinolys (Turgeon 1998, s.412). Fibrinolysen har även som uppgift att begränsa utbredningen av fibrinkoaglet (Astermark 2012, s. 289).

Det enzym som har en central roll i det fibrinolytiska systemet är plasmin. Plasmin är den aktiverade formen av proenzymet plasminogen. Plasminogen cirkulerar i plasma och kan aktiveras genom plasminogenaktivatorer som klyver plasminogenet till plasmin (Chan& Paredes 2013, s. 8). Plasminogenaktivatorerna är tPA (tissue plasminogen activator) och uPA (urokinas plasminogen activator) vilka syntetiseras och utsöndras av endotelceller i kärlväggen (Paredes& Chan 2013, s. 38). Aktivatorerna är i sin tur reglerade av inhibitorn plasminogen activator inhibitor- 1 (PAI-1). α 1- antiplasmin och trombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) är de primära inhibitorerna för plasmin (Chan & Paredes 2013, s. 8).

Plasmin hydrolyserar fibrin och fibrinogen till mindre fragment (Turgeon 1998, s. 412). Fibrinfragmenten benämns som fibrin degradation products (FDP) (Chan& Paredes 2013, s. 8). FDP är olösliga och fagocyteras till sist av makrofager i vävnaden (Turgeon 1998, s. 412) eller utsöndras via njurarna (Hillarp & Stenflo 2003, s. 283).

3.2 Antikoagulansbehandling

Oral antikoagulansbehandling är den främsta orsaken till varför P-TT-INR analyseras. Vikten i detta kapitel kommer att läggas på läkemedelssubstansen warfarin som går under läkemedelsnamnet Marevan® som är det vanligaste använda läkemedlet för oral antikoagulansbehandling i Finland.

3.2.1 Bakgrunden till antikoagulansbehandling

Hemostasen påverkas, rubbas, av medfödda eller förvärvade faktorer som kan leda till ökad blödningsbenägenhet eller trombosenbenägenhet (Astermark 2012, s. 287-297). Tromboser är då trombocyter aktiveras p.g.a. inflammation i blodkärlet och bildar ett koagel. Koaglet kan täppa till blodkärlet eller så kan fragment av trombosen förflytta sig i blodomloppet till t.ex. lungornas artärer. Dessa fragment kallas embolier (Schulman 2012, s. 299-300).

Riskfaktorer för att bilda tromboser kan vara förvärvade eller ärftliga. Förvärvade riskfaktorer är kirurgiska ingrepp, trauma, immobilisering, graviditet, hjärtsvikt, övervikt, njurinsufficiens och stigande ålder. Medfödda riskfaktorer är kärldfejder, hereditär trombofili, blodgrupp A, B eller AB och manligt kön (Schulman 2012, s.300). Tromboser och embolier är orsaken till bl.a. stroke, hjärtinfarkt, djup ventrombos och lungemboli (Ørn 2007, s. 170).

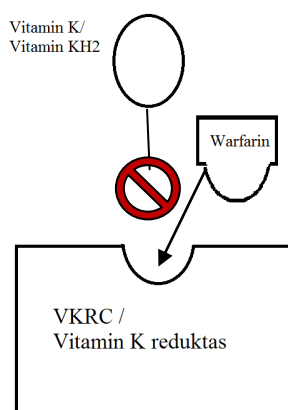
Behandlingen av tromboser och embolier är komplex och det är svårt att dosera läkemedel. Behandlingen är beroende av vilken typ av trombos som skall avlägsnas eller förebyggas. Läkemedel för behandling av tromboser kan delas in i läkemedel som hämmar trombocytfunktionen, trombolytiska läkemedel och läkemedel som hämmar koagulationssystemet. De läkemedel som hör till hämmare av koagulationssystemet är heparin och warfarin. (Ørn 2007, s. 170-172).

3.2.2 Warfarin

Warfarin går under läkemedelsnamnet Marevan® i Finland. Warfarin är en förkortning av substansnamnet warfarinnatrium (Orion Pharma AB u.å., s.1). Warfarin härrör från år 1921 då boskap fick svåra blödningssymptom efter att ha ätit ensilage som innehöll gul sötväppling (*Melilotus officinalis*). År 1933 påbörjades processen att isolera och syntetisera ämnet från växten. Resultatet blev det isolerade ämnet 4-hydroxikumarin och dess syntetiserade form dikumarol. Dikumarol vidareutvecklades och marknadsfördes som råttgift och ett patent togs för warfarin. År 1951 upptäcktes warfarins möjligheter inom medicinområdet och tre år senare, år 1954, kom det ut på marknaden i form av läkemedlet Coumadin® i USA. (Fritsma 2013, s.41).

Indikationerna för behandling med warfarin är förebyggande av djup ventrombos, lungemboli, tromboemboliska komplikationer efter hjärtinfarkt, tromboemboliska komplikationer hos patienter med förmaksflimmer eller med klaffproteser (FASS 2012; Orion Pharma u.å, s. 1; Finlands hjärtförbund r.f. 2012, s. 5). I Finland är den vanligaste orsaken till behandling med warfarin förmaksflimmer (Virjo m.fl. 2010, s. 237).

Warfarin hör till vitamin K-antagonisterna och förhindrar syntesen av koagulationsfaktorerna II, VII, IX, X samt protein S och protein C i levern (Turgeon 1998, s. 413-414; Fritsma 2013, s. 41). Warfarin fungerar genom att kompetitivt blockera leverenzymerna vitamin K epoxid reduktas (VKORC) och vitamin K reduktas (FASS 2012; Fritsma 2013, s. 41). Dessa enzymer har som uppgift att reducera vitamin K och dess 2,3-epoxid till vitamin KH_2 , denna reduktion blockeras av warfarin (FASS 2012). Figur 4 nedan visar en schematisk bild av warfarinets funktion.



Figur 4. Schematisk bild av warfarinets funktion.

Gemensamt för koagulationsfaktorererna II, VII, IX, X och protein S samt protein C är att de innehåller gamma-karboxyglutaminsyra. För att denna komponent skall bildas behövs vitamin K₂ i karboxyleringen av glutaminsyra (Hillarp & Stenflo 2003, s.288; FASS 2012; Fitsma 2013, s.41). Då omvandlingen av vitamin K är hämmad av warfarin produceras ineffektiva partiellt karboxylerade och dekarboxylerade former av de berörda koagulationsproteinerna (Fitsma, s. 41; FASS 2012). Dessa former saknar förmågan att binda Ca²⁺, vilket krävs för interaktion med de negativt laddade fosfolipidmembranen i cellerna i koagulationsprocessen (Hillarp & Stenflo 2003, s. 288).

Warfarin associeras med många farliga biverkningar. De allvarligaste biverkningarna av behandling med warfarin är okontrollerade blödningar och tromboser efter behandling av blödning (Lassila 2011; FASS 2012). Eftersom warfarin påverkar koagulationsförmågan har de flesta biverkningar att göra med koagulation. Blödningar kan härröra från alla organ men de vanligaste är blödningar från tandköttet, näsan, mag-och tarmkanalen och ökad tendens för blåmärken (FASS 2012; Orion Pharma AB u.å.,s. 4). Risken för en allvarlig blödning är 1-3 % per år (Schulman 2012, s.306). Vid överdosering med warfarin ges K-vitamin intravenöst som behandling. Vid allvarliga blödningar kan behandlingen kompletteras med koagulationsfaktorer som ges i form av plasma eller koagulationsfaktorkoncentrat (FASS 2012).

Eftersom warfarin har en smal terapeutisk bredd måste patienten följas upp med regelbundna kontroller för att justera läkemedelsdosen. Dessa regelbundna kontroller innefattar analys av tromboplastintiden, P-TT-INR, men även blodbild, njur- och levervärden (Lassila 2011).

P-TT-INR kan variera kraftigt hos samma patient och samma dos av warfarin kan ha olika verkningsgrad hos olika patienter. Detta gör att behandlingen är komplex och det är svårt att dosera rätt läkemedelsdos till patienten. Dessa variationer hos patienterna beror på patientens diet, body mass index (BMI), ålder, kön, leverfunktion, interaktion med andra läkemedel, övriga sjukdomar och genetiska polymorfismer. (McGlasson 2013, s.43, 45).

De genetiska variationerna beror på polymorfism i generna för cytokrom oxidas-reduktas systemet (CYP), främst CYP450. CYP ansvarar för metabolismen av warfarin. Genen som berörs är CYP2C19 (McGlasson 2013, s. 45; Rane & Lindh 2010, s. 2). De patienter som har polymorfism i CYP2C19-genen metaboliserar warfarin långsammare. Det finns även polymorfismer i genen för VKORC. Individer med denna polymorfism kräver en lägre dos av warfarin än den genomsnittliga patienten (McGlasson 2013, s. 45).

Diskussioner om att testa patienter genetiskt innan behandling med warfarin var aktuellt i början på 2000-talet (McGlasson 2013, s. 45). Diskussionen pågår fortfarande och det aktuella ämnet är den kliniska nyttan med att genotypa patienter samt kostnadsfrågan för undersökningarna (Baudhuin 2009, s. 152-153). Även om genotypning kan komma att ingå i rutinundersökningarna i framtiden måste läkarna ändå ta i beaktande de övriga faktorer som påverkar doseringen av warfarin (Rane & Lindh 2010, s.3).

Från och med år 2011 används alternativ till warfarinbehandling i Finland. Dessa alternativ är behandling med dabigatran (Pradaxa®) eller rivaroxaban (Xarelto®) (Finlands Hjärtförbund rf 2012, s. 1). Erfarenheten av behandling med dessa nya antikoagulantia är liten och de har inte en specifik antidot vid akuta situationer vilket warfarin har. Warfarin kommer därför att fortsätta vara det mest använda läkemedlet i Finland i många år fram över (Virjo m.fl. 2010, s. 241).

3.3 Tromboplastintid

Tromboplastintid (TT) eller protrombintid (PT) är en koagulationsundersökningsmetod som etablerades 1935 av Quick. Syftet med denna undersökningsmetod var att kunna fastställa koagulationsdefekter hos nyfödda och patienter med ikterus. I dagens läge har metoden modifierats och det nuvarande användningsområdet är för att utvärdera den yttre aktiveringsvägen i koagulationsprocessen och för att övervaka oral antikoagulationsbehandling (Ignatovic 2013, s. 121).

3.3.1 Princip

TT används för bestämning av oral antikoagulationsbehandling, främst vid behandling med K-vitamin antagonisterna som warfarin. TT mäter proteiner som syntetiseras i levern och proenzym till serinproteaser (Hillarp & Stenflo 2003, s.288-289). De koagulationsfaktorer som berörs är faktor II, V, VII och X men även fibrinogen (Ignatovic 2013, s. 122).

Principen för TT är aktivering av koagulationsprocessen in vitro genom närvaro av vävnadsfaktor (TF) och CaCl_2 . Denna aktivering leder till att en stabil fibrinklump bildas. Tiden det tar för fibrinklumpen att bildas mäts i sekunder vilket TT representerar (Ignatovic 2013, s. 122). När plasma och reagens inkuberas och blandas leder detta till en aktivering av faktor X i närvaro av faktor VII vilket slutligen leder till fibrinbildning (Ignatovic 2013, s. 121).

P-TT-INR anger koagulationstiden för ett blodprov i förhållande till koagulationstiden för ett normalprov. Analysresultatet är beroende av hur mycket faktor II, VII och X det finns (Hillarp & Stenflo 2003, s.288-289). Andra faktorer att ta i beaktande i analyskedet är tromboplastinkälla och koncentration, inkuberingstid och val av buffert och mätmetod (Ignatovic 2013, s. 122).

3.3.2 Internationella standarder

Standardisering av analyser finns till för att sätta riktlinjer och upprätthålla kvalitetsledningssystem i laboriemiljö. Dessa i sin tur förebygger analysfel och säkerställer en hög kvalitet på de analyser som utförs vid laboratorier (Crighton 2013, s. 80).

Ett antal organisationer som arbetar med att bidra med standarder inom hematologi finns över hela världen. Det finns två organ inom laboratoriemedicin vilkas internationella standarder och kvalitetsledningssystem är i bruk över hela världen: the International Organization for Standardization (ISO) och the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Dock är the World Health Organization (WHO) den största auktoriteten vad gäller standarder och rekommendationer inom laboratoriemedicin. För kliniska laboratorier som arbetar med koagulation rekommenderas det att man skall följa de standarder som the International Society on Thrombosis and Haemostasis sätter upp (Crighton 2013, s. 80).

INR, International Normalized Ratio, är standardiserad enligt nationella riktlinjer från WHO. INR-värdet skall endast användas för att övervaka och kontrollera oral antikoagulationsbehandling. Standardiseringen krävs för att kunna jämföra TT-INR resultaten mellan olika laboratorier oberoende av reagens och mätmetod. (Nilsson-Ehle 2003, s.288-289, Ignatovic 2013, s.122). INR tar i beaktande de skillnader som finns i de olika typer av

tromboplastinreagens som finns tillgängliga. Sensitiviteten för TT är mycket beroende av vilket tromboplastinreagens som används och varifrån vävnadsfaktorn i reagenset härstammar. Ursprunget till vävnadsfaktor i reagens kan vara animaliskt; kaninhjärna, kohjärna och kaninlunga men kan även härstamma från människa; hjärna och placenta (Ignatovic 2013, s. 122).

INR är jämförbart med förhållandet mellan TT-värdet hos patientplasman och normalt TT-värde hos den genomsnittliga befolkningen (medelvärde från 20 friska vuxna) upphöjt till International Sensitivity Index (ISI). Detta kan åskådliggöras med ekvationen: $INR = (\text{Patient TT} / \text{Medelvärde av normalt TT})^{ISI}$ (Ignjatovic 2013, s. 122).

ISI bestäms genom att testa TT på plasma som man erhållit från friska patienter och patienter som står på warfarinbehandling med det tromboplastin som används i laboratoriet och med den internationella referensen för tromboplastinpreparat. De värden som uppmäts sätts in i en log-log-graf och lutningen för regressionslinjen representerar ISI-värdet. Ett idealiskt tromboplastinreagens skall ha ett lågt ISI på 1-1,2 (Ignjatovic 2013, s. 122-123).

Trots detta försök till standardisering är INR-värdet fortfarande beroende av citratkoncentrationen i plasma, ytterligare variationer i tromboplastinreagens, instrument och ISI, när det gäller specifika skillnader hos tillverkaren samt kalibreringsmetod hos de olika laboratorerna (Ignatovic 2013, s. 122-123).

3.3.3 Målvärden för P-TT-INR

Målvärdena för P-TT-INR är beroende av orsaken till behandlingen med koagulationshämmare. Under warfarinbehandling är INR-målvärdet i allmänhet 2,0- 3,0 eller 2,5- 3,5 beroende av indikationerna och trombosbenägenhet hos patienten (Lassila. 2011; FASS 2012). P-TT-INR-värdet måste även ses i relation till patientens ålder, kroppsvikt, kontraindikationer m.m. Resultaten för P-TT-INR-värden värderas först enligt det rekommenderade målvärdet och sedan med det senast föregående värdet och därefter mot eventuell dosändring som är gjord (Ganrot & Tryding 2003, s. 43). För en frisk person med normal koagulation och utan antikoagulansbehandling är referensvärdet för P-TT-INR 0,9 - 1,2 (Hillarp, Dahlbäck & Strandberg 2012, s. 199).

3.3.4 Preanalytiska faktorer

Preanalytiska faktorer är omständigheter som före analys av provet kan påverka ett provs koncentration så att den inte överensstämmer med den verkliga koncentrationen hos patienten (Theodorsson, Grankvist & Nilsson- Ehle 2012, s. 27). Det finns olika sätt att dela in de preanalytiska faktorerna på. Ett sätt är att dela in dessa i kontrollerbara variabler och icke kontrollerbara variabler. Icke kontrollerbara variabler är sammankopplade med den biologiska variationen hos patienten som t.ex. kön, ålder, genetik och sjukdomar. Till kontrollerbara variabler hör standardisering av provtagning, transport och provhantering (Young, Bermes & Haverstick 2008, s. 42).

I och med att den biologiska variationen hos patienter med antikoagulansbehandling med warfarin är så stor (se kapitel 3.2.2 Warfarin), påverkar det P-TT-INR-värdet i hög grad. Därför måste laboratorierna se till att de följer standardiserade anvisningar och kvalitetsaspekter för hantering av P-TT-INR för att därigenom kunna säkerställa att resultatet som anges är verkligt och återspeglar patientens kliniska status och inte är en produkt av preanalytiska faktorer. De vanligaste felen förknippat med preanalytik vid hemostasanalys är att provet saknas (49,3 %), hemolys (19,5 %), blodet har koagulerat i röret (14,2%) och att provmängden är olämplig (13,7 %) (Preston, Lippi, Favaloro, Jayandharan, Edison & Srivastava 2010, s. 95). I detta kapitel följer rådande rekommendationer för att minska fel i det preanalytiska skedet vid analysen P-TT-INR.

Patientförberedelser

För provtagning av P-TT-INR krävs inte några speciella patientförberedelser. För att P-TT-INR-värdet skall hållas stabilt i förhållande till medicineringen skall patienten tänka på sina levnadsvanor. Förutom den egna biologiska variationen kan faktorer som bl.a. kostintag, alkoholkonsumtion, fysisk aktivitet, användning av naturläkemedel och andra mediciner påverka P-TT-INR-värdet. Det viktigaste för en patient med antikoagulansbehandling är att ha regelbundna levnadsvanor och att komma ihåg att meddela sin läkare om levnadsmönstret ändras så att medicineringen kan justeras till patientens rådande förhållanden. (Orion Pharma AB u.å. s. 4)

Provtagning

Vid provtagning är det viktigt att en identifiering av patienten görs för att säkerställa att patienten är densamma som remissen uppger. Efter provtagningen är det viktigt att provtagaren, helst i patientens närvaro, fäster identifieringsetiketterna på rören. Detta för att förhindra att patientprover förväxlas. På etiketterna bör det finnas patientens namn, födelsetid och signum, datum och tiden för provtagningen. (McCraw, Hillarp & Echenagucia 2010, s.74).

Vid själva provtagningen är provtagning från ven att föredra. När venen punkteras utlöser själva punktionen en reaktion kopplad till hemostasen då kärlets endotelceller skadats och TF exponeras (se kapitel 3.1.3 Plasmakoagulationen) (McCraw m.fl. 2010, s. 74). Koagulationsprocessen sätts igång direkt och detta förklarar varför prover för koagulationsundersökningar är så känsliga. Detta förklarar också varför det är rekommenderat att ta ett extra rör först som sedan kasseras innan man tar rören för koagulationsundersökningar. Det finns dock inga tydliga bevis för klinisk betydelsefulla skillnader mellan resultaten observerade från det första röret och det andra röret om de är tagna i ordningsföljd för P-TT-INR (Preston m.fl. 2010, s.96; Favoloro m.fl. 2012, s. 3; McCraw m.fl. 2010, s.75).

Prover för P-TT-INR tas i rör, med blå kork vanligtvis, som innehåller natriumcitrat som antikoagulant med en koncentration på 3,2 % eller 3,8 %. Natriumcitratet binder fria Ca^{2+} -joner i blodet vilket leder till att blodet inte koagulerar då Ca^{2+} -joner är en nödvändighet för att koagulationen skall fortskrida. Detta förklarar också varför provet måste tillsättas CaCl_2 innan analys (se kapitel 3.3.1 Princip och kapitel 3.1.3 Plasmakoagulationen). Rören måste vara helt fyllda, en variation på $\pm 10\%$ av volymen är tillåten. Rör som inte är tillräckligt fyllda orsakar ett falskt förlängt P-TT-INR-värde då det finns för mycket av antikoagulanten natriumcitrat. (McCraw m.fl. 2010, s. 75; Favoloro m.fl. 2012, s. 3).

Direkt efter provtagningen skall rören blandas försiktigt tre till fem gånger så att antikoagulanten och blodet blandas bra och man säkerställer då att blodet inte koagulerar i röret. Dock skall man inte överdriva rörelsen, t.ex. genom att skaka röret, då detta kan leda till in vitro hemolys eller aktivering av koagulationsfaktorer vilket i sin tur kan ge falskt låga P-TT-INR-värden. (Favoloro m.fl. 2012, s. 3).

Nåltypen som används vid provtagning är också av betydelse. Nålen skall ha en storlek på från 16 G till 25 G, för stor eller för liten nål kan bidra till hemolyserade prover. Vid

användning av fjärilsnål skall man komma ihåg att slangen innehåller luft och om man ej tar ett extra rör innan rören för koagulationsanalyserna kan luften i slangen leda till att volymen i röret blir felaktig. (Favoloro m.fl. 2012, s. 3-4; Stang & Mitchell 2013, s.56).

Transport, förvaring och provhantering

Transport av prover sker i rumstemperatur (15-22 °C) och under en så kort tid som möjligt. Helst skall analysen av P-TT-INR utföras senast 4 h efter provtagning men om man centrifugerar provet och separerar plasman har provet en hållbarhetstid på 24 h i rumstemperatur. (Favoloro m.fl. 2012, s. 4; Stang & Mitchell 2013, s.58).

Proverna skall centrifugeras så snabbt som möjligt i 1500 g i 10-15 min. (Favoloro m.fl. 2012, s. 4; Stang & Mitchell 2013, s.57). Om proverna inte kan analyseras inom 24 h skall plasma frysas ner. Hållbarhetstiden är 2 veckor i -20 °C och 6 månader i -70 °C.(Ignjatovic 2013, s. 125). Vid upptining av prover skall dessa värmas i 37 °C vattenbad i 5-10 min. Då provet är tinat skall det blandas ordentligt och därefter analyseras direkt (Favoloro m.fl. 2012, s. 4; Ignjatovic 2013, s. 125-126).

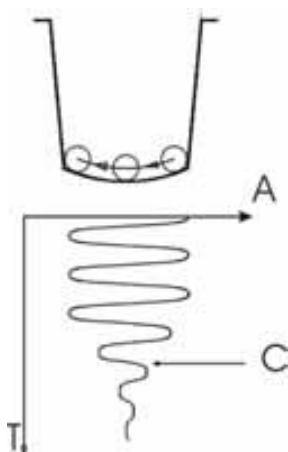
3.4 Analysetoder för bestämning av P-TT-INR

Laboratorieundersökningar av hemostasen försöker att återskapa den normala koagulationsprocessen som sker in vivo i laboratoriemiljö. Analysetoderna för bestämning av P-TT-INR är baserade på bildningen av ett fibrinkoagel. Metoder baserade på bildningen av fibrinkoagel försöker återskapa vad som händer i den yttre aktiveringsvägen och den alternativa aktiveringsvägen. De övergripande metoderna är mekanisk detektion av fibrinkoagel, viskositetsbaserad detektionssystem, optisk detektion och nefelometrisk metod. (Crighton 2013, s. 73-74). I detta kapitel kommer endast den viskositetsbaserade detektionsmetoden och den optiska detektionen att behandlas då dessa ligger som grund för principen i analysinstrumenten SStart 4 respektive Thrombolyzer Compact X.

3.4.1. Viskositetsbaserad metod

Viskositet definieras som motståndet hos ett material då det ändrar form. Mer specifikt kan viskositet beskrivas som de friktionskrafter som uppstår i strömmande vätskor p.g.a. friktion mellan de enskilda vätske- och molekyllagren då dessa är under rörelse. Ord som trögflytande och seghet hör ihop med viskositetsbegreppet. En vätska med hög viskositet är trögflytande och seg och en vätska med låg viskositet är lättflytande. (Simonsen 2005, s. 84).

Den viskositetsbaserade metoden är baserad på att då fibrin bildas i plasma ökar plasmans viskositet och viskositetsökningen kan detekteras med hjälp av elektromekanisk metod. I kyvetten finns en stålkula som börjar pendla när den utsätts för ett elektromagnetiskt fält. Kulans pendelrörelse, amplitud, övervakas under hela analysprocessen. När fibrin bildas ökar viskositeten i provet och stålkulans pendelrörelse saktar ner. Förändringen i pendelrörelsen detekteras och timern stoppas och en tromboplastintid uppmäts. En schematisk bild över händelseförloppet ses i figur 5. Fördelen med denna metod är att den kräver små volymer reagens och patientprov. Metoden påverkas heller inte av lipemiska eller ikeriska prov. Nackdelen är att metoden kan ha svårigheter att detektera små nivåer av fibrin. (Chrigton 2013, s. 75).



Figur 5. Schematisk bild över viskositetsbaserad metod. A= Kulans oscillationsamplitud, T = Tiden, C = Koagulation. (Editerad: Diagnostica Stago 2003).

3.4.2. Fotoptisk metod

Principen för fotoptisk metod baserar sig på mätning av förändring av ljustransmission som optisk densitet d.v.s. absorbans. Absorbansen är ett mått på förhållandet mellan ljusintensitet vid en passage, i detta fall en kyvett, av ett blankprov respektive ett prov. Absorbansen, A , kan uttryckas matematisk i en logaritmisk funktion där $A = \lg(I_0/I)$. Denna matematiska formel kallas Lambert- Beers lag. I_0 är ljusintensiteten utan energiabsorption och I är ljusintensiteten efter energiabsorption i den lösning som mäts. (Simonsen 2005, s. 147, 149).

Lambert- Beers lag kan tillämpas i analysinstrument då den uttrycker proportionalitet mellan ämneskoncentrationen i lösningen och den ljusenergi som ämnet i lösningen absorberar. Lambert- Beers lag är då formulerad enl. $A = k \times c \times l$. A står för absorbansen, k är en konstant, c är koncentrationen och l är kyvettlängden. Kyvettlängden definieras som det avstånd som strålen färdas i kyvetten då den passerar lösningen. (Simonsen 2005, s. 150).

Analysatorn har en ljuskälla som skickar ut en ljusstråle. Ljusstrålen passerar en kyvett, där det finns plasma och reagens. När fibrin bildas bryts ljusstrålens riktning och träffar en sensor. Sensorn omvandlar det mottagna ljuset till en elektrisk signal som sedan omvandlas till ett utläsbart resultat i förhållandet till tiden det tog att bilda fibrin (Turgeon 1998, s. 389; Crighton 2013, s. 75).

3.5 Analysinstrument för bestämning av P-TT-INR

De analysatorer som kommer att användas i den här undersökningen är analysatorn Thrombolyzer Compact X från tillverkaren Behnk Elektronik och analysatorn SStart 4 från tillverkaren Stago. Analysatorerna använder sig av två olika mätmetoder som skall jämföras. Thrombolyzer Compact X använder sig av en fotooptiskt mätmetod och SStart 4 använder sig av en viskositetsbaserad mätmetod. Principerna för mätmetoderna beskrivs i kapitel 3.4. Analysmetoder för bestämning av P-TT-INR. De reagens och kontroller som används i apparaterna behandlas i detta avsnitt. Reagens och kontroller är de samma för båda instrumenten.

3.5.1 Val av analysinstrument

Fram till 1970-talet fanns det inte många alternativ till analysmetoder och analysinstrument för koagulationsundersökningar. I början var analysmetoden helt manuell och baserades på visuell detektion av bildning av fibrin (McCraw m.fl. 2010, s. 77). Sedan dess har utvecklingen gått framåt och i dagens läge finns det många alternativ på den analytiska sidan, både gällande analysmetoder och analysinstrument.

De valmöjligheter som finns att tillgå för ett laboratorium är allt från automatiserade analysinstrument till manuella. Från analysinstrument som kan analysera stora volymer prov till analysinstrument som endast är kapabla till små mängder prov. (Tekkesin & Kilinc 2012, s. 125). Gällande alternativ till analysmetoder är dessa mekanisk detektion av fibrinkoagel, viskositetsbaserad detektionssystem, optisk detektion och nefelometrisk metod, vilket redan nämnts i kapitel 3.4 Analysmetoder för bestämning av P-TT-INR (Crighton 2013, s. 73-74).

I dagens läge har efterfrågan på automatiserade analysinstrument som kan analysera stora mängder prov blivit större (Tekkesin & Kilinc 2012, s. 125). Fördelarna med att använda sig av helt automatiserade analysinstrument är många. Helt automatiserade instrument sparar tid och minskar arbetsbördan för personalen (McCraw m.fl. 2010, s. 75). Automatiserade instrument är även ekonomiska med tanke på mängden provmaterial och reagens som används (Crighton 2013, s. 73).

När ett laboratorium gör en bedömning av ett nytt analysinstrument finns många faktorer att ta i beaktande i förhållande till laboratoriets egna krav men också till analysinstrumentets analytiska prestanda. Laboratoriets egna krav innefattar bl.a. ekonomiska kostnader, utrymme för analysinstrumentet, material och reagenser, analystid och avfallshantering. Bedömningen av den analytiska prestandan baserar sig däremot på statistiska analyser. (Jensen & Kjelgaard-Hansen 2006, s. 276).

3.5.2 Reagens och kontroller

Analys av P-TT-INR baserar sig på att reagens blandas med plasma och aktiverar därefter faktor VII, vilket leder till att det i slutändan bildas fibrin (koagel). Båda metoderna i denna studie använder sig av reagenset ThrombotestTM. Reagenset innehåller tromboplastin från bovinhjärna och absorberat bovinplasma. Reagenset är fritt från koagulationsfaktorer och mellanlänkar, den absorberade plasman är tillsatt som källa för koagulationsfaktor V och fibrinogen. Reagenset är känsligt för koagulationsfaktorerna II, VII och X samt PIVKA-proteins (protein induced by vitamin K absence or antagonists). Reagenset rekonstrueras med 11 mL 3,2 mmol/L CaCl₂ (Axis- Shield PoC 2007).

Kontrollerna som används i detta arbete är Control Plasma AK och Control Plasma Normal från tillverkaren Axis-Shield PoC. Kontrollerna består av frystorkad human citratplasma och måste rekonstrueras med 0,6 ml destillerat vatten före användning (Axis-Shield PoC 2005, 2011). Control Plasma Normal används som kontroll inom normalvärden för koagulationsaktiviteten (Axis-Shield PoC 2005). Control Plasma AK är framställd av plasma som kommer från patienter som står på oral antikoagulationsbehandling. Kontrollvärdena för Control Plasma AK har därför samma aktivitet som plasma från patienter som står på oral antikoagulationsbehandling (Axis- Shield PoC 2011). Båda kontrollerna är specialtillverkade för användning av reagenset ThrombotestTM (Axis-Shield PoC 2005, 2011).

3.5.3 Thrombolyzer Compact X

Thrombolyzer Compact X (se figur 6) från tillverkaren Behnk Elektronik är ett helautomatiskt instrument som används vid koagulationsundersökningar in vitro. Thrombolyzer Compact X använder sig av en optisk mätmetod (se kapitel 3.4.2. Fotoptisk metod) och mäter patientprov på en våglängd av 620 nm eller 405 nm. Instrumentet analyserar fibrinogen, APTT och TT-INR. Instrumentet har en kapacitet att analysera 160 TT-INR- prover i timmen respektive 140 APTT-prover i timmen. (Behnk Elektronik 2011, s.6).

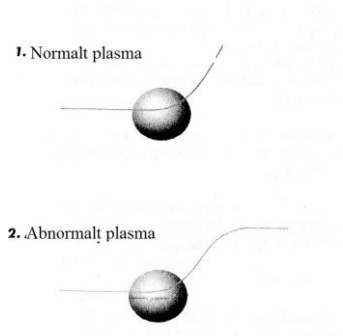


Figur 6. Thrombolyzer Compact X (Editerad: Behnk Elektronik 2013)

Kyvettracken innehåller fyra kyvetter med stålkula i varje kyvett. Kyvettracken rör sig från registerpositionen för kyvetten till positionen för pipetering. Plasma och reagens pipeteras till kyvetten och förflyttas sedan för inkubering i 180 s. När inkubationstiden är slut flyttas kyvettracken över till positionen för mätning. (Behnk Elektronik 2011, s.7. s. 63-64).

Stålkulan finns i den övre delen av kyvetten och i mätpositionen börjar den att röra sig uppifrån och neråt. På vägen rullar stålkulan in i droppar av reagens och plasma och för dem ner till botten av kyvetten. För att blandningen skall bli homogen finns roterande magneter som ser till att stålkulan rör sig. Då plasma och reagens blandas aktiveras koagulationsprocessen och mätningen påbörjas. (Behnk Elektronik 2011, s.7. s. 63-64).

Stålkulan är i rörelse under hela mätningsprocessen. Då koagulationsprocessen är aktiverad bidrar stålkulan till att fibrintrådar binds. Kulan har även funktionen att dess rörelse stoppas då fibrin bildas, kulans position vid fibrinbildning har inverkan på hur ljusstrålen går genom kyvettracken då mätningen uppmäts. Vid normal koagulation har kulan liten effekt på ljusstrålen genom kulans rotation. Vid abnormal koagulation binder fibrintrådarna tidigt till kulan och skapar därmed ett hinder i den optiska banan för ljusstrålen. Principen för kulans funktion ses i figur 7 nedan. (Behnk Elektronik 2011, s.8).



Figur 7. Principen för kulans funktion i Thrombolyzer Compact X. (Editerad Behnk Elektronik 2011, s. 8).

Thrombolyzer mäter sedan förändringen i absorbans vid 405-620 nm då koaglet bildas och stoppar tiden. Ett INR-värde fås uträknat efter koagulationstiden. När mätningen är klar skjuts kyvetracken ut eller så återvänder racken till pipeteringspositionen om det fortfarande finns tomma kyvetter kvar. (Behnk Elektronik 2011, s.64).

Alla godkända svar går automatiskt över i datasystemet GSM Analytix 2.0. Prov som är under minimigräns eller över maximigräns analyseras automatiskt på nytt av instrumentet. Provsvaren måste godkännas manuellt i datasystemet GSM Analytix 2.0 av en laboratorieskötare innan provsvaren ges ut till behandlande läkare i journalprogrammet Medix.

3.5.4 STart[®] 4 Hemostasis Analyzer

STart[®] 4 Hemostasis Analyzer (se figur 8) är ett semiautomatiskt koagulationsinstrument från tillverkaren Stago för in vitro diagnostik. STart[®] 4 använder sig av den viskositetsbaserad metoden, tillverkarna kallar denna metod VDS (Viscosity-based Detection System). STart 4 är idealisk för små till mellanstora provmängder och kan fungera som en back-up för instrument som använder sig av optisk mätmetod. STart 4 kan bl.a. analysera TT, APTT, fibrinogen och koagulationsfaktorer beroende på val av förinställda program. Programmen och testparametrarna kan även modifieras av användaren för att tillfredsställa dennes behov. (Diagnostica Stago 2003).



Figur 8. STart Hemostasis Analyzer (Editerad: Stago 2013)

STart 4:s huvuddelar är inkubationszoner för plasma och reagens, printer, kalkylator, fyra självständiga timers för inkubationstiden, fyra kanaler för mätning av prover och pipett. Pipetten är en Finnpiptett® som har modifierats. Den har utökats med ett system som detekterar reagenstillättning och har en kabel som överför information om tillsättningen av reagens till instrumentet. Instrumentet sätter igång mätningarna automatiskt då den mottagit informationen om att reagens har tillsatts (Diagnostica Stago 2003). Pipetten som används vid Ålands Centralsjukhus har en totalvolym på 2,5 ml och tillsätter 250 µl reagens för varje tryck.

Innan analysen kan påbörjas måste instrumentet och reagenserna förberedas. Till kyvetthållarna tillsätts en stålkula manuellt i varje kyvett. Kyvetthållarna med stålkula förvärms innan prov tillsätts. Reagensen skall sättas i de uppvärmda reagenshållarna och skall anta en temperatur av 37 ° C innan användning. Om automatisk pipett används skall reagens dras upp i pipetten och förvärmas i den avsedda positionen. (Diagnostica Stago 2003).

Prov tillsätts i kyvetterna och inkuberas i inkuberingspositionen. En ljudsignal ljuder då det är 10 sekunder kvar av inkuberingstiden. Kyvetten skall då flyttas över till mätzonen. Då inkuberingstiden är slut skall reagens tillsättas. Om man använder Finnpiptett®, som medföljer instrumentet, startar mätningen automatiskt då reagenset är tillsatt. Om man använder en annan pipett måste man trycka på ”pipettstyrningstangenten” samtidigt som man tillsätter reagenset för att starta mätningen. Då fibrin detekteras erhålls ett resultat som printas ut i pappersform från instrumentet (Diagnostica Stago 2003). Resultatet valideras av en laboratorieskötare och skrivs sedan in manuellt i datasystemet GSM Analytix 2.0.

3.6 Kvalitetsparametrar

Kvalitetsstyrning och kvalitet är essentiella komponenter i laboratorieundersökningsprocessen. Analysresultat som erhålls från ett laboratorium måste vara korrekta, tillförlitliga och repeterbara. För att kunna säkerställa dessa faktorer är kvalitetsstyrningen hos laboratorier viktig. Till kvalitetsstyrning hör en uppdaterad kvalitetshandbok och en kvalitetspolicy, kvalitetskontroller, intern och extern kvalitetsgranskare och intern auditering (Crighton 2013, s. 81). Det är viktigt att komma ihåg och förstå att koagulationsanalyser endast försöker imitera vad som händer i kroppen och är därför endast så bra som det laboratorium som utför dessa.

Denna undersökning jämför två apparater och för att kunna tolka resultaten måste kvalitetsparametrar och kvalitetsbegrepp behandlas för att kontrollera metodernas tillförlitlighet. Dessa kvalitetsbegrepp är analytisk sensitivitet och specificitet, mätosäkerhet, mätfel, reproducerbarhet och precision.

3.6.1 Analytisk sensitivitet och specificitet

Analytisk sensitivitet kan definieras som ändring av ”signal” i relation till ändring av ”kvantitet” (Ganrot & Tryding 2003, s. 24). En annan definition av analytisk sensitivitet är att den anger den minsta mängd av den sökta substansen i ett prov som kan uppmätas (Saah & Hoover 1997).

Analytisk specificitet beskriver analysens förmåga att endast mäta den avsedda analyten då det förekommer andra komponenter i provet än den berörda analyten. (Ganrot & Tryding 2003, s. 24; Simonsen 2005, s. 47).

3.6.2 Mätosäkerhet och mätfel

De mätresultat som erhålls får inte uppfattas som de riktigt sanna värdena för det som skall mätas. Alla mätningar som görs har nämligen någon form av mätosäkerhet och mätfel i olika grad. I laboratoriets kvalitetsarbete ingår det att fastställa mätosäkerheten för nya metoder. Förutom mätosäkerhet och mätfel kan det förekomma osäkerhet kring preanalytiska faktorer, mätning och rapportering av resultaten. Dessa osäkerhetskomponenter kan behandlas som en utvidgad mätosäkerhet. (Ganrot & Tryding 2003, s. 24-26).

Mätfel definieras som skillnaden mellan det erhållna värdet och det sanna värdet. Mätfelet är egentligen en idealisering eftersom det sanna värdet i allmänhet inte är känt men mätfelet kan teoretiskt sätt ha ett bestämt värde (Ganrot&Tryding 2003, s. 24).

Det finns två typer av mätfel, slumpmässiga mätfel och systematiska fel. Systematiska mätfel innebär t.ex. felaktig kalibrering av mätmetoden eller utrustningen (Ganrot & Tryding 2003, s. 24). Systematiska fel kan man upptäcka och korrigera, dock kan systematiska fel ha en komplex orsak eller vara svårdefinierbara. (Simonsen 2005, s. 31).

Mätosäkerheten uppkommer till följd av mätfel och en naturlig slumpmässig variation. Hur stor mätosäkerheten är brukar anges med statistiska mått. Den slumpmässiga variationen kan uppskattas genom upprepade mätningar av prover och därefter uträknas medelvärde och standardavvikelse. Ett ideal som eftersträvas är att analysmetodens mätosäkerhet skall vara mindre än hälften för den intraindividuell biologiska variationen. Utöver den statistiska mätosäkerheten finns även en risk för extraordinära fel som t.ex. mänskliga misstag och instrumenthaveri. (Ganrot & Tryding 2003, s. 24-26).

Då laboratorieanalyser används till att fastställa och värdera prognoser eller följa upp en redan känd sjukdom hos patienten, uppföljning av behandling eller att styra doseringen av läkemedel är det viktigt att komma ihåg att kontroll av värdena skiljer sig från annan användning av laboratorieanalyser. Analysresultaten jämförs i första hand med utfallet av föregående resultat, inte i relation till referensvärdena. Om det förekommer skillnader mellan resultaten kan man då fråga sig om skillnaden är verklig och har en klinisk betydelse eller om skillnaden beror på mätosäkerhet eller biologisk variation hos patienten (Ganrot & Tryding 2003, s. 42).

3.6.3 Precision, repeterbarhet och reproducerbarhet

Precisionen hos en metod beror på tillfälliga fel som uppstår under mätning. Tillfälliga fel är variationer som bara kan göras med en begränsad noggrannhet. Resultatet som erhålls beror på apparaturen som används och den person som utför mätningen. Precision kan uttryckas med standardavvikelse. Precision uttrycker endast hur resultaten fördelar sig kring medelvärdet och inte om mätningen ligger nära det sanna värdet. (Simonsen 2005, s. 32- 33).

Precisionen hos en metod kan bestämmas under sådana mätförhållanden då yttre faktorer inte har någon inverkan. Precisionen bestäms som repeterbarhet. Repeterbarhet uttrycker precisionen när mätningarna utförs under likadana förhållanden d.v.s. samma metod, procedur, apparatur, person och upprepning under kort tid. Reproducerbarhet å andra sidan är ett uttryck för precisionen då en eller flera av förutsättningarna för mätningen ändras så som en annan mätmetod eller olika personer som utför mätningarna. (Simonsen 2005, s.33- 34).

3.7 Jämförelse av metoder

Metodvalidering är det arbete som utförs av laboratoriet för att dokumentera att metodens erhållna resultat uppfyller de fastställda kvalitetskrav som råder (Simonsen 2005, s. 38). Metodvalideringen är således ett viktigt arbete i det kliniska laboriearbetet ur kvalitetsperspektiv och en förutsättning för att laboratoriet kan producera ett tillförlitligt resultat.

Varje gång en ny metod tas i bruk i ett rutinlaboratorium bör den valideras och detta görs i regel genom att jämföra den nya metoden med en annan metod. Den andra metoden kan vara en referensmetod eller en annan metod som används i rutinarbetet vid laboratoriet. (Bilic-Zulle 2011, s. 49).

Under ideala omständigheter är en referensmetod att föredra. En referensmetod är en högkvalitativ metod vars mätresultat är kända för att ge ett så korrekt värde som möjligt och genom spårbarhet hos standardiserade referensmaterial. Alla skillnader som upptäcks

mellan testmetoden och referensmetoden härrör från testmetoden då man anser att referensmetoden inte kan ifrågasättas (Westgard 2008). Genom att jämföra metoden mot en referensmetod kan man då fastställa hur bra metoden är i förhållande till referensmetoden.

Om man inte har tillgång till en referensmetod eller om en referensmetod saknas för den berörda analysen kan man ta hjälp av en annan metod, en s.k. jämförelsemetod. En jämförelsemetod kan vara en annan metod som används i rutinarbetet (Bilic-Zulle 2011, s. 49). Då man jämför två rutinmetoder kan man inte fastställa om den ena metoden är bättre än den andra utan fokus ligger på att se om den ena metoden kan ersätta den andra metoden (Linnet & Boyd 2008, s. 213).

Målet med att jämföra metoder är att uppskatta systematiska skillnader mellan metoderna och på det sättet bekräfta om det finns en signifikant skillnad mellan metoderna. För att få en objektiv bild är det rekommenderat att använda statistik och synliggöra resultatet grafiskt. De mest använda metoderna för detta är Bland-Altman plot och Passing Bablok regressionsanalys (Linnet & Boyd 2008, s.213; Bilic-Zulle 2011, s. 49). Om man jämför testmetoden med en jämförelsemetod skall man dock vara försiktig vid tolkningen av resultaten. Generellt kan sägas att om skillnaden är liten och är kliniskt acceptabel har de två metoderna samma tillförlitlighet. Detta betyder i praktiken att metoderna kan användas simultant och är utbytbara mot varandra. Om skillnaden är stor och den kliniska betydelsen oacceptabel är det nödvändigt att undersöka vilken av metoderna som är felaktig och om möjligt kalibrera om den metod som är felaktig (Westgard, 2008).

3.8 Tidigare forskning

Förutom mängder av alternativ till analysinstrument finns det även alternativ till mätmetoderna som används i analysinstrumenten. De alternativ som finns, och som redan nämnts, kan grovt delas in i fotoptisk mätmetod och mekanisk metod. Flera undersökningar har gjorts för att avgöra om någon av dessa metoder är överlägsen den andra (Tekkesin & Kilinc 2012, s. 125).

Det har slagits fast att den mekaniska mätmetodens analysresultat inte påverkas av turbida, grumliga, prover och därför har det uppstått en allmän åsikt att den mekaniska mätmetoden är överlägsen den fotooptiska mätmetoden. Dock har senare studier visat att ingen av mätmetoderna påverkas av turbida prover (Tekkesin & Kilinc 2012, s. 125).

Tekkesin och Klinic (2012, s. 125) har gjort en sammanfattning av tidigare studier som berör olika mätmetoder inom koagulation. Dessa studier har föreslagit att optisk och mekanisk mätmetod är ekvivalenta i förhållande till korrelation, mätnoggrannhet och tillförlitlighet gällande koagulationsundersökningar. Andra studier föreslår att den optiska mätmetoden är bättre än den mekaniska mätmetoden, speciellt under de förhållanden där patientens kliniska sjukdomsbild påverkar koagulationen så som vid sjukdomen familial dysfibrinogenemi. Konsekvensen av detta är det finns ingen klarhet i vilken mätmetod som är den mest riktiga (Tekkesin & Kilinc 2012, s. 125).

Tekkesin och Kilinc (2012, s.126) gjorde en studie för att finna klarhet i den förvirring som uppstått kring mätmetoder vid koagulationsundersökningar. De beslöt att jämföra två analysinstrument vid analys av protombintid (PT) och aktiverad partiell tromboplastintid (aPTT). De analysinstrument som användes var Coag-A-Mate MTX- 2 (MTX II) och AMAX 200, båda från tillverkaren TrinityBiotech. MTX II använder sig av en optisk mätmetod medan AMAX 200 använder sig av en mekanisk mätmetod. Resultatet av ovannämnda studie visade på en utmärkt korrelation för de båda analysinstrumenten för PT och aPTT.

Trots att Tekkesin och Klinic (2012) kom fram till att deras instrument har god korrelation kvarstår fortfarande frågan om vilken mätmetod som är den mest riktiga eller om val av mätmetod spelar roll. Detta beror till största del på att alla studier använder sig främst av en endast en typ av kombination för analysinstrument och reagens, inte av ett standardinstrument och ett standardreagens (McCraw m.fl. 2010, s. 77).

4 Material och metoder

Syftet med denna undersökning är att jämföra analysinstrumenten Thrombolyzer Compact X (Behnk Electronics) och SStart 4 (Stago) för att se om det finns statistiska och kliniskt signifikanta skillnader mellan dessa instrument. Om det visar sig att skillnader finns bör denna kunskap bidra till att åtgärda eventuella problem i den befintliga verksamheten.

Detta kapitel presenterar materialet och metoderna som använts i genomförandet av denna undersökning. Kapitlet behandlar de teoretiska utgångspunkterna för undersökningsmetoden för denna studie, det praktiska genomförandet av undersökningen samt metoderna som använts vid datainsamlingen och analysen av erhållna data. Ett kapitel med undersökningens kvalitetsaspekter finns även med.

4.1 Metoder för undersökningen

När man inleder en undersökning måste man klargöra vilken metod som är mest relevant i förhållande till syftet för undersökningen. De metoder, forskningsperspektiv, som är mest använda är kvalitativ metod och kvantitativ metod. Kvalitativ metod är en metod som används för att få tillgång till beskrivande data och för att undersöka fenomen (Olsson & Sörensen 2011, s.96, s.106) Kvantitativ metod är baserad på tidigare forskning. Den kvantitativa metoden kännetecknas av att forskningsprocessen är strukturerad och planerad och genomförs empiriskt för att sedan presenteras med statistisk analys (Olsson & Sörensen 2011, s. 108). Denna undersökning grundar sig på den kvantitativa metoden.

4.1.1 Metoder för datainsamling

Innan man påbörjar en undersökning måste man ta hänsyn till syfte och frågeställning för att kunna avgöra mängden och typen av material som skall insamlas (Patel & Davidsson

2011, s. 69). För denna undersökning har en teoretisk datainsamling samt en empirisk datainsamling gjorts.

Den teoretiska datainsamlingen innefattar den teoretiska bakgrunden för denna undersökning men även val av metoder. Den teoretiska datainsamlingen gjordes med hjälp av elektroniska databaser som yrkeshögskolor och universitet tillhandahåller, böcker, broschyrer och manualer för analysinstrument. Den empiriska datainsamlingen gjordes på ÅCS laboratorium (se kapitel 4.3 Undersökningens praktiska genomförande) och presenteras med hjälp av en tabell (se bilaga 1 Tabell över rådata).

4.1.2 Westgards metod för metodjämförelse

Westgard, grundare av Westgard QC inc. som är ett framstående och ledande företag inom kvalitetsstyrning i analytisk laboratoriemiljö, har utvecklat en mall, ”The Comparison of Methods Experiment”, för hur man skall gå tillväga då man jämför två metoder (Westgard 2008). Respondenten har använt dessa rekommendationer som utgångspunkt i det praktiska genomförandet av undersökningen.

Principen för undersökningen är att prover skall analyseras med en testmetod och med en jämförelsemetod (se kapitel 3.7 Jämförelse av metoder). Westgard rekommenderar att provantalet skall vara minst 40 olika patientprover. Det ideala är att välja ut prover som täcker hela arbetsområdet för metoden d.v.s. välja ut prover med låga, normala och höga värden. Valet av prover bör även representera det spektrum av sjukdomstillstånd som förväntas dyka upp vid rutinmässig tillämpning av metoden. Kvaliteten på undersökningen och uppskattning av systematiskt fel beror mer på ett brett spektrum av prover än av själva provantalet. Fördelen med ett stort antal prover är att man då kan identifiera enskilda patientprover vars resultat inte överensstämmer på grund av interferenser i ett enskilt provs matrix. Detta är ofta av intresse om den nya metoden använder sig av en annan kemisk reaktion eller en annan mätprincip. (Westgard 2008).

Westgard rekommenderar även att undersökningen skall genomföras under minst fem olika dagar och i olika provkörningar. Detta för att minimera eventuella systematiska fel som kan förekomma under en enskild körning. Vid körning av prover bör proverna analyseras inom två timmar av både testmetoden och jämförelsemetoden, detta för att säkerställa att

provet hålls stabilt. Stabiliteten hos provet kan höjas genom separering av plasma eller serum. Andra alternativ för att säkerställa stabiliteten hos provet är förvaring i kylskåp eller frys eller med hjälp av konserveringsmedel. Provhanteringen bör vara systematiserad och definierad före genomförandet av undersökningen. Detta för att undvika att observerade skillnader mellan testresultaten kan bero på provhantering än systematiskt analytiskt fel. (Westgard 2008).

4.2 Metoder för datanalis

För att analysera data vid en kvantitativ undersökning framställs resultaten med hjälp av statistiska metoder. Meningen med att använda statistik är att lättare kunna beskriva och tolka sina resultat, främst då det finns mycket rådata. Deskriptiv statistik är då man beskriver sina resultat med hjälp av tabeller och diagram eller med statistiska siffermått. Analytisk statistik är då man med data man erhållit skall analysera och jämföra variablerna och med hjälp av detta kan man dra slutsatser och tolka resultaten (Ejlertsson 2003, s.15). I detta examensarbete används båda typer av statistik för att lättare kunna ta del av resultatet.

Det finns i nuläget ingen gyllene standard för vilka statistiska metoder som skall användas vid metodjämförelse. De metoder som har utvecklats exklusivt för metodjämförelse är Passing- Bablok regressionsanalys och Bland- Altman plotmetod, dessa metoder är även de mest använda. (Bilic- Zulle 2011, s. 49-50).

Insamlingen av data har skett via indirekta observationer m.h.a. laboratorieundersökningar, då analysresultaten från de olika apparaterna antecknats och sedan har data analyserats med hjälp av Passing-Bablok regressionsanalys och Bland-Altman-plotmetod i programmet Microsoft Excel 2010 med tillägsprogrammet Analyze-it: Method Evaluation Edition.

4.2.1 Bland- Altman plot

För att undersöka hur systematiska (bias) och slumpmässiga avvikelser mellan metoderna varierar med den verkliga nivån hos det som mäts används Bland- Altman plot. Bland-Altmandiagrammet illustrerar skillnaderna mellan de två mätmetoderna mot medelvärdet. Genom att använda Bland-Altman plot-metoden kan man få fram information om relationen mellan skillnad och koncentration, som kan vara användbar då man skall se om det finns problem hos analysinstrumentet vid särskilda gränser. Man kan även se om skillnaderna mellan mätmetoderna ökar proportionellt med koncentrationen eller om skillnaderna är oberoende av koncentrationen. (Linnet & Boyd 2008, s.215).

Från Bland-Altman diagram får man ut hur skillnaden mellan två kvantitativa mätmetoder (illustreras på y-axel) beror på den verkliga nivån (illustreras på x-axeln) (Björk 2010, s.274). Horisontella linjer dras vid den genomsnittliga skillnaden samt på gränsen av den genomsnittliga skillnaden $\pm 1,96$ gånger standardavvikelsen (SD) för skillnaderna (MedCalc Software, 2013). Standardavvikelsen anger ett mått för den genomsnittliga avvikelsen från medelvärdet (Björk 2010, s. 60).

Bland-Altman metoden räknar ut den genomsnittliga skillnaden mellan två kvantitativa mätmetoder och gränsvärdet av 95 %, vilket innebär den genomsnittliga skillnaden av 1,96 SD. Man förväntar sig att 95 % av skillnaderna mellan de två mätmetoderna håller sig inom gränsvärdet av 95 %. (Myles & Cui 2007, s.309).

4.2.2 Passing- Bablok regressionsanalys

Vid en jämförelse av metoder förväntar man sig att korrelationen mellan metoderna skall vara hög, helst 0,99 eller högre (Pearsons korrelationskoefficient). För att tolka resultaten används ofta en linjär regressionsmodell. Det är rekommenderat att använda Passing-Babloks regressionsanalys vid jämförelse av metoder. En fördel med att använda Passing-Babloks regressionsanalys jämfört med andra statistiska analysmetoder är att man inte måste ta hänsyn till eventuella extremvärden då denna metod är en icke- parametrisk metod. (Bilic- Zulle 2011, s.50).

Med hjälp av Passing- Babloks regressionsanalys kan få fram ett spridningsdiagram med en regressionslinje. Ekvationen för regressionslinjen lyder: $y = a + bx$. a står för regressionslinjens skärningspunkt, b står för lutningen för regressionslinjen och x står för en observation av endera mätmetoden. Regressionsekvationen visar konstanta och proportionella skillnader inom konfidensintervallet 95 %. (Bilic- Zulle 2011, s.50).

Konfidensintervallen förklarar om deras värde skiljer sig från värdet noll för skärningspunkten och värdet ett för linjens lutning endast genom slumpen. Följaktligen om konfidensintervallet 95 % för skärningspunkten omfattar värdet noll, kan man dra slutsatsen att det finns ingen signifikant skillnad mellan det erhållna värdet för skärningspunkten och värdet noll. Därför finns det ingen konstant skillnad mellan metoderna. (Bilic- Zulle 2011, s.50).

På samma sätt kan man om 95 % konfidensintervallet för lutningen inkluderar värdet ett, dra slutsatsen att det inte finns en signifikant skillnad mellan det erhållna värdet för linjens lutning och värdet ett. Det finns därför ingen proportionell skillnad mellan metoderna. I sådana fall kan man anta att $x=y$, det finns ingen skillnad mellan metoderna och därför kan metoderna användas omväxlande. (Bilic- Zulle 2011, s.50).

4.3 Det praktiska genomförandet av undersökningen

Undersökningen planerades och genomfördes under perioden 7.5.– 22.5.2013 vid Åland Centralssjukhus laboratorium under handledning av kemist Christian Jansson. Initialt planerades det praktiska genomförandet och en genomgång av principerna för apparaterna gjordes.

Blodprov insamlades från patienter som kommer för blodprovstagning för att undersöka P-TT-INR. Blodprov kommer från den polikliniska provtagningsenheten, akutmottagningen, sjukhusets avdelningar, antikoagulansmottagningen, hemsjukvården och geriatriska kliniken vid Ålands hälso- och sjukvård, ÅHS. Personalen vid laboratoriet har följt de rekommenderade anvisningarna för provhantering av P-TT-INR som råder vid laboratoriet vid Ålands Centralsjukhus.

Enligt överenskommelse med personalen på laboratoriet vid Ålands Centralsjukhus sparades de prover som kommit in under dagen, tidsintervallet mellan provtagning och analys var max 10 h. Prover med synbar hemolys, ikterus och lipemi valdes bort för att undvika eventuella skillnader i mätresultatet på grund av detta. Proverna märktes med en sifferkod och således insamlades inga patientuppgifter. För undersökningen insamlades totalt 94 prover för jämförelse mellan instrumenten.

Reagenset ThrombotestTM rekonstruerades med 11 mL 3,2 nM CaCl₂ och blandades väl innan användning. Kontrollerna Control Plasma AK och Control Plasma Normal rekonstruerades med 0,6 ml destillerat vatten. Respondenten följde tillverkarens instruktioner för hantering av reagens och kontroller (se kapitel 3.5.2 Reagens och kontroller).

Före analys av prover på apparaterna kördes kontrollerna Control Plasma AK och Control Plasma Normal på både Thrombolyzer Compact X och STart4 för att upprätthålla en intern kvalitetskontroll (se kapitel 4.4 Kvalitetsaspekter i utförandet). Därefter analyserades proverna, 20 åt gången, på Thrombolyzer Compact X respektive STart med mindre än två timmars mellanrum. Proverna analyserades enligt de instruktioner som angavs i respektive tillverkarens manualer (se kapitel 3.5.3 Thrombolyzer Compact X och kapitel 3.5. 4 STart[©] Hemostasis Analyzer). Resultaten dokumenterades och matades in i dataanalysprogrammet Microsoft Excel och analyserades med statistiska metoder (se kapitel 4.2 Metoder för dataanalys).

Upprepningar av mätningar av samma patientprov på samma apparat gjordes även för att kunna bestämma analysapparaternas egna mätosäkerheter. Totalt insamlades 12 prover som mättes två gånger på respektive mätinstrument, mätningarna skedde vid tre olika tillfällen.

4.4 Kvalitetsaspekter i utförandet

För att säkerställa och dokumentera kvaliteten i laboratoriearbetet finns flera olika kontrollsystem i användning. Dessa kontrollsystem är till för att upptäcka eventuella fel i mätningarna och för att registrera mätosäkerheten. Ett av dessa system är intern

kvalitetskontroll. Intern kvalitetskontroll görs med kontrollprover med minst två olika, viktiga mätnivåer och dessa behandlas på samma sätt som patientprover. Kontrollproverna mäts och värdena jämförs med de fastställda värdena och på basis av detta förkastas eller godkänns kontrollerna. Extern kvalitetskontroll innebär å andra sidan att laboratoriet analyserar prover, vilka är distribuerade av ett kontrollorgan (Theodorsson & Grankvist & Nilsson- Ehle 2012, s. 19-21). För ÅCS laboratorium är detta kontrollorgan Labquality.

Ett alternativ för att öka mätresultatets tillförlitlighet är spårbar kalibrering av mätmetoder och mätutrustning. Kalibrering är en procedur som medför ett entydigt samband mellan erhållna mätvärden och kända värden för mätparametern. Prover med kända värden kallas kalibratorer. Alla kalibratorer är spårbara och har tillverkats enligt nationell eller internationell referens. Beroende på hur stabilt ett mätsystem är görs metodkalibrering med korta eller långa tidsintervall som t.ex. byte av reagens. Kalibreringen kontrollerar också att utrustningen ger rätt värden. (Theodorsson & Grankvist & Nilsson- Ehle 2012, s. 21).

Den interna kvalitetssäkringen för undersökningen innefattade kontroller, Control Plasma AK och Control Plasma Normal (se kapitel 3.5.2 Reagens och kontroller), som används i rutinarbetet (Björkqvist & Kastus 2013, s. 7). Kontrollerna kördes före varje körning av patientprover. Kontrollerna var inom de givna gränserna. Varje enskild kontroll som användes under denna undersökning hade ett lotnummer till vilken hör ett visst kontrollvärde som är specifik för det lotnummret. För varje ny kontrollflaska kontrollerades lotnummret så att samma lotnummer användes under hela undersökningstiden.

Före insamling av data från patientprover kalibrerades båda instrumenten. För varje nytt lotnummer av ThrombotestTM (se kapitel 3.5.2 Reagens och kontroller) kalibreras instrumenten enl. en kalibreringskurva som medföljer reagenset (Björkqvist & Kastus 2013, s. 9). ThrombotestTM, vilken användes under undersökningen, hade ett ISI-värde på 0,99, vilket är ett helt acceptabelt värde (se kaptiel 3.3.3 Internationella standarder).

Pipetterna som användes under undersökningens gång var kalibrerade och tekniken som användes vid pipettering var konsekvent. Pipettekniken som användes var indirekt pipettering.

Rekonstrueringslösningen, 3,2 nM CaCl₂, som användes i undersökningen var den samma som användes i rutinarbetet i laboratoriet. Den var tillredd enl. laboratoriets anvisningar; 6,4 ml av 0,1 M CaCl₂ (stamlösning) utspädd med 200 ml destillerat H₂O. Stamlösningen

tillverkas på laboratoriet av 1,47 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ med 50 ml destillerat H_2O . Både rekonstrueringslösningens och stamlösningens utgångsdatum kontrollerades och dessa var inom tidsramen för undersökningen.

5 Resultat och tolkning

Syftet med denna undersökning var att jämföra två analysinstrument, Thrombolyzer Compact X och STart 4, och deras mätmetoder för att fastställa om det fanns en signifikant skillnad mellan dessa och om metoderna är utbytbara mot varandra samt om eventuella skillnader har en klinisk betydelse. I detta kapitel följer en presentation av resultaten och tolkning av resultaten med hjälp av tabeller och diagram för att göra resultaten mer överskådliga.

Det har även gjorts en uppskattning av analysinstrumentens interna variation, en standardosäkerhet, för att se om instrumenten ger tillförlitliga svar och om instrumenten i sig är noggranna.

5.1 Beskrivning av materialet

För undersökningen insamlades 94 patientprover för att göra en jämförelse av instrumenten. Det insamlade materialet presenteras i sin helhet i bilaga 1. Spridningen av resultaten varierade från ett INR-värde på 0,91 till 5,15. Nedan ses ett utdrag ur tabellen i bilaga 1 (tabell 1).

Tabell 1. Utdrag ur tabellen med rådata (Bilaga 1).

ProvID	Thrombolyzer Compact X(INR)	ST art 4 (INR)	Differens (INR)	Medelvärde (INR)
40	1,69	1,79	-0,1	1,74
41	3,32	3,35	-0,03	3,335
42	2,52	2,42	0,1	2,47
43	1,06	1,04	0,02	1,05
44	2,51	2,64	-0,13	2,575
45	2,11	2,14	-0,03	2,125
46	2,13	2,24	-0,11	2,185
47	1,31	1,32	-0,01	1,315
48	0,91	0,9	0,01	0,905
49	3,64	3,73	-0,09	3,685

Tabellen är indelad i fem kolumner. Den första kolumnen anger provets identifikationsnummer, den andra kolumnen anger uppmätta värden i INR från Thrombolyzer Compact X och den tredje kolumnen anger uppmätta värden i INR från STart 4. Den fjärde kolumnen anger differensen i INR för de erhållna värdena hos respektive analysinstrument (INR-värde enl. Thrombolyzer Compact X – INR-värde enl. STart 4). I den femte kolumnen presenteras medelvärdet av de erhållna resultaten ((INR-värde enl. Thrombolyzer Compact X + INR-värde enl. STart 4) /2).

5. 2 Den interna variationen hos respektive instrument

För att kontrollera den interna variationen hos Thrombolyzer Compact X och STart 4 har en uträkning av standardavvikelsen gjorts för respektive instrument. Standardavvikelsen definieras som den genomsnittliga avvikelsen från medelvärdet. Ju högre standardavvikelse desto mer avviker de erhållna värdena från medelvärdet i genomsnitt (Björk 2010, s. 60). Genom att beräkna standardavvikelsen får man ut hur god en metods precision är (se kapitel 3.6. 3 Precision, repeterbarhet och reproducerbarhet).

För att uppskatta den interna variationen hos respektive analysinstrument har standardavvikelsen räknats ut. Detta har gjorts genom att först göra upprepade mätningar från samma provmaterial och sedan se hur mycket medelvärdet av detta prov skiljer sig från medelvärdet av de upprepade mätningarna från alla prov som användes. Totalt mättes 12 olika prover, vilka alla kördes två gånger var på varje analysinstrument.

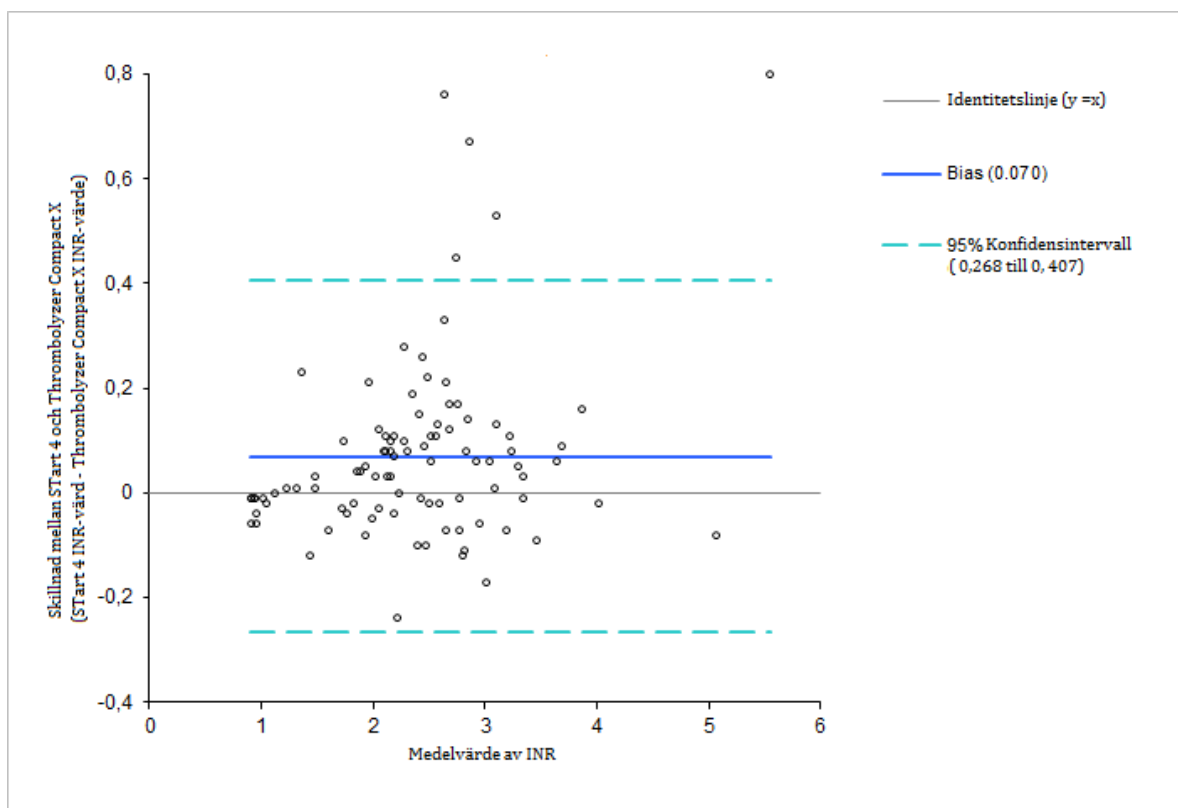
Den uppskattade standardavvikelsen för Thrombolyzer Compact X är 0,02. För att få standardfelet använder man sig av ett 95 % konfidensintervall och en täckningsfaktor på två. För att få fram skillnaden mellan mätningarna som skall täcka 95 % av fallen multipliceras standardavvikelsen med täckningsfaktorn två. Statistiskt betyder detta att i 95 % av mätningarna skiljer de sig inte mer än 0,04 enheter. Detta betyder att precisionen för Thrombolyzer Compact X är god.

Den uppskattade standardavvikelsen för STart 4 är 0,06. Detta betyder att i 95 % av mätningarna skiljer de sig inte mer än med 0,12 enheter. Precisionen för STart4 är således god.

5.3 Tolkning med hjälp av Bland- Altman plot

För att undersöka hur systematiska (bias) och slumpmässiga avvikelser mellan metoderna varierar med den verkliga nivån (teoretiskt värde) hos det som mäts används Bland-Altman plot. Bland-Altmandiagrammet illustrerar skillnaderna mellan de två mätmetoderna mot medelvärdet, vilket kan ses i figur 9.

På y-axeln finns den beräknade skillnaden mellan mätningarna gjorda på Thrombolyzer Compact X och STart 4. På x-axeln ses medelvärdena av P-TT-INR. Varje punkt motsvarar en mätning. De horisontella linjerna som syns i diagrammet är identitetslinjen, linje för bias och konfidensintervallet 95 %. Identitetslinjen är de värdena då $y = x$, alltså då det inte finns någon skillnad mellan analysinstrumenten. Bias, 0,07 i det här fallet, är den genomsnittliga skillnaden mellan mätmetoderna och konfidensintervallet 95% sträcker sig från en skillnad på -0,268 till 0,407.



Figur 9. Diagram över resultat erhållna genom Bland-Altman plot metoden.

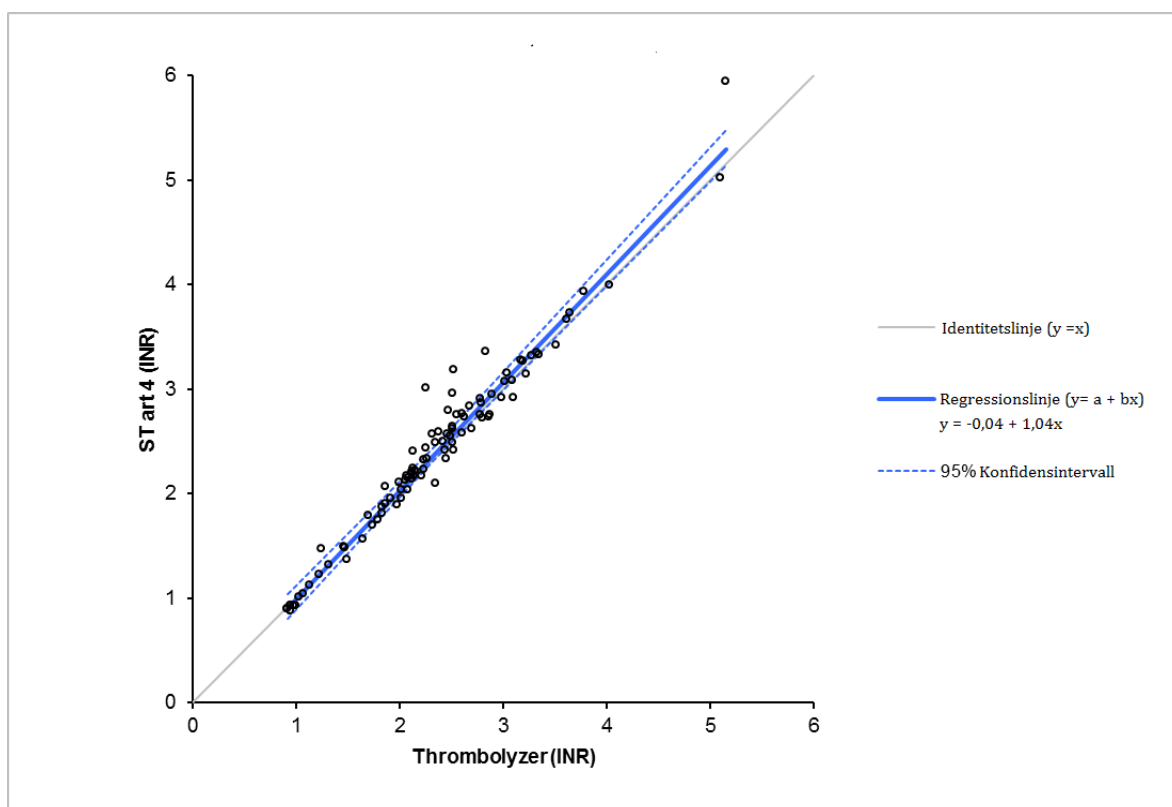
En stor del av punkterna ligger på eller nära identitetslinjen $y = x$. Detta kan tolkas som att analysinstrumentens uppmätta värden har god överensstämmelse. Man förväntar sig att 95 % av skillnaderna mellan de två mätmetoderna håller sig inom gränsvärdet av 95 %. Detta

påstående stämmer bra då endast fem punkter, vilka utgör 5,3 % av alla punkter, befinner sig utanför konfidensintervallet. Detta tyder på att skillnaderna är normalfördelade och att analysinstrumentens metoder överensstämmer bra.

5.4 Tolkning med hjälp av Passing- Bablok regressionsanalys

Ekvationen för regressionslinjen lyder: $y = a + bx$. I detta fall står y för ett mätvärde som har erhållits av STart 4 och x står för ett mätvärde som har erhållits Thrombolyzer Compact X. a står i detta fall för interceptvärdet (skärningspunkten) och b står för regressionslinjens lutning. Resultatet presenteras grafiskt i figur 10. Vid utförande av regressionsanalys enl. Passing- Bablok metod fås ekvationen:

$$y = -0,04 + 1,04x$$



Figur 10. Diagram över resultat erhållna genom Passing- Bablok regressionsanalys

Pearsons korrelationskoefficient är 0,98 och $P < 0,001$, vilket tyder på god korrelation. Konfidensintervallet 95% för skärningspunkten -0,04 är -0,10 till 0,03, vilket betyder att

värdet noll är inkluderat i konfidensintervallet. Detta betyder att det inte finns någon konstant skillnad mellan metoderna. Konfidensintervallet 95% för regressionslinjens lutning 1,04 är 1,00 till 1,07, värdet ett är inkluderat i konfidensintervallet och man kan därför dra slutsatsen att det finns ingen proportionell skillnad mellan metoderna. Man kan därför anta att $x=y$ och metoderna kan användas omväxlande och den ena metoden kan ersätta den andra metoden som rutinmetod.

Då ekvationen för regressionslinjen blev $y = -0,04 + 1,04x$ kan man därifrån räkna ut det systematiska felet (SE = systematic error) vid viktiga, kliniska beslutsgränser. Det systematiska felet vid ett visst värde beräknas enl. ekvationen $SE = Y_c - X_c$, där X_c står för ett givet medicinsk, viktigt värde och Y_c står för det korresponderande y-värdet (Westgard 2008). I denna undersökning väljs INR-värdena 2,0 och 3,0 då dessa är gränserna för det terapeutiska målet vid antikoagulansbehandling med warfarin (se kapitel. 3.3.2 Målvärden).

Ekvationen för regressionslinjen lyder $y = -0,04 + 1,04x$, d.v.s. att skärningspunkten är INR-värdet -0,04 och kurvans lutning 1,04. Det korresponderande y-värdet för 2,0 är 2,04 ($y = -0,04 + 1,04 * 2,0$) och det korresponderande y-värdet för 3,0 är 3,08 ($y = -0,04 + 1,04 * 3,0$). Detta betyder att det finns ett systematiskt fel på 0,04 respektive 0,08 INR-enheter vid gränsvärdena för det terapeutiska målområdet. Därav kan slutsatsen dras att dessa systematiska fel är så små att de inte har någon klinisk betydelse i praktiken för patienten.

5.5 Sammanfattning av resultaten

Den interna variationen hos respektive analysinstrument var liten. Den uppskattade standardavvikelsen visade att båda instrument har bra precision. Thrombolyzer Compact X:s uppskattade standardavvikelse var 0,02 medan STart 4:s uppskattade standardavvikelse var 0,06. Thrombolyzer Compact X är således snäppet noggrannare gällande precision men detta har ingen statistisk signifikans då skillnaden är så liten. Båda analysinstrumenten ger ut P-TT-INR-svar med två decimaler.

Sammanfattningsvis kan man dra slutsatsen att Thrombolyzer Compact X och STart 4 överensstämmer bra genom statistisk analys med Bland-Altman plot och Passing- Bablok regressionsanalys. Detta betyder i sin tur att metoderna kan användas omväxlande och Thrombolyzer Compact X är således ett bra val av analysinstrument för att ersätta STart 4.

6 Kritisk granskning

För att kunna granska en studie kritiskt bör det finnas vissa kvalitetskriterier som bör uppfyllas. De kvalitetskriterier som ligger som grund för denna studie baserar sig på Staffan Larssons kvalitetskriterier och begreppen validitet och reliabilitet. I detta kapitel diskuteras även övriga kvalitetsaspekter och kritiska tankar kring undersökningen.

Det första kvalitetskriteriet enligt Larsson (2005, s. 3-5) är perspektivmedvetenhet. Bakom varje beskrivning, tolkning, av verkligheten finns ett perspektiv. Genom att göra läsaren medveten om vilka utgångsperspektiv som används för tolkningen av undersökningen blir läsaren informerad om tolkningen ur en speciell synvinkel. Detta görs praktiskt genom att redovisa de teorier som används, forskningsläget och genom att sätta in forskningen in i ett samband. Denna undersökning har ett definierat perspektiv. De teoretiska utgångspunkterna och perspektiv för undersökning står att finna i kapitel 3 Teoretisk bakgrund och kapitel 4 Undersökningens genomförande och utgångspunkter. Detta examensarbete är även insatt i ett sammanhang, vilket har gjorts i inledning av kapitel 3 Teoretisk bakgrund.

Det andra kvalitetskriteriet enligt Larsson (2005, s. 9) är att intern logik skall råda i forskningen. Detta betyder att det skall finnas en harmoni mellan syfte, datainsamlingsmetod och analysteknik. Denna harmoni kan ses som en röd tråd genom arbetet och arbetet skall kunna ses som en helhet. Det skall även finnas en återkoppling till syftet i resultatdiskussionen för att arbetet skall vara en sammanfogad konstruktion. I detta arbete löper en röd tråd och kapitlena är valda med eftertanke för att kunna ge läsaren en så tydlig helhetsbild som möjligt av undersökningen. Arbetet är presenterat på ett logiskt och strukturerat vis.

En tredje kvalitetsaspekt enligt Larsson (2005, s. 9-10) är det etiska värdet. Detta betyder att man i jakten på ny kunskap inte avslöjar studiens deltagares identitet. Inom detta sammanhang gäller också att de resultat som presenteras är sanningsenliga och inte förvrängda samt att man följt god vetenskaplig praxis. Respondenten har följt god vetenskaplig praxis och etiken har även beaktats. De patienter, vars blodprover har används i denna undersökning, har inte fått sin identitet röjd då provrören märktes med ett identifikationsnummer redan innan mätningen av proverna påbörjades.

Det fjärde kvalitetskriteriet är att en forskning skall ha ett heuristiskt värde och/eller ett pragmatiskt krav. Med heuristiskt värde avses upptäckten av ny kunskap. Det pragmatiska kravet omfattar nyttan av studien och om resultaten av studien ger en ökad förståelse för ämnet (Antus 2013, s. 19; Larsson 2005, s. 18, s. 24-25). Denna studie har inte bidragit till ny kunskap inom området utan istället bekräftat befintliga teorier om metodjämförelser av analysinstrument för koagulationsundersökningar. Nyttan med denna studie är dock desto större då mätmetoden hos Thrombolyzer Compact X är validerad och resultaten kan användas som grund för vidare kvalitetsutveckling och framtida metodvalidering vid ACS.

Validiteten på undersökningen berättar om hur väl man lyckats mäta det som skall mätas (Olsson & Sörensen 2011, s.124) och om val av undersökningsmetod är relevant (Patel & Davidsson 2011, s.106). Undersökningsmetoden som användes i denna undersökning var kvantitativ, och som utgångspunkt för genomförandet av undersökningen användes en metod speciellt utarbetad för metodjämförelser konstruerad av Westgard (se kapitel 4.1.2 Westgards metod för metodjämförelse). Tack vare denna metod kunde jag arbeta strukturerat och metodiskt för att få svar på mina frågeställningar.

Reliabilitet är graden av överensstämmelse mellan mätningar då man använt samma mätinstrument. Det är ett mått på hur noggrant mätinstrumentet är. I praktiken vill man att det skall bli samma resultat vid varje mätning (Olsson & Sörensen 2011, s.123). För att erhålla hög reliabilitet är det viktigt att man är konsekvent under hela undersökningsprocessen och speciellt vid undersökningens praktiska genomförande. Nedan följer åtgärder och diskussion kring det jag har gjort för att försöka upprätthålla god reliabilitet.

Denna undersökning är reproducerbar i den bemärkelsen att en annan studerande kan uppnå liknande resultat om denne följer samma utgångspunkter för metod och val av analysinstrument. En liten variation kan uppstå då en annan person hanterar det semi-manuella instrumentet STart 4. Resultaten är baserade på ACS patientunderlag och om undersökningen skulle utföras på annan ort skulle detta kunna bidra till en liten variation.

Det intressanta är att man kan se ett mått på respondentens egen repeterbarhet, speciellt då det gäller den interna variationen för STart 4 där instrumentet är semi-manuellt. Om den interna variationen hos STart 4 hade varit hög kunde man antagit att en felkälla var respondentens utförande, d.v.s. pipetteringstekniken, överflyttning av kyvetter i inkubationsskedet eller tillsättandet av reagens.

I efterhand skulle jag gjort beräkningen av den interna variationen annorlunda, då mina mätdata gjorde det komplicerat att räkna ut standardavvikelsen och därför blev det bara en uppskattning av den verkliga standardavvikelsen. Jag skulle istället ha valt att köra ett kontrollprov t.ex. Control Plasma AK upprepade gånger, t.ex. 20 st. upprepade mätningar på vardera analysinstrumentet och därifrån räkna ut standardavvikelsen.

I övrigt har respondenten följt arbetsbeskrivningarna vid ÅCS noggrant och sett till att minimera eventuella felkällor (se kapitel 4.4 Kvalitetsaspekter i utförandet). Innan undersökningen genomförades lästes även bruksanvisningar för användandet av analysinstrumenten igenom för att minska risken att dessa hanterades inkorrekt.

7 Diskussion

Syftet med denna undersökning var att göra en metodjämförelse mellan analysapparaterna Thrombolyzer Compact X och STart 4 i samband med att Thrombolyzer Compact X ersatte STart 4 som rutinmetod vid Ålands centralsjukhus laboratorium. De specifika frågeställningarna löd: ”Kan Thrombolyzer Compact X ersätta STart 4 som rutinmetod för P-TT-INR?”, ”Har instrumenten en signifikant skillnad i mätvärden vad gällande P-TT-INR?” och ”Om det finns en signifikant skillnad, har den i så fall klinisk betydelse?”.

Undersökningens frågeställningar är besvarade genom statistiska analyser som jämför korrelationen och överensstämmelsen mellan analysinstrumenten. Det finns ingen signifikant skillnad mellan instrumenten och metoderna statistiskt, varken en proportionell eller konstant skillnad. Det finns därför heller ingen skillnad som har en klinisk betydelse för patienten. Analysinstrumenten och metoderna är därför utbytbara mot varandra och kan användas omväxlande.

Om det hade funnits en signifikant skillnad mellan metoderna hade en kalibrering av endera metoden varit nödvändig att göra genom att använda regressionsekvationen, en så kallad interkalibrering. Dock skulle det vara svårt att avgöra och fastställa vilken av metoderna som var felaktig då ingen referensmetod finns tillgänglig.

Med denna undersökning har det kartlagts om det finns systematiska fel mellan metoderna och det har även gjorts en uppskattning av analysinstrumentens slumpmässiga variation. Instrumenten är tillförlitliga till sina resultat. Det är dock viktigt att komma ihåg att trots att mätosäkerheten hos analysapparaterna är utforskad, finns det fortfarande förhållanden, som utvidgad mätosäkerhet och biologisk variation hos patienten, som kan ge ett avvikande resultat. Detta måste man ha i åtanke då man bedömer om ett avvikande resultat är verkligt, speciellt vad gällande resultat för P-TT-INR.

Den biologiska variationen är individuell för P-TT-INR, vilket behandlats i kapitel 3.2.2. Som bioanalytiker har man inte tillgång till patientuppgifter då man bedömer ett resultats riktighet, endast tidigare resultat, vilket kan försvåra bedömningen. Då man jämför ett resultat mot ett tidigare resultat är det svårt för en oerfaren bioanalytiker att avgöra om ett avvikande resultat beror på patientens biologiska variation, ändringar i läkemedelsdosering eller om det skett ett fel i analyseringen. Vid sådana tillfällen är det bra om metoden är

validerad och mätfelet uppskattat så att man kan säkerställa att resultatet inte beror på några systematiska fel eller slumpmässig variation hos analysinstrumentet.

När jag sökte bland tidigare forskning som underlag till denna undersökning fanns det endast artiklar och studier med specifika analysinstrument och reagens som användes i studierna. Ingen av undersökningarna hade använt sig av en standardiserad metod och ett standardiserat reagens. Det verkar vara ett problem gällande metoder för koagulationsundersökningar att det inte finns en bestämd referensmetod. Den undersökning jag utförde visar bara att metoderna är utbytbara mot varandra och ingen metod är överlägsen den andra metoden, vilket Tekkesins och Kilincs (2012, s.126) studie även visade.

Den analytiska prestandan för Thrombolyzer Compact X och STart 4 är kartlagd och beträffande denna är dessa två analysinstrument likvärdiga. Dock kan man ta i beaktande andra faktorer vid en jämförelse mellan dessa. Thrombolyzer Compact X är ett helt automatiskt analysinstrument och ger fler fördelar än STart 4, vilket är ett semi-automatiskt instrument.

För det första finns de ekonomiska fördelarna då Thrombolyzer Compact X använder sig av en mindre mängd reagens. Andra fördelar som finns är att arbetsbördan och analystiden minskar då Thrombolyzer Compact X pipetterar reagens och provmaterial automatiskt, inkuberar och mäter på egen hand samt för över resultatet automatiskt till dataprogrammet GSM Analytix 2.0. Med STart 4 måste de flesta steg i analysen göras manuellt förutom själva mätningen vid fibrinbildningen. Resultaten måste även överföras manuellt till datorn från pappersform. Variationer i resultat som uppkommer på grund av den mänskliga faktorn är således nästan helt eliminerade vid användning av Thrombolyzer Compact X.

Att arbeta en längre tid vid STart 4 innebär ett monotont arbete som innefattar en hel del pipettering. Monoton pipettering under en längre tid är en av orsakerna till varför bioanalytiker som yrkesgrupp oftare får problem med axlar och händer än övriga yrkesgrupper (Gerner Björkstén, Almby & Sassarinis Jansson 1994, s. 2-3). Genom att byta ut STart 4 mot Thrombolyzer Compact X försvann det manuella arbetet med pipettering. Detta betyder också att belastningen av arbetstagarnas axlar och händer minskade. På längre sikt förebygger också detta minskade arbetsskador och sjukskrivningar hos arbetstagarna.

Denna undersökning utredde hur bra P-TT-INR-värden erhållna av Thrombolyzer Compact X och STart 4 korrelerade och överensstämde. I nuläget används STart 4 vid antikoagulansmottagningen vid ÅCS och där analyseras patienters INR genom att använda kapillärblod och ThrombotestreagensTM rekonstruerat med destillerat H₂O. Det skulle vara intressant att göra en undersökning för att se hur bra värden för P-TT-INR från Thrombolyzer Compact X och värden för cB- TT-INR från STart 4 överensstämmer. Denna undersökning skulle dock kräva patienternas samtycke och godkännas av en etisk kommitté innan den skulle kunna genomföras.

När jag började göra litteratursökningar till min teoretiska bakgrund började jag med en litteraturkälla från år 1998. Jag insåg snabbt att informationen jag fann där var mycket föråldrad. Vid vidare litteratursökning fann jag att hemostasen, koagulationsbehandling och metodvalidering av analysinstrument för koagulationsundersökningar har varit och är fortfarande heta ämnen under de senaste åren.

Under de senaste åren har forskningen inom dessa områden gått fort fram; nya modeller för koagulationsprocessen har utarbetats, nya upptäckter inom genetiken ger möjlighet till nya antikoagulansläkemedel och möjliggör säkrare behandling med befintliga läkemedel och ny apparatur för koagulationsundersökningar utvecklas. Det skall bli intressant att följa med forskningen som yrkesverksam person för att se vilka möjligheter och framsteg den kommer att ge och göra i framtiden inom området.

Källförteckning

- Advani, A. Theil, K. (2011). *Chronic Myeloproliferative Disorders*. Cleveland: The Cleveland Clinic Foundation.
- <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/chronic-myeloproliferative-disorders/> (hämtad 10.09.13).
- Antus, M. (2013). *Forskning och utveckling med siktet inställt på LP-BA8*. Yrkehögskolan Novia: Opublicerat föreläsningmaterial för utbildningsprogrammet bioanalytik (YH).
- Astermark, J. (2012). Koagulation och koagulopati. Ingår i: G. Gahrton & G. Juliusson (red.), *Blodets sjukdomar- lärobok i hematologi*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Axis- Shield. (2005). *Control Plasma Normal -Produktbeskrivning*. Oslo.
- Axis- Shield. (2007). *ThrombotestTM -Produktbeskrivning*. Oslo.
- Axis- Shield. (2011). *Control Plasma AK -Produktbeskrivning*. Oslo.
- Baudhuin, L. (2009). Warfarin Pharmacogenetics: Ready for Clinical Utility? *Clinical Laboratory Science* 22:151-155.
- Behnk Elektronik. (2011). *Thrombolyzer Compact X- Instructions for use. V.01*.
- Behnk Elektronik. (2013). *Fully automated systems- Thrombolyzer Compact X*. <http://www.behnk.de/english/pages/prod-compactx-01.html> (hämtad 10.9.13)
- Bilic-Zulle, L. (2011). Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica* 21:49-52.
- Björk, J. (2010). *Praktisk statistik för medicin och hälsa*. Stockholm: Liber AB.
- Björkqvist, S. Kastus, L.(2013). *Thrombolyzer Compact X- Handhavandebeskrivning v. 1.0*. Mariehamn: Ålands centralsjukhus laboratorium. Opublicerat material.
- Chan, Anthony K.C. Paredes, N. (2013). The Coagulation System in Humans. *Haemostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 992:3-12.
- Crighton, G. (2013). Methods of Coagulation. *Haemostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 992:73-83.

Diagnostica Stago. (2003). *User manual-Start 4.V. 1.2.*

Ejlertsson, G. (2003). *Statistik för hälsovetenskaperna*. Lund: Studentlitteratur.

Fakhri, R-H. Janket, S-J. Jackson, E.A. Baird, A.E. Dinnocenzo, R. Meurman, J.H. (2013). Tutorial in oral antithrombotic therapy: Biology and dental implications. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2013 May 1;18(3):461-472.

FASS. (2012). *Warfarin Orion*.

http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produktsida.jsp?NplID=20090803000035&DocTypeID=3&UserTypeID=0 (hämtat 20.5.2013).

Favaloro, E.J. Funk, D.M. Lippi, G. (2012). Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis. *Labmedicine* 43: 1-7.

Fimea. FPA. (2012). *Suomen lääketilasto 2011*. Helsingfors. http://www.fimea.fi/download/22707_SLT_2011_net.pdf (hämtad 26.3.2013)

Finlands hjärtförbund r.f. (2012). *Marevanbehandling*. Helsingfors.

Fritsma, G. (2013). Anticoagulant Therapy Overview. *Clinical Laboratory Science* 26:39-42.

Ganrot, P O. Tryding, N. (2003) Kliniska laboratorieundersökningar. Ingår i: Nilsson-Ehle, P (red). *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. (8:nde uppl.). Lund: Studentlitteratur AB.

Gerner Björkstén, M. Almby, B. Sassarinis Jansson, E. (1994). *Hand and shoulder ailments among laboratory technicians using modern plunger-operated pipettes*. http://id.mt.com/dam/RAININ/PDFs/ErgoPapers/tr2001_8.pdf (hämtad 17.9.13)

Hillarp, A. Dahlbäck, B. Strandberg, K. (2012). Koagulationsrubbningar. Ingår i: Nilsson-Ehle, P. (red). *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. (9:nde uppl.). Lund: Studentlitteratur AB.

Hillarp, A. Stenflo, J. (2003). Hemostas. Ingår i: Nilsson-Ehle, P (red). *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. (8:nde uppl.). Lund: Studentlitteratur AB.

Ignjatovic, V. (2013). Protrombin Time/ International Normalized Ratio. *Haemostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 992:121-129.

- Jensen, A.L. Kjelgaard-Hansen, M. (2006). Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology* 35 No.3: 276-285.
- Kannas, L. Eskola, K. Räsänen, P. Mustajoki, P. (2007). *Hälsokunskap för gymnasiet 1-2*. Helsingfors: Schildts.
- Larsson, S. (2005). Om kvalitet i kvalitativa studier. *Nordisk pedagogik* (25), 1, 16-35. <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:245080/FULLTEXT01.pdf> (hämtad 17.9.13).
- Lassila, R. (2011). Kvaliteten av antikoagulansbehandling kan bli bättre. *Sic*, 4/11. Fimea.
- Linden, M. D. (2013). Platelet Physiology. *Haemeostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 992:13-30.
- Linnet, K. Boyd, J.C. (2008). Selection and Analytical Evaluation of Methods With Statistical Techniques. In: Bruns, D.E. Bustis, C.A. Ashwood, E.R (ed). *Tietz-Fundamentals of Clinical Chemistry* (6:th ed.) Missouri: Saunders.
- McCraw, A. Hillarp, A. Echenagucia, M. (2010). Considerations in the laboratory assessment of haemostasis. *Haemophilia* v. 16 2010: 74-78.
- McGlasson, D. (2013). Monitoring Coumadin- The Original Oral Anticoagulant. *Clinical Laboratory Science* 26:43-47
- Medicalc. (2013) *Bland- Altman plot*. <http://www.medcalc.org/manual/blandaltman.php> (hämtad 10.9.13).
- Myles, P.S. Cui, J. (2007). Using the Bland- Altman method to measure agreement with repeated measures. *British Journal of Anaesthesia* 99: 309-310.
- Olsson, H. Sörensen, S. (2011). *Forskningsprocessen- Kvalitativa och kvantitativa perspektiv*. Stockholm: Liber AB.
- Orion Pharma AB. (u.å.). *Patientinformation- Till dig som behandlas med Warfarin Orion*. Sollentuna.
- Paredes, N. Chan, A. (2013). The Role of the Vessel Wall. *Haemostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 992:31-46.
- Patel, R. Davidson, B. (2011). *Forskningsmetodikens grunder- Att planera, genomföra och rapportera en undersökning*. Lund: Studentlitteratur AB.

- Preston, F.E. Lippi, G. Favaloro, E.J. Jayandharan, G.R. Edison, E.S. Srivastava, A. (2010). Quality issues in laboratory haemostasis. *Haemophilia* 16:93-99.
- Rane, A. Lindh, J. (2010). Pharmacogenetics of Anticoagulants. *Human Genomics and Proteomics* 2010:1-7.
- Rodak, B.F. Carr, J.H. (2013). *Clinical Hematology Atlas (Forth edition)*. St. Louis, Missouri: Saunders.
- Saah, A.J. Hoover, D.R. (1997). "Sensitivity" and "Specificity" Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings. <http://annals.org/article.aspx?articleid=710264> (hämtad 25.9.2013)
- Sand, O. Oystein V. Sjaastad. Haug, E. Bjålie, G J. (2006). *Människokroppen- Fysiologi och anatomi*. (2:ndra uppl.). Oslo: Liber.
- Schulman, S. (2012). Trombos och emboli. Ingår i: G. Gahrton & G. Juliusson (red.), *Blodets sjukdomar- lärobok i hematologi*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Simonsen, F. (2005). *Analysteknik- Instrument och metoder*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Stago. (2013). *Instruments- START® HEMOSTASIS ANALYZER*. <http://www.stago-us.com/products-services/catalog/instruments/product-sheets/selection/type-analyzers/reference/start-hemostasis-analyzer/> (hämtad 10.9.2013).
- Stang, L.J. Mitchell, L.G. (2013). Specimen Requirements for the Haemostasis Laboratory. *Haemostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 992:49- 71.
- Tekkesin, N. Kilinc, C. (2012). Optical and Mechanical Clot Detection Methodologies: A Comparison Study for Routine Coagulation Testing. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 26: 125-129.
- Theodorsson, E. Grankvist, K. Nilsson- Ehle, P. (2012 a). Laboratoriets verksamhet. Ingår i: Nilsson- Ehle, P. (red.), *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin.(9:nde uppl.)*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Theodorsson, E. Grankvist, K. Nilsson- Ehle, P. (2012 b). Tolkning av analysresultat. Ingår i: Nilsson- Ehle, P. (red.), *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin. (9:nde uppl.)*. Lund: Studentlitteratur AB.

Tran, R. Myers, D R. Ciciliano, J. Hardy Trybus, E L. Sakurai, Y. Ahn, B. Qui, Y. Mannino, R G. Fay, M E. Lam, W A. Biomechanics of haemostasis and thromobsis in health and disease: from the macro- to molecular scale. *J. Cell. Med. Vol. XX. 2012: s-1-18*.

Turgeon, Mary L. (ed.) (1998). *Clinical Hematology- Theory and Procedures*. (3:dje uppl.). Philadelphia: Lippncott Williams and Wilkins.

Virjo, I. Mäkela, K. Aho, J. Kalliola, P. Kurunmäki, H. Uusitalo, L. Valli, M. Ylinen, S. (2010). Who receives anticoagulant treatment with warfarin and why? A population-based study in Finland. *Scandinavian Journal of Primary Health Care* 28, 237-241.

Wadenwik, H. (2012). Trombocyter och trombocytopeni. Ingår i: G. Gahrton & G. Juliusson (red.), *Blodets sjukdomar- lärobok i hematologi*. Lund: Studentlitteratur AB.

Westgard, J.O. (2008). *The Comparison of Methods Experiment*. www.westgard.com/lesson23.htm (Hämtad 4.6.2013)

Young, D.S. Bermes, E.W. Haverstick, D.M. (2008). Specimen Collection and Other Preanalytical Variables. In: Bruns, D.E. Bustis, C.A. Ashwood, E.R (ed). *Tietz-Fundamentals of Clinical Chemistry* (6:th ed.) Missouri: Saunders.

Ørn, S. (2007). Läkemedel vid hjärt- och kärlsjukdomar. Ingår i: H. Nordeng& O. Springset. (red.), *Farmakologi och farmakologisk omvårdnad*. Lund: Studentlitteratur AB.

Tabell över rådata

ProvID	Thrombolyzer Compact X(INR)	ST art 4 (INR)	Differens (INR)	Medelvärde (INR)
1	2,25	2,44	-0,19	2,345
2	2,11	2,19	-0,08	2,15
3	3,19	3,27	-0,08	3,23
4	2,23	2,33	-0,1	2,28
5	2,07	2,04	0,03	2,055
6	1,99	2,11	-0,12	2,05
7	2,77	2,76	0,01	2,765
8	1,49	1,37	0,12	1,43
9	1,97	1,89	0,08	1,93
10	0,97	0,93	0,04	0,95
11	1,86	1,9	-0,04	1,88
12	2,13	2,41	-0,28	2,27
13	2,51	2,96	-0,45	2,735
14	1,83	1,87	-0,04	1,85
15	2,14	2,17	-0,03	2,155
16	2,41	2,5	-0,09	2,455
17	2,46	2,57	-0,11	2,515
18	3,17	3,28	-0,11	3,225
19	2,25	3,01	-0,76	2,63
20	2,47	2,8	-0,33	2,635
21	5,15	5,95	-0,8	5,55
22	1,12	1,12	0	1,12
23	2,06	2,17	-0,11	2,115
24	2,55	2,76	-0,21	2,655
25	2,62	2,74	-0,12	2,68
26	2,21	2,17	0,04	2,19
27	3,27	3,32	-0,05	3,295
28	3,78	3,94	-0,16	3,86
29	5,1	5,02	0,08	5,06
30	2,67	2,84	-0,17	2,755
31	2,34	2,49	-0,15	2,415
32	3,01	3,07	-0,06	3,04
33	2,86	2,74	0,12	2,8
34	2,23	2,23	0	2,23
35	1,02	1,01	0,01	1,015
36	1,79	1,75	0,04	1,77
37	1,91	1,96	-0,05	1,935
38	0,94	0,93	0,01	0,935
39	2,01	2,04	-0,03	2,025
40	1,69	1,79	-0,1	1,74

41	3,32	3,35	-0,03	3,335
42	2,52	2,42	0,1	2,47
43	1,06	1,04	0,02	1,05
44	2,51	2,64	-0,13	2,575
45	2,11	2,14	-0,03	2,125
46	2,13	2,24	-0,11	2,185
47	1,31	1,32	-0,01	1,315
48	0,91	0,9	0,01	0,905
49	3,64	3,73	-0,09	3,685
50	3,03	3,16	-0,13	3,095
51	2,01	1,96	0,05	1,985
52	0,91	0,9	0,01	0,905
53	0,94	0,93	0,01	0,935
54	2,11	2,21	-0,1	2,16
55	2,79	2,87	-0,08	2,83
56	3,34	3,33	0,01	3,335
57	2,89	2,95	-0,06	2,92
58	2,37	2,59	-0,22	2,48
59	1,46	1,49	-0,03	1,475
60	2,51	2,62	-0,11	2,565
61	2,77	2,91	-0,14	2,84
62	3,22	3,15	0,07	3,185
63	2,07	2,15	-0,08	2,11
64	3,08	3,09	-0,01	3,085
65	3,51	3,42	0,09	3,465
66	2,52	3,19	-0,67	2,855
67	1,83	1,81	0,02	1,82
68	0,99	0,93	0,06	0,96
69	1,22	1,23	-0,01	1,225
70	3,09	2,92	0,17	3,005
71	2,8	2,73	0,07	2,765
72	3,61	3,67	-0,06	3,64
73	2,31	2,57	-0,26	2,44
74	2,69	2,62	0,07	2,655
75	0,94	0,88	0,06	0,91
76	4,02	4	0,02	4,01
77	1,47	1,48	-0,01	1,475
78	1,24	1,47	-0,23	1,355
79	2,34	2,1	0,24	2,22
80	2,6	2,77	-0,17	2,685
81	2,05	2,13	-0,08	2,09
82	2,51	2,49	0,02	2,5
83	2,87	2,76	0,11	2,815
84	2,6	2,58	0,02	2,59
85	2,49	2,55	-0,06	2,52
86	1,86	2,07	-0,21	1,965

87	2,26	2,34	-0,08	2,3
88	1,73	1,7	0,03	1,715
89	2,44	2,34	0,1	2,39
90	2,83	3,36	-0,53	3,095
91	2,43	2,42	0,01	2,425
92	2,98	2,92	0,06	2,95
93	1,64	1,57	0,07	1,605
94	2,15	2,22	-0,07	2,185