



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö

Fakulteten för hälso- och livsvetenskap

Examensarbete

Utvärdering av BD Vacutainer[®] Rapid Serum Tube vid analys av S-Paracetamol och S-Etanol



Författare: Filippa Bild

*Ämne: Biomedicinsk
laboratorievetenskap*

Nivå: Grundnivå

Nr: 2014:BL5

Utvärdering av BD Vacutainer® Rapid Serum Tube vid analys av S-Paracetamol och S-Etanol

Filippa Bild

Examensarbete i biomedicinsk laboratorievetenskap, 15 högskolepoäng

Filosofie Kandidatexamen

Extern handledare:

Ingvar Rydén

Med Dr, PhD

Länsenheten för Klinisk kemi

Kalmar Länssjukhus

SE-391 85 Kalmar

Intern handledare:

Susanne Widell

Dr Med Vet

Institutionen för kemi och biomedicin

Linnéuniversitetet

SE-391 82 Kalmar

Examinator:

Maria Mattsson

Dr Med Vet

Institutionen för kemi och biomedicin

Linnéuniversitetet

SE-391 82 Kalmar

Examensarbetet ingår i Biomedicinska analytikerprogrammet, 180 högskolepoäng

SAMMANFATTNING

Avdelningen för klinisk kemi vid Länssjukhuset i Kalmar analyserar läkemedel och alkoholer med BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tube (Serum Tube), som kräver en koagulationstid i upp till 60 minuter. BD Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST™) innehåller trombin och kräver en koagulationstid på endast 5 minuter. Syftet med studien var att undersöka möjligheten att förkorta den preanalytiska väntetiden före centrifugering vid intoxikationsanalyser i serumrör från akutmottagningen. Studien utfördes genom att jämföra RST™ med Serum Tube vid analys av S-Paracetamol och S-Etanol. Totalt analyserades 70 prover för S-Paracetamol, varav 35 RST™ och 35 Serum Tube från 35 patienter. Analys av S-Etanol utfördes på 60 prover, varav 30 RST™ och 30 Serum Tube från 30 patienter. RST™ centrifugerades efter 5 minuter och Serum Tube efter 50 minuter, före kolorimetrisk analys på analysinstrumentet VITROS® 5,1 FS. Resultaten för S-Paracetamol var inom intervallet 74,9 – 198,7 µmol/L för RST™ och inom 76,6 – 195,3 µmol/L för Serum Tube. Resultaten för S-Etanol var inom intervallet 7,5 – 74,5 mmol/L för RST™ och inom 7,5 – 74,8 mmol/L för Serum Tube. Pearsons korrelationskoefficient var 0,9977 för S-Paracetamol och 0,9980 för S-Etanol och det fanns en liten positiv bias vid analys med RST™ för båda analyterna, men ingen signifikant skillnad ($p > 0,05$) mellan provrören påvisades. Användning av RST™ på akutmottagningen medför en förkortad preanalytisk väntetid och en snabbare turnaround time (TAT). Hypotesen att S-Paracetamol och S-Etanol kan analyseras med RST™ på VITROS® 5,1 FS stämmer, med undantag för höga koncentrationer av S-Paracetamol som inte kunde utvärderas. För att RST™ ska kunna användas rutinmässigt bör därför ytterligare studier utföras.

Nyckelord

Turnaround time, RST™, Paracetamol, Etanol

ABSTRACT

The Laboratory of Clinical Chemistry at Kalmar County Hospital uses BD Vacutainer[®] Plus Plastic Serum Tube (Serum Tube) when analyzing drugs and alcohols, a blood collection tube demanding a clotting time of up to 60 minutes. BD Vacutainer[®] Rapid Serum Tube (RST[™]) contains thrombin, demanding a clotting time of only 5 minutes. The purpose of this study was to evaluate the possibility of shortening the pre-analytic waiting time before centrifugation, when testing analytes involved in suspected intoxication on patients in the emergency department. The study was performed by comparing RST[™] with Serum Tube when analyzing S-Paracetamol and S-Ethanol. Blood samples were collected from 35 patients for analysis of S-Paracetamol (35 RST[™] and 35 Serum Tubes) and from 30 patients for analysis of S-Ethanol (30 RST[™] and 30 Serum Tubes). RST[™] was centrifuged after 5 minutes and Serum Tube after 50 minutes, prior to colourimetric analysis on the analytical instrument VITROS[®] 5,1 FS. The results for S-Paracetamol were between 74.9 – 198.7 µmol/L for RST[™] and between 76.6 – 195.3 µmol/L for Serum Tube. The results for S-Ethanol were between 7.5 – 74.5 mmol/L for RST[™] and between 7.5 – 74.8 mmol/L for Serum Tube. Pearson's correlation coefficient was 0.9977 for S-Paracetamol and 0.9980 for S-Ethanol. There was a small positive bias with RST[™] for both analytes, but there was no significant difference ($p>0.05$) between the collection tubes for either analyte. Use of RST[™] in the emergency department leads to a shortened pre-analytic waiting time and a faster turnaround time (TAT). The hypothesis that S-Paracetamol and S-Ethanol can be analyzed with RST[™] on VITROS[®] 5,1 FS is correct, with the exception of high concentrations of S-Paracetamol which could not be evaluated. If RST[™] is to be used routinely further investigation is needed.

Keywords

Turnaround time, RST[™], Paracetamol, Ethanol

FÖRKORTNINGAR

| | |
|------------------|---|
| AAA | Arylacylamidas |
| ADH | Alkoholdehydrogenas |
| ALDH | Aldehyddehydrogenas |
| CYP | Cytokrom P-450 |
| CV % | Variationskoefficient i procent |
| NAD ⁺ | Nikotinamid-adenindinukleotid |
| NAPQI | N-acetylbenzokinonimin |
| NOS | Reaktiva kväveföreningar |
| ROS | Reaktiva syreföreningar |
| RST™ | BD Vacutainer® Rapid Serum Tube |
| Serum Tube | BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tube |
| SD | Standardavvikelse |
| TAT | Turnaround time |
| THQ | 1-3-sulfopropyl-1,2,3,4-tetrahydrokinolin |
| TRIS | Tris(hydroxymetyl)aminometan |

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

| | |
|--|----|
| INTRODUKTION | 1 |
| BD Vacutainer® Rapid Serum Tube | 1 |
| Paracetamol | 1 |
| <i>Farmakodynamik</i> | 2 |
| <i>Farmakokinetik</i> | 2 |
| <i>Paracetamolförgiftning</i> | 2 |
| Etanol | 3 |
| <i>Centrala nervsystemet</i> | 4 |
| <i>Metabolism</i> | 4 |
| <i>Negativa effekter</i> | 5 |
| <i>Etanolförgiftning</i> | 5 |
| VITROS® 5,1 FS | 6 |
| <i>Analysprincip för S-Paracetamol</i> | 6 |
| <i>Analysprincip för S-Etanol</i> | 7 |
| Kvalitetssäkring | 8 |
| <i>Akreditering</i> | 8 |
| Syfte | 9 |
| MATERIAL OCH METODER | 9 |
| Patienter och prover | 9 |
| Interna kontroller | 9 |
| Analys av S-Paracetamol | 10 |
| Analys av S-Etanol | 10 |
| Interferensmätning | 10 |
| Statistik | 10 |
| Etik | 11 |
| RESULTAT | 11 |
| Interna kontroller | 11 |
| S-Paracetamol | 11 |
| S-Etanol | 13 |
| DISKUSSION | 15 |
| Slutsats | 18 |
| TACK | 19 |
| REFERENSER | 20 |
| BILAGA I | |
| BILAGA II | |

INTRODUKTION

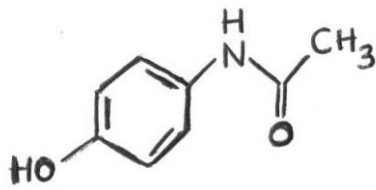
Turnaround time (TAT) kan definieras som tiden det tar från provtagning till dess provet analyserats och besvarats från ett kliniskt laboratorium (1). TAT kan även inkludera tiden det tar till dess läkaren tittar på provsvaret i journalen och eventuellt inleder eller ändrar patientens behandling (2). Snabba analysresultat gynnar både läkare som patient och särskilt viktigt är det på akutmottagningar och intensivvårdsavdelningar. Att förbättra de olika delarna i analyskedjan kan vara komplicerat, men ett alternativ för kliniska laboratorier är att analysera plasma och helblod i större utsträckning än serum (3). Användning av provrör innehållande antikoagulantia för analys på plasma innebär att centrifugering kan utföras omgående efter provtagning, till skillnad från vanliga serumrör. Serum erhålls vid centrifugering av koagulerat helblod, vilket uppstår när trombocytterna aktiverats, aggregerat och koagulationskaskaden utlösts (4). Avdelningen för klinisk kemi och transfusionsmedicin vid Länssjukhuset i Kalmar analyserar läkemedel och alkoholer med BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tube (Serum Tube). Serum Tube från Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey) är ett rör för venös provtagning innehållande silikon och silikapartiklar, vilka fungerar som koagulationsaktivator. Serum Tube kräver koagulation av blodet i upp till 60 minuter före centrifugering för att erhålla serum (5). Koagulationsprocessen är tidskrävande och hur lång tid koagulationen tar beror på eventuell tillsats i provröret (4).

BD Vacutainer® Rapid Serum Tube

År 2010 lanserades BD Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST™), ett rör för venös provtagning innehållande en trombinbaserad koagulationsaktivator samt en gel. Gelen består av en polyesterbaserad formel med inaktiva komponenter och agerar separator mellan erythrocyter och serum efter centrifugering (5). Trombin aktiverar trombocyter och omvandlar fibrinogen till fibrin, som bildar ett olösligt nätverk av fibrintrådar. Trombin aktiverar dessutom koagulationsfaktorerna V, VIII och XI i koagulationskaskaden (6). Tillsats av trombin i provröret ska därför medföra att blodet endast behöver koagulera i 5 minuter före centrifugering. Användning av RST™ istället för Serum Tube ska således medföra en förkortad TAT vid analys på serum (5).

Paracetamol

Paracetamol är den aktiva substansen i vissa analgetiska (smärtlindrande) och antipyretiska (febernedsättande) läkemedel, bland annat Alvedon® och Panodil®. Det kemiska namnet för paracetamol är *N*-acetyl-*p*-aminofenol men substansen benämns även acetaminofen, se Figur 1 (7).



Figur 1 Strukturformel för paracetamol.
Illustration av Filipa Bild[©].

Farmakodynamik

Paracetamols analgetiska och antipyretiska effekter grundas i olika farmakologiska mekanismer. Dessa mekanismer har tidigare varit okända men flera anses nu vara fastställda (8). Paracetamol uppvisar selektivitet för cyklooxygenas (COX-1 och COX-2) och inhiberar dess funktion som peroxidas, genom att oxideras och agera substrat för enzymet. Paracetamol inhiberar därigenom syntesen av prostaglandiner, faktorer som är associerade med smärta, feber och inflammation. Paracetamol har även förmågan att inhibera andra enzym, däribland myeloperoxidase (MPO) som finns i neutrofila granulocyter och i viss utsträckning även i monocyter (8). MPO katalyserar bildandet av hypokloritsyra, som är involverad vid skador på vävnader utsatta för akut eller kronisk inflammation. Paracetamol har även en anti-inflammatorisk effekt, men är inte jämbördig med icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAIDs), vilka dessutom är effektivare analgetikum. Dock anses paracetamol mer tolerabelt i terapeutiska doser och orsakar oftast inte gastrointestinalt obehag eller andra oönskade effekter (8).

Farmakokinetik

Paracetamol administreras vanligtvis peroralt, vilket innebär att substansen absorberas från mag-tarmkanalen (9). Paracetamol är en liten, hydrofil molekyl som passivt diffunderar mellan och genom epitelcellerna (10). Huvuddelen av absorptionen sker i tunntarmen, varifrån paracetamol transporteras med blodet i *vena portae* till leverns hepatocyter där förstapassagemetabolismen sker (9). Den största delen paracetamol konjugeras till glukuronsyra och sulfat, men enstaka procent av substansen utsöndras i oförändrad form med urinen (6, 9). Vid administration av paracetamol peroralt sker ett snabbt upptag från tarmen, vilket leder till en maximal koncentration av substansen i plasma inom 30 – 60 minuter (6, 7). Eftersom upptaget av paracetamol främst sker i tunntarmen är tiden för absorption beroende av magsäckstömningen och varierar således mellan individer. Absorptionen varierar därmed även vid samtidigt födointag (11).

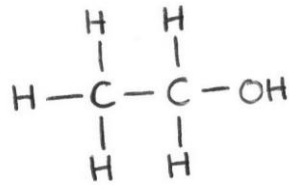
Paracetamolförgiftning

Vid förstapassagemetabolismen i levern oxideras en mindre del paracetamol via enzystemet cytokrom P-450 (CYP) och den reaktiva metaboliten

N-acetylbenzokininimin (NAPQI) bildas (6, 12). NAPQI är toxisk för hepatocyterna, men vid terapeutiska doser konjugeras metaboliten till glutation. Vid överdosering av paracetamol förbrukas glutation och NAPQI binder istället kovalent till makromolekyler i hepatocyterna, framförallt till proteiner med nekros som följd (9, 13). Ett antal faktorer och komplexa mekanismer samverkar dock till att nekros uppstår och att levern skadas, vilket i värsta fall kan leda till akut leversvikt. Dessa mekanismer inkluderar förlust av glutation, vilket leder till oxidativ stress och en ökad förekomst av reaktiva kväve- och syreföreningar (NOS respektive ROS). Förändring i permeabilitet hos mitokondriernas innermembran medför sannolikt att den oxidativa stressen ökar och att kalciumhomeostasen påverkas. Mitokondrierna förlorar dessutom förmågan att syntetisera adenosintrifosfat (ATP), vilket i sin tur medför att nekros uppstår (13). Intoxikation orsakad av paracetamol behandlas med N-acetylcystein, som ovandlas till glutation i hepatocyterna. N-acetylcystein detoxifierar NAPQI direkt, men påverkar indirekt även mitokondriernas innermembranpermeabilitet och minskar den oxidativa stressen (9, 13). Antidotet bör administreras intravenöst och innan glutationreserverna förbrukats, eftersom det minskar risken för en bestående leverskada. Baserat på koncentrationen av paracetamol i blodet bedömer den kliniskt ansvarige läkaren om behandling krävs eller inte. Är koncentrationen över 1000 $\mu\text{mol/L}$ efter fyra timmar (sedan intaget läkemedel), över 700 $\mu\text{mol/L}$ efter sex timmar eller över 450 $\mu\text{mol/L}$ efter nio timmar insätts antidot. Om tidpunkten för intaget läkemedel inte är känd fastställs koncentrationen vid två tillfällen med några timmars mellanrum (9). Halveringstiden för paracetamol i blodet är i normala fall ungefär två timmar, men ökar vid en förgiftning (6). En halveringstid på över fyra timmar innebär en stor risk för leverskada och skadans svårighetsgrad ökar vid en lång halveringstid (6, 9). Behandling med N-acetylcystein ska inledas inom 24 timmar efter intag, därefter uppvisas ingen effekt. En allvarlig förgiftning ger sällan symtom under det första dygnet, vilket innebär att när symtomen väl uppstår under det andra eller tredje dygnet är det för sent att behandla. Magsmärtor indikerar leverskada och vid provtagning för analys av leverfunktionsprover påvisas höga värden för alaninaminotransferas (ALAT), aspartataminotransferas (ASAT), bilirubin och protrombintid (NT), (9). Toxisk dos för vuxna är ungefär 10 g paracetamol, men den kan variera beroende på samtidigt alkoholmissbruk, dehydrering, undernäring, Gilberts syndrom eller aids (6).

Etanol

Etanol är den mest förekommande alkoholen och ingår i de alkoholhaltiga drycker som konsumeras i stora mängder världen över, se Figur 2. Etanol påverkar det centrala nervsystemet, vilket initialt leder till eufori och berusning men därefter till försämrad aktivitet i hjärnan, dålig koordination och beteendeförändringar (14).



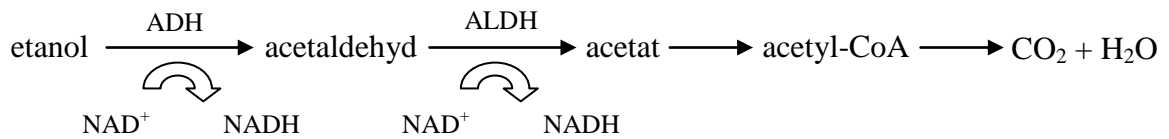
Figur 2 Strukturformel för etanol.
Illustration av Filippa Bild®.

Centrala nervsystemet

Etanol påverkar syntesen, frisättningen och signaleringen av neurotransmittorer som serotonin, glutamat, gamma-amino-smörtsyra (GABA) och endocannabinoider samt receptorerna dit transmittorer binder (14). Exempelvis genom att samverka med receptorn för GABA. När GABA binder till receptorn öppnas en jonkanal för kloridjoner att passera genom. Etanol binder till en receptor som är associerad till GABA-receptorn, vilket medför att jonkanalen öppnas ytterligare och fler kloridjoner passerar in i nervcellen. Den ökade strömmen av kloridjoner innebär att spänningsskillnaden mellan cellens ut- och insida ökar och nervcellen kräver ett kraftigare stimuli för att exciteras. Därmed försvagar etanol överföringen av signaler i det centrala nervsystemet (9).

Metabolism

Etanols effekt på olika vävnader beror på koncentrationen av alkoholen i blodet. Efter oralt intag absorberas etanol via passiv diffusion, en femtedel genom väggen i magsäcken och den resterande delen genom epitelcellerna i tunntarmen (14, 15). Etanol elimineras främst genom metabolism, men en liten del avlägsnas via utandning, svett och urin. Huvuddelen av metabolismen sker i levern, genom att etanol oxideras av alkoholdehydrogenas (ADH), aldehyddehydrogenas (ALDH), cytokrom P-450 2E1 (CYP2E1) och katalasenzym (14). Hos individer som enbart intar en liten eller måttlig mängd alkohol oxideras etanol till acetaldehyd i en reversibel reaktion katalyserad av ADH. På grund av hög affinitet för etanol och låg kapacitet blir ADH snabbt mättat vid fortsatt intag, vilket medför att acetaldehyd oxideras till acetat i en irreversibel reaktion katalyserad av ALDH. Vid båda dessa reaktioner används kofaktorn nikotinamid-adeninukleotid (NAD^+), som reduceras till NADH vid oxidationen av etanol. Acetat i aktiverad form benämns acetyl-CoA, ett ämne som metaboliseras till ketonkroppar, aminosyror, fettsyror och steroider. När acetyl-CoA oxideras i citronsyracykeln bildas koldioxid och vatten, vilka är de slutliga produkterna från metabolismen av etanol, se reaktionssekvenser nedan (14, 15).



CYP2E1 finns i hepatocyternas mikrosomer i det endoplasmatiska nätverket och oxiderar etanol till acetaldehyd vid förhöjda koncentrationer, det vill säga hos individer som intar etanol regelbundet. Denna reaktion kräver syre och nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat (NADPH), som reduceras till NADP vid bildningen av vatten. I peroxisomerna finns enzymet katalas, som kan oxidera en liten del av etanolen till acetaldehyd i närvaro av väteperoxid (H₂O₂) (14, 15).

Negativa effekter

Den största konsekvensen av ett högt alkoholintag under en lång tid är utveckling av fibros, cirros eller cancer i levern. Acetaldehyd och acetat är skadliga metaboliter för kroppens vävnader. När ALDH mättats frisätts acetaldehyd, vilket negativt påverkar lipider, proteiner och nukleinsyror. Mitokondriernas struktur och funktion i lever och hjärta påverkas, med försämrad respiration och sänkta nivåer av ATP till följd av minskad aktivitet i elektrontransportkedjan. Sannolikt ökar även produktionen av ROS och NOS, på grund av ökad aktivitet av CYP2E1. ROS påverkar permeabiliteten hos mitokondriernas yttre- och innermembran, vilket kan medföra ett ökat inflöde av joner och vatten. En samtidig frisättning av cytokrom c leder till aktivering av kaspaser och fragmentering av DNA, vilket inducerar apoptos (14). Vid kroniskt etanolintag minskar även hepatocyternas nivåer av glutation, vilket innebär att levern blir känsligare för oxidativ skada, exempelvis vid intag av läkemedel (13, 14). Höga koncentrationer av etanol skadar även mag-tarmkanalen, bland annat genom nekros av mucosa, sårbildning och påverkan på mitokondriernas funktion likt i lever och hjärta (14).

Etanolförgiftning

Etanol absorberas snabbt, särskilt om det intas på fastande mage (6, 9). Hur mycket alkohol som en individ klarar av beror på ett antal faktorer, inklusive kön, vikt och leverfunktion (15). Generellt gäller att en etanolkoncentration på 6 – 11 mmol/L utövar en hämmande effekt på motoriken, medan en koncentration på 20 – 25 mmol/L medför mer avtrubbade psykiska funktioner, bristande uppmärksamhet och försämrad tankegång. En koncentration på 45 – 60 mmol/L leder till illamående, kräkningar och en uppenbar berusning med märkbart okoordinerade rörelser. Vid en koncentration på 65 – 90 mmol/L är andningscentrum påverkat och individen fullständigt redlös. En koncentration över 100 mmol/L medför andningsförlamning och kan således vara dödlig, men enstaka individer har överlevt med högre koncentrationer i blodet (6). Behandling av en etanolförgiftning varierar beroende på symtom och svårighetsgrad. Patienten observeras, för att upptäcka

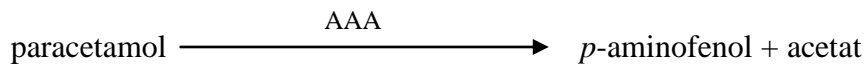
andningssvårigheter och således förhindra kvävning. En medvetlös patient läggs i stabilt sidoläge och vid en mycket hög etanolkoncentration kan hemodialys övervägas (16). Hemodialys innebär rening av blodet via passiv diffusion av det giftiga ämnet till en dialysvätska (9). I vissa fall kan även tömning eller sköljning av magsäcken utföras för att avlägsna en del av etanolen från kroppen (17).

VITROS[®] 5,1 FS

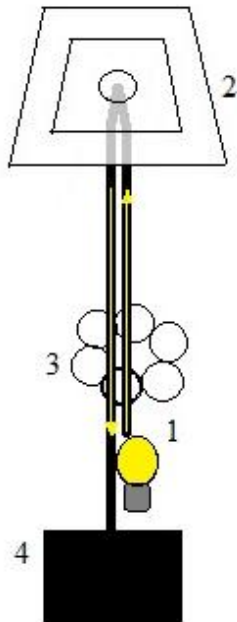
VITROS[®] 5,1 FS kemisystem från Ortho-Clinical Diagnostics (Rochester, New York) är ett helautomatiskt analysinstrument som används för kvantitativ mätning av ett femtiotal analyter i plasma, serum, urin, cerebrospinalvätska och helblod. Analysmetoder som instrumentet tillämpar är både torrkemiska (enzymatiska, kolorimetriska, potentiometriska) och våtkemiska (turbidimetriska, spektrofotometriska). Vid våtkemi används MicroTips, då provet blandas med reagens i vätskeform i en kyvett och inkuberas under en viss tid beroende på analyt. Med en spektrofotometer avläses absorptionsen vid olika tidsintervall och omvandlas till en koncentration, utifrån kalibrering och en, för metoden, lämplig matematisk modell. Vid torrkemi används MicroSlides, vilket innebär flerskiktsreagens på en stödbas av polyester. MicroSlides har storleken av ett frimärke och förpackas i svarta kassetter. En droppe prov (5 – 11 µl beroende på analyt) fördelas jämnt över sliden och det sker en kemisk reaktion mellan analyten och reagensen i skikten. Därefter mäts en färgutveckling spektrofotometriskt vid en specifik våglängd och är proportionell mot en koncentration eller enzymaktivitet. Instrumentet kräver underhåll för att fungera optimalt. Dagligen utförs byte av ERF-behållare som används till potentiometriska analyser, rengöring av spetsen och hylsan för ERF, tömning av avfall för MicroSlides och engångsmaterial, uppmättningsunderhåll samt analysering av interna kontroller. Påfyllnad av reagens, pipettspetsar och kyvetter utförs under dagen vid behov. En gång i veckan utförs ett noggrannare underhåll, vilket bland annat innebär rengöring av provförråd, sensorer, spetsförseglare, tangentbord och monitor. En gång i månaden utförs ett än mer grundligt underhåll av instrumentet, av laboratoriets ingenjörer (18).

Analysprincip för S-Paracetamol

Analysprincipen för S-Paracetamol på VITROS[®] 5,1 FS är kolorimetri (18). Analysen utförs på serum med VITROS[®] ACET MicroSlides. En droppe prov appliceras på sliden, fördelas över spridningsskiktet och tränger ner till underliggande skikt. I reagensskiktet finns arylacylamidas (AAA), 1-3-sulfopropyl-1,2,3,4-tetrahydrokinolin (THQ), kaliumferricyanid och en buffert (pH 7,5). AAA katalyserar reaktionen då paracetamol hydrolyseras till *p*-aminofenol och acetat bildas. *P*-aminofenol oxideras av ferricyanid, sammankopplas med THQ och det sker en röd färgutveckling, se reaktionssekvenser nedan (18).



Färgens reflektionstäthet analyseras genom slutpunktsmätning med reflektansspektrofotometri vid 670 nm efter en inkubationstid, se Figur 3. Färgens reflektans är omvänt proportionell mot koncentrationen av paracetamol i provet som beräknas baserat på kalibrering. S-Paracetamol mäts i enheten $\mu\text{mol/L}$ och instrumentet kan analysera koncentrationer inom det linjära området 66 – 1323 $\mu\text{mol/L}$ utan provspädning (18).

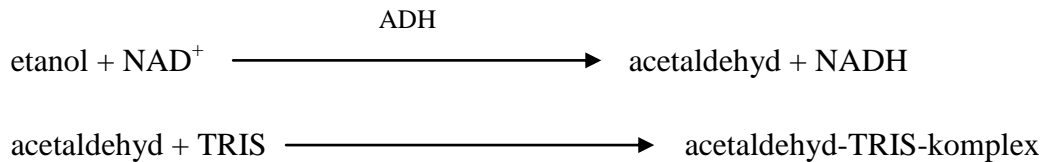


Figur 3 Schematisk bild över reflektansspektrofotometri. 1: Ljuset från reflektometerlampan färdas genom ett filter som är inställt på den specifika våglängden för analyten. 2: Färgämneskomplexet absorberar ljuset partiellt och därefter reflekteras ljuset av spridningsskiktet i sliden. 3: Det ljus som inte absorberas av färgämnet reflekteras tillbaka genom samma filter. 4: Fotodetektorn tar emot ljuset vars intensitet omvandlas till en spänning och en koncentration beräknas (18). Illustration av Filippa Bild[®].

Analysprincip för S-Etanol

Analysprincipen för S-Etanol på VITROS[®] 5,1 FS är kolorimetri (18). Analysen utförs på serum med VITROS[®] ALC MicroSlides. En droppe prov appliceras på sliden, fördelas över spridningsskiktet och tränger ner till underliggande skikt. I spridningsskiktet finns kofaktorn NAD^+ som reduceras till NADH , i samband med

att etanol oxideras till acetaldehyd av enzymet ADH, som finns i reagensskiktet. Reaktionen fullföljs genom att acetaldehyd binds av bufferten Tris(hydroxymetyl)-aminometan (TRIS) (pH 8,75), se reaktionssekvenser nedan (18).



Reflektionstätheten för NADH analyseras genom slutpunktsmätning med reflektansspektrofotometri vid 340 nm efter en inkubationstid. Reflektansen för NADH är omvänt proportionell mot koncentrationen av etanol i provet som beräknas baserat på kalibrering. S-Etanol mäts i enheten mmol/L och instrumentet kan analysera koncentrationer inom det linjära området 2,2 – 65,1 mmol/L utan provspädning (18).

Kvalitetssäkring

Interna kontroller används för att fortlöpande säkerställa att instrumentet utför analyser med korrekta resultat och för att följa en eventuell variation i metoden. För varje kontroll finns ett åsatt värde och för att en kontroll ska godkännas ska resultatet finnas inom ett intervall. Reglerna för interna kontroller på laboratoriet är enligt Westgaards' kontrollregler, något modifierade (19). Är kontrollresultatet inom 2 standardavvikelser (SD) från det åsatta värdet är den godkänd, men avviker resultatet mer än 2 SD är kontrollen endast godkänd om de tidigare fyra resultaten ligger inom 2 SD (regel 1 av 5). Avviker resultatet mer än 3 SD är kontrollen inte godkänd och inga provsvar för analyten lämnas ut. Den första åtgärden är generellt att analysera kontrollen en gång till, men ibland kan en kalibrering krävas (19). Kalibrering av en analysmetod utförs för att resultaten av okända prover ska kunna jämföras med en kalibreringskurva baserad på kända värden. Kalibrering av en analys utförs vid byte av lotnummer på reagens eller när de interna kontrollerna indikerar att en kalibrering behövs (18). Utöver de interna kontrollerna analyseras externa kontroller med jämna mellanrum. Dessa skickas från EQUALIS och används för att jämföra laboratoriets instrument och metoder med andra laboratorier i Sverige, för att säkerställa att en analyt ger samma resultat oberoende av var i landet provet tas (20).

Ackreditering

S-Paracetamol och S-Etanol är ackrediterade analyser vid avdelningen för klinisk kemi och transfusionsmedicin vid Länssjukhuset i Kalmar. Verksamheten är ackrediterad av SWEDAC enligt ISO/IEC 17025, vilket innebär att myndighetens standard ska följas och att laboratoriet regelbundet granskas. Syftet med

ackreditering är att säkerställa kvalitet, samt att det ska finnas dokument och metodbeskrivningar över det dagliga arbetet. Samtliga dokument ingår i en kvalitetsmanual och personalen ska ha kompetensbevis för att få utföra analyser (21).

Syfte

Syftet med studien var att undersöka möjligheten att förkorta den preanalytiska väntetiden före centrifugering vid intoxikationsanalyser i serumrör från akutmottagningen vid Länssjukhuset i Kalmar. Studien utfördes genom att utvärdera hypotesen att S-Paracetamol och S-Etanol kan analyseras med BD Vacutainer[®] Rapid Serum Tube på instrumentet VITROS[®] 5,1 FS och ge samma resultat som vid analys med BD Vacutainer[®] Plus Plastic Serum Tube.

MATERIAL OCH METODER

Patienter och prover

Totalt analyserades S-Paracetamol på venöst tagna serumprover från 35 patienter och S-Etanol på serumprover från 30 patienter, samtliga med okänd ålder och kön. För analys av S-Paracetamol insamlades 46 prover från kirurgavdelning 6 vid Länssjukhuset i Kalmar, varav 23 RST[™] (referensnummer 368774, LOT 130207) och 23 Serum Tube (referensnummer 367819, LOT 3094912). Av de 23 patienterna behandlades 21 stycken med 1 g Alvedon[®] tre eller fyra gånger per dygn, medan två av patienterna behandlades med 665 mg Alvedon[®] med modifierad frisättning tre gånger per dygn. Modifierad frisättning innebar att tabletten bestod av två skikt, ett för snabb frisättning av paracetamol och ett för långsam frisättning. Läkemedlet intogs peroralt och provtagning utfördes 30 – 45 minuter efter senast intagen dos (7). Under sex veckor insamlades även 24 prover (12 RST[™] och 12 Serum Tube) från akutmottagningen för analys av S-Paracetamol. Från akutmottagningen insamlades under dessa veckor även 60 prover för analys av S-Etanol, varav 30 RST[™] och 30 Serum Tube. Samtliga RST[™] hade samma LOT-nummer.

Alla provrör (n=130) skickades med rörpost till laboratoriet direkt efter provtagning. RST[™] (n=65) centrifugerades efter 5 minuter och Serum Tube (n=65) centrifugerades efter minst 50 minuter, samtliga vid 2000g i 10 minuter vid 20°C (ROTINA 380R, Hettich zentrifugen och SIGMA 2-16PK).

Interna kontroller

De interna kontrollerna för S-Paracetamol och S-Etanol ingick i Autonorm[™] Human Liquid L-1 och L-2 (LOT 1210572 respektive 1206402) (SERO AS, Billingstad, Norge) och benämndes på laboratoriet A1 och A2. A1 och A2 innehöll fryst humanserum från blodgivare och tinades genom blandning på vagga i 40 minuter.

För S-Paracetamol analyserades interna kontroller dagligen i två olika nivåer. Åsatta värden (SD) var 218 (2,70) $\mu\text{mol/L}$ för A1 respektive 924 (11) $\mu\text{mol/L}$ för A2. För S-Etanol analyserades interna kontroller i två olika nivåer före patientprov. Åsatta värden (SD) var 9,1 (0,6) mmol/L för A1 respektive 34,2 (1,7) mmol/L för A2 (19).

Analys av S-Paracetamol

Provrören (n=70) placerades utan kork i provrack i instrumentets provförråd. Den primära uppmättningsmodulen aspirerade provet med en VersaTip (pipettspets) och applicerade 10 μl på en ACET MicroSlide (LOT 146194) för analysering. VITROS[®] ACET MicroSlides innehöll per cm^2 : AAA (*Pseudomonas*, E.C.3.5.1.13) 0,3 U; kaliumferricyanid 0,18 mg; THQ 0,1 mg. Övrigt innehåll: pigment, bindemedel, buffert, ytaktiva ämnen, rengöringsmedel och tvärbindingssubstans. Sliden inkuberades i 5 minuter vid 37°C i MicroSlide-inkubatorn varefter den bildade färgens reflektans avlästes vid 670 nm. Reflektansen användes i instrumentets programvara enligt den slutpunktskolorimetriska kalibreringsmodellen för S-Paracetamol och koncentrationen ($\mu\text{mol/L}$) beräknades (18).

Analys av S-Etanol

Provrören (n=60) placerades utan kork i provrack i instrumentets provförråd. Den primära uppmättningsmodulen aspirerade provet med en VersaTip och applicerade 10 μl på en ALC MicroSlide (LOT 278565) för analysering. VITROS[®] ALC MicroSlides innehöll per cm^2 : ADH (jäst, E.C.1.1.1.1) 1,1 U; NAD^+ 0,8 mg; TRIS 1,0 mg. Övrigt innehåll: pigment, bindemedel, stabiliseringsämne, ytaktiva ämnen, protein och tvärbindande substans. Sliden inkuberades i 5 minuter vid 37°C i MicroSlide-inkubatorn varefter reflektansen för bildat NADH avlästes vid 340 nm. Reflektansen användes i instrumentets programvara enligt den slutpunktskolorimetriska kalibreringsmodellen för S-Etanol och koncentrationen (mmol/L) beräknades (18).

Interferensmätning

VersaTip förseglades efter provapplicering på MicroSlide, genom att botten på spetsen smältes samman för att bilda en kyvett. Serum analyserades spektrofotometriskt med avseende på hemolys, ikterus (bilirubin) och turbiditet (lipemi) och provindex för respektive parameter erhöles (18).

Statistik

Samtliga statistiska analyser utfördes i Microsoft Office Excel 2007. För båda analyserna beräknades medelvärden samt standardavvikelser för resultaten från

RST™ respektive Serum Tube. Korrelationen mellan RST™ och Serum Tube utvärderades genom Pearsons korrelationskoefficient, linjär regressionsanalys, bias plots och oparat tvåsidigt Students t-test. Med Pearsons korrelationskoefficient uppskattades graden av linjärt samband mellan RST™ och Serum Tube uttryckt i r . Med linjär regressionsanalys bestämdes linjens lutning samt dess skärningspunkt med y-axeln i ett diagram. Linjen framtoogs enligt minsta kvadratmetoden, vilket medförde att summan av alla datapunkters avvikelser från linjen i kvadrat blev så liten som möjligt. Systematiska avvikelser vid användning av RST™ i jämförelse med Serum Tube beskrevs med bias plots, genom att differensen mellan resultaten från de båda provrören beräknades. Med ett oparat tvåsidigt Students t-test utvärderades om det fanns en signifikant skillnad ($p < 0,05$) mellan medelkoncentrationerna för mätningarna med RST™ jämfört med Serum Tube (22).

Etik

Prover för analys av S-Paracetamol från kirurgavdelningen togs i samband med ordinarie provtagning och medförde inte ytterligare obehag för patienten. Provrören märktes med nummer från 1 – 23 vilket innebar att inga patientdata fanns på rören. Patienterna informerades skriftligt före provtagningen och tillfrågades angående medverkan. Vid provtagning på akutmottagningen togs ett extra rör (RST™) tillsammans med ordinarie Serum Tube. RST™ märktes med samma LID-nummer (unik streckkodsidentitet) men ingen patientdata. Samtliga provrör kasserades efter analys. Lag 2003:460 om etikprövning av forskning som avser människor gäller inte för en studie utförd inom högskoleutbildning på grundnivå (23).

RESULTAT

Interna kontroller

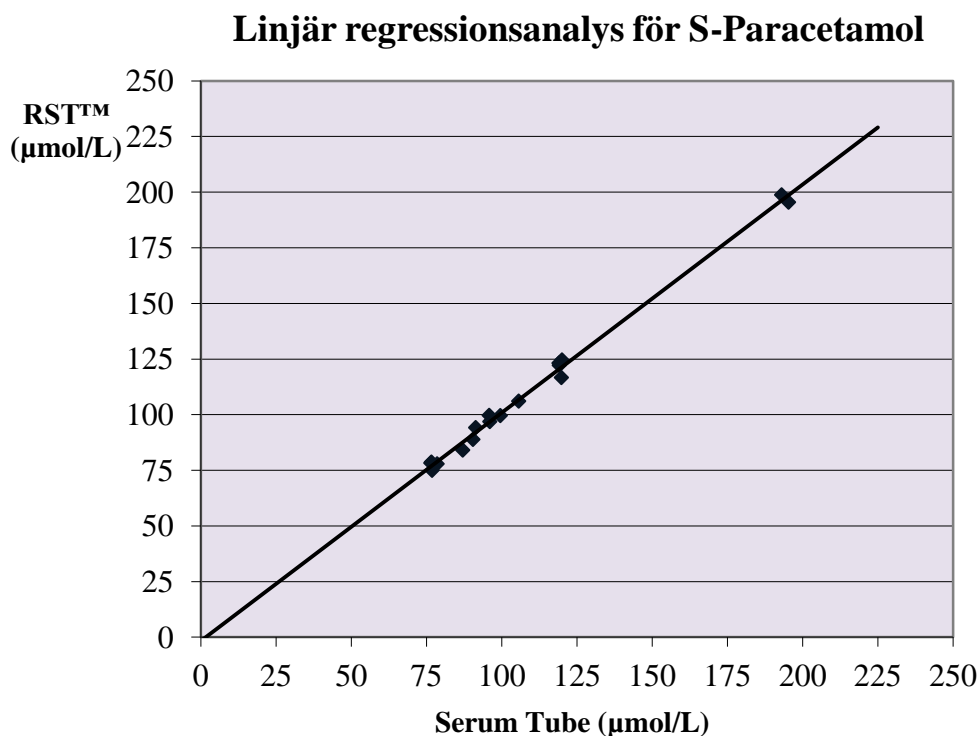
De analyserade interna kontrollerna för S-Paracetamol under de dagar som proverna analyserades låg inom 2 SD från åsatta värden (218 respektive 924 $\mu\text{mol/L}$, intervall 212,6 – 223,4 respektive 902 – 946 $\mu\text{mol/L}$), förutom en kontroll som låg inom 3 SD men godkändes enligt regeln 1 av 5. De analyserade interna kontrollerna för S-Etanol låg inom 2 SD från åsatta värden (9,1 respektive 34,2 mmol/L , intervall 7,9 – 10,3 respektive 30,8 – 37,6 mmol/L).

S-Paracetamol

Av de 23 dubbelproverna (RST™ + Serum Tube) från kirurgavdelningen var 14 positiva ($>66,2 \mu\text{mol/L}$), (61 %) och 9 negativa ($<66,2 \mu\text{mol/L}$), (39 %), dvs. ingen mätbar koncentration av paracetamol kunde påvisas i varken RST™ eller Serum Tube. Av de 12 dubbelproverna från akutmottagningen var 3 positiva (25 %) och 9 negativa (75 %). Vid positivt resultat uppmättes koncentrationer i båda provrören.

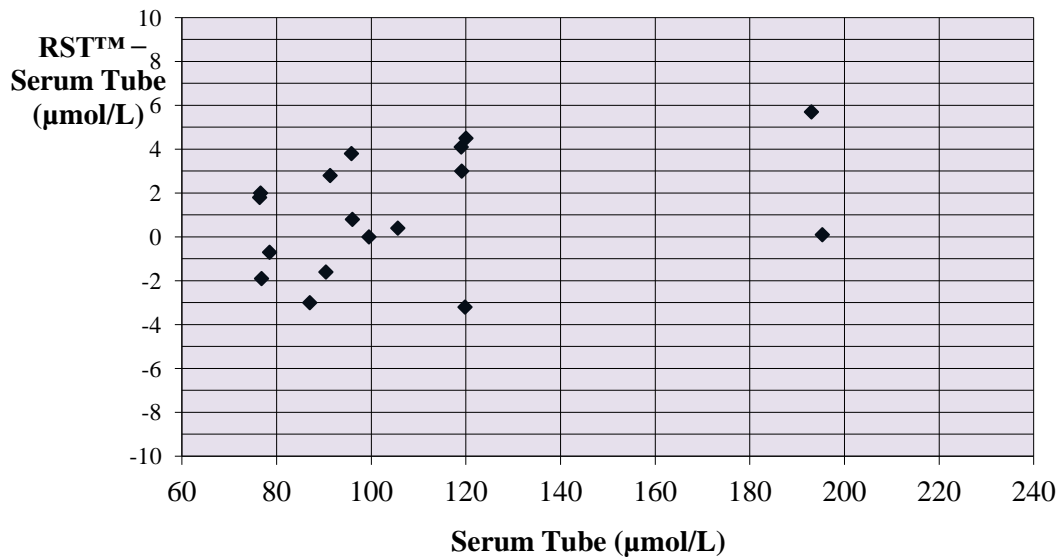
Uppmätta koncentrationer för analyserna med RST™ låg i området 74,9 – 198,7 µmol/L och för analyserna med Serum Tube i området 76,6 – 195,3 µmol/L, se Bilaga I för rådata. Medelvärde (SD) för de positiva proverna (n=17) vid analys med RST™ var 108,2 (8,7) och vid analys med Serum Tube 109,3 (8,9) µmol/L. Provindex för hemolys låg under gränsen för interferens (index 400) för samtliga prover, se Bilaga I. Provindex för ikterus och turbiditet låg under gränserna för interferens för samtliga prover (data redovisas ej).

Vid utvärdering av de 17 positiva dubbelproverna beräknades Pearsons korrelationskoefficient till 0,9977. Den linjära regressionsanalysen resulterade i ekvationen $y = 1,0258x - 1,6964$ för den räta linjen, se Figur 4. 95 % konfidensintervall för linjens lutning var [0,9873 ; 1,0643] och för intercept med y-axeln [-6,0720 ; 2,6792]. Differensen mellan resultaten från RST™ och Serum Tube för individuella patienter låg mellan -3,0 och 5,7 µmol/L, se Figur 5. Ingen signifikant skillnad i resultat mellan de två provrören påvisades (p=0,0877).



Figur 4 Linjär regressionsanalys för S-Paracetamol med resultaten (n=17) från RST™ på y-axeln avsatta mot resultaten från Serum Tube på x-axeln. Den räta linjen hade ekvationen $y = 1,0258x - 1,6964$ ($r=0,9977$) och framtogs enligt minsta kvadratmetoden.

Bias plot vid analys av S-Paracetamol



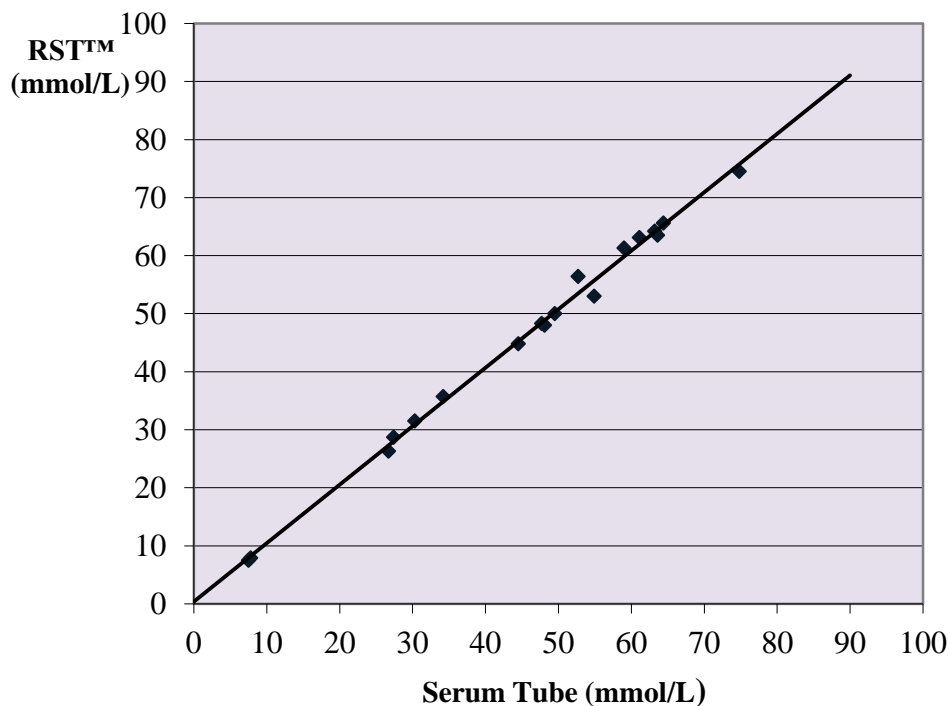
Figur 5 Resultatens spridning (n=17) vid analys av S-Paracetamol med differensen mellan RST™ och Serum Tube i µmol/L på y-axeln och resultaten för Serum Tube på x-axeln. Värdena på x-axeln börjar inte vid 0 då gränsen för en mätbar koncentration var 66,2 µmol/L.

S-Etanol

Av de 30 dubbelproverna (RST™ + Serum Tube) från akutmottagningen var 18 positiva (>2,2 mmol/L), (60 %) och 12 negativa (<2,2 mmol/L), (40 %), dvs. ingen mätbar koncentration av etanol kunde påvisas i varken RST™ eller Serum Tube. Vid positivt resultat uppmättes koncentrationer i båda provrören. Uppmätta koncentrationer för analyserna med RST™ låg i området 7,5 – 74,5 mmol/L och för analyserna med Serum Tube i området 7,5 – 74,8 mmol/L, se Bilaga II för rådata. Medelvärdet (SD) för de positiva proverna (n=18) vid analys med RST™ var 46,1 (4,6) och vid analys med Serum Tube 45,4 (4,6) mmol/L. Provindex för hemolys låg under gränsen för interferens (index 400) för samtliga prover, se Bilaga II. Provindex för ikterus och turbiditet låg under gränserna för interferens för samtliga prover (data redovisas ej).

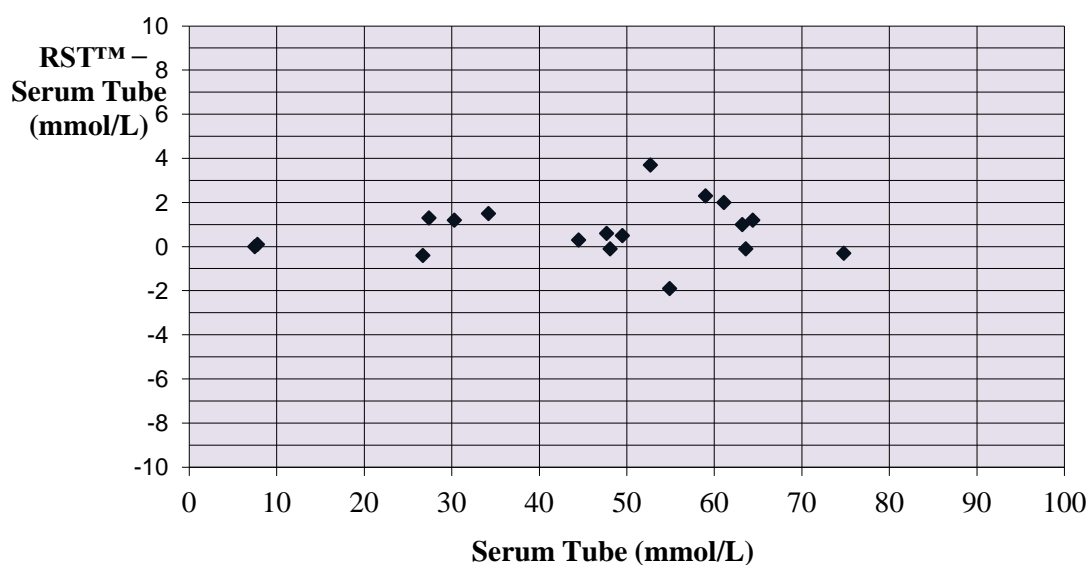
Vid utvärdering av de 18 positiva dubbelproverna beräknades Pearsons korrelationskoefficient till 0,9980. Den linjära regressionsanalysen resulterade i ekvationen $y = 1,0078x + 0,3612$ för den räta linjen, se Figur 6. 95 % konfidensintervall för linjens lutning var [0,9741 ; 1,0416] och för intercept med y-axeln [-1,2968 ; 2,0192]. Differensen mellan resultaten från RST™ och Serum Tube för individuella patienter låg mellan -1,9 och 3,7 µmol/L, se Figur 7. Ingen signifikant skillnad i resultat mellan de två provrören påvisades (p=0,1107).

Linjär regressionsanalys för S-Etanol



Figur 6 Linjär regressionsanalys för S-Etanol med resultaten (n=18) från RST™ på y-axeln avsatta mot resultaten från Serum Tube på x-axeln. Den räta linjen hade ekvationen $y = 1,0078x + 0,3612$ ($r=0,9980$) och framtogs enligt minsta kvadratmetoden.

Bias plot vid analys av S-Etanol



Figur 7 Resultatens spridning (n=18) vid analys av S-Etanol, med differensen mellan RST™ och Serum Tube i mmol/L på y-axeln och resultaten för Serum Tube på x-axeln.

DISKUSSION

Syftet med studien var att undersöka möjligheten att förkorta den preanalytiska väntetiden före centrifugering vid intoxikationsanalyser i serumrör från akutmottagningen vid Länssjukhuset i Kalmar. Studien utfördes genom att utvärdera hypotesen att S-Paracetamol och S-Etanol kan analyseras med BD Vacutainer® Rapid Serum Tube på instrumentet VITROS® 5,1 FS och ge samma resultat som vid analys med BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tube. De interna kontrollerna för S-Paracetamol och S-Etanol som analyserades under studien godkändes enligt laboratoriets regler. Därför anses resultaten av analyserna vara tillförlitliga.

Korrelationen mellan RST™ och Serum Tube vid analys av S-Paracetamol utvärderades med 17 positiva dubbelprover (RST™ + Serum Tube). Pearsons korrelationskoefficient (r) beräknades till 0,9977. Ett värde för $r = \pm 1$ innebär perfekt korrelation (22), värdet 0,9977 ligger tillräckligt nära 1 för att korrelationen mellan RST™ och Serum Tube ska anses vara mycket god. Den räta linjens lutning och intercept låg innanför de respektive intervallen, vilket innebär att RST™ och Serum Tube med 95 % konfidensgrad kan anses ge samma resultat. Bias plot visade att analys med RST™ gav något högre resultat jämfört med Serum Tube. Tio av datapunkterna låg ovanför strecket för ingen differens, medan fem av datapunkterna låg under. Det fanns alltså en liten bias vid analys med RST™. Även den linjära regressionsanalysen indikerade att RST™ kan ge något högre resultat eftersom linjens lutning var större än 1 ($k=1,0258$), även när linjen tvingades genom origo. Dock behöver den lilla skillnaden inte ha någon klinisk signifikans, eftersom det vid en förgiftning kan vara bättre med ett lite för högt resultat än ett falskt för lågt. T-testet påvisade ingen signifikant skillnad ($p>0,05$) mellan medelkoncentrationerna och därmed behålls hypotesen att RST™ och Serum Tube ger samma resultat. Av totalt 35 analyserade dubbelprover för S-Paracetamol var 17 positiva. Koncentrationerna för dessa prover var under 200 $\mu\text{mol/L}$, vilket innebär inom det terapeutiska intervallet vid behandling med paracetamol (24). Eftersom inga patienter kom in till akutmottagningen med högre koncentrationer, som ses vid en allvarlig förgiftning (6), kunde inte RST™ utvärderas för hela mätområdet.

Korrelationen mellan RST™ och Serum Tube vid analys av S-Etanol utvärderades med 18 positiva dubbelprover (RST™ + Serum Tube). Pearsons korrelationskoefficient beräknades till 0,9980, vilket innebär ett värde nära 1 och en mycket god korrelation mellan provrören (22). Den räta linjens lutning och intercept låg innanför de respektive intervallen, vilket innebär att RST™ och Serum Tube med 95 % konfidensgrad kan anses ge samma resultat. Bias plot visade att analys med RST™ gav något högre resultat jämfört med Serum Tube, eftersom dubbelt så många datapunkter låg ovanför strecket för ingen differens. Även den linjära regressionsanalysen indikerade att RST™ kan ge något högre resultat eftersom linjens lutning var större än 1 ($k=1,0078$), även när linjen tvingades genom origo.

Dock behöver den lilla skillnaden inte ha någon klinisk signifikans vid analys av S-Etanol, precis som vid analys av S-Paracetamol. T-testet påvisade ingen signifikant skillnad ($p > 0,05$) mellan medelkoncentrationerna och därmed behålls hypotesen att RST™ och Serum Tube ger samma resultat. Av totalt 30 analyserade dubbelprover för S-Etanol var 18 positiva. Koncentrationerna för dessa prover låg mellan 7,5 – 74,8 mmol/L, vilket innebär att RST™ kunde utvärderas för i stort sett hela mätområdet för analysen (6).

Stora skillnader i resultat från analys med RST™ jämfört med Serum Tube sågs inte i denna studie, men eventuella skillnader behöver inte enbart bero på provrören, utan även på metodens imprecision. Laboratoriet har tidigare utfört egna studier av VITROS® 5,1 FS totalimprecision vid analys av S-Paracetamol och S-Etanol (19). Två kontrollprover med olika koncentrationer analyserades i 30 replikat under fem dagar. För S-Paracetamol var medelvärdena (SD) 119,3 (2,1) respektive 1138 (6,4) µmol/L. Variationskoefficienten i procent (CV %) för den lägre koncentrationen var 1,8 och för den högre 0,6. För S-Etanol var medelvärdena (SD) för de två kontrollproverna 22,4 (0,55) respektive 45,6 (1,58) mmol/L. CV % för den lägre koncentrationen var 2,4 och för den högre 3,5 (19). En låg variationskoefficient indikerar god precision för metoden, likaså en låg standardavvikelse. För kontrollprovet med den högre koncentrationen av S-Paracetamol var SD högre än för de övriga kontrollproverna. I denna studie hade även SD för den höga interna kontrollen för S-Paracetamol ett högt värde på 11. Den interna kontrollen kan alltså godkännas även om koncentrationen varierar mellan 902 och 946 µmol/L från dag till dag (19). Detta indikerar att metodens imprecision vid analys av S-Paracetamol ökar med stigande koncentration.

Det höga antalet negativa prover medförde att provunderlaget för utvärdering av RST™ blev lägre än önskat. Av de 23 dubbelproverna från kirurgavdelningen var endast 14 positiva för S-Paracetamol. Proverna togs 30 – 45 minuter efter senast intagen dos och för de 10 patienter som behandlats med fyra doser 1 g Alvedon® under föregående dygn var samtliga dubbelprover positiva. Enbart 4 av 13 dubbelprover från patienter som behandlats tre gånger var positiva. När ett läkemedel tillförs flera gånger under en tidsperiod, som under ett dygn, stiger koncentrationen i blodet mellan varje dos. Ju kortare tid mellan varje dos, desto högre koncentration i blodet (9). När Alvedon® intogs fyra gånger per dygn var intervallet mellan doserna var sju timme, jämfört med var åttonde timme när läkemedlet intogs tre gånger per dygn. Således hade det varit bättre med provtagning på fler patienter behandlade med fyra doser, men det vanliga på avdelningen visade sig vara tre doser. Det fanns ytterligare svårigheter med provtagningen för studien, bland annat att vissa patienter behandlades med paracetamol under natten och nästa dos kunde därför inte intas tidigt på morgonen. Proverna i RST™ och Serum Tube togs i samband med ordinarie provtagning, för att undvika ytterligare obehag för patienten. Därför

passade tidpunkten för provtagning inte in på alla avdelningens patienter. Provtagningen på akutmottagningen för S-Paracetamol och S-Etanol kunde inte påverkas, eftersom det inte gick att förutspå hur många patienter som skulle komma in med höga koncentrationer av dessa analyter i blodet. På grund av studiens korta tidsperiod på sex veckor insamlades inte tillräckligt med prover för att fullständigt utvärdera användningen av RST™, främst gällande S-Paracetamol. Det fanns även en avsikt att utvärdera RST™ vid analys av S-Salicylat, men avsaknaden av provunderlag medförde att det inte kunde genomföras. S-Salicylat är en analyt som ibland beställs tillsammans med S-Paracetamol och S-Etanol vid misstänkta intoxikationer, exempelvis om en person kommer in medvetlös till akutmottagningen (9).

Vid analys på VITROS® 5,1 FS erhålls provindex efter mätning av interferenser, gällande hemolys, ikterus och turbiditet. Provindex för samtliga parametrar låg under gränserna för interferens för alla prover. Hemolys kan påverka ett analysresultat på flera sätt, exempelvis genom att serum blir rött och färgen interfererar vid en viss våglängd, men även genom att hemoglobin påverkar vissa kemiska reaktioner (25). Analyserna av S-Paracetamol och S-Etanol är inte känsliga för hemolys, eftersom det krävs ett provindex på 400 (ca 4 g/L hemoglobin) för att resultatet ska påverkas till den grad att provsvaret inte får lämnas ut (19). BD skriver i produktbladet för RST™ att graden av hemolys minskar vid användning av RST™ i jämförelse med andra serumrör (5). Hemolysindex var <15 för de flesta av de analyserade proverna, men vid högre provindex kunde ingen tydlig skillnad mellan RST™ och Serum Tube påvisas. För att koagulationstiden på utlovade 5 minuter ska stämma krävs att RST™ blandas direkt efter provtagning, för att blodet omgående ska komma i kontakt med trombinet (5). Att blanda provrören efter provtagning gäller i princip för samtliga provrör (4), men kirurgavdelningens och akutmottagningens personal informerades om den viktiga aspekten vid studiens början. Ytterligare felkällor att ta hänsyn till är att provrören vid provtagning ska fyllas med blod upp till markeringen eller tills dess vakuum upphör. Analyser utförs inte vid för låg blodvolym, eftersom tillsatsen i röret är beräknad utefter en viss mängd (4).

Det har utförts flera studier där RST™ jämförs med andra serum- eller plasmarör vid analys av olika ämnen. I en studie publicerad 2010 utvärderas RST™ i jämförelse med BD Vacutainer® Plasma Separator Tube (PST™) och BD Vacutainer® Serum Separator Tube (SST™) för 31 analyter. Författarna drar slutsatsen att RST™ är ett bra alternativ för de flesta av patienterna. Resultaten visar dock att en förlängd koagulationstid i RST™ kan förekomma i prover tagna på patienter som behandlats med mycket höga koncentrationer av antikoagulantia (26). I en studie publicerad 2013 utvärderas RST™ vid analys av 22 vanliga biokemiska analyter. Resultaten visar en koagulationstid på mindre än de 5 minuter som BD utlovar, med en medeltid på 2,07 minuter. Resultaten visar att RST™ överensstämmer väl med SST™, som

har en koagulationstid på 30 minuter, för de flesta av analyterna. Författarna fastställer att RST™ är ett bra alternativ vid akuta serumprover för att minska tiden det tar att få ett analysvar (27). I en annan studie publicerad 2013 utvärderas RST™ på en akutmottagning, vid provtagning för analys av Troponin T och Creatine kinase-MB. Författarna finner ingen signifikant skillnad mellan analysresultaten för RST™ respektive SST™ och RST™ innebär en kort koagulationstid, vilket de anser fördelaktigt på en akutmottagning (28). I en studie publicerad 2014 jämförs RST™ med SST™ vid analys av 54 rutinkemiska analyter och 10 hormoner. Resultaten överensstämmer väl för de flesta av analyterna, med viss statistisk avvikelse för 11 stycken. Dock är avvikelserna inte kliniskt signifikanta, med undantaget analys av parathyroideahormon (PTH) (29).

Ett Serum Tube kostar enligt avtalspris med landstinget i Kalmar län 0,75 kr och ett RST™ 3,85 kr, vilket innebär en skillnad på 3,10 kr. Den ekonomiska aspekten måste därför vägas emot den kliniska nyttan vid användning av RST™ istället för Serum Tube. Skillnaden i turnaround time är 45 minuter, vilket kan innebära en stor skillnad vid en paracetamol- eller etanolförgiftning. Särskilt viktigt är det vid överdosering av paracetamol, eftersom det finns en antidot att tillgå. Ju fortare antidoten injiceras desto mindre är risken för en bestående leverskada (9). Om en förgiftning utesluts genom ett negativt provsvar innebär det att patienten kan lämna akutmottagningen snabbare, vilket gör att personalen får mer tid för andra patienter. Behandlingen vid en etanolförgiftning är ofta observation, vilket kräver att patienten övervakas noggrant (16).

Slutsats

I denna studie påvisades ingen signifikant skillnad mellan RST™ och Serum Tube. Användning av RST™ på akutmottagningen medför en förkortad preanalytisk väntetid och ett snabbare provsvar, vilket är viktigt vid förgiftningar. Hypotesen att S-Paracetamol och S-Etanol kan analyseras med RST™ på VITROS® 5,1 FS stämmer, med undantag för höga koncentrationer av S-Paracetamol som inte kunde utvärderas. För att RST™ ska kunna användas rutinmässigt bör därför ytterligare studier utföras.

TACK

Tack till huvudhandledare Ingvar Rydén för upplägget av studien och vägledning under projektets gång. Tack till Ingela Lagström på klinisk kemi för hjälp med införskaffandet av RST™, vilka skänktes från BD för denna studie. Tack till personalen på kirurgavdelning 6 och akutmottagningen som utfört provtagningen för studien. Tack till trevlig personal på avdelningen för klinisk kemi och transfusionsmedicin, som även tagit hand om prover från akutmottagningen under jourtid. Tack till Susanne Widell som agerat intern handledare och granskat skrivandet.

REFERENSER

1. Hawkins RC. Laboratory turnaround time. *Clin Biochem Rev.* 2007;28(4):179-94. Epub 2008/04/09.
2. Rodriguez-Borja E, Villalba-Martinez C, Carratala-Calvo A. Enquiry time as part of turnaround time: when do our clinicians really consult our results? *J Clin Pathol.* 2014;67(7):642-4. Epub 2014/04/08.
3. Howanitz JH, Howanitz PJ. Laboratory results. Timeliness as a quality attribute and strategy. *Am J Clin Pathol.* 2001;116(3):311-5. Epub 2001/09/14.
4. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. *Diagnostic Samples: From the Patient to the Laboratory. The Impact of Preanalytical Variables on the Quality of Laboratory Results.* 4th ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2009.
5. Becton, Dickinson and Company. [cited 2014-04-13 17:35]; Available from: www.bd.com.
6. Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E. *Laurells Klinisk Kemi i Praktisk Medicin.* 9:e uppl. Lund: Studentlitteratur; 2012.
7. FASS. [cited 2014-04-10 21:14]; Available from: <http://www.fass.se/LIF/product?4&userType=0&nplId=19581115000027>.
8. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology.* 2013;21(3):201-32. Epub 2013/05/31.
9. Simonsen T, Aarbakke J. *Illustrerad farmakologi 1: Principer och tillämpningar.* 1:a uppl. Stockholm: Natur och Kultur; 2001.
10. Schafer C, Schroder KR, Hoglinger O, Tollabimazraehno S, Lornejad-Schafer MR. Acetaminophen changes intestinal epithelial cell membrane properties, subsequently affecting absorption processes. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(2):431-47. Epub 2013/08/31.
11. Paintaud G, Thibault P, Queneau PE, Magnette J, Berard M, Rumbach L, et al. Intraindividual variability of paracetamol absorption kinetics after a semi-solid meal in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;53(5):355-9. Epub 1998/03/27.
12. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(5):1327-31. Epub 1984/03/01.
13. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010(196):369-405. Epub 2009/12/19.
14. Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(12):4281-304. Epub 2011/02/15.
15. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012;16(4):667-85. Epub 2012/10/30.
16. Nilsson P-H. *Medicinboken.* In: Grefberg N, Johansson L-G, editors. *Akutmedicin.* 4:e uppl. Stockholm: Liber; 2010. p. 11-54.

17. Wikström J. Akutsjukvård - Handläggning av patienter med akut sjukdom eller skada. 1:a uppl. Lund: Studentlitteratur; 2007.
18. Vitros System Documentation. Ortho-Clinical Diagnostics; 2014. Available from: <http://www.orthoclinical.com/>.
19. Kvalitetsmanual. Klinisk kemi och transfusionsmedicin: Kalmar; 2014.
20. EQUALIS. [cited 2014-03-12 09:48]; Available from: [http://equalis.se/sv/vaar-verksamhet/extern-kvalitetssaekring/kvalitetssaekringsprogram/a-f/allmaen-klinisk-kemi-\(107\)-2014.aspx](http://equalis.se/sv/vaar-verksamhet/extern-kvalitetssaekring/kvalitetssaekringsprogram/a-f/allmaen-klinisk-kemi-(107)-2014.aspx).
21. SWEDAC. [cited 2014-03-06 10:42]; Available from: www.swedac.se/sv/.
22. Björk J. Praktisk statistik för medicin och hälsa. 1:a uppl. Stockholm: Liber; 2010.
23. Sveriges Riksdag. [cited 2014-04-29 18:36]; Available from: http://www.riksdagen.se/sv/Dokument-Lagar/Lagar/Svenskforfattningssamling/Lag-2003460-om-etikprovning_sfs-2003-460/?bet=2003:460.
24. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1999.
25. Saibaba KS, Bhaskar MV, Rao PV, Ramana GV, Dakshinamurthy KV. Interferences in clinical chemistry analysis. Indian J Clin Biochem. 1998;13(2):55-62. Epub 1998/07/01.
26. Dimeski G, Masci PP, Trabi M, Lavin MF, de Jersey J. Evaluation of the Becton-Dickinson rapid serum tube: does it provide a suitable alternative to lithium heparin plasma tubes? Clin Chem Lab Med. 2010;48(5):651-7.
27. Ng WY, Yeo CP. Thrombin-accelerated quick clotting serum tubes: an evaluation with 22 common biochemical analytes. Adv Hematol. 2013;2013:769479.
28. Budak YU, Huysal K, Bulut M, Polat M. Evaluation in an emergency department of rapid separator tubes containing thrombin for serum preparation prior to hs-cTnT and CK-MB analyses. BMC Clin Pathol. 2013;13(1):20. Epub 2013/06/15.
29. Yan R, Lou A, Watts G, Tarr H, Smith H, Kinney L, *et al*. Comparison of Becton Dickinson Vacutainer rapid serum tube with the serum separator tube for routine chemistry and immunoassay tests. J Clin Pathol. 2014;67(7):599-604. Epub 2014/04/02.

BILAGA I

Tabell I Resultat från analys av S-Paracetamol med RST™ och Serum Tube på VITROS® 5,1 FS, inklusive hemolysindex för respektive provrör. Prov 1 – 23 togs på kirurgavdelning 6 och tabellen visar även antalet doser patienten erhöll vid behandlingen med paracetamol (1 g Alvedon®, förutom prov 10 och 17) . Prov 24 – 35 togs på akutmottagningen vid ordinarie provtagning på patienter med misstänkt förgiftning. Medelvärdet (SD) för de 17 positiva proverna (>66,2 µmol/L) vid analys med RST™ var 108,2 (8,7) och vid analys med Serum Tube 109,3 (8,9) µmol/L.

| | SerumTube | RST™ | Serum Tube | RST™ | |
|------|-----------|----------|--------------|--------------|-------------|
| Prov | (µmol/L) | (µmol/L) | Hemolysindex | Hemolysindex | Antal doser |
| 1 | 119,1 | 122,1 | <15 | <15 | 4 |
| 2 | 87 | 84 | <15 | <15 | 4 |
| 3 | 120 | 124,5 | <15 | <15 | 4 |
| 4 | 76,6 | 78,6 | <15 | <15 | 4 |
| 5 | 193 | 198,7 | <15 | <15 | 4 |
| 6 | 195,3 | 195,4 | <15 | <15 | 3 |
| 7 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3 |
| 8 | 91,3 | 94,1 | <15 | <15 | 4 |
| 9 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3 |
| 10 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3x665mg |
| 11 | 96 | 96,8 | 17 | <15 | 3 |
| 12 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3 |
| 13 | 99,5 | 99,5 | <15 | <15 | 3 |
| 14 | 119,8 | 116,6 | <15 | <15 | 3 |
| 15 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3 |
| 16 | 76,8 | 74,9 | <15 | <15 | 4 |
| 17 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3x665mg |
| 18 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3 |
| 19 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3 |
| 20 | 78,5 | 77,8 | <15 | <15 | 4 |
| 21 | 95,8 | 99,6 | <15 | <15 | 4 |
| 22 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | 3 |
| 23 | 76,4 | 78,2 | <15 | <15 | 4 |
| 24 | <66,2 | <66,2 | <15 | <15 | |
| 25 | <66,2 | <66,2 | 18 | 27 | |
| 26 | 119 | 123,1 | 20 | <15 | |
| 27 | <66,2 | <66,2 | 31 | 33 | |
| 28 | <66,2 | <66,2 | <15 | 32 | |
| 29 | 105,6 | 106 | <15 | <15 | |
| 30 | 90,4 | 88,8 | <15 | <15 | |
| 31 | <66,2 | <66,2 | 98 | 87 | |
| 32 | <66,2 | <66,2 | <15 | 24 | |
| 33 | <66,2 | <66,2 | 19 | 21 | |
| 34 | <66,2 | <66,2 | 16 | <15 | |
| 35 | <66,2 | <66,2 | 46 | <15 | |

BILAGA II

Tabell II Resultat från analys av S-Etanol med RST™ och Serum Tube på VITROS® 5,1 FS, inklusive hemolysindex för respektive provrör. Samtliga prover togs på akutmottagningen vid ordinarie provtagning på patienter med misstänkt förgiftning. Medelvärde (SD) för de 18 positiva proverna (>2,2 mmol/L) vid analys med RST™ var 46,1 (4,6) och vid analys med Serum Tube 45,4 (4,6) mmol/L.

| | Serum Tube | RST™ | Serum Tube | RST™ |
|-------------|-------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| Prov | (mmol/L) | (mmol/L) | Hemolysindex | Hemolysindex |
| 1 | <2,2 | <2,2 | <15 | <15 |
| 2 | 44,5 | 44,8 | <15 | <15 |
| 3 | 47,7 | 48,3 | <15 | <15 |
| 4 | 64,4 | 65,6 | 16 | 17 |
| 5 | 7,5 | 7,5 | 21 | <15 |
| 6 | <2,2 | <2,2 | 16 | <15 |
| 7 | 61,1 | 63,1 | 18 | 27 |
| 8 | <2,2 | <2,2 | 20 | 15 |
| 9 | <2,2 | <2,2 | 31 | 33 |
| 10 | 59,0 | 61,3 | <15 | 31 |
| 11 | 27,4 | 28,7 | <15 | <15 |
| 12 | 54,9 | 53 | 43 | 19 |
| 13 | <2,2 | <2,2 | <15 | <15 |
| 14 | 26,7 | 26,3 | 18 | <15 |
| 15 | 52,7 | 56,4 | 35 | 32 |
| 16 | 63,6 | 63,5 | <15 | <15 |
| 17 | <2,2 | <2,2 | <15 | <15 |
| 18 | <2,2 | <2,2 | <15 | <15 |
| 19 | <2,2 | <2,2 | <15 | <15 |
| 20 | 63,2 | 64,2 | <15 | <15 |
| 21 | 48,1 | 48 | <15 | <15 |
| 22 | <2,2 | <2,2 | 97 | 87 |
| 23 | 30,3 | 31,5 | <15 | <15 |
| 24 | <2,2 | <2,2 | 28 | 44 |
| 25 | 49,5 | 50 | 16 | 23 |
| 26 | 34,2 | 35,7 | <15 | <15 |
| 27 | <2,2 | <2,2 | <15 | <15 |
| 28 | <2,2 | <2,2 | <15 | <15 |
| 29 | 74,8 | 74,5 | <15 | <15 |
| 30 | 7,8 | 7,9 | <15 | <15 |

Linnéuniversitetet
Kalmar Växjö
Lnu.se