

# Hemostaasitutkimusten preanalytiikka ja analytiikan ongelmat

Suomen Kliinisen Kemian Yhdistys ry:n (SKKY) ja  
Sairaalakemistit ry:n koulutuspäivä 24.3.2011

Kaija Javela, sairaalakemisti, hemostaasi- ja  
trombosyyttitutkimukset  
SPR Veripalvelu

## Hemostaasin mittaaminen, vuototaipumustutkimukset

- P -Tromboplastiiniaika
- P- Tromboplastiiniaika, aktivoitu partiaalinen
- P –Hyytymistekijä V
- P –Hyytymistekijä VII
- P –Hyytymistekijä X
- P –Hyytymistekijä VIII
- P –Hyytymistekijä XIII
- P –von Willebrand –tekijä, ristoseetiinikofaktori
- P – Protrombiini

### Jatkotutkimukset tarvittaessa:

- P -Fibrinogeeni
- P –Hyytymistekijä IX
- P –Hyytymistekijä XI
- P –Hyytymistekijä XII
- P –Hyytymistekijä VIII, v-a
- P –von Willebrand –tekijä, Ag
- P -Von Willebrand –tekijä, kollageeniin sitoutuminen
- P –von Willebrand –tekijä, multimeerit
- P –von Willebrand –tekijä, F VIII –sitomiskyky
- Pt-von Willebrandin tauti, alatyypitys

# Hemostaasin mittaaminen, tukostaipumustutkimukset

- P –Antitrombiini
- P –Proteiini C
- P –Proteiini S
- P –Lupusantikoagulantti, PTT
- P –Lupusantikoagulantti, dRVVT
- S –Beeta-2-glykoproteiini, IgG-vasta-aineet
- S –Kardiolipiini IgG-vasta-aineet
- S –Kardiolipiini IgM-vasta-aineet
- B –Hyytymistekijä V geeni, DNA-tutkimus
- B –Protrombiini geeni, DNA-tutkimus
- P –Trombiiniaika
- P –Tromboplastiiniaika

## Jatkotutkimukset tarvittaessa

- P –Antitrombiini, antigeeni
- P –Antitrombiini, mutaatio
- P –Proteiini C, antigeeni
- P –Proteiini C, mutaatio
- P –Proteiini S, antigeeni
- P –Lupusantikoagulantti, PTT, varmistus
- P –Lupusantikoagulantti, dRVVT, varmistus
- P –Plasminogeeni
- P –Protrombiini, antigeeni
- P –D-Dimeeri
- P –Fibrinogeeni
- P –Reptilaasiaika

# Preanalytiikasta

# Hemostaasitutkimusten kansainvälisten suositusten historiaa

- Miten suositukset syntyvät:
  - Mielenpitoeseen perustuvat
    - yksi tai useampi asiantuntija
  - Konsensusukseen perustuvat
    - ryhmä asiantuntijoita
  - Todisteisiin perustuvat
    - julkaisuihin perustuvat
- Thomson JM; Blood Coagulation and Haemostasis 1.-4. painos (1970, 1980, 1985, 1991)
  - keskityttiin menetelmiin, referoitiin julkaisuja
  - ei mainintaa preanalytiikasta
- Suomalaisilla paljon yhteistyötä ruotsalaisten kanssa, samankaltaiset käytännöt

## NCCLS: Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays; Approved Guideline, 1998

- Ensimmäinen varsinaisesti hemostaasitutkimusten preanalytiikkaan liittyvä kansainvälinen suositus
- Sitraattipitoisuus (3,13-3,2 %)
- Neulan koko (22-19 G)
- Näytteen säilytys 2-4 °C tai huoneenlämmössä 24 h
- aPTT, hyytymistekijä VIII –määritystä varten erottelu 4 h sisällä, INR 24 h
- Määritettävä omat viitevälit
- Normaali ja epänormaali kontrolli sarjoissa mukana

*(Favaloro et al 1996: Näytettä voidaan säilyttää huoneenlämmössä jopa 7 pv ennen määritystä)*

## NCCLS 2003, pääkohdat

- Näytteen säilytys 2-4 °C tai huoneenlämmössä 24 h
- Hematokriitin vaikutus
- Julkaisujen mukaan aPTT- ja INR-määrittelyyn ei tarvita hukkaputkea

*(Favaloro et al 2004: Näytettä ei voi säilyttää 2-4 °C:ssa (jäävesihaude), koska saattaa aiheuttaa hyytymistekijä VIII:n ja von Willebrandin tekijän laskua)*

*(Böhm et al 2006: Näytettä ei voi säilyttää 2-4 °C:ssa, koska vW-taudin luokitus voi muuttua)*

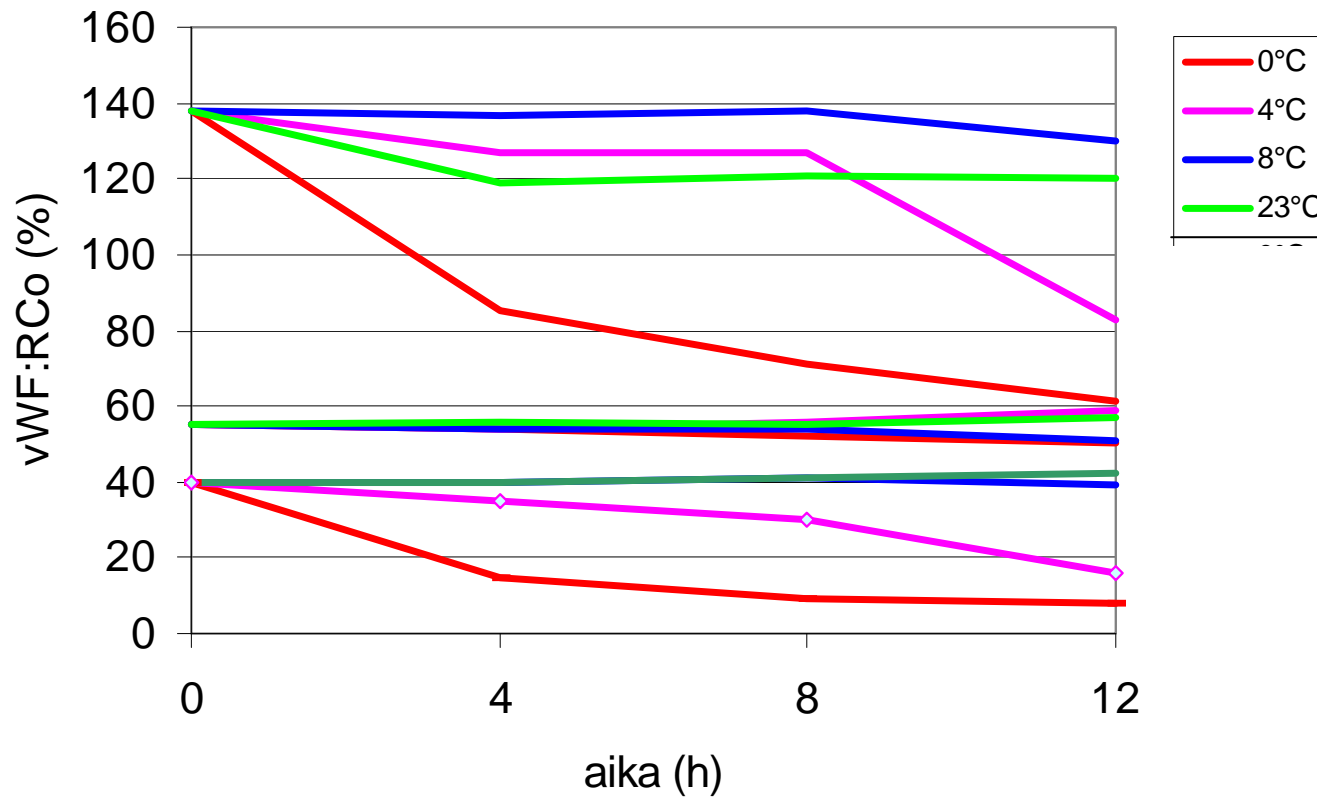
## NCCLS 2008, pääkohdat

- Näytteen säilytystä 2-4 °C ei suositella, vaan huoneenlämmössä korkeintaan 4 h
  - jos käytetään muita vaihtoehtoja, validoitava
- Näytteenkäsittelyn ideaaliaika 1 h näytteenotosta

*(Zürcher et al 2008: Näytteen kuljettaminen 2-4 °C:ssa max 12 h ja sen jälkeen säilytys huoneenlämmössä 12 h ei vaikuttanut tuloksiin 10 % enempää)*

# Lämpötilan vaikutus, omia kokemuksia

vWF:RCo -aktiivisuus ajan ja lämpötilan  
funktiona



## Preanalytiikan vaikutus diagnooseihin Suomessa

- Veripalvelun nykyinen kuljetuspakkaus (näytteen It 8-12 °C) käyttöön 01/1997, sitä ennen näytteet tulivat suositusten mukaisesti ja myös Ruotsissa olleen käytännön mukaisesti termoskannussa kylmälähetyksenä
- Favalaron et al mukaan näytteen kylmäsäilytys aiheuttaa potilaan von Willebrand –tyypin virheellisen diagnoosin (tyyppi 1 → 2)
- Ei ole vaikuttanut diagnoosityypityksiin Suomessa:

v	1-typin esiintyvyys vW-taudeissa (%)	v	1-typin esiintyvyys vW-taudeissa (%)
1993	90,3	1997	94,3
1994	94,9	1998	91,5
1995	93,4	2009	93,2
1996	92,5	2010	96

## Potilaasta aiheutuvat tärkeimmät tulokseen vaikuttavat tekijät

- ikä
- sukupuoli
- raskaus
- geneettiset tekijät
- etniset tekijät
- ruokavalio
- lääkitys
- tupakointi, alkoholi
- kemikaalit
- potilaan äskettäinen runsas vuoto
- stressi näytteenotto-tilanteessa
- fyysinen rasitus
- ...

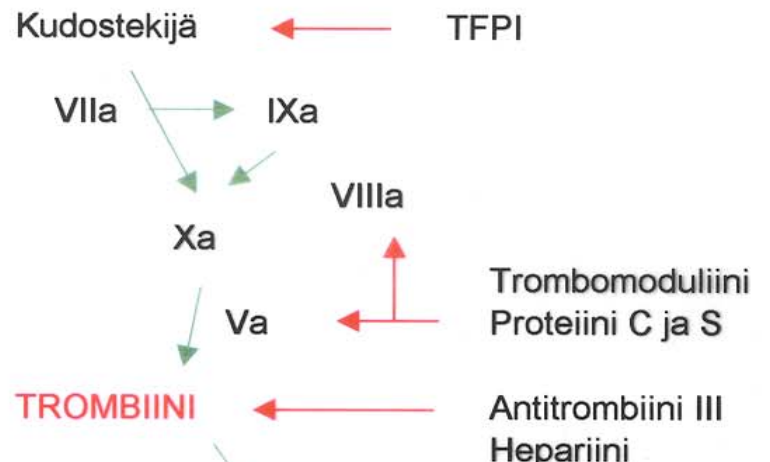
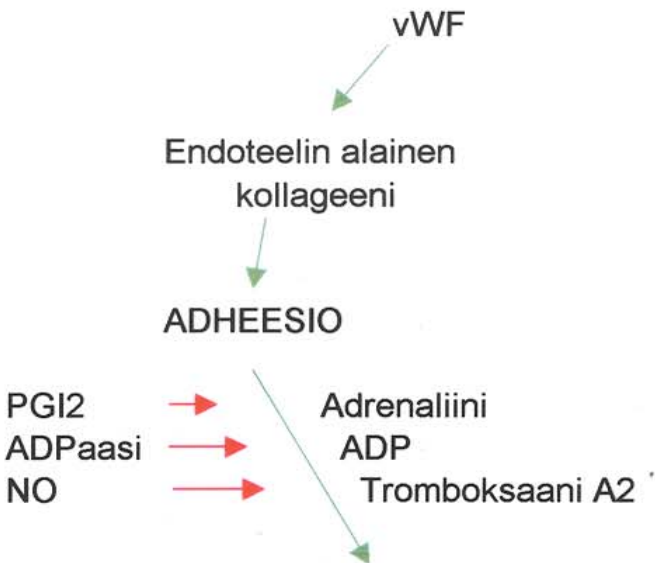
## Näytteenottoon liittyvät tulokseen vaikuttavat tekijät

- Väärä antikoagulantti
- Putken väärä täyttöaste
- Näytteenotto
  - staasi, neulanpisto, kudostromboplastiini, hepariini
  - hidas näytteenotto

# VERISUONEN VAURIO

# Hyytymisjärjestelmä

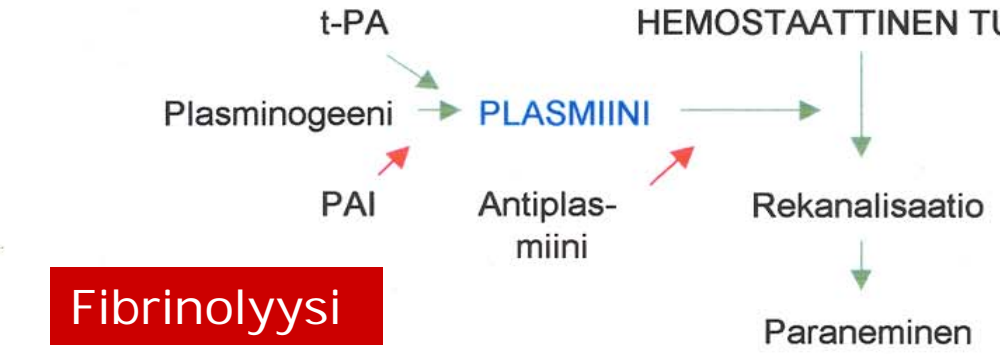
## Trombosyytit



## AGGREGAATIO

## HEMOSTAATTINEN TULPPA

## HEMOSTAATTINEN MEKANISMI



## Fibrinolyysi

Kirjassa: Colman ym. (toim.)  
Hemostasis & Thrombosis. Kuva 1.

# Näytteenkäsittelyyn liittyvät tulokseen vaikuttavat tekijät

- Näytteen säilyttäminen huoneenlämmössä mahdollisimman lyhyen aikaa
  - labiilien hyytymistekijöiden aktiivisuudet voivat laskea
- Kokoverinäytteitä ei saa jäähdyttää lähelle 0 °C
  - jotkut hyytymistekijät voivat aktivoitua
  - hyytymistekijä VIII ja von Willebrand -tekijän ristoseitiinikofaktoriaktiivisuus voivat laskea
- Sentrifugointiaika ja – nopeus
  - plasman erottelutapa (trombosyyttivapaa plasma)
- Pakastus nopeasti (-40 °C:ssa tai kylmemmässä)
- Putkimateriaali inerttiä muovia, jotta ei aiheutettaisi hyytymistekijöiden aktivaatiota
- Hemolyysi
- ...
- Näytteen kannalta olisi optimaalista
  - näytteen sentrifugointi tunnin sisällä näytteenoton jälkeen, pakastaminen nopeasti ja näytteen lähettäminen hiilihappojäissä analysoivaan laboratorioon

## Preanalytiikan vaikutus tuloksiin, yhteenveto

- Analysoiva laboratorio luottaa siihen, että näyte on otettu oikein
- Preanalytiikan vaikutus tiedettävä ja tiedostettava
- Esim. poikkeavien lämpötilojen, kuljetusaikojen ja lääkityksen vaikutus tuloksiin arvioitava
- Viitevälejä määritettäessä tulee preanalytiikan vaikutus huomioida mahdollisimman hyvin
- Näytteestä saatu tulos kuvaa aina potilaan senhetkistä hemostaasin tasoa ja näytteenoton onnistumista
- Poikkeava tulos tulisi aina varmistaa uudesta näytteestä

# Hemostaasianalytiikan ongelmia

## Hemostaasin mittaaminen

### Hyytymisajan mittaamiseen perustuvat menetelmät

- Aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika, tromboplastiiniaika, trombiiniaika, yksittäiset hyytymistekijät

### Kromogeeniset menetelmät

- Entsymaattisen aktiivisuuden mittaaminen (esim. Prot C, AT)

### Immunokemialliset menetelmät

- ELISA-menetelmät (esim. fosfolipidivasta-aineet)
- Immunoturbidometriset menetelmät (esim. vWF:Ag)
- Immunoelektroforeesitekniikka (esim. Prot C -Ag, Prot S -Ag, AT-Ag, vW-multimeerit)

## Hemostaasitutkimusten tulosten laatuun vaikuttavia tekijöitä 1(4)

- Preanalytiikan vaikutus
- Menetelmät hyvin herkkiä ja häiriöalttiita
- Reagenssien liuotus tulee tehdä aina samalla tavalla
- Näytteen sulatus ennen analyysiä 5 min +37 °C
- Määritykset tehtävä heti ja viimeistään tunnin sisällä näytteiden sulatuksesta
- Kontrolleja vähintään kahta tasoa
  - matalia pitoisuuksia analysoitaessa lisäksi matalan tason kontrollit
  - oltava myös omia kontrolleja
- Kontrollit mukaan joka sarjaan (vähintään kerran tunnissa)

## Hemostaasitutkimusten tulosten laatuun vaikuttavia tekijöitä 2(4)

- Vakioiden aktiivisuudet/pitoisuudet ongelma
  - useimmille parametreille on kansainvälinen vakio, rajoitetusti saatavilla ja kalliita
  - käyttövakiot jäljitettävissä usein sekundaarivakion kautta kansainvälisiin vakioihin reagenssivalmistajien toimesta
  - sekä kansainvälisten että käyttövakioiden aktiivisuuksille/pitoisuuksille erästä toiseen sallitaan  $\pm 10\%$  virhemarginaali
  - lisäksi laboratorion oma menetelmän mittausepävarmuus vakiokuvaajaa määritettäessä

## Hemostaasitutkimusten tulosten laatuun vaikuttavia tekijöitä 3(4)

- ELISA-menetelmien ongelmia (fosfolipidivasta-aineet)
  - levymateriaali
  - puskurit
  - vasta-aine
  - substraatti
  - kansainvälisen vakion puuttuminen
  - positiivisen rajan määrittäminen
  - lukuisia valmistajia
  - ongelmia myös saman valmistajan reagenssia käytettäessä

## Hemostaasitutkimusten tulosten laatuun vaikuttavia tekijöitä 4(4)

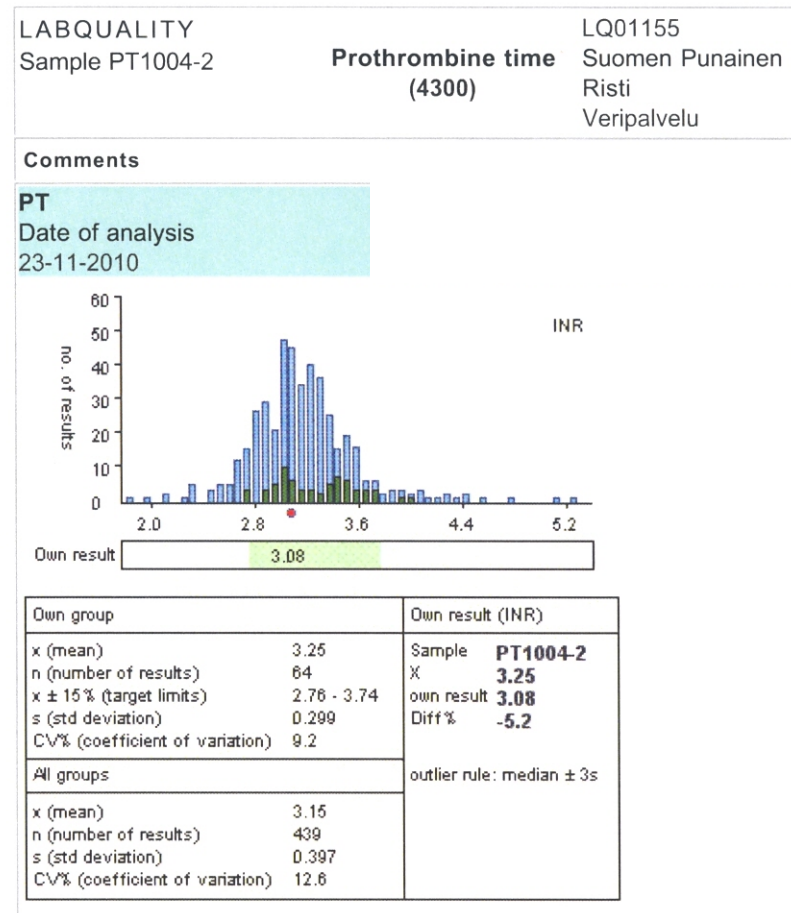
- Tason pysyvyydestä tulee huolehtia
  - kontrollit eivät saa vaihtua samanaikaisesti, kun reagenssierä vaihtuu ja tehdään uusi vakiokuvaaja
  - uuden vakion ilmoitettuun pitoisuuteen ei tule sokeasti uskoa ( $\pm 10\%$ )
  - kattava sisäinen laadunohjaus – useampitasoisia kontrolleja (myös omia)
  - ulkoiset laatukierrokset
- Hemostaasitutkimuksia tekevissä laboratorioissa tulisi määrittää omat viitevälit ja cut-off -arvot
- Pitkäjaksoisten potilaskeskisarvojen käyttö laadunohjauskeinona

## INR-määritys, vakioinnin virhelähteet

- Vakioiden mittausepävarmuus (TT- ja ISI-vakio)
  - jokaisella vakiolla voi esiintyä 3-10 % systemaattinen virhe
  - kokonaisvirhe vakioille voi olla  $\pm 10$  % (NCCLS)
- Vakiointien mittausepävarmuus
  - pipetointi, käyrän sovitus
  - käytettävä normaaliaika voi vääristää tuloksia
  - kokonaisvirhe vakioinnille voi olla  $\pm 10$  %
- INR-hoitoalueella
  - hyytymän muodostuminen heikompaa
  - hyytymän detektio vaikeampaa
  - reagenssin herkkyys vaikuttaa tulokseen
  - mittauksen kokonaisvirhe voi olla  $\pm 10$  %

# Ulkoinen laadunarviointi, INR, Labqualityn kierros

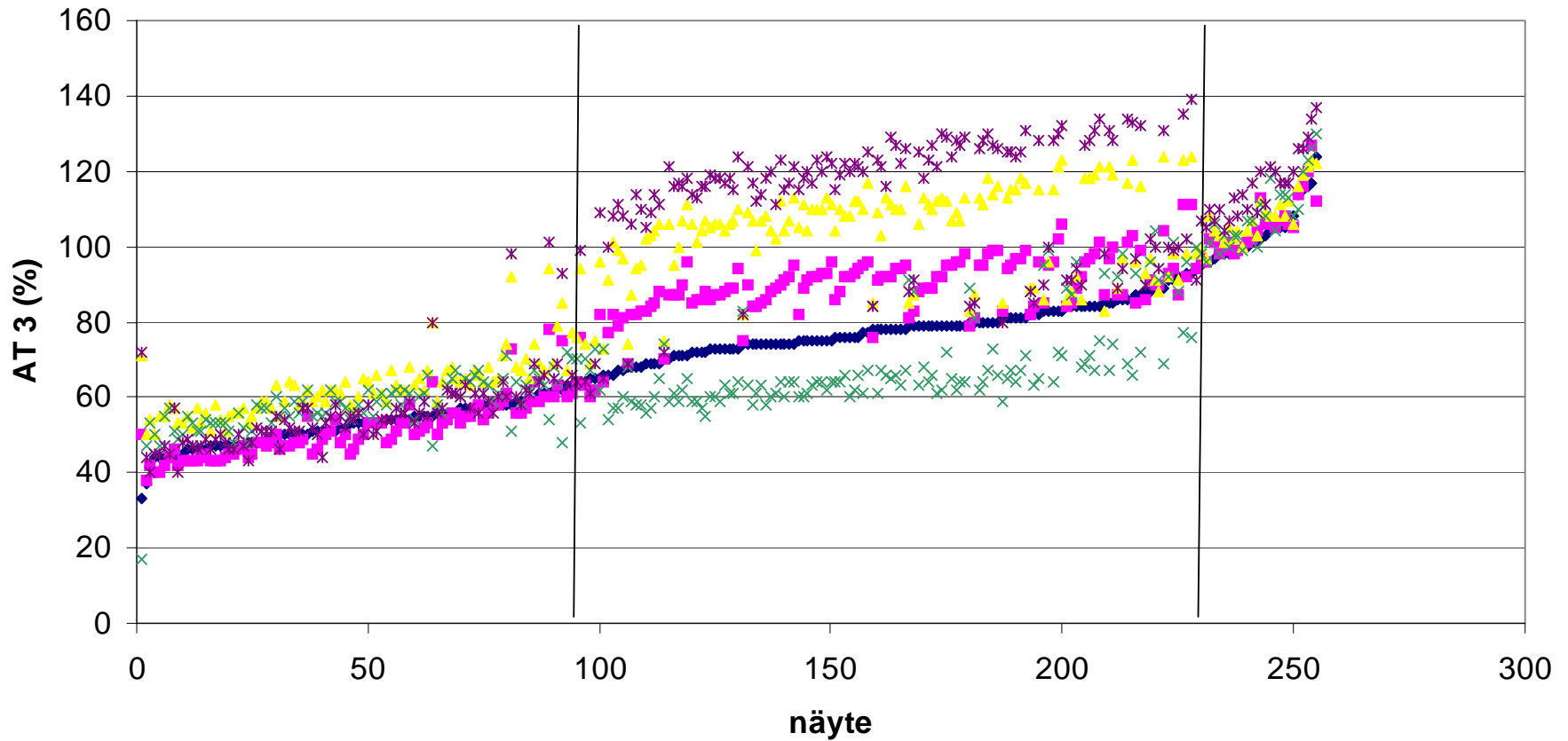
- Ei preanalytiikan vaikutusta, hajonta analytiikasta johtuvaa
- INR-tulostuksen tulisi huomioida eri reagenssit ja laitteet
- Vaihtelu 1,9-5,2
- INR-vakiointi edelleen ongelma!



## Antitrombiini-määritys eri valmistajien reagensseilla

- 235 poikkeavan antitrombiinituloksen saanutta potilasta
- Määritykset neljällä reagenssilla ja lisäksi yhden reagenssin muutetuilla mittausparametreilla (kolme valmistajaa)
- Reagensseissa kaksi eri määrittämissperiaatetta (trombiinin kautta/F Xa:n kautta)
- Käytettiin kaikilla reagensseilla samaa vakiota
- Eri valmistajien viitearvot vaihtelivat melko vähän

# AT-määritys viidellä eri reagenssilla



# Ulkoinen laadunarviointi, AT

- vaihteluväli 74 – 110 %
- 20/39 alle viitevälin (51 %)

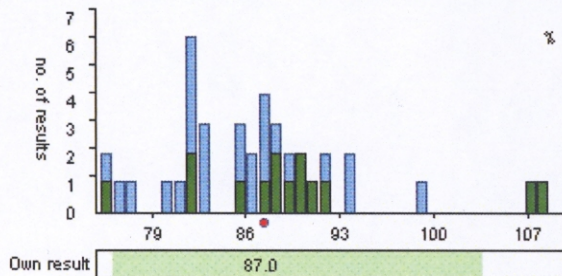
- vaihteluväli <73 – 128 %

LABQUALITY LQ01155  
Sample COAG1003-1 Antithrombin, Prot.C, Suomen Punainen  
Prot.S and FVIII (4386) Risti  
Veripalvelu

## Comments

### Antitr

Date of analysis  
8-9-2010



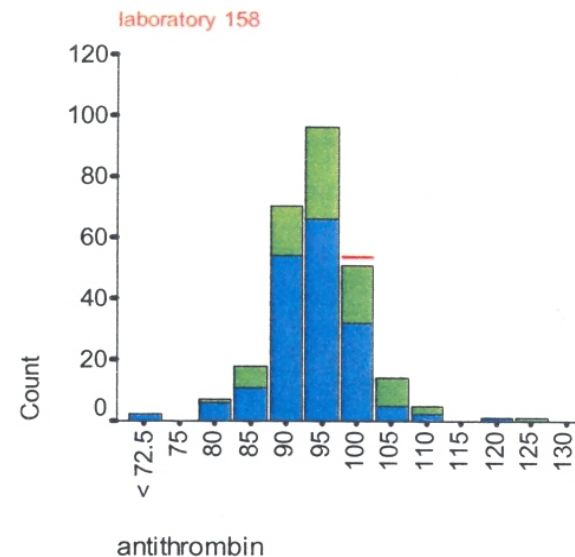
Own group	Own result (%)
x (mean)	89.7
n (number of results)	14
x ± 15% (target limits)	76.3 - 103.2
s (std deviation)	8.672
CV% (coefficient of variation)	9.7
<b>All groups</b>	
x (mean)	86.8
n (number of results)	39
s (std deviation)	7.084
CV% (coefficient of variation)	8.2

outlier rule: median ± 3s



ECAT FOUNDATION  
INTERNATIONAL EXTERN  
PROGRAMME IN HAEMOS

## ANTITHROMBIN (% , IU/dl)

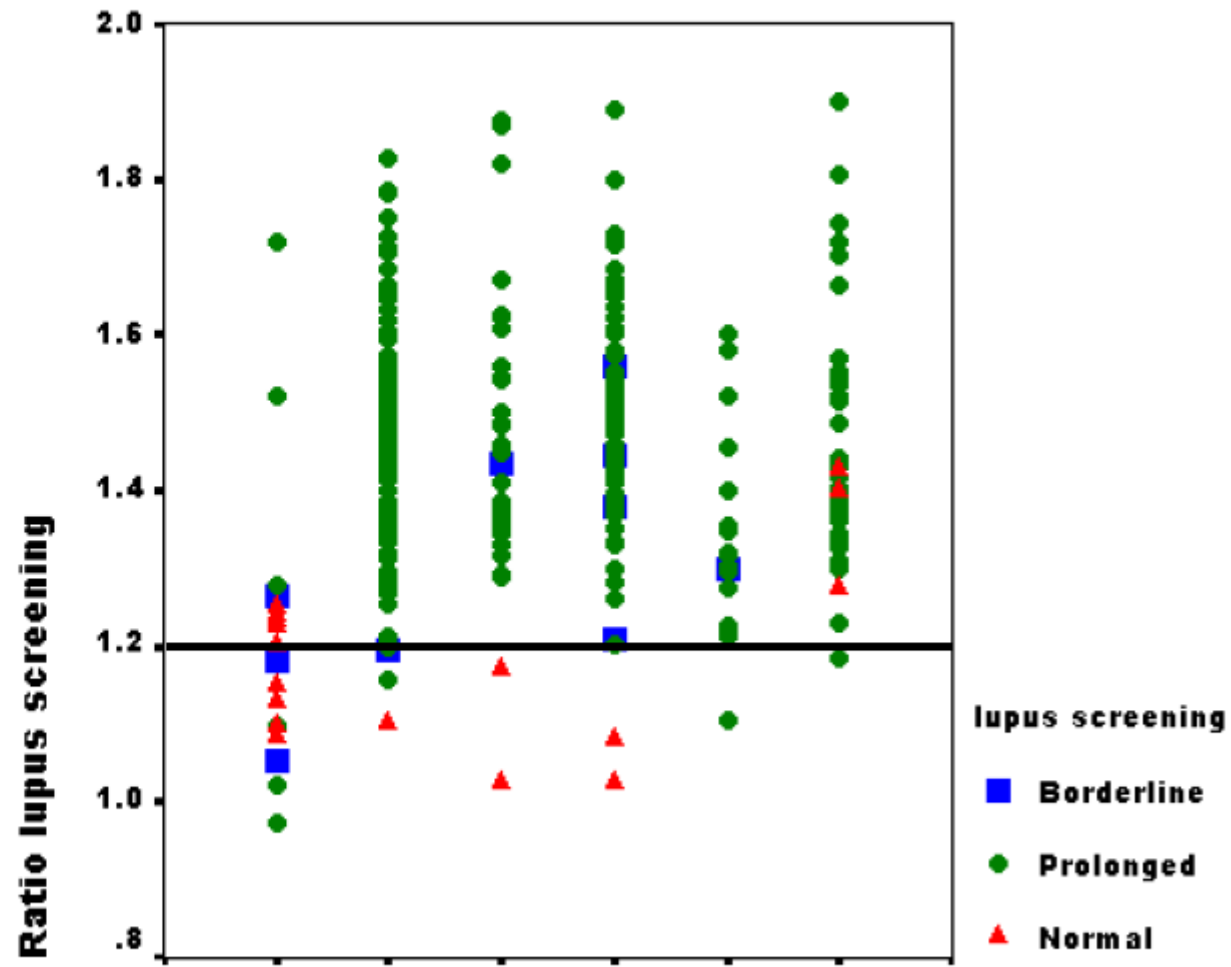


## Noudattavatko laboratoriot kansainvälisiä suosituksia lupusantikoagulantti-määrityksissä (ECAT 2005, 2010)?

- Seulonta kahdella eri menetelmällä (alhainen fosfolipidipitoisuus) – 90 % laboratorioista
- Vasta-aineiden poissulku sekoitusmenetelmällä (näyte + normaalipooli) – puolet laboratorioista tekee
- Varmistustesti seulontatestin ollessa positiivinen (korkea fosfolipidipitoisuus) – 70 % laboratorioista tekee
- Hepariniin vaikutus – 70 % laboratorioista tekee
- Yksittäisten hyytymistekijöiden määrittäminen (mahdollinen vaja-us) – 10 % laboratorioista tekee



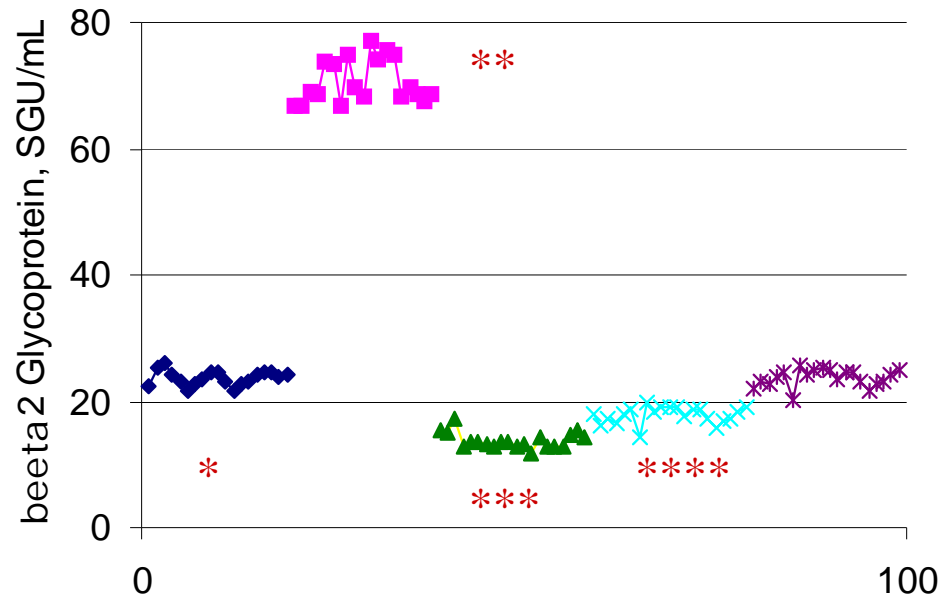
**2010-2**





# Beeta-2-Glykoproteiinivasta-aineet

- Kaupallisia ELISA-menetelmiä
- Ei ole olemassa kansainvälistä vakiota, reagenssivalmistajat käyttävät referenssinä ns. Sapporon vakiota



Oman kontrollin tulokset viidellä eri reagenssierällä

Positiivisten potilasnäytteiden määrä:

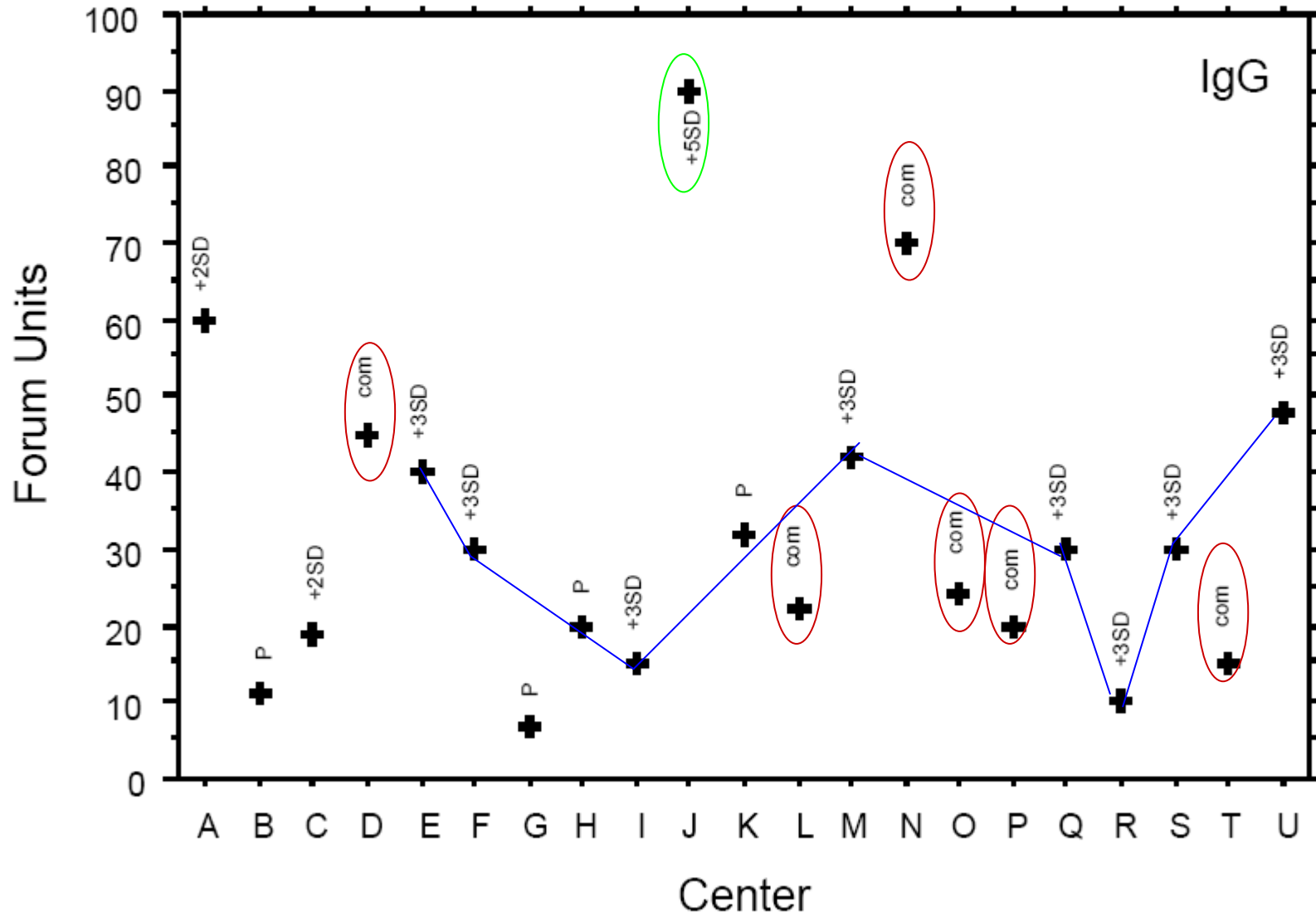
\* 2,2 %

\*\* 21 %

\*\*\* 1,3 %

\*\*\*\* 1,5 %

# Local cut-off values expressed in Forum Units





# Kardioliipiinivasta-aineet

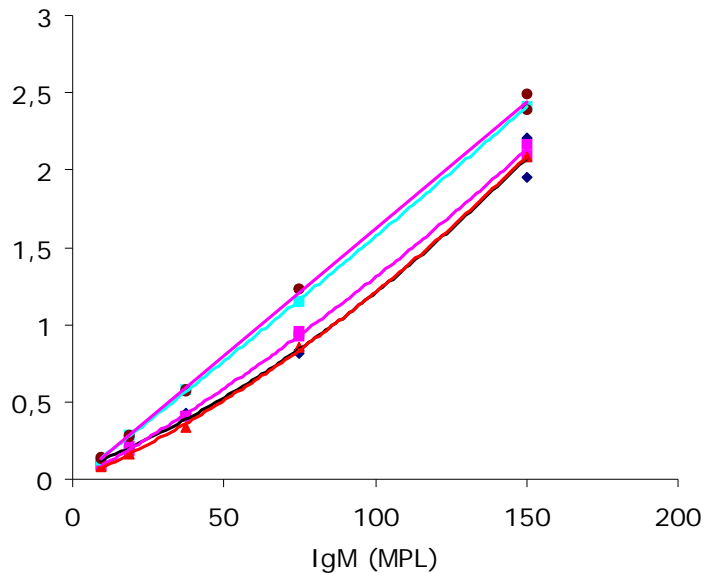
- Kaupallisia ELISA-menetelmiä
- Ei ole olemassa kansainvälistä vakiota, reagenssivalmistajat käyttävät referenssinä ns. Sapporon vakiota

Kardioliipiini IgG -tulos (GPL)				
Oma reag	Reag 1	Reag 2	Reag 3	Reag 4
<6	8,8	5	8	3,49
<6	5,6	1,6	5,4	0,7
19	15,6	4,8	17,4	7,1
21	12	3	8,9	2,5
23	12,1	3,8	21,3	15,7
25	12,7	4,5	12,2	6,1
26	10,3	4	14,8	8,9
27	26,5	4,2	16,7	7,1
28	10,2	3,5	4,6	1,9
29	15	10	23	15
29	15,4	3,4	11,2	5,5
30	46,9	71,6	51,2	24,7
33	22,6	2,3	8	1,5
35	25,8	3,9	10,3	2,8
36	11,9	3,3	15,4	2,7
38	42,9	13,3	33,3	16,8
41	48	4	17,5	4,5
42	41,6	2,6	4,3	0,9
43	25,7	3,5	8,7	2,9
43	12,5	2,5	44,9	6,7
59	185,4	163,2	165,6	168
87	111,9	138	77,8	156
173	391	1256	815,2	770
646	447	856,4	551,2	950

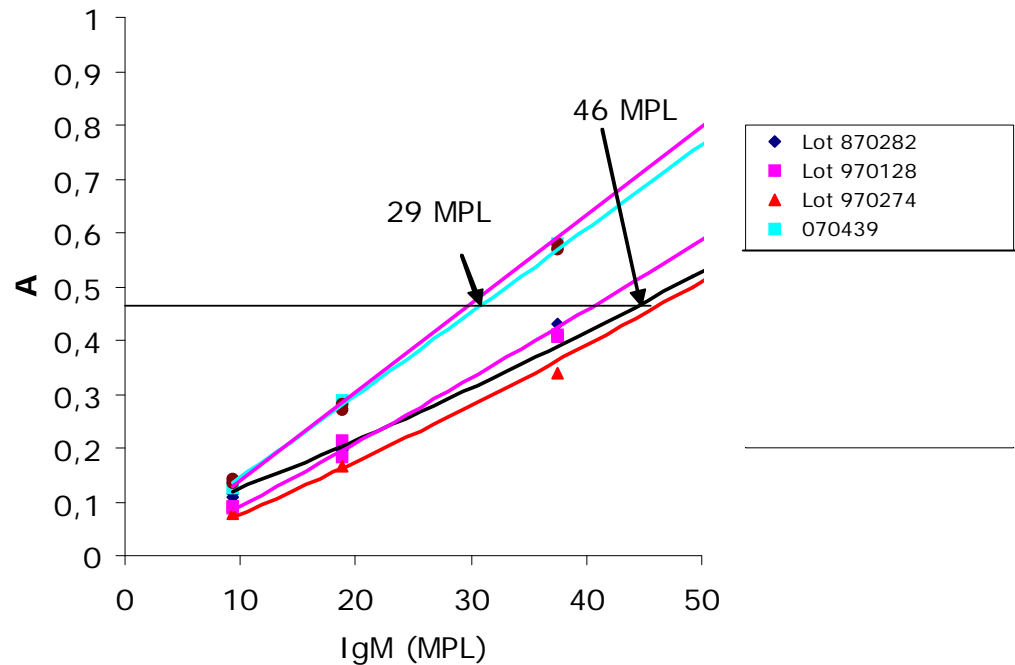
# Kardioliipiinivasta-aineet

- Saman valmistajankin erissä vaihtelua → erän vaihtuessa erityisen tärkeää tarkastaa tason säilyminen
- Älä luota pelkästään valmistajan kontroleihin!

ACA IgM



ACA IgM

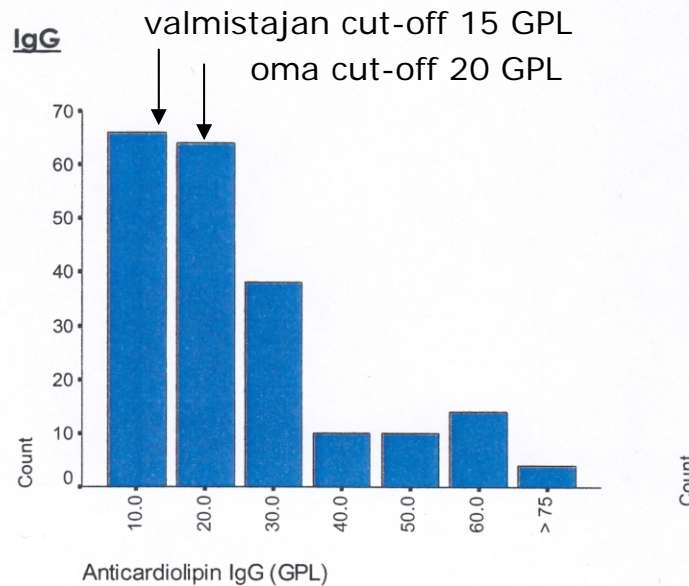


# Ulkoinen laadunarviointi, kardiolipiini- ja beeta-2-glykoproteiinivasta-aineet



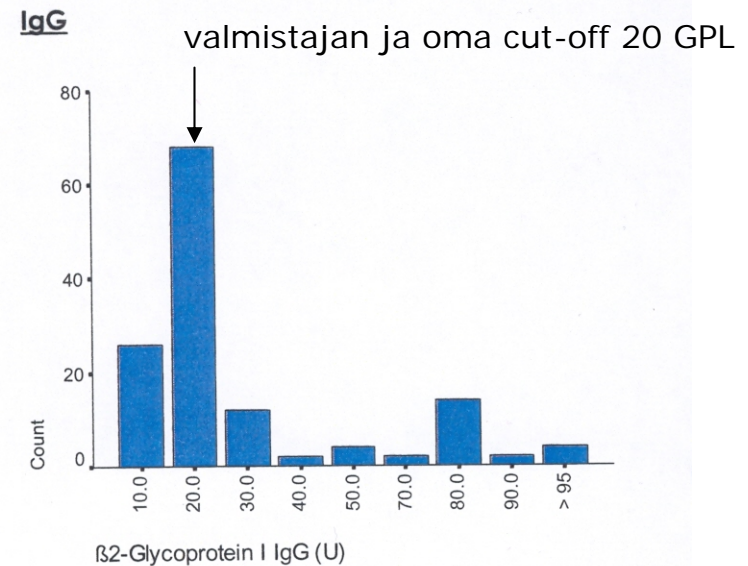
ECAT FOUNDATION  
INTERNATIONAL EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT  
PROGRAMME IN HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS

## ANTICARDIOLIPIN ANTIBODIES



ECAT FOUNDATION  
INTERNATIONAL EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT  
PROGRAMME IN HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS

## β2-GLYCOPROTEIN I ANTIBODIES



## Yhteenveto

- Hemostaasitutkimusten preanalytiikkaan on alettu kiinnittää erityistä huomiota vasta 1990-luvun loppupuolella
- Lisääntyneen tietämyksen myötä ohjeistukset ovat täsmentyneet ja muuttuneet
- Menetelmät ovat kehittyneet huomattavasti ja niitä on automatisoitu, mikä on parantanut toistettavuutta; paljon on kuitenkin vielä parannettavaa
- Diagnoosikriteerit ovat vuosien saatossa muuttuneet

Hemostaasitutkimusten määrittäminen on erittäin haasteellista

Poikkeava tulos pitää varmistaa toisesta näytteestä

Potilastulokset tulee tarvittaessa arvioida tapauskohtaisesti