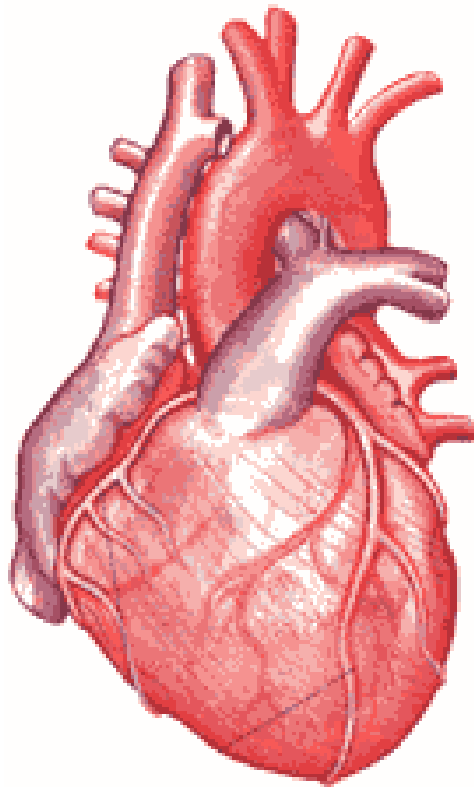


# Tre metoder – Ett arbete

---

En undersökning av användarvänligheten, effektiviteten och känsligheten hos flödescytometri, **Multiplate™** och ljustransmissionsaggregometri för att mäta hämning av blodplättarnas ADP-receptor P2Y<sub>12</sub>



Ebba Blomberg Cedergren

Maria Lindahl

Katedralskolan Nv3d

2011/2012

# Sammanfattning

---

Vi har fördjupat oss inom ämnesområdena biologi, klinisk kemi och medicin eftersom dessa områden intresserar oss. Vårt specialarbete inriktades på sjukdomen hjärtinfarkt och hur man behandlar det.

I vårt arbete undersökte vi de tre olika metoderna flödescytometri, Multiplate™ och ljustransmissionsaggregometri. En stor del av projektet ägnades åt att utvärdera dessa tre olika metoder som bland annat mäter hur väl läkemedlet Plavix® hämmar trombocyternas (blodplättarnas) aktivitet. Plavix® ges till patienter efter deras första hjärtinfarkt för att förebygga nyinsjuknande och verkningsmekanismen för medicinen är att hämma trombocyternas aktivitet så att en ny hjärtinfarkt förhindras.

Vi jämförde noggrannheten för de olika instrumenten, hur användarvänliga de är för personal samt hur mycket medicinens verkan skiljer sig mellan olika patienter. Vår undersökning har skett på en medicin som liknar Plavix®, som heter cangrelor. Detta gjordes eftersom cangrelor är direktverkande i blodet medan Plavix® börjar verka först efter att det passerat och modifierats i levern. Cangrelor är således enklare att studera.

Problemet med dagens trombocythämmande läkemedel är att ge rätt dos. Man vill förhindra ny trombos (blodpropp) i hjärtats kranskärl, men vill samtidigt inte få problem med blödning, inte minst om man till exempel måste operera patienten. De tre metoder som vi undersökt antas kunna mäta effekten av läkemedel som hämmar trombocytens receptor för adenosindifosfat (ADP), och på så sätt borde man kunna bedöma hur stor receptorhämmning man fått, och förhoppningsvis vilken risk för trombos eller blödning det kan innebära. Arbetet gick således även ut på att undersöka huruvida individanpassad dosering är möjlig.

Alla tre metoder, flödescytometri, Multiplate™ och ljustransmissions aggregometri, var noggranna och kunde detektera låga doser av medicinen. Våra slutsatser är dock att Multiplate™ lämpar sig bäst ute på klinik för rutinärenden då den både är användarvänlig och prisvärd. Vi kom även fram till att då medicinens verkningsgrad skiljer sig förhållandevis mycket mellan patienter bör en individanpassad dosering föredras.

# Innehållsförteckning

---

Sammanfattning	1
Innehållsförteckning	2
1. Inledning	3
1.1 Teoretisk bakgrund	3
2. Metod	8
2.1 Källor och materiel	10
3. Resultat	11
3.1 Flödescytometri	11
3.2 Multiplate™	15
3.3 Ljustransmissionsaggregometri	18
4. Diskussion	20
4.1 Flödescytometri	20
4.2 Multiplate™	21
4.3 Ljustransmissionsaggregometri	21
4.4 Jämförelse mellan metoderna	21
4.5 Individanpassad dosering	22
4.6 Felkällor	23
4.7 Förslag till förbättringar	23
4.8 Källkritik	24
5. Referenslista	25
6. Bilaga 1	26
7. Bilaga 2	43

# 1. Inledning

---

Syftet med vårt projektarbete är att lära oss själva mer om hjärtinfarkt och hur man förhindrar en ny hjärtinfarkt.

De frågeställningar som ligger till grund för vårt projektarbete är följande:

- Vad är hjärtinfarkt, hur uppkommer den och vilka drabbas?
- Hur behandlar man hjärtinfarkt?
- Hur kan man mäta effekten av trombocythämmande läkemedel?
- Hur låga doser av trombocythämmande läkemedel kan olika metoder detektera?
- Hur användarvänliga är metoderna?
- Hur mycket varierar resultaten mellan metoderna och vad får resultaten att variera?

## 1.1 Teoretisk bakgrund

---

### Händelseförlopp och effekter av hjärtinfarkt

Hjärtinfarkt (myokardinfarkt) är en kraftfull process som startar i de inre hjärtmuskelskikten för att sedan spridas till de yttre. Infarkten uppkommer då en hård orsakad av ateroskleros (åderförfettning) bildas i en eller flera av kransartärerna. När sedan sprickor uppkommer i det aterosklerösa området frisätts ämnen som aktiverar blodplättar (även kallade trombocyter). Förutom detta frigörs även kärlsammandragande ämnen.<sup>1</sup> Detta leder vanligtvis till att en blodpropp (trombos) bildas på den plats på artärväggen där härden sitter. Med detta menas att trombocyterna aktiveras av till exempel ADP som gör att de klumpar sig och bildar en propp. Konsekvensen av detta blir en bristande syre- och näringstillförsel i den del av hjärtmuskeln som artären med proppen leder till. Då skapas en akut celledöd i det berörda muskelområdet. Följden av detta är en hjärtinfarkt.<sup>2</sup>

Omfattningen på hjärtinfarkten beror på flera olika faktorer. Exempelvis, hur lång tid de berörda kärlen är tilltäppta samt omfattning och volym av de tilltäppta kärlen. Allt som allt tar händelseförloppet för en hjärtinfarkt cirka tio timmar vilket gör att man i tidigt sjukdomsstadium kan påverka utvecklingen av hjärtinfarkten och den slutgiltiga storleken av skadan på hjärtmuskeln.<sup>2</sup>

### Förekomst och drabbade

Antalet personer som vårdades på sjukhus i Sverige för akut hjärtinfarkt var år 2008 cirka 24 000. Risken att drabbas av en hjärtinfarkt ökar med åldern och två tredjedelar av de insjuknade är 75 år eller äldre.<sup>1</sup> Andra faktorer som påverkar sannolikheten att drabbas av hjärtinfarkt är högt blodkolesterol, högt blodtryck, rökning och kön. Den största riskgruppen är män som röker omkring 65 års ålder.<sup>2</sup>

När man pratar om hjärtinfarkt och vilka faktorer som är utlösande har man infört begreppet riskfaktorer. Detta innebär att man har hittat vissa riskfaktorer för denna sjukdom men det är långt ifrån alla som drabbas som har någon riskfaktor. Till att börja med finns det ärftliga faktorer som påverkar risken för att få hjärtinfarkt, man vet inte riktigt vad det är som påverkar i våra gener. Troligtvis beror denna genetiska riskfaktor på andra saker så som ärftligt högt blodtryck eller blodfettssubbningar hos män.

En sak som dock tydligt påvisats vara en riskfaktor för hjärtinfarkt är rökning. Personer som avlider i hjärtinfarkt är oftare rökare och de rökare som slutar har en avsevärt större chans att överleva. Anledningen till varför just rökning är skadligt är att i samma ögonblick som det utövas ökar såväl det systoliska som det diastoliska artärtrycket och även pulsen. Cigarettrökning påverkar även blodets förmåga att transportera syre.

Andra faktorer som ökar risken för att drabbas av en hjärtinfarkt är högt blodtryck och förhöjda blodfetter. Artärerna i vår kropp åldras och en allt för stor andel blodfetter i kombination med ett högt blodtryck ökar risken för att det ska bli ett stopp som förorsakar en hjärtinfarkt.

Diabetes, både typ I och II, medför en ökad risk för hjärtinfarkt och diabetes typ II kan förebyggas genom att sköta sin kropp. Många pratar även om den ökade risken då man är överviktig. Själva fetman i sig är inte ett problem men ofta följer med övervikten en rad andra komplikationer så som ökad blodfettshalt. Hur vi själva upplever stress i våra liv är en annan viktig faktor. Om vi har ett allt för högt tempo under en längre tid så är det bevisat att risken för hjärtinfarkt ökar.<sup>3</sup>

Faktum är att hjärtinfarkt, som enskild sjukdom, är den vanligaste dödsorsaken i Sverige.<sup>6</sup> Statistiskt sett avlider en femtedel av de insjuknande redan första dygnet, ofta på grund av att patienten inte hinner fram till sjukhuset. Dock kan sjukhuset göra stora insatser för de drabbade.<sup>1</sup>

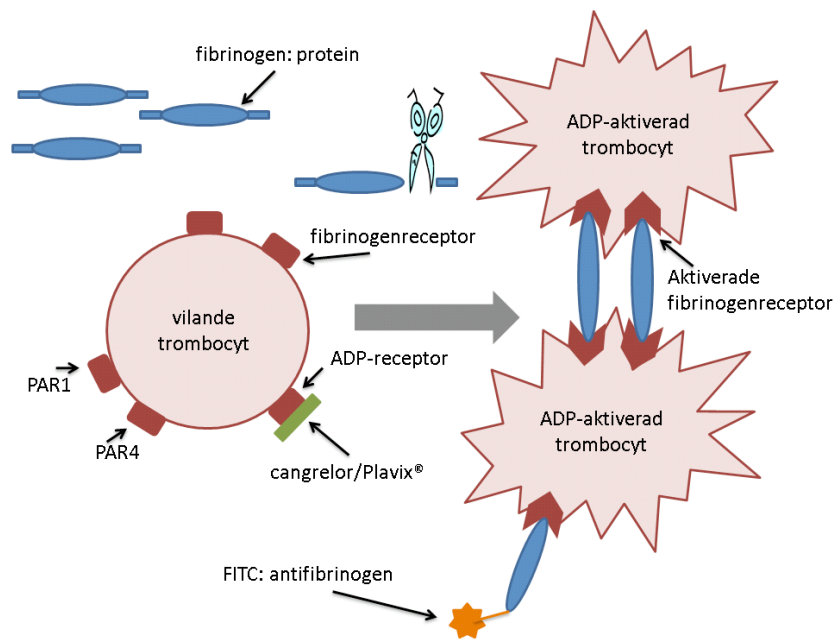
### Behandling av hjärtinfarkt

Det första som sker då en hjärtinfarktspatient anländer till sjukhuset är att EKG och blodanalyser tas för att kunna ställa en säker diagnos. Behandling bygger på att se till att hjärtinfarkten inte sprider sig till övriga delar av hjärtat. Det är också viktigt att blodtrycket återgår till det normala och att patienten får smärtstillande medel.

Vanligtvis görs koronarangiografi i det akuta skedet vilket är en röntgenundersökning av kransartärerna. Denna undersökning bygger på att man sprutar in kontrastmedel i hjärtat via en kateter för att kunna se kransartärerna och dess grenar. Då man ser en propp kan den behandlas med angioplastik (ballongvidning). I vissa fall är en bypassoperation (kranskärlsoperation) nödvändig.<sup>2</sup>

För att blodflödet ska återgå till det normala brukar man ge trombolysbehandling (blodproppslösande läkemedel).<sup>2</sup> Dels används trombolys i det akuta skeendet för begränsa infarktområdet. Tidsaspekten är för den tidiga trombolysen är mycket avgörande. Sedan finns även senare trombolys. Denna trombolys är viktig för att förhindra att infarkten ökar i utbredning och för att gynna blodperfusionen (blodflödet) i området runt infarkten. Forskning på olika trombolytiska preparat har visat att det finns mycket små skillnader avseende gynnsamma effekter eller komplikationsrisker mellan dem. En vanlig komplikation av trombolys är blödning, genom långtidsbehandling med Waran® minskas denna risk.<sup>4</sup>

Plavix®<sup>7</sup> är ett trombocythämmande läkemedel som ges till patienter som har drabbats av en tidigare hjärtinfarkt. Medicinen verkar genom att den hämmar trombocyternas aktivitet då den blockerar ADP från att aktivera dem (se figur nedan).



Tablettdoseringen av Plavix® kan komma att behöva justeras mellan tillfällena, ytterligare svårigheter med denna behandling är att andra mediciner kan påverka effekten på trombocyterna, till exempel vissa värktabletter. En av de allvarligaste bieffekterna är risken för blödning vid en eventuell operation, något som kan leda till att man förblöder.<sup>3</sup>

I dagens läge är inte mängden läkemedel individanpassad. Detta kan leda till att doseringen är mer eller mindre effektiv. Anledningen till att alla får samma dos är att det är både kostsamt och tidskrävande att mäta effekten av medicinen hos varje individ. Flertalet instrument har på senare tid blivit tillgängliga för att kunna mäta effekten av behandlingen, vilket i förlängningen skulle kunna göra en individanpassad dosering möjlig. I vår studie kommer vi att titta närmare på några av dessa instrument; flödescytometri, ett mer patientnära aggregationstest i blod, Multiplate™ och ljustransmissionsaggregometri.<sup>5</sup>

## Flödescytometri

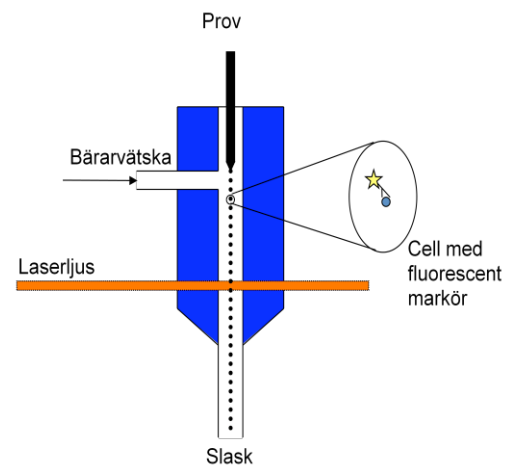
Flödescytometri innebär att man låter celler passera genom en smal passage där de beskjs med laserstrålar. Med dessa strålar kan man avläsa storleken på cellen och mängden granula (små korn i cytoplasman). Denna information visar då huruvida det är en blodplätt, röd blodkropp eller vit blodkropp.<sup>5</sup>

I vår undersökning vill vi endast avläsa informationen angående blodplättar eftersom vi intresserar oss för hur aktiverade trombocyterna blir vid olika doser av medicinering av Plavix®. Man säger att flödescytometri är ett statiskt system vilket innebär att man aktiverar trombocyterna utan omrörning och sedan stoppar aktiveringen innan man låter cellerna passera laserstrålen. Sedan avläses andelen aktiverade trombocyter.

I flödescytometri använder man helblod. De två typer av helblod som vi använt oss av är citratblod och hirudinblod, dessa har olika antikoaguleringslösningar och dessutom har citratblod en lägre kalciumhalt än hirudin. I flödescytometri använder man oftast citratblod eftersom det aktiveras bättre av ADP.

## Multiplate™

Multiplate™ går även den ut på att mäta aktiveringen av trombocyterna. Till skillnad från flödescytometri är Multiplate™ en dynamisk metod. Man mäter alltså vad som händer när blodet får aktiveras (aggregera) under omrörning och mäter vid varje tidpunkt under aktiveringen. Multiplate™ bedömer trombocytaggregationen genom att läsa av resistansen mellan två elektroder vilket innebär att man inte behöver centrifugera helblodet ner till plasma och trombocyter. För att fullständig aggregation ska kunna ske bör man använda hirudinblod eller citratblod med kalcium, eftersom trombocytens receptor för fibrinogen är beroende av kalcium för att kunna fungera effektivt och binda ihop cellerna med hjälp av fibrinogen från plasman.



## Ljustransmissionsaggregometri

Ljustransmissionsaggregometri innebär att man låter en ljusstråle gå genom en lösning av enbart plasma och trombocyter och detekterar hur mycket ljus lösningen släpper igenom. Ju mer ljusgenomsläppligt desto mer aktiverade är trombocyterna. Till skillnad från Multiplate™ måste man låta helblodet centrifugeras, det vill säga för att få en lösning av plasma och trombocyter måste man från början låta helblod centrifugeras så att g-kraften skiljer blodkropparna från plasman och trombocyterna. Precis som Multiplate™ är ljustransmission en dynamisk metod.



## 2. Metod

---

Projektet inleddes med informationssökning om hjärtinfarkt för att arbetet på avdelningen för klinisk kemi skulle bli så lättförståeligt som möjligt och för att forskningen skulle få bästa möjliga resultat. Fokus i analysen ligger på de vanliga läkemedlen som används idag, ASA-profylax, olika ADP-receptorhämmare som till exempel Plavix®/clopidogrel och fibrinogenreceptorhämmare.

På klinisk kemi finns tillgång till ett antal metoder som kan användas för att mäta trombocytaktivitet och bedöma hämning av ADP-receptorn. De tre metoderna som ligger till grund för projektet är flödescytometri, trombocyttaggregometri med ljustransmission och ett mer patientnära aggregationstest i blod, Multiplate™.

Ett stort tack vill vi ge Sofia Ramström och Martina Nylander för all hjälp och rådgivning som Ni gav oss under projektets gång.

### Flödescytometri

Arbetet inleds med försöken med flödescytometri. Provrören markerade med 1-11 prepareras med blod från blodgivare 1 tillsammans med tillsatser enligt nedan:

Koncentration av aktivator, ADP = 0,13mM

Tabell 1:

Rör	Preparation
1	Hepesbuffert med EDTA (sänker calciumnivån så att fibrinogenreceptorn ej aktiveras)
2-11	Hepesbuffert 1-3 Nollkontroll Ingen aktivator Hämmare: Hepesbuffert anti-fibrinogen-antikropp
4-5	Aktivator: ADP Hämmare: NaCl anti-fibrinogen-antikropp
6-7	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-8}$ M anti-fibrinogen-antikropp
8-9	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-9}$ M anti-fibrinogen-antikropp
10-11	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-10}$ M anti-fibrinogen-antikropp

Tabell 2:

Rör	Preparation
1	Hepesbuffert med EDTA (sänker calciumnivån så att fibrinogenreceptorn ej aktiveras)
2-11	Hepesbuffert 1-3 Nollkontroll Ingen aktivator Hämmare: Hepesbuffert anti-fibrinogen-antikropp
4-5	Aktivator: ADP Hämmare: NaCl anti-fibrinogen-antikropp
6-7	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-5}$ M anti-fibrinogen-antikropp
8-9	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-6}$ M anti-fibrinogen-antikropp
10-11	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-7}$ M anti-fibrinogen-antikropp

För mer information se bilaga 1.

I omgång 1 (se tabell 1) prepareras dubbla set för att öka noggrannheten av resultaten. Provrören sätts sedan in i flödescytometern och resultaten läses av.

Efter detta följer omgång 2 av flödescytometri och även här används blod från blodgivare 1. Sedan prepareras dubbla set (se tabell 2), omgången körs och resultaten läses av.

I den sista omgången, omgång 3, på flödescytometern görs seten med två olika blodprov från en ny blodgivare, antikoagulerade med hirudin eller citrat. Detta eftersom kommande metoder kräver olika antikoaguleringsstillsatser. I övrigt prepareras de som tidigare omgångar, körs och resultaten läses av.

### **Multiplate™**

Sedan följer försöken på Multiplate™. Här körs tre omgångar, den första med blod från blodgivare 2 och de två följande med blod från blodgivare 3.

Den första omgången prepareras med provkoppar med en liten loppa. Dess funktion är omrörning av lösningen. Sedan följs instruktionerna (se bilaga 2) som ges av apparaten, där varje provkopp ska ha sin mängd buffert, aktivator och hämmare.

Tabell 3:

Rör	Preparation
1	Ingen ADP
2	Nollkontroll Aktivator: ADP Ingen hämmare
3	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-5}$ M
4	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-6}$ M
5	Aktivator: ADP Hämmare: cangrelor $10^{-7}$ M

Den andra och tredje omgången preparerades som den första omgången, men med blod från en annan blodgivare. Proverna körs och resultaten läses av.

I den avslutande omgången på Multiplate™ körs citratblod och citratblod med kalcium för att se om det blir någon skillnad i resultat, då Multiplate™-manualen kräver att citratblod ska köras med kalcium, men att det skulle kunna missas av en ovan användare.

### Ljustransmissionsaggregometri

Laborationen avslutades med försöken med ljustransmissionsaggregometri. Då denna metod mäter antalet hämmade trombocyter genom ljusinsläpp så behövde trombocyterna separeras från de röda blodkropparna. Helblodet behövde således centrifugeras så att trombocyterna och de andra blodkropparna separerades. Sedan pipetterades den trombocytrika plasman till fyra olika rör.

Dessa rör preparerades med olika koncentrationer cangrelor:  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  och  $10^{-7}$  M. Därefter nollställdes maskinen och ett nollprov med NaCl sattes i maskinen. Därefter kunde de andra proven placeras i de olika ingångarna. Vid en viss tidpunkt tillsattes ADP som aktiverade trombocyterna. Sedan följdes aggregationen med tiden. Därefter stängdes maskinen av och ur ett diagram kunde sedan graden av trombocyttaggregation avläsas mot tiden. Sammanlagt kördes denna metod 3 gånger.

## 2.1 Källor och materiel

---

Sakkunniga (se referenslista)

Litteratur (se referenslista)

Internet (se referenslista)

Utrustning (se metodbeskrivning 2)

## 3. Resultat

---

Nedan följer de olika laborationsresultaten.

### 3.1 Flödescytometri

---

Hämmningsgraden räknades ut genom:

(100 % - procentsatsen i aktuella röret) / (medelvärdet av rör 4 och 5)

#### Omgång 1, blodgivare 1

Laborant 1			Laborant 2		
Rör	Aktiverade trombocyter	Listnummer	Rör	Aktiverade trombocyter	Listnummer
1	5,2 %	639	1	5,7 %	650
2	4,4 %	640	2	5,7 %	651
3	4,1 %	641	3	6,4 %	652
4	61,9 %	642	4	64,9 %	653
5	57,0 %	643	5	58,2 %	654
6	61,7 %	644	6	62,2 %	655
7	57,5 %	645	7	62,7 %	656
8	58,8 %	646	8	59,3 %	657
9	61,7 %	647	9	59,2 %	658
10	63,9 %	648	10	60,3 %	659
11	62,3 %	649	11	57,9 %	660

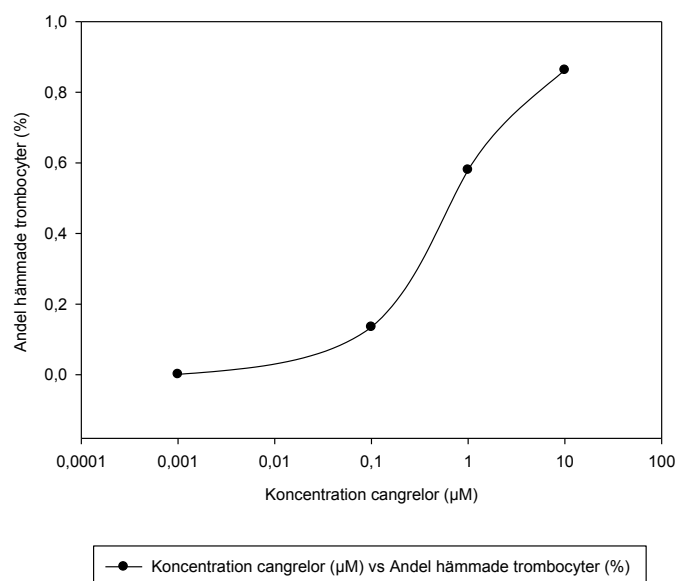
Laborant 1			Laborant 2		
Rör	Hämningsgrad	Listnummer	Rör	Hämningsgrad	Listnummer
4	0 %	642	4	0 %	653
5	0 %	643	5	0 %	654
6	0 %	644	6	0 %	655
7	0 %	645	7	0 %	656
8	0 %	646	8	0 %	657
9	0 %	647	9	0 %	658
10	0 %	648	10	0 %	659
11	0 %	649	11	0 %	660

### Omgång 2, blodgivare 1

Laborant 1			Laborant 2		
Rör	Aktiverade trombocyter	Listnummer	Rör	Aktiverade trombocyter	Listnummer
1	3,5 %	661	1	5,7 %	672
2	5,8 %	662	2	5,6 %	673
3	4,8 %	663	3	5,1 %	674
4	69,7 %	664	4	67,6 %	675
5	71,3 %	665	5	70,3 %	676
6	9,3 %	666	6	8,7 %	677
7	9,8 %	667	7	10,0 %	678
8	32,0 %	668	8	26,6 %	679
9	28,6 %	669	9	29,7 %	680
10	58,8 %	670	10	60,7 %	681
11	61,2 %	671	11	61,0 %	682

Laborant 1			Laborant 2		
Rör	Hämmningsgrad	Listnummer	Rör	Hämmningsgrad	Listnummer
4	0 %	664	4	0 %	675
5	0 %	665	5	0 %	676
6	87 %	666	6	87 %	677
7	86 %	667	7	85 %	678
8	55 %	668	8	61 %	679
9	59 %	669	9	57 %	680
10	17 %	670	10	12 %	681
11	13 %	671	11	12 %	682

#### Flödescytometri omgång 2

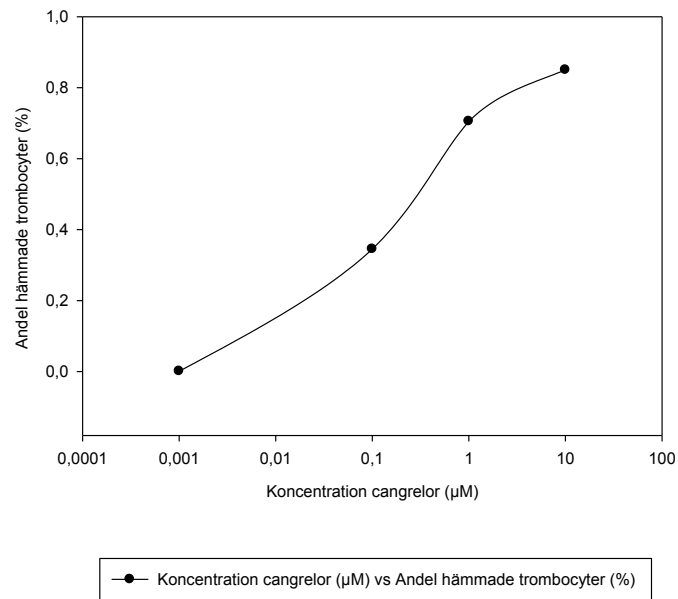


## Omgång 3, blodgivare 2

Laborant 1: citratblod			Laborant 2: hirudinblod		
Rör	Aktiverade trombocyter	Listnummer	Rör	Aktiverade trombocyter	Listnummer
1	4,1 %	688	1	5,4 %	699
2	4,5 %	689	2	5,8 %	700
3	5,9 %	690	3	5,5 %	701
4	55,1 %	691	4	49,6 %	702
5	54,8 %	692	5	51,7 %	703
6	7,6 %	693	6	7,7 %	704
7	6,4 %	694	7	9,8 %	705
8	15,7 %	695	8	15,5 %	706
9	15,0 %	696	9	15,6 %	707
10	32,1 %	697	10	35,3 %	708
11	37,3 %	698	11	33,6 %	709

Laborant 1: citratblod			Laborant 2: hirudinblod		
Rör	Hämningegrad	Listnummer	Rör	Hämningegrad	Listnummer
4	0 %	691	4	0 %	702
5	0 %	692	5	0 %	703
6	86 %	693	6	85 %	704
7	88 %	694	7	81 %	705
8	71 %	695	8	69 %	706
9	73 %	696	9	69 %	707
10	42 %	697	10	30 %	708
11	32 %	698	11	34 %	709

### Flödescytometri omgång 3



## 3.2 Multiplate™

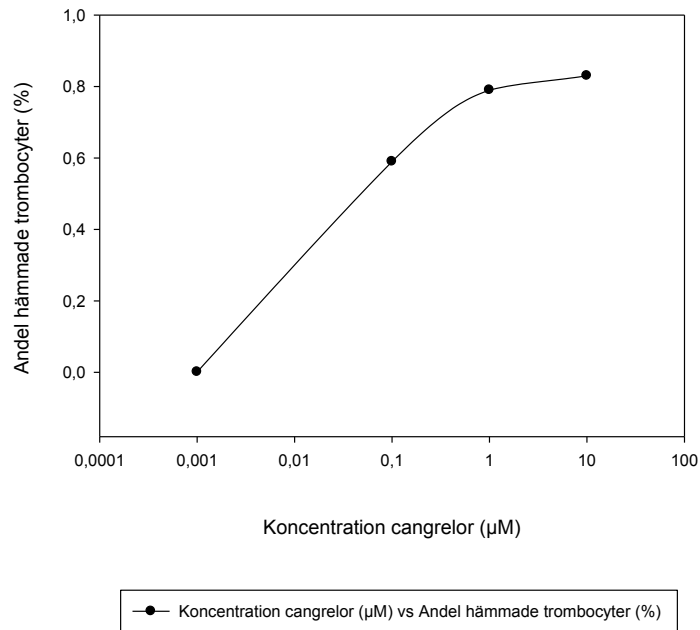
(100 % - procentsatsen i aktuella röret) / (avläsning på resultatdiagram)

Omgång 1, blodgivare 2

Koncentration Cangrelor	Hämmningsgrad
0 M	0 %
$10^{-5}$ M	83 %
$10^{-6}$ M	79 %
$10^{-7}$ M	59 %



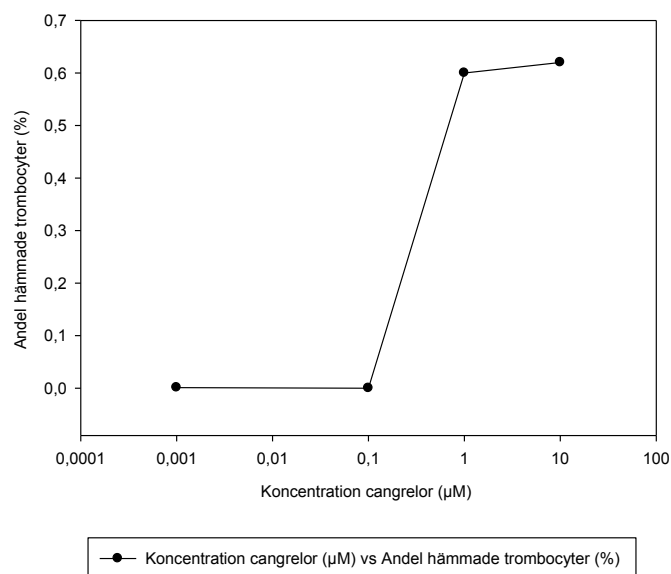
### Multiplate omgång 1



### Omgång 2, blodgivare 3

Koncentration Cangrelor	Hämmningsgrad
0 M	0 %
$10^{-5}$ M	62 %
$10^{-6}$ M	60 %
$10^{-7}$ M	0 %

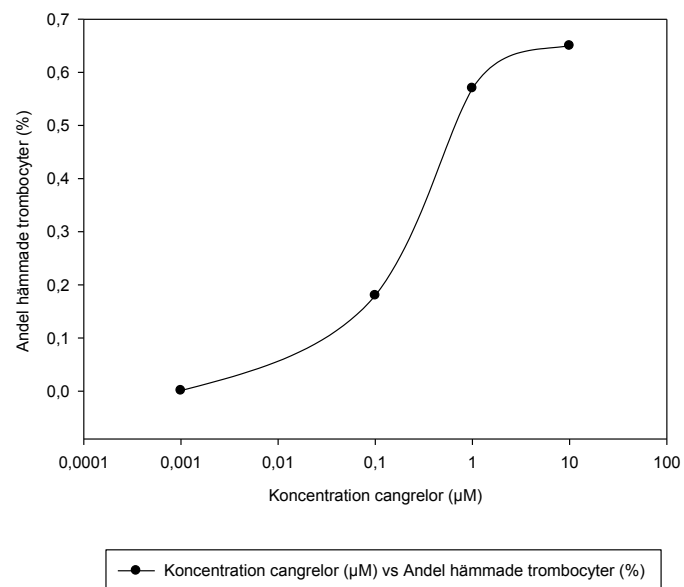
### Multiplate omgång 2



### Omgång 3, blodgivare 3

Koncentration Cangrelor	Hämmningsgrad
0 M	0 %
$10^{-5}$ M	65 %
$10^{-6}$ M	57 %
$10^{-7}$ M	18 %

Multiplate omgång 3



### Omgång 4, blodgivare 4

Blodtyp	Hämmningsgrad
Hirudin	0 %
Citrat	49 %
Citrat med kalcium	18 %

### 3.3 Ljustransmissionsaggregometri

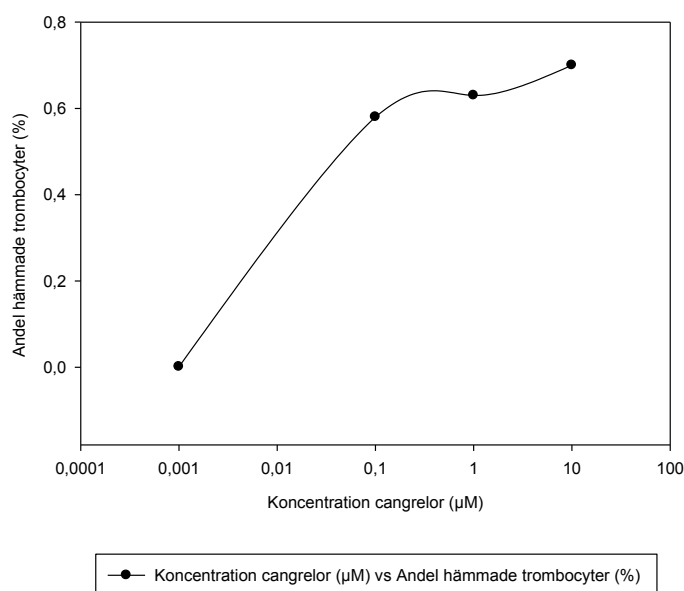
(100 % - procentsatsen i aktuella röret) / (avläsning på resultatdiagram)

#### Omgång 1, blodgivare 5

12.30

Koncentration Cangrelor (M)	Hämmningsgrad
0	0 %
$10^{-5}$	70 %
$10^{-6}$	63 %
$10^{-7}$	58 %

Ljustransmissions aggregometri omgång 1

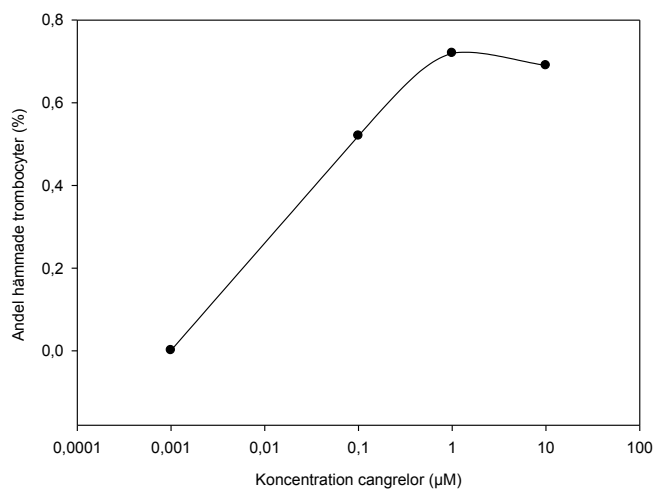


#### Omgång 2, blodgivare 5

13.00

Koncentration Cangrelor (M)	Hämmningsgrad
0	0 %
$10^{-5}$	69 %
$10^{-6}$	72 %
$10^{-7}$	52 %

### Ljustransmissions aggregometri omgång 2



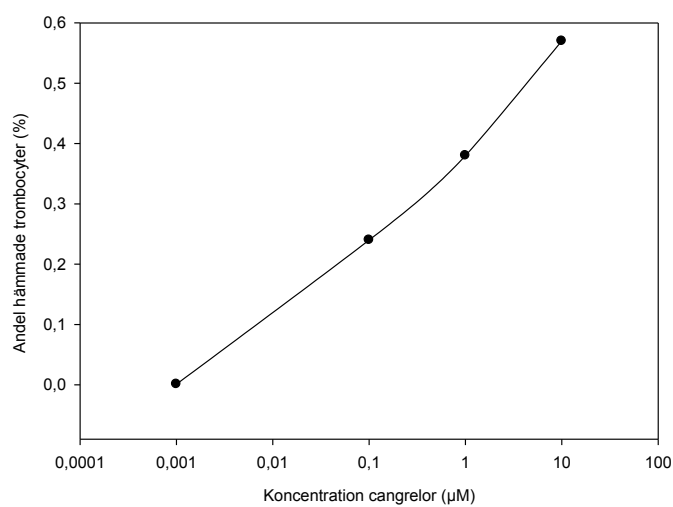
—●— Koncentration cangrelor (µM) vs Andel hämmade trombocyter (%)

### Omgång 3, blodgivare 5

13.30

Koncentration Cangrelor (M)	Hämmningsgrad
0	0 %
$10^{-5}$	57 %
$10^{-6}$	38 %
$10^{-7}$	24 %

### Ljustransmissions aggregometri omgång 3



—●— Koncentration cangrelor (µM) vs Andel hämmade trombocyter (%)

## 4. Diskussion

---

Under detta avsnitt följer en diskussion kring vår forskning. Inledningsvis, en för låg dosering av Plavix kan öka risken för proppbildning och som i sin tur leder till en ny hjärtinfarkt. Samtidigt kan en för hög dos av Plavix ge en ökad risk för blödning.

### 4.1 Flödescytometri

---

#### Omgång 1

I denna omgång användes för låga koncentrationer av hämmaren cangrelor. Doserna var så pass låga att vi inte kunde se en hämning av trombocyterna, således var de flesta trombocyter, vad vi kunde se, aktiverade. Detta kan även ha berott på metoden i sig då den eventuellt inte kan avläsa denna låga koncentration av hämmade trombocyter.

Dessutom visade denna omgång att det inte var någon betydande skillnad mellan de personer som utförde försöket då resultatet bara skiljde sig marginellt mellan laboranterna.

#### Omgång 2

För omgång två användes högre doser av cangrelor och vi fick nu ett utslag som gick att avläsa. Detta tyder på att metoden är bra och noggrann då den kunde detektera dessa låga doser och att det, mellan laboranterna, var jämna resultat.

I provrör nummer 10 och 11 ser vi en väldigt liten hämning på trombocyterna, vilket betyder att medicinen i denna dos inte skulle ge patienten den effekt som önskas. Således behöver denna person ha mer läkemedel än denna dos i sitt blod om man vill ha tillräcklig hämning på trombocyterna för att minska risken för hjärtinfarkt.

Om denna patient däremot skulle behöva opereras är detta ett bra resultat av hämmade trombocyter då man behöver de aktiverade trombocyterna för att förhindra förblödning.

#### Omgång 3

Här har vi använts oss av samma koncentrationer som i tidigare omgång men två olika typer av blod. Vi ser då att citratblodet reagerar bättre än hirudinblodet i metoden men vi får inte någon avgörande skillnad.

Den avgörande skillnaden från tidigare omgångar är att vi nu har en ny blodgivare. Vi kan då se om vi jämför med tidigare resultat att det skiljer sig mellan individer hur hämmad trombocyterna blir av samma dos medicin. Även denna patient får en alldeles för liten effekt i provrör 10-11 men som skulle vara ett bra resultat om patienten skulle opereras.

## 4.2 Multiplate™

---

Även den här metoden visar att effekten av cangrelor skiljer sig mellan olika individer, blodgivare. Denna metod ger bra jämna resultat vilket vi kan se mellan omgång 2 och 3 då vi här har samma blodgivare men blodet har stått olika länge. Resultaten för omgång 2 och 3 är förhållandevis jämna men i och med att blodet stått olika länge ses en viss skillnad för andel hämmade trombocyter.

I omgång 4 jämfördes hirudinblod, citratblod samt citratblod med kalcium. Vanligtvis använder man hirudinblod. Då man istället skulle använda citratblod ger det ett mycket annorlunda resultat, trots att tiden och blodgivaren är densamma. Citratblodet ger ett felaktigt utslag som visar att stor del av trombocyterna är hämmade. Faktum är att trombocyterna är mycket aktiverade, vilket påvisades av både försöket med hirudinblod och försöket med citratblod med kalcium. Detta leder till att om fel blodtyp används kan en fel diagnos ställas, patienten kan alltså få en för hög/låg dos av Plavix®, eftersom som det skiljer så pass mycket mellan blodtyper.

## 4.3 Ljustransmissionsaggregometri

---

För denna metod kunde vi inte undersöka huruvida det skiljer sig mellan olika patienter, troligtvis skulle även denna metod påvisa detta då det handlar om de egenskaper en individs blod har. Denna metod ger förhållandevis jämna resultat. Vi kan dock se en skillnad mellan de tre omgångarna, denna skillnad kan bero på att blodet analyserades vid olika tidpunkter.

I omgång 2 fick vi ett avvikande resultat av hämmade trombocyter vilket sannolikt berodde på en fel-pipettering. Detta tyder på att metoden är känslig och noggrann.

Blodgivaren som vi användes oss av svarade bra på medicinerna och skulle inte behöva en särskilt hög dos för att få en fullständig blockering av aktiverade trombocyter.

## 4.4 Jämförelse mellan metoderna

---

Man kan jämföra dessa metoder på flera olika sätt. Det finns den resultatmässiga biten, den användarvänliga biten och den ekonomiska biten. För att vi ska kunna komma fram till vilken metod som faktiskt är bäst måste man väga in alla dessa faktorer.

Ur resultatsynpunkt så har vi fått ut det vi har velat, metoderna har visat sig vara effektiva utifrån vår frågeställning. Alla tre metoderna kan detektera låga koncentrationer av cangrelor och de har en bra jämnhet i sina resultat. Skillnaden mellan laboranter är inte avgörande vilket är en viktig faktor om metoden ska användas på klinik.

Metod	Omgång 1 Koncentration cangrelor $10^{-7}$ M	Omgång 3 Koncentration cangrelor $10^{-7}$ M
Flödescytometri	60 % eller 60,9 %	37 % eller 32 %
Multiplate™	59 %	18 %
Ljustransmissionsaggregometri	58 %	24 %

Som vi kan se i tabellen ovan skiljer procentsatsen hämmade trombocyter sig inte avsevärt mellan de tre olika metoderna på omgång 1 och 3 trots att det var olika blodgivare. Mellan omgång 1 och omgång 3, för alla metoder, skiljer det sig mer detta kan bero på olika blodgivare, tiden och den mänskliga faktorn. Metodernas resultat får inte variera avsevärt då detta kan leda till feldosering av medicin hos patienter. Som man kan se i resultatdelen varierar inte heller svaren mellan de tre metoderna.

En annan viktig del för oss är hur användarvänliga dessa metoder är. Flödescytometrin var mycket komplicerad att arbeta med och den krävde mycket förberedelser. Det var många bitar som man var tvungen att förstå samtidigt som metoden är väldigt mångsidig och kan testa fler faktorer än just de vi var intresserade av i vår studie.

Multiplate™ var den allra lättaste metoden då man följde instruktioner som dök upp på datorskärmen. Detta ledde till ett mycket pedagogiskt arbetssätt som inte krävde varken mycket tid eller förkunskap.

Ljustransmissionsaggregometri var arbetsmässigt relativt lätt att utföra, den krävde inte lika mycket förberedelser som flödescytometri men betydligt mer än Multiplate™. Den gick dock snabbt att köra och krävde inte stora mängder förkunskap.

Multiplate™ är betydligt billigare än både flödescytometrin och ljustransmissionsaggregometrin, vilket också speglar deras användningsområden, om man vill använda dem i forskningssynpunkt eller endast ute på kliniken för att köra prover.

Sammanfattningsvis tycker vi att Multiplate™ lämpar sig bäst för rutinarbete ute på kliniken då den är lättanvänd, liten och prisvärd. För speciella fall som forskning och svåra patientfall är flödescytometrin att föredra trots dess höga kostnad.

## 4.5 Individanpassad dosering

---

I nuläget används inte individanpassad dosering av Plavix®, alla patienter i Östergötlands län får samma dos av medicinen. Detta på grund av att det tar mycket tid och är kostsamt att individanpassa doseringen. Det saknas dessutom studier på området vilket gör att man inte vet om man skulle vinna något på att använda sig av individanpassad dosering. Att göra en sådan studie är krävande och svår att genomföra då det behövs många försökspersoner.

Det är möjligt att den extra kostnaden som en individanpassad dosering kräver kan hämtas in då färre komplikationer, som exempelvis blödningar vid en operation, inträffar.

Som vi har kunnat se i våra resultat så varierar effekten av Plavix® mellan olika patienter. Anledningen till detta är att antalet trombocyter och antalet ADP-receptorer på varje trombocyt varierar mellan personer. Blödningarna kommer troligen i framtiden att visa oss att vi bör använda oss av en individanpassad dosering.

## 4.6 Felkällor

---

I denna laboration finns det en rad olika felkällor som kan ha påverkat våra resultat. Den första är självklart antalet försök som vi har kört, vi har inte använt oss av så många försök att man med säkerhet skulle kunna fastställa en korrekt slutsats.

Sedan har vi använt oss av flera olika blodgivare för att kunna se skillnaden mellan olika individer. Denna kan ha lett till felaktigheter då vi inte har kört samma blod på alla tre metoderna utan ett blod på bara två av metoderna. Vi kan då inte se om de ger olika utslag på samma blod.

Om man sedan låter blodet stå kan detta ge olika skillnader i resultat. Detta är en avgörande faktor som vi måste väga in i våra resultat eftersom våra försök har gjorts under en vecka och med precis nytaget blod och blod från blodpåsar. Detta kan vi se exempel på i resultatet från ljustransmissionsaggregometrin, där vi får olika resultat bara av att låta blodet stå en halvtimme mellan varje försök.

Sedan måste man förstå att effekten av läkemedel hos en person inte ökar linjärt. Vi kan därför inte anta att om vi ökar dosen med det dubbla kommer inte antalet hämmade trombocyter öka till det dubbla. Man kan därför inte avläsa på våra få försök vilken dos av Plavix® som en patient faktiskt skulle behöva. Ytterligare en felkälla som spelar in är den mänskliga faktorn. När man laborerar finns det saker som går fel vilket vi kan se exempel på i ljustransmissionsaggregometrianalysen omgång 2 där en felpipettering av ADP har skett i provröret med  $10^{-6}$  molar cangrelor. Vi får då ett helt felaktigt utslag om man jämför detta med försök 1 och 3. Sedan har vi även läst av olika diagram och kurvor och då använt oss av vårt ögonmått, vilket inte är exakt. Sedan kommer det att bli en skillnad mellan individer vid exempelvis pipettering då ingen av oss har utbildning inom detta område.

## 4.7 Förslag till förbättring

---

Om vi sedan tittar på de felkällor vi har så finns det förbättringar att göra. Antalet försök skulle kunna ökas kraftigt, dock var detta svårt för oss då vi fick en begränsad tillgång på tid. För att kunna få så mycket bättre och jämnare resultat skulle man behöva köra försöken ytterligare ett antal gånger.



Att vi får en skillnad i resultat mellan blodgivare skulle ha kunnat reduceras genom att när man tog blod från en blodgivare skulle ha kunna kört det i de tre metoderna samtidigt. Även detta är svårt då vi bara var två personer och det skulle ha blivit en tidskillnad för någon körning. Sedan hade man blivit tvungna att köra dessa tester flera gånger för att se den mänskliga faktorn, men då blir det en skillnad i blodet hur länge det har vilat mellan körningarna.

Alla laborationer kommer att innebära en viss felmarginal på grund av den mänskliga faktorn. Denna kan reduceras genom tydligare instruktioner och förklaringar för användning av de olika metoderna samt genom att välja en enkel och pedagogisk metod.

Om vi då skulle ha förbättrat vår forskning skulle vi ha behövt fler medarbetare men även mer tid och kunskap. Detta skulle kräva pengar i sin tur och man måste då väga in hur pass mycket pengar man vill lägga i förhållande till hur viktigt det är att få ett svar på sin frågeställning.

Ytterligare ett förslag till förbättring är att jämföra sin studie med en likartad. För att hitta ett annat arbete på samma område sökte vi på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Tyvärr hade ingen tidigare jämfört de tre metoderna med varandra.

## 4.8 Källkritik

---

När man gör ett arbete är det ytterst viktigt att använda sig av bra och trovärdiga källor. För att försäkra oss om att all information vi har hittat är korrekt har vi därför sökt information på många olika sätt, bland annat genom en personlig intervju, i litteratur och internetsök. Vi har försökt att hitta samma information från olika källor så att de kan stödja varandra (se 5. Referenslista). Till exempel, <sup>3</sup>Freyschuss Ulla, Rössner Stephan (1977). *Hjärtinfarkt*. Stockholm: Gotab 1985, Andra upplagan, som är en äldre källa men mycket informativ. För att försäkra oss om att denna information fortfarande stämde så sökte vi samma information från andra källor (se 5. Referenslista). Dessutom valde vi tillförlitliga källor som enligt definition är noga kontrollerade och kända för att uppge korrekt information, som till exempel [www.ne.se](http://www.ne.se). När det gällde litteraturen hittade vi den på hälsouniversitetets bibliotek, detta innebär att den där blivit godkänd som källa av ämneskunnig personal och bör därför vara tillförlitlig för detta arbete.

Alla de källor vi använt har även haft kända upphovsmän eller själva varit sakkunniga personer, vilket skapar tillförlitlighet till dem. Samtidigt har källorna inte heller upplevts vinklade och de har riktats till olika målgrupper. Till exempel, <sup>3</sup>Freyschuss Ulla, Rössner Stephan (1977). *Hjärtinfarkt*. Stockholm: Gotab 1985, Andra upplagan, som riktar sig till patienter med hjärtinfarkt och deras anhöriga. Således är boken mer lättförståelig och innehåller inte lika medicinskt ingående förklaringar som <sup>2</sup>Liedholm Hans (2008). *Hjärtinfarkt*. Malmquist, Jörgen (red.) *Medikon Band 2*. Finland: Bertmarks förlag 2008, sid. 176-177. Den är skriven för alla vilket gör den pedagogisk, samtidigt som den också är ett medicinskt lexikon vilket gör att den är mer ingående, rent medicinskt, än boken *Hjärtinfarkt*.

## 5. Referenslista

---

<sup>1</sup> <http://www.ne.se/lang/hj%C3%A4rtinfarkt> 2011-09-06

<sup>2</sup> Liedholm, Hans (2008). Hjärtinfarkt. Malmquist, Jörgen (red.) *Medikon Band 2*. Finland: Bertmarks förlag 2008, sid. 176-177

<http://www.hjart-lungfonden.se/Sjukdomar/Sjukdomar/Hjartinfarkt/> 2011-09-06

<sup>3</sup> Freyschuss Ulla, Rössner Stephan (1977). *Hjärtinfarkt*. Stockholm: Gotab 1985, Andra upplagan

<http://www.suntliv.nu/Amnen/Halsa/Artiklar-om-halsa/Nya-bevis-for-att-stress-orsakar-hjartinfarkt/> 2012-01-24

<sup>4</sup> Persson Jerker, Stagmo Martin (2008). *Perssons Kardiolog*. Danmark: Författaren och Studentlitteratur 2008, Upplaga 6:1

<sup>5</sup> Andersson, Karin (2006) *Trombocytaktivering vid perkutan koronar intervention och kärlkramp*. C-uppsats. Hälsouniversitetet, Linköping.

<sup>6</sup> Andersson, Joakim. Överläkare på Universitetssjukhuset Linköping. Intervju den 3 oktober 2011.

<sup>7</sup> [http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel\\_produkt.jsp?NplID=19980715000015&DocTypeID=7&UserTypeID=2](http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produkt.jsp?NplID=19980715000015&DocTypeID=7&UserTypeID=2) 2011-09-06

Ramström, Sofia. Forskarassistent på Universitetssjukhuset Linköping. (2011) Personlig kommunikation.

Nylander, Martina. Doktorand på Universitetssjukhuset Linköping. (2011) Personlig kommunikation.

# 6. Bilaga 1

Gäller för specialitet: Klinisk kemi	Dokumentnamn: Trombocytfunktionsutredning	Sid nr: 26(51)
Utfärdad av: Kerstin M Gustafsson	Införd: 2010-01-15	Revision: 2
Godkänd av: Tomas Lindahl	Fastställd av: Tomas Lindahl	

## Trombocytfunktionsutredning

**Manuellt införda justeringar**

**Medicinsk bakgrund**

**Analys- /bestämningsprincip**

**Miljöaspekter**

**Apparatur och tillbehör**

**Bipacksedel**

**Kemikalier och /eller reagens**

**Kalibratorer /kalibrering**

**Kontrollprover /kontroller**

**Provtagning och provhantering**

**Förberedelser**

**Utförande**

**Beräkning**

**Instrumentparametrar**

**Bedömning**

**Metodvalidering**

**Interferenser**

**Svarsrutiner**

**Referensintervall**

**Ersatta metoder**

**Författare och godkännande av metodbeskrivning**

**Metodansvarig/a**

## Medicinskt ansvarig

## Referenser

## Justeringstabell

### Manuellt införda justeringar

#### Tabellens användning

Tabellen används för förändringar som behöver dokumenteras innan ny revision hunnit färdigställas. Den aktuella ändringen beskrivs genom att det nya förfaringssättet skrivs in under det avsnitt där ändringen gäller. Datum och ansvarig sätter sin signatur vid den aktuella ändringen. Nedanstående tabell fylls i. OBS alla manuella ändringar skall göras med bläckpenna och vara läsbara. Ansvarig för ändringen signerar samt anger datum. Manuella ändringar får vara högst sex månader gamla innan de införs i ny revision av metod-beskrivningen.

<b>Datum</b>	<b>Ändring införd i rutin. Ange avsnitt och aktuell sida för denna revision av beskrivningen.</b>	<b>Ansvarig för ändring</b>

## Medicinsk bakgrund

Trombocytfunktionsutredning görs ofta i samband med blödningsutredning, särskilt om patienten har symptom på störd primär hemostas och/eller lång blödningstid. Typiska symptom är näsblod, petekier, lätt att få blåmärken, långvarig blödning efter skärskador och tandextraktioner, rikliga menstruationer. Kunskap om trombocytdysfunktionens orsak kan ha betydelse för patientens behandling och är därför av vikt att känna till vid operativa ingrepp, medicinering m m.

## Analys- /bestämningsprincip

Instrumentet som används är en flödescytometer Coulter Epics XL MCL. Bärarvätskan Isoton II och prov suggs upp manuellt eller via en provväxlare. En cell i taget passerar en flödeskammare och belyses med laserljus (Argon 488 nm). Här bedöms granulering och storlek på cellen, s.k side scatter respektive forward scatter. Trombocyterna färgas med antikroppar som är märkta med fluoroforer som avger grönt ljus (Fluoresceinisotiocyanat (FITC), för att avläsa aktiveringsförmågan).

## Miljöaspekter

EDTA irriterar andningsorganen. Undvik inandning av damm. Använd munskydd, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

Övriga kemikalier ingen känd risk.

## Apparatur och tillbehör

Coulter Epics XL MCL		Beckman Coulter
Pipetter 5 µL - 1 mL		Finnpipette
Vortex-mixer	Labora	
Vattenbad		Julabo EM/IKA Verke
Stoppur		Henry Eriksson AB

## Bipacksedel

Om medföljande dokument (till ex reagens) innehåller meddelande om förändring skall kontroll ske att metodansvarig är informerad. Bipacksedeln förvaras i särskild pärm märkt "Bipacksedlar"

## Kemikalier och /eller reagens

### Hepesbuffert

NaCl Cas nr [7647-14-5] 137 mmol	8,006 g	Sigma- Aldrich
KCl Cas nr [7447-40-7] 2,7 mmol	0,201 g	Kebo
MgCl <sub>2</sub> Cas nr [7786-30-3] 1 mmol	0,203 g MW 203,31	Kebo
Eller		
MgCl <sub>2</sub> 1 mmol	0,0952g MW 95,22	Sigma
Glukos Cas nr [50-99-7] 5,6 mmol	1,009 g	Kebo
Hepes Cas nr [7365-45-9] 20 mmol	4,766 g	Sigma- Aldrich

Lös upp kemikalierna med ultrarent vatten till ca 900 mL. Justera pH till 7,40 med NaOH.

Efter upplösningen av kemikalierna tillsätts

Bovint serum albumin Cas nr [9048-46-8] 1 g Sigma

Justera volymen till 1000 mL.

Fördela bufferten i 50ml Falconrör eller 100 mL flaskor.

Hållbart 6 månader i -20°C. Tinad och förvarad i kylskåp 5 dygn

### Hepesbuffert med 10 mmol/L EDTA

Väg in

Na-EDTA, Titriplex 0,074 g C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2H<sub>2</sub>O Fluka

i en mätkolv. Lös upp med Hepesbuffert till 20 mL.

Förvara i eppendorfrör i -20°C.

### Fysiologisk koksaltlösning (i texten kallad "NaCl 9 mg/mL")

Natriumklorid Braun 9 mg/mL, från B.Braun Medical AB (Bromma).

### Lathund för bestämning av volym till pulver:

$$\frac{\left( \text{Det invägda pulvrets vikt (i mg) / MW (i g/mol)} \right)}{\text{Den önskade koncentrationen (i mM eller mmol/L)}} \times 1000 = \text{volym att tillsätta (i mL)}$$

Vägledning: till 10 mL åtgår:

0,65 mg ADP (för 0,13 mM)

1,56 mg PAR1-AP (för 0,195 mM)

35,4 mg PAR4-AP (för 5,2 mM)

5,3 mg PAR4-AP (för 0,78 mM)

### ADP-lösningar 0,13mM

ADP Adenosine 5´- diphosphate (finns i plastpåse i -20° frysen)

ADP [ 72696-48-1 ]

Sigma- Aldrich

MW 501,32 g/mol

Små mängder pulver invägs i glasrör på känsligaste vågen i vågrummet. Upplöses sedan i NaCl 9 mg/mL till 0,13 mmol/L.

Den spädda lösningen portioneras i 60 uL-portioner och fryses i -70°. Tinas på vattenbad 3 minuter före användning. Upptinad lösning kan användas till upprepande försök under samma dag om den förvaras i kylskåp.

Den nya batchen skrivs in i pärmen "Loggbok lösningar flödet" som förvaras vid flödescytometern. Aktiviteten på den ny tillverkade lösningen kontrolleras med flödescyometri och jämförs mot tidigare lösningar. Resultatet av detta sätts också in i pärmen.

### PAR1-aktiverande peptid (PAR1-AP, SFLLRN) 0,195mM

Syntetiseras av "the Biotechnology Centre of Oslo, Oslo University, Oslo, Norway"

(se bifogad prislista). Kontaktperson: Ola Rumohr Blingsmo

[o.r.blingsmo@biotek.uio.no](mailto:o.r.blingsmo@biotek.uio.no)

MW 748,88 g/mol.

Frystorkat pulver skall förvaras i excikator i kylrum.

Små mängder pulver invägs i glasrör på känsligaste vågen i vågrummet. Upplöses sedan i NaCl 9 mg/mL till 0,195 mmol/L (kan krävas lite värmning i 37 graders vattenbad, vortexa inte för tidigt, då det kan få pulverrester att fastna på kärlets väggar och inte lösa sig korrekt).

Den spädda lösningen portioneras i 80 µL-portioner och fryses i -70°. Tinas på vattenbad 3 minuter före användning. Upptinad lösning kan användas till upprepande försök under samma dag om den förvaras i kylskåp.

Den nya batchen skrivs in i pärmen "Loggbok lösningar flödet" som förvaras vid flödescytometern. Aktiviteten på den nytillverkade peptidlösningen kontrolleras m.h.a. flödescytometri och jämförs mot tidigare lösningar. Resultatet av detta sätts också in i pärmen.

### CRP ("collagen related peptide")

Gly-Cys-Hyp-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Gly-Cys-Hyp-Gly-NH<sub>2</sub>, MW 3280 g/mol

Frystorkat pulver har tidigare erhållits från Richard W. Farndale (Phone +441223766111, e-mail: [r.w.farndale@bioc.cam.ac.uk](mailto:r.w.farndale@bioc.cam.ac.uk)) and Graham Knight, Department of Biochemistry, University of Cambridge, Building O, Downing Site, Cambridge CB21QW,UK. Frystorkat pulver förvaras i excikator i kylrummet.

Peptiden skall korslinkas med SPDP (se bifogad instruktion) före användning.

Den nya batchen skrivs in i pärmen "Loggbok lösningar flödet" som förvaras vid flödescytometern. Aktiviteten på den korslinkade peptidlösningen kontrolleras m.h.a. flödescytometri och jämförs mot tidigare lösningar. Resultatet av detta sätts också in i pärmen. Kan därefter spädas till önskad styrka före infrysningen med 0,05% HAc (ättiksyra). Portionera och frys i -70°C frys.

50 µL-portioner från batch 061128 finns infrysta i -70°C frys. Dessa är spädda 1:150 och ska spädas ytterligare **1:4 (30 µL CRP+90 µL Hepesbuffert) innan användning.**

Tinas på vattenbad 3 minuter före användning. Upptinad lösning kan användas till upprepande försök under samma dag om den förvaras i kylskåp.

### PAR4-aktiverande peptid (PAR4-AP, AYPGKF) 5,2mM och 0,78mM

Syntetiseras av "the Biotechnology Centre of Oslo, Oslo University, Oslo, Norway"

(se bifogad prislista). Kontaktperson: Ola Rumohr Blingsmo

[o.r.blingsmo@biotek.uio.no](mailto:o.r.blingsmo@biotek.uio.no)

MW 681 g/mol

Frystorkat pulver skall förvaras i excikator i kylrum.

Små mängder pulver inväges i glaströr på känsligaste vågen i vågrummet. Upplöses sedan i NaCl 9 mg/mL förvämt till 37°C till önskad styrka, 5,2 eller 0,78 mmol/L (vortexa inte för tidigt, då det kan få pulverrester att fastna på kärlets väggar och inte lösa sig korrekt).

Lösningen portioneras (70 µL-port. för 5,2 mM, 60 µL-port. för 0,78 mM) och fryses i -70°. Tinas på vattenbad 3 minuter före användning. Upptinad lösning kan användas till upprepande försök under samma dag om den förvaras i kylskåp.



Den nya batchen skrivs in i pärmen "Loggbok lösningar flödet" som förvaras vid flödescytometern. Aktiviteten på den ny tillverkade peptidlösningen kontrolleras m.h.a flödescytometri och jämförs mot tidigare lösningar. Resultatet av detta sätts också in i pärmen.

### Apyras

Apyrase from potato

Sigma, prod. No. A6535

Grade VII, lyophilized powder, ATPase  $\geq$  200 units/mg protein

Cas Number: [9000-95-7](#)

DTT (DL-Dithiothreitol) lösning (1 M i H<sub>2</sub>O)

Sigma, prod. No. 646563

Ska lösas till 10 U/mL i buffert pH 7,5, innehållande HEPES, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT samt 1g/L bovint serumalbumin. Apyrasbufferten erhålles genom att 0.6 mL av Hepesbuffert med 10 mmol/L EDTA (se beskrivning ovan) blandas med 5.4 mL av den HEPES-buffert vi normalt använder. Till detta sätts 6  $\mu$ L DTT från stamlösningen (1M).

Lös upp apyrasampullen (200 units, vid annat innehåll gäller inte nedanstående!) med 200  $\mu$ L av apyrasbufferten (får då en stamlösning med 1000 U/mL). 50  $\mu$ L av denna stamlösning sätts till 4950  $\mu$ L av apyrasbufferten. Apyraslösningen (10 U/mL) portioneras i 35  $\mu$ L-portioner i rör med skruvkork och gummipackning, förvaras i -70°. Resterande stamlösning av apyras (1000 U/mL) fördelas på två portioner och fryses i -70° för att kunna göra mer arbetslösning vid ett senare tillfälle.

### Antikroppar

anti-fibrinogen-FITC, hönsantikropp batchberoende (flaska)

Diapensia

anti-CD62P-FITC,  $\alpha$ -p-selektin hönsantikropp batchberoende (flaska)

Diapensia

anti-insulin-FITC, hönsantikropp, negativ kontrollantikropp (flaska)

Diapensia

**Vid byte till ny antikropps-batch kontrolleras spädningen mot den gamla batchen.**

### Kalibratörer /kalibrering

Metoden kalibreras ej.

En person med kända resultat från tidigare analysomgång analyseras vid varje ny tillverkning av agonist, dvs minst en gång per år.

### Kontrollprover /kontroller

Flow- Check

Beckman Coulter

Vid varje analysdag en gång om dagen kontrolleras detta med ett känt antal plastkolor.

Instruktion finns i apparatbeskrivning. (HP X-CV ska vara <2). Protokollet som ska användas heter "Flow Check-xl4 blodningsutredning.PRO" och finns i mappen "Common" som hittas i listan i menyerna (själva mappen ligger under C:/EXPO32/Users/admin/Protocol). Ett godkänt resultat för Flow Check-kontrollen ska noteras i listan som sitter uppsatt vid flödescytometern, nya listor sätts upp efterhand och de gamla arkiveras i kontrollpärlen.

I varje försöksomgång så analyseras negativa kontroller till varje mätantikropp.

## Flow- Set

Beckman Coulter

Före analys analyseras Flow-Set för att kontrollera medel fluorescensintensitet (MFI). **Instruktion finns i apparatbeskrivning.** Protokollet som ska användas heter "Flow Set blodningsutredning.PRO" och finns i mappen "Common" som hittas i listan i menyerna (själva mappen ligger under C:/EXPO32/Users/admin/Protocol).

X-mean för FITC (FL1) ska ligga inom referensintervallet för batchen (medel  $\pm$  2SD), detta värde finns angivet i listan som finns uppsatt vid flödescytometern (intervall som gäller för lot nr752446F, 070601: 39.9-42.7). Om inte det blir så, pröva att hålla upp nya kulor och upprepa proceduren. Om värdet fortfarande hamnar utanför, kontakta Kerstin Gustafsson eller Nahreen Tynngård och meddela detta (man kan då ändra förstärkningen, men man måste då även ändra förstärkningen i protokollet "FITC blodningsutredning FS vs SS.PRO" i mappen "Blodningsutredning". Detta får absolut inte göras utan att alla användare meddelas om att så skett!.) Värdet för X-mean som erhålls för Flow-Set-kontrollen ska noteras i listan som sitter uppsatt vid flödescytometern, nya listor sätts upp efterhand och de gamla arkiveras i kontrollpärlen.

## Apyraskontroll

Det värde som **erhålls för provet i rör 6 ( $\alpha$ -fibrinogen med apyras närvarande, aktiverat med ADP) ska noteras** i listan som sitter uppsatt vid flödescytometern, nya listor sätts upp efterhand och de gamla arkiveras i kontrollpärlen. På så sätt kan det kontrolleras att det apyras som används fortfarande är aktivt nog att bryta ner tillfört ADP (aktiveringsgraden ska alltså vara låg i detta prov).

## Provtagning och provhantering

Rör med blå kork innehållande natrium-citrat 0,129 mol/L. Röret ska vara välfyllt. Blanda röret 10 gånger. Notera exakt tid för provtagning.

## Förberedelser

Provet ska vara välblandat strax innan analys. Analys av fibrinogen-inbindning och p-selektin-uttryck ska utföras 1 timma (minst 30 min och max 3 timmar) efter provtagning.

## Utförande

### Analys av förmåga till fibrinogen-inbindning och p-selektin-uttryck

Tina upp Hepesbuffert (åtgång för komplett analys: ca 45 mL). Plocka fram antikroppar, gör eventuella spädningar i hepesbuffert.

OBS! Se vilken spädning som gäller för aktuellt lot nr.

anti-fibrinogen-FITC (flaska)	Lot F105	spädning 1:7 (30µl+180µl)
anti-CD62P-FITC α-p-selektin	Lot P102	spädning 1:10 (12µl+108µl)
Ospecifik IgY (neg. kontroll) (ependorfkopp) Lot		spädning 2:1 (20µl+10µl)

1. Märk upp ellermanrör 1-29.

Pytsa 100 µL hepes med EDTA i rör 1.

Pytsa 100 µL hepes i rör 2-29.

2. Tillsätt 10 µL anti-fibrinogen FITC till rör 1-18, 10µL ospec. IgY till rör 19 och 10µL anti-p-selektin-FITC till rör 20-29.

Ställ rören mörkt i väntan på analys.

3. Strax före tillsats av blod, tillsätt 3µL Apyras till rör 6, 9-10, 13-14 och 17-18.

4. 1 timma efter provtagning ska 10 µL välblandat helblod tillsättas till samtliga rör (blodröret ska ha vänts minst 10 gånger).

5. Tina aktivatörer från -70°C i +37°C i 3 minuter:

PAR1-AP, ADP, CRP och PAR4-AP. Späd ev. CRP till rätt koncentration. (lot 061128 ska spädas 1:4,1+3 dvs 40µL CRP+120µL Hepes.

6. Tillsätt 10 $\mu$ L aktivatörer eller Hepesbuffert med 15 sekunders intervall (använd stoppur) enligt nedanstående schema.

Rör nr	Aktivator	Rör nr	Aktivator
1	Hepesbuffert	19	Hepesbuffert
2	"	20	"
3	"	21	"
4	ADP	22	ADP
5	"	23	"
6	ADP (Apyrase)	24	PAR1-AP
7	PAR1-AP	25	"
8	"	26	PAR-4-AP 0,78mM
9	PAR1-AP (Apyras)	27	"
10	"	28	CRP
11	PAR4-AP 5,2mM	29	"
12	"		
13	PAR4-AP 5,2mM (Apyras)		
14	"		
15	CRP		
16	"		
17	CRP (Apyras)		
18	"		

7. Efter exakt 10 min (med 15 sekunders intervall mellan varje rör) stoppas aktiveringen med 1 mL Hepesbuffert i alla rör.

Blanda efter varje tillsats i 10 sekunder med vortex-mixer.

8. Späd 1:3 i ett nytt plaströr (0,2 mL prov + 0,4 mL Hepesbuffert).

9. Analysera på flödescytometer enligt apparatbeskrivning. Alla rör ska analyseras med protokollet **"FITC blodningsutredning FS vs SS.PRO"**, som finns i mappen **"Blodningsutredning"**. Vid analys av en komplett serie kan man använda en färdig Worklist som heter **"Blodningsutredning standard 070410.WLS"**, som finns under fliken **"Worklists"** i mappen **"Blodningsutredning"**. Då behöver man bara föra in patient-ID under Sample ID 2 samt Carousel No. innan analysen startas.

(Vid ev. ändringar i mappen **"Blodningsutredning"** kan denna hittas under D:/Expo32 060621. Detta ska dock inte göras utan att alla användare informeras om att så skett.)

I prov nr 1 och nr 18 ska det vara 1-2% FITC-positiva trombocyter. Om detta inte är fallet, justera diskriminatoren och spara ändringen i protokollet.

10. Efter analys sparas provtagningsröret i -70°C frys för ev DNA-analys.

## Beräkning

Trombocytpopulationen definieras genom sina ljusspridningsegenskaper med hjälp av forward scatter (FS) och side scatter (SS)-detektorerna. Kring denna population läggs en gate. Innehållet i denna gate analyseras och plottas i ett histogram där populationens fluorescens från fluoroforen FITC (FL1) anges.

Inbindningen av antikropparna anges i %. I prov nr 1 och nr 18 (negativa kontrollprov) ska det vara 1-2% FITC-positiva trombocyter. Om detta inte är fallet, justera diskriminatoren och spara ändringen i protokollet. Medel fluorescensintensitet (MFI) för hela trombocytpopulationen anges också i protokollet.

## Instrumentparametrar

Inställningar av parametrar se apparatbeskrivningen

## Bedömning

Skriftligt svar av medicinsk ansvarig läkare där eventuellt fler analyser bedöms ihop för exempelvis blodningsutredning.

## Metodvalidering

Metodvalidering beskrivs i underordnat *Metodvalidering och verifiering, kvantitativa metoder, LMC*

## Precision (total mätosäkerhet) på dubbelprov

Agonist	Antikropp	Antal serier	CV % pos	CV% MFI
ADP	Anti-fibrinogen	47	3,6	11,7
PAR1-AP	Anti-fibrinogen	47	2,5	11,9
PAR4-AP 5,2mM	Anti-fibrinogen	47	1,3	10,4
CRP	Anti-fibrinogen	47	5,4	9,5
ADP	Anti-p-selektin	47	2,6	10,1
PAR1-AP	Anti-p-selektin	47	1,2	5,5
PAR4-AP 0,78mM	Anti-p-selektin	47	6,5	15,0
CRP	Anti-p-selektin	47	2,3	6,9

## Riktighet

Externt kontrollsystem för riktighet finns ej.

## Mätområde

0,1-100% positiva trombocyter.

## Interferenser

Autoantikroppar riktade mot trombocytantigen kan ge upphov till felaktiga bedömningar.

## Svarsrutiner

Varje utredning besvaras med skriftligt läkarutlåtande, där trombocytfunktion, blodstatus, koagulationsanalyser; blödningstid, vWF, FVIII, APTT, PK bedöms. Ev råd om behandling och ev. ytterligare utredning av patienten och/ eller dennes släktingar meddelas.

## Referensintervall

Eget referens-intervall baseras på 20 friska försökspersoner. Analys av förmåga till fibrinogen-inbindning och p-selektinuttryck.

Rör nr	Aktivator	Ref.intervall % positiva	Ref.intervall MFI
1	Hepesbuffert	1-2	0,6-2,7
2	"	0-15	
3	"		
4	ADP	21-90	1,6-6,5
5	"		
6	ADP +Apyrase		
7	PAR1-AP	17-86	1,7-4,6
8	"		
9	PAR1-AP +Apyras		
10	"		
	Procentuell nedgång m apyras		
11	PAR4-AP	44-100	1,6-7,6
12	"		
13	PAR4-AP +Apyras		
14	"		
	Procentuell nedgång m apyras		
15	CRP	22-96	0,9-8,1
16	"		
17	CRP+Apyras		
18	"		
	Procentuell nedgång m apyras		
19	Hepesbuffert	1-2	
20	"	2-9	
21	"		

22	ADP	25-69	1,3-5,0
23	"		
24	PAR1-AP	71-99	7,4-16,1
25	"		
26	PAR4-AP	44-100	2,4-12,5
27	"		
28	CRP	52-98	4,9-16,7
29	"		

## Ersatta metoder

Trombocytfunktionsutredning med Ortho Cytoron Absolute 1998-12-01.

## Författare och godkännande av metodbeskrivning

Tomas Lindahl, Inger Fagerberg, Ewa Lönn Karlsson, Kerstin Gustafsson, Sofia Ramström.

## Metodansvarig/a

### Metodansvarig

Kerstin Gustafsson

### Plats/Ort

Klinisk Kemi, Linköping

## Medicinskt ansvarig

### Medicinskt ansvarig

Tomas Lindahl

### Specialitet

Klinisk Kemi, Linköping

## Referenser

Lindahl T L, Festin R and Larsson A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: An improved method for measuring platelet activation. Thrombosis and Haemostasis 1992;68:221-225.



Lindahl T L, Lundahl J, Netré C and Egberg N. Studies on the platelet fibrinogen receptor in Glanzman patients and uremic patients. *Thrombosis Research* 1992;67:457-466.

Bunescu A, Lindahl T, Solum N O, Schulman S, Larsson A, Lundahl J, Egberg N. Partial expression of GP IB measured by flow cytometry in two patients with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Res* 1994;76:441-450.

Bunescu A, Lundahl J, Söderström T, Lindahl T, Larsson A, Egberg N. Evaluation of platelet function by flow cytometric measurement of ligand binding. *Platelets* 1995;6:340-345.

Lundahl T H, Lindahl T L, Fagerberg I H, Egberg N, Bunescu A, Larsson A. Activated platelets and impaired platelet function in intensive care patients analyzed by flow cytometry. *Blood Coag Fibrinolysis* 1996;7:218-220.

Berglund U, Lindahl T. Enhanced onset of platelet inhibition with a loading dose of ticlopidine in ASA-treated stable coronary patients. *Int J Cardiol.* 1998;64(2):215-7.

Larsson A, Eriksson M, Lundahl T, Lundkvist K, Lindahl T. Impaired platelet function in endotoxemic pigs analyzed by flow cytometry. *Platelets* 1998; 9:115-9.

Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein 11b/111a, and von Willebrand factor do not. *Blood* 1998;91(2):491-499

Ramström AS, Fagerberg IH, Lindahl TL. A flow cytometric assay for the study of dense granule storage and release in human platelets. *Platelets* 1999;10:153-58.

Milovanovic M, Lysen J, Ramstrom S, Lindahl TL, Richter A, Jaremo P. Identification of low-density platelet populations with increased reactivity and elevated alpha-granule content. *Thromb Res.* 2003;111:75-80.

Nylander S, Mattsson C, Lindahl TL. Characterisation of species differences in the platelet ADP and thrombin response. *Thromb Res.* 2006;117:543-9.

Nylander S, Johansson K, van Giezen JJ, Lindahl TL. Evaluation of platelet function, a method comparison. *Platelets.* 2006;17:49-55.

Vretenbrant Öberg K, Ramström S, Bjerke M, Lindahl TL. Platelet activation via PAR4 is involved in the initiation of thrombin generation and in clot elasticity development. *Thromb Haemost.* 2007; 97(3): 417-424.

## Justeringstabell

<b><i>Datum</i></b>	<b><i>Revision</i></b>	<b><i>Avsnitt samt principiellt vad som ändrats</i></b>	<b><i>Ansvarig</i></b>
2010-01-15	2	Ändrat molekylvikten för PAR-1	KG

# 7. Bilaga 2

Gäller för specialitet: Klinisk kemi	Dokumentnamn: Trombocyttaggregation på Multiplate	Sid nr: 42(51)
Utfärdad av: Kerstin M Gustafsson	Införd: 2009-01-01	Revision: A. K.
Godkänd av: Tomas Lindahl	Fastställd av: Tomas Lindahl	

## Trombocyttaggregation på Multiplate

**Manuellt införda justeringar**

**Medicinsk bakgrund**

**Analys- /bestämningsprincip**

**Miljöaspekter**

**Apparatur och tillbehör**

**Kemikalier och /eller reagens**

**Kalibratorer /kalibrering**

**Kontrollprover /kontroller**

**Provtagning och provhantering**

**Förberedelser**

**Utförande**

**Beräkning**

**Instrumentparametrar**

**Bedömning**

**Metodvalidering**

**Interferenser**

**Svarsrutiner**

**Referensintervall**

**Ersatta metoder**

**Författare och godkännande av metodbeskrivning**

**Metodansvarig/a**

**Medicinskt ansvarig**

## Referenser

## Justeringstabell

### Manuellt införda justeringar

#### Tabellens användning

Tabellen används för förändringar som behöver dokumenteras innan ny revision hunnit färdigställas. Den aktuella ändringen beskrivs genom att det nya förfaringssättet skrivs in under det avsnitt där ändringen gäller. Datum och ansvarig sätter sin signatur vid den aktuella ändringen. Nedanstående tabell fylls i. OBS alla manuella ändringar skall göras med bläckpenna och vara läsbara. Ansvarig för ändringen signerar samt anger datum. Manuella ändringar får vara högst sex månader gamla innan de införs i ny revision av metod-beskrivningen.

<b>Datum</b>	<b>Ändring införd i rutin. Ange avsnitt och aktuell sida för denna revision av beskrivningen.</b>	<b>Ansvarig för ändring</b>

#### Medicinsk bakgrund

Trombocyttaggregation på Multiplate kan användas för utvärdering av trombocytfunktionen. Känsligheten mot inverkan av GPIIb/IIIa antagonister och en brist på GPIIb/IIIa receptorer kan detekteras. Ingen eller liten känslighet mot cyklooxygenashämning med ASA och ADP-receptorhämning med klopido-rel och relaterade läkemedel kan också detekteras.

#### Analys- /bestämningsprincip

Principen för metoden är impedansmätning. Provkoppen har två uppsättningar elektroder för dubbelprovsbestämning, där impedansen mäts. När trombocytterna adhererar/aggregerar, sätter sig på elektroderna stiger impedansen. Detta registreras som ett kurvförlopp. Ur detta kan hastighet,

maxutslag, area under kurva beräknas. Svar på olika agonister fås, se nedan vilka som är tillgängliga från företaget.

## Miljöaspekter

Ingen känd risk.

## Apparatur och tillbehör

Multiplate		Triolab
Multiplate measuring cells	Mp 0020	Triolab
Pipette spetsar (Biohit)	Mp 0040	Triolab
TI blood collection tubes	Mp 0624	Triolab

## Kemikalier och /eller reagens

Öppnade reagensflaskor ska förvaras vid 2-8°C. De är stabila till utgångsdatum.

Rekonstituera med 1,0 mL destillerat vatten. Blanda genom att snurra försiktigt. Skaka ej! Låt stå 10 minuter i rumstemperatur. Lotnummer ska dokumenteras.

Portionera 200 µL/portion och frys i <20 °C. Rören ska märkas med rekonstitueringsdatum och lotnummer.

Tag endast ut reagens från kylskåpet för kortare tid och omedelbar användning eller bered en dagsportion som kan sättas på instrumentet och kasseras vid dagens slut.

### Reagens

#### TRAPtest, trombinreceptoraktiveringspeptid

Reagenset är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

#### ADPtest

Reagenset är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

#### ASPItest, aktivering med arachidonsyra

Reagenset är stabilt 24 timmar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

#### COLtest, aktivering med kollagen

Reagenset är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering.

Frys inte reagenset!

## RISTOlow

Reagenset är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

## RISTOhigh

Reagenset är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

## ADPtest HS

Reagenset är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

## ASAcontrol

Kontrollen är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

## Prostaglandin E1 (PG)

Reagenset är stabilt 14 dagar vid 2-8°C i den ursprungliga flaskan efter rekonstituering. Förvaring vid <20 °C ökar stabiliteten till 4 veckor.

## Spädningslösning

**NaCl 0,9%**

## Kalibratorer /kalibrering

Metoden kalibreras ej.

## Kontrollprover /kontroller

### Intern kvalitetskontroll

Multiplate Liquid quality controls (LQC): Quick reference (1/2)

Triolab

analyseras 1 gång/kvartal. Skriv ut resultatet och sätt in i kontrollpärmen.

Kör en "Electronic Control" varje dag som instrumentet används. Skriv ut resultatet och sätt in i kontrollpärmen.

En person med kända resultat analyseras 1 gång/månad. Skriv ut resultatet och sätt in i kontrollpärmen.

## Provtagning och provhantering

Rör med grå kork innehållande trombinhämmaren hirudin. Röret ska vara välfyllt. Blanda röret 10 gånger. Notera tid för provtagningen.

Analysera provet mellan 30-180 minuter efter provtagning.

## Förberedelser

Kör en "Electronic Control" varje dag som instrumentet används.

## Utförande

### Reagens

Kontrollera att ingen ändring av reagens, kalibrator etc. har gjorts. När firmorna gör ändringar i reagensen markerar de utanpå förpackningen att en förändring har skett. Den som använder reagensen första gången ser till att nödvändiga förändringar noteras i metodbeskrivningen och meddelar metodansvarig. Inserten hanteras på laboratorierna enligt lokala rutiner".

### Analys

Analys med hjälp av den elektroniska pipetten.

1. Förvärm spädningslösningen ca 15 minuter till 37 °C i instrumentet.
2. Välj "Autopipette", F1.
3. Skriv in patient-ID och välj vilket test som ska analyseras. Bekräfta med "Starta autopipette". Max 5 tester kan köras åt gången.
4. Sätt i kyvetter i de angivna kanalerna (säkerställ att magnetomröraren finns i kyvetten), anslut sensorkabeln till kyvetten och bekräfta med "Nästa".
5. Utför skärmens anvisningar. Aktiva pipettsteg markeras med en grön pil och utförda steg bockas av.
6. Tillsätt spädningslösning, NaCl 300 µL.
7. Blanda blodet genom att vända på röret 10 gånger och sätt 300 µL till kyvetten.
8. Efter 3 minuters inkubering sätts aktivatorn, 20 µL till provet. (20 µl för alla agonister utom för RISTO test)
9. Håll pipetten vertikalt och sätt aktivatorn till kyvettens botten. Beröring mot magnetomröraren med pipettspetsen kan höras och det är normalt.
10. Efter 6 minuter är provet färdigt. Skriv ut resultatet, F6.
11. Kassera kyvetterna och frigör kanalerna, F7.

Analys med hjälp av den manuella pipetten.

1. Förvärm spädningslösningen ca 15 minuter till 37 °C i instrumentet.
2. Sätt kyvetter i mätpositionerna (säkerställ att magnetomröraren finns i kyvetten) och anslut sensorkabeln.
3. Pipettera 300 µL spädningslösning, NaCl och 300 µL blandat blod till kyvetten.
4. Starta timer för 3 minuters inkubering, välj knappen "F2: Start timer".
5. Efter 3 minuter pipettera aktivatorn, 20 µL till kyvetten. Starta genom att välja "F3: Start Test"
6. Välj en kanal och bekräfta med "Start" eller "Enter".
7. Skriv in patient-ID, "F4: Enter ID och välj en test, "T:Test selection.
8. Efter 6 minuter är provet färdigt. Skriv ut resultatet, F6.
9. Kassera kyvetterna och frigör kanalerna, F7.

## Beräkning

AUC Area under kurvan

RUO Velocity

RUO Aggregation

## Instrumentparametrar

## Bedömning

Skriftligt svar av medicinsk ansvarig läkare.

## Metodvalidering

### Precision (total mätosäkerhet)

#### Kontroll av ADP på känd person

Tidsperiod	Antal	Medelvärde AUC	SD AUC	CV %
Maj-08 – Nov-08	13	1047	159	15,2



### Kontroll av ASPI på känd person

Tidsperiod	Antal	Medelvärde AUC	SD AUC	CV %
Maj-08 – Nov-08	7	1176	62	5,3

### Kontroll av TRAP på känd person

Tidsperiod	Antal	Medelvärde AUC	SD AUC	CV %
Maj-08 – Nov-08	6	1186	77	6,5

### Kontroll av COL på känd person

Tidsperiod	Antal	Medelvärde AUC	SD AUC	CV %
Maj-08 – Nov-08	4	1090	128	11,8

### Kontroll av RISTO på känd person

Tidsperiod	Antal	Medelvärde AUC	SD AUC	CV %
Maj-08 – Nov-08	1	1967		

### Riktighet

#### Mätområde

Ej relevant, arbiträra enheter

#### Detektionsgräns

Ej relevant.

#### Linearitet

Ej relevant, ingen kalibrering sker.

### Interferenser

Ej undersökt.

### Svarsrutiner

Skriftligt svar av medicinsk ansvarig läkare.

## Referensintervall

Test AUC	ASPI	ADP	TRAP	COL	RISO
Normaler Eget ref område	589-1275	361-1093	778-1375	503-1268	446-2381
Test AUC	ASPI	ADP	TRAP	COL	RISO
Behandlade patienter Triolabs ref område	0-300	0-500	941-1563		0-0

## Ersatta metoder

### Författare och godkännande av metodbeskrivning

Kerstin Gustafsson, Ewa Lönn-Karlsson, Tomas Lindahl.

## Metodansvarig/a

### Metodansvarig

Kerstin Gustafsson

### Plats/Ort

Klinisk Kemi, Linköping

## Medicinskt ansvarig

### Medicinskt ansvarig

Tomas Lindahl

### Specialitet

Klinisk Kemi, Linköping

## Referenser

1.

## Justeringstabell

Varje förändring i metodbeskrivningen skall dokumenteras. Vid utfärdandet av ny revision av metodbeskrivningen införs aktuella ändringar samt de som dokumenterats i tabellen "manuellt införda justeringar". Datum anger fastställande datum när ny revision av metodbeskrivningen börjar gälla. Det ska framgå under vilken rubrik förändringen har skett samt vad som utgår och vad som införs. Har ändringen införts från tabellen "manuellt införda justeringar" skall även anges det datum vid vilket den manuella justeringen infördes. Även den som är ansvarig för ändringen skall anges.

## Justeringstabell

Datum	Revision Nr	Införda ändringar (avsnitt samt principiellt vad som ändrats)	Ansvarig för ändringen
		•	
		•	
		•	
		•	
		•	