
Vad var och en bör veta om preanalytiska faktorer

BENOIT DUGUÉ

De faktorer som påverkar resultatet av laboratorieprover kan indelas i 1) In vivo-preanalytiska faktorer (t.ex. ålder, kronobiologisk rytm, diet, sjukdom o.s.v.), 2) In vitro-preanalytiska faktorer (t.ex. provtagning, utrustning, transport, lagring o.s.v.) och 3) analytiska faktorer (analysmetod o.s.v.) samt 4) postanalytiska faktorer (t.ex. hur resultaten rapporteras och tolkas). För att förbättra laboratoriediagnostiken måste de faktorer som kraftigt inverkar på resultaten kunna kontrolleras. Detta kan åstadkommas genom användning av standardiserade metoder för analys och provtagning.

I den kliniska verksamheten beaktar man tyvärr inte tillräckligt ofta de preanalytiska faktorerna. Denna översikt understryker därför hur mycket dessa faktorer inverkar på resultatet av laboratorieprover och hur viktig inverkan är. Speciellt framhålls undersökningar som har initierats och utförts av nuvarande eller tidigare medlemmar i Biokemigruppen vid Minerva.

Inledning

När jag lämnade Minerva för nästan 10 år sedan ordnades en liten fest. Institutets medlemmar och Ralph Gräsbeck, chef för Biokemigruppen och min handledare, gav mig en avskedsgåva som sades vara en lista över de ställen där jag borde föreläsa om hur preanalytiska faktorer, dvs. faktorer som verkar under perioden mellan beslutet att ta ett prov och den slutliga analysen, inverkar på resultaten av laboratorieprover. Denna märkliga present var en världsatlas!

Jag har försökt följa denna apostoliska mission att göra laboratoriepersonal (t.ex. tekniker, laboratorieskötare, studerande) och kolleger som ansvarar för tolkningen av laboratoriedata (t.ex. läkare, vetenskapsmän) medvetna om betydelsen av de talrika preanalytiska faktorer som kan påverka laboratorieresultaten och således också tolkningen av dem. Denna uppgift är verkligen inte lätt; också nära kolleger kan förbli skeptiska. Studerande verkar vara de som lättast kan acceptera, lära sig och också arbeta med preanalytiska faktorer. Detta gäller i själva verket hela filosofin med referensvärden, som äldre kolleger har svårt att tillägna sig.

Denna artikel är därför en del av en serie framställningar om betydelsen av preanalytiska faktorer vid laboratoriearbete och då man tolkar laboratoriedata.

Referensvärden och preanalytiska faktorer – två viktiga begrepp utvecklade vid Medicinska Forskningsinstitutet Minerva

Begreppet eller paradigmet referensvärden är i grund och botten filosofiskt; det uppfanns av Ralph Gräsbeck vid Minerva och utvecklades sedan vidare i samarbete med inhemska, skandinaviska och internationella kolleger. Begreppet kan definieras som att man fastställer och använder relevanta data för att tolka medicinska iakttagelser. Ett annat sätt att uttrycka saken är att kliniska iakttagelser ska tolkas med användande av ett ordentligt

FÖRFATTAREN

FD **Benoît Dugué** är för närvarande professor i fysiologi vid fakulteten för idrottsvetenskap vid universitetet i Poitiers, Frankrike. Bosatt i Finland i ungefär tio år medan han arbetade inom Biokemigruppen vid Minerva där han skrev sin avhandling. Han utnämndes till docent i biokemi vid Helsingfors universitet 1998. Han har fortsatt samarbetet med finländska kolleger inom områdena referensvärden samt idrotts- och motionsmedicin, och har också studerat fysiskt handikappade personer.

kontrollmaterial, i likhet med experimentella data. Begreppet behöver inte nödvändigtvis begränsas till laboratoriemedicin (1-3). I grund och botten är det frågan om att tolka ett mätresultat (ett observerat värde) genom att jämföra det med en eller flera samlingar av data (referensvärden) som har insamlats med samma teknik från lämpliga kontrollpersoner (referensindivider). Referensvärden bör därför noggrant samlas in från ett tillräckligt stort antal representanter för den population som ska undersökas. Det är viktigt att inte bara bestämma referensvärden för subjektivt friska personer (hälsorelaterade referensvärden), utan också för personer som lider av olika slags sjukdomar (sjukdomsrelaterade referensvärden). Referensvärden kan också vara statiska (resultat vid en viss tidpunkt) eller dynamiska, då de återspeglar en tidsrelaterad process. Det nya begreppet referensförändring (reference change) har på senare tid använts för den sistnämnda situationen (4). Man kan få gruppbaseade referensvärden genom att dela upp referenspopulationen i mindre grupper. Det kan till exempel vara relevant att under vissa förhållanden ha olika referensvärden för män och kvinnor eller för olika åldersgrupper. Personbaseade (individuella) referensvärden som tidigare har uppmätts på individen själv kan verka vara idealiska, speciellt om det populationsbaseade referensintervallet för ett mätvärde är för stort. Man bör studera resultatens noggrannhet med avseende på olika material och omständigheter. Olika medicinska specialiteter och olika kliniska och preventiva medicinska situationer kan kräva olika slags procedurer (1, 5, 6).

Variationer i resultaten av laboratorieprover kan bero av ett stort antal olika faktorer som kan kategoriseras som i Figur 1. De kan indelas i preanalytiska, analytiska och postanalytiska faktorer (5, 7, 8). Preanalytiska faktorer inverkar före den slutgiltiga analysen, och de kan indelas i *in vivo*- (biologiska) och *in vitro*-faktorer. *In vivo*-faktorer inverkar i den undersökta personen före och under provtagningen; en del av dessa faktorer kan kontrolleras, som diet, läkemedelsbehandling, fysisk aktivitet och kroppsställning, medan andra inte är kontrollerbara, som genetiska faktorer, kön eller ålder. *In vitro*-faktorerna omfattar provtagningen och provtagningsutrustningen samt behandlingen av provet (transport, lagring, förberedelse för analysen). En lista över en del *in vivo*- och *in vitro*-preanalytiska faktorer visas i Tabell I. Eftersom det viktigaste ändamålet med laboratorie-

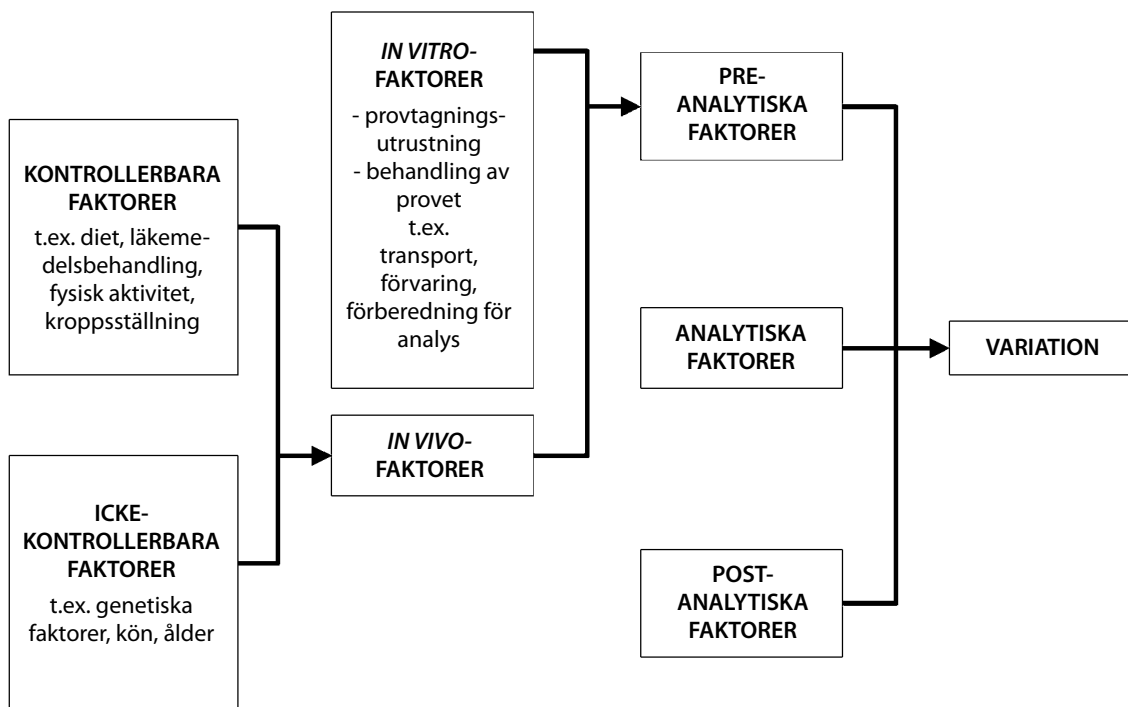
undersökningar är att särskilja patologiska (eller avvikande) resultat och bakgrundsdata från kontrollpersoner (eller från tidigare data från samma person), är det viktigt att minska bruset (variationen) som beror på icke-patologiska faktorer.

Hur kan man minska de preanalytiska faktorernas inverkan?

De finns flera sätt att minska inverkan av dessa faktorer. Man kan mycket strikt standardisera förberedelsen av patienterna för testerna, insamlingen och behandlingen av data samt de analytiska metoder som används. För att utveckla standardiseringsprocedurerna måste faktorer som potentiellt inverkar på resultatet upptäckas och studeras. Om de orsakar en klar förskjutning av data borde man utveckla strategier för att undvika att sådana faktorer inverkar på resultaten. Om det är frågan om kontrollerbara faktorer kan man använda procedurer som dämpar dessa faktorer inverkan, och sedan förbättra standardproceduren med lämpliga nya regler. Om faktorerna inte kan kontrolleras, borde undersökningar genomföras för att klarlägga hur mycket (t.ex. i procentuell förändring) en faktor eller en kombination av faktorer kan påverka data. Möjligheten att använda speciella set av referensvärden eller att korrigera data bör övervägas. Om en inverkan faktor konstateras före eller under mätproceduren, borde detta åtminstone meddelas klinikern eller forskaren som utnyttjar data för att fatta beslut, till exempel genom att bifoga en varning till laboratoriesvaret.

Borde inverkan av preanalytiska faktorer utvärderas så snart en ny undersökning blir kommersiellt tillgänglig? Vem borde ansvara för en utvärdering?

Den preanalytiska fasen har större inverkan på resultatet av laboratorieundersökningar än själva analysen; det analytiska felet är alltså mycket mindre än den preanalytiska variationen. Jag anser att kvalitetskontrollen för ett laboratorieprov borde omfatta preanalytiska faktorer långt mer än vad nu är fallet. Inte ens internationella standarder beaktar tillräckligt detaljerat patientens fysiologiska tillstånd och hur patienten förbereds innan provtagningen. Klinikern borde vara medveten om att en förändring i laboratorieresultaten inte nödvändigtvis innebär en förändring i patientens hälsotillstånd. Kliniska beslut borde basera sig på fakta snarare än på erfarenhet och välgrundade gissningar. Man kan därför fråga sig



Figur 1.
Faktorer som påverkar resultatet av laboratorieprover.

om inte undersökningar av de preanalytiska faktorerna borde finnas med i valideringsprocessen för en ny undersökning. Min åsikt är att sådana studier borde krävas. Till dags dato har ett sådant krav tyvärr inte övervägts. En annan fråga är vem som borde ansvara för sådana undersökningar, en officiell instans, företaget som säljer undersökningsmetoden, eller någon annan?

Några exempel på bidrag av nuvarande eller tidigare medlemmar av Biokemigruppen vid Minerva till studiet av inverkan av preanalytiska faktorer

Vi har studerat inverkan av ett rätt stort antal preanalytiska faktorer, som kroppsställning (9–12), fysisk och psykisk stress (13–18), fysisk ansträngning (18–23), näringsupptag (6, 24) eller tid på dygnet (6, 24), på resultatet av många prover som används rutinmässigt eller som håller på att utvecklas.

En av de mest framgångsrika undersökningarna studerade kroppsställningens inverkan; den presenteras nedan mer i detalj. Redan under min tid vid Minerva diskuterade vi mycket

den sammanlagda effekt som en kombination av preanalytiska faktorer har på resultatet av laboratorieprov. Det står klart att flera preanalytiska faktorer samverkar vid provtagningen, t.ex. näringsintag, kroppsställning och användning av stasslang. En av mina studerande skrev nyligen sin doktorsavhandling om faktorer (eller kombinationer av faktorer) som påverkar den endogena produktionen av androgener hos kvinnor.

Som jag tidigare har nämnt vore det viktigt att preanalytiska faktorer äntligen skulle studeras då ny teknologi utvecklas. Vi har nyligen framlagt preliminära resultat som klart visar att fysisk ansträngning är en preanalytisk faktor som bör beaktas då man undersöker metabolomik med urinprov.

Inverkan av kroppsställningen

Med avseende på referensvärden är det av grundläggande betydelse att provtagningsförhållandena är desamma för referenspersonerna och patienterna: värden för sittande patienter ska jämföras med värden från sittande kontrollpersoner och värden från liggande patienter med värden från liggande kontrollpersoner. Men i praktiken tas rutinblodprov

Tabell I.
Exempel på preanalytiska faktorer som orsakar variation.

IN VIVO-FAKTORER	IN VITRO-FAKTORER
ålder blodtyp	koagulation (tid, temperatur, underlättande agens) utrustning (provtagningstillbehör: typ, storlek, form, material; förvaringskärl: kapillärrör eller större rör av glas, plast; tillsatsämnen)
kronobiologiska faktorer diet (typ, mängd) sjukdom miljö	förberedelse för analys (upptining, blandning)
etnisk grupp	separation av serum, plasma och fasta beståndsdelar
motion och fysisk kondition feber	element (centrifugkraft, tid, temperatur) förvaring (behållare, varaktighet, temperatur, konserveringsmedel)
genetiska faktorer menstruation, menopaus	teknik (punktering, uppsamling: fritt flöde eller sug)
farmakologiskt aktiva ämnen kroppsställning	transport (behållare, konserveringsmedel, temperatur, tid)
graviditet pubertet kön socioekonomisk ställning stress	

ofta på morgonen på rörliga polikliniska patienter som har ansträngt sig måttligt fysiskt (vanligen genom att komma gående), medan sjukhuspatienter ofta ligger i sina bäddar nästan helt utan fysisk aktivitet (11).

Små molekyler påverkas minst av kroppsställningen vid blodprovtagningen eftersom de fritt kan röra sig mellan interstitiella rummet och blodbanan (10). Medan den fria fraktionen av en metabolit, ett läkemedel, ett hormon eller en metalljon vanligen inte påverkas av kroppsställningen, påverkar kroppsställningen den fraktion som är bunden till protein, t.ex. albumin. I blodprover från personer i sittande ställning ses i allmänhet en ökning av de flesta cellulära och makromolekylära substanserna jämfört med blodprover från personer i liggande ställning (10).

Behovet att standardisera patientens kroppsställning vid provtagning är uppenbart. Åtminstone måste man veta i vilken omfattning och riktning förändringarna sker då ställningen ändras från liggande till sittande.

Enligt den skandinaviska rekommendationen för sammanställning av referensvärden (25) borde rörliga patienter sitta i minst 15 minuter före provtagning. Förändringar i plasmavolymer i samband med förändrad kroppsställning eller vid användning av stasslang kan påverka koncentrationen av flera substanser. Det har föreslagits att blodprov borde tas sedan patienten suttit i 15 minuter, utan stasslang och helst på morgonen på fastande mage (26). Detta förfaringsätt minskar effekten av många preanalytiska faktorer, vilket vi har visat för en del substanser (9–11). Tyvärr bryr man sig ofta inte om sådana procedurer. Det finns ett anmärkningsvärt undantag: Idrottsmän verkar vara mycket noga med att inta en standardiserad kroppsställning innan de lämnar blodprov för mätning av hemoglobinkoncentrationen (3).

Samverkan av flera preanalytiska faktorer

Vi har nyligen hos unga kvinnor undersökt inverkan av menstruationscykeln, oral kon-

traception och fysisk träning på träningsinducerade (kort- och långvariga intensiva övningar) förändringar i cirkulerande dehydroepiandrosteron (DHEA) -sulfat samt testosteron, urinutsöndring av DHEA, dess metabolit androsteron och nandrolonmetaboliter (19-norandrosteron och 19-noretiocholanon) (8, 20–22). Nandrolonutsöndringen påverkades inte av menstruationscykelns fas (tidig/follikulär jämfört med mellan/luteal), föregående motion, oral kontraception eller akut fysisk ansträngning. Hos alla försökspersoner orsakade långvarig ansträngande motion en signifikant stegring av cirkulerande DHEA-s och testosteron samt av androsteronutsöndringen i urinen. Kortvarig motion orsakade en signifikant stegring i cirkulerande DHEA hos otränade försökspersoner och hos vältränade försökspersoner med fysiologisk menstruationscykel. Oral kontraception minskade de förändringar som orsakades av kortvarig motion.

Dessa resultatserier är av vikt när man tolkar data från dopingkontroll på idrottare.

Fysisk ansträngning och metabolomik

Metabolomik är det systematiska studiet av de unika kemiska fingeravtryck som specifika cellulära processer lämnar efter sig; mer specifikt studiet av metabolitprofiler med avseende på små molekyler (27). Metabolomik är därför en vittomfattande metod för metabolanalys, där man mäter biologiska provers övergripande metabola profil. Vi använde detta tillvägagångssätt för att undersöka förändringar i urinens biokemiska profil orsakad av fysisk ansträngning (23). Den ansträngning vi undersökte var intensiv men kortvarig (30 sekunder). Proverna analyserades med ¹H NMR-spektroskopi, och multivariata statistiska metoder användes för att analysera data. Som väntat orsakade intensiv fysisk ansträngning många förändringar i provernas metabola profil, både hos otränade och vältränade försökspersoner. Förändringarna förblev signifikanta mer än en timme efter avslutad ansträngning. Därför borde hård fysisk ansträngning beaktas som en viktig biologisk faktor som påverkar experimentresultaten vid studier i metabolomik inom farmakologi och toxikologi samt vid kliniska studier, och betydelsen av att undvika denna faktor borde beaktas då en studie planeras. I ljuset av våra data är metabolomik å andra sidan ett lovande verktyg med vilket man kan

profilera idrottares urin för att få en insikt i det fysiologiska tillståndet samt klargöra de förändringar som orsakas av kortvarig intensiv fysisk ansträngning.

Nuvarande och framtida forskning om preanalytiska faktorer

Antalet publikationer om preanalytiska faktorer i Medline är för närvarande över 500. Detta antal är globalt sett rätt litet, men det är intressant att 20 procent av artiklarna har publicerats under de två senaste åren, vilket återspeglar den ökande förståelsen av hur viktigt området är. Ett tidigt undantag är Donald Youngs bok (28). Det är också lovande att författare nu för tiden beaktar inverkan av preanalytiska faktorer då nya tekniker utvecklas (29, 30). Dessutom publiceras allt fler artiklar om faktorer som kan inverka på resultatet av laboratorieprover, också om de oftast inte kallas preanalytiska faktorer. Därför har vårt pionjärbete inte varit förgäves, och det står klart att mycket mera sådan forskning är i antågande.

Slutsats och budskap att ta till sig

Ändamålet med denna översikt är att uppmärksamma läsaren på inverkan av det stora antal preanalytiska faktorer som kan påverka resultatet av laboratorieprover och andra kliniska tester. För att förbättra testernas värde borde man därför bemöda sig om att begränsa inverkan av förvrängande faktorer, när detta är nödvändigt. En nyckelstrategi är att införa och följa (!) standardiserade procedurer för hur prover ska tas och behandlas, och att rutinemässigt rapportera till klinikern då man har avvikit från de rekommenderade procedurerna. Flera andra problem borde också angripas, som behovet av en standardisering av de analytiska metoderna och utvecklingen av lämpliga samlingar av referensvärden och referensintervall.

Prof. Benoit Dugué
Université de Poitiers
Faculté des Sciences du Sport et Laboratoire
des Adaptations Physiologiques aux Activités
Physiques (EA 3813)
4 allée Jean Monnet
86000 Poitiers
Frankrike
benoitdugue@hotmail.com

Referenser

1. Advances in Clin Chem 1989;27:1-79.
2. Gräsbeck R. Reference values, why and how. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1990;50 Suppl 201:45-53.
3. Gräsbeck R. The evolution of the reference value concept. Clin Chem Lab Med 2004;42:692-697.
4. Kairisto V, Virtanen A, Uusipaikka E, Voipio-Pulkki L-M, Peltola O, Irjala K. Method for determining reference changes from patients' serial data: example of cardiac enzymes. Clin Chem 1993;39:2298-304.
5. Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Preanalytical factors and the measurement of cytokines in human subjects. Int J Clin Lab Res 1996;26:99-105.
6. Leppänen E, Dugué B. When to collect blood specimens: mid-morning vs fasting samples. Clin Chem 1998;44:2537-42.
7. Gräsbeck R. Terminology and biological aspects of reference values. Logic and Economics of Clinical Laboratory Use Vol. New York: Elsevier, 1978:77-90.
8. Enea C, Boisseau N, Diaz V, Dugué B. Biological factors and the determination of androgens in female subjects. Steroids 2008;73:1203-16.
9. Leppänen E. Experimental basis for standardisation of blood specimen collection. Doktorsavhandling Helsingfors, 2004.
10. Leppänen E, Gräsbeck R. Experimental basis of standardized specimen collection: Effects of posture on blood picture. Eur J Haematol 1988;40:222-226.
11. Leppänen E, Luisto M, Dugué B. Surgical patients with surprising laboratory data. Br J Clin Pract 1995;49:121-122.
12. Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Packed-cell volume in athletes. Lancet 1998;352:1387-8.
13. Dugué B, Leppänen E, Zhou H-P, Gräsbeck R. Preanalytical factors and standardised specimen collection: influence of psychological stress. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 1992;52:43-50.
14. Dugué B, Leppänen E, Teppo A, Fyhrquist F, Gräsbeck R. Effects of psychological stress on plasma interleukins-1 beta and 6, C-reactive protein, tumor necrosis factor, antidiuretic hormone and serum cortisol. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 1993;53:555-561.
15. Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Preanalytical factors and standardised specimen collection: the effect of industrial noise. Stress Medicine 1994;10:185-189.
16. Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Preanalytical factors (biological variation) and the measurement of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 in man. Influence of the time of the day, food intake, psychological and physical stress. Clin Chem 1999;45:1543-47.
17. Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. The driving licence examination as a stress model. Effects on blood picture, serum cortisol and the production of pro-inflammatory interleukins in subjectively healthy volunteers. Life Sciences 2001;68:1641-7.
18. Dugué B, Smolander J, Westerlund T, Oksa J, Nieminen R, Moilanen E, Mikkelsen M. Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 2005;65:395-402.
19. Dugué B, Leppänen E. Adaptation related to cytokines in man. Effects of regular swimming in ice-cold water. Clin Physiol 2000;20:114-121.
20. Bayle M, Enea C, Goetinck P, Lafay F, Boisseau N, Dugué B, et al. Quantitative analysis of DHEA and Androsterone in female urine: application to the evaluation of sport and contraceptive pill intake influences. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2009;393:1315-25.
21. Enea C, Boisseau N, Bayle M, Flament M, Denjean A, Diaz V, Dugué B. Nandrolone excretion after exhaustive exercises in females: influence of menstrual cycle, oral contraception and training level. Scand J Med Sci Sports 2009; i tryck.
22. Enea C, Boisseau N, Ottavy M, Mulliez J, Millet C, Ingrand I, Dugué B. Effects of menstrual cycle, oral contraception, and training on exercise-induced changes in circulating DHEA-sulfate and testosterone in young women. Eur J Appl Physiology 2009;106:365-373.
23. Enea C, Seguin F, Petitpas-Mulliez J, Boisseau N, Delpech N, Diaz V, Dugué B. Physical exercise is a preanalytical factor to consider in urine metabolomic studies: an investigation in the profile changes induced by acute and chronic physical exercise. Acta Physiologica (supplement 671) 2009; O7.
24. Dugué B, Leppänen E. Short term variability in the concentration of serum IL-6 and its receptor in subjectively healthy persons. Clin Chem Lab Med 1998;36:323-325.
25. Alström T, Gräsbeck R, Hjelm M, Skandsen S. Recommendations concerning the collection of reference values in clinical chemistry and activity report by the Committee on Reference Values of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1975;144:1-44.
26. Alstrom T, Gräsbeck R, Lindblad B, Solberg H, Winkel P, Viinikka L. Establishing reference values from adults: recommendation on procedures for the preparation of individuals, collection of blood, and handling and storage of specimens. Committee on Reference Values of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 1993;53:649-652.
27. Daviss B. Growing pains for metabolomics. The Scientist 2005;19:25-28.
28. Young D. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests. Washington, DC: AACC Press, 1993.
29. Banks R. Preanalytical influences in clinical proteomic studies: raising awareness of fundamental issues in sample banking. Clin Chem 2008 54:6-7.
30. Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, et al. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics. Clin Chem Lab Med 2009;47:724-744.