



JÖNKÖPING UNIVERSITY
School of Health and Welfare

Utvärdering av analysmetod för bestämning av anti-FXa aktivitet i plasma hos patienter behandlade med apixaban eller LMH

HUVUDOMRÅDE: *Biomedicinsk, laboratorievetenskap*

FÖRFATTARE: *Areej Abuaita och Asmaa El Saleh*

HANDLEDARE: *Sandra Karlsson och Susanne Karlsson*

JÖNKÖPING 2019-juni

Sammanfattning

Apixaban och lågmolekylärt heparin (LMH) är antikoagulantia som förhindrar blodproppsbildning genom att hämma faktor Xa. Allt mer patienter använder apixaban och LMH, vilket gör att laboratoriemedicin på länssjukhuset Ryhov är i behov av att utvärdera analysmetoder för apixaban och LMH för att kunna implementera analyserna i klinisk rutin. Syftet med studien var att utvärdera analysmetoden för bestämning av anti-FXa aktivitet i plasma hos patienter behandlade med apixaban eller LMH med hjälp av kromogen substratmetod. Metodutvärderingen bestod av fyra steg: repeterbarhet, mellanliggande precision, överensstämmelse med validerad metod och analys av normalpopulation. Utvärderingen genomfördes med hjälp av Sysmex CS-2100 där det analyserades 20 respektive 40 patientprover för apixaban och LMH samt 10 normalprover. Aktivitet av faktor Xa bestämdes kvantitativt med användning av ljusabsorption vid 405 nm. Repeterbarhet och mellanliggande precision visade låg CV. Patientprover visade överensstämmande resultat med referensvärden från andra laboratorier där r^2 för apixaban och LMH var 0,95. Avvikande resultat kan bero på mätfel eller förväxling mellan prover. Analys av normalpopulation visade att värden låg under det lägsta tillförlitliga värdet. Utvärdering av analysmetoden apixaban och LMH på Ryhofs laboratorium visade goda resultat vilket bekräftar att analysmetoden kan användas i klinisk rutin.

Nyckelord: NOAK; Kromogen substratmetod; Eliquis; fragmin; blodkoagulation.

Summary

Evaluation of assay method for determination of anti FXa activity in patient's plasma treated with apixaban or LMWH

Introduction: Apixaban and low molecular weight heparin (LMWH), are anticoagulants that prevent clot formation by inhibiting factor Xa. Increasingly more patients use apixaban and LMWH, for this reason the laboratory medicine at the county hospital Ryhov needs to evaluate methods of analysis for apixaban and LMWH to be able to implement the analyzes in clinical routine. **Aim:** The purpose of the study was to evaluate the assay method for determining anti-FXa activity in plasma in patients treated with apixaban or LMWH using chromogenic substrate method. **Method:** The method evaluation consisted of four steps: repeatability, intermediate precision measures, compliance with validated method and analysis of normal population. The evaluation was performed using Sysmex CS-2100 where 20 respective 40 patient samples were analyzed for apixaban and LMWH as well as 10 normal population samples. Factor Xa activity was quantitatively determined using light absorption at 405 nm. **Result and discussion:** Repeatability and intermediate precision showed low CV. Patient samples showed consistent results with reference values from other laboratories where r^2 for apixaban and LMWH were 0.95. Deviant results may be due to measurement errors or confusion between samples. Analysis of normal population showed that values were below the lowest reliable value. **Conclusion:** Evaluation of the analysis method apixaban and LMWH at Ryhov's laboratory showed good results, which confirms that the assay method can be used in clinical routine.

Keywords: NOAC; Chromogenic substrate assay; Eliquis; Fragmin; blood coagulation.

Innehållsförteckning

Sammanfattning	2
Summary	3
Innehållsförteckning	4
Inledning	1
Bakgrund	1
Koagulationssystemet	1
Nya perorala antikoagulantia läkemedel.....	2
Apixaban.....	2
Lågmolekylärt heparin.....	3
Analys av anti-faktor Xa	4
Metodvalidering	5
Syfte	5
Material och metod	6
Studiepopulation	6
Studiedesign.....	6
Analys av repeterbarhet	6
Analys av mellanliggande precision	6
Analys av överensstämmelse med validerad metod.....	6
Analys av normalpopulation.....	6
Statistisk analys.....	7
Etiska överväganden.....	7
Resultat	8
Repeterbarhet.....	8
Mellanliggande precision.....	8
Överensstämmelse med validerad metod.....	8
Analys av normalpopulation.....	9
Diskussion	11
Metodvalidering	11
Repeterbarhet.....	11
Mellanliggande precision.....	11
Överensstämmelse med validerad metod	12
Analys av normalpopulation.....	12
Slutsatser	13
Omnämmanden	13
Referenser	14

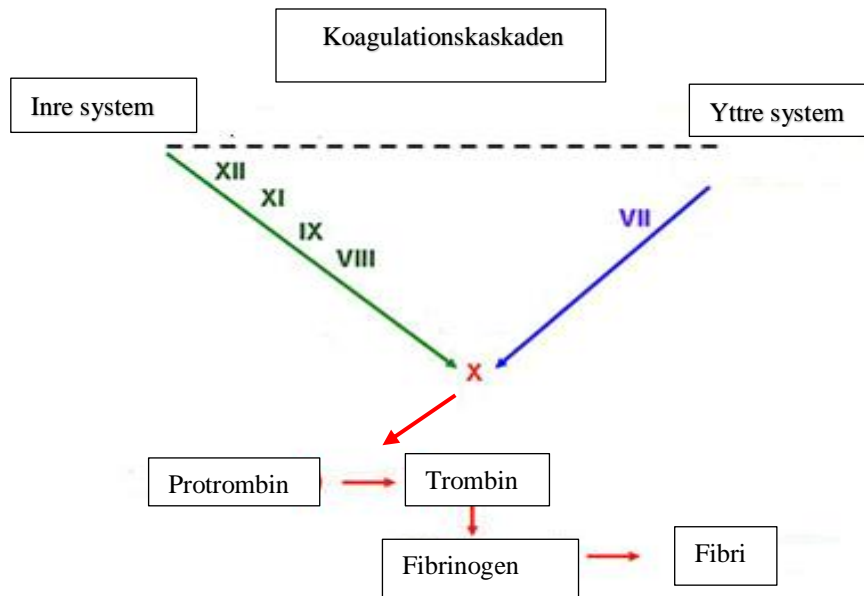
Inledning

Antikoagulantia verkar på olika komponenter i koagulationssystemet och används för att behandla och förebygga blodproppar. Warfarin ingår i denna grupp av läkemedel och har varit den vanligaste använda vitamin K-antagonister i Sverige som indirekt hämmar koagulationsfaktorer (1). Warfarin kräver noggrann uppföljning för att bestämma om rätt dos tas eller om doseringen behöver ändras. Felaktig dosering av warfarin kan orsaka livshotande blödningar i buk eller hjärna(2). Antikoagulantia som vitamin K-antagonister kan endast ges oralt och de har en långsam effekt, därför är de inte lämpliga för användning vid akut behandling (3). Apixaban och lågmolekylärt heparin (LMH) är andra antikoagulantia som förhindrar blodproppsbildning i kroppen genom att hämma faktor Xa (4, 5). Allt mer patienter använder apixaban och LMH, vilket gör att laboratoriemedicin på länssjukhuset Ryhov är i behov av att utvärdera analysmetoder för apixaban och LMH för att kunna implementera analyserna i klinisk rutin.

Bakgrund

Koagulationssystemet

I koagulationssystemet samverkar trombocyter och blodproteiner för att stoppa blödningar som uppstår vid skador. Vid normalt hälsotillstånd finns en bra balans mellan koagel och antikoagel. Det finns flera koagulationsfaktorer som samverkar vid koagulationen. Koagulationen sker genom att enzymer aktiveras i en bestämd följd, vilket kallas koagulationskaskad. Koagulationssystemet kan delas in i ett inre och ett yttre system. Inre systemet aktiveras av faktorer som finns i blodet medan yttre systemet aktiveras av membranfaktor som normalt finns utanför blodbanan. Koaguleringskaskaden i det yttre systemet startar när den skadade vävnadsfaktorn kommer i kontakt med faktor VII som omvandlas till ett enzym som aktiverar faktor X. Faktor Xa, som är en aktiverad form av Faktor X, aktiverar protrombin till trombin. Trombin i sin tur omvandlar fibrinogen till fibrintrådar, se Figur 1. I fibrintrådarna fastnar sedan blodkroppar och bildar en primär plugg (6). Faktor X produceras i levern och är beroende av vitamin k för aktivering (7).



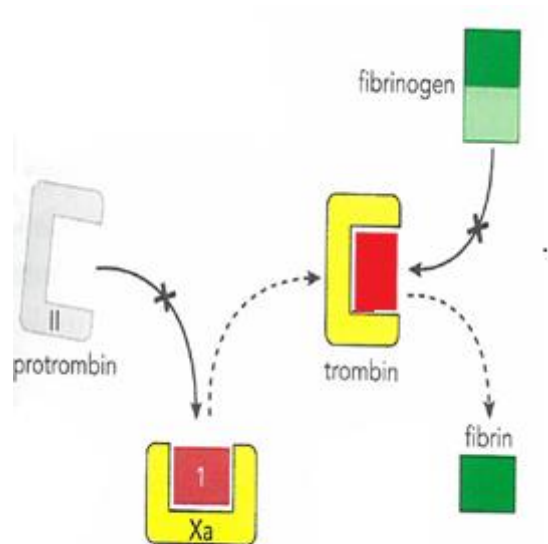
Figur 1. Schematisk beskrivning av koagulationssystemet som delas upp i ett inre och ett yttre system. Faktor VII aktiverar faktor X som i sin tur aktiverar protrombin till trombin, trombin förvandlar fibrinogen till fibrin (6)

Trombos orsakas av koagulering inne i kärlen, mest vanligen förekommande är djup ventrombos och lungembolism. Tromboser täpper igenom kärlen och leder till att vävnader inte får syre. Med stigande ålder påverkar olika faktorer bildning av trombos, såsom övervikt, venstatus, graviditet, nedsatt rörlighet, autoimmuna tillstånd och hormonbehandling. Det finns även flera ärftliga koagulationssjukdomar förknippade med en ökad risk för trombos (6).

Nya perorala antikoagulantia läkemedel

Apixaban

Apixaban är det verksamma substansen i läkemedlet Eliquis®, vilken är en selektiv direkt hämmare av fri och koagelbunden faktor Xa. Apixaban har hög affinitet för humant faktor Xa (4). Apixaban hämmar faktor Xa genom att binda till dess aktiva bindningsställe, vilket i sin tur hämmar bildningen av trombin, se Figur 2 (8). För friska individer uppnås maximal koncentration efter två timmar och ökning av apixaban är proportionell mot ökningen av dosen. Apixaban intas som en aktiv substans och har hög biotillgänglighet. Största delen av apixaban utsöndras via levern (4).



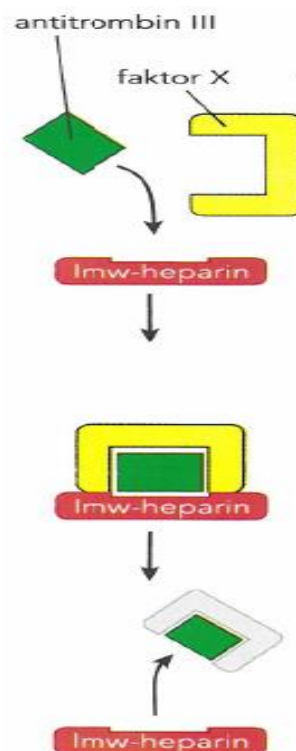
Figur 2. Verkningsmekanism för apixaban, apixaban (1) binds till faktor Xa. Trombinbildning hämmas och fibrinogen omvandlas inte till fibrin (8).

Nya orala antikoagulantia har utvecklats de senaste åren och apixaban dominerar vid nya insättningar av orala antikoagulantia (OAK). Apixaban är ett effektivt och säkert läkemedel som kan ges i klinisk rutin och kräver inte upprepade provtagningar som vid användning av warafin. Apixaban går in i blodbanan inom några timmar efter dosen och elimineras snabbare från kroppen efter den sista dosen jämfört med warfarin. I Kloka Listan 2017 rekommenderas apixaban i första hand och warfarin i andra hand (2). När det gäller stroke, systemiska embolier och allvarliga blödningar har apixaban visat minskade risker jämfört med warfarin (9). Det har även visats att patienter med nedsatt njurfunktion och som fått apixaban, fick liknande eller till och med mindre blödningar jämfört med patienter som fick warfarin. Vilket visar att patienter med nedsatt njurfunktion kunde med säkerhet använda apixaban istället för warfarin (10).

Lågmolekylärt heparin

Lågmolekylärt heparin (LMH) är antikoagulantia som kan ges parenteralt och har en snabb effekt. Heparin är en sulfaterad polysackarid, det finns både som ofraktionerat heparin (UFH) ($M_w \approx 15\,000$ g/mol) och som en lågmolekylärt heparin (LMH, $M_w \approx 4\,000\text{--}6\,500$ g/mol) (3). LMH som har lägre molekylvikt är derivat från heparin och verkar övervägande genom att hämma faktor Xa (se Figur 3). LMH har högre biotillgänglighet och längre halveringstid jämfört med UFH. Inom LMH ingår dalteparin (Fragmin®), enoxaparin (klexane®) (5). Heparin fungerar som katalysator för reaktioner mellan antitrombin och olika koagulationsfaktorer, vilket resulterar i en snabbare och mer kraftfull inaktivering av koagulationsfaktorer IX, X, XI, XII samt trombin. Heparin aktiverar antitrombin, vilken i sin tur inhiberar koagulationsfaktorerna. LMH har kraftfullare effekt på faktor X, men är mindre effektiv på övriga koagulationsfaktorer (8).

Heparin och dess derivat, lågmolekylärt heparin (LMH), används vid behov av snabb antikoagulerande effekt då de har snabbare effekt när de administreras genom IV-injektion. Hepariner administreras i lägre doser som profylax än för behandling av venös trombos eller akut myokardiskemi. LMH-preparat kan enkelt styras antingen på sjukhus eller utanför sjukhuset eftersom de kan administreras subkutant



Figur 3. Verkningsmekanism för LMH. LMH binds till antitrombin som i sin tur hämmar faktor X (8)

utan behov av laboratoriets uppföljning. Men även om kliniska granskningar har visat att LMH-övervakning inte är nödvändig, kan det fortfarande vara kliniskt användbart i vissa fall, som njurinsufficiens och fetma eller risk för över- eller underdoserin (11). När långvarig antikoagulantibehandling indikeras, administreras LMH oftast med orala antikoagulantia. Däremot används långvarig behandling utanför sjukhuset med LMH när antikoagulantia indikeras under graviditet och hos patienter som utvecklar recidiverande venös tromboembolism. LMH-preparat användes även för behandling av venös trombos och för behandling av instabil angina. Den används för behandling av venös trombos och akut lungemboli (12). LMH används även för att förhindra djup venetrombos (DVT) och för att minska neurologisk funktionsnedsättning eller för att minska risken för tidig återkommande ischemisk stroke (5).

Analys av anti-faktor Xa

Kromagen substratmetod kan användas för att analysera koncentrationer av apixaban och LMH. Detta är en indirekt metod för kvantifiering som baseras på mätning av anti-faktor Xa aktivitet. Faktor Xa är

den aktiva formen av faktor X, anti faktor Xa innebär den hämmade formen av faktor Xa. Ett överskott av faktor Xa läggs till citratplasman därefter bildas ett komplex mellan patientens egna trombin och faktor Xa i reagenset. Det kromogena substratet klyvs av faktor X eftersom koagulationskomponenten är endast aktiv i ett enzymkomplex. Det kromogena substratet ger ett färgomslag som är omvänt proportionellt mot läkemedel koncentration i plasmaprovet. Instrumentet mäter färgomslaget fotometriskt vid 405 nm (metodblad för Siemens, Innovance Heparin). Noak koncentration kan även bestämmas av vätske- kromatografi–tandemmasspektrometri (LC-MS/MS) referensmetod (13).

Antikoagulantia som LMH och apixaban används över hela världen för behandling och profylax av tromboemboliska störningar. Rutinlaboratorietester är inte nödvändiga på grund av att LMH och apixabans vanligtvis elimineras från kroppen. För gravida patienter, barn, patienter med njursvikt, fetma eller äldre behövs rutinlaboratorietester på grund av sämre elimination. Anti-Factor Xa plasmanivåer används oftast vid bedömning och vägledning av noggrann dosering i dessa patientgrupper(10, 14).

Metodvalidering

Metodens tillförlitlighet för mätresultat bedöms genom valideringsstudier. Vid valideringen lyfts fram de egenskaper som ger en generell beskrivning av metodens tillförlitlighet. Repeterbarhet, mellanliggande precision och analys av normalpopulation är tre viktiga steg som används för metodvalidering. Repeterbarhet utförs för att bestämma den variation som finns vid en mätmetod, det innebär att upprepade mätningar utförs under samma omständigheter. Den mellanliggande precision innebär förändring i en eller flera faktorer för att bedöma hur stabil metoden är, ändringen är i t.ex. tid, operatör och utrustning (15).

Syfte

Syftet med studien var att utvärdera analys av apixaban och LMH för bestämning av anti-FXa aktivitet i plasma genom kromogen substratmetod på länssjukhuset Ryhov, Jönköping.

Material och metod

Studiepopulation

Prover insamlades av rutinverksamheten på Linköping, Göteborg och Malmö laboratorium, alla prover som var tillgängliga användes i studien. Inklusionskriterier var patienter som behandlades med apixaban eller LMH. Kontroller för repeterbarhet och mellanliggande precision är ifrån företagen Innovance och Biophen. För att bestämma analys av normal population användes plasma från friska individer som kontroll för mätning av apixaban och LMH. Inklusionskriterier här var friska individer som inte tar antikoagulantia eller andra mediciner som påverkar koagulationssystemet.

Studiedesign

Metodutvärderingen bestod av fyra steg: repeterbarhet, mellanliggande precision, överensstämmelse med validerad metod och analys av normalpopulation. Med repeterbarhet och mellanliggande precision uppskattades mätosäkerheten, därefter påbörjades överstämmelse med validerad metod som utfördes genom att analysera patientplasma och jämföra resultatet med en liknande validerad metod. Repeterbarhet, mellanliggande precision, överstämmelse med validerad, samt analys av normalpopulation genomfördes med hjälp av Sysmex CS-2100 (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH), där aktivitet av faktor Xa bestämdes kvantitativt med användning av ljusabsorption vid 405 nm.

Analys av repeterbarhet

För LMH analys, användes två kontroller, en kontroll med lågränsvärde (INNOVANCE® heparin LMH kontroll 1) med gränsvärde 0.31- 0.51 IU/mL och en kontroll med höggränsvärde (INNOVANCE® heparin LMH kontroll 2) med gränsvärde 0.82-1.24 IU/mL. För analys av apixaban användes också två kontrollnivåer, dvs låg nivå (BIOPHEN™ apixaban Control low, REF 225201, CI) och hög nivå (BIOPHEN™ apixaban Control, REF 225301, CI). Gränsvärdena för låg respektive hög nivå apixaban uppmättes till 14–34 IU/mL och 165–223 IU/mL. Kontrollerna späddes upp genom att tillsätta 1 ml milliporevatten och delades därefter upp i doser om 250 µl och frystes ner i –20 °C. Vid kontrollkörning, tinades kontrollerna i ett värmeblock (37 °C) under 10 min och därefter vaggades kontrollerna i 5 min. Mätningar av alla fyra kontroller utfördes 10 gånger på samma material.

Analys av mellanliggande precision

För mätning av mellanliggande precision, användes två kontrollnivåer för mätning av LMH (hög och låg) och två kontrollnivåer för mätning av apixaban (hög och låg). En kontroll som motsvarar 250 µl tinades upp för varje dags körning genom att använda värmeblock (37 °C) under 10 min och därefter vaggades kontrollerna i 5 min. Kontrollerna mättes 2 gånger med 4 timmars skillnad. Mätningarna genomfördes under 5 sammanhängande dagar.

Analys av överensstämmelse med validerad metod

Analys av överensstämmelse med validerad metod utfördes genom att kontroller upptinades i ett värmeblock (37 °C) under 10 min och vaggades därefter i 5 min. Efter kontrollmätning tinades patientproverna på samma sätt som kontrollupptining. Patientproverna som analyserades tidigare av validerad metod var frysta i –20 °C. Det planerades 40 prover per analys men i realiteten blev 20 prover för apixaban. Totalt användes 40 patientprover för LMH analys och 20 patientprover för apixaban analys. Provresultat jämfördes med referensvärden från andra laboratorium i Linköping, Göteborg och Malmö

Analys av normalpopulation

För analys av normalpopulation utfördes venös provtagning på tio individer, där 2,7 mL blod fylldes i citratrör. Proverna centrifugerades i 20 min vid 2000 g. Plasman avskildes och hölls av i ett nytt rör som centrifugerades i ytterligare 5 min vid 2000 g. Plasma delades upp därefter i två eppendorfrör som frystes ner i -20 °C. Vid analys av normalpopulation tinades alla 20 plasmaprover från de 10 individer för att därefter köras i Sysmex CS-2100.

Statistisk analys

Datan bearbetades i Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond WA). För repeterbarhet och mellanliggande precision beräknades medelvärde (\bar{x}), standardavvikelse (SD) samt variationskoefficient (CV). Excel har använts vid överstämme med validerad metod för beräkning av linjär regression och korrelation. Vid överstämme med validerad metod har resultat även bearbetats med SPSS 21.0.0.2 (IBM Analytics, Armonk, NY), där Paired-Samples T-test och Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test användes för jämförelse mellan resultat från Jönköpings laboratoriet och andra laboratorier. Resultaten ansågs vara signifikant vid $p < 0,05$.

Etiska överväganden

I studien används plasma från patientprover som insamlats av rutinverksamheten. Proverna avkodades och gjordes icke spårbara för utbildningsändamål. Plasma från friska individer användes som kontroll och deltagarna tillfrågades och gav muntligt samtycke innan provtagning. En etisk egengranskning gjordes tillsammans med handledaren, det bestämdes att det inte finns något behov av att gå vidare för en etisk prövning.

Resultat

Repetierbarhet

För att bestämma repeterbarhet analyserades både låga och höga kontrollnivåer. För apixaban och LMH sammanställdes \bar{x} , SD och CV% i Tabell 1. Den låga och höga QC variationskoefficient för apixaban låg på 8,17 respektive 1,42. Den låga och höga QC variationskoefficient för LMH låg på 2,19 respektive 0,01. Medelvärdet låg inom gränsvärden.

Tabell 1. Variationskoefficient (CV) vid mätning av repeterbarhet för apixaban och LMH analys.

	Apixaban				LMH			
	Gränsvärde (mg/l)	\bar{x}	SD	CV (%)	Gränsvärde (IU/ml)	\bar{x}	SD	CV (%)
Låg QC	14–34	23	1,88	8,17	0,31–0,51	0,43	0,01	2,19
Hög QC	165–223	214,75	3,05	1,42	0,82–1,24	1,03	0,03	2,56

Medelvärde (\bar{x}), variationskoefficient (CV), kvalitetskontrollerna (QC)

Mellanliggande precision

För mätning av mellanliggande precision analyserades hög och låg kontrollnivåer. För apixaban och LMH visas \bar{x} , SD och CV% i Tabell 2. Den låga och höga QC variationskoefficient för apixaban låg på 7,16 respektive 1,01. Den låga och höga QC variationskoefficient för LMH låg på 3,27 respektive 0,02. Medelvärdet låg inom gränsvärden.

Tabell 2. Mellanliggande precisions variationskoefficient (CV) för apixaban och LMH analys.

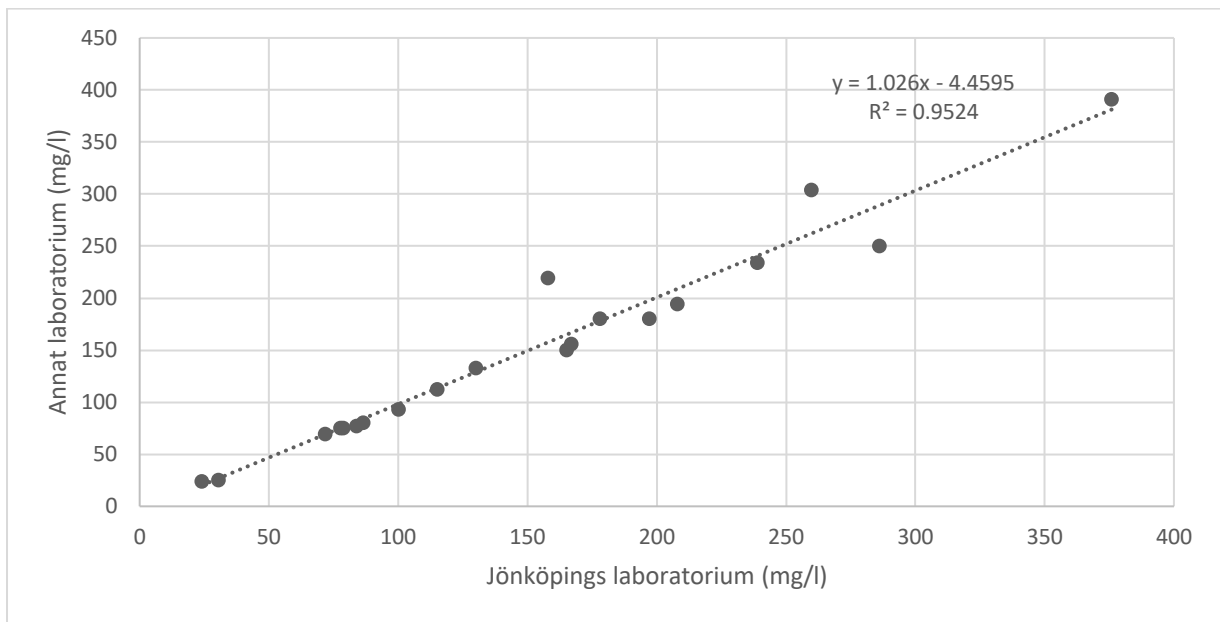
	Apixaban				LMH			
	Gränsvärde (mg/l)	\bar{x}	SD	CV (%)	Gränsvärde (IU/ml)	\bar{x}	SD	CV (%)
Låg	14–34	22,63	1,62	7,16	0,31–0,51	0,41	0,01	3,27
Hög	165–223	215,51	2,26	1,05	0,82–1,24	1,00	0,02	2,03

Medelvärde (\bar{x}), variationskoefficient (CV), kvalitetskontrollerna (QC)

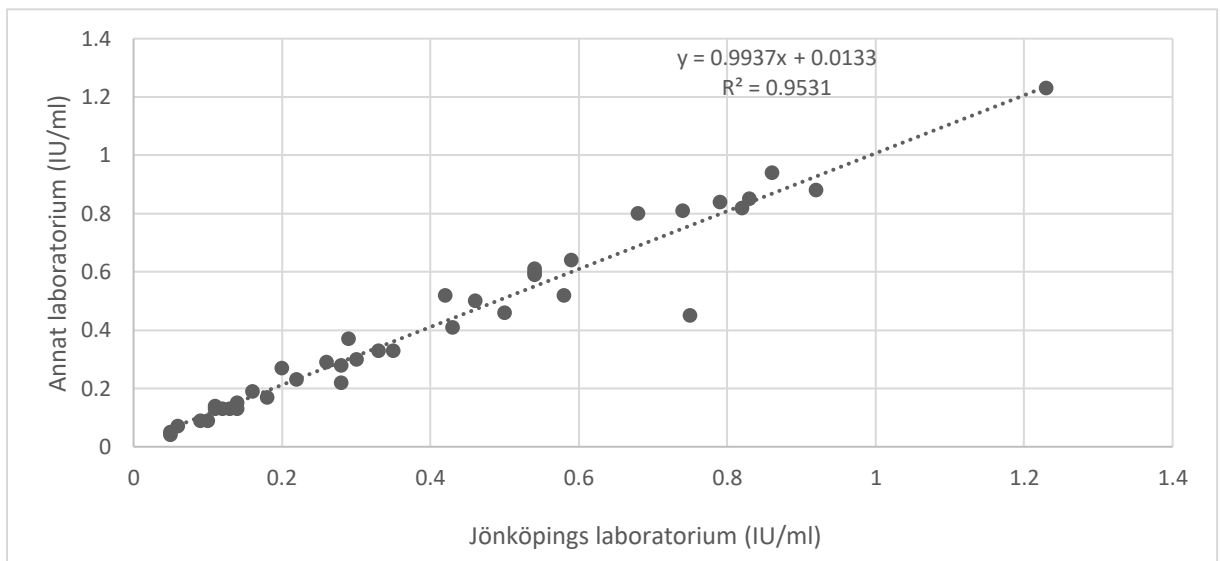
Överrensstämmelse med validerad metod

För överrensstämmelse med validerad metod för apixaban analys respektive LMH analys har Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test respektive Paired-Samples T-test använts för statistisk uträkning. Vid jämförelse av provresultat från Jönköpings laboratoriet och andra laboratorier för apixaban analys är P värdet 0,121 vilket visar att ingen statistisk skillnad finns. Detsamma för LMH analys vid jämförelse av provresultat från Jönköpings laboratoriet och andra laboratorier är P värdet 0,303 vilket visar att ingen signifikant skillnad finns.

Linjär regression och korrelation har även analyserats mellan Jönköpings laboratoriet och referensvärden från andra validerade laboratorier, resultatet redovisas nedan i Figur 4 och 5.



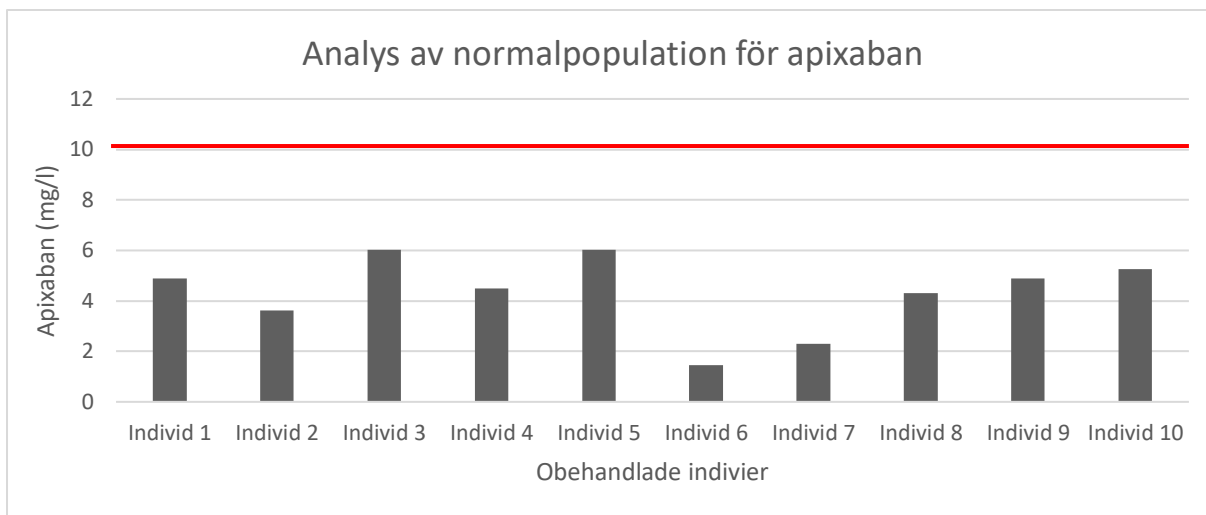
Figur 4. Linjär regression och korrelationsanalys mellan provresultat från Jönköpings och andra laboratorium (Linköping, Göteborg och Malmö) för apixaban analys. 40 prover analyserades.



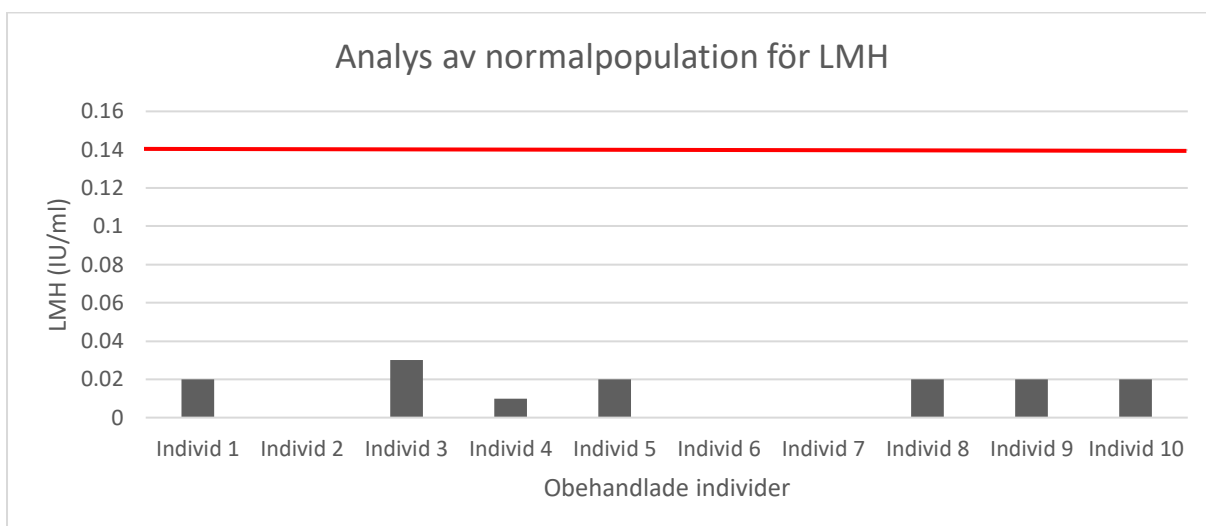
Figur 5. Linjär regression och korrelationsanalys mellan provresultat från Jönköpings och andra laboratorium (Linköping, Göteborg och Malmö) för LMH analys. 40 prover analyserades.

Analys av normalpopulation

Analys av normalpopulation fastställdes genom att analysera plasma från 10 friska individer. Figur 6 och 7 visar nivåerna av apixaban respektive LMH och den röda linjen visar det lägsta mätbara värdet för respektive analys. Värdena av normala populationen ligger under det lägsta tillförlitliga värdet.



Figur 6. Analys av normalpopulation för apixaban. Samtliga värden är under det lägsta tillförlitliga värdet som är 10 mg/l.



Figur 7. Detektionsgräns för LMH. Samtliga värden är under det lägsta tillförlitliga värdet som är 0,14 IU/ml.

Diskussion

I den här studien har vi utvärderat en analysmetod för detektion av anti-FXa aktivitet i plasma hos patienter behandlade med apixaban eller LMH, med hjälp av kromogen substratmetod. För att utvärdera metoden har vi utfört olika steg som bestod av: repeterbarhet, mellanliggande precision, överensstämmelse med validerad metod och detektionsgräns. Studien har utförts i Länssjukhuset Ryhov Jönköping.

Metodvalidering

Avsikten med validering är att utvärdera en metod, vilket kan resultera i en form av intyg som visar att metoden är lämplig, att man kan lita på att metoden uppnår givna önskemål och att metoden är korrekt i förhållande till de krav man har(16). Under studien har upprepade mätningar gjorts för att dokumentera och därefter kunna validera metoden. Validering brukar utföras en gång vid ny insättning av en metod. Det viktigaste under metodutvecklingen ligger främst på att bestämma och eliminera betydelsefulla systematiska effekter. Fördelen är att de flesta väsentliga osäkerhetskällor kan identifieras(15, 16). Vid bedömning av metodernas mätnoggrannhet på laboratorier används vanligen CV som visar hur stort en SD är i förhållande till ett \bar{x} (17).

Repeterbarhet

Repeterbarhet utförs för att analysera den variation som kan finnas vid en mätmetod. Repeterbarhet innebär att upprepade mätningar utförs under helt lika förhållanden (15). Analys av repeterbarhet var den första delen i valideringen. Repeterbarheten utfördes över en kort tid, med samma förutsättningar där reagenser, tid, instrument, material och temperatur hölls samma vilket medger till mindre spridning. Resultatet för repeterbarhet för apixaban presenteras i Tabell 1. Den låga och höga QC variationskoefficient för apixaban låg på 8,17 respektive 1,42. Den låga och höga QC variationskoefficient för LMH låg på 2,19 respektive 2,56. Resultatet har bedömts genom att medelvärdet av de upprepade analysera jämförts med gränsvärdena. Alla värden har varit godkända eftersom värdena ligger inom gränsvärdena. CV % har använts för att se hur stort en SD är i förhållande till ett \bar{x} , resultatet för CV% i den här studien avser skillnad när det gäller analys av apixaban. Spridningen är större när det gäller apixaban, dock har alla prover bearbetats på samma sätt och utförts under samma förhållande, det kan bero på att LMH analys har högre stabilitet än apixaban analys (Överläkare vid länssjukhuset Ryhov, Sone Nilsson, sone.nilsson@rjl.se).

Mellanliggande precision

Nästa steg i valideringsprocessen utgjordes av analys av mellanliggande precision, skillnad mellan repeterbarhet och mellanliggande precision är att mellanliggande precision avser ändringen i en eller flera faktorer för att se hur stabil metoden är, ändringen är i t.ex. tid, operatör och utrustning (15). I denna studien har tiden varierats och mätningarna har utförts med 4 timmars skillnad under fem dagar. Fördelen med att analysera tidsfaktorn vid mellanliggande precision, är att man utför mätningar som det verkligen ser ut i rutinen eftersom då utförs mätningarna under hela dygnet. På så sätt kan man se hur stabil metoden är och kontrollerna reagensers hållbarhet. Resultatet för mellanliggande precision redovisas i Tabell 2. För att bedöma resultatet har medelvärdet av de upprepade analysera jämförts med gränsvärdena. Alla värden har varit inom tillåtna gränsvärde därför är resultatet godkänd. Den låga och höga QC variationskoefficient för apixaban låg på 7,16 respektive 1,01. Den låga och höga QC variationskoefficient för LMH låg på 3,27 respektive 2,03. Högre variationskoefficient har visats hos apixaban jämfört med LMH. Variationen bland kontroller med låggränsvärde är högre beror på att den låga kontrollen påverkas vid experimentella fel eftersom de handlar om små mängder. Det beror även på att läkemedlet apixaban är instabil (Överläkare vid länssjukhuset Ryhov, Sone Nilsson, sone.nilsson@rjl.se).

Överensstämmelse med validerad metod

För överensstämmelse med validerad metod användes patientprover från Linköping, Malmö och Göteborg. Patientproverna har analyserats både i ursprungslaboratoriet och på Ryhovs laboratorium, klinisk kemi. Genom att göra denna jämförelse, kan man se hur nära resultatet från Jönköpings laboratorium ligger till referensvärden från de tidigare validerade metoderna. Provresultaten för apixaban har bearbetats med hjälp av en icke-parametrisk test som Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test som visade ingen signifikant skillnad mellan provresultaten från Jönköpings laboratorium och andra laboratorier där P-värdet var 0,121. Anledning till att en icke-parametrisk test användes var att provantal är väldigt liten och därför förutsätter vi inte en normalfördelning. Ingen signifikant skillnad visades för LMH analys vid jämförelse av provresultat från Jönköpings laboratorium och andra laboratorier, P-värdet var 0,303 i Pairsampel Paired-Samples T-test. Det visade ingen signifikant skillnad, alltså mätningen ger samma resultat men det kan bli väldigt lite variation orsakad av experimentella faktorer som bland annat hantering av prover.

Provresultaten analyserades även genom linjär regression och korrelationsanalys. Regressionsanalys används för att upptäcka systematiska avvikelser mellan variabler (17). Regressionskoefficient för apixaban och LMH var 0,95 respektive 0,99 vilket visar att det finns ett samband mellan metoden i Ryhov och de tidigare validerade metoderna. Perfekta överensstämmelse ses då regressionskoefficienten visar 1, regressionskoefficienten för apixaban och LMH är väldigt nära 1 därför konstateras metoden ha ett samband mellan metoden i Ryhovs och de validerade metoderna. Resultatet för apixaban hade dock större spridning jämfört med LMH, det kan bero på att antalet prover som analyserades var färre jämfört med LMH, vilket kan resultera till en osäkerhet i datan.

Korrelationsanalys används för att visa graden av samband mellan två variabler (17). I metodöverensstämmelse studerades hur metoden i Ryhov förhåller sig till andra validerade metoder, korrelationskoefficienten för både apixaban och LMH visar 0,995. Då båda korrelationskoefficienter visar positivt värde, tolkas det på en positiv korrelation mellan metoderna. En korrelationsvärde på +1 indikeras som perfekt korrelation.

Enligt farmaceutiska specialiteter i Sverige för Fragmin® uppnås den maximala läkemedelseffekt (LMH) 2–4 timmar efter given dos (18). Enligt Siemens healthcare (Efficient monitoring of heparin therapy by anti Xa assays) är stabiliteten hos citrat plasmaprov för heparinmätning begränsad till 4 timmar i rumstemperatur efter provtagning. Patientens endogena antitrombinkoncentration kan påverka mätningens resultat eftersom mätmetoden är beroende av antitrombinkoncentration. Anti-Xa kan bli lägre än önskat vid lägre antitrombinkoncentration i förhållande till given dos. Resultaten beror även på dosens storlek, njurfunktionen och provtagningstid i förhållande till LMH-injektion (18). Vid analys av patientprover för LMH har vissa prover varit under det lägsta tillförlitliga värdet, 0,14 IU/ml, se Figur 5. Detta kan bero på fel provtagningstid eller fel provhantering. Lägre läkemedelsdos kan även vara en orsak till att värdet är under det lägsta tillförlitliga värdet. Eftersom informationen om dosens storlek och dosens administreringstid var inte tillgänglig under studien går det inte att med säkerhet bestämma orsaken till varför vissa provresultat har hamnat under gränsen. Vissa prover har visat avvikelser mellan Jönköpings laboratorium och andra laboratorier (se figur 4, 5), detta kan bero på mätfel, förväxling mellan prover eller fel provhantering. Provens resultat kan bli falskt för låg/hög om det hanteras fel vid bl.a. centrifugering eller nedfrysning. Repor på kyvetterväggarna, användning av andra reagenser och andra mätmetoder kan orsaka till skillnad i överensstämmelse mellan Jönköpings laboratorium och andra laboratorier (19).

Analys av normalpopulation

Analys av normalpopulation gjordes med syfte att kontrollera mät-säkerheten, prover från obehandlade individer analyserades med önskan att inte överstiga det lägsta tillförlitliga värdet som leverantören har angivet. Resultat av normalpopulation för LMHs samtliga prover var $\geq 0,03$ IU/ml medan för apixaban låg alla värden $>6,05$ mg/l. Enligt leverantören är det minsta mätbara värdet för LMH 0,14 IU/ml och 10 mg/l för apixaban. Alla värden för respektive analys låg under det lägsta tillförlitliga värdet. Alla värden som är under tillförlitlighetsgränsen anses vara noll eftersom metoden inte kan mäta enda ner till noll, det beror på att kalibreringskurvan som användes är ställd till den minsta påvisbara värdet och inte ställd till noll.

I vanliga fall finns inget heparin eller apixaban i plasman. Utifrån ett mätsäkerhetsperspektiv går det inte att hävda att de uppmätta värdena som erhöles är en uppmätt koncentration av LMH eller apixaban, enligt leverantören kan mätmetoden för apixaban och LMH endast mäta till 10 mg/l respektive 0,14 IU/ml och inte enda ner till noll. Provresultaten från normalpopulation kan bero på annat som mäts i bakgrunden som ger absorptions vid samma våglängd, 405 nm.

Slutsatser

Aktiviteten av anti-fXa kan med god säkerhet analyseras genom kromogen substratmetod med instrumentet Sysmex CS-2100 på länssjukhuset Ryhov, Jönköping. Då resultat från repeterbarhet, mellanliggande precisioner, överrensstämmelse med validerad metod och analys av normalpopulation visat att ingen statistisk skillnad föreligger, vilket gör att analysmetoden apixaban och LMH kan implementeras i klinisk rutin. För att ta reda på analysmetodens detektionsgräns och säkerställa det lägsta mätbara värdet bör dock ytterligare studier utföras.

Omnämmanden

Slutligen vill vi tacka kliniskt kemilaboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov, Jönköping. Ett särskilt tack till våra handledare Susanne Karlsson och Sandra Karlsson.

Referenser

1. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med.* 2007;146(12):857-67.
2. **Karolina N**, Frieder B. Jämförande värdering av NOAK vid förmaksflimmer Janusinfo: region Stockholm; 2017 [
3. Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E, Becker C, Laurell C-B. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. 9., [rev. och utök.] uppl. / redaktion: Peter Nilsson-Ehle, Maria Berggren Söderlund, Elvar Theodorsson ; redaktionskommitté: Charlotte Becker, Kjell Grankvist, Anders Grubb, Göran Lindstedt, Per Simonsson. ed. Lund: Lund : Studentlitteratur; 2012.
4. Mavrakanas TA, Samer CF, Nessim SJ, Frisch G, Lipman ML. Apixaban Pharmacokinetics at Steady State in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2241-8.
5. Sandercock PA, Leong TS. Low-molecular-weight heparins or heparinoids versus standard unfractionated heparin for acute ischaemic stroke. *The Cochrane Database Of Systematic Reviews.* 2017;4:CD000119.
6. Jones A. Essential Guide to Blood Coagulation. *The Journal of Perioperative Practice.* 2010;20(12):421.
7. Chatterjee T, Philip J, Nair V, Mallhi RS, Sharma H, Ganguly P, et al. Inherited Factor X (Stuart-Prower Factor) deficiency and its management. *Medical Journal, Armed Forces India.* 2015;71(Suppl 1):S184-S6.
8. Lindström E, Norlén P. Farmakologi. 3. uppl.. ed. Stockholm: Stockholm : Liber; 2014.
9. Connolly SJ, Eikelboom J, Joyner C, Diener H-C, Hart R, Golitsyn S, et al. Apixaban in patients with atrial fibrillation. *The New England Journal Of Medicine.* 2011;364(9):806-17.
10. Stanton BE, Barasch NS, Tellor KB. Comparison of the Safety and Effectiveness of Apixaban versus Warfarin in Patients with Severe Renal Impairment. *Pharmacotherapy.* 2017;37(4):412-9.
11. Houbouyan L, Boutière B, Contant G, Dautzenberg MD, Fievet P, Potron G, et al. Validation protocol of analytical hemostasis systems: measurement of anti-Xa activity of low-molecular-weight heparins. *Clin Chem.* 1996;42(8 Pt 1):1223-30.
12. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest.* 2001;119(1 Suppl):64S-94S.
13. Antovic JP, Skeppholm M, Eintrei J, Boija EE, Söderblom L, Norberg EM, et al. Evaluation of coagulation assays versus LC-MS/MS for determinations of dabigatran concentrations in plasma. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(11):1875-81.
14. Harris LF, Castro-López V, Jenkins PV, O'Donnell JS, Killard AJ. Comparison of a fluorogenic anti-FXa assay with a central laboratory chromogenic anti-FXa assay for measuring LMWH activity in patient plasmas. *Thromb Res.* 2011;128(6):e125-9.
15. Chesher D. Evaluating assay precision. *The Clinical Biochemist Reviews.* 2008;29 Suppl 1:S23-S6.
16. Örnemark U. Utvärdering av mätosäkerhet i kemisk analys Sveriges Provnings- och Forskningsinstitut2004 [2:a:[
17. Ejlertsson, G. Statistik för hälsovetenskaperna. Upplaga 2:3 ed. Lund: Studentlitteratur2012. p. 98, 107.
18. allmänhet F. Fragmin FASS.se2016 [
19. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(6):565-75.