

22.

Særtrykk av Farmakoterapi nr. 1, vol. XVII, 1961. Utgiver: Nyegaard & Co. A/S, Oslo

En ny modifikasjon av Trombotest-metoden

I. Trombotest med citrat-kapillærblod

Av Peter F. Hjort og Solveig Mikkelsen

II. Några erfarenheter av Trombotest utført med citrat-kapillærblod

Av Gunvor Lilienberg, Ingrid Norèn
og Ann-Catrine Teger-Nilsson

GRØNDAHL & SØNS BOKTRYKKERI
OSLO 1961

En ny modifikasjon av Trombotest-metoden.

I. Trombotest med citrat-kapillærblod.

Av Peter F. Hjort og Solveig Mikkelsen.

Institutt for Tromboseforskning, Rikshospitalet, Oslo.

II. Några erfarenheter av Trombotest utført med citrat-kapillærblod.

Av Gunvor Lilienberg, Ingrid Norèn og Anne-Catrine Teger-Nilsson.

Akademiska sjukhuset, Kemiska centrallaboratoriet, Uppsala.

Karolinska sjukhuset, Kemiska centrallaboratoriet, Stockholm.

Sabbatsbergs sjukhus, Kemiska centrallaboratoriet, Stockholm.

I. Trombotest med citrat-kapillærblod.

Behandling med perorale antikoagulantia bør kontrolleres med en metode som tilfredsstillter både teoretiske og praktiske krav. Etterhvert som pasient-tallet øker, er det de praktiske krav som trer i forgrunnen: Metoden må være enkel, pålitelig og billig. Dessuten bør den gi resultater som kan sammenlignes direkte fra laboratorium til laboratorium. Trombotest-metoden (OWREN 1959) ble utarbeidet for å tilfredsstillte disse krav.

Opprinnelig ble metoden utarbeidet i to modifikasjoner:

1) Kapillærblod tas uten tilsetning og undersøkes straks. Dette er det enkleste og også det sikreste, fordi man unngår den vanskelighet som skyldes kontakt-aktivering av blodet under henstand. I Norge bruker man derfor denne metode både for pasienter som møter til kontroll ved laboratoriet og i stor utstrekning også for pasienter som er innlagt i sykehus.

2) Veneblod tas med tilsetning av citrat, oppbevares i plastrør, og undersøkes innen 48 timer. Denne metode brukes for pasienter som må sende sine blodprøver til laboratoriet i posten.

Erfaringen har vist (OWREN 1960) at man i selve testen kan redusere volumet av reagens og blod til det halve, altså til 0,05 ml blod og 0,25 ml reagens. Denne teknikk reduserer utgiftene til det halve, og er nå gjennomført overalt.

Etter at Trombotest var tatt i bruk ved en del sykehus i Sverige, ble det behov for en tredje modifikasjon. Det viste seg der å være uhensiktsmessig å laborere ved sykesengen, og man ønsket derfor å ta kapillærblod av pasientene, bringe det til laboratoriet, og undersøke det der. Dette problem ble løst på forskjellige måter ved 4 sykehus. En av disse modifikasjoner er publisert (BLEEKER 1960). De 4 løsningene var alle fullt brukbare, men ingen av dem ble ansett som helt ideell. På et møte i Stockholm i april 1960 fikk derfor Institutt for Tromboseforskning i oppdrag å samarbeide dem til et forslag. I denne artikkel gjør vi rede for vårt forslag.

Prinsipp.

Kapillærblod suges opp i en pipette som inneholder citrat, blodet blåses ned i et plastrør og bringes til laboratoriet. Her undersøkes prøven i det samme plastrør ved tilsetning av Trombotest-reagens som inneholder kalsium.

Utstyr.

1. Kapillærpipetter av glass som er merket ved 0,05 og ved 0,1 ml. Pipettene bør måle ca. 10 cm fra spissen til merket 0,1 ml.
2. Antikoagulans: 1 del 3,13 % natriumcitrat dihydrat blandet med 8 deler 0,9 % natriumklorid.
3. Trombotest reagens for *veneblod*.
4. Rør av plast eller tilsvarende materiale.

Det øvrige utstyr er det samme som for den tidligere Trombotest for kapillær-blod.

Fremgangsmåte.

Pipetten fylles med antikoagulans til merket 0,05 ml. Huden vaskes, og innstikk gjøres som tidligere. Pipetten fylles opp til merket 0,1 ml med blod, og citrat-blodet blåses straks ut i et plastrør. Blodet kan nå stå ved værelsetemperatur i 1—2 timer (se nedenfor).

Når blodet skal testes, settes plastrøret i et vannbad som holder 37° C. Etter 2—3 min. blåses 0,25 ml Trombotest reagens ned i røret, og klokken startes. Koagulasjonspunktet avleses på vanlig måte. Trombotest-reagenset må være forvarmet til 37° C. Det bør ikke stå ved denne temperatur i over 30 min.

Kommentarer.

1) *Reagensmengde.* Prøven utføres med halvdelen av den opprinnelige foreslåtte reagensmengde, nemlig 0,25 ml. Reagenset må løses opp i 3,2 mM kalsiumklorid og ikke i destillert vann, fordi blodprøven inneholder citrat.

2) *Blodmengde.* Vi er blitt stående ved 0,05 ml blod som en passende mengde. Prøven kan gjøres med bare 0,02 ml blod (WITH 1960), men vi har funnet at så små mengder gir usikre verdier i et rutine-laboratorium.

3) *Antikoagulans.* Vi prøvet først den vanlige tilsetning av 1/10 volum 3,13 % natriumcitrat dihydrat, det vil si 0,005 ml citrat til 0,045 ml blod. Det var imidlertid upraktisk å pipettere så små mengder antikoagulans, og vi prøvet derfor større volum av tynnere citrat-oppløsninger. Vi har funnet det mest praktisk å bruke:

0,05 ml av en spesiell citrat-fortynning: 1 del 3,13 % citrat + 8 deler
0,9 % natrium klorid,

0,05 ml blod.

Dette gir det samme forhold mellom citrat og blod som det er i citrat-veneblood.

4) *Blodprøvetagning* skjer på vanlig måte fra øre eller finger. Vi foretrekker siden av fjerde eller femte finger. Det er viktig å stikke så dypt at man får tilstrekkelig blod uten å «melke». Den første dråpen skal brukes, og man skal ikke berøre såret med bomull eller lignende før prøven tas. Det er en fordel å bruke nye og skarpe blad for hver gang. Blodet suges opp i en pipette som på forhånd inneholder antikoagulans i riktig mengde. Vi har funnet at man kan bruke en vanlig glass-pipette uten å få målbar kontakt-aktivering.

5) «*Tube*». Blodprøven må straks blåses ned i en «non-wetable tube», fordi man ellers får kontakt-aktivering av blodet under henstanden før undersøkelsen. Teoretiske overveielser skulle tale for at selve koagulasjonen burde foregå i et vanlig glassrør. I så fall måtte prøven overføres til dette like før undersøkelsen. Et slikt system forbyr seg selv, fordi det er for komplisert og tar for lang tid.

Vi har funnet at selve koagulasjonen kan foregå i en «non-wetable tube» uten at det forlenger koagulasjonstiden. Man kan derfor straks blåse blodprøven ned i et slikt rør, og senere utføre selve testen i samme rør ved å blåse Trombotest-reagenset ned. Dette gir maksimal forenkling, og er teknisk ikke vanskeligere enn den vanlige kapillær-prøve.

Vi har undersøkt silikonert glass og forskjellige plasttyper. Alle disse rør gir fullt brukbare resultater. Gjennomsiktige plastrør er mest praktiske.

6) *Forandring av blodet under henstand.* For å undersøke dette, har vi gjort følgende forsøk. Fem kapillær-pipetter ble fylt med 0,05 ml av citratoppløsningen. Deretter ble 2 ml veneblod tappet i et silikonert glass uten antikoagulans. Pipettene ble umiddelbart fylt opp med 0,05 ml blod og tømt ut i hvert sitt plastrør. De 5 rørene ble oppbevart ved værelsetemperatur, og undersøkt med mellomrom ved at 0,25 ml Trombotest-reagens ble blåst ned i røret. Selve koagulasjonen foregikk ved 37° C. Resultatet av dette forsøk fremgår av fig. 1.

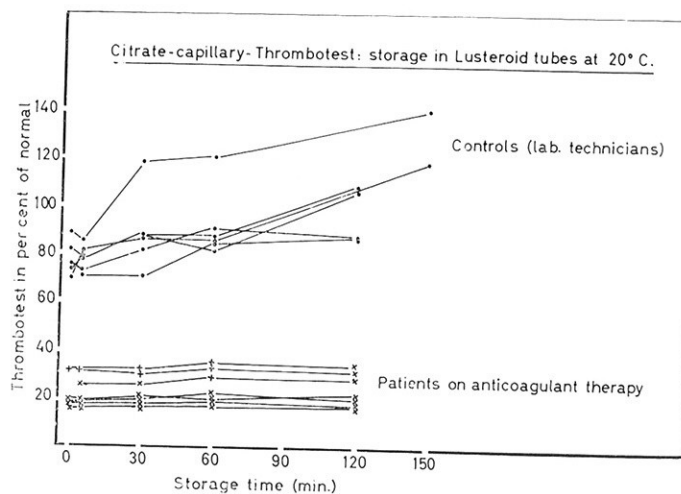


Fig. 1. Henstand av citratblod ved værelsetemperatur. Se teksten for beskrivelse av teknikken.

Blod fra antikoagulasjonsbehandlede pasienter er stabilt. Blod fra normale viser derimot aktivering under henstand, men forholdsvis lite i løpet av første time. Dette svarer til det vi har funnet tidligere (OWREN 1959), og forholdet beror vesentlig på at Trombotest er sensitivt for «intrinsic system». Forsøket i fig. 1 ble gjort med veneblod, fordi det er vanskelig å fylle en serie pipetter med kapillærblod fra samme person. Det er sannsynlig at kapillærblodet oppfører seg på samme måte som veneblod under disse forhold. Vi har derfor trukket den praktiske konklusjon at citrat-kapillærblod fra pasienter under antikoagulasjonsbehandling er stabilt iallfall i 2 timer. Senere erfaring har vist at man trygt kan strekke intervallet til 5 timer for blodprøver fra slike pasienter. Blod fra pasienter med normal koagulasjonsaktivitet er mindre stabilt, og det bør derfor undersøkes innen 1 time. Allikevel ser man av og til aktivering med for høye verdier.

Henstand ved forskjellig temperatur viser at det ikke er noen fordel å lagre prøvene ved lav temperatur. De bør derfor stå ved værelsetemperatur inntil de blir undersøkt.

Normalpersonene lå i dette forsøk i området 70—90 %. Etter vår erfaring er dette et vanlig funn hos kvinnelig laboratoriepersonale.

7) *Standardkurve.* Citrat-kapillærblod-metoden arbeider med 0,05 ml blod, det vil si samme mengde som i den vanlige kapillærprøve. Resultatet skulle derfor leses av etter kurven for *kapillærblod* (tiltross for at man bruker reagenset for *veneblod*). På den annen side utføres koagulasjonen i en «non-wetable tube», blodet inneholder citrat, og volumet av koagulasjonsblandingen er noe større enn i den vanlige kapillærprøve (0,35 ml mot 0,30 ml).

Det var umulig å forutsi hvilken virkning alt dette ville ha på resultatet, og standard-kurven måtte derfor bestemmes empirisk. Dette ble gjort på følgende måte. På 100 fortløpende pasienter under antikoagulasjonsbehandling ble

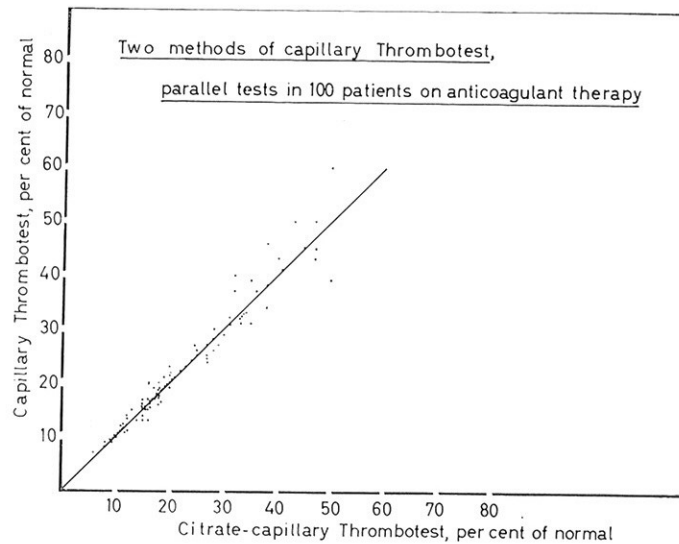


Fig. 2. Sammenligning av Trombotest utført i kapillærblod og i citrat-kapillærblod. Se teksten for beskrivelse av teknikken.

det gjort Trombotest i vanlig kapillærblod og i citrat-kapillærblod. De to prøvene ble tatt fra samme stikk, men rekkefølgen vekslet. Begge prøver ble undersøkt umiddelbart, men av to forskjellige teknikere. Koagulasjonstidene ble oversatt til % ut fra kurven for *kapillær*-blod. Fig. 2 viser at de to metoder ga samme resultat, slik at det ikke trenges noen omregningsfaktor. Vi valgte pasienter under antikoagulasjonsbehandling til dette forsøk, fordi deres blod er stabilt. Prøver i normalområdet viste prinsipielt samme funn, men noe større spredning.

Konklusjon.

1. Det er utarbeidet en enkel og praktisk metode til undersøkelse av citrat-kapillærblod med Trombotest.
2. Metoden gir pålitelige resultater for blod fra pasienter under antikoagulasjonsbehandling, og blodet kan stå i 5 timer før det undersøkes.
3. Metoden gir brukbare resultater for blod fra normalpersoner, såfremt blodet undersøkes innen 1 time.

Thrombotest with citrated capillary blood

by Peter F. Hjort and Solveig Mikkelsen.

Summary.

Thrombotest is ordinarily performed with citrated venous blood or with capillary blood. In some hospitals, a modification using citrated capillary blood is more convenient. A practical method has been developed in cooperation with Swedish hospitals.

The following technique is used: aspirate 0.05 ml. anticoagulant (1 part 3.13. % sodium citrate dihydrate + 8 parts of 0.9 % sodium chloride) into a capillary pipette, then aspirate an additional 0.05 ml. of capillary blood, empty the pipette into a non-wetable tube, and place the tube in a waterbath at 37° C. After 2–3 minutes, add 0.25 ml. of Trombotest reagent for venous blood, determine the clotting time, and read the result from the correlation curve marked "capillary blood". Citrated capillary blood from patients on anticoagulant treatment may be stored for at least 5 hours before testing, while normal blood should be tested within one hour. Before testing, the blood sample should be stored at room temperature.

LITTERATUR

- BLEEKER, J. J.: Trombotest (ad modum Owren) utförd på citrat-kapillär-blod. Sv. Läk. **57**, 380–383 (1960).
OWREN, P. A.: Trombotest. A new method for controlling anticoagulant therapy. Lancet **II**, 754–758 (1959).
OWREN, P. A.: Trombotest-metoden. Modifikasjon med mindre reagens-mengde. T. norske Lægeforen. **80**, 343–344 (1960).
WITH, T. K.: Laboratoriekontrol af antikoagulationsbehandling. Nord. Med. **63**, 458–460 (1960).

II. Några erfarenheter av Trombotest utfört med citrat-kapillärblod.

Den av OWREN 1959 introducerade Trombotest-metoden (TT) har tilldragit sig stort intresse, då den angetts vara känslig, enkel och personalbesparande. Metoden var ursprungligen utarbetad för citrat-venblod samt för kapillärblod utan tillsats. Vid kapillärprov medförde detta att bestämningen måste utföras i omedelbar anslutning till provtagningen. Vid en konferens i april 1960 ansågs detta förfarande mindre lämpat för svensk sjukhusrutin. Önskemål framfördes från flera håll, att metoden borde modifieras för citrat-kapillärblod för att möjliggöra analys inom större tidsintervall.

På grundval av de förslag som framlades vid denna konferens har HJORT och MIKKELSEN (1961) utarbetat en Trombotest-metodik för citrat-kapillärblod. Några erfarenheter med denna metodik redovisas här.

Metod.

Reagens: Utspädd natriumcitratlösning: 1 del 0,1 M natriumcitratlösning + 8 delar fys. koksalt-lösning. Trombotest-lösning: Trombotest-reagens löst i 3,2 mM kalciumkloridlösning.

Provtagning: En 0,1 ml kapillärpipett fylls till 0,05 ml med utspädd natrium-citratlösning och därefter med kapillärblod till 0,1 ml. Blod-citratblandningen nedblåses i plaströr.

Bestämning: Trombotestlösning samt rör med prov förvärmes i vattenbad till 37°. 0,25 ml Trombotest-lösning nedblåses i rören. Proven får stå

30 sek. i vattenbadet, varefter de vaggas. Tiden mellan tillsats av Trombotest-lösning och koagulation avläses. Koagulationsaktiviteten erhålles ur den korrelationskurva, som medföljer varje Trombotest-förpackning.

Resultat och diskussion.

En liten serie parallellbestämningar har utförts för jämförelse mellan den ursprungliga TT-kapillär-metoden och TT-citrat-kapillär-metoden. Resultatet redovisas i tabell 1. Den goda korrelationen är i överensstämmelse med HJØRRTS och MIKKELSENS resultat. Vidare har bestämningar för jämförelse mellan TT-

| Thrombotest capillary technique coagulation activity % | Thrombotest citrate-capillary technique coagulation activity % | P-P method % | Quick-Lehmann prothrombin index |
|---|---|--------------------|---------------------------------------|
| < 5 | < 5 | < 5 | 29 |
| 5,3 | 5,3 | 6,5 | 43 |
| 5,2 | 5,6 | 7 | 43 |
| 8,2 | 8,8 | 10 | 50 |
| 11,5 | 11 | 12 | 53 |
| 16 | 14 | 17 | 57 |
| 17,2 | 18 | 20 | 69 |
| 23 | 22 | 27 | 72 |
| 37 | 33 | 40 | 79 |
| 64 | 60 | 64 | 82 |

Tabell 1: Jämförelse mellan Trombotest kapillärmetod och Trombotest citrat-kapillärmetod.

citrat-kapillär-metoden och P-P-metoden (protrombin-proconvertin-bestämning enl. OWREN & AAS 1951) utförts på patienter med antikoagulantbehandling samt på ett mindre antal normalpersoner.

Med båda metoderna har dubbelprov utförts. Då korrelationskurvan för Trombotest först nyligen förlängts till 5 %, har en del av bestämningarna med koagulationsaktivitet understigande 10 % ej inritats i diagrammet. Resultaten från 3 laboratorier har sammanförts i fig. 1.

Metoderna visar tillfredsställande överensstämmelse, dock med tendens till något högre värden för P-P-metoden. En förklaring därtill kan vara att olika referensplasma använts för metoderna. Samma tendens har emellertid iakttagits vid de olika laboratorierna, varför en liten men verklig skillnad i koagulationsaktivitetsnivå hos metoderna ej kan uteslutas.

Spridningen i diagrammet förefaller vara större vid höga koagulationsaktiviteter. Detta har iakttagits vid tidigare redovisade undersökningar av Trombotest och belyses ytterligare av följande exempel. Tolv prov på ett blod med koagulationsaktivitet 31 % gav en standarddeviation av 1,5, medan stan-

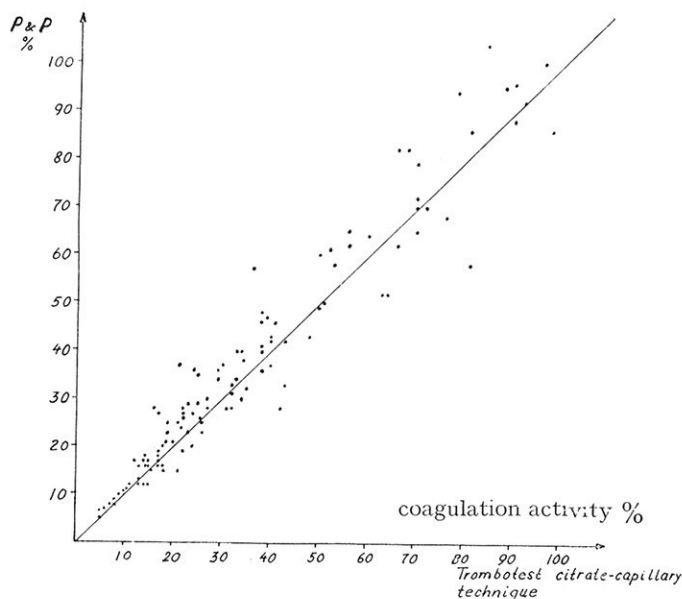


Fig. 1: Jämförelse mellan P-P-metoden enl. OWREN och Trombotest citrat-kapillärmetod.

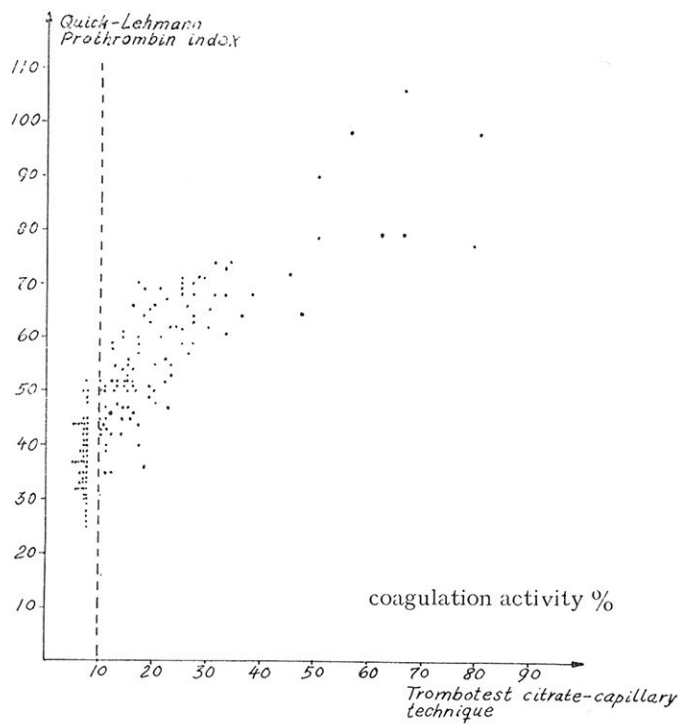
dardeviationen för samma antal prov på ett blod med koagulationsaktivitet 84 % var 5,5. Vid användande av reducerad blodmängd i det senare fallet d.v.s. 0,01 ml, vilket rekommenderats vid hög koagulationsaktivitet, sjönk standarddeviationen till 3.

Det kan vara av intresse att jämföra protrombinindex enl. QUICK-LEHMANN med koagulationsaktivitet vid antikoagulantibehandling. Sådana jämförelser har publicerats av LUND & SUNDBLAD 1956, BJÖRNESJÖ & KARLSTRÖM 1958 samt BLEEKER 1960. I fig. 2 redovisas en jämförelse mellan protrombinindex enl. QUICK-LEHMANN (mikrometod) och koagulationsaktivitet bestämd med TT-citrat-kapillär-metod på ett hundratal prov. TT-värden under 10 % har samlats omkring en godtycklig linje. Med Trombotest har gjorts enkelprov, med QUICK dubbelprov.

Den stora spridningen visar, att man knappast kan utnyttja enstaka jämförelser mellan TT-värden och QUICK-värden. Vi har även iakttagit, hur hos några patienter under antikoagulantibehandling en höjning av TT-värdet har motsvarats av en sänkning av QUICK-värdet och vice versa. I det stora hela tycks dock koagulationsaktivitet och protrombinindex enl. QUICK-LEHMANN följas åt inom intervallet upp till ca 30 % koagulationsaktivitet.

Vid förvaring av blodprov finnes risk för förändring av den ursprungliga koagulationsaktiviteten hos provet på grund av aktiveringsprocesser m. m. Man har anledning att vänta sig att kontaktaktivering skall ha större betydelse vid ifrågavarande små provmängder, där kontaktytan är stor i förhållande till provets volym. Vi har undersökt förändringar i koagulationsaktiviteten vid förvaring av citrat-kapillärblod i plaströr. Resultatet redovisas i fig. 3. Den

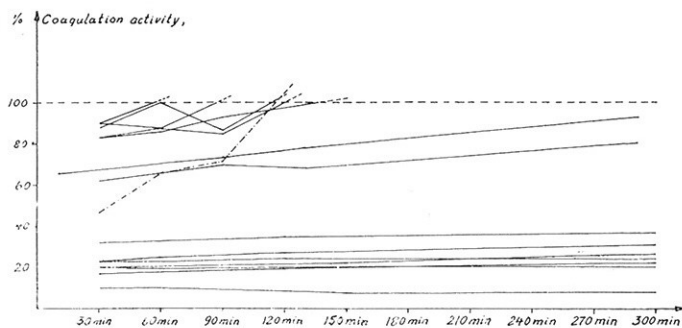
Fig. 2: Jämförelse mellan protrombinindex enligt QUICK-LEHMANN och Trombotest citrat-kapillärmetod.



långsamma förhöjningen av Trombotest-värdena vid låg koagulationsaktivitet torde sakna praktisk betydelse. Vid värden mellan 50 % och 100 % får man däremot en förhöjning, som varierar och gör det nödvändigt att utföra bestämningen relativt kort tid efter provtagningen. På ett större sjukhus kan detta bereda vissa praktiska svårigheter.

Vid TT-citrat-kapillär-metoden som vid alla koagulationsanalyser bör man utföra bestämningarna under standardiserade förhållanden och med så konstant teknik som möjligt. — Vi har funnit genomskinliga plaströr lämpliga att

Fig. 3: Förändringar i koagulationsaktivitet bestämd med Trombotest citrat-kapillärmetod vid förvaring av proven i plaströr.



använda och billiga i inköp. Som diskmedel har sodalösning rekommenderats. Även diskmedlet Teepool av sulfonattyp har undersökts. Ingen skillnad erhöles mellan bestämningar som gjorts parallellt med utensilier rengjorda med de olika diskmedlen.

Ur laboratorieteknisk synpunkt är Trombotest-citrat-kapillär-metoden lika enkel att utföra som den tidigare prövade Trombotest-kapillär-metoden (NORÉN & SWEDIN 1960) och innebär liksom denna en förenkling jämfört med P-P-metoden. Dessutom har Trombotest den fördelen, att reagenset är kalibrerat av tillverkaren, så att lokal standardisering, med de variationer som därav kan förmedas, blir överflödig.

Vid bestämning av normal eller lätt sänkt koagulationsaktivitet, t. ex. vid leverdiagnostik innebär TT-citrat-kapillär-metoden ingen fördel framför P-P-metoden, eftersom inverkan av kontaktaktivering och andra metodfel blir alltför kännbar. Metoden torde däremot vara väl lämpad för kontroll av anti-koagulantbehandling. Den har sedan ett halvår tillbaka använts vid kontrollen av ca 150 patienter, som behandlats polikliniskt, och den har därvid visat sig fungera tillfredsställande.

Some experiences with Thrombotest performed with citrated capillary blood.

By Gunvor Lilienberg, Ingrid Norén and Ann-Catrine Teger-Nilsson.

Summary.

A modification of the Thrombotest method for determination of blood coagulability in citrated capillary blood has been investigated.

The method gives a good correlation with the Thrombotest capillary technique and a satisfactory correlation with the P & P method, but less good correlation with the QUICK-LEHMANN prothrombin index.

The conservation of the blood sample in plastic tubes is good at low coagulation values, while at high values a certain contact activation cannot be avoided.

The method must be regarded as suitable for the control of anticoagulant treatment.

REFERENSER:

1. BJÖRNESJÖ, U. B. & KARLSTRÖM, F.: Acta Paediatrica **47**, 626 (1958).
2. BLEEKER, J. J.: Svensk läkartidning **57**, 380 (1960).
3. HJORT, P. F. & MIKKELSEN, S.: Farmakoterapi **17**, 1 (1961).
4. LEHMANN, J.: Nord. Med. **12**, 3192 (1941).
5. LUND, F. & SUNDBLAD, L.: Kliniska laborationsmetoder (AB Astra, Södertälje, Sweden) del VII, 22 (1957).
6. NOREN, I. & SWEDIN, B.: Opuscula Medica **5**, 93 (1960).
7. OWREN, P. A.: Lancet **II**, 754 (1959).
8. OWREN, P. A. & AAS, K.: Scand. J. Clin. Lab. Inv. **3**, 201 (1951).