



LipoClear og ultrasentrifugering som metode for fjerning av lipoprotein i serum

Christine Morken

Masteroppgave

Masterprogram i helsevitenskap, Radiograf- og bioingeniørfag

Institutt for global helse og samfunnsmedisin

Semester 4

Vår 2021

Forord

Denne mastergradsoppgaven ble utført ved Universitetet i Bergen, Institutt for global helse og samfunnsmedisin. Selve masterprosjektet ble utført ved Seksjon for Automatiserte analyser, Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF) ved Haukeland Universitetssjukehus i perioden fra oktober 2019 til desember 2020.

Til daglig jobber jeg som bioingeniør ved Seksjon for Automatiserte analyser, Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi ved Haukeland Universitetssjukehus. Her jobber vi med automatiserte analyseinstrument som analyserer blant annet leverenzym, elektrolytter og nyremarkører i serum. Forslaget til oppgavetema kom fra seksjonsleder og fagansvarlig her. Vi mottar årlig flere sterkt lipemiske pasientprøver både fra eksterne og interne pasienter, der noen av disse prøvene er øyeblikkelig hjelp-prøver. Dette krever at vi har en rask og presis prosedyre for behandling av disse prøvene for at resultatet ikke skal bli feil eller forsinket. Lipemiske prøver oppleves som vanskelig å håndtere da grad av interferens kan være vanskelig å fastslå, samtidig som at behandlingsmetoden vi benytter i dag oppleves som uforutsigbar.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere overlege, dr.med. professor Jan Didrik Schjøtt og fagbioingeniør Linda Fagerland for råd, hjelp og oppfølging, og ikke minst for å alltid være tilgjengelig for spørsmål under hele masterprosjektet.

Takk til MBF ved Haukeland Universitetssykehus, og spesielt seksjonsleder Terje Ertkjern, for tilrettelegging slik at det var mulig å kombinere jobb og masterstudiet. Jeg vil også takke MBF for finansiering og tilgang på utstyr til masterprosjektet mitt.

Takk til Lipidgruppen ved Universitetet i Bergen, og spesielt avdelingsingeniør Liv Kristine Øysæd, for lån av ultrasentrifuge, samt opplæring og oppfølging gjennom prosjektet.

Sist, men ikke minst vil jeg rette en stor takk til familie, venner og kollegaer ved Seksjon for automatiserte analyser, og spesielt Solveig Haugstad, for å ha vært tålmodige og oppmuntret i frustrerte perioder av masterprosjektet.

Bergen, mai 2021

Christine Morken

Innholdsfortegnelse

FORORD	2
SAMMENDRAG	4
ABSTRACT	5
FORKORTELSER	6
1.0 INTRODUKSJON	7
1.1 LIPEMI	7
1.1.1 <i>Utbredelse</i>	7
1.1.2 <i>Lipoprotein</i>	7
1.1.3 <i>Interferensforskning</i>	9
1.1.3 <i>Vurdering av lipemi</i>	10
1.2 LIPEMISK INTERFERENS	11
1.2.1 <i>Ioneselektiv elektrode (ISE)</i>	11
1.2.2 <i>Spektrofotometrisk metode</i>	12
1.2.3 <i>Tidligere forskning</i>	13
1.4 METODER FOR FJERNING AV LIPOPROTEIN I SERUM	14
1.4.1 <i>Tidligere forskning</i>	16
2.0 HENSIKT OG PROBLEMSTILLING	18
2.1 HENSIKT	18
2.2 PROBLEMSTILLINGER	18
3.0 METODE	19
3.1 FORSKNINGSDESIGN OG METODE	19
3.2 ANALYSEMETODER	22
3.2.1 <i>Utvalg av analytter</i>	23
3.3 METODER FOR FJERNING AV LIPOPROTEIN I SERUM	23
3.3.1 <i>LipoClear</i>	24
3.3.2 <i>Ultrasentrifugering</i>	24
3.4 ETISKE BETRAKTNINGER	25
3.5 STATISTISK BEHANDLING AV RESULTAT	25
3.5.1 <i>Krav til bias</i>	26
4.0 RESULTAT	27
4.2 GJENFINNBARHET	27
4.3 SPIKING MED INTRALIPID	33
4.4 NATURLIG LIPEMISKE PASIENTPRØVER	36
5.0 DISKUSJON	44
6.0 KONKLUSJON	55
REFERANSER	56
VEDLEGG 1: PROSEDYRE FOR TILSATS AV INTRALIPID VED INTERFERENSFORSØK	60
VEDLEGG 2: PROSEDYRE FOR LIPOCLEAR-BEHANDLING AV LIPEMISKE SERUMPRØVER	61
VEDLEGG 3: PROSEDYRE FOR ULTRASENTRIFUGERING AV LIPEMISKE PRØVER	62
VEDLEGG 4: RESULTATER	63

Sammendrag

Bakgrunn: Hensikten med studien var å sammenligne LipoClear og ultrasentrifugering som metoder for å fjerne lipoproteiner i serum i pasientprøver med sterk lipemisk interferens for 10 biokjemiske analytter.

Materiale og metode: Det ble utført 3 delforsøk med de 2 respektive metodene i følgende prøvematerialer: Del 1. Femten ikke-lipemiske pasientprøver, Del 2. En serumpool ble tilsatt Intralipid til L-indeks tilsvarende 100, 300, 500 og 750, med 3 prøver for hver indeks, og Del 3. Tjue naturlig lipemiske pasientprøver. Delforsøkene sammenlignet metodenes kvalitet i forhold til gjenfinnbarhet, L-indeks, og naturlig lipemiske prøver. Avvik ble vurdert med t-test, Passing-Bablok regresjon eller bias.

Resultat: Del 1: LipoClear viser signifikant avvik ved t-test for natrium, kalium, glukose, kreatinin, albumin og fosfat, mens ultrasentrifugering viste signifikante avvik for natrium, kalium, klorid og fosfat. LipoClear overstiger krav til bias basert på biologisk variasjon for natrium, klorid, glukose, albumin og fosfat, ultrasentrifugering for klorid. Passing-Bablok viser bias for glukose, kalsium, kreatinin og albumin ved LipoClear-behandling og for kalsium ved ultrasentrifugering.

Del 2: LipoClear overstiger krav til bias basert på biologisk variasjon ved tre eller flere L-indeks for natrium, klorid, glukose, kalsium, kreatinin, albumin og fosfat ved LipoClear-behandling. Ultrasentrifugering overstiger krav til bias for to eller flere L-indeks testet for klorid, albumin og kalsium.

Del 3: Begge metoder viste større prosentvis variasjon i naturlig lipemiske pasientprøver enn i serumpool tilsatt Intralipid.

Konklusjon: Behandling med LipoClear bør ikke benyttes til å fjerne lipemisk interferens i serum ved analysing av natrium, glukose, kreatinin, albumin og fosfat. Ultrasentrifugering av lipemisk serum bør ikke benyttes ved analysing av albumin. Ny prosedyre for behandling av sterkt lipemisk interferens bør være basert på bruk av ultrasentrifugering.

Nøkkelord: Interferens, lipemi, ultrasentrifuge, LipoClear, kvalitetsforbedring

Abstract

Background: The aim of the study was to compare LipoClear and ultracentrifugation as methods for removing lipemia in patient samples.

Materials and methods: Three sub-experiments with the respective methods were conducted in following materials: Part 1: Fifteen non-lipemic patient samples, Part 2: A serum pool spiked with Intralipid to L-index of 100, 300, 500 and 750, with 3 samples in each, Part 3: Twenty natural lipemic patient. The sub-experience compared the quality of the methods with regard to recovery, L-index and natural lipemic samples. Deviation was assessed with t-test, Passing-Bablok regression or bias.

Results: Part 1: Pared sample t-test showed significant difference in sodium, potassium, glucose, creatinine, albumin and phosphate after treatment with LipoClear, and in sodium, potassium, chloride and phosphate with ultracentrifugation. Passing-Bablok regression shows bias on glucose, calcium, creatinine, albumin after treatment with LipoClear, and on calcium after ultracentrifugation. LipoClear exceeds the bias requirements based on biological variation for sodium, chloride, glucose, albumin and phosphate.

Ultracentrifugation exceeded the same bias requirements for chloride. Part 2: LipoClear exceeds the bias requirements based on biological variation for three or more L-indexes tested for sodium, chloride, glucose, calcium, creatinine, albumin and phosphate.

Ultracentrifugation exceeded the same bias requirements for two or more L-indexes tested for chloride, albumin and calcium. Part 3: Both methods showed greater percentage difference in natural lipemic patient samples compared with serum pool spiked with Intralipid.

Conclusion: LipoClear is not suitable for lipemia removal from samples designated for sodium, glucose, creatinine, albumin and phosphate measurements. Ultracentrifugation is not suitable for lipemia removal from samples designated for albumin measurements. A procedure for treatment of lipemic patient samples should be based on the use of ultracentrifugation.

Keywords: Interference, Lipemia, LipoClear, ultracentrifuge, quality improvement

Forkortelser

ALAT	Alanin aminotransferase
Alb	Albumin
ALP	Alkalisk fosfatase
Bil	Total-bilirubin
Ca	Kalsium
Cl	Klorid
CRP	C-reaktivt protein
GGT	Gamma-glutamyltransferaste
Gluk	Glukose
HDL	High density lipoprotein
ISE	Ioneselektiv elektrode
K	Kalium
Kreat	Kreatinin
KI	Konfidensintervall
L-indeks	Lipemisk-indeks
LDL	Low density lipoprotein
Na	Natrium
P	Fosfat
SAA	Seksjon for Automatiserte analyser, Avdeling for Medisinsk biokjemi og Farmakologi, Haukeland Universitetssykehus
TG	Triglyserid
VLDL	Very low density lipoprotein

1.0 Introduksjon

1.1 Lipemi

1.1.1 Utbredelse

Innen klinisk biokjemi er gjerne hemolyse, ikterus og lipemi omtalt som tre store interferensskilder (1). Av disse tre er spesielt lipemi utfordrende å studere og ha gode prosedyrer på. Generelt sett regner en med at ulike laboratorier mottar mellom 0,5 -2,5% lipemiske prøver hvert år (2, 3). Seksjon for Automatiserte analyser, Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi ved Haukeland Universitetssjukehus (SAA) mottar mellom 70 og 100 lipemiske prøver hver måned, noe som tilsvarer i underkant av 1 % av totalt analyserte prøver. Det er likevel verdt å merke seg at dette antallet er svært variabelt over tid.

Vanlige årsaker til forhøyet konsentrasjon av lipoproteiner i blod er diett, alkoholinntak, diabetes mellitus, hypertriglyseridemi, kronisk nyresvikt, hypothyroidisme, pankreatitt, lupus erythematosus (SLE), primær biliær cholangitt eller tilførsel av total parental ernæring (4, 5). Enkelte av disse årsakene kan unngås ved tilstrekkelig fasting før blodprøvetaking (1) eller midlertidig stans i tilførsel av parental ernæring, men det er likevel flere tilfeller der dette er vanskelig å forebygge.

1.1.2 Lipoprotein

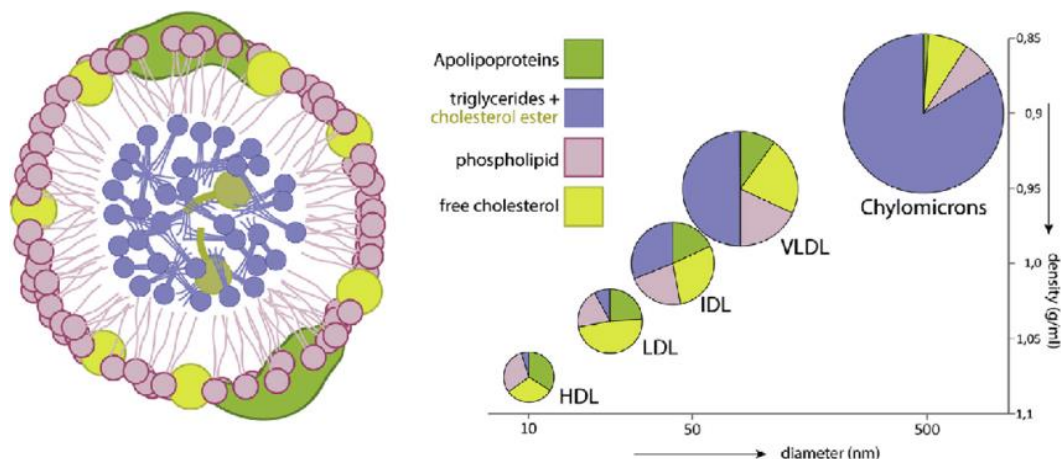
Lipider og lipoproteiner er essensielle for energitransport og -metabolismen i kroppen. Måling av nivået av disse i blod er i de senere årene også blitt klinisk viktig grunnet deres assosiasjon med utvikling av koronar hjertesykdom (6). Det er i hovedsak to former for plasmalipider: kolesterol og triglyserid. I tillegg er det også fosfolipider og frie fettsyrer (7). De frie fettsyrene er delvis vannløselige og blir fraktet i blodet bundet til albumin. Resten av lipidene er uløselige i vann og må transporteres i form av lipoprotein (7). Lipoprotein er partikler av lipider og proteiner. I et lipoprotein er triglyseridene i kjernen, og de amfipatiske molekylene kolesterol og fosfolipid i overflaten. Overflaten til lipoproteiner består også av spesifikke proteiner kalt apolipoproteiner (8, 9).

Det meste av kolesterolet i blodplasma finnes i partiklene Low Density Lipoprotein (LDL) og High Density Lipoprotein (HDL), mens triglyserid hovedsakelig finnes i kylemikron og Very Low Density Lipoprotein (VLDL) (7).

Kylomikron blir dannet i tarmmucosa og har som oppgave å transportere triglyserider fra tarm til andre deler av kroppen. Kylomikron oppstår ved opptak av triglyserider etter fordøyelse av fett, og fører til økt triglyseridkonsentrasjon og blakket plasma (9). Ettersom kylomikron oppstår ved fordøyelse av fett så finner en normalt ikke denne partikkelen i fastende plasma. Kylomikron er lipoproteinpartikkelen som har lavest tetthet, men er størst (9). Dette gjør den i stand til å reflektere lys (1). Den lave tettheten gjør partikkelen lett, og ved lagring vil den flyte opp og danne et lag øverst i plasma (10).

VLDL er lipoprotein-partikkelen med nest høyest andel av triglyserid. Partikkelen blir dannet i leveren og frakter triglyserider fra leveren til andre deler av kroppen. Triglyseridfraksjonen som blir målt hos fastende personer er i hovedsak den som finnes i VLDL (9). VLDL har også en størrelse som fører til at de reflekterer lys, og de står for det meste av turbiditeten som kan observeres i fastende plasma. I motsetning til kylomikron er de mindre og har mindre oppdrift, og vil dermed ikke lage samme distinkte lag som kylomikron på toppen av plasma (10).

LDL dannes ved nedbryting av VLDL ved at enzymet lipoprotein lipase spalter triglyserid til frie fettsyrer og glyserol, noe som gir et gradvis lavere triglyseridinnhold i blodet. LDL er den mest kolesterolrike fraksjonen av blodplasma, og inneholder ca. 70% av alt kolesterol i plasma. HDL er viktig for transport av kolesterol fra perifere celler til leveren. Denne partikkelen står for ca. 20% av totalkolesterol i plasma (7).



Figur 1: Fysisk-biokjemisk sammensetning av lipoproteiner (11).

De ulike lipoprotein-partiklene har ulik størrelse og tetthet, og vil dermed bidra til turbiditeten i prøvemateriale i ulik grad. Kylomikron, som er den største lipoprotein-partikkelen, vil i størst grad bidra til turbiditet i prøvemateriale. De mindre partiklene HDL, LDL og VLDL vil i mindre grad bidra til den synlige turbiditeten i prøvematerialet (1). Turbiditeten i prøvematerialet forårsaket av lipoproteiner kan observeres ved visuell inspeksjon og kan også måles kvantitativt.

1.1.3 Interferensforskning

Forsøkene utført på lipemisk interferens består gjerne av tilsetting av kommersielt tilgjengelige løsninger med kjent konsentrasjon og sammensetning av lipid. En vanlig benyttet slik løsning er Intralipid (Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sweden) (1). Intralipid består av en blanding av olje fra soyabønner, fosfolipider fra eggeplomme og glycerin, og består dermed av triglyserid fra linolsyre, oljesyre, linolensyre, palmitinsyre og stearinsyre (1). Bornhorst *et al.* sammenlignet interferens i naturlig lipemiske prøver med prøvemateriale tilsatt Intralipid, og fant forskjellig grad av interferens mellom disse (12). Årsaken til det forskjellige resultatet i naturlig lipemiske prøver og prøver tilsatt Intralipid er at partiklene i Intralipid-løsningen har en størrelse på mellom 200 nm til 600 nm, med et gjennomsnitt på ca. 345 nm (1), mens de humane lipidene VLDL er mellom 35 nm og 200 nm og kylomikron

opptil 1000 nm (7). Prøver tilsatt Intralipid vil dermed mangle effekten av de største og minste kylomikron-partiklene, samt av de største VLDL, som finnes i naturlig lipemiske prøver (13). Det er likevel anbefalt å benytte kommersielle løsninger med lipider i interferensforsøk da disse er mer homogene, og vil dermed gi en god standardisering og replikerbarhet for forsøkene (14). På den andre siden vil dette føre til at resultatene ikke nødvendigvis direkte kan generaliseres til klinisk praksis da pasientprøver ofte har en mer heterogen sammensetning av lipid (1).

1.1.3 Vurdering av lipemi

Høy konsentrasjon av lipoproteiner i serum forårsaker turbiditet, som ofte kan observeres som en blakket, melkeaktig farge.

Forskjellige produsenter av klinisk-kjemiske analysesystem har utviklet egne mål på interferens i prøvematerialet, kalt serum-indeks. Roche Diagnostics, som leverer analysesystemet Cobas 8000, benytter Lipemisk-indeks (L-indeks) som et mål på hvor turbid et prøvemateriale er (15, 16). Denne verdien er semi-kvantitativ og lineær opp til 1000. Altså tilsvarer en L-indeks på 500 en konsentrasjon av Intralipid på ca. 500 mg/dl (15, 16). Ettersom L-indeks er standardisert opp mot Intralipid, så stemmer denne ofte dårlig overens med triglyseridkonsentrasjonen i prøvematerialet (2). Denne metoden vil også overestimere den lipemiske interferensen i prøvematerialet dersom det er andre årsaker til turbiditeten i materialet som blir detektert ved samme bølgelengde.

Studier som sammenligner visuell inspeksjon av prøvematerialet mot automatisk deteksjon viser at den visuelle inspeksjonen har en lavere kvalitet for å identifisere korrekt grad av interferens enn automatisk deteksjon. Det er også vist at det er dårlig samsvar mellom ulike personer som bedømmer samme prøve, dette til tross for standardisering av prosedyren for visuell deteksjon (2, 17). Vermeer *et al.* rapporterte i sin studie økt kvalitet på pasientresultat ved bruk automatisk måling av serum indeks. De fant også at prøver med interferens fra hemolyse, bilirubin og/eller lipemi oftere ble oppdaget ved automatisk inspeksjon enn det som var rapportert tidligere ved visuell bedømmelse av interferens (18).

1.2 Lipemisk interferens

Forhøyede nivåer av lipoproteiner i serum kan ha ulike effekter på forskjellige analysemetoder. Økte konsentrasjon av lipoproteiner kan føre til en endring i forholdet mellom vandig og ikke-vandig fase i prøvematerialet, en volumforskyvningseffekt. Denne volumforskyvningseffekten påvirker analysering av elektrolytter ved bruk av indirekte ioneselektiv elektrode (ISE) (19). Ettersom lipoproteiner er store molekyler, så kan de spre lys. I høy konsentrasjon vil de dermed føre til interferens ved bruk av spektrofotometrisk metode (1). Denne lysspredningseffekten av lipoproteinene vil også påvirke analysering ved bruk av nefelometri, som baserer seg på måling av lysspredning.

1.2.1 Ioneselektiv elektrode (ISE)

Ioneselektiv elektrode er en potensiometrisk målemetode. Ved potensiometrisk måleprinsipp blir det målt spenning mellom to elektroder, en indikatorelektrode og en referanselektrode. Elektrodene vil måle spenningsendringen over en membran ved hjelp av et voltmeter, og denne spenningsendringen er proporsjonal med konsentrasjonen av elektrolytten i løsningen (10, 19).

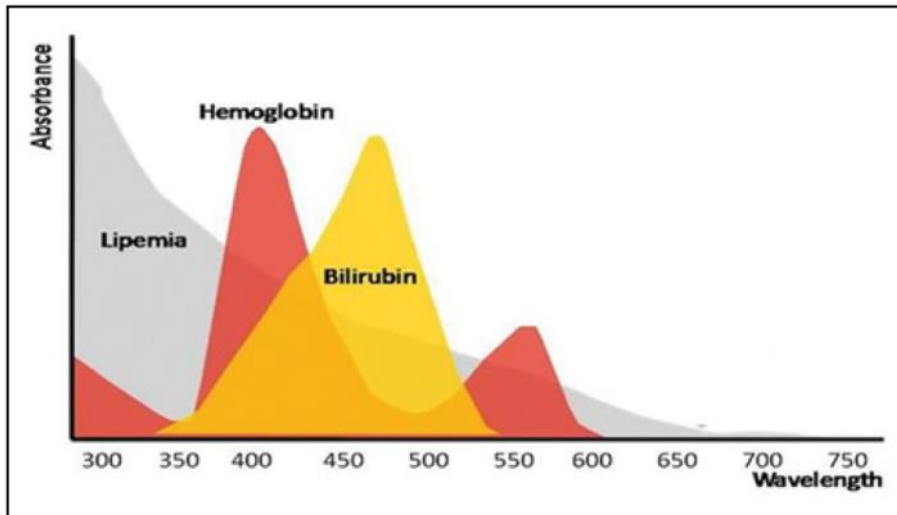
ISE-metoder benytter enten direkte eller indirekte måling. Ved indirekte måling blir prøven fortynnet med en fortynningsløsning (diluent), i et forhåndsbestemt forhold, av instrumentet før analysering. Store analysesystemer benytter ofte denne metoden (19). Normalt plasma består av ca. 93 % vann og 7 % makromolekyl (20, 21). Dersom prøvematerialet inneholder store mengder lipoprotein, ikke-vandig andel, så vil disse kunne fortrenge den vandige andelen, som inneholder elektrolytter, i prøven. Ettersom metoden benytter forholdet mellom vann og makromolekyl i normalt plasma ved beregning av konsentrasjonen i prøven, så blir resultatet lavere enn reelt i lipemisk prøvemateriale. Denne effekten er gjerne særlig synlig ved analysering av natrium grunnet dens lave biologiske variasjon, og blir kalt pseudohyponatremi (19, 22). Ved direkte måling blir analyttene målt i ufortynnet prøvemateriale, og vil dermed ikke bli påvirket av en volumforskyvningseffekt i

prøvematerialet. Direkte ioneselektiv metode er oftest benyttet i pasientnære analyseapparat (19).

1.2.2 Spektrofotometrisk metode

Spektrofotometriske målinger baserer seg på dannelse av fargereaksjoner mellom reagens og analytt, som deretter kan måles ved hjelp av lysabsorbans. Absorbansen til ulike reaksjonsblandinger kan benyttes til å regne ut konsentrasjonen av en analytt ved hjelp av en standardkurve. Slike absorbansmålinger blir utført av et spektrofotometer (10). Den fargede reaksjonsblandingen blir dannet i en kyvette ved blanding av reagens og prøvemateriale, og fargereaksjonen er proporsjonal med konsentrasjonen av analytten i prøven. Denne fargereaksjonen kan måles spektrofotometrisk ved at lys blir sendt gjennom kyvetten med reaksjonsblandingen, og deretter blir lyset som har vandret gjennom reaksjonsblandingen, det transmitterte lyset, målt. Mengden lys absorbert av reaksjonsblandingen kan deretter bli beregnet (10).

Lipoproteiner er store molekyler. Høye verdier av lipoproteiner i prøven vil føre til spredning av lys, noe som fører til mindre transmittert lys og en for høy målt absorbans for metoden (23). Spektrofotometrisk metode benytter forskjellige bølgelengder avhengig av reaksjonsmetode og type analysesystem. Figur 2 viser ved hvilke bølgelengder lipemi har sterkest påvirkning, og dermed hvilke analytter lipemi vil interferere mest med.



Figur 2: Skjematisk oversikt over interferens ved ulike bølgelengder (24).

1.2.3 Tidligere forskning

Det er anbefalt å benytte tilsats av Intralipid ved interferensstudier (1, 14). Økende mengde av Intralipid blir da tilsatt prøvematerialet frem til påvirkningen på analytten er så stor at den overskrider kravet som er satt. Som nevnt tidligere oppfører ikke alltid Intralipid seg på samme måte som naturlige lipoprotein, men blir benyttet i interferensstudier på grunn av ønsket om standardisering, replikerbarhet, samt muligheten for å sette en «fasit»/0-prøve før interferenskilden tilsettes prøvematerialet (1, 14). Det er i dag krav om at leverandører av analysesystem skal utføre egne studier for interferens på metodene de benytter (1, 25). Resultatet av disse studiene blir presentert med grenser for ved hvilken konsentrasjon en interferent påvirker analyseresultatet. Roche Diagnostics, som produserer analysesystemet som blir benyttet i studien her, har presentert egne interferensgrenser for sine metoder i pakningsvedleggene. Forsøkene er basert på tilsats av Intralipid og med et krav til akseptabelt avvik på +/- 10 % for analyttene undersøkt her.

Nikolac *et al.* utførte i 2013 en studie der målet var å verifisere interferensgrensene for lipemi satt av produsentene Siemens Healtheneers, Roche Diagnostics og Beckman Coulter. I studien ble forskjellige serumpooler tilsatt økende mengde Intralipid til en maksimal konsentrasjon på 1000 mg/dL. For produsenten Roche ble alle interferensgrenser testet

verifisert, bortsett fra tre: konjugert- og total-bilirubin og kreatinin, der påvirkningen av Intralipid var overestimert for kreatinin og underestimert for konjugert- og total-bilirubin (26).

I 2000 utførte Nordic Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (NQLM) en stor studie på lipemisk interferens kalt Nordic Interference Study. Seks serumprøver, der to hadde normal lipidprofil, to tilsatt 2,5 g/L Intralipid (tilsvarende 5,5 mmol/L triglyserid) og to prøver tilsatt 5,0 g/L Intralipid (tilsvarende 10,9 mmol/L triglyserid) ble sendt ut til 206 nordiske laboratorier for analysering. Ved hjelp av disse resultatene kunne studien rapportere ulik grad av interferens ved ulike analysesystemer. For Cobas Integra, som er forløperen til Cobas 8000, ble det bare funnet klinisk signifikant interferens ved måling av bilirubin (27).

Det er også blitt utført studier på interferensgrenser på naturlig lipemiske prøver. Calmarza *et al.* undersøkte endringen på synlig turbide prøver før og etter ultrasentrifugering. De fant en signifikant endring i konsentrasjon for analyttene fosfat, kreatinin, total protein og kalsium etter ultrasentrifugering, noe som tyder på en interferens av disse analyttene (28).

Variasjonen i grenser for når analytter blir påvirket av lipemi og problemet med den heterogene oppførselen til naturlige lipid tyder på at egne grenser og prosedyrer for behandling av lipemisk interferens bør utarbeides ved lokale laboratorier for å ta hensyn til lokale forhold, utstyr og ressurser tilgjengelig. Dette blir også støttet av Anderson *et al.*, som i sin studie fant at de fleste store analysesystemer som er benyttet i dag har metoder som er robuste nok til å tåle lipemisk interferens, men at de anbefaler individuelle laboratorier å teste egne interferensgrenser for egne metoder og instrumentering (29).

1.4 Metoder for fjerning av lipoprotein i serum

Det er flere metoder tilgjengelig for å fjerne lipoprotein fra serum. Disse metodene baserer seg eksempelvis på binding, utfelling og/eller sentrifugering for å fjerne eller redusere

konsentrasjonen av lipoproteinene i prøvemateriale (1). To av disse metodene er utfelling med ulike ekstraksjonsreagens og ultrasentrifugering. Ultrasentrifugering er en metode som blir anbefalt benyttet på lipemisk serum ved analysering av natrium, kalium og klorid ved indirekte ISE av Roche Diagnostics (30). Metoden blir også anbefalt av CLSI-guiden C56-A *Hemolysis, Icterus, and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratory Analysis: Approved Guideline* (14). SAA benytter LipoClear, som er et ekstraksjonsreagens, som gjeldende metode på lipemiske prøver.

I tillegg til spesifikke metoder for å fjerne lipemisk interferens fra prøvematerialet, finnes det også flere metoder som blir benyttet for å fjerne graden av interferens i prøvematerialet uten å fjerne eller redusere konsentrasjonen av lipoproteiner. Prøvematerialet kan bli fortynnet før analysering, enten manuelt eller på analysesystemet, for å redusere mengden lipoproteiner i andelen av prøvematerialet som blir benyttet til analysering. Leverandører av analysesystem har også utviklet analysemetoder som benytter serumblank, som er en absorpsjonsmåling av prøvematerialet før tilsetning av reagens. Denne absorpsjonsmålingen blir trukket fra resultatet av absorpsjonsmålingen etter reaksjonen i kyvetten er ferdig. Dermed vil reduksjon av transmittert lys som skyldes lipoproteiner bli tatt bort fra sluttmålingen (10). Store klinisk-kjemiske analysesystem benytter også for flere analysemetoder bikromatisk avlesning. Ved bikromatisk avlesning blir reaksjonsblandingen avlest ved to bølgelengder, der sekundærbølgelengden blir benyttet til å korrigere for eventuell interferens (10). Det er også mulig å benytte direkte måling av ISE ved analysering av elektrolytter, da denne er mindre sensitiv for lipemisk interferens (19, 31).

Det finnes ulike leverandører som produserer reagenser som kan benyttes til å felle ut, og dermed redusere mengden, av lipoprotein i serum. Et slikt utfellingsreagens er LipoClear. LipoClear fra StatSpin (StatSpin, Norwood, MA, USA) er et polart ekstraksjonsreagens som inneholder en non-ionisk og ikke-toksisk polymer. Reagenset binder seg til lipoproteinene i serum eller plasma, og deretter feller de ut ved sentrifugering (32). Metoden har sin begrensning i at den krever et forholdsvis stort prøvemateriale og at den ikke kan benyttes på enkelte analyser, som proteiner og fosfat (32).

Ultrasentrifugering er en sentrifugeringsmetode der en benytter svært høye sentrifugalhastigheter. Der en vanlig sentrifuge kan benyttes på hastigheter mellom 2000 xg og 3000 xg, vil en ultrasentrifuge kunne ha hastigheter på mellom 100 000 xg og 2 000 000 xg (1). Ultrasentrifugering blir gjerne benyttet som en metode for å separere molekyl i prøvematerialet i forskjellige lag, som f.eks. ulike protein eller lipider (33), men metoden kan også benyttes til å fjerne eller redusere lipoprotein i serum (34).

Ultrasentrifugering blir omtalt som anbefalt metode for fjerning av lipemisk interferens av blant annet Clinical Laboratory Standards Institute (1, 14, 35). Leverandøren Roche Diagnostics anbefaler også ultrasentrifugering for fjerning av lipemisk interferens ved analysing av elektrolyttene natrium, kalium og klorid ved indirekte måling med ioneselektiv elektrode (15, 30). Utfordringen ved bruk av ultrasentrifugering som metode for reduisering eller fjerning av lipoprotein i serum, er at det er liten konsensus med tanke på prosedyre. Verken Roche Diagnostics, som anbefaler bruk av metoden, eller Beckman Coulter, som produserer ultrasentrifuger, kan anbefale hastighet, tid og/eller temperatur for sentrifugering til dette formålet. Ulike studier på ultrasentrifugering av lipemiske prøver benytter også svært forskjellige prosedyrer; Castro-Castro *et al.* ultrasentrifugerte prøvene på 108 200 xg i 20 minutter ved 6°C (36), Calmarza *et al.* benyttet 40 000 xg i 18 timer ved 4°C (28), Dimeski *et al.* benyttet 107 000 xg i 15 minutter (35), mens Soleimani *et al.* ultrasentrifugerte lipemiske prøver på 100 000 xg i 15 minutter (37). De to sistnevnte studier opplyser ikke om hvilke temperatur ultrasentrifugeringen er utført på.

Per d.d. er ikke ultrasentrifugering av lipemisk serum en utbredt metode for fjerning av lipemisk interferens i rutinedrift ved sykehus i Norge, istedenfor blir gjerne utfellingsreagens, fortynning av prøvemateriale eller en kombinasjon av disse benyttet.

1.4.1 Tidligere forskning

Ultrasentrifugering blir regnet som «gullstandard» for behandling av lipemisk prøvemateriale, og interferensstudier som er utført blir derfor gjerne satt opp som sammenligning av andre metoder mot denne. Ettersom ultrasentrifuge er kostbart utstyr er

det også utført flere studier med high-speed sentrifuger, som er et billigere og lettere tilgjengelig alternativ.

Saracevic *et al.* utførte i 2014 en sammenligningsstudie mellom high-speed sentrifugering og behandling med LipoClear. De benyttet plasmapool med tilsats av to forskjellige konsentrasjoner av Intralipid tilsvarende 9,6 og 14,2 mmol/L triglyserid. Gjenfinnbarheten overskred grensene satt for analysene glukose, natrium, klorid, kalsium, fosfat, magnesium, ALP, GGT, total-protein, albumin og CRP etter behandling med LipoClear, og for analyttene natrium, klorid, kalsium og total-protein ved high-speed sentrifugering (38). Andre studier som også har benyttet serumpool tilsatt Intralipid fant bare uakseptabel gjenfinnbarhet etter high-speed sentrifugering på total-bilirubin og CRP, samt for GGT, total-kolesterol, HDL og CRP etter behandling med LipoClear (39).

Castro-Castro *et al.* utførte en multisenterstudie med naturlig lipemiske prøver, der ultrasentrifugering ble sammenlignet med high-speed sentrifugering, samt sammenligning mellom high-speed sentrifugering og behandling med LipoClear. De fant en statistisk signifikant forskjell mellom ultrasentrifugering og high-speed sentrifugering for natrium, klorid, glukose, bilirubin og ALAT, men ingen av avvikene var større enn LCSi-kravet (limit of clinically significant interference) satt. Videre viste studien at protein, albumin og kalsium overskred LCSi-kravet etter LipoClear-behandling (36). I kontrast til dette har studien til Anderson *et al.* ikke funnet signifikant avvik ved behandling av naturlig lipemiske prøver med metoden LipoClear, bortsett fra for analyttene protein, fosfat, kolesterol og triglyserid, som er opplyst om av leverandør at ikke kan behandles med LipoClear (29). I samme artikkel konkluderer Anderson *et al.* med at de fleste klinisk-kjemiske metodene som blir benyttet i dag er robuste nok til å håndtere lipemi, men at de anbefaler alle laboratorier å teste egne metoder for individuelle forskjeller (29).

Ved sammenligning av ultrasentrifugering og high-speed sentrifugering er det verdt å merke seg at ved bruk av high-speed sentrifuge, med lavere sentrifugalkrefter, vil bare serumprøver som er interferert av store lipid, som f.eks. kylomikron, bli tilstrekkelig behandlet. Ved prøver med lipemisk interferens fra mindre lipoprotein-partikler, vil high-speed

sentrifugering være mindre effektiv (1). For å korrigere for dette er det blitt utført sammenligningsstudie av ultrasentrifugering og high-speed sentrifugering med en forbedret prosedyre for high-speed sentrifugering. Ved økt hastighet, samt dobbelsentrifugering av prøvene med high-speed sentrifugering, ble det ikke funnet avvik mellom ultrasentrifugering og high-speed sentrifugering (35).

Ettersom ultrasentrifuge er kostbart utstyr, er det blitt utført studier for å se på billigere og enklere alternativer. Soleimani *et al.* undersøkte om serumblank og fortynning prøvemateriale kunne erstatte ultrasentrifugering av lipemisk prøvemateriale. De fant at ved analysing av kalsium, magnesium, fosfat, total-protein, jern, jernbindingskapasitet, karbamid og klorid i lipemisk prøvemateriale er ikke fortynning eller serumblank tilstrekkelig for å motvirke interferens, men at serumblank var tilstrekkelig ved analysing av glukose (37).

2.0 Hensikt og problemstilling

2.1 Hensikt

Hensikten med studien var å etablere en prosedyre for håndtering av pasientprøver med sterk lipemisk interferens ved SAA.

2.2 Problemstillinger

Er ultrasentrifugering en bedre metode enn LipoClear for fjerning av lipoprotein ved lipemisk interferens i serum?

Hvordan påvirker ultrasentrifugering og behandling med LipoClear sentrale analytter målt med ioneselektiv elektrode og spektrofotometri?

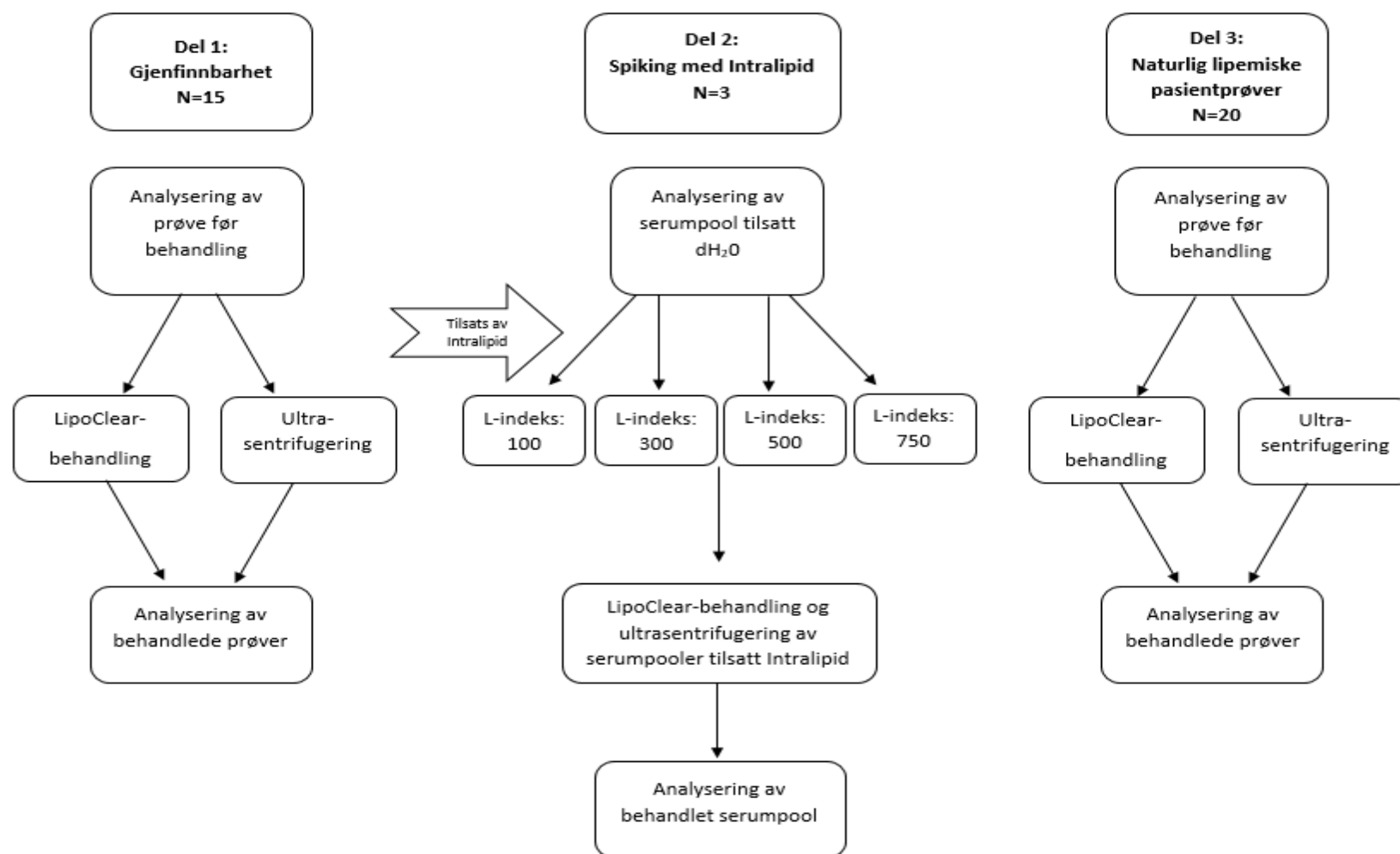
3.0 Metode

3.1 Forskningsdesign og metode

Studien ble satt opp som en metodesammenligning med to metoder for fjerning eller redusering av lipoprotein i serum: LipoClear og ultrasentrifugering. For å sammenligne LipoClear og ultrasentrifugering som metode for fjerning av lipoprotein i serum var det hensiktsmessig med tre underforsøk. Dette for å kontrollere gjenfinnbarhet (recovery) for metodene, samt undersøke metodene både med serum tilsatt en kommersielt tillaget lipidløsning og naturlig lipemiske pasientprøver. Som nevnt tidligere oppfører naturlige lipid seg annerledes enn kommersielle lipid (12), og det var derfor ønskelig å undersøke hvordan disse oppfører seg sammenlignet med serumpooler tilsatt Intralipid ved behandling med LipoClear og ultrasentrifugering.

Prøvematerialet som er blitt benyttet i studien kommer fra overskuddsmateriale etter analysering ved SAA. Overskuddsmaterialet er blitt oppbevart kjølig og med kork, for å unngå fordamping. Mellomvareprogrammet cobas IT middleware (cITm) er blitt benyttet til å søke opp prøver fra arkivet med riktig L-index.

I alle delforsøkene ble prøvematerialet delt i to og behandlet med begge metoder samtidig. For å unngå variasjon som kan forekomme ved flere operatører, er alle manuelle pipetteringer i studien utført av en person. 0-prøve (før behandling), prøve behandlet med LipoClear og ultrasentrifugert prøve ble analysert i en serie for hver prøve for å minimere variasjoner som kan forekomme i analysene og instrumenteringen. Figur 3 viser flytdiagram over delforsøkene utført i studien.



Figur 3: Oversikt over delforsøk

I del 1 ble femten ikke-lipemiske serumprøver, med L-index < 20 , delt i to, der en del ble ultrasentrifugert og den andre behandlet med LipoClear. Prøvene ble analysert før og etter behandling med de to metodene. Av prøvene valgt til studien hadde fem natriumkonsentrasjon større enn referanseområdet benyttet ved SAA, fem med natriumkonsentrasjon i referanseområdet og fem med natriumkonsentrasjon lavere enn referanseområdet. Ettersom det er vanskelig å finne prøver med stor variasjon i alle analytter som ble undersøkt, ble det her valgt å fokusere på variasjon i natriumkonsentrasjon. Prøvene som ble benyttet var oppbevart på kjøll og var maksimalt to dager gamle.

I del 2 ble det laget en serumpool av ikke-lipemiske serumprøver med L-index < 20 . Serumpoolen ble delt i fem deler, der hver del ble tilsatt en økende mengde Intralipid til henholdsvis L-index 100, 300, 500 og 750. Den siste alikvoten av serumpoolen ble tilsatt destillert vann i samme fortynningsforhold som de respektive alikvotene ble tilsatt Intralipid. Serumpoolen tilsatt destillert vann fungerte som 0-prøve (fasit), som de behandlede prøvene ble sammenlignet med. Oppsettet for standardkurve og tilsatt av Intralipid er vedlagt (vedlegg 1). Serumprøvene som ble valgt til poolen hadde konsentrasjon av ALAT >30 U/L og bilirubin >10 $\mu\text{mol/L}$. Dette da ALAT og bilirubin har en dårligere presisjon i lavt område, samt at små endringer i lave konsentrasjoner gir stor prosentvis endring. Det var dermed ønskelig med noe høyere konsentrasjon på disse analyttene for å unngå at avvik i resultatet skyldes dårlig presisjon og små endringer heller enn bias i behandlingsmetodene. I dette delforsøket ble det benyttet prøver oppbevart på kjøll som var maksimalt to dager gamle. For å kontrollere repeterbarheten til metodene ble de ulike serumpoolene i dette forsøket ultrasentrifugert og behandlet med LipoClear tre ganger hver.

I del 3 ble 20 naturlig lipemiske pasientprøver mottatt ved SAA plukket ut og behandlet med LipoClear og ultrasentrifugering. Prøvene i forsøket ble valgt på bakgrunn av tilgjengelighet og ønsket om spredning i L-indeks på prøvene. Samtidig var det ønskelig med fire prøver per ultrasentrifugering for å få full sentrifuge og dermed unngå hyppige avtaler om lån av

ultrasentrifugen. Prøvematerialet benyttet i denne delen av studien var maksimalt tre dager gamle og oppbevart kjølig.

3.2 Analysemetoder

Ettersom formålet med studien var å etablere en lokal prosedyre ble utstyr tilgjengelig ved SAA benyttet i studien. Prøvene i forsøkene er blitt analysert på Cobas 8000-systemet levert av Roche Diagnostics (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Elektrolyttene natrium, kalium og klorid ble analysert på modul for ioneselektiv elektrode (ISE-modul), og analyttene ALAT, glukose, bilirubin, kalsium, kreatinin, albumin og fosfat ble analysert på C702 (spektrofotometrisk modul). Interferensgrense for lipemi oppgitt fra leverandør og interferensgrenser gjeldende ved SAA er presentert i tabell I.

Tabell I: Metodeinformasjon og grenser for lipemisk interferens^c

Analyse	Produsent	Metode	Bølgelengde (nm)	Interferens ifg pakningsvedlegg (L-indeks)	Interferensgrenser ved SAA (L-indeks) ^d
Na	Roche	Ioneselektiv elektrode, indirekte	/	2000 ^a	Triglyserid konsentrasjon: 10 mmol/L
K	Roche	Ioneselektiv elektrode, indirekte	/	2000	Triglyserid konsentrasjon: 10 mmol/L
Cl	Roche	Ioneselektiv elektrode, indirekte	/	2000	Triglyserid konsentrasjon: 10 mmol/L
ALAT	Roche	Fotometri, IFCC med pyridoxal phosphate aktivering	340	150	500
Gluk	Roche	Fotometri, hexokinase	340	1000 ^b	1000 ^b
Bil	Roche	Fotometri, azobilirubin	546	1000 ^b	1000 ^b
Ca	Roche	Fotometri, NM-BAPTA	340	1000 ^b	1000 ^b
Kreat	Roche	Enzymatisk fotometri	546	2000	1000 ^b
Alb	Roche	Fotometri, BCG metode	570	1000 ^b	1000 ^b
P	Roche	Fotometri, molybdat UV	340	800	Triglyserid konsentrasjon: 15 mmol/L

a Fra pakningsvedlegg: *Pseudohyponatremi kan forekomme ved lipemiske prøver.*

b Ingen signifikant interferens ved L-indeks < 1000

c Basert på referanse (30, 40-46)

d Hentet fra Elektronisk Kvalitetshåndbok ved Haukeland Universitetssykehus (47)

Gjeldende kalibrerings- og kvalitetskontrollrutiner for SAA er benyttet. Alle analytter har intern kvalitetskontroll i tre nivåer, og er påmeldt minst ett eksternt kvalitetskontrollprogram pr. analytt. SAA benytter kvalitetskontrollregler 1-3s/2-2s (n=2) for intern kvalitetskontroll. 0-prøve (før behandling), prøve behandlet med LipoClear og ultrasentrifugert prøve ble analysert i en serie for å unngå variasjoner i instrumentering og analyser.

3.2.1 Utvalg av analytter

Jeg valgte i denne studien å undersøke et begrenset utvalg av analytter. Ettersom det var metodene ioneselektiv elektrode og spektrofotometri som var ønskelig å undersøke, har analytter som blir analysert med disse analysemetodene blitt valgt ut. Elektrolyttene natrium, kalium og klorid ble undersøkt etter ønske fra SAA, der disse erfaringsmessig har vist en lavere lipemisk interferensgrense enn det som er rapportert fra leverandøren av analysesystemet, Roche Diagnostics. I tillegg er det ved SAA observert at natrium i enkelte tilfeller oppfører seg ustabil ved LipoClear-behandling. Dette er dog ikke blitt systematisk undersøkt. Ettersom elektrolyttene analysert med indirekte ISE også er svært utsatt for volumforskyvingeffekten som oppstår i lipemisk prøvemateriale, så er det ønskelig å kunne etablere gode rutiner for behandling av disse (19-21). Alanin amino-transferase (ALAT) og glukose ble valgt da de blir avlest ved 340nm, som er bølgelengden der den lipemiske interferensen har størst påvirkning (1, 45, 46). Bilirubin, kalsium og kreatinin ble inkludert i studien på bakgrunn av at disse er funnet påvirket av lipemi ved tidligere forsøk (27, 39). Albumin og fosfat ble inkludert da analyttene har vist utilstrekkelig gjenfinnbarhet etter LipoClear-behandling (28, 38). Analyttene i studiene ble også valgt på bakgrunn av at de er hyppig rekvirert på prøver, og spesielt øyeblikkelig hjelp-prøver, som blir analysert ved SAA.

3.3 Metoder for fjerning av lipoprotein i serum

To ulike metoder for fjerning eller redusering av lipoproteiner i serum ble benyttet i studien: LipoClear levert av StatSpin og ultrasentrifugering.

3.3.1 LipoClear

I denne studien er reagenset LipoClear fra leverandøren StatSpin (StatSpin, Norwood, MA, USA) benyttet. Reagenset blir levert ferdig fordelt i rør, som deretter tilsettes serum (32). Etter sentrifugering danner lipoproteinene et distinkt lag i røret, som kan fjernes og infranatanten analyseres. Anbefalt prosedyre fra leverandør ble benyttet i studien. 500µL serum ble tilsatt røret med ferdig fordelt reagens, for deretter å bli mikset på vortexmikser og etter henstand, sentrifugert i 3 minutt på StatSpin Express 4 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ved 4000 xg. Det distinkte laget med lipoprotein som ble dannet ble fjernet, og infranatanten analysert. Analysesvaret ble deretter ganget opp for å korrigere for fortynningen fra reagenset (32). Prosedyre for LipoClear-behandling er vedlagt (vedlegg 2).

3.3.2 Ultrasentrifugering

Ultrasentrifugeringen i studien ble utført på Optima Max Ultrasentrifuge produsert av Beckman Coulter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Ultrasentrifugen ble lånt fra Lipidgruppen, Klinisk Institutt 2, Universitetet i Bergen. Prøvematerialet ble overført til spesielle sekundærglass som tåler høy sentrifugalkraft. Glasstypen *Thickwall Polyallomere, 3,5mL, 13x51mm*, produsert av Beckman Coulter, ble benyttet i denne studien. Det ble laget en prosedyre for bruk av ultrasentrifugen som ble benyttet i denne studien (vedlegg 3). Prøvene i studien er sentrifugert ved 100 000 xg i 20 minutter ved 20°C (romtemperatur). Innstillingene på hastighet, tid og temperatur ble bestemt basert på tidligere studier (28, 35-37), erfaringer ved bruk av metoden for reduksjon/fjerning av lipider ved Lipidgruppen ved Klinisk Institutt 2, Universitetet i Bergen, samt etter et begrenset pilotforsøk. Prosedyren ble også tilpasset etter hva som er praktisk mulig å benytte ved eventuell rutinebruk for sykehus med akutfunksjon. Det er eksempelvis ikke hensiktsmessig med lang sentrifugetid siden det er viktig med kort svartid.

Etter sentrifugering dannet lipidene et distinkt lag som ble fjernet og infranatanten analysert.

3.4 Ethiske betraktninger

Det ble i denne studien benyttet anonyme prøver, og data analysert i aggregert form vil være uten konsekvens for behandling av enkeltindivider. I slike kvalitetsforbedringsstudier er det vanlig å benytte overskuddsserum uten samtykke, dersom dette ikke er til ulempe for pasienten. Utvelging av prøver som ble tatt med i studien er basert på analyseresultat som allerede foreligger, dermed vil ikke uventede patologiske analysesvar ha blitt oppdaget i studien. Ingen informasjon om pasienten ble lagret i studien og resultater fra studien ble ikke knyttet til personen prøven kom fra. Derfor var det heller ikke nødvendig å innhente samtykke eller søke Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) og Norsk senter for forskningsdata (NSD). Prøver benyttet i studien som var over interferensgrensene som foreligger ved SSA, ble behandlet etter gjeldende prosedyre ved seksjonen før bruk i studien.

3.5 Statistisk behandling av resultat

Resultatet av del 1, behandling av ikke-lipemiske pasientprøver, er presentert med gjennomsnitt og gjenfinnbarhet med største og minste gjenfinnbarhet. Der gjenfinnbarhet er beregnet mellom sluttresultat og resultat før behandling for både LipoClear-behandling og ultrasentrifugering. Differanse i prosent mellom før behandling og etter ultrasentrifugering og behandling med LipoClear er beregnet og presentert i diagram. Differansen i prosent for de ulike analyttene er sammenlignet med krav til bias basert på biologisk variasjon. Det ble i tillegg utført paret t-test med signifikansnivå 0,05 mellom seriene for de ulike analyttene. Basert på resultatene i del 1 (N=15) ble det utført Passing-Bablok regresjon mellom 0-prøve og etter LipoClear og ultrasentrifugering for de ulike analyttene, samt laget differanseplott. Paret t-test forutsetter normalfordeling av resultater. Normalfordelingen til resultatene er testet ved QQ-plot (48).

Del 2, serumpool med økende tilsats av Intralipid, er presentert som gjennomsnitt og gjennomsnittlig differanse i prosent. Differanse i prosent ble beregnet mellom resultat av serumpool tilsatt destillert vann i samme fortynningsforhold som resterende serumpooler

tilsatt Intralipid, og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering. Differansen ble, som resultatene i del 1, sammenlignet mot krav til bias basert på biologisk variasjon.

I del 3 ble det beregnet differanse i prosent mellom resultat analysert i lipemisk serum og resultat etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering. Ettersom det i dette delforsøket ikke er en «nullprøve» eller fasit uten lipemisk interferens, så er differansen sammenlignet med differansen mellom resultat fra serumpool tilsatt Intralipid før behandling og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering. I både del 2 og del 3 ble også differanse i L-indeks og triglyserid beregnet fra før behandling og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering for å kontrollere at metodene fjerner den lipemiske interferensen.

Alle statistiske beregninger i studien er utført i Microsoft Excel (versjon 2016) med Analyse-IT (versjon 5.65). Konsentrasjoner for analytter er presentert med antall desimaler som blir utgitt til rekvirent ved SAA.

3.5.1 Krav til bias

Det er hensiktsmessig å sammenligne differansen mellom 0-prøve/«fasit» og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering med et bias krav. Krav til akseptabel bias for respektive analytter er presentert i tabell II. Krav til bias og tillatt totalfeil benyttet i studien er basert på biologisk variasjon:

$$Bias (\%) < 0,25 (CV_w^2 + CV_g^2)^{1/2}$$

$$TE (\%) < 1,65 \times 0,5 CV_w^2 + 0,25 (CV_w^2 + CV_g^2)^{1/2}$$

Der CV_w er intra-individuell biologisk variasjon og CV_g er inter-individuell biologisk variasjon (49).

Informasjon om biologisk variasjon er hentet fra databasen til European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFML database for biological variation) (50). Denne databasen utfører metaanalyse over tilgjengelige artikler for biologisk variasjon og denne blir fortløpende oppdatert etter hvert som nye artikler blir publisert. På analyser som EFML-databasen ikke har presentert biologisk variasjon på enda, er Westgards database for Optimal Biological Variation benyttet (51). For informasjon om biologisk variasjon hentet fra Westgards database, er det kontrollert at informasjonen er basert på flere artikler (hhv. 11, 24 og 17 artikler for bilirubin, kalsium og fosfat).

Tabell II: Krav til bias og tillatt totalfeil, samt analytisk variasjon ved SAA for analytter testet i studien.

Analytt	Krav til bias (%) ^a	Tillatt totalfeil (%) ^a	Analytisk variasjon ved SAA (%) ^b
Natrium	0,3	0,7	1,0
Kalium	1,5	4,8	2,0
Klorid	0,4	1,3	2,0
ALAT	7,7	16,1	5,0
Glukose	2,4	6,5	2,5
Bilirubin*	9,0	26,9	6,0
Kalsium*	0,8	2,5	2,0
Kreatinin	3,7	7,5	3,0
Albumin	1,4	3,6	3,0
Fosfat*	3,4	10,1	3,0

Analytter merket * er basert på informasjon hentet fra Westgard.

a Basert på referansene (50, 51)

b Hentet fra Elektronisk Kvalitetshåndbok for Haukeland Universitetssykehus (47)

4.0 Resultat

4.2 Gjenfinnbarhet

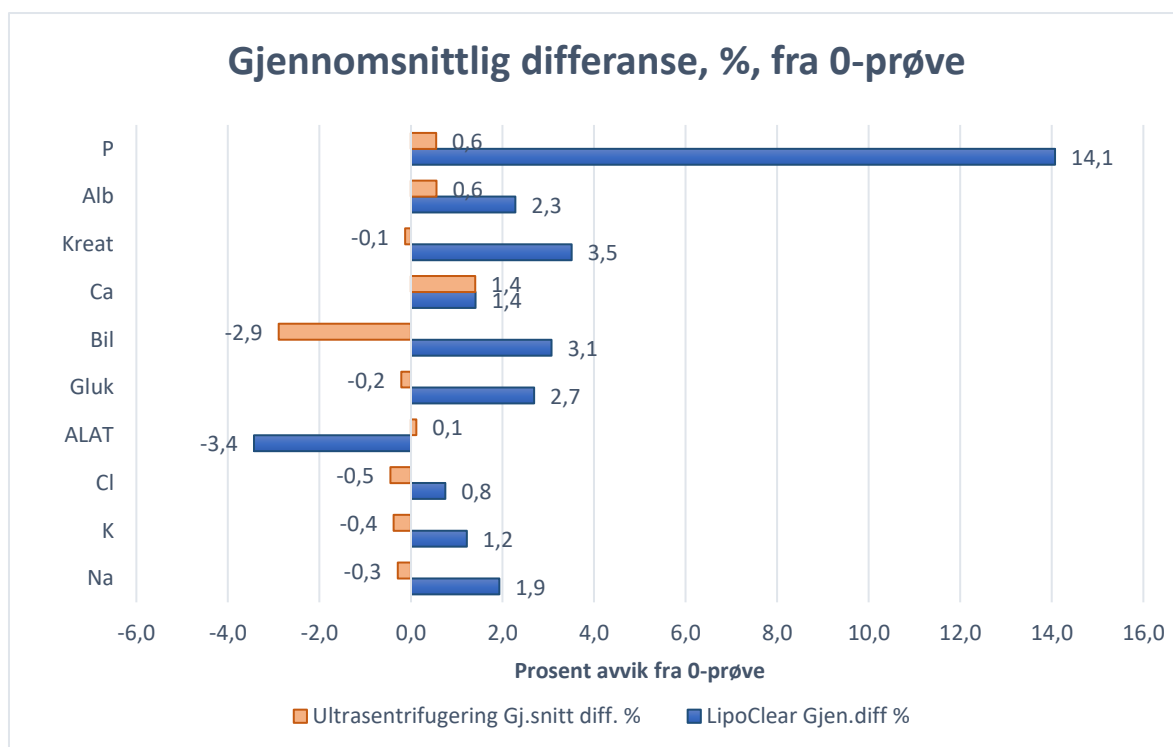
I første delforsøk ble 15 ikke-lipemiske serumprøver med L-indeks < 20 ultrasentrifugert og behandlet med LipoClear, dette for å kontrollere gjenfinnbarhet for analysene i forsøket etter behandling. Resultat fra første delforsøk er vist i tabell III og figur 4.

Tabell III: Gjenfinnbarhet etter LipoClear-behandling og ultrasentrifugering i ikke-lipemisk serum.

N=15	Før behandling	LipoClear		Ultrasentrifugering	
Analytt	Gj.snittskonsentrasjon (min-max)	Gj.snitt	Gjenfinnbarhet, % (min-max)	Gj.snitt	Gjenfinnbarhet, % (min-max)
Na	138 mmol/L (131 – 145)	141	102 (100 - 106) * β	138	100 (99 - 102) β
K	4,4 mmol/L (3,2 - 5,1)	4,4	101 (100-105) β	4,4	100 (99-101) β
Cl	99 mmol/L (82 – 110)	99	101 (99 - 104) *	98	100 (99 - 101) * β
ALAT	25 U/L (10 – 75)	25	97 (76 - 111)	26	100 (91 - 109)
Gluk	6,1 mmol/L (3,5 - 8,3)	6,3	103 (101 - 108) * β	6,1	100 (99 - 101)
Bil	6 μ mol/L (1 – 13)	6	103 (83 - 120)	6	97 (77 - 111)
Ca	2,35 mmol/L (2,02 - 2,58)	2,38	101 (97 - 120) *	2,38	101 (98 - 120) *
Kreat	97 μ mol/L (56 - 246)	100	104 (101 - 108) β	97	100 (97 - 103)
Alb	42 g/L (33 – 48)	43	102 (98 - 107) * β	43	101 (99 - 103)
P	1,06 mmol/L (0,75 - 1,60)	1,21	114 (90 - 119) * β	1,07	101 (99 - 102)

*Avvik større enn krav til bias basert på biologisk variasjon

β Statistisk signifikant avvik ved t-test med signifikansnivå $P < 0,05$.



Figur 4: Oversikt over gjennomsnittlig differanse, %, for respektive analytter i ikke-lipemisk serum

Ikke-lipemisk serum viser en gjennomsnittlig gjenfinnbarhet på mellom 97% og 104% for alle analytter med unntak av fosfat etter LipoClear-behandling, som viser en gjennomsnittlig gjenfinnbarhet på 114%. Rådata fra analysering er vedlagt (vedlegg 4).

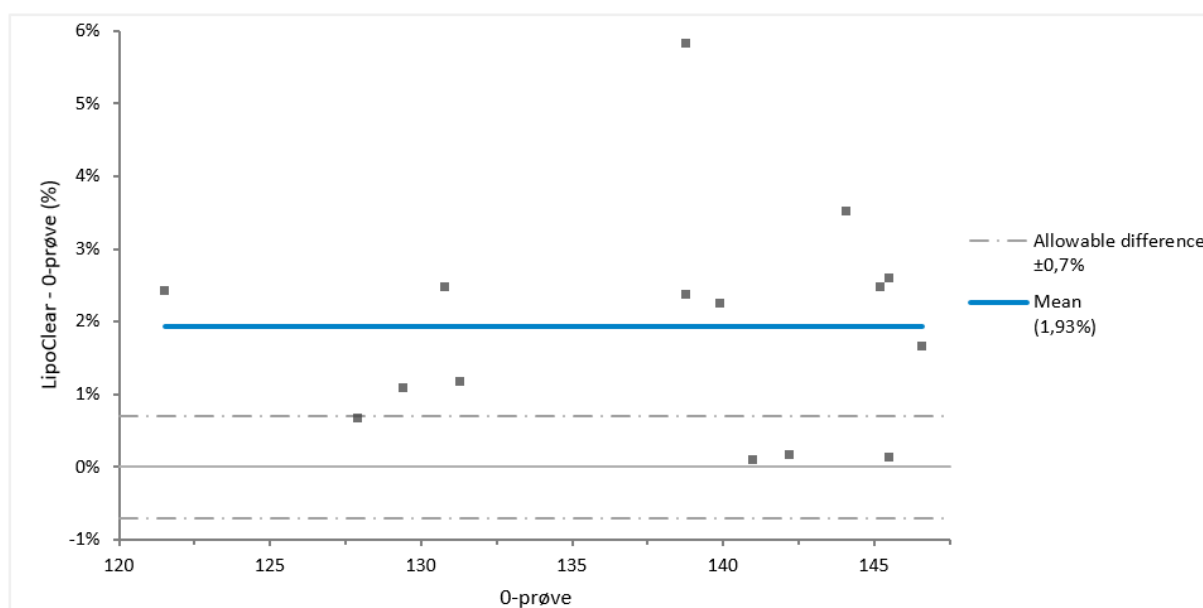
Generelt viser LipoClear-behandling en noe større spredning i gjenfinnbarhet enn ultrasentrifugering. Den største spredningen i differanse etter ultrasentrifugering og LipoClear-behandling er på analytter med lavt konsentrasjonsområde, som bilirubin og ALAT. Både LipoClear-behandling og ultrasentrifugering har ett resultat med svært stort avvik på kalsium. Denne prøven viser uvanlig lavt resultat i 0-prøven på 2,11 mmol/L, mot henholdsvis 2,52 mmol/L og 2,53 mmol/L etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering. Samme prøve har albumin-verdi innenfor referanseområdet både før og etter behandling, og heller ingen andre resultater som er uvanlig lav før behandling eller høy etter behandling. Dersom dette resultatet ekskluderes vil gjennomsnittlig gjenfinnbarhet og maksimal gjenfinnbarhet bli 100% og 103% for LipoClear og 100% og 102% for ultrasentrifugering.

Differanse mellom resultat av 0-prøve og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering ble testet ved bruk av parett t-test med signifikansnivå $P < 0,05$, samt sammenlignet med krav til bias basert på biologisk variasjon (se tabell II, kap. 4.1). Normalfordelingen til resultatene i del 1 er testet med QQ-plot, som viser at resultater for alle analytter i forsøket er tilnærmet normalfordelt. Resultat av t-test og QQ-plot for normalfordeling er vedlagt (vedlegg 4).

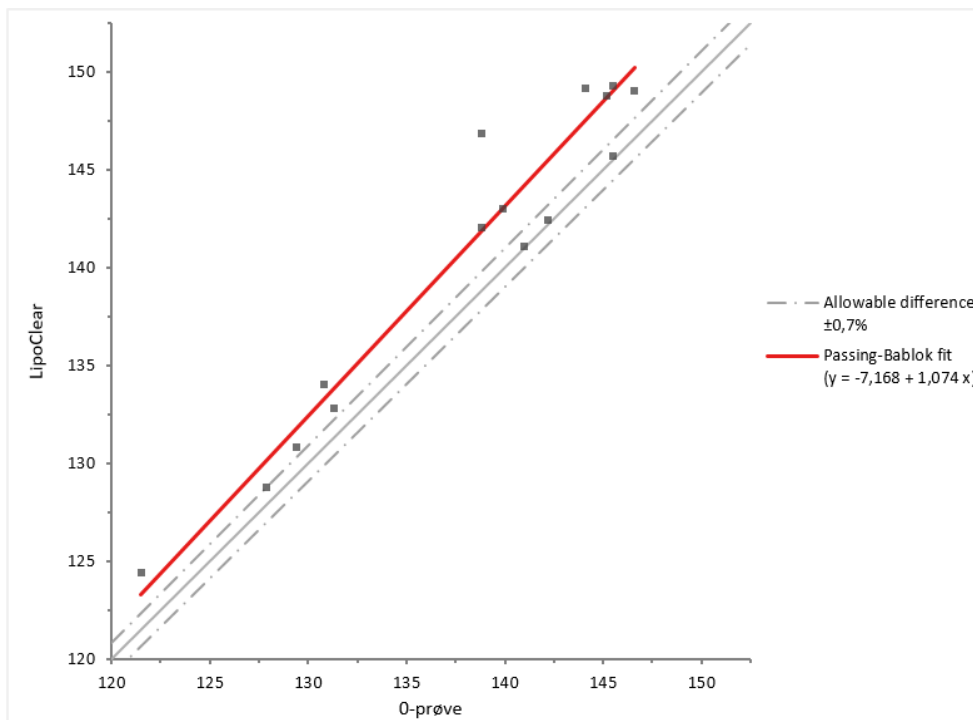
Analyttene natrium, kalium, glukose, kreatinin, albumin og fosfat viser statistisk signifikant avvik ved signifikansnivå $P < 0,05$ etter LipoClear-behandling. Etter ultrasentrifugering viser resultatet statistisk signifikant avvik for analyttene natrium, kalium, klorid og fosfat. Sammenlignet med krav til bias basert på biologisk variasjon viser behandling med LipoClear større differanse på analyttene natrium, klorid, glukose, kalsium, albumin og fosfat, mens behandling med ultrasentrifugering viser større differanse på analyttene klorid og kalsium. Ved ekskludering av det svært avvikende kalsium-resultatet nevnt over, så vil både LipoClear-behandling og ultrasentrifugering være innenfor krav til bias for kalsium. Av analyttene som ikke overstiger krav til bias har alle, bortsett fra ALAT etter behandling med LipoClear, ett eller færre resultater større enn tillatt totalfeil.

Det ble også utført regresjonsanalyse med Passing Bablok mellom resultatene av 0-prøven og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering. Resultatet av Passing-Bablok regresjon er vedlagt (vedlegg 4). For LipoClear inneholdt ikke konfidensintervallet for stigningstallet (slope) 1 for analyttene glukose, kalsium, kreatinin og albumin, mens konfidensintervallet for konstantleddet (intercept) 0 for analytten kalsium. For ultrasentrifugering inneholdt ikke konfidensintervallet til konstantleddet 0 for analytten kalsium. Dette tyder på et proporsjonalt avvik for analyttene glukose, kalsium, kreatinin og albumin etter LipoClear-behandling og et konstant avvik for kalsium etter både LipoClear-behandling og ultrasentrifugering.

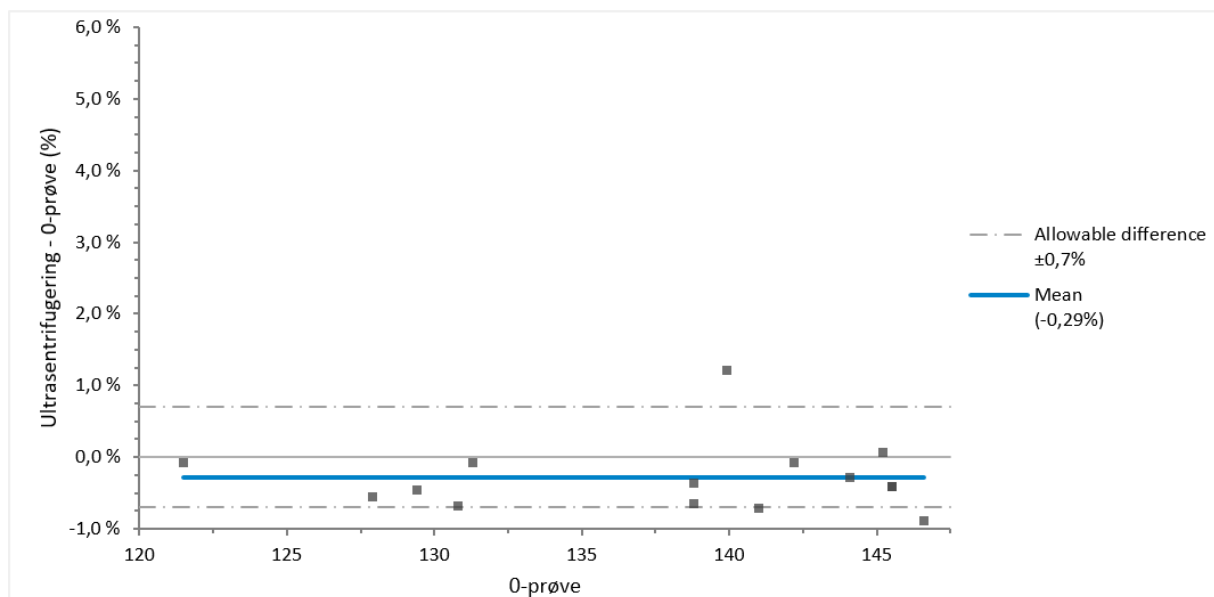
Det ble i dette delforsøket fokusert på spredning i natrium-konsentrasjon, og derfor er differanseplott og Passing-Bablok regresjon for denne analytten vist her, figur 5-8. Differanseplottene for natrium viser en større spredning i differanse etter behandling med LipoClear sammenlignet med ultrasentrifugering. Differanseplottene viser også at LipoClear har en positiv bias, i motsetning til ultrasentrifugering som viser en svak negativ bias. Den positive trenden til natrium etter LipoClear-behandling er også svært synlig i regresjonenslinjen. Resultat for regresjonsanalysen og differanseplott for de resterende analyttene er vedlagt (vedlegg 4). Differanseplottene for de ulike analyttene viser en positiv trend for natrium, fosfat, albumin, kreatinin og glukose etter behandling med LipoClear, og negativ trend for klorid etter ultrasentrifugering.



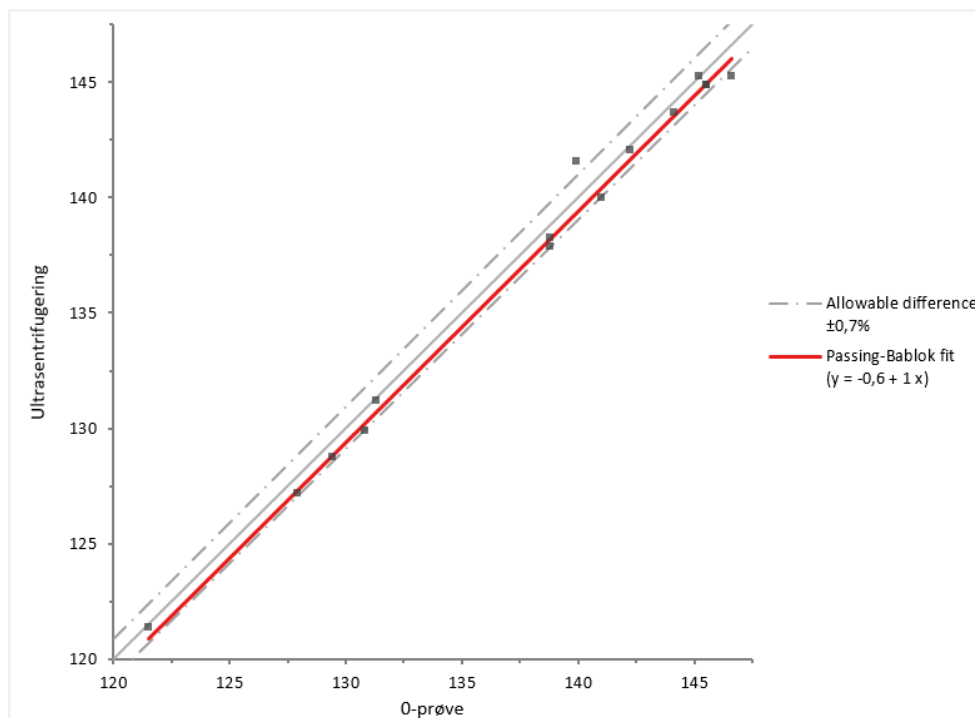
Figur 5: Differanseplott for natrium før og etter LipoClear-behandling.



Figur 6: Passing Bablok regresjon for natrium før og etter LipoClear-behandling.



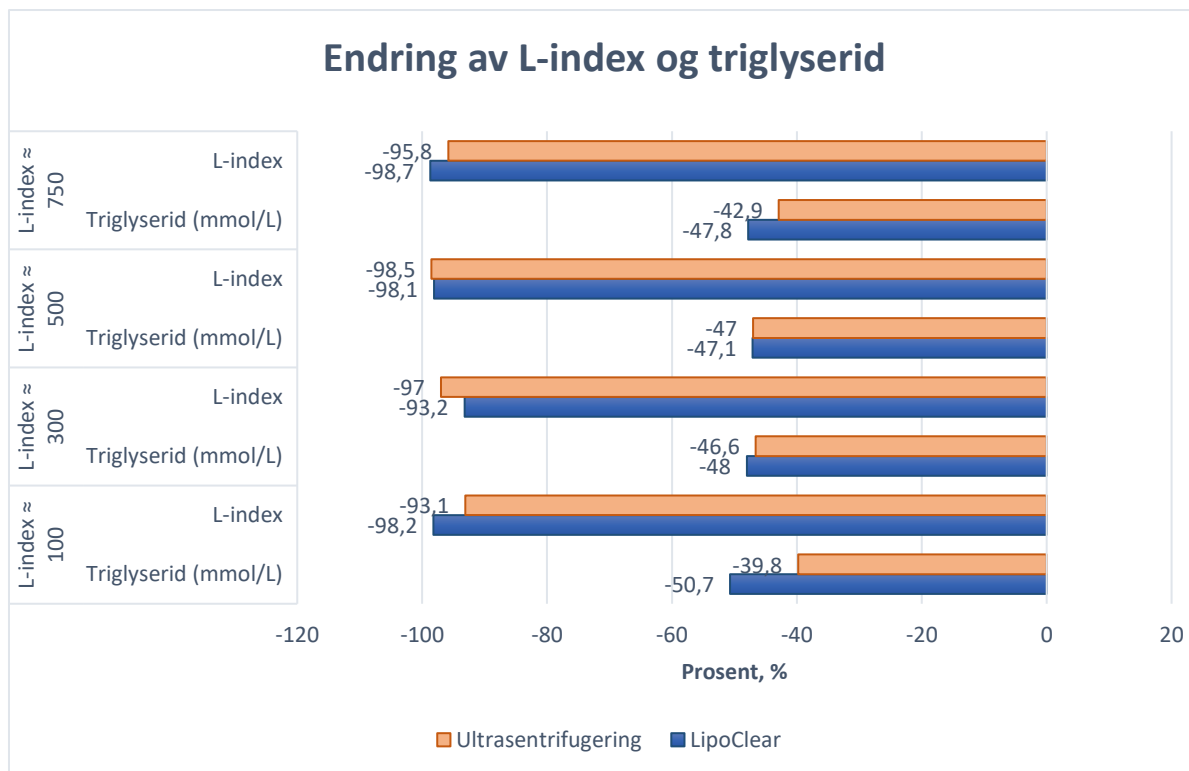
Figur 7: Differanseplott for natrium etter ultrasentrifugering.



Figur 8: Passing Bablok regresjon for natrium etter ultrasentrifugering.

4.3 Spiking med Intralipid

En serumpool med L-indeks < 20 ble fordelt og tilsatt økende mengde Intralipid til konsentrasjon av L-indeks på ca. 100, 300, 500 og 750. Effekten til metodene ble testet ved å analysere L-indeks og triglyserid-konsentrasjon før og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering. Begge behandlingsmetoder for fjerning av lipider viser en sterk nedgang i L-indeks og triglyserid etter behandling, vist i figur 9. Ved alle nivå av L-indeks testet, fjerner begge metoder nok lipemisk interferens til at de er innenfor grensene for interferens oppgitt fra leverandør og i bruk ved SAA (se tabell I, kap. 3.2).



Figur 9: Endring i L-index og triglyserid før og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering

Serumpoolene med økende mengde Intralipid ble analysert, og deretter ultrasentrifugert og behandlet med LipoClear. Infranatanten fra behandlet serum ble deretter analysert. En alikvot av serumpoolen ble tilsatt destillert vann i samme fortynningsforhold som øvrige alikvoter tilsatt standardkurve med Intralipid. Denne prøven er «fasit» eller 0-prøve. Differansen for de ulike analyttene er beregnet mellom serumpoolen tilsatt destillert vann og serum etter ultrasentrifugering og behandling med LipoClear.

Tabell IV: Resultat av LipoClear-behandling og ultrasentrifugering av serumpool med økende tilsats av Intralipid.

Analyse	\bar{X} , 0-prøve	L-indeks \approx 100		L-indeks \approx 300		L-indeks \approx 500		L-indeks \approx 750	
		LipoClear Gj.snittlig differanse (%)	Ultra-sentrifugering Gj.snittlig differanse (%)	LipoClear Gj.snittlig differanse (%)	Ultra-sentrifugering Gj.snittlig differanse (%)	LipoClear Gj.snittlig differanse (%)	Ultra-sentrifugering Gj.snittlig differanse (%)	LipoClear Gj.snittlig differanse (%)	Ultra-sentrifugering Gj.snittlig differanse (%)
Na (mmol/L)	126	0,9 *	-1,1 *	0,8 *	-0,1	1,3 *	0,0	1,0 *	0,3
K (mmol/L)	3,7	0,2	-1,0	0,8	0,3	1,6 *	0,4	1,2	1,3
Cl (mmol/L)	91	1,2 *	-0,9 *	0,9 *	-0,1	1,6 *	0,6 *	1,2 *	0,6 *
ALAT (U/L)	148	0,5	7,4	1,6	5,9	2,4	6,5	2,7	7,2
Gluk (mmol/L)	5,1	3,7 *	0,2	3,3 *	-0,3	3,9 *	0,9	3,8 *	0,9
Bil (μ mol/L)	29	-0,1	1,7	0,5	1,2	0,9	0,2	-2,9	0,1
Ca (mmol/L)	2,15	1,1 *	0,5	-0,8	0,4	1,3 *	1,5 *	0,9 *	1,3 *
Kreat (μ mol/L)	68	4,9 *	1,7	6,1 *	0,7	4,9 *	2,2	6,1 *	2,2
Alb (g/L)	39	3,7 *	4,7 *	1,3	0,8	2,5 *	0,8	1,9 *	1,8 *
P (mmol/L)	0,99	14,1 *	0,2	13,7 *	1,2	15,3 *	0,2	14,5 *	1,2

*Avvik større enn krav til bias basert på biologisk variasjon

Tabell IV viser gjennomsnittlig differanse for serumpool ultrasentrifugert og behandlet med LipoClear. Gjennomsnittlig differanse er sammenlignet med krav til bias (se tabell II, kap. 4.1). Resultat etter behandling med LipoClear viser en større differanse enn krav til bias for analyttene natrium, klorid, glukose, kreatinin og fosfat ved alle konsentrasjoner av L-indeks undersøkt, samt ved kalsium og albumin ved alle L-indeks-nivå testet unntatt ved konsentrasjon av L-indeks \approx 300. Ultrasentrifugering viser en høyere differanse enn tillatt bias ved natrium ved L-indeks 100, kalsium ved L-indeks 500 og 750, samt albumin ved L-indeks 100 og 750.

4.4 Naturlig lipemiske pasientprøver

20 naturlig lipemiske pasientprøver mottatt ved SAA ble ultrasentrifugert og behandlet med LipoClear. Dette for å se om naturlig lipemiske prøver oppfører seg på samme måte som serumpool tilsatt Intralipid ved ultrasentrifugering og behandling med LipoClear. Konsentrasjonsområde, gjennomsnitt og median for de 20 prøvene testet i dette forsøket er vist i tabell V. Tabell VI viser fordeling i L-indeks på prøvene i dette delforsøket.

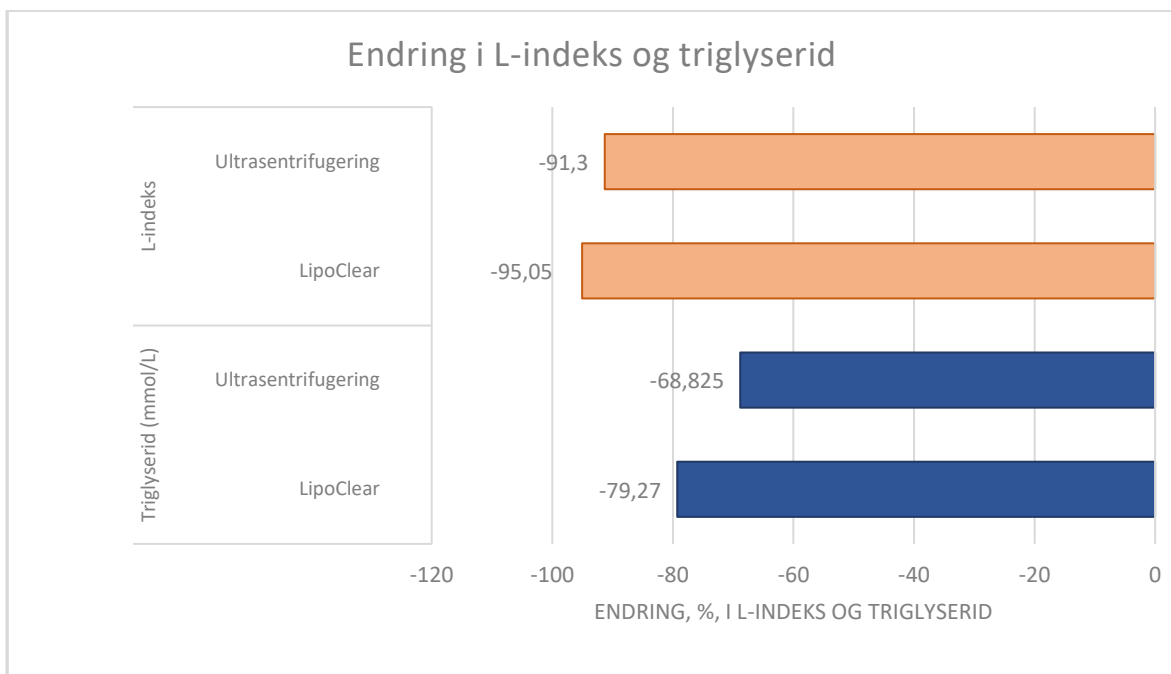
Tabell V: Beskrivende statistikk for naturlig lipemiske prøver før LipoClear-behandling og ultrasentrifugering.

Analytt	Konsentrasjonsområde	Gjennomsnitt	Median
Na (mmol/L)	129 – 143	138	140
K (mmol/L)	3,4 – 4,9	4,3	4,4
Cl (mmol/L)	92 - 106	100	101
ALAT (U/L)	11 – 120	43	33
Gluk (mmol/L)	5,0 – 20,0	8,1	6,5
Bil (μ mol/L)	1,5 – 8,7	4,4	4,2
Ca (mmol/L)	1,00 – 2,53	2,01	2,36
Kreat (μ mol/L)	21 – 148	87	89
Alb (g/L)	34 – 48	44	45
P (mmol/L)	0,65 – 1,84	1,09	1,14
TG (mmol/L)	3,24 – 89,62	20,23	13,39

Tabell VI: Fordeling av L-indeks på prøver før behandling

L-index	Antall prøver
100-200	13
200-300	3
300-400	1
400-500	0
>500	4

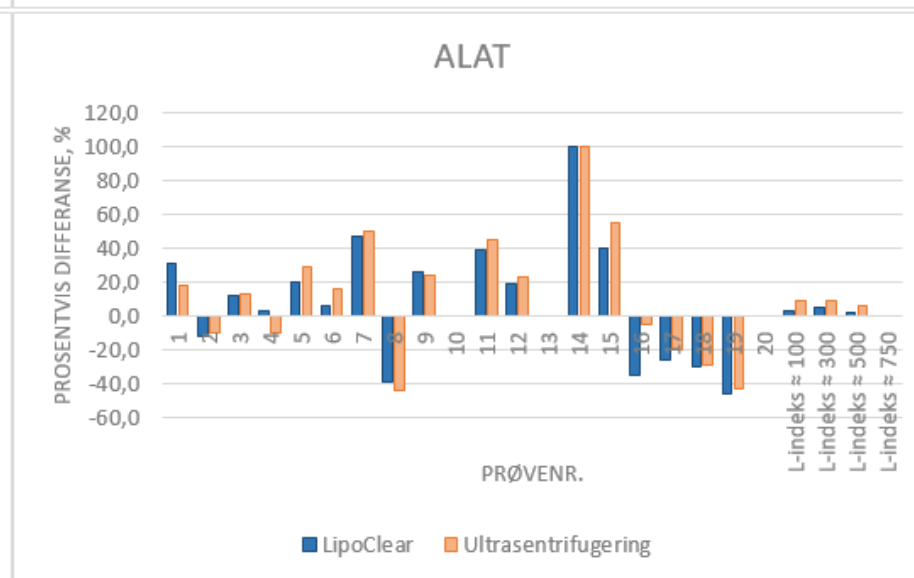
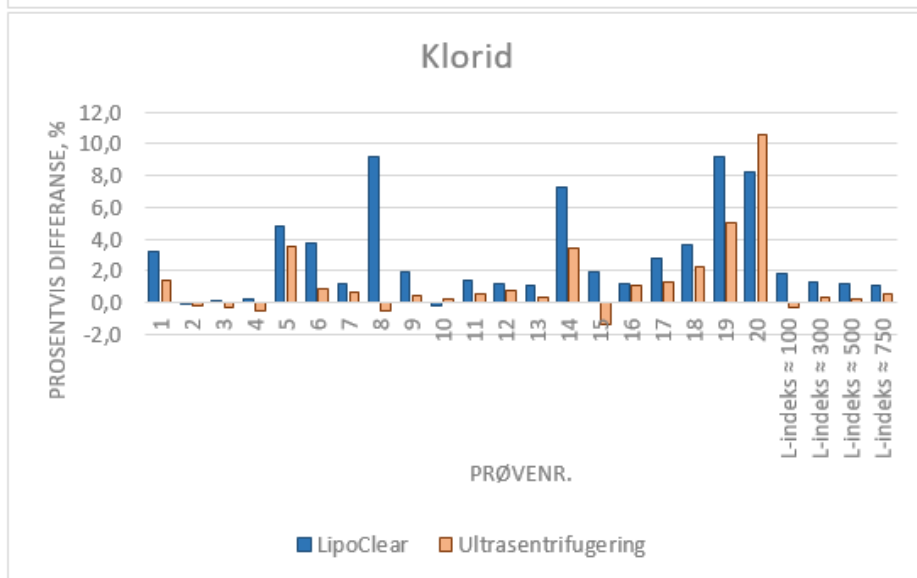
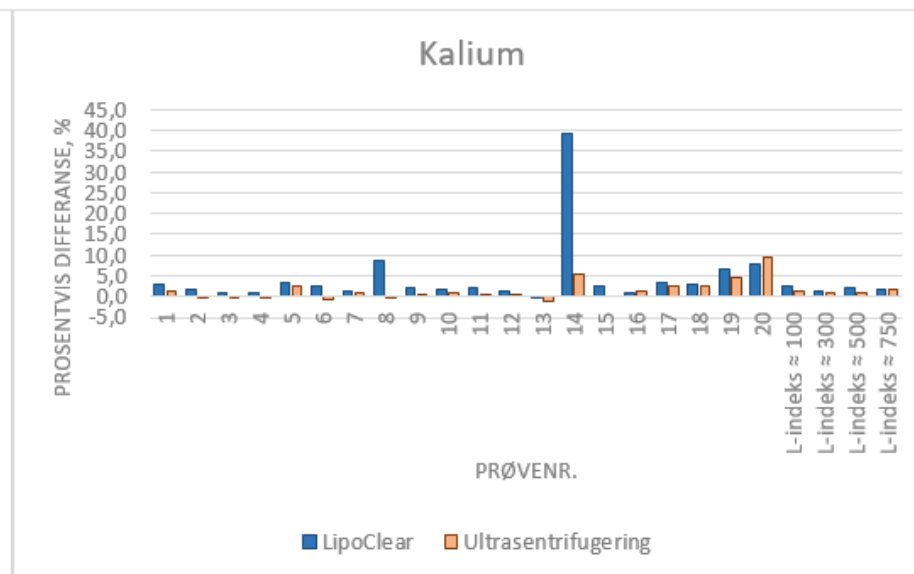
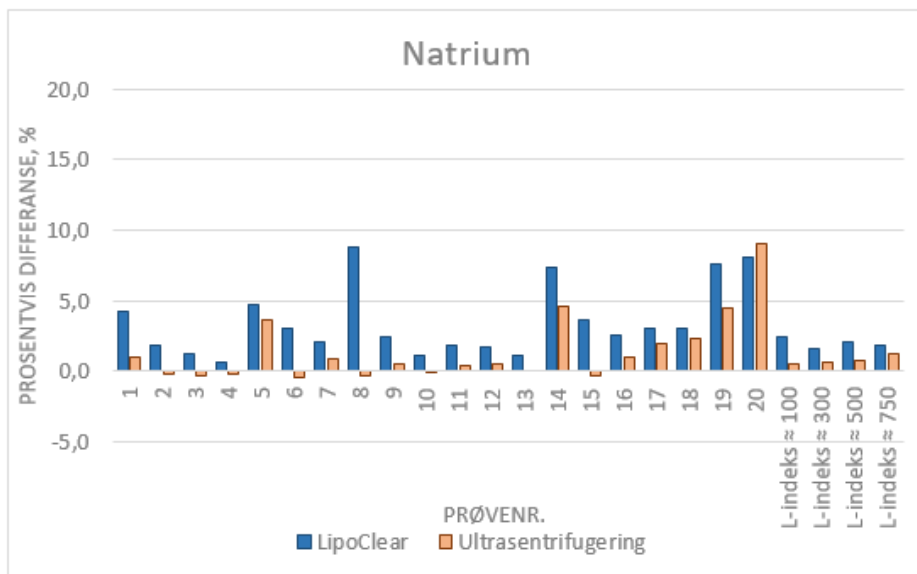
For å kontrollere at begge metodene fjerner lipider også i naturlig lipemiske prøver ble L-indeks og triglyserid-konsentrasjon målt i prøvene både før og etter behandling. Prosentvis nedgang i L-indeks og triglyserid-konsentrasjon etter ultrasentrifugering og LipoClear-behandling er vist i figur 10 (se vedlegg 4 for resultat). Alle prøver hadde triglyserid-konsentrasjon og L-indeks lavere enn interferensgrenser satt av leverandør og ved SAA etter både behandling med LipoClear og ultrasentrifugering (se kap.3.2, tabell I).

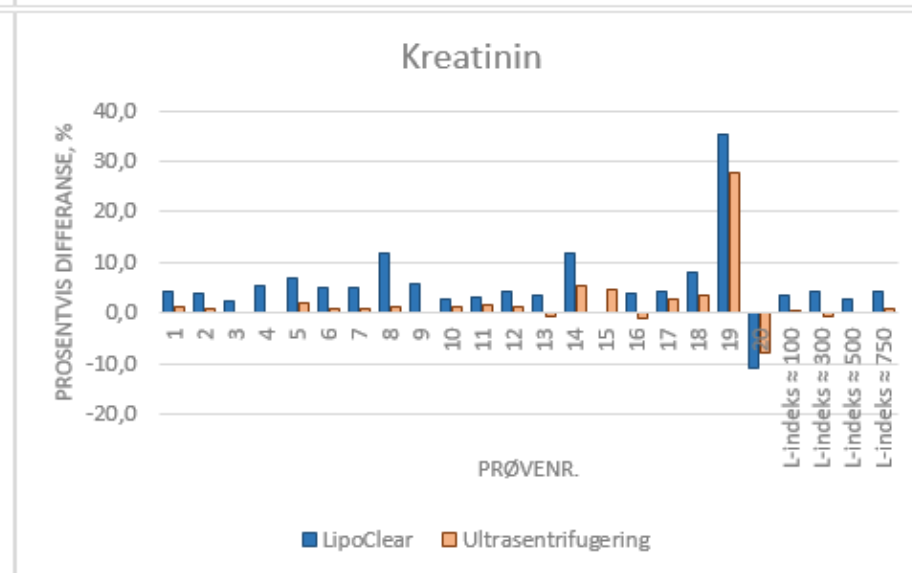
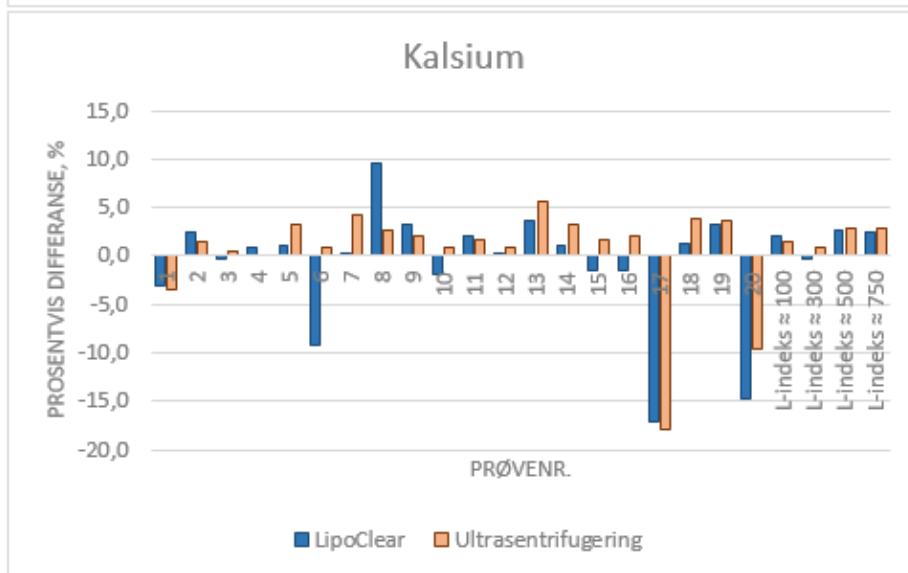
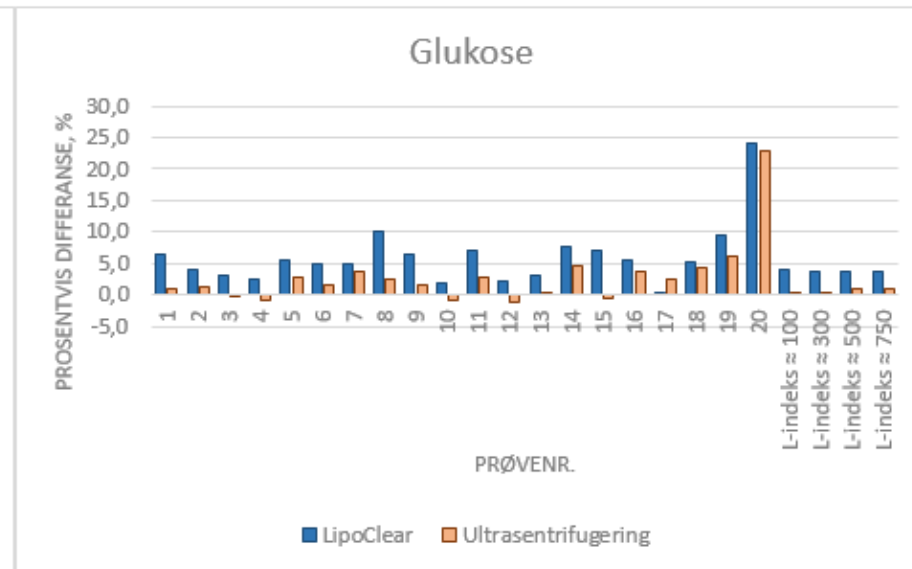
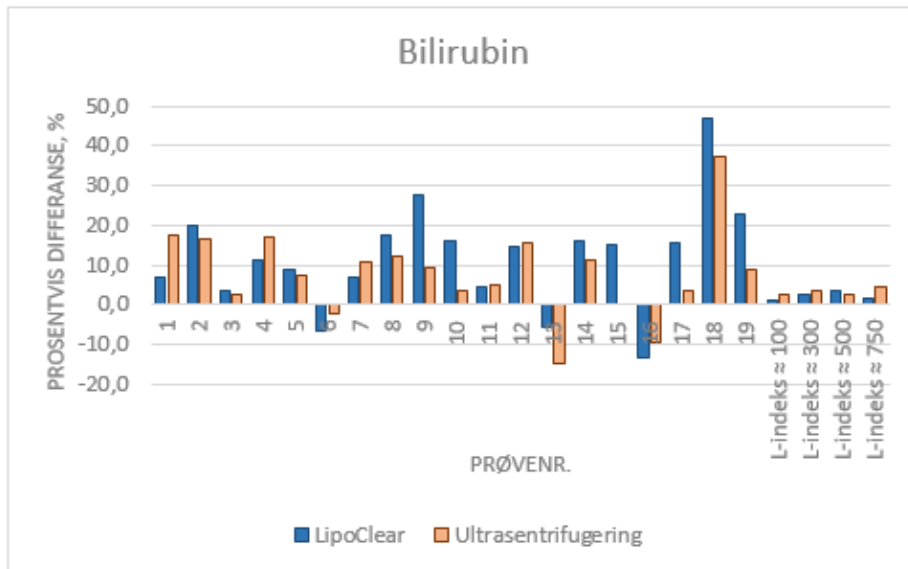


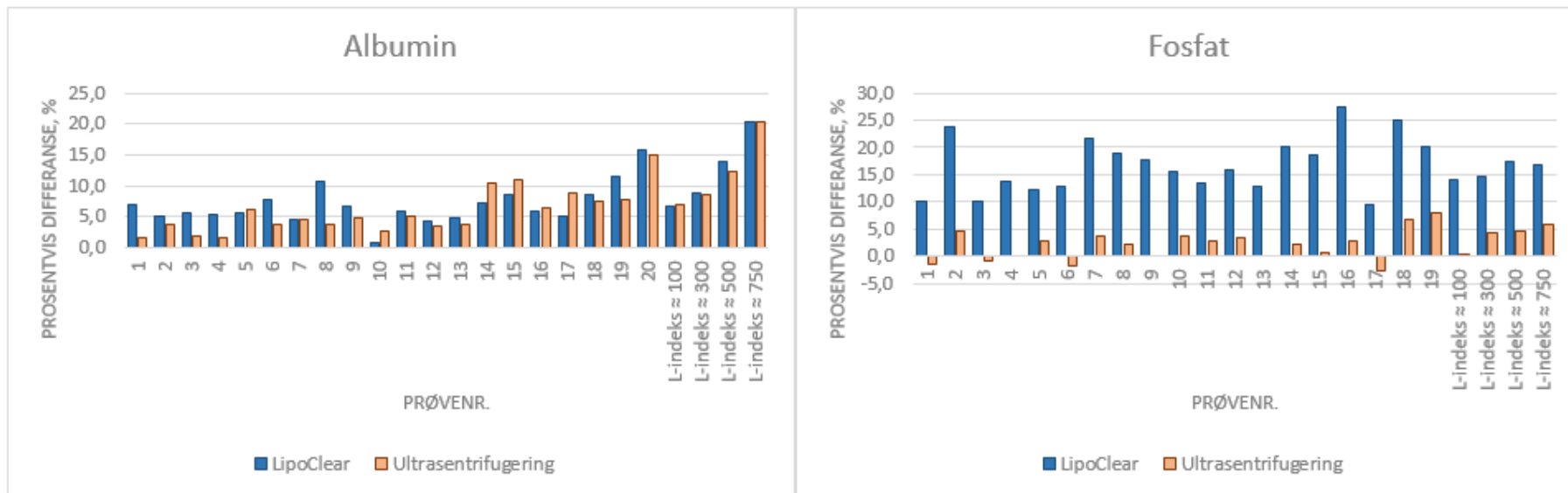
Figur 10: Endring i L-indeks og triglyserid-konsentrasjon etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering.

Ettersom det i dette delforsøket ble benyttet lipemiske prøver mottatt ved SAA, så er det ikke en «fasit»/nullprøve som resultatet kan sammenlignes med. For prøvene i forsøket er endring i analyttene blitt beregnet fra analysering før og etter ultrasentrifugering og behandling med LipoClear. Denne endringen er deretter sammenlignet med resultater fra del 2, med tilsvarende endring mellom analytt i serumpool tilsatt Intralipid (med interferens) og etter ultrasentrifugering og behandling med LipoClear.

Prøvene behandlet er presentert i figur 11, rangert i rekkefølge med stigende L-indeks, fra 101 til 1843, med lavest lengst til venstre.







Figur 11: Differanse (%) for ulike analytter før og etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering.

Prøve 1-20 er rangert i rekkefølge med stigende L-indeks, fra 101 til 1843, med lavest lengst til venstre. Lengst til høyre er endring i analytter for serumpool tilsatt Intralipid før og etter behandling. Prøvenr. 10, 13 og 20, samt serumpool med Intralipid tilsvarende L-indeks ≈ 750 kunne ikke analyseres i ubehandlet prøvemateriale for ALAT, og er derfor ekskludert fra diagrammet. Prøve 20 er fjernet fra diagrammet til bilirubin, da denne hadde en svært lav konsentrasjon og dermed fikk stor differanse i prosent (246%). Merk at Y-aksen for de ulike diagrammene har ulik verdi, dette grunnet forskjellig differanse (%) for ulike analytter.

Generelt sett viser flere av prøvene og analyttene behandlet en trend med høyere prosentvis differanse på analyttene, dess høyere L-indeks som er målt. Av prøvene er det spesielt prøve 20 som utmerker seg, da denne hadde en svært høy L-indeks på 1831, og gir på flere av analytter derfor svært stor differanse før og etter ultrasentrifugering og behandling med LipoClear. Videre viser resultatet at behandling av naturlig lipemiske serumprøver gir en mindre ensartet endring sammenlignet med behandling av serumpool tilsatt Intralipid. Der serumpool tilsatt Intralipid enten gir en liten endring eller en stigende endring ved stigende tilsatt av Intralipid, viser flere av analyttene i de naturlig lipemiske prøvene en mer tilfeldig differanse i forhold til L-indeks. Ettersom prøvene er tilfeldig valgt ut fra prøver mottatt ved SAA, ble det for analyttene ALAT og bilirubin undersøkt et lavt konsentrasjonsområde. Dette fører til en noe variabel og til dels stor differanse i prosent mellom før og etter behandling. Både fordi små endringer vil gi stort utslag i prosentvis differanse, men også da analyttene har en større analytisk variasjon i lavt område. Dette i motsetning til serumpoolen tilsatt Intralipid som hadde en konsentrasjon av ALAT og bilirubin på hhv 148 U/L og 29 $\mu\text{mol/L}$. De fleste analyttene viser lavere resultater i lipemisk serum, før behandling, og dermed en positiv differanse etter ultrasentrifugering og behandling med LipoClear. Denne positive trenden er lik både for de naturlig lipemiske pasientprøvene og serumpoolen tilsatt Intralipid. Unntaket fra dette er de tidligere omtalte analyttene ALAT og bilirubin, samt kalsium. Kalsium har to prøver som måler unormalt lav verdi på den lipemiske prøven, dette gjelder prøve 17 og 6 som måler hhv 1 mmol/L og 1,07 mmol/L før behandling. Prøve 17 viser en endring i konsentrasjon etter behandling, når den lipemiske interferensen er fjernet, mens prøve 6 bare viser en endring ved LipoClear-behandling. I tillegg til prøve 17, viser også prøve 20 en sterk negativ differanse ved analysing av kalsium etter LipoClear-behandling og ultrasentrifugering. Prøve 20 er, som nevnt tidligere, en svært lipemisk prøve med høy L-indeks.

Som vist i tabell V er konsentrasjonsområdet på ALAT for prøvene behandlet på 11-120 U/L, og med et gjennomsnitt på 43 U/L og en median på 33 U/L. Dette betyr at det generelt sett er lave konsentrasjoner av analytten som er blitt testet. Ved lipemiske prøver vil instrumentet ha problemer med å analysere ALAT, og vil fortynne prøven automatisk for å redusere den interfererende komponenten i andelen av prøvemateriale som blir benyttet til

analysering. Når prøver med allerede lav konsentrasjon fortynnes så vil dette føre til en større usikkerhet i resultatet, da resultatet kan være forholdsvis langt nede i måleområdet for analysen. For disse naturlig lipemiske prøvene som er testet er 16 av 20 blitt automatisk fortynnet av instrumentet for å generere resultat uten feilmelding på analyseresultatet pga. interferens. Til tross for automatisk fortynning av instrumentet er prøve 10, 13 og 20, samt analysering av 0-prøve med L-index ≈ 750 blitt utgitt med feilmelding, dette da automatisk fortynning på instrumentet ikke er tilstrekkelig for å fjerne interferensen.

Elektrolyttene natrium, kalium og klorid viser en større spredning i differanse etter behandling med LipoClear enn etter ultrasentrifugering. Spesielt prøve 8 og 14 viser stor endring etter LipoClear-behandling. Sammenlignet med serumpool tilsatt Intralipid gir de naturlig lipemiske prøvene en mindre forutsigbar endring. Dette ses spesielt godt på prøve 13 og 14, der prøve 14 endrer seg mer enn prøve 13. Begge prøver har forholdsvis lik L-indeks på hhv 202 og 228, men ulik triglyseridkonsentrasjon på hhv 5,32 mmol/L og 38,49 mmol/L. Prøve 8 er en annen prøve som utmerker seg hos flere andre analytter, som kalsium, kreatinin og glukose, der den viser en større positiv differanse etter behandling med LipoClear enn med ultrasentrifugering.

Fosfat viser samme trend etter behandling med LipoClear på de naturlig lipemiske prøvene som ved serumpool tilsatt Intralipid med vesentlig høyere differanse enn etter ultrasentrifugering. Dette er forventet da det er opplyst i pakningsvedlegget til metoden at den ikke kan benyttes for denne analytten. Ifølge pakningsvedlegget kan heller ikke LipoClear-metoden benyttes ved analysering av albumin (32). Albumin viser her, ved behandling av naturlig lipemiske prøver, en ganske lik endring sammenlignet både med ultrasentrifugering og ved behandling av serumpool tilsatt Intralipid.

For både glukose og kreatinin viser LipoClear en høyere positiv differanse sammenlignet med ultrasentrifugering. Begge analyttene viser mindre endringer etter behandling sammenlignet med andre analytter, samtidig viser de naturlig lipemiske prøvene noe større differanser sammenlignet med serumpool tilsatt Intralipid. Prøve 20 viser en sterk positiv differanse

etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering på glukose, og en negativ differanse for kreatinin. Prøve 19 viser også en stor positiv endring på kreatinin før og etter behandling med både LipoClear og ultrasentrifugering.

5.0 Diskusjon

Formålet med denne studien var å sammenligne LipoClear-behandling og ultrasentrifugering som metode for å fjerne lipoproteiner i lipemiske serumprøver. Dette for å kunne etablere en prosedyre for håndtering av pasientprøver med sterk lipemisk interferens ved Seksjon for automatiserte analyser, Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi ved Haukeland Universitetssykehus. Generelt sett regner en at ulike laboratorier mottar mellom 0,5 -2,5% lipemiske prøver hvert år (2, 3), og disse pasientprøvene kommer typisk fra akuttmottak, kronisk syke pasienter, pasienter med organsvikt og pasienter med behov for total parenteral ernæring. Dette tilsier at det trengs gode prosedyrer for å behandle prøvene, da resultatene som regel er avgjørende for videre behandling. I et regionsykehus vil slike prøver være forventet ut fra pasientgrunnlaget og helsetjenestetilbudet. Etersom disse prøvene er utfordrende å behandle, samt at metodene som kan benyttes er kostbare i bruk, må det gjøres en vurdering av ressursbruk på prosedyrene.

Resultatet av studien viser at begge metoder reduserer eller fjerner lipoprotein i serum. Reduksjonen er vist ved nedgang i både L-indeks og triglyseridkonsentrasjon etter både ultrasentrifugering og behandling med LipoClear. Reduksjonen i triglyserid-konsentrasjon og L-indeks kan ses både ved behandling av serumpool tilsatt økende mengde Intralipid, samt ved behandling av naturlig lipemiske pasientprøver. Ultrasentrifugering har en noe mindre reduksjon i både L-indeks og triglyserid-konsentrasjon sammenlignet med LipoClear. Den prosentvise reduksjonen ved bruk av begge metoder er tilsvarende for L-indeks både ved behandling av serumpool med Intralipid og for naturlig lipemiske prøver. For triglyserid-konsentrasjonen er den prosentvise reduksjonen noe lavere i serumpool med Intralipid sammenlignet med naturlig lipemiske pasientprøver. Begge metoder reduserer den lipemiske interferensen tilstrekkelige til at alle prøver var innenfor grenser for interferens oppgitt fra Roche Diagnostics og ved SAA (se tabell I, kap. 3.2).

Etter behandling av ikke-lipemisk serum med LipoClear viser analyttene natrium, kalium, glukose, kreatinin, albumin og fosfat statistisk signifikant avvik. Etter ultrasentrifugering viser analyttene natrium, kalium, klorid og fosfat statistisk signifikant avvik. LipoClear-behandling overstiger krav til bias for analyttene natrium, klorid, glukose, kalsium, albumin og fosfat, mens analyttene klorid og kalsium overstiger krav til bias etter ultrasentrifugering. Dersom det svært avvikende resultatet på kalsium før behandling blir ekskludert er denne analytten innenfor krav til bias for både LipoClear og ultrasentrifugering. Ettersom denne svært avvikende kalsium-verdien gir tilsvarende verdier etter både ultrasentrifugering og LipoClear, er det grunn til å tro at det er skjedd en feilmåling i 0-prøven. Denne feilmålingen kan for eksempel komme av dårlig oppblanding av prøvemateriale før analysering eller instrumentfeil.

Etter behandling av serum-pool tilsatt økende mengde Intralipid gav LipoClear differanse større enn krav til bias for alle L-indekser testet for natrium, klorid, glukose, kreatinin og fosfat, og for tre av fire L-indeks-nivå undersøkt for albumin og kalsium. Ultrasentrifugering overskred kravet til bias for klorid på tre av fire L-indeks-nivå testet, og albumin og kalsium for to av fire L-indeks-nivå undersøkt. Dette resultatet viser at differansene funnet i del 1 i stor grad er i overensstemmelse med differansene funnet i del 2 av denne studien, noe som styrker antagelsen om at dette er gjeldende bias for metodene. Analyttene undersøkt i denne studien viser avvik av samme størrelsesorden og retning både ved L-indeks ≈ 100 og ved L-indeks ≈ 750 , noe som tyder på det ikke er økt bias dess høyere L-indeks.

Resultatet av Passing-Bablok regresjon viser avvik for analyttene glukose, kalsium, kreatinin og albumin etter LipoClear-behandling og for kalsium etter ultrasentrifugering. Ved analyser med god presisjon vil statistiske tester som parett-test og Passing-Bablok regresjon påvise svært små forskjeller som statistisk signifikante da konfidensintervallene er smale. Analysene benyttet i denne studien har svært god presisjon. Resultatet av de statistiske testene bør derfor vurderes sammen med krav til bias og praktisk bruk av analysene. Basert på resultatet fra Passing-Bablok regresjon er det også vanskelig å konkludere med konstant og/eller

proporsjonalt avvik da resultatet er basert på få prøver, samt at hele måleområdet for analysen ikke er undersøkt.

Det er blitt etablert en konsensus for krav til analytisk spesifisering benyttet i medisinske laboratorier. Denne plasserer analytiske krav basert på biologisk variasjon på andre plasser bak evaluering av effekten av analysekvalitet på kliniske utfall i en spesifikk klinisk setting (52). En vanlig prosedyre ved verifisering av analysemetoder ved SAA er å benytte et krav til bias basert på biologisk variasjon. Dette er også blitt benyttet i andre tilsvarende studier (38). Det øverste kravet i konsensusen er ofte vanskelig å oppfylle da mange analytter, og spesielt de undersøkt i denne studien, kan benyttes på flere ulike måter av klinikere basert på klinisk scenario (53). Dette har også ført til at kravet er lite benyttet i publiserte studier (53). I denne studien er det derfor blitt benyttet et krav til bias basert på biologisk variasjon, som er det nest høyeste punktet i konsensusen for krav til analytisk spesifisering benyttet i medisinske laboratorier (52). Problemet med å benytte et bias-krav basert på biologisk variasjon er at analytter med lav biologisk variasjon vil få lavt krav til bias og tillatt totalfeil. Et eksempel på dette er natrium, som har en intra-individuell biologisk variasjon på 0,5 % og en inter-individuell biologisk variasjon på 1%. Dette gir et krav til tillatt bias på 0,3 %. I praksis fører dette til at natrium har et bias-krav som er lavere enn den analytiske variasjonen til analysen, som er på 1% ved SAA. Dette problemet oppstår også for analyttene klorid, kalsium og albumin som har krav til tillatt bias på hhv 0,4 %, 0,8 % og 1,4 %, og en analytisk variasjon på 2% for klorid og kalsium og 3% for albumin. Den analytiske presisjonen til analysene benyttet i denne studien må derfor ses i lys av vurdering av gjenfinnbarhet og differanse ved bruk av metodene for å fjerne lipemisk interferens. Dersom en tar utgangspunkt i eksempelvis en differanse på 1,9%, som LipoClear-behandling gir ved behandling av ikke-lipemisk serum, på en natrium-verdi sentralt i referanseområdet, f.eks. 139 mmol/L, så vil dette utgjøre 2,6 enheter. Ettersom svaret blir utgitt i hele tall så vil det utgjøre 3 enheter. Det er grunn til å anta at en endring i natrium-konsentrasjon på tre enheter i noen tilfeller vil ha klinisk signifikans. Et avvik på 1,4% på kalsium, som etter både LipoClear-behandling og ultrasentrifugering, vil på en verdi på 2,40 mmol/L utgjøre 0,03 enheter. Videre vil differansen etter behandling med LipoClear eller ultrasentrifugering på klorid utgjøre mindre enn 0,5 enheter ved verdier sentralt i referanseområdet. Vurdering av

størrelsesorden på bias er derfor viktig å ta hensyn til da slike metodologiske forhold i klinikken kan påvirke prøveresultater som ligger nær grenser for referanseområder eller cut-off for behandlingsgrenser. Øvrige analytter undersøkt i studien har et krav til bias som det forventes at metodene bør klare å oppfylle.

Andre studier har benyttet 2x analytisk variasjon som krav til differanse (29). Dersom dette kravet hadde blitt benyttet i denne studien så ville alle analyser undersøkt blitt godkjent både ved LipoClear-behandling og ultrasentrifugering, med unntak av fosfat etter LipoClear-behandling. Ved bruk av dette kvalitetskravet må en ta hensyn til at en akseptabel bias, på f.eks. 4%, på metoden som fjerner lipoproteiner kommer i tillegg til den analytiske variasjonen i analysemetoden. I verste fall vil dette kunne gi en total bias på prøvesvaret på 8%.

Ved vurdering av gjenfinnbarhet og differanse ved utprøving av metoder er det også viktig å ta hensyn til klinisk bruk av prøveresultater. For analytter som eksempelvis ALAT og bilirubin er det klinisk sett viktig med stigning og reduksjon, ettersom disse analyttene i mindre grad har en cut-off for behandling. Natrium, kalium og kalsium er analytter der det gjerne er en cut-off verdi som blir benyttet for oppstart eller avslutning av behandling, og en nøyaktig verdi er dermed viktigere for disse analyttene. Til tross for dette er det vanskelig å anse en differanse som lavere enn den analytiske variasjonen for metoden som klinisk signifikant. Med dette til grunn kan en vurdere at endringene i klorid- og kalsium-verdier etter behandling med LipoClear og ultrasentrifugering, samt endring i natrium etter ultrasentrifugering funnet i denne studien er så små at de vil utgjøre liten klinisk signifikans. Ettersom LipoClear og ultrasentrifugering gir en bias på 3,7 % og 4,7 % ved analysing av albumin etter behandling av serumpool med L-indeks \approx 100, bør metodene benyttes med forsiktighet ved lave L-indekser frem til eventuelt mer utprøving i dette konsentrasjonsområdet. Siden det er opplyst i pakningsvedlegget til LipoClear at metoden ikke bør benyttes på fosfat og albumin, er det ikke uventet at disse analysene gir stort avvik etter behandling (32).

Som nevnt i resultatdelen er det spesielt vanskelig å si noe om bilirubin og ALAT da det i stor grad er lave konsentrasjoner av analyttene som er testet i del 1 og del 3. Ved lave konsentrasjoner vil små endringer i resultat utgjøre stor prosentvis differanse. Det er også verdt å merke seg at ALAT og bilirubin er analyser som har en noe dårligere presisjon i lavt område. Ved vurdering av differanse på analytter som bare er testet på verdier godt innenfor referanseområdet kan det tenkes en endring her i mindre grad vil påvirke klinisk vurdering av pasienten, så fremt denne differansen kun er gjeldende for lave konsentrasjoner. Ved analysing av prøver med sterk lipemisk interferens vil ofte ikke instrumentet klare å produsere et svar på ALAT pga. feilmelding. Formålet med behandling av prøvemateriale for å redusere interferensen blir derfor å kunne produsere et resultat til rekvirenten, heller enn at analysen må avvises. Til tross for at det er lavere konsentrasjoner av ALAT og bilirubin som er blitt undersøkt i studien, samt at disse analysene har dårligere presisjon i dette konsentrasjonsområdet, var ingen av differansene større enn krav til bias satt. Eksempelet med bilirubin og ALAT viser problemstillingen med at vi i for liten grad kjenner til effekten av LipoClear og ultrasentrifugering for andre deler av konsentrasjonsområdet for analyttene. Dette kunne være aktuelt å undersøke i kommende studier.

Basert på denne studien, med krav til bias som er satt, analytisk presisjon for analysene samt klinisk skjønn er det derfor ikke anbefalt å benytte LipoClear-behandling ved analysing av natrium, glukose, kreatinin, albumin og fosfat. Ultrasentrifugering kan benyttes til alle analytter undersøkt i denne studien, med unntak av albumin. Dersom LipoClear likevel skal benyttes bør aktuelle prøveresultater kommenteres for å gjøre klinikken oppmerksom på usikkerheten i prøvesvaret og dermed hvilke forutsetninger de har for å tolke prøvesvarene.

Sammenlignet med tidligere studier viser resultatene av denne studien lik eller lavere differanse etter behandling med LipoClear enn tilsvarende studier. Disse studiene har forskjellig krav til bias, og dermed ulik konklusjon sammenlignet med denne studien. Anderson *et al.* (2008) testet LipoClear og benyttet krav til bias som 2,8 x analytisk variasjon (CV%) for metoden. Dette gav eksempelvis krav til bias for kalsium på 5,9 % og for kreatinin

7,3 % (29). Dersom Anderson *et al.* hadde benyttet samme krav til bias som er benyttet i denne studien, så hadde sluttkonklusjonen vært lik: LipoClear-behandling bør ikke benyttes på analyttene glukose, kalsium, kreatinin, albumin og fosfat. Anderson *et al.* undersøkte ikke LipoClear-behandling ved analysing av natrium, kalium og klorid i sin studie (29). Ved å benytte en streng bias, som gjort i denne studien, kan avvik som ikke er klinisk signifikante føre til at en metode ikke blir tatt i bruk og i verste fall kan det føre til vanskeligheter med å etablere en metode med gode nok resultat til å bli tatt i bruk. På den andre siden kan et moderat krav føre til at bias i prøvesvar blir større enn det trenger å være, og dermed påvirke pasientbehandling.

En tilnærming til denne problemstillingen er å kombinere ulike analytiske og kliniske krav. Castro-Castro *et al.* sammenlignet high-speed sentrifugering og ultrasentrifugering, samt high-speed sentrifugering og LipoClear, og benyttet krav basert på intra-individuell biologisk variasjon og den kritiske/kliniske beslutningskonsentrasjonen til analytten. Dette gav eksempelvis et krav om at natrium før og etter behandling ikke kan endre seg mer enn 1,27 enheter, kalium 0,34 enheter og klorid 0,61 enheter. Kalsium hadde et krav på maksimalt avvik på 0,09 enheter (36). Ettersom denne studien ikke opplyser om hvor stort avviket for de ulike metodene for analyse av analytter er, er det vanskelig å vurdere om konklusjonen kunne vært en annen ved bruk av et annet krav. Denne tilnærmingen til krav er også benyttet i denne studien: Det ligger et strengt krav til bias basert på biologisk variasjon i grunn, og resultatet er deretter vurdert på bakgrunn av både analytisk prestasjon til analysene, samt klinisk bruk av analytten.

Saracevic *et al.* benyttet Westgards database for ønskelig krav til impresisjon. Dette kravet er tilsvarende det som er benyttet i denne studien. Konklusjonen i Saracevic *et al.* sin studie er også i stor grad i overensstemmelse med resultatene i denne studien ang. hvilke analytter LipoClear kan benyttes på. Unntaket er analysing av kalium og kalsium, som Saracevic *et al.* ikke godkjenner etter behandling med LipoClear (38). For disse to analyttene viser studien til Saracevic *et al.* vesentlig høyere differanser enn denne studien, med 2,2 % og 2,5 % differanse for kalium og 6,6 % og 7,3 % differanse for kalsium (38), i motsetning til denne

studien som har funnet hhv. 0,8 % og 1,6 % for kalium og -0,8 % og 1,3 % for kalsium ved tilsvarende tilsatt av Intralipid. Som i denne studien behandlet også Saracevic *et al.* prøvene i triplikat (38).

Som forventet gav ikke behandling av naturlig lipemiske pasientprøver samme resultatet som behandling av serumpool tilsatt Intralipid. Som nevnt tidligere består den lipemiske interferensen i en pasientprøve av en annen sammensetning av lipider enn løsningen med kommersielt tillaget Intralipid (12). Dette gav en større variasjon i resultat på de ulike analyttene enn det L-indeks alene skulle tilsi. Et eksempel på dette er prøve 14 og prøve 13 som har ganske lik L-indeks på ca. 200, men svært ulik triglyserid-konsentrasjon på hhv 38,49 mmol/L og 5,32 mmol/L. Ved behandling med LipoClear og ultrasentrifugering får prøve 14 en større endring i elektrolyttkonsentrasjon enn prøve 13, noe som kan tyde på at triglyseridkonsentrasjonen kan være et mål på hvor sterk den lipemiske interferensen på indirekte ISE-metode er. Ettersom det i denne studien ikke ble analysert full lipidprofil på prøvene, som f.eks. HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, kolesterol og kylomikron, er det vanskelig å si noe spesifikt om hvilke lipider som påvirker de ulike analysemetodene mest. Dette gjør det også vanskelig å si noe om LipoClear eller ultrasentrifugering fungerer bedre på enkelte lipider. Ved behandling av naturlig lipemiske prøver er det også vanskelig å konkludere basert på at det ikke eksisterer en «fasit», et riktig resultat, som analyseresultatet etter behandling av prøvene kan sammenlignes med. Ettersom det kan se ut som triglyserid-konsentrasjon er en indikasjon på påvirkning av analysering av elektrolytter ved hjelp av indirekte ISE, bør det anbefales at det rutinemessig blir analysert både L-indeks og triglyserid ved mottak og behandling av lipemisk prøvemateriale.

Den samme trenden i endring i analyttene som er observert i behandling av ikke-lipemiske prøver og serumpool tilsatt Intralipid, kan også ses på de naturlig lipemiske prøvene. I stor grad følger de to behandlingsmetodene hverandre, men LipoClear viser en noe større positiv differanse etter behandling. Dette kan spesielt observeres på fosfat og kreatinin. Videre viser LipoClear-metoden en større differanse i forhold til ultrasentrifugering på enkelte prøver ved analysering på elektrolytter. At LipoClear gir enkelte unormalt høye verdier etter behandling

er noe som også er blitt observert tidligere ved bruk i rutinedrift ved SAA. Den store spredningen i natrium-resultat ble også observert i del 1 og 2 av studien. Positiv bias ved måling av natrium etter LipoClear-behandling er også blitt observert i andre studier; Roberts *et al.* fant en gjennomsnittlig positiv bias på 3,6 mmol/L ved sammenligning av ultrasentrifugering og LipoClear (54). Disse unormalt høye verdiene etter behandling med LipoClear blir et usikkerhetsmoment ved rutinebruk. Ved behandling av lipemiske prøver i rutinedrift er det viktig at operatør er sikker på at endringer i prøveresultat skyldes at den lipemiske interferensen er fjernet, og ikke ustabilitet i reagenset eller mistanke om feilpipettering. LipoClear viser sammenlignet med ultrasentrifugering en større nedgang i L-indeks og triglyserid etter behandling, altså fjerner metoden mer lipoproteiner enn ultrasentrifugering. Det kan ikke utelukkes at dette i noen grad påvirker analysering av analytter i behandlet serum, og kan dermed være en årsak til at denne metoden viser en større differanse enn ultrasentrifugering. I denne studien er det i del 1 og del 2 en «fasit» eller 0-prøve før behandling, når metodene benyttes rutinedrift vil det ikke eksistere en «fasit» eller kontroll som kan bekrefte at resultatet er riktig, dette setter derfor krav til at vi er trygge på metoden vi benytter.

På prøvene i delforsøk 3 med høyest L-indeks kan en se et noe unaturlig mønster med svært høye differanser på enkelte analytter og avvik som går motsatt vei av tidligere trend. Et eksempel på dette mønsteret er prøve 20 ved analysering av kreatinin. Det kan tenkes at for prøvene med høyest L-indeks, og som gir stor differanse i resultat bør prosedyren for behandling repeteres, dette for å utelukke manuelle feil eller ikke-homogen prøve ved preparering. Per i dag har vi ikke slike rutiner etablert ved SAA, men dette bør vurderes ved utarbeiding av ny prosedyre for behandling av sterkt lipemiske prøver.

Denne studien har sin største svakhet i at det er forholdsvis få prøver undersøkt: N=15 i del 1, N=3 i del 2 og N=20 i del 3. At studien hadde få prøver førte til at det ble vanskelig å utføre statistiske tester som t-test og regresjonsanalyse på del 2 med god styrke. Noe som følgelig blir aktuelt å ta stilling til i kommende studier. På grunn av begrensning i arbeidsmengde og økonomi for denne studien ble det besluttet at det viktigste var størst mulig spredning i

elektrolytt-konsentrasjon, og da spesielt natrium. Dette på grunn av at det er analytten vi i størst grad, og ved lavest L-indeks, erfaringsmessig opplever interferens. En annen svakhet i studien er at resultatene i del 1 og i del 3 er basert på prøver som bare er blitt behandlet en gang hver med de ulike behandlingsmetodene. Avvikende analyseresultater er blitt reanalysert, men det er likevel en klar svakhet ved studien at resultat med stort avvik fra 0-prøve ikke er blitt behandlet på nytt for å utelukke manuelle feil som f.eks. feilpipettering og ikke-homogen prøve, eller dårlig separering mellom lipider og infranatant etter behandling med de ulike metodene. Analysemetodene benyttet i denne studien er regnet som pålitelige og med god presisjon, noe som også fører til at vi kan påvise små forskjeller mellom metodene for å fjerne lipoproteiner som kan skyldes disse metodene og ikke analysemetoden.

Utfordringen med bruk av Intralipid versus naturlig lipemiske prøver er også blitt demonstrert i studien. Tilsats av Intralipid er metoden som er foretrukket ved interferensstudier, da disse oppfører seg likt og resultatene kan dermed replikeres (12). Både denne studien, og andre studier, har vist at naturlig lipemiske pasientprøver ikke alltid oppfører seg på samme måte som Intralipid (12). Dette kommer av at den lipemiske interferensen i pasientprøver kan ha opphav i forskjellige lipoproteiner og lipidprofiler (1), og at ulike behandlingsmetoder kan reagere ulikt på disse. Problemet som oppstår ved studering av naturlige lipemiske pasientprøver er at det ikke eksisterer en «nullprøve» eller en «fasit» som resultatet etter behandling kan sammenlignes med, samt at prøver med samme L-indeks i noen tilfeller kan gi svært forskjellig resultat ved behandling med samme metode. Sistnevnte er naturlig da L-indeks er et mål på turbiditeten til prøvematerialet, og ikke nødvendigvis konsentrasjonen av lipoproteiner (15, 16). Ettersom del 1 og del 2 av studien er utført etter anbefalte retningslinjer for interferensstudier og verifisering av metoder, samt at det er benyttet anerkjente analysemetoder, er det grunn til å tro at resultatene er overførbare til andre laboratorier av samme størrelse og instrumentering.

Det ble i denne studien benyttet ultrasentrifugering. Dette er kostbart utstyr som mange mindre sykehus i Norge ikke har ressurser til å kunne skaffe seg. Et billigere alternativ til

ultrasentrifuge er, som nevnt, high-speed sentrifuge. I dette prosjektet ble det likevel vurdert som mer riktig å teste ultrasentrifugering mot LipoClear da denne metoden er anbefalt av flere aktører (14, 30), samt at en ved bruk av ultrasentrifuge unngår en eventuell gjentakelse av prosedyren ved sterkt lipemiske prøver, som en gjerne må ved high-speed sentrifugering (35). Tilgang på ultrasentrifuge som kunne benyttes i studien talte for valg av denne metoden. En annen svakhet for studien at den bare tar utgangspunkt i en innstilling på ultrasentrifugen. Innstillingene ble valgt ut fra litteratursøk, praktisk anvendelse og et svært begrenset pilotprosjekt. Det vil dermed kreve noe mer utprøving før metoden kan tas i bruk i rutinedrift. Dersom ultrasentrifugering skal erstatte LipoClear i rutinedrift ved SAA vil det også kreve ressurser i form av opplæring av ansatte. Sterkt lipemiske prøver blir mottatt hele døgnet ved SAA, og det er derfor en forutsetning at alt personell ved denne avdelingen er kjent med prosedyre og bruk av metoden for å fjerne lipemisk interferens. På den andre siden er bioingeniører godt kjent med bruken av sentrifuger, og bruk av en ultrasentrifuge er ikke særlig ulik en vanlig sentrifuge. Denne studien sammenligner bare metodene LipoClear og ultrasentrifugering, og kan dermed ikke utelukke at det er andre metoder som kunne fungert bedre i rutinedrift, som f.eks. high-speed sentrifuge. Det kan heller ikke utelukkes at en annen rutine burde benyttes for enkelte analyser, som fortykning av analytter i forkant av analysering for å «fortynne bort» interferensen eller bruk av direkte ioneselektiv-metode for analysering av natrium, kalium og klorid. Vi vet også for lite om hvilke effekter metodene har i ulike konsentrasjonsområder for analyttene, og denne studien gir kun begrenset innsikt i dette.

Basert på resultatet i denne studien fremstår ultrasentrifugering som en mer stabil og forutsigbar metode enn LipoClear for behandling av pasientprøver med lipemisk interferens. Dette både basert på resultatene for alle tre delforsøk, der ultrasentrifugering er innenfor krav til bias for de fleste analytter, men også da metoden utelukker potensielle feilkilder som manuelle behandlingstrinn. Dette til tross for at det er benyttet relativt strenge krav til bias i studien. Det er også viktig for vurderingen at ultrasentrifugering har mindre spredning i resultatene, også dette er vist i alle tre delforsøk, og metoden blir dermed oppfattet som mer stabil i bruk. Ulempen med ultrasentrifuge er at denne er svært dyr å anskaffe, noe som kan gå på bekostning av andre investeringer på laboratoriet. Dette fører til at det kanskje

bare er de største sykehusene med stor nok prøvemengde som har mulighetene til å skaffe ultrasentrifuge. Større sykehus kan også lettere investere i dette utstyret siden flere analysemetoder kan benytte denne, eksempelvis nefelometriske målemetoder. Anskaffelse av en ultrasentrifuge kan derfor potensielt være til nytte i flere enheter i laboratorieklinikker, og investeringen kan følgelig være aktuell å diskutere på klinikknivå. Et annet argument for innkjøp av ultrasentrifuger er at Haukeland som universitetssykehus bør være tidlig ute med å benytte ultrasentrifugering som rutinemetode. For det første på grunn av universitetssykehusets rolle som rådgivende laboratorium for mindre sykehus, som gjerne sender prøver med problemer hit. For det andre fordi sykehuset har svært syke pasienter som klinikken krever raske og presise prøvesvar på. Det forventes at lipemiske prøver kan øke på grunn av demografiske endringer i samfunnet, der det blir flere eldre, multimorbide pasienter som akuttinnlegges ved sykehus. Samtidig vil nye krav til hurtig diagnostikk kreve effektiv fjerning av lipoproteiner for å raskt generere korrekt prøveresultat med liten usikkerhet. Dersom ultrasentrifuge blir regnet som en for stor kostnad, kan man anskaffe high-speed sentrifuge som er et billigere alternativ til ultrasentrifuge. Studier har vist at ved en optimal prosedyre kan high-speed sentrifugering være like effektivt som ultrasentrifugering (35).

Ettersom ultrasentrifugering ikke er spesielt utbredt som behandlingsmåte av sterkt lipemiske prøver hos sykehus i Norge, og heller ikke er blitt benyttet i rutinedrift ved SAA, så vil det kreve noen ressurser i forkant for optimalisering og testing til prosedyre, samt til opplæring i bruk. På tross av dette er det grunn til å tro at prosedyren benyttet i denne studien også kan benyttes ved eventuell innføring av ultrasentrifugering av lipemiske prøver i rutinedrift ved SAA. Ved analysing av prøver ved et sykehuslaboratorium med akutfunksjon er formålet å produsere et korrekt prøvesvar så raskt som mulig. I denne sammenheng er ultrasentrifugering en enklere metode å benytte. Når prosedyren er etablert og utstyret satt opp, så er metoden lett å benytte og har liten *hands-on* tid. Dette i motsetning til LipoClear som krever pipettering, henstand og sentrifugering.

6.0 Konklusjon

Fjerning av lipemisk interferens i prøver er viktig for klinisk diagnostikk ved både akutt og kronisk sykdom. Denne studien har sett på et utvalg klinisk kjemiske analytter, men prinsippene for studien kan utvides til andre analytter som tilbys fra laboratorier med tilsvarende analysesystemer.

Ultrasentrifugering er en bedre metode enn LipoClear ved fjerning av lipoproteiner ved lipemisk interferens i serum. Behandling med LipoClear bør ikke benyttes til å fjerne lipemisk interferens i serum ved analysering av natrium, glukose, kreatinin, albumin og fosfat.

Ultrasentrifugering av lipemisk serum bør ikke benyttes ved analysering av albumin.

SAA bør utrede om det er mulig å anskaffe ultrasentrifuge for klarering av sterkt lipemiske prøver, herunder om det også er andre avdelinger eller seksjoner som kan ha nytte av den. Dersom det ikke er mulig å anskaffe ultrasentrifuge bør SAA endre prosedyre for behandling av sterkt lipemisk serum til en alternativ metode ved analysering av natrium, glukose, kreatinin. Albumin og fosfat blir pr. d.d. ikke behandlet med LipoClear ved SAA og bør heller ikke det i fremtiden.

Referanser

1. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochemia medica: Biochemia medica*. 2014;24(1):57-67.
2. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. *Clinical chemistry*. 1989;35(5):837-9.
3. Goswami B, Singh B, Chawla R, Mallika V. Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2010;48(1):63-6.
4. Lim K-H, Lian W-B, Yeo C-L. Does visual turbidity correlate with serum triglyceride levels in babies on total parenteral nutrition? *Annals-Academy of Medicine Singapore*. 2006;35(11):790.
5. Glueck CJ, Khan NA, Umar M, Uppal MS, Ahmed W, Morrison JA, et al. Insulin Resistance and Triglycerides. *Journal of Investigative Medicine*. 2009;57(8):874-81.
6. Kannel WB, Vasan RS, Keyes MJ, Sullivan LM, Robins SJ. Usefulness of the triglyceride–high-density lipoprotein versus the cholesterol–high-density lipoprotein ratio for predicting insulin resistance and cardiometabolic risk (from the Framingham offspring cohort). *The American journal of cardiology*. 2008;101(4):497-501.
7. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states: relationship to atherogenesis. *Diabetes care*. 1991;14(9):839-55.
8. Havel RJ, Rapaport E. Management of primary hyperlipidemia. *New England Journal of Medicine*. 1995;332(22):1491-8.
9. Mahley RW, Innerarity TL, Rall Jr SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of lipid research*. 1984;25(12):1277-94.
10. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical chemistry : principles, techniques, and correlations*. 7th ed. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
11. van Leeuwen EM, Emri E, Merle BM, Colijn JM, Kersten E, Cougnard-Gregoire A, et al. A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research*. 2018;67:56-86.
12. Bornhorst JA, Roberts RF, Roberts WL. Assay-specific differences in lipemic interference in native and intralipid-supplemented samples. *Clinical chemistry*. 2004;50(11):2197-201.
13. Kroll MH. *Evaluating interference caused by lipemia*. Oxford University Press; 2004.
14. Smith M, Chan Y, Dolci A, Kellogg M, McCudden C, McLean M. Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis, approved guideline. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.

15. Serum Index [Internforelesning] Roche Diagnostics, 2017.
16. SI2 (serum Index) Versjon 6. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
17. Simundic A-M, Nikolac N, Ivankovic V, Ferenec-Ruzic D, Magdic B, Kvaternik M. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2009;47(11):1361-5.
18. Vermeer HJ, Thomassen E, de Jonge N. Automated processing of serum indices used for interference detection by the laboratory information system. *Clinical chemistry*. 2005;51(1):244-7.
19. Dimeski G, Badrick T, St John A. Ion selective electrodes (ISEs) and interferences—a review. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(5-6):309-17.
20. Albrink MJ, Hald PM, Man EB, Peters JP. The displacement of serum water by the lipids of hyperlipemic serum. A new method for the rapid determination of serum water. *The Journal of clinical investigation*. 1955;34(10):1483-8.
21. El Hage L, Reineks E, Nasr C. Pseudohyponatremia in the Setting of Hypercholesterolemia. *AACE clinical case reports*. 2019;5(2):e172-e4.
22. Aw T, Kiechle F. Pseudohyponatremia. *The American journal of emergency medicine*. 1985;3(3):236-9.
23. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clinical chemistry*. 1994;40(11):1996-2005.
24. Lippi G, Ippolito L, Favalaro EJ. Technical evaluation of the novel preanalytical module on instrumentation laboratory ACL TOP: advancing automation in hemostasis testing. *Journal of laboratory automation*. 2013;18(5):382-90.
25. Simundic A-M. Statistical analysis in method comparison studies - Part one [18.05.2016 Hentet: 25.04.21] Tilgjengelig fra: <https://acutecaretesting.org/en/articles/statistical-analysis-in-method-comparison-studies-part-one>
26. Nikolac N, Simundic AM, Miksa M, Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Caruso B, et al. Heterogeneity of manufacturers' declarations for lipemia interference—an urgent call for standardization. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;426:33-40.
27. Uldall, A, Loikkanen, M, Olafsdottir, E et.al. Nordic Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine. Nordic Interference Study, March 2000 - Effects of Intralipid on some common serum analysis. 2000.
28. Calmarza P, Cordero J. Lipemia interferences in routine clinical biochemical tests. *Biochimica medica*. 2011;21(2):160-6.
29. Anderson N, Slim S, Gama R, Holland M. Lipaemia: an overrated interference? *British journal of biomedical science*. 2003;60(3):141-3.

30. ISE indirect NA-K-Cl for Gen.2, Versjon 12. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
31. Higgins C. Spurious sodium results (1) Pseudohyponatremia. [01.03.2015 Hentet: 15.02.21] Tilgjengelig fra: <https://acutecaretesting.org/en/articles/spurious-sodium-results-1-pseudohyponatremia>
32. LipoClear [Pakningsvedlegg]. Beckman Coulter. [03.2018]
33. Laue TM. Analytical ultracentrifugation. Current Protocols in Protein Science. 1996;4(1):7.5. 1-7.5. 9.
34. Beckman Coulter. Clarification of Lipemic Serum and Removal of Fatty Particles Using Beckman Coulter Airfuge Ultracentrifuge News Medical [16.05.2020. Hentet: 06.05.21] Tilgjengelig fra: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20160926/Clarification-of-Lipemic-Serum-and-Removal-of-Fatty-Particles-Using-Beckman-Coulter-Airfuge-Ultracentrifuge.aspx>
35. Dimeski G, Jones BW. Effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. Biochemia medica: Biochemia medica. 2011;21(1):86-92.
36. Castro-Castro MJ, Candas-Estebanez B, Esteban-Salan M, Calmarza P, Arrobas-Velilla T, Romero-Roman C, et al. Removing Lipemia in Serum/Plasma Samples: A Multicenter Study. Annals of laboratory medicine. 2018;38(6):518-23.
37. Soleimani N, Mohammadzadeh S, Asadian F. Lipemia Interferences in Biochemical Tests, Investigating the Efficacy of Different Removal Methods in comparison with Ultracentrifugation as the Gold Standard. Journal of analytical methods in chemistry. 2020;2020.
38. Saracevic A, Nikolac N, Simundic A-M. The evaluation and comparison of consecutive high speed centrifugation and LipoClear® reagent for lipemia removal. Clinical biochemistry. 2014;47(4-5):309-14.
39. Vermeer HJ, Steen G, Naus AJ, Goevaerts B, Schoenmakers CH. Correction of patient results for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids: a practical approach. Clinical Chemical Laboratory Medicine. 2007;45(1):114-9.
40. PHOS2 (Fosfat) Versjon 11. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
41. ALB2 (Albumin) Versjon 6. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
42. CREP2 (Kreatinin) Versjon 12. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
43. CA2 (Kalsium) Versjon 6. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
44. BILT3 (Bilirubin) Versjon 10. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
45. GLUC3 (Glukose) Versjon 16. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics
46. ALTPM (ALAT) Versjon 9. [Pakningsvedlegg] Roche Diagnostics

47. Elektronisk Kvalitetshåndbok for Haukeland Universitetssykehus.
48. Lydersen S, Skovlund E. Er dataene normalfordelt? Tidsskrift for Den norske legeforening. 2020. [17.08.2020. Hentet: 08.05.21] Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2020/08/medisin-og-tall/er-dataene-normalfordelt>
49. Ricós C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario J, Hernandez A, Jimenez C, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 1999;59(7):491-500.
50. European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; EFML Biological Variation Database [Hentet 21.02.21] Tilgjengelig fra: <https://biologicalvariation.eu/>.
51. Desirable Biological Variation Database Specifications [Oppdatert: 2014; Hentet 20.01.2021] Available from: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
52. Kenny D, Fraser C, Petersen PH, Kallner A. Consensus agreement. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 1999;59(7):585-.
53. Horvath AR, Bossuyt PM, Sandberg S, St John A, Monaghan PJ, Verhagen-Kamerbeek WD, et al. Setting analytical performance specifications based on outcome studies—is it possible? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2015;53(6):841-8.
54. Roberts CM, Cotten SW. Cyclodextrin removal of lipemic interference: An attractive alternative to ultracentrifugation for satellite laboratories. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2013;137(8):1027-8.

Vedlegg 1: Prosedyre for tilsats av Intralipid ved interferensforsøk

1. Lag serumpool

Samle en pool (ca. 20 mL*) av pasientserum uten synlig hemolyse, ikterus eller lipemi, med ønsket nivå av analytt som skal testes. Bland godt.

* 20 mL tilsvarer at serumpoolen skal deles i 5, med ulik grad av lipemi tilsvarende en L-index på henholdsvis 0, 100, 300, 500 og 750. Hver serumpool skal LipoClear-behandles 3 ganger (5 pooler x 3 LipoClear á 500 µL serum = 7500 µL), og deretter ultrasentrifugeres x3 paralleller (5 pooler x 3 Ultrasentrifugeringer á 500 µL serum = 7500 µL). Hver serumpool skal også ha en nullprøve (5 pooler x 0-prøve á 500 µL serum = 1500 µL). Til sammen tilsvarer dette ca. 16,5 mL serum, men det bør lages noe mer i tilfelle.

2. Lag fortynningsrekke vha Intralipid-løsning

Intralipid-løsningen fortynnes til 4 ulike konsentrasjoner med destillert vann. Lag fortynningene til 10x nivå sterkere konsentrasjon enn sluttkonsentrasjoner i serumpoolene.

3. Fortynn serum med ulik grad av lipemi

Serumpool fortynnes 9:10 med lipidfortynninger fra pkt. 2 (900 µL serum + 100 µL lipidblanding). 0-prøven tilsettes 100 µL destillert vann. Alle serumpoolene er da like mye fortynnet og vil gi samme svar dersom lipemi ikke påvirker analysen.

Fortynningsrekke med L-index ≈ 100, 300, 500 og 750, med utgangspunkt i Intralipid-løsning med konsentrasjon ca. 200 mg/L:

L-Index	Intralipid	dH ₂ O
100	150 µL	2000 µL
300	440 µL	2000 µL
500	860 µL	2000 µL
750	1600 µL	2000 µL

Vedlegg 2: Prosedyre for LipoClear-behandling av lipemiske serumprøver

LipoClear-reagenset skal oppbevares i kjøleskap. Før bruk skal reagenset kontrolleres for at det er fargeløst og klart. Dersom reagenset er misfarget eller blakket er det ubrukelig, og skal ikke benyttes.

1. Reagenset er levert ferdig opp-pipettert med 100 μ L i hvert rør. Ta reagenset ut av kjøleskapet og spin det ned på bordsentrifuge (StatSpin Express 4) ved (4000xg) i 3 min.
2. La reagenset stå i 2 min til for å oppnå romtemperatur.
3. Tilsett 500 μ L serum og kork røret.
4. Bland godt på vortexmikser og la røret stå i 5 minutter.
5. Sentrifuger i 5 min på bordsentrifuge (modell) ved 4000xg.
6. Pipetter av supernatanten og analyser denne. Lipidene legger seg enten på bunnen av røret eller som et lokk på overflaten av væsken. Pass på at det ikke okkmer med lipider i supernatanten som blir analysert. Supernatanten analyseres innen 1 time etter tillaging.
7. Analyseresultatet må multipliseres med 1,2 for å korrigere for fortynningen med LipoClear-reagenset.

Dersom det er mindre enn 500 μ L prøvemateriale tilgjengelig, bruk 250 μ L prøvemateriale. Resultatet må da multipliseres med 1,4.

Analysene kolesterol, triglyserider, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, protein, CRP, haptoglobin, transferrin, transferrinreseptor og fosfat kan ikke analyseres i LipoClear-behandlet serum.

(Kilde: pakningsvedlegg, Elektronisk kvalitetshåndbok)

Vedlegg 3: Prosedyre for ultrasentrifugering av lipemiske prøver

- 1) Minimum 500 µL prøvemateriale overføres til ultrasentrifuge rør (Thickwall Polyallomere, 3,5mL, 13x51mm, art.nr: 349623, Beckman Coulter)
- 2) Oppstart av ultrasentrifuge
 - a. Trykk på power on (bryter under skjerm)
 - b. Vac.-lyset vil tennes når ultrasentrifugen blir slått på(NB! Døren må være lukket), vent til lyset slukker.
Ultrasentrifugen har nå vakuuim og kan benyttes.
 - c. Still inn temperaturen til 20°C.
(Trykk enter → time/temp → sett riktig temperatur → enter)
 - d. Still inn hastighet – 30 000 rpm (tilsvare ca. 100 000xg)
(Trykk enter → sett hastighet → enter)
NB! Hastigheten til ultrasentrifugen blir lagt inn i RPM. Tabell for omregning fra xg til RPM for gjeldende rotor står i brukermanual.
 - e. Still inn tid – 20 min (dette da ultrasentrifugen bruker 5 min til akselerering og 2-3 min bremsing: en får da 12-13 min effektiv sentrifugering på optimal hastighet)
(Trykk enter → sett tid → enter)
 - f. Kontroller at ultrasentrifugen er stilt inn på Accel: 1 og Decel: 1 – dette for raskest mulig akselerasjon og bremsing
- 3) Benytt MLS-50 rotor, som har plass til 4 prøver av gangen, i ultrasentrifugen. NB! Rotoren må **balanseres** slik at det er ultrasentrifugerør med ca. 500µL væske i alle rotorarmer (altså må det benyttes ultrasentrifugerør med vann i tomme posisjoner i rotoren). Rotoren står på kjølerom ved siden av sentrifugerommet, og må **tempereres** før bruk.
- 4) Trykk på door-knapp for å åpne døren til ultrasentrifugen. Døren skyves til siden.
- 5) Sett rotoren ned i ultrasentrifugen på "pinnen". *NB! "Foten" som rotoren står i til vanlig, skal ikke settes ned i ultrasentrifugen.*
- 6) Lukk døren og vent til ultrasentrifugen gjenvinner vakuuim (når vakuumlampen slukker).
- 7) Trykk enter og deretter start for å starte ultrasentrifugen.

Hastigheten på ultrasentrifugen går raskt opp til 5000 rpm, deretter saktere opp til innstilt hastighet. Ultrasentrifugen bør kontrolleres med jevne mellomrom for å se til at den når riktig hastighet og temperatur, samt at den ikke mister vakuuim.

Vedlegg 4: Resultater

Rådata, del 1:

Analyse/res.	Prøve 1			Prøve 2			Prøve 3			Prøve 4			Prøve 5		
	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.
Na	131	134	130	129	131	129	128	129	127	122	124	121	131	133	131
K	5,06	5,12	5,03	4,70	4,75	4,70	3,17	3,17	3,13	4,37	4,40	4,36	4,93	4,99	4,93
Cl	98	97	97	90	92	91	82	84	81	87	86	87	91	93	91
ALAT	28	29	30	31	25	33	10	10	9	15	13	14	22	17	24
Gluk	3,5	3,6	3,5	7,7	7,9	7,6	7,4	7,6	7,4	6,3	6,4	6,3	5,3	5,4	5,3
Bil	1	1	1	2	2	2	10	10	10	13	13	13	8	8	8
Ca	2,36	2,35	2,35	2,02	1,97	1,98	2,17	2,14	2,17	2,29	2,27	2,27	2,50	2,51	2,51
Kreat	81	83	79	246	254	251	75	77	74	90	92	88	61	64	61
Alb	43	44	42	36	35	36	33	34	34	39	40	39	48	50	49
P	0,78	0,92	0,79	1,60	1,76	1,61	1,00	1,15	1,02	1,31	1,44	1,31	1,13	1,30	1,15
L-index	18,00	4,80	11,00	11,00	8,40	7,00	11	3,6	4	14	7,2	6	23,00	7,20	9,00

Analyse/res.	Prøve 6			Prøve 7			Prøve 8			Prøve 9			Prøve 10		
	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.
Na	141	141	140	140	143	142	139	142	138	142	142	142	139	147	138
K	4,49	4,48	4,45	3,98	4,04	4,02	4,21	4,27	4,18	4,08	4,07	4,07	4,01	4,22	4,00
Cl	101	101	100	102	101	101	100	98	99	102	103	102	98	101	98
ALAT	12	13	11	12	10	11	13	14	13	23	22	23	47	50	50
Gluk	5,6	5,8	5,6	5,9	6,0	6,0	7,5	7,6	7,5	5,7	5,8	5,7	6,0	6,4	6,1
Bil	3	3	3	5	5	4	6	6	6	6	6	6	7	8	8
Ca	2,37	2,34	2,36	2,30	2,28	2,28	2,35	2,35	2,38	2,46	2,46	2,47	2,45	2,53	2,47
Kreat	70	71	69	61	62	62	118	122	118	56	56	55	62	67	61
Alb	43	43	44	43	43	43	40	41	41	42	43	43	46	49	46
P	1,33	1,46	1,33	0,92	1,06	0,93	1,12	1,25	1,13	0,87	1,02	0,88	1,02	1,19	1,02
L-index	7,00	2,40	7,00	12,00	3,60	7,00	10,00	8,40	8,00	9,00	4,80	3,00	13,00	4,80	10,00

Analyse/res.	Prøve 11			Prøve 12			Prøve 13			Prøve 14			Prøve 15		
	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.	Før behandling	LipoClear	Ultras.
Na	147	149	145	146	149	145	144	149	144	146	146	145	145	149	145
K	4,78	4,80	4,74	3,88	3,96	3,85	4,94	5,05	4,93	4,42	4,42	4,39	4,41	4,48	4,41
Cl	106	104	105	104	108	104	106	106	105	103	104	103	110	110	110
ALAT	35	37	32	27	29	28	12	11	13	75	74	77	18	18	18
Gluk	4,9	5,0	4,9	6,4	6,7	6,4	5,0	5,2	5,0	8,3	8,5	8,3	6,1	6,2	6,1
Bil	4	3	3	12	12	12	5	5	5	6	6	6	3	3	3
Ca	2,11	2,53	2,52	2,35	2,42	2,37	2,34	2,38	2,35	2,58	2,59	2,62	2,56	2,56	2,57
Kreat	93	96	94	99	106	102	132	136	132	93	96	94	116	122	116
Alb	47	50	47	44	45	44	44	44	43	41	42	42	46	48	46
P	1,04	1,18	1,04	0,82	0,96	0,81	1,38	1,51	1,37	0,89	1,03	0,89	0,75	0,88	0,76
L-index	9,00	3,60	4,00	4,00	0,00	4,00	7,00	3,60	1,00	11,00	2,40	2,00	14,00	2,40	3,00

Rådata, del 2:

0-prøve med tilsatt destillert vann i samme fortynningsforhold som øvrige deler av serumpool tilsatt standardkurve med Intralipid:

Analyse/res.	0-prøve 1	0-prøve 2
Na	126	126
K	3,73	3,71
Cl	91	90
ALAT	149	147
Gluk	5,1	5,2
Bil	29	29
Ca	2,14	2,15
Kreat	67	68
Alb	39	39
P	0,98	0,99
TG	1,63	1,62
L-index	11	10

Serumpool L-index ≈100								
Analyse/res.	0 prøve 1	0-prøve 2	LipoClear 1	LipoClear 2	LipoClear 3	Ultras. 1	Ultras. 2	Ultras. 3
Na	124	124	127	126	127	125	124	125
K	3,64	3,64	3,73	3,72	3,732	3,70	3,65	3,70
Cl	90	90	92	91	92	90	90	90
ALAT	145	143	151	146	149	159	158	160
Gluk	5,1	5,1	5,3	5,3	5,3	5,1	5,1	5,1
Bil	28	28	29	28	29	29	29	29
Ca	2,12	2,13	2,14	2,14	2,23	2,14	2,14	2,19
Kreat	69	68	71	71	71	69	68	69
Alb	39	37	40	40	40	40	41	41
P	0,98	0,99	1,12	1,12	1,14	0,99	0,98	0,99
TG	4,80	4,75	2,34	2,41	2,32	2,79	2,83	3,00
L-index	130	132	1,20	2,40	3,60	3,00	7,00	17

Serumpool L-index ≈300								
Analyse/res.	0 prøve 1	0-prøve 2	LipoClear 1	LipoClear 2	LipoClear 3	Ultras. 1	Ultras. 2	Ultras. 3
Na	125	125	128	127	125	127	125	126
K	3,68	3,71	3,79	3,73	3,72	3,76	3,69	3,74
Cl	90	90	92	91	90	90	91	90
ALAT	143		154	148	150	157	158	155
Gluk	5,1	5,1	5,3	5,3	5,3	5,3	5,1	5,1
Bil	28	28	28	29	29	29	29	29
Ca	2,14	2,13	2,12	2,14	2,12	2,16	2,14	2,16
Kreat	68	69	72	71	72	68	68	68
Alb	36	36	39	39	40	39	39	39
P	0,97	0,94	1,12	1,12	1,13	1,00	1,00	0,99
TG	10,67		5,45	5,45	5,76	5,71	5,61	5,79
L-index	333	333	19,20	14,40	34,80	10,00	7,00	13,00

Serumpool L-index ≈500								
Analyse/res.	0-prøve 1	0-prøve 2	LipoClear 1	LipoClear 2	LipoClear 3	Ultras. 1	Ultras. 2	Ultras. 3
Na	124	125	127	128	127	126	127	125
K	3,69	3,71	3,77	3,792	3,78	3,72	3,78	3,71
Cl	91	91	91	93	92	91	91	91
ALAT	148		150	154	151	160	155	158
Gluk	5,1	5,2	5,3	5,4	5,3	5,2	5,1	5,2
Bil	28	28	29	29	29	29	29	29
Ca	2,11	2,12	2,14	2,20	2,18	2,15	2,19	2,19
Kreat	68	70	70	72	71	68	70	69
Alb	34	35	40	40	40	39	39	39
P	0,95	0,93	1,14	1,14	1,13	0,98	0,99	0,99
TG	16,05		8,51	8,51	8,46	8,39	8,66	8,46
L-index	542	550	8,40	8,40	14,40	6,00	12,00	6,00

Serumpool L-index ≈750								
Analyse/res.	O-prøve 1	O-prøve 2	LipoClear 1	LipoClear 2	LipoClear 3	Ultras. 1	Ultras. 2	Ultras. 3
Na	124	125	127	127	126	127	126	126
K	3,71	3,69	3,77	3,79	3,73	3,81	3,77	3,73
Cl	91	90	92	92	91	91	91	91
ALAT	Ikke mulig å analysere		151	156	149	158	158	160
Gluk	5,1	5,1	5,3	5,3	5,3	5,2	5,2	5,2
Bil	28	27	27	28	28	28	29	29
Ca	2,11	2,11	2,17	2,16	2,16	2,16	2,18	2,18
Kreat	68	69	72	71	72	69	69	69
Alb	32	32	40	40	39	39	40	40
P	0,95	0,93	1,12	1,13	1,14	1,00	1,00	0,99
TG	21,40		11,22	11,14	11,18	12,90	11,97	11,76
L-index	759	757	12,00	12,00	4,80	40,00	39,00	17,00

Rådata del 3

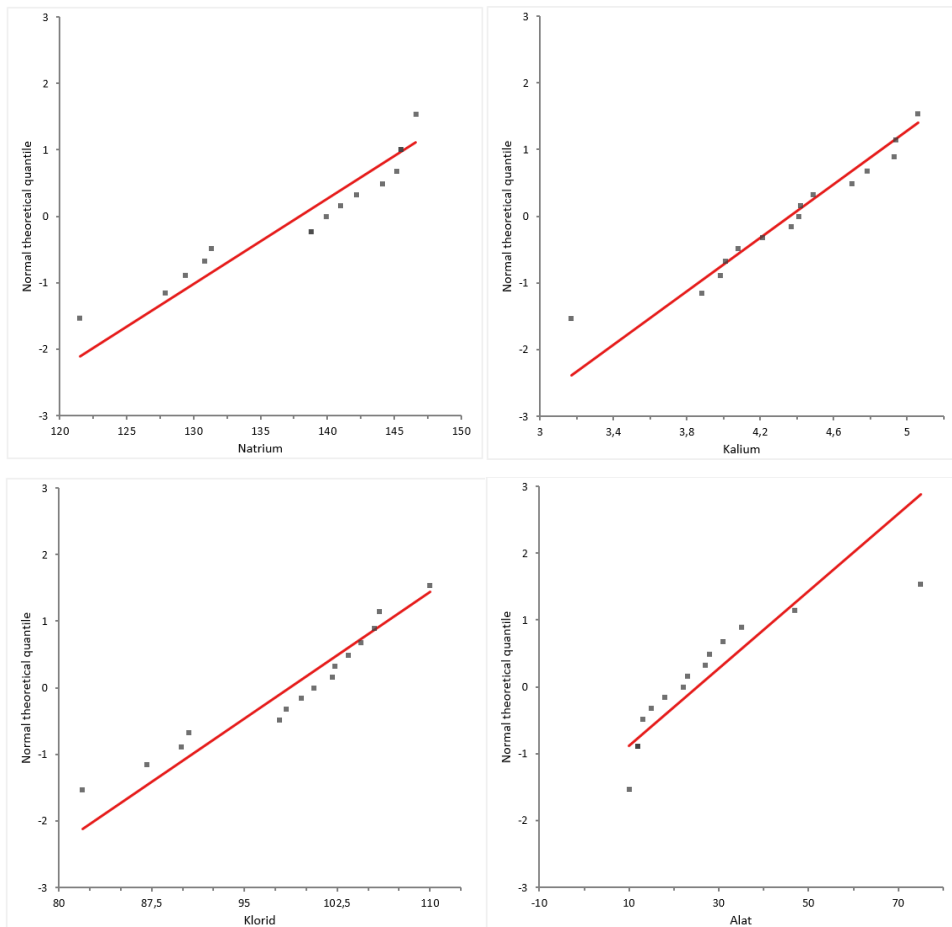
	Pasient 1			Pasient 2			Pasient 3			Pasient 4			Pasient 5		
Analyse/res.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.
Na	139	141	138	142	147	143	142	143	141	141	141	140	136	143	141
K	3,39	3,44	3,38	4,18	4,30	4,23	4,1	4,14	4,08	4,17	4,21	4,16	4,53	4,68	4,64
Cl	95	95	95	103	106	104	105	105	104	105	105	104	95	99	98
ALAT	11	14	13	49	43	44	30	34	34	29	30	26	48	58	62
Gluk	5,1	5,3	5,2	6,4	6,8	6,5	7,4	7,7	7,4	6,6	6,8	6,6	14,7	15,5	15,1
Bil	2	2	2	5	5	5	4	4	4	4	5	5	6	6	6
Ca	2,18	2,23	2,21	2,33	2,26	2,25	2,43	2,42	2,44	2,38	2,40	2,38	2,4	2,42	2,48
Kreat	147	152	148	91	95	92	61	62	61	106	112	106	55	59	56
Alb	34	36	36	47	50	48	45	47	46	46	49	47	47	50	50
P	0,65	0,80	0,68	1,33	1,46	1,31	1,20	1,32	1,19	1,14	1,30	1,14	1,39	1,56	1,43
TG	4,99	2,05	2,31	13,31	1,34	5,32	3,24	0,77	1,20	5,72	0,97	2,66	27,24	2,06	7,36
L-index	101	1	2	101	7	27	108	7	9	113	8	11	127	2	12

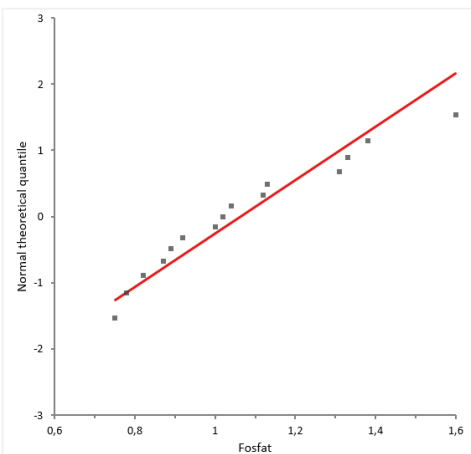
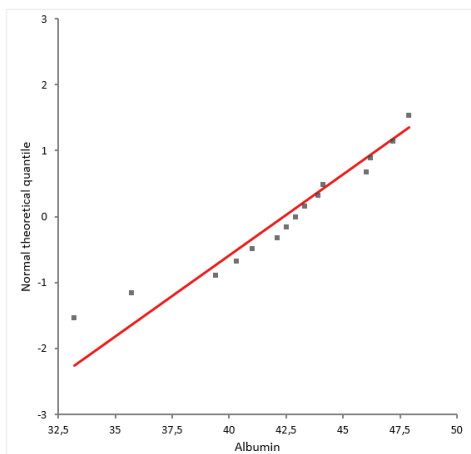
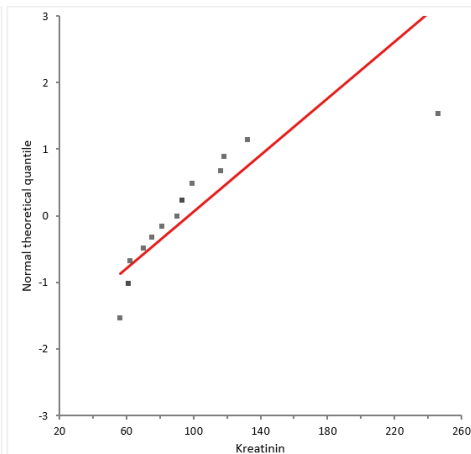
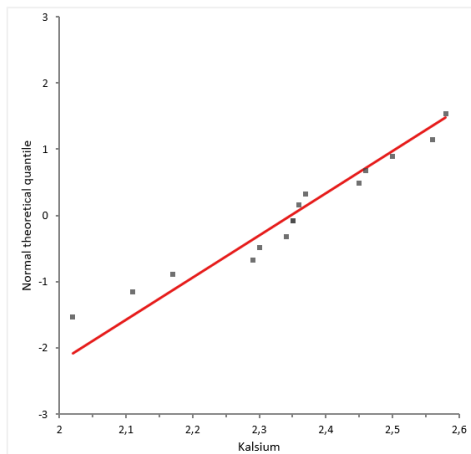
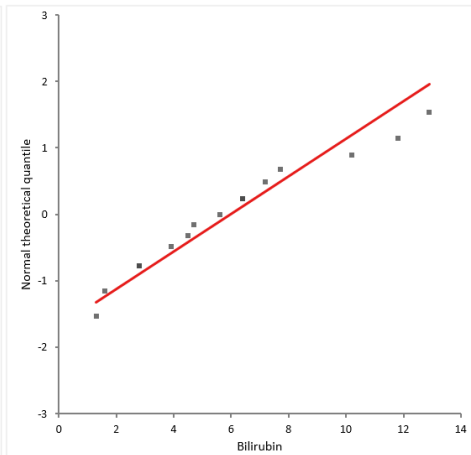
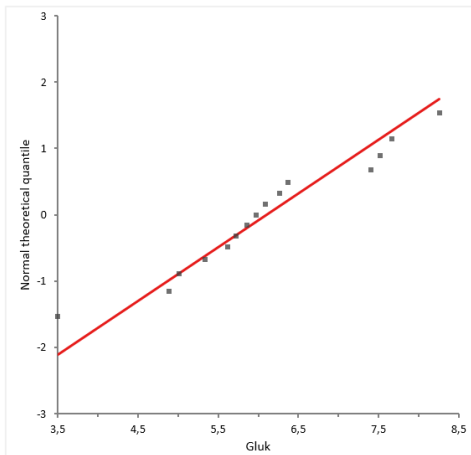
Analyse/res.	Pasient 6			Pasient 7			Pasient 8			Pasient 9			Pasient 10		
	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.
Na	135	139	134	140	143	141	143	155	142	137	140	138	141	142	141
K	4,94	5,08	4,90	4,48	4,55	4,52	4,67	5,08	4,65	4,19	4,27	4,20	4,66	4,75	4,71
Cl	95	99	96	104	105	105	104	114	104	97	99	98	103	102	103
ALAT	58	61	67	22	32	33	57	35	32	21	26	26	Ikke mulig å ana.	25	34
Gluk	12,9	13,5	13,1	6,0	6,3	6,2	5,3	5,8	5,4	7,4	7,8	7,5	6,6	6,8	6,6
Bil	4	4	4	7	8	8	5	6	6	3	4	4	3	3	3
Ca	1,07	0,97	1,08	2,35	2,35	2,45	2,31	2,53	2,37	2,35	2,42	2,40	2,41	2,37	2,43
Kreat	113	119	114	148	154	150	87	97	88	76	80	76	90	92	91
Alb	44	48	46	44	46	46	46	51	48	48	51	50	45	45	46
P	1,16	1,31	1,14	0,8	0,97	0,83	0,98	1,16	1,00	0,99	1,16	0,99	0,79	0,91	0,82
TG	13,46	8,52	6,41	13,08	2,74	3,61	6,36	3,97	1,93	11,10	1,46	2,63	4,80	0,69	2,55
L-index	128	20	14	132	7	13	151	17	12	166	10	10	183	6	34

Analyse/res.	Pasient 11			Pasient 12			Pasient 13			Pasient 14			Pasient 15		
	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.
Na	139	142	140	141	143	142	140	141	140	132	141	138	140	145	139
K	3,81	3,89	3,82	4,42	4,48	4,43	4,39	4,38	4,35	3,84	5,35	4,05	4,66	4,79	4,66
Cl	104	106	105	102	103	102	101	102	101	96	103	99	103	104	101
ALAT	31	43	45	120	143	147	Ikke mulig å ana.	22	19	12	24	24	11	15	17
Gluk	5,9	6,3	6,1	6,2	6,3	6,1	5,8	6,0	5,8	10,4	11,2	10,9	5,0	5,3	5,0
Bil	6	6	7	5	5	5	5	4	4	9	10	10	2	2	2
Ca	2,28	2,33	2,32	2,35	2,35	2,37	2,48	2,53	2,54	2,34	2,42	2,47	2,53	2,49	2,57
Kreat	71	73	72	84	88	85	122	126	121	58	65	61	21	21	22
Alb	47	50	49	46	48	47	44	46	45	45	48	50	41	44	45
P	1,46	1,66	1,50	1,13	1,31	1,17	1,15	1,30	1,15	0,88	1,06	0,90	1,84	2,18	1,85
TG	19,04	1,63	5,90	14,29	1,57	4,16	5,32	1,22	1,95	38,49	3,17	4,94	7,5	0,90	2,60
L-index	190	8	28	197	4	16	202	10	7	228	4	10	283	3	44

	Pasient 16			Pasient 17			Pasient 18			Pasient 19			Pasient 20		
Analyse/res.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.	0-prøve	LipoClear	Ultras.
Na	140	144	142	134	138	136	140	145	144	130	139	135	129	139	140
K	4,45	4,49	4,51	4,76	4,92	4,89	4,23	4,36	4,33	4,36	4,64	4,56	3,53	3,80	3,86
Cl	100	101	101	96	99	98	106	110	109	92	100	97	94	101	104
ALAT	43	28	41	109	80	87	70	49	50	47	25	27	Ikke mulig å ana.	22	21
Gluk	6,2	6,5	6,4	20,0	20,7	20,5	6,4	6,7	6,6	9,7	10,6	10,2	7,4	9,2	9,1
Bil	4	4	4	3	3	3	3	4	4	8	10	9	2	6	5
Ca	2,40	2,37	2,45	1,00	0,83	0,82	2,37	2,40	2,46	2,50	2,58	2,59	2,38	2,03	2,15
Kreat	101	105	100	107	112	110	90	97	93	47	64	60	62	55	57
Alb	46	49	49	40	42	43	46	50	49	45	50	49	42	49	48
P	1,12	1,43	1,15	1,15	1,26	1,12	0,74	0,92	0,79	1,26	1,51	1,36	0,65	1,28	1,14
TG	16,04	1,37	3,50	29,09	15,65	6,74	26,45	1,51	3,96	55,43	1,58	15,13	89,62	6,62	11,58
L-index	351	3	12	508	79	3	587	1	52	621	2	21	1831	49	30

QQ-plot av resultat fra del 1:





Resultat av paret t-test med signifikansnivå $p < 0,05$

Analytt	Metode	P-verdi
Na	LipoClear	0,00025
	Ultrasentrifugering	0,043
K	LipoClear	0,0031
	Ultrasentrifugering	0,012
Cl	LipoClear	0,109
	Ultrasentrifugering	0,010
ALAT	LipoClear	0,436
	Ultrasentrifugering	0,36
Gluk	LipoClear	0,000043
	Ultrasentrifugering	0,5359
Bil	LipoClear	0,4089
	Ultrasentrifugering	0,1916
Ca	LipoClear	0,3104
	Ultrasentrifugering	0,2857
Kreat	LipoClear	0,000048
	Ultrasentrifugering	0,6832
Alb	LipoClear	0,0012
	Ultrasentrifugering	0,1450
P	LipoClear	0,00000
	Ultrasentrifugering	0,04056

Resultat av lineær regresjon med Passing Bablok:

		N	Konstantledd (KI)	Stigningstall (KI)	Bias % (KI)
Na	LipoClear	15	-7,168 (-28,92 – 12,15)	1,074 (0,9242 – 1,232)	1,93 (1,089 – 2,762)
	Ultrasentrifugering	15	-0,600 (-6,715 – 5,906)	1,000 (0,9538 – 1,045)	-0,29 (-0,566 – 0,014)
K	LipoClear	15	0,039 (-0,257 – 0,292)	1,005 (0,9455 – 1,067)	1,22 (0,439 – 2,002)
	Ultrasentrifugering	15	-0,010 (-0,112 – 0,149)	1,000 (0,9610 – 1,023)	-0,38 (0,677 – -0,079)
Cl	LipoClear	15	3,020 (-12,07 – 13,48)	0,9767 (0,8727 – 1,126)	0,75 (-0,165 – 1,673)
	Ultrasentrifugering	15	1,379 (-3,764 – 4,848)	0,9811 (0,9467 – 1,030)	-0,45 (-0,758 – 0,140)
ALAT	LipoClear	15	-1,059 (-4,800 – 0,9000)	1,059 (0,9500 – 1,200)	-3,43 (-9,691 – 2,835)
	Ultrasentrifugering	15	-1,588 (-2,714 – 0)	1,088 (1,000 – 1,143)	0,12 (-3,686 – 3,935)
Gluk	LipoClear	15	-0,073 (-0,3010 – 0,1170)	1,036 (1,004 – 1,070) α	2,69 (1,741 – 3,639)
	Ultrasentrifugering	15	-0,080 (-0,3002 – 0,0035)	1,010 (0,9952 – 1,048)	-0,21 (-0,696 – 0,277)
Bil	LipoClear	15	0,1513 (-0,2400 – 0,3730)	0,9913 (0,9405 – 1,050)	3,07 (-1,738 – 7,873)
	Ultrasentrifugering	15	-0,2000 (-0,5188 – 0,1930)	1,000 (0,9419 – 1,078)	2,89 (-7818 – 2,022)
Ca	LipoClear	14	0,3152 (-0,7362 – -0,2663) γ	1,129 (1,108 – 1,312) α	-0,38 (-1,509 – 0,744)
	Ultrasentrifugering	14	-0,3180 (-0,4790 – -0,0005) γ	1,132 (1,000 – 1,200)	-0,17 (-0,947 – 0,513)
Kreat	LipoClear	15	-1,294 (-4,440 – 0,3429)	1,044 (1,029 – 1,080) α	3,51 (2,382 – 4,630)
	Ultrasentrifugering	15	-2,071 (-4,070 – 0)	1,018 (1,000 – 1,044)	-0,13 (-1,054 – 0,787)
Alb	LipoClear	15	-6,014 (-13,00 – 0,2473)	1,165 (1,018 – 1,336) α	2,28 (1,091 – 3,469)
	Ultrasentrifugering	15	1,565 (-2,948 – 5,057)	0,9703 (0,8919 – 1,074)	0,56 (-0,203 – 1,318)
P	LipoClear	15	0,14 (0,0900 – 0,1674)	1,00 (0,9714 – 1,050)	14,07 (12,357 – 15,775)
	Ultrasentrifugering	15	0,0100 (-0,0153 – 0,0342)	1,00 (0,9722 – 1,017)	0,55 (0,038 – 1,054)

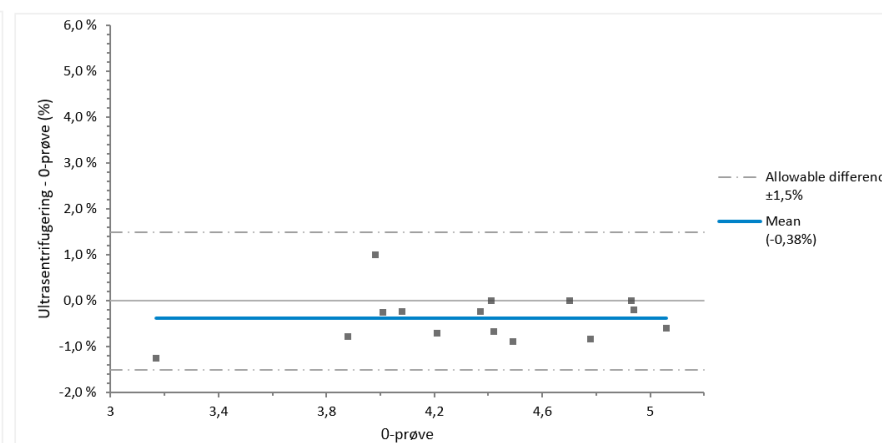
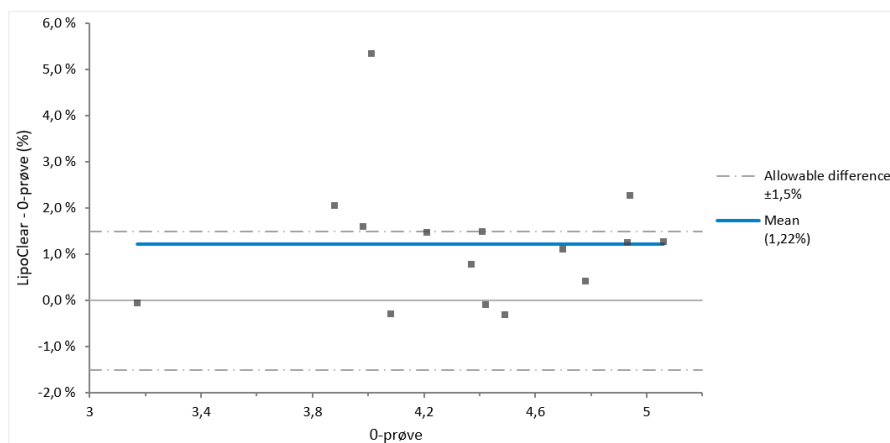
α Konfidensintervallet (KI) for stigningstallet (slope) inneholder ikke 1.

γ Konfidensintervallet (KI) for konstantleddet (intercept) inneholder ikke 0.

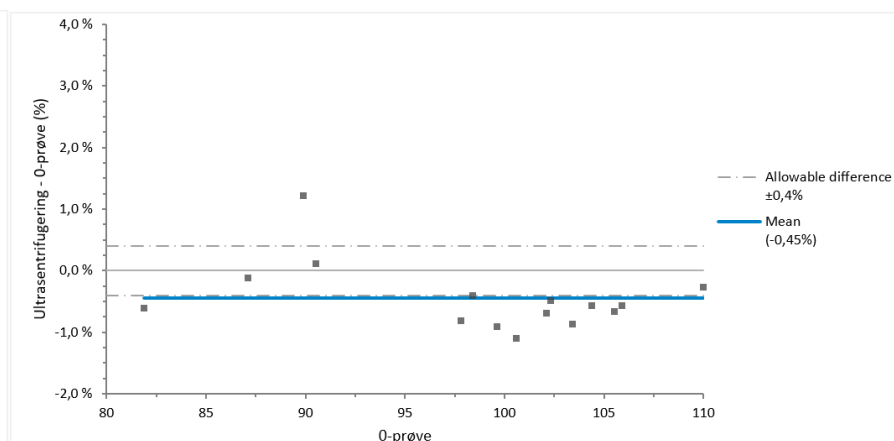
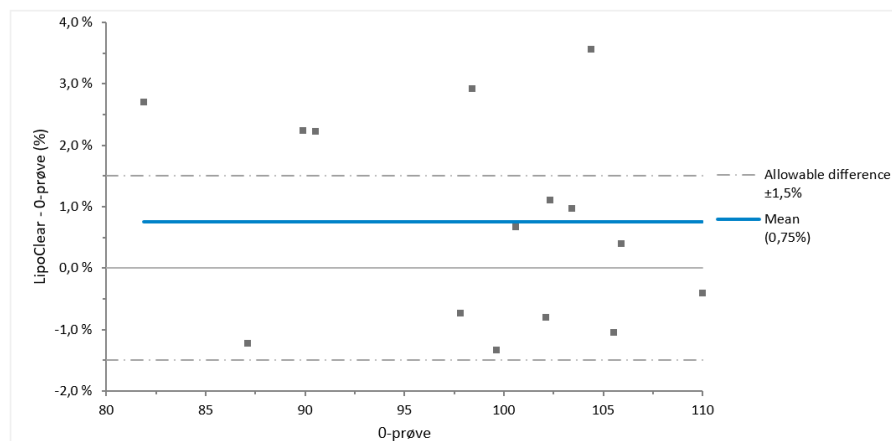
Differanseplott fra del 1:

Merk at Y-aksen er forskjellig for de ulike analyttene.

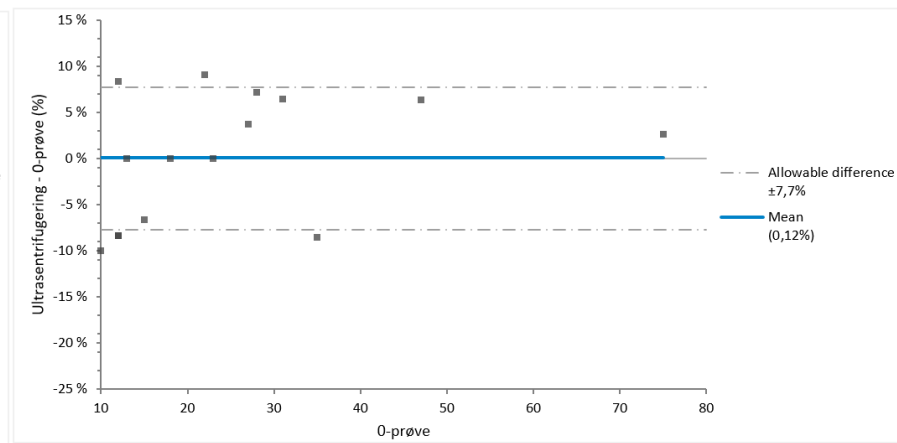
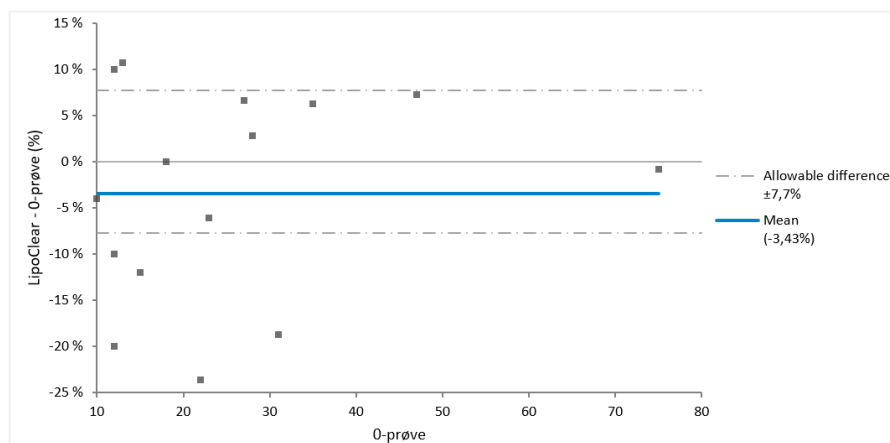
Kalium:



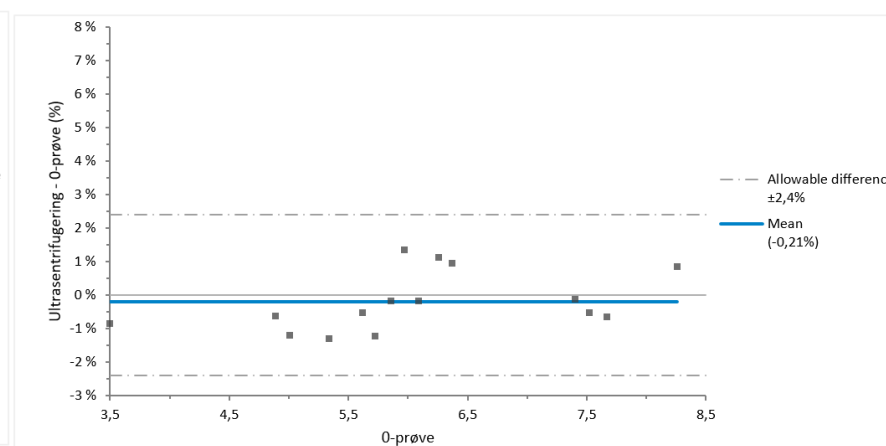
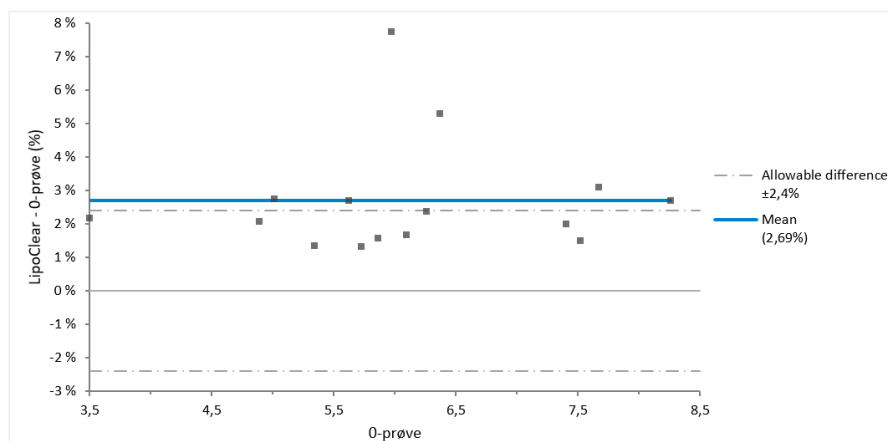
Klorid:



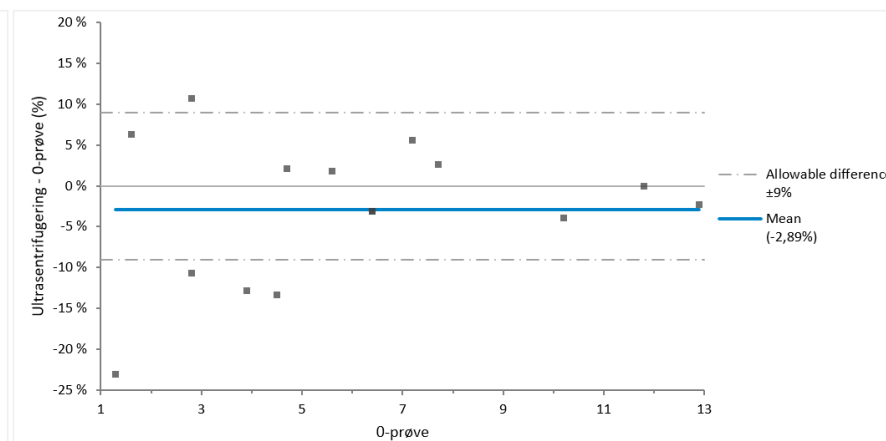
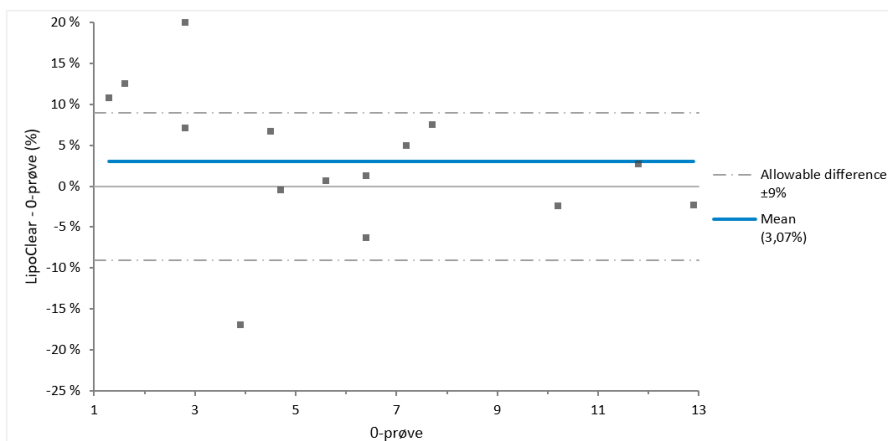
ALAT:



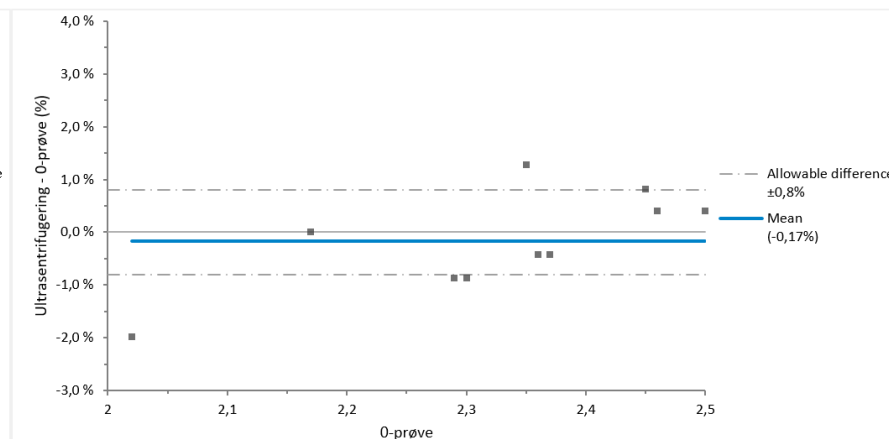
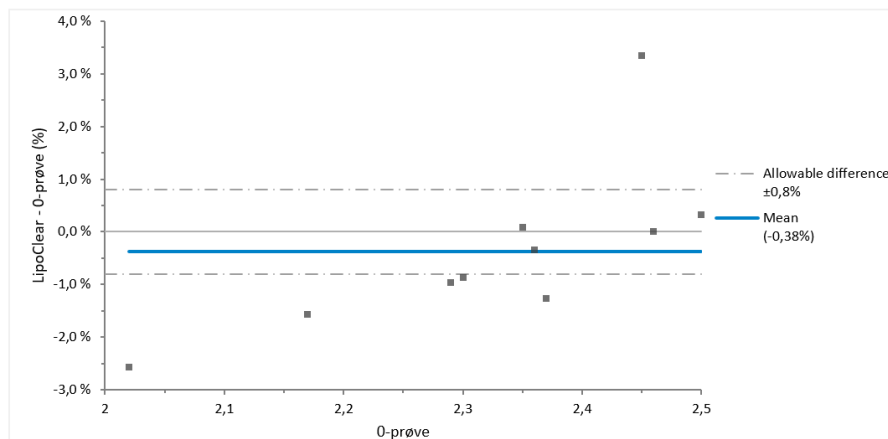
Glukose:



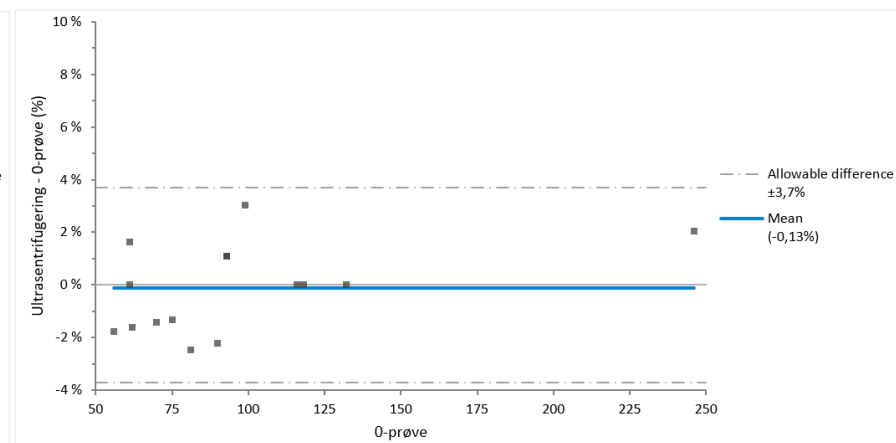
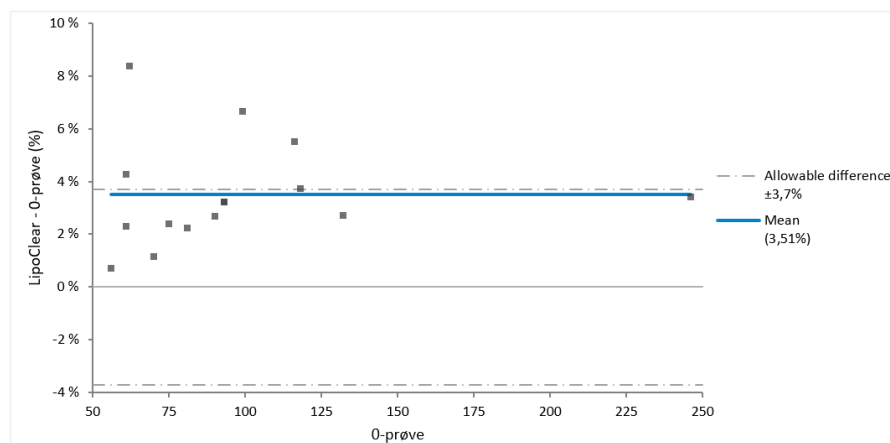
Bilirubin:



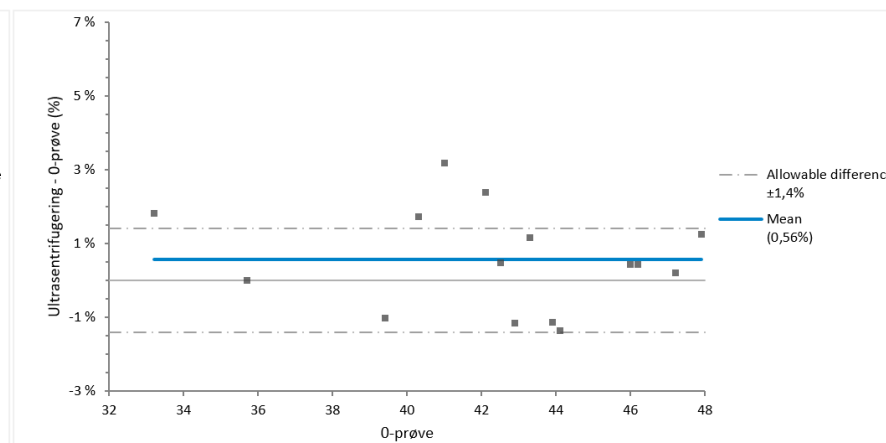
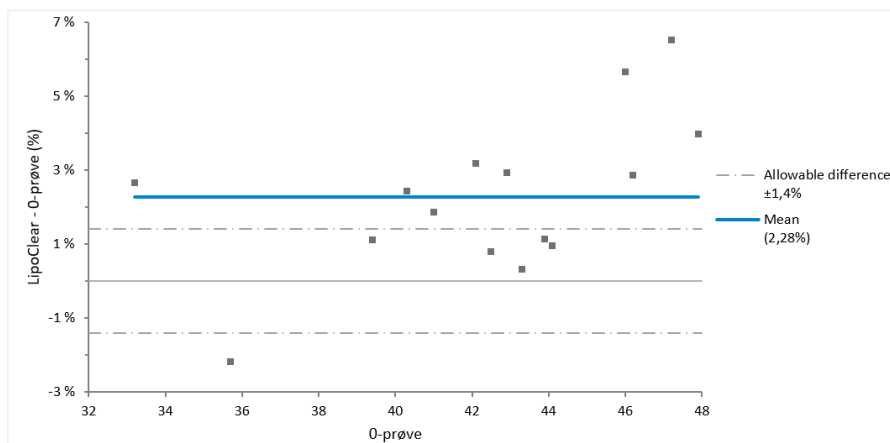
Kalsium:



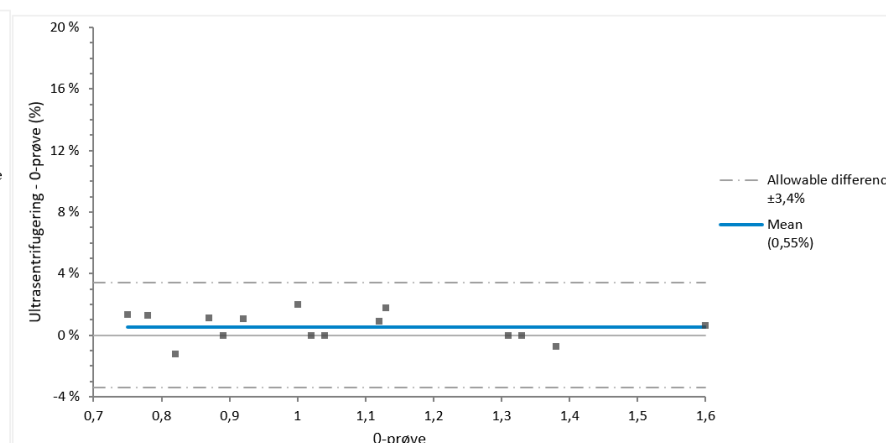
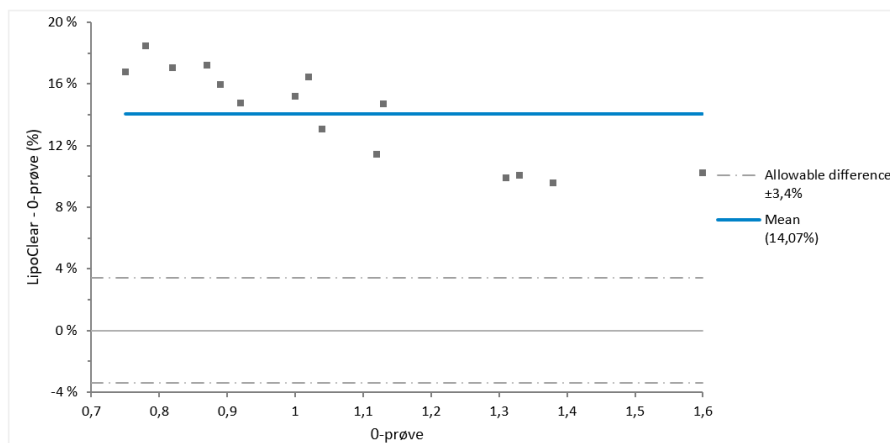
Kreatinin:



Albumin:

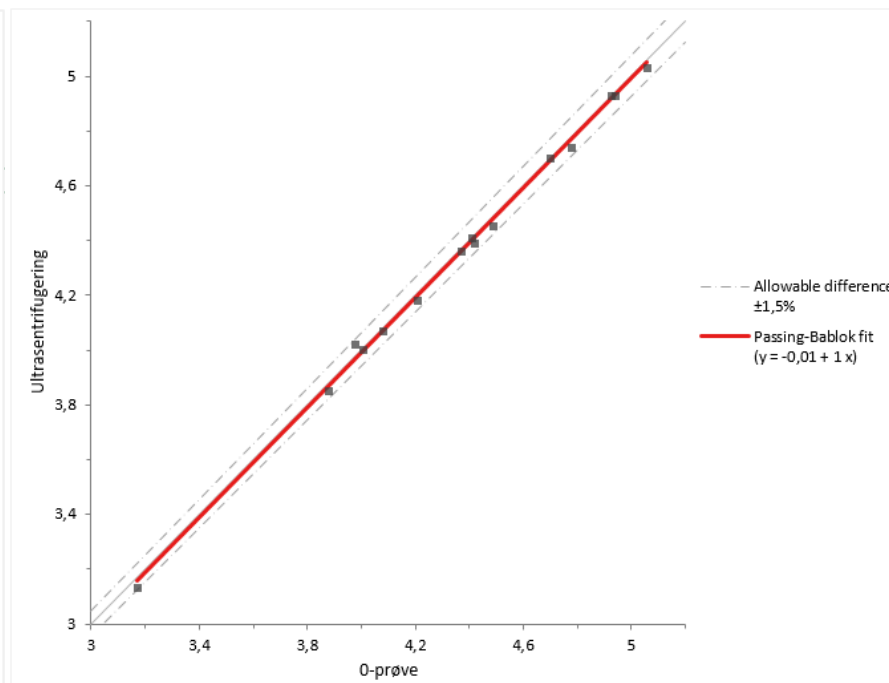
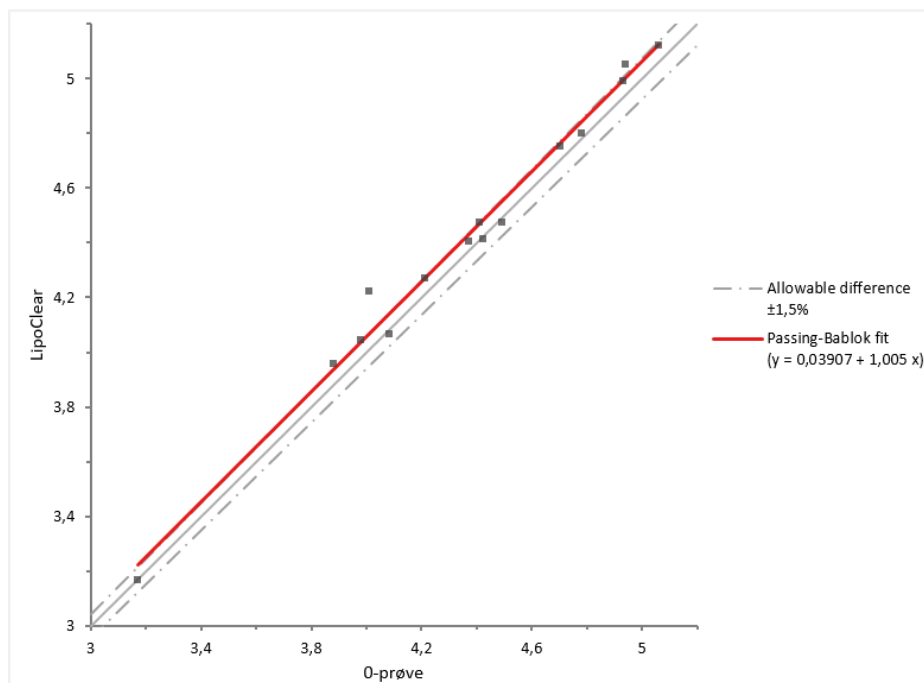


Fosfat:

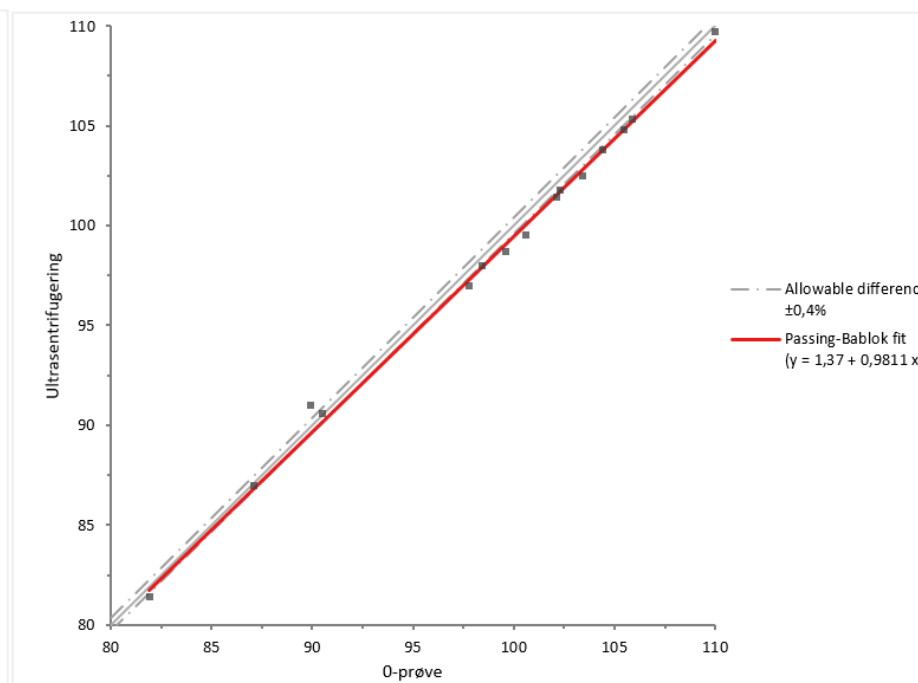
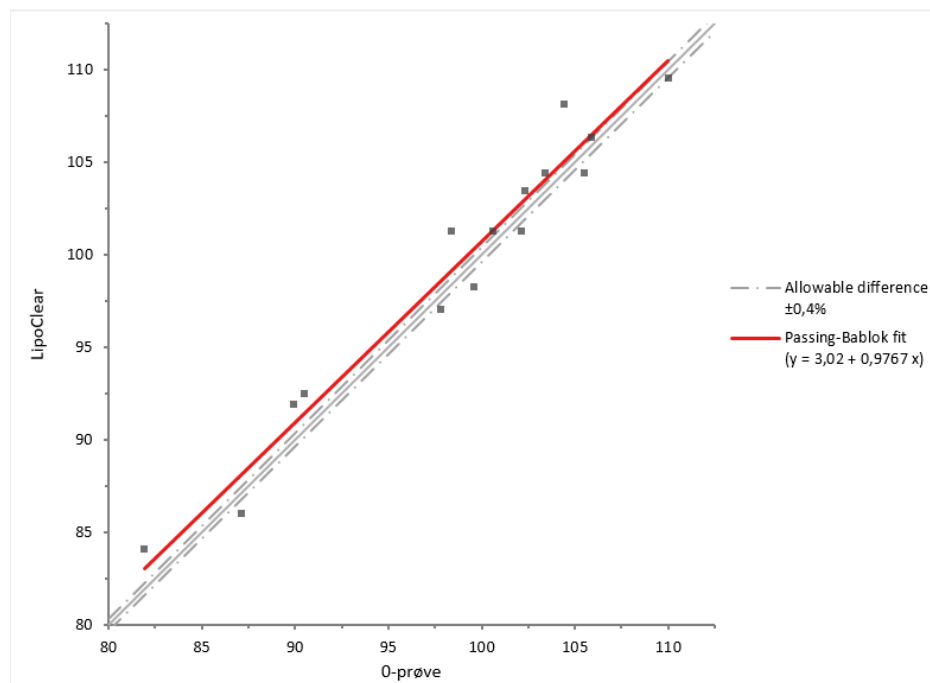


Resultat fra Passing-Bablok regresjon, fra del 1 av studien:

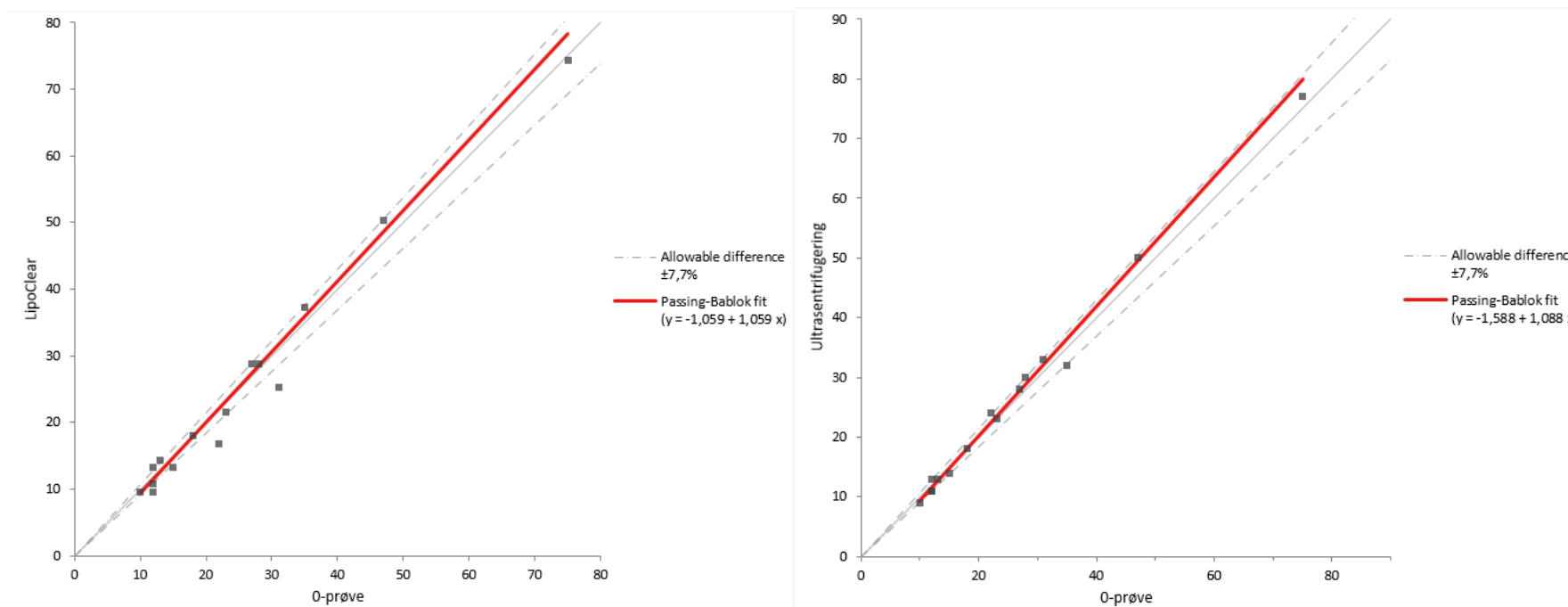
Kalium:



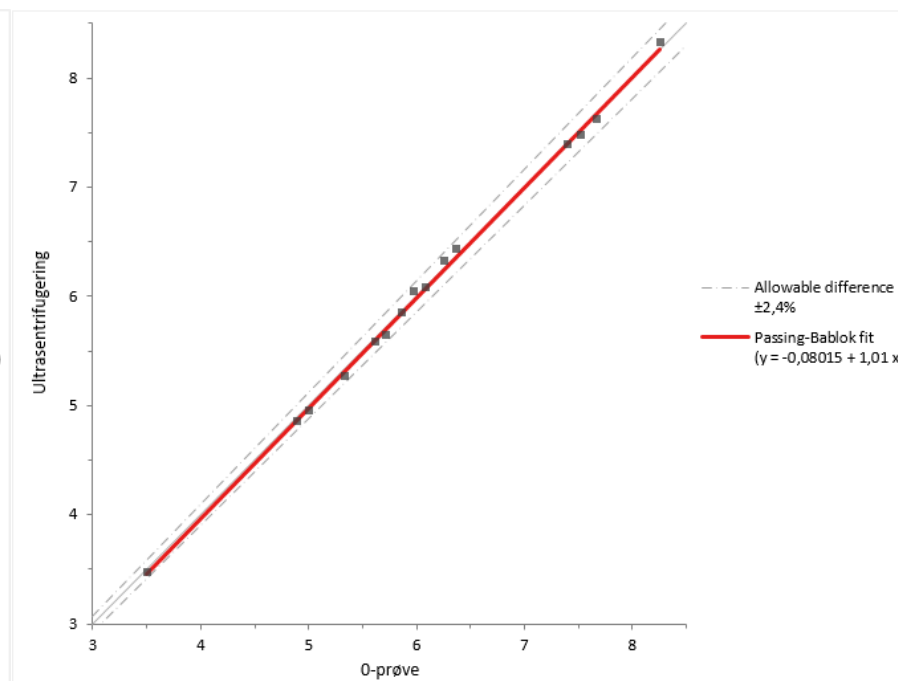
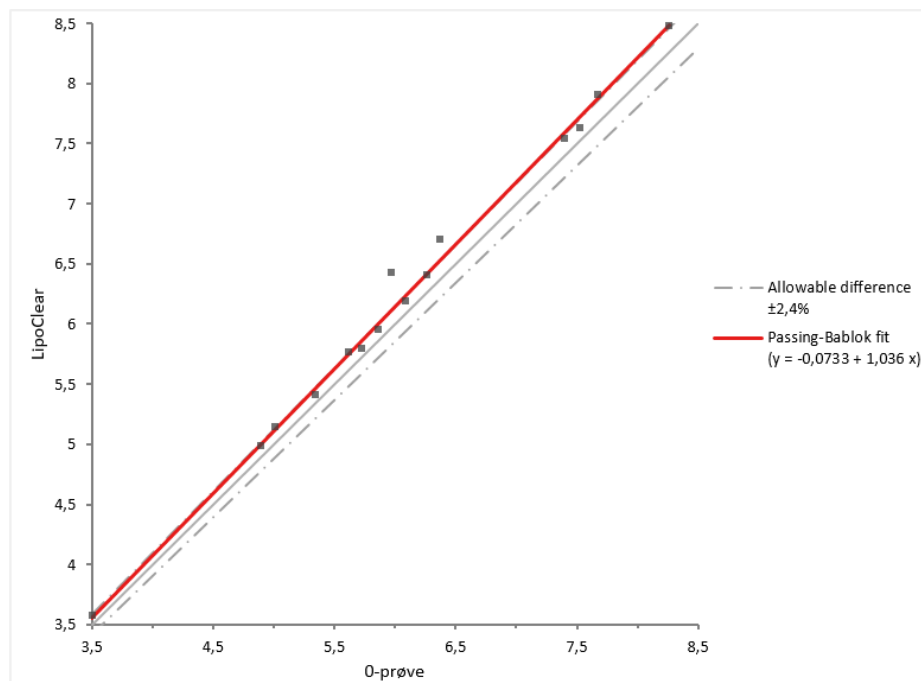
Klorid:



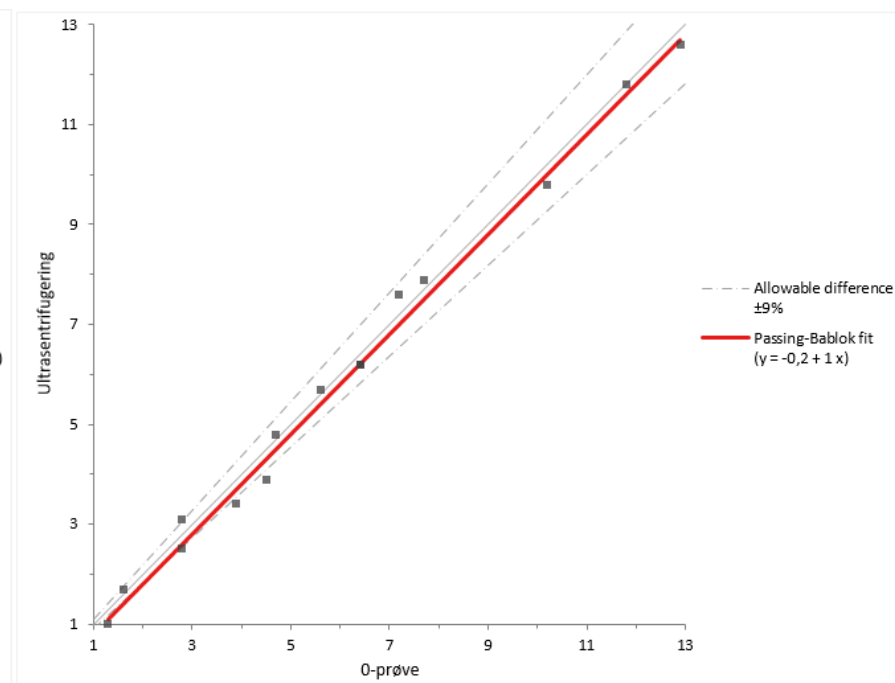
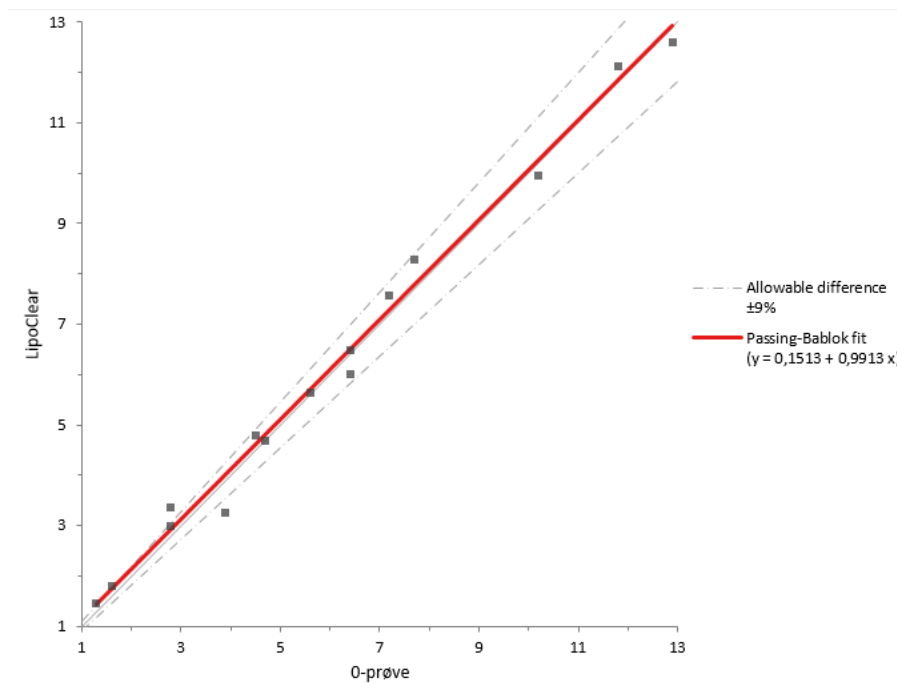
ALAT:



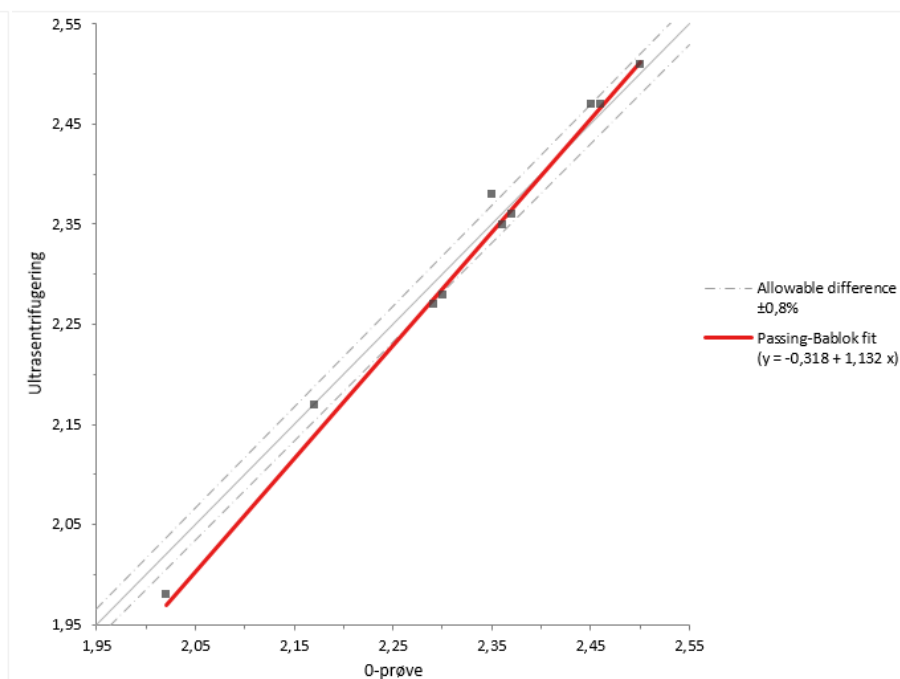
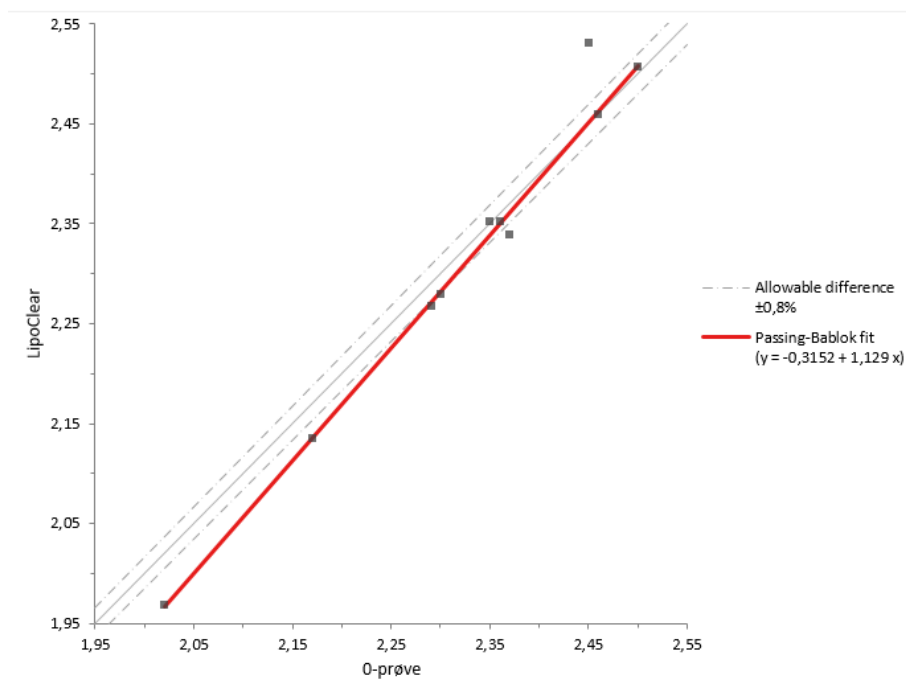
Glukose:



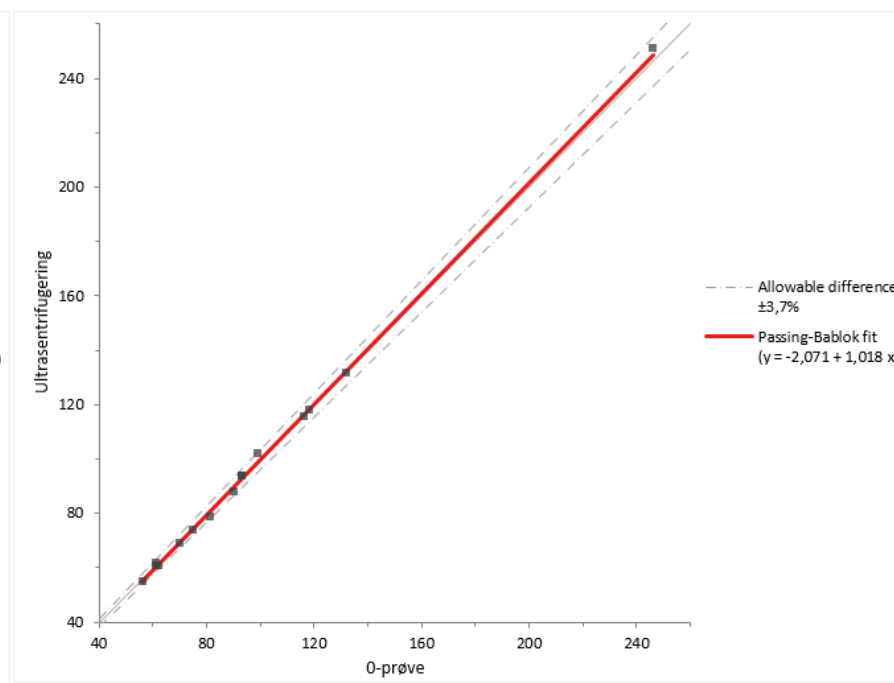
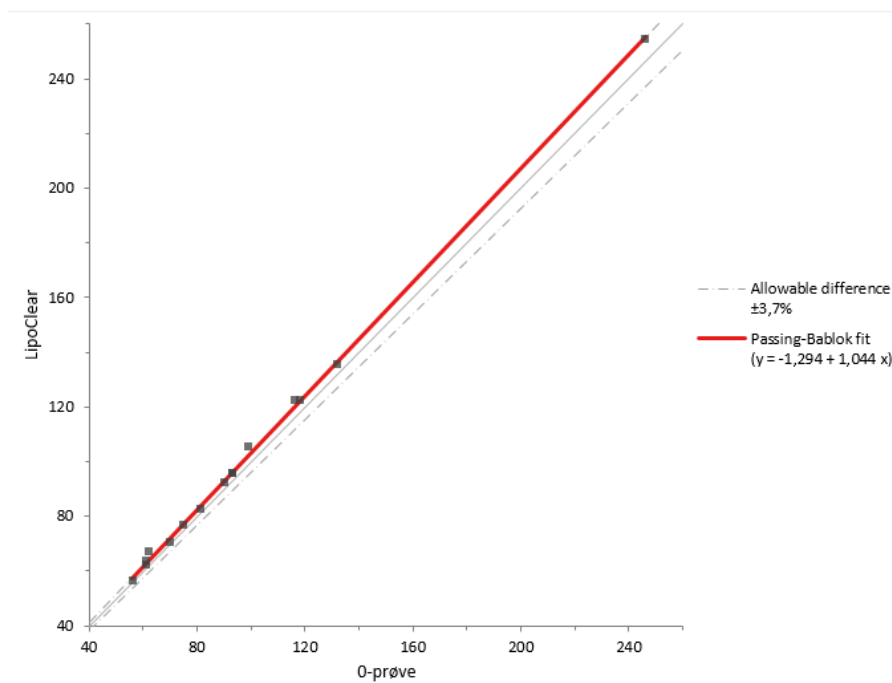
Bilirubin:



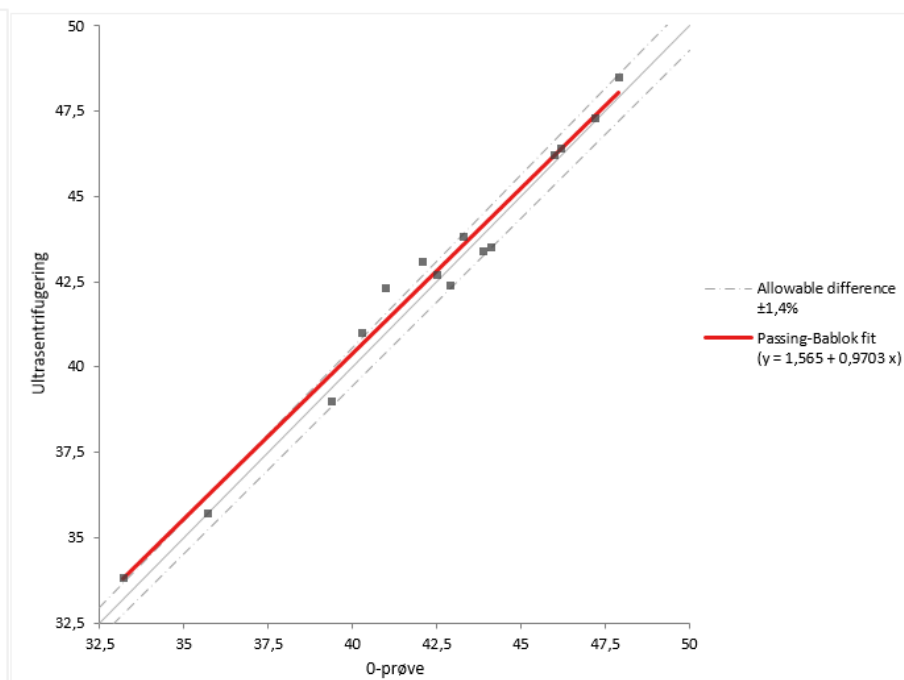
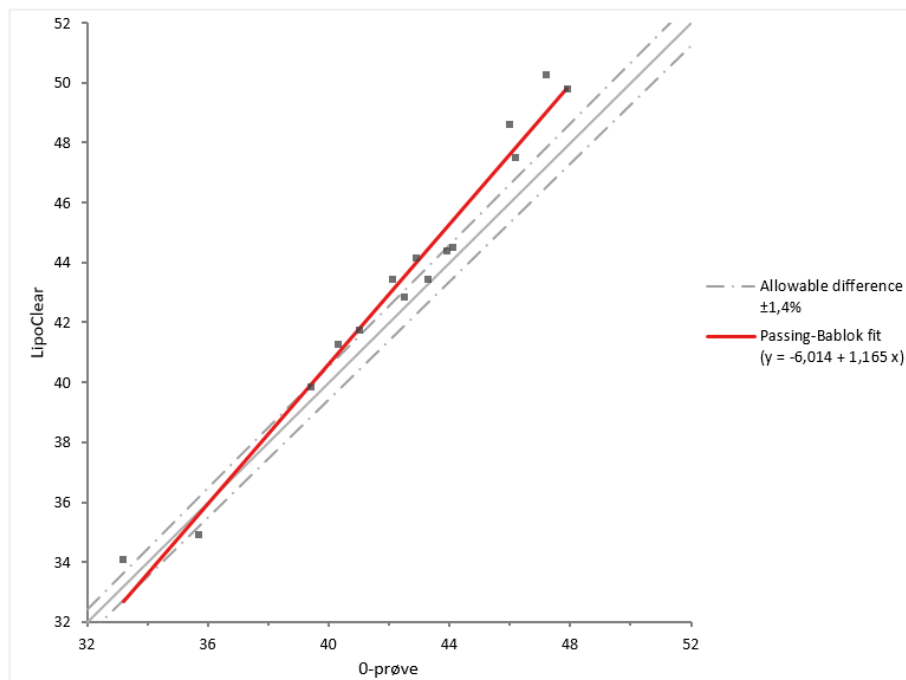
Kalsium:



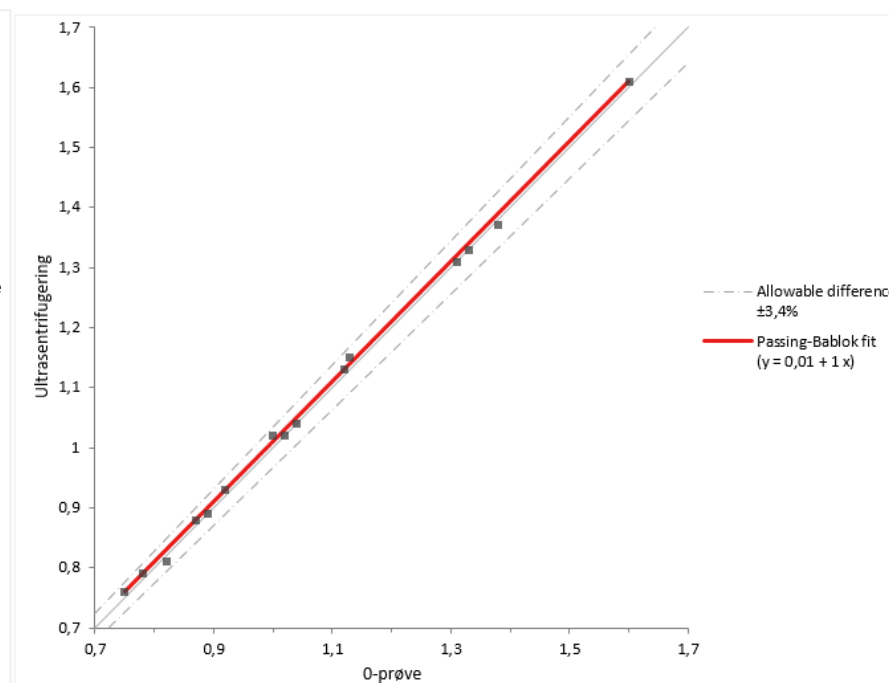
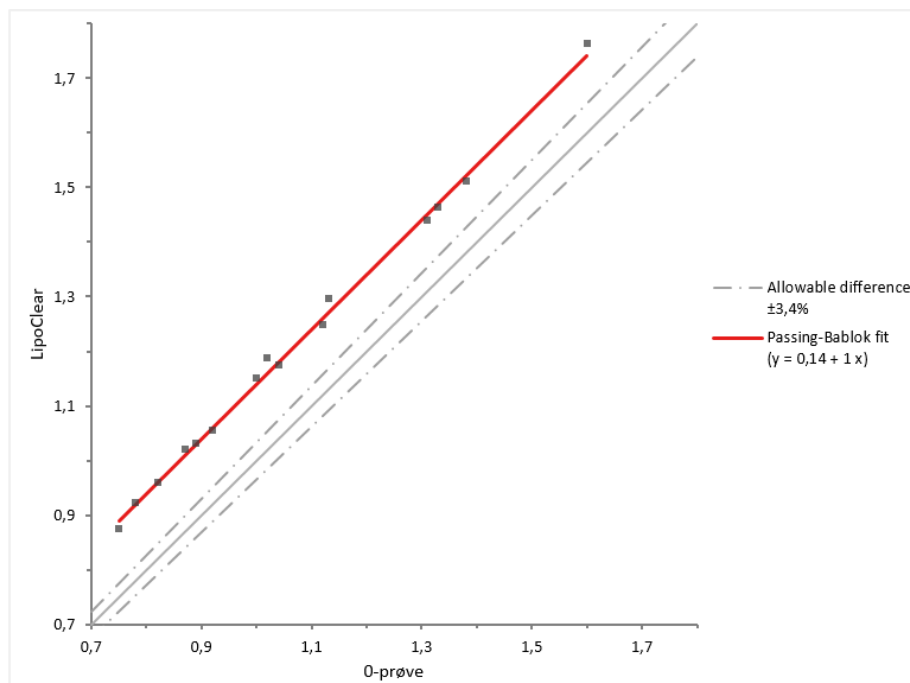
Kreatinin:



Albumin:



Fosfat:



Endring i L-indeks og triglyserid-konsentrasjon i serumpool tilsatt økende mengde Intralipid etter ultrasentrifugering og LipoClear-behandling

		Før behandling	LipoClear		Ultrasentrifugering	
			Gj.snitt	Diff. %	Gj.snitt	Diff. %
L-index < 20	Triglyserid (mmol/L)	1,63	0,62	-61,8	1,31	-19,2
	L-index	11	1	-88,6	5	-55,6
L-index ≈ 100	Triglyserid (mmol/L)	4,78	2,36	-50,7	2,87	-39,8
	L-index	131	2	-98,2	9	-93,1
L-index ≈ 300	Triglyserid (mmol/L)	10,67	5,55	-48	5,7	-46,6
	L-index	333	23	-93,2	10	-97
L-index ≈ 500	Triglyserid (mmol/L)	16,05	8,49	-47,1	8,5	-47
	L-index	546	10	-98,1	8	-98,5
L-index ≈ 750	Triglyserid (mmol/L)	21,4	11,18	-47,8	12,21	-42,9
	L-index	758	10	-98,7	32	-95,8

Endring i L-indeks og triglyserid-konsentrasjon i naturlig lipemiske pasientprøver etter ultrasentrifugering og LipoClear-behandling

		Før behandling	LipoClear		Ultrasentrifugering	
			Resultat	Diff. %	Resultat	Diff. %
Pas. 1	Triglyserid (mmol/L)	13,31	1,34	-89,9	5,32	-60,0
	L-index	101	7	-93,0	27	-73,0
Pas. 2	Triglyserid (mmol/L)	4,99	2,05	-58,9	2,31	-53,7
	L-index	101	1	-99,0	2	-98,0
Pas. 3	Triglyserid (mmol/L)	3,24	0,77	-76,3	1,2	-63,0
	L-index	108	7	-93,0	9	-92,0
Pas. 4	Triglyserid (mmol/L)	5,72	0,97	-83,0	2,66	-53,5
	L-index	113	8	-93,0	11	-90,0
Pas. 5	Triglyserid (mmol/L)	27,24	2,06	-92,4	7,36	-73,0
	L-index	127	2	-98,0	12	-91,0
Pas. 6	Triglyserid (mmol/L)	13,46	8,52	-36,7	6,41	-52,4
	L-index	128	20	-84,0	14	-89,0
Pas. 7	Triglyserid (mmol/L)	13,08	2,74	-79,1	3,61	-72,4
	L-index	132	7	-95,0	13	-90,0
Pas. 8	Triglyserid (mmol/L)	6,36	3,97	-37,6	1,93	-69,7
	L-index	151	17	-89,0	12	-92,0
Pas. 9	Triglyserid (mmol/L)	11,1	1,46	-86,8	2,63	-76,3
	L-index	166	10	-94,0	10	-94,0
Pas. 10	Triglyserid (mmol/L)	4,8	0,69	-85,7	2,55	-46,9
	L-index	183	6	-97,0	34	-81,0
Pas. 11	Triglyserid (mmol/L)	19,04	1,63	-91,4	5,9	-69,0
	L-index	190	8	-96,0	28	-85,0
Pas. 12	Triglyserid (mmol/L)	14,29	1,57	-89,0	4,16	-70,9
	L-index	197	4	-98,0	16	-92,0
Pas. 13	Triglyserid (mmol/L)	5,32	1,22	-77,0	1,95	-63,4
	L-index	202	10	-95,0	7	-97,0
Pas. 14	Triglyserid (mmol/L)	38,49	3,17	-91,8	4,94	-87,2
	L-index	228	4	-98,0	10	-96,0
Pas. 15	Triglyserid (mmol/L)	7,5	0,9	-88,1	2,6	-65,3
	L-index	283	3	-99,0	44	-84,0

Pas. 16	Triglyserid (mmol/L)	16,04	1,37	-91,5	3,5	-78,2
	L-index	351	3	-99,0	12	-97,0
Pas. 17	Triglyserid (mmol/L)	29,09	15,65	-46,2	6,74	-76,8
	L-index	508	79	-84,0	3	-99,0
Pas. 18	Triglyserid (mmol/L)	26,45	1,51	-94,3	3,96	-85,0
	L-index	587	1	-100,0	52	-91,0
Pas. 19	Triglyserid (mmol/L)	55,43	1,58	-97,1	15,13	-72,7
	L-index	621	2	-100,0	21	-97,0
Pas. 20	Triglyserid (mmol/L)	89,62	6,62	-92,6	11,58	-87,1
	L-index	1831	49	-97,0	30	-98,0