



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö

Fakulteten för hälso- och livsvetenskap

Examensarbete

Erythrocytinnehåll i plasmakomponenter

*En jämförelse mellan teststickan Multistix,
hematologinstrumentet Advia 2120 och manuell
räkning i mikroskop med Bürkers räknekammare*



Författare: Josefin Björk

Ämne: Biomedicinsk laborietvetenskap

Nivå: Grundnivå

Erythrocytinhåll i plasmakomponenter - en jämförelse mellan teststicken Multistix, hematologiinstrumentet Advia 2120 och manuell räkning i mikroskop med Bürkers räknecammare.

Josefin Björk

Examensarbete i Biomedicinsk laborietvetenskap 15 högskolepoäng

Filosofie Kandidatexamen

Handledare:

Nicholas Holthuis, överläkare

Transfusionsmedicin
Landstinget Blekinge
Blekingesjukhuset Karlskrona
371 85 Karlskrona.

Magnus Ståhle, universitetslektor

Institutionen för kemi och biomedicin
Linnéuniversitetet
391 82 Kalmar

Examinator:

Ulrika Johansson, universitetslektor

Institutionen för kemi och biomedicin
Linnéuniversitetet
391 82 Kalmar

Examensarbetet ingår i Biomedicinska analytikerprogrammet 180 högskolepoäng

SAMMANFATTNING

Efter tappning av 450 mL helblod från frivilliga blodgivare separeras blodet till plasma, erythrocyter och trombocyter. Kontroller tas för att undersöka komponentframställningens resultat. I plasmaenheterna kontrolleras bland annat att antalet erythrocyter är under 6×10^9 per liter. Helblod innehåller normalt $4-6 \times 10^{12}$ erythrocyter per liter. Massiv blödning är den främsta indikationen för plasmatransfusion. En transfusion är förknippad med risker såsom transfusion related acute lung injury (TRALI) och transfusion associated circulatory overload (TACO). Syftet med examensarbetet var att hitta en beslutsgräns för bestämning av erythrocytinnehållet i plasmakomponenter som framställs vid beredning av blodkomponenter inför transfusion. Gränsen skulle fastställas genom en jämförelse mellan teststickan Multistix 8 SG, Body fluid-programmet i hematologiinstrumentet Advia 2120 samt manuell räkning i Bürkers räknekammare. Analys skedde av 38 prover varav 18 prover fick tillsats av extra erythrocyter för att antingen överstiga kontrollgränsen eller finna övergången till stickans högsta nivå. Medelvärde och medianen för de kvantitativa resultaten från Bürkers räknekammare för 20 godkända kontrollerna, fördelade efter teststickans kategorier, beräknades. Samtliga resultaten låg mellan $0,063 \times 10^9/L$ och $2,08 \times 10^9/L$. Av de 38 prover som analyserades erhöles 37 ett resultat i form $<10 \times 10^9/L$ på Advia 2120. Utifrån de erhållna resultaten fastslogs gränsen vid vilken en komponentkontroll garanteras ett godkänt resultat till $\leq 2+$ på teststickan. Vid resultat $3+$ ska en konfirmerande kvantitativ analys utföras. Den slutsats som kunde dras var att teststickan Multistix 8 SG kan användas som en screeningmetod vid analys av erythrocytinnehållet i de tillverkade plasmakomponenterna. Slutsatsen blev även att det Adviaprogram som användes inte är lämpligt för analys av erythrocytinnehållet i plasma.

Nyckelord

Komponentberedning, plasmakomponent, produktkontroller, erythrocytinnehåll, Bürkers räknekammare, Multistix, Advia 2120.

ABSTRACT

Following blood donation of 450 mL of whole blood from volunteer donors, the blood is separated into plasma, erythrocytes and thrombocytes. Controls are performed to investigate the separation performance. E.g. the plasma units are not allowed to contain more than 6×10^9 erythrocytes per liter. Whole blood does normally contain $4\text{-}6 \times 10^{12}$ erythrocytes per liter. The primary indication for plasma transfusion is massive bleeding, a treatment mainly associated with risks such as transfusion related acute lung injury (TRALI) and transfusion associated circulatory overload (TACO). The aim of the thesis work was to find a decision limit for the determination of the erythrocyte content in plasma components produced prior to transfusion. The limit was to be determined by a comparison between the Multistix 8 SG test stick, Body fluid program in the Advia 2120 hematology instrument and manual count in the Bürker counting chamber. Analysis were performed on 38 samples, of which 18 samples were prepared by addition of extra erythrocytes to either exceed the control limit or find the transition point to the highest result level of the stick. The average and median of the quantitative results from the Bürker counting chamber for the 20 approved controls, broken down by the categories on the stick, were calculated. All results were between $0.063 \times 10^9/\text{L}$ and $2.08 \times 10^9/\text{L}$. Of the 38 samples analyzed, 37 received a result $< 10 \times 10^9/\text{L}$ on the Advia 2120. Based on these results, the decision limit at which a component control is guaranteed an approved result was determined to $\leq 2+$ on the test stick. In the case of a 3+ result, a confirmatory quantitative analysis must be performed. The conclusion was that the test stick Multistix 8 SG could be used as a screening method for analyzing the erythrocyte content of the plasma components produced. The conclusion was also that the Advia program used is not suitable for analysis of the erythrocyte content in plasma.

FÖRKORTNINGAR

DIC – disseminated intravascular coagulation

FFP – färskfrost plasma

GMP – good manufacturing practice, god tillverkningsed

HLA – humana leukocytantigen

PLT – platelet count, antalet trombocyter

RBC – red blood cell count, antalet erythrocyter

TACO – transfusion associated circulatory overload

TNC – total nucleated cell count, antalet kärnförande celler

TRALI – transfusion related acute lung injury

TTP – trombotisk trombocytopen purpura

WBC – white blood cell count, antalet leukocyter

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION	1
Plasma	1
Erythrocyter	1
ABO-systemet	2
Komponentberedning och produktkontroller	2
<i>Produktkontroller</i>	4
Plasmatransfusion och transfusionsreaktioner	4
Analysmetoder	5
<i>Multistix 8 SG och Clinitek Advantus™ Analyzer</i>	5
<i>Advia 2120</i>	6
<i>Bürkers räknekammare</i>	7
<i>Validering</i>	7
Syfte	8
MATERIAL OCH METOD	8
Framställning av plasma	8
<i>Whole Blood-påse (n=14)</i>	8
<i>Erythrocytes-påse (n=6)</i>	8
Multistix 8 SG	9
Advia 2120	9
Bürkers räknekammare	10
Statistik	10
Etik	10
RESULTAT	10
DISKUSSION	13
SLUTSATS	17
TACK	17
REFERENSER	18
BILAGOR	i
Bilaga A: Beräkningar	i
Bilaga B: Rådata	ii

INTRODUKTION

Plasma

Människans blod består av celler fördelade i plasma, en vätska till cirka 90 % bestående av vatten (1-4). Övrigt innehåll i plasman är fett, kolhydrater, lösta salter, samt ett stort antal olika proteiner med en totalvikt på omkring 70 gram per liter plasma (1, 2, 4, 5). Plasman har en gulaktig färg som erhålls på grund av dess innehåll av bilirubin och albumin (2, 6). I plasman transporteras olika ämnen antingen fritt eller bundna till olika plasmaproteiner beroende på deras vattenlöslighet (4). Exempel på plasmaproteiner är albumin, koagulationsfaktorer, immunoglobuliner och komplementproteiner. Albumin är ett transportprotein som hjälper till att bibehålla vätskebalansen i blodkärlen.

Koagulationsfaktorernas uppgift är att stoppa blödning genom att koagulera blodet. Immunoglobulinerna, även kallade antikroppar, och komplementproteinerna är två viktiga delar av immunförsvaret mot främmande ämnen (4, 7-9).

Erythrocyter

De tre huvudtyperna av celler i blodet är leukocyter, trombocyter samt erythrocyter, varav de sistnämnda utgör över 90 % av blodets celler (1). Hos en vuxen individ finns det omkring mellan $4-6 \times 10^{12}$ erythrocyter per liter med en viss könsvariation (10). En mogen erythrocyt saknar cellkärna, mitokondrier och andra cellorganeller (1, 4, 11, 12). Detta gör erythrocytens metabolism anaerob (1, 12). Erythrocyternas uppgift är att transportera syrgas från lungorna till kroppens alla celler samt att transportera koldioxid tillbaka till lungorna (1, 12, 13). Erythrocyterna har en diameter på omkring 8 μm men dess runda, bikonkava form ger cellen en stor yta vilket underlättar utbytet av syrgas och koldioxid (1, 11).

Erythrocyten har en genomsnittlig levnadstid på 120 dagar (1, 4, 12). En av anledningarna till det är avsaknaden av DNA och RNA. Detta gör att erythrocyten inte kan producera några proteiner för att laga cellskador som uppstår när den pressas genom trånga kapillärer (1). Avsaknaden av DNA och RNA gör också att erythrocyten inte kan föröka sig genom celledelning utan varje erythrocyt måste nybildas genom delning av stamceller, en process som kallas erythropoes (1, 11, 12). Detta är en process som pågår under hela människans liv. Hos vuxna individer sker den i den röda benmärgen i de platta benen såsom revbenen, bröstbenet och bäckenbenet. Stamcellen är från början gemensam för både erythrocyter, leukocyter och trombocyter (1, 4). Den genomgår sedan många olika mognadssteg innan den slutligen blir en mogen erythrocyt (1, 12). Produktionen av erythrocyter från stamceller i benmärgen styrs av erythropoetin, ett hormon som frisläpps från njurarna. Frisläppningen regleras av hur bra syretransporten till njurarna är. När erythrocyten dör tas den upp och bryts ner av makrofager i levern, mjälten och benmärgen (1, 4, 12).

Erythrocytens syretransporteringsförmåga är helt beroende av dess innehåll av hemoglobin (1, 4, 14). Det är ett ämne som är uppbyggt av fyra underenheter. Varje underenhet består av en hemgrupp som har en globulär polypeptidkedja veckad kring sig (1, 14, 15). Hemgruppen i sin tur har en järnatom i mitten till vilken syrgasmolekylen binds (1, 4, 14). Varje hemoglobinmolekyl kan därmed binda fyra syrgasmolekyler åt gången (1, 12). I genomsnitt innehåller blodet 150 gram hemoglobin per liter, med en viss könsvariation.

Hemoglobin utgör cirka 95 % av erythrocytens proteininnehåll då varje erythrocyt innehåller omkring 300 miljoner hemoglobinmolekyler (1).

ABO-systemet

ABO-systemet är ett blodgruppssystem som upptäcktes år 1901 av Karl Landsteiner (16). Det består av fyra olika fenotyper i form av A, AB, B och O (16, 17). Fenotypen baseras på uttrycket av de tre allelerna A, B och O på kromosom 9. Dessa alleler kodar för enzymer ansvariga för bildning av de antigen som uttrycks på erythrocyten (16). Antigen A och B utgår båda från en prekursorsubstans H till vilken N-acetylgalaktosamin respektive D-galaktos adderas i olika utsträckning av enzymer som kallas glykosyltransferaser. O-allelen kodar inte för något enzym och motsvarande antigen består därför endast av H-substans. Allelen för A- och B-antigenet skiljer sig åt med sju nukleotider. Anledningen till att de tre allelerna kan ge upphov till fyra fenotyper är att A- och B-allelen är ko-dominant medan O-allelen är recessiv i nedärvningen (16, 17).

En individ med blodgrupp A uttrycker A-antigen på ytan av sina erythrocyter. Motsvarande har den även antikroppar närvarande i plasman mot det antigen som inte uttrycks (tabell I). I det här fallet har individen alltså antikroppar mot B-antigenet. En individ med blodgrupp O däremot uttrycker varken A- eller B-antigen på sina erythrocyter men har antikroppar mot de båda i sin plasma. Varje erythrocyt uttrycker omkring två miljoner antigenmolekyler (4, 16-19).

Tabell I: ABO-systemets fyra förekommande fenotypers uttryck av erythrocytantigen och antikroppar i plasman.

Blodgrupp	A	B	AB	O
Erythrocyter	A-antigen	B-antigen	A-antigen B-antigen	Antigen A och B saknas
Plasman	Anti-B	Anti-A	Anti-A och Anti-B saknas	Anti-A och anti-B

Antigenuttrycket på erythrocytens yta är en kolhydratkedja där oligosackaridernas sekvens bestämmer om det är ett A- eller B-antigen. De naturligt förekommande antikropparna i plasman kan vara av IgM- och IgG-typ. När antikropparna kommer i kontakt med antigenet på erythrocyterna aktiveras komplementkaskaden vilket leder till att erythrocyterna lyseras (4, 16).

Komponentberedning och produktkontroller

Efter tappning av 450 mL helblod från frivillig blodgivare placeras helblodspåsen på en kylplatta för att påskynda nerkyllningen av blodet till rumstemperatur. Nedkyllningen pågår i två timmar och därefter bibehålls en temperatur på omkring 20° (19, 20). Anledningen till att blodpåsarna ska vila innan komponentberedningen påbörjas är att leukocyterna i blodet

ska tillåtas fagocytera eventuella bakterier innan uppdelningen, vilket minskar risken för bakterieöverföring vid transfusion (20, 21).

Plasmaenheter fås genom separation från erythrocyter, leukocyter och trombocyter efter helblodstappning, alternativt via aferes. Separationen sker genom centrifugering där skillnaden i densitet mellan de olika beståndsdelarna utnyttjas (5, 18, 19, 22-27).

Erythrocyterna har högst densitet, 1,060 g/mL, och hamnar i påsens nedre del. Plasman kommer att utgöra toppskiktet eftersom den har en densitet på 1,025 g/mL (23, 25-27).

Trombocyterna hamnar mellan plasman och erythrocyterna i ett så kallat buffy coat medan leukocyterna samlas i den övre delen av erythrocytskiktet (26). Centrifugeringshastighet och tid väljs så att största möjliga mängd produkt kan utvinnas med minsta möjliga skada på cellerna (23, 24, 26-28). Plasma från helblod tillverkas oftast i enheter om 200-300 mL (5, 19, 24).

För att erhålla leukocytbefriade komponenter genomförs en filtrering. Då filtret fångar upp leukocyter och trombocyter genom både adhesion och att cellerna mekaniskt fastnar i filtrets fibrer kan inga trombocytkomponenter framställas om filtreringen sker innan centrifugeringen. Eftersom leukocyterna samlas i erythrocytskiktet när centrifugering sker innan filtrering är det endast nödvändigt att filtrera erythrocytenheten i dessa fall (19, 24, 26).

Efter centrifugering separeras plasman från erythrocyterna och eventuella trombocyter med en automatisk blodpress genom att plasman överförs till en tom förvaringspåse. Blodpressen använder sig av en optisk sensor som mäter ljusgenomsläppligheten hos vätskan. Då de olika komponenterna har en skild ljusgenomsläpplighet kan blodpressen skilja komponenterna åt (29).

Framställd plasma fryses och förvaras vid en temperatur på -18°C eller lägre. Tack vare den låga förvaringstemperaturen är plasmaenheterna hållbara i upp till 3 år (18, 24, 26, 27). Den färskfrysta plasman (FFP) benämns på två vis; FFP1 som är infrost inom 8 timmar från tappning och FFP2 som är infrost 8-24 timmar från tappning (5, 30). De flesta koagulationsfaktorerna är välbevarade i båda varianterna, dock innehåller FFP2 en lägre koncentration av stabila koagulationsfaktorer såsom faktor V och faktor VIII jämfört med FFP1 (5, 18, 27, 30). Tining av plasman har viss påverkan på koagulationsfaktorernas aktivitet men endast en liten del av dessa försvinner vid upptining (5, 30). Vid infrysning av plasma förstörs eventuella kvarvarande blodceller (25, 31, 32). Majoriteten av den plasma som framställs säljs till läkemedelsindustrin (24, 33). Där används plasman som råvara för att framställa olika plasmaproteiner. Exempel på sådana är albumin, immunoglobuliner, antitrombin och koagulationsfaktorerna VIII och IX (19, 24, 33).

Tillverkningen av komponenter ska ske enligt Good Manufacturing Practice (GMP) (19). Det är ett regelverk som styr samtliga steg i tillverkningsprocessen för att säkerställa blodkomponenternas kvalitet. GMP rör allt från renhet vid tillverkning och personalens utbildning till spårbarhet och dokumentation (34). De lokaler som används för framställning av komponenter ska motsvara renhetsklass D. För att uppfylla detta krav

krävs det att rummet har ett övertryck gentemot omgivningen samt att den inkommande luften filtreras (24).

Produktkontroller

Komponentberedningen måste ingå i ett kvalitetskontroll- och kvalitetssäkringssystem där både produkter och all utrustning kontrolleras regelbundet (23). Kontroller tas för att undersöka produktframställningens resultat. Provtagningen ska ske slumpmässigt och utspritt under året för att täcka in alla berörda komponenter, personal, utrustning och arbetspass (25). Eftersom kvarvarande blodceller i plasman förstörs vid infrysning ska kontrollerna tas i samband med framställningen (25, 31, 32). Den plasma som är avsedd för transfusion till patient kontrolleras dock inte utan där säkerställs kvaliteten istället genom en recentrifugering (22).

I plasmaenheterna kontrolleras antalet kvarvarande celler, det vill säga antalet leukocyter (WBC), antalet trombocyter (PLT) samt antalet erythrocyter (RBC) (22). Vid Blekingesjukhuset i Karlskrona analyseras detta med hematologiinstrumentet Advia 2120. De gränsvärden som föreligger är $<1 \times 10^6$ per enhet för WBC, $<50 \times 10^9$ per liter för PLT och $<6 \times 10^9$ per liter för RBC. För att beräkna antalet celler per enhet beräknas först volymen (22, 25).

Kvalitetskraven innefattar både gränsvärden för respektive enhet och hur stor andel av enheterna som måste ligga inom dessa (25). Kraven kommer från Socialstyrelsens och Läkemedelsverkets föreskrifter (24). Av de enheter som kontrolleras ska minst 75 % uppfylla de krav och gränsvärden som finns. Dock måste 90 % av de leukocytreducerade blödenheterna uppfylla kravet om mindre än en miljon leukocyter per enhet. Antalet kontrollerade enheter per år styrs av antalet producerade enheter (25). Vid avdelningen för transfusionsmedicin på Blekingesjukhuset i Karlskrona framställs omkring 20 000 enheter per år, av dessa kontrolleras omkring 200 plasmaenheter fördelade så att cirka 15-20 kontroller utförs per månad (22, 25).

Plasmatransfusion och transfusionsreaktioner

Den främsta indikationen för transfusion av plasma är massiv blödning (4, 5, 18, 24, 26, 30, 32, 33, 35). En sådan transfusion ersätter förlorade koagulationsfaktorer så att hemostas kan uppnås (5, 26, 30, 32, 35). Övriga proteiner i plasman tros även de ha viss fördelaktig effekt vid en sådan transfusion (30). Plasma transfunderas även vid stora brännskador, som medför stora förluster av plasma, samt vid andra typer av hemostasrubbingar exempelvis trombotisk trombocytopen purpura (TTP) och disseminerad intravasal koagulation (DIC) (4, 5, 24, 33).

De risker som i första hand förknippas med plasmatransfusion är transfusion related acute lung injury (TRALI) och transfusion associated circulatory overload (TACO) (19, 26, 30,

32). TRALI är en transfusionsreaktion som kännetecknas av låg syrgashalt i blodet, så kallad akut hypoxemi, och icke-kardiogent lungödem inom 6 timmar från transfusion (18, 19, 32, 36). Orsaken till reaktionen är förekomsten av antikroppar hos blodgivaren riktade mot leukocyter, närmare bestämt mot antigen på neutrofila granulocyter eller humana leukocytantigen (HLA) (18, 19, 30, 32). När dessa antikroppar transfunderas till en patient med motsvarande antigen kommer de neutrofila granulocyterna i lungornas mikrovaskulatur att agglutinera. De frisätter då enzymer och inflammationsmediatorer som skadar lungendotelet (32). Kvinnor, särskilt kvinnor som genomgått ett flertal graviditeter, är den grupp av människor som oftast har HLA-antikroppar. En strategi för att minska risken för TRALI är därför att inte transfundera plasman från dessa givare (5, 32). TACO kännetecknas av akut respiratorisk nöd, syrebrist i vävnader, så kallad hypoxi, och temporärt transfusionsassocierade lungödem (18, 32). Symptomen från de båda reaktionerna liknar varandra och tillstånden kan därför vara svåra att särskilja. Orsaken till TACO är en förhöjd blodvolym, oftast till följd av att den transfunderade mängden plasma som krävs för att ersätta de koagulationsfaktorer som patienten är i behov av är hög (32).

Andra, mindre ofta förekommande, risker är allergiska transfusionsreaktioner och erythrocytalloimmunisering. En allergisk reaktion sker till följd av att mottagaren har antikroppar som reagerar mot ett antigen hos givaren. Exempel på sådana antigen är haptoglobin och IgA men bortsett från dessa två är antigenen oftast svåridentifierbara (32). En erythrocytalloimmunisering innebär att det bildas antikroppar mot de erythrocytantigen som mottagaren själv saknar (37). Då kvarvarande erythrocyter och erythrocytfragment i plasman potentiellt kan orsaka en alloimmunisering hos mottagaren kräver The Council of Europe att varje plasmaenhet ska innehålla färre än 6×10^9 erythrocyter per liter innan infrysning (26, 32). De flesta erythrocyterna fragmenteras vid infrysning vilket minskar deras immuogenicitet. Den från början låga halten och fragmenteringen vid infrysning gör att alloimmunisering vid plasmatransfusion numera är ovanlig (32).

Analysmetoder

Multistix 8 SG och Clinitek Advantus™ Analyser

Enligt Handbok för Blodcentraler kan en teststicka avsedd för urin användas som sällningstest för räkning av låga koncentrationer erythrocyter (25). Multistix 8 SG är en teststicka avsedd för *in vitro*-diagnostik av urin och kan avläsas både manuellt och maskinellt (38, 39). Stickkan innehåller ett flertal testområden för detektion av olika ämnen. Testområdet för detektion av blod består av bland annat diisopropylbensen-dihydroperoxid och 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (38). Metoden bygger på ett färgomslag av testområdet som sker till följd av att den peroxidliknande aktiviteten hos hemoglobin katalyserar reaktionen i diisopropylbensen-dihydroperoxid och 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (38, 40). Stickkan är graderad i fem olika steg; negativ, +/-, +, 2+ och 3+. Där motsvarar + cirka 25 erythrocyter per μL urin, 2+ omkring 80 erythrocyter per μL och 3+ ungefär 200 erythrocyter per μL . En hemoglobinkoncentration på 150-620 $\mu\text{g/L}$ motsvarar ungefär 5-20 intakta erythrocyter per μL . Kaptopril och andra föreningar innehållande sulfhydrylgrupper kan minska känsligheten. Kontaminering med vissa oxiderande ämnen, såsom hypoklorit, kan orsaka falskt positiva resultat. Även synliga rester av blod kan påverka läsbarheten (38).

Inför analys är det viktigt att provet är välblandat och att stickan endast doppas i provet, den ska inte vara kvar någon längre tid i provet (38, 39).

För maskinell avläsning av teststickan kan det halvautomatiska analysinstrumentet Clinitek Advantus™ Analyzer användas. Det är en reflektansspektrofotometer som analyserar färgen och intensiteten i ljuset som reflekteras från testområdet. Instrumentet består av en station för laddning av stickor, en station för inkubation och avläsning samt en avfallsbehållare (40). När teststickan har doppats i provet placeras den på laddningsstationen och en arm för stickan till inkubations- och avläsningsstationen (39, 40). Där avläses stickans ID-band för autokontroll bestående av automatisk identifiering och kvalitetskontroll av stickan (38-40). Inför varje analys genomförs automatiskt en kalibrering av instrumentet med hjälp av två vita kalibreringsstickor (40). Stationen består av två läshuvud som avläser stickans testområden efter bestämda inkuberingstider, det ena efter kortare tid och det andra efter längre tid (38, 40). Varje läshuvud innehåller en glödlampa och ett fotodiodpaket. Lampan bestrålar testområdet och en del av ljuset som träffar området reflekteras tillbaka till fotodiodpaketet. Vilken våglängd det reflekterade ljuset har beror på färgförändringen i fältet och är direkt relaterat till koncentrationen av ämnet i provet. Fotodiodpaketet innehåller fyra filter med fyra olika våglängdsområden för blått, grönt, rött och infrarött ljus. Fotodiodpaketet omvandlar sedan det detekterade ljuset till elektriska impulser. Dessa impulser behandlas av instrumentets mikroprocessor och omvandlas då till kliniskt relevanta resultat. Efter slutförd testning faller stickorna ned i avfallsbehållaren (40).

Advia 2120

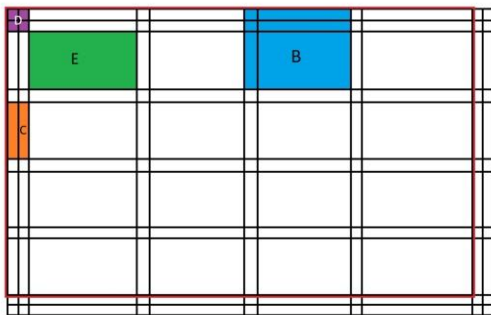
För att bestämma antalet celler i en komponent kan en automatisk cellräknare användas. Vanligtvis är dock inte de program som används för analys av helblod anpassade för analys av mer cellfattiga vätskor. Anledningen är oftast att det inte föreligger linjäritet i detta mätområde (12, 25). Sådana instrument räknar cellerna i en bestämd volym som passerar genom instrumentet (11). Ett program i Advia 2120 som är anpassat för cellfattiga vätskor är Body fluid-programmet. Det är avsett för analys av antalet kärnförande celler (TNC) och RBC i prover från pleura (lungsäcken), peritoneum (bukhinnan) och peritonealdialys (bukdialys) insamlade i EDTA-rör (41-44). Innan analys är det viktigt att provet är välblandat. Analysen kräver 300 µL prov och är linjär mellan 10×10^9 – $6,76 \times 10^{12}$ celler per liter. På grund av detta anges resultat under 10×10^9 celler per liter som <10 (44).

Advia 2120 Hematology System är ett automatiserat hematologiinstrument bestående av en analysdel innehållande bland annat reagens, hydraulik och en uppsamlingscontainer samt en tillhörande dator (45). Provinmatningen kan ske via en automatisk provinmatare med kapacitet för 150 prover fördelade på 15 rack alternativt manuellt via det yttre öppna eller slutna systemet (45, 46). När provet har aspirerats når det en fördelningsventil som roterar för att fördela provet till de olika kanalerna för de olika analyserna (45). Vid analys av antalet erythrocyter blandas provet med ADVIA 120 RBC/PLT-reagens, bestående av natriumdodecylsulfat (0,035 mmol/L), dinatrium EDTA dihydrat (4,03 mmol/L), tetranatrium EDTA dihydrat (3,36 mmol/L), natriumklorid (109,3 mmol/L), glutaraldehyd

(0,11%) och buffert, i en reaktionskammare. Genom en cytokemisk reaktion blir erythrocyterna isovolymetriskt sfärade, vilket innebär att de formar sfärer men behåller samma volym. Därefter fixeras de till denna form. För att cellerna sedan ska kunna passera genom flödescellen för analys tillförs Sheath/Rinse-vätska innehållande konserveringsmedel, buffrar och tensid. Erythrocyterna passerar sedan genom en flödescell i en encellssuspension. I flödescellen bestrålas de av ljus från en laserdiod vilket de då bryter. En detektor i form av en spridningsfotodiod detekterar det spridda ljuset vid två vinklar, en låg vinkel på 2-3° respektive en hög vinkel på 5-15° (44, 45, 47, 48). De två ljusspridningssignalerna amplifieras sedan elektroniskt och RBC beräknas (45).

Bürkers räknekammare

För att undersöka cellinnehållet i olika kroppsvätskor kan Bürkers räknekammare användas. Det är en manuell metod som, korrekt utförd, är väldigt säker men också tidskrävande jämfört med automatiska cellräkningsmetoder (11). Då plasmaenheter ska innehålla låga halter erythrocyter för att vara godkända produkter är den här metoden lämplig för räkning av erythrocytinnehållet (25). Bürkers räknekammare anses vara Gold Standard för beräkning av antalet erythrocyter i plasmaenheter (49).



Figur 1: De olika rutorna i Bürkers räknekammare där A-rutan är markerad med en röd linje, B-rutan är blå, C-rutan är orange, D-rutan är lila och E-rutan är grön.

Räknekammaren innehåller en mönstrad yta uppdelad i nio stora rutor benämnda som A-rutor med måtten 1x1 mm och ett djup på 0,1 mm. Detta ger varje A-ruta en volym på 0,1 mm³. Varje A-ruta är sedan i sin tur indelad i mindre rutor med beteckningarna B-, C-, D- och E-rutor som rymmer olika volymer (figur 1). Hela kammaren rymmer en volym på 10 µL. Tidigare var det vanligt med återanvändningsbara kammare gjorda av glas men då dessa lätt blev repiga och sämre med tiden finns nu engångskammare i plast att tillgå (50).

Validering

Vid införandet av en ny metod i en verksamhet ska en validering genomföras för att påvisa att metoden leder till de avsedda och förväntade resultaten. Finns det sedan tidigare en genomförd validering är det endast nödvändigt att utföra en verifiering för att lokalt bekräfta valideringens resultat (25, 51). Som en del av valideringen bör linjäriteten för analysmetoden inom det avsedda mätområdet undersökas (51). För metoder avsedda för

cellräkning i blodkomponenter rekommenderas det att kontroller genomförs i sådan utsträckning att de täcker minst samma innehåll och omfattning som normalt kontrolleras under en månads tid (25).

Syfte

Syftet med examensarbetet var att hitta en beslutsgräns för bestämning av erythrocytinhåll i plasmakomponenter som framställs vid beredning av blodkomponenter inför transfusion. Gränsen skulle fastställas genom en jämförelse mellan teststickan Multistix 8 SG, analysmetoden avsedd för cellfattiga vätskor i hematologiinstrumentet Advia 2120 samt manuell räkning av antalet erythrocyter i Bürkers räknekammare. Den frågeställning som förelåg var huruvida Multistix 8 SG kunde användas som en screeningmetod vid analys av erythrocytinhåll i de plasmakomponenter som tillverkas vid avdelningen för transfusionsmedicin på Blekingesjukhuset i Karlskrona. Om så är fallet, även undersöka var gränsen gick vid vilken analysen istället bör ske i hematologiinstrumentet Advia 2120 för att säkerställa att antalet erythrocyter inte överstiger gränsen tillåtna erythrocyter i plasmakomponenten.

MATERIAL OCH METOD

Framställning av plasma

Whole Blood-påse (n=14)

Tappningspåsen Whole Blood (MacoPharma, Mouvaux, Frankrike) innehållande 450 mL helblod placerades efter tappning på ett kylblock. När påsen hade vilat på kylblocket i en timme hängdes den upp för filtrering genom Leucoflex LXT in-line filtret (MacoPharma, Mouvaux, Frankrike). Därefter centrifugerades påsen i någon av de två centrifugerna Roto Silenta RS eller Roto Silenta 630 RS (Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, Tyskland), benämnda RS respektive RS-ny. Centrifugeringen skedde vid 4805g i 11,5 minuter vid en temperatur på 22°C. Efter centrifugering pressades påsen i MacoPress Smart (MacoPharma, Mouvaux, Frankrike) för att separera plasman från erythrocyterna. Efter genomförd filtrering, centrifugering och komponentuppdelning märktes ett EDTA-rör med tappningsnummer och blodgrupp innan det fylldes till hälften med plasma (22).

Erythrocytes-påse (n=6)

Tappningspåsen Erythrocytes (MacoPharma, Mouvaux, Frankrike) innehållande 450 mL helblod placerades efter tappning på ett kylblock. När påsen hade vilat på kylblocket i två timmar centrifugerades den i någon av de två centrifugerna RS eller RS-ny vid 4898g i 12 minuter vid en temperatur på 22°C. Därefter pressades påsen i MacoPress Smart (MacoPharma, Mouvaux, Frankrike) för att separera plasman från erythrocyterna och buffy coaten. Därefter märktes ett EDTA-rör med tappningsnummer och blodgrupp innan det fylldes till hälften med plasma (22).

De plasmaenheter som framställdes förväntades uppfylla kravet att innehålla mindre än 6×10^9 erythrocyter per liter plasma. Därför togs, utöver dessa 20 produktkontroller, även 10 prover till vilka erythrocyter tillsattes för att överstiga denna gräns. De 10 proverna framställdes från tre av de 20 plasmapåsar. Det skapades även en serie av prover kring området mellan 2+ och 3+ på urinstickan Multistix 8 SG (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA). Denna serie innehöll 8 prover framställda från en av de 20 plasmapåsar. Tillsatsen erhöles genom att ett EDTA-rör fylldes med erythrocyter från den erythrocytenhet som framställdes från samma givare. Därefter centrifugerades röret för att skapa den pellet med koncentrerade erythrocyter som sedan tillsattes till plasman.

Multistix 8 SG

Kvalitetskontroll genomfördes av ordinarie personal placerad vid urinanalysinstrumentet när en ny burk teststickor öppnades. Då användes Liquid QC DipStrip Urinalysis Control (Cliniqa Corp., San Marcos, USA) (38).

EDTA-rören innehållande plasma (n=38) vändes för hand tio gånger innan urinstickan Multistix 8 SG (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA) doppades i plasman. Stickans baksida torkades av mot rörets kant i samband med att den avlägsnades från röret. Därefter placerades stickan i Clinitek Advantus™ Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA) för analys med reflektansspektrofotometri. Den peroxidasliknande aktiviteten hos hemoglobin katalyserade reaktionen i diisopropylbensen-dihydroperoxid och 3,3',5,5'-tetrametylbensidin vilket ledde till ett färgomslag. (38-40).

Advia 2120

Kontroller utfördes tre gånger dagligen av ordinarie personal placerad vid hematologiinstrumentet. Då användes Advia 2120 3-in-1 TestPoint Control (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA).

Ett EDTA-rör innehållande natriumklorid [9 mg/mL] (Fresenius Kabi AG, Homburg, Tyskland) och EDTA [4 mM] analyserades med hjälp av Body fluid-programmet i hematologiinstrumentet Advia 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA). Detta för att säkerställa att instrumentet var rent sedan föregående analys. Provet aspirerades genom instrumentets yttre, öppna kanal. Därefter vändes EDTA-rören innehållande plasma (n=38) tio gånger för hand innan 300 µL prov aspirerades, även det genom instrumentets yttre, öppna kanal. Plasmaprovet nådde då en fördelningsventil som roterade för att fördela provet till reaktionskammaren avsedd för analys av RBC. I reaktionskammaren blandades provet med ADVIA 120 RBC/PLT-reagens (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA). För att cellerna sedan skulle kunna passera genom flödescellen för analys tillfördes Sheath/Rinse-vätska (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA). Cellerna passerade sedan en och en förbi en ljusström från en laserdiod i flödescellen. De detekterade ljusspridningssignalerna amplifierades

elektroniskt utifrån vilket antalet erythrocyter per liter beräknades av instrumentets mjukvara (44, 45, 47).

Bürkers räknekammare

EDTA-rören innehållande plasma (n=38) blandades med hjälp av en provrörsblandare i 10 minuter. Plasman späddes därefter 1:2 med ID-CellStab (BioRad, Cressier FR, Schweiz) till en slutvolym på 1 mL innan innehållet blandades i ytterligare 5 minuter med provrörsblandare. Av plasmablandningen pipetterades 10 µL till engångs Bürkers räknekammaren C-Chip DHC-B01 (NanoEnTek, Seoul, Korea). Räknekammaren placerades i en fuktkammare där innehållet fick sedimentera i 10 minuter. Därefter räknades antalet erythrocyter i 9 A-rutor med hjälp av ljusmikroskopet Olympus BX43 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) på 40x förstoring. Utifrån detta beräknades antalet erythrocyter per liter (bilaga A) (52).

Statistik

För de statistiska beräkningarna användes kalkylerings- och datahanteringsprogrammet Microsoft Excel. Den statistik som beräknades var medelvärde och median för värdena erhållna ur Bürkers räknekammare uppdelade efter urinstickans olika nivåer.

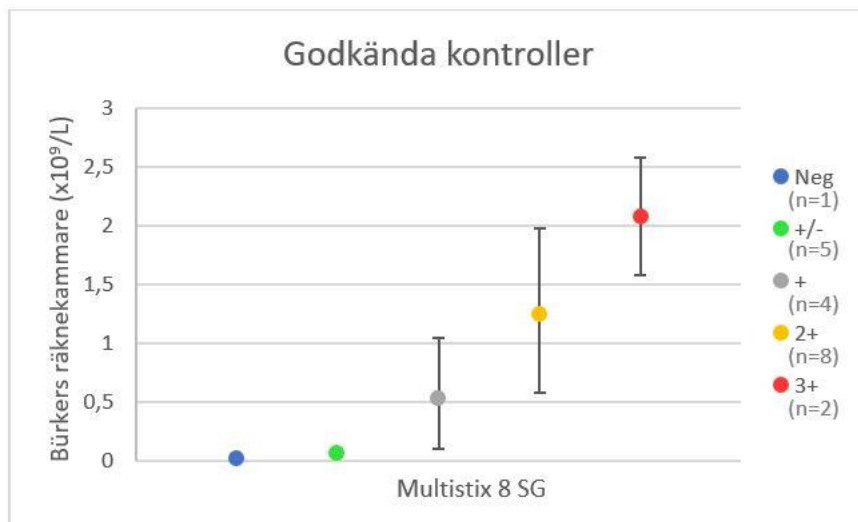
Etik

Studentarbeten som utförs på grundnivå omfattas vanligen inte av Lag (2003:460) om etikprövning av forskning som avser människor då dessa enligt 2§ inte anses som forskning i lagens mening (53, 54). I övrigt omfattar lagen enligt 4§ ”studier på biologiskt material som har tagits från en levande människa och kan härledas till denna människa” (54). Då den plasma som användes omkodades och oidentifierades innan analys genom att den endast benämndes med de fyra sista siffrorna i tappningsnumret kunde det biologiska materialet inte härledas tillbaka till blodgivaren via namn eller personnummer. Dock fanns möjligheten att spåra materialet under hela arbetets gång fortfarande kvar. Allt biologiskt material behandlades med respekt och med blodgivaren i åtanke under hela arbetets gång.

RESULTAT

För samtliga av de 38 prover som analyserades erhöles ett resultat från varje av de tre undersökta metoderna (bilaga B). Av de 38 proverna erhöles 37 stycken ett resultat i form $<10 \times 10^9/L$ på Advia 2120. Prov 3159-8 visade ett resultat på $10 \times 10^9/L$. Vid analys med Multistix 8 SG visade ett prov negativt, fem prov +/-, fyra prov +, 12 prov 2+ och 16 prov 3+.

De 20, enligt analys i Bürkers räknekammare, godkända produktkontrollernas resultat fördelade efter de fem resultatkategorierna på urinstickan visas i figur 2. Medelvärdet respektive medianen för de fyra kategorierna som innehöll fler än ett värde var $0,063 \times 10^9/L$ och $0,069 \times 10^9/L$ för +/-, $0,52 \times 10^9/L$ och $0,47 \times 10^9/L$ för +, $1,24 \times 10^9/L$ och $1,10 \times 10^9/L$ för 2+ samt $2,08 \times 10^9/L$ och $2,08 \times 10^9/L$ för 3+.



Figur 2: De 20 godkända kontrollernas medelvärde från analys i Bürkers räknekammare fördelade efter deras resultat på urinstickan Multistix 8 SG. Felstaplarna presenterar varje kategoris högsta och lägsta erhållna värde.

Samtliga av de 10 prover där erythrocyter tillsattes för att överstiga gränsen för en godkänd kontroll, $6 \times 10^9/L$, visade i Bürkers räknekammare ett resultat som översteg denna gräns (tabell II). Resultatet för de 8 prover som tillsattes erythrocyter för att finna övergången mellan 2+ och 3+ på teststickan visade att den högsta erhållna halten erythrocyter för 2+ var $2,28 \times 10^9/L$ (tabell III).

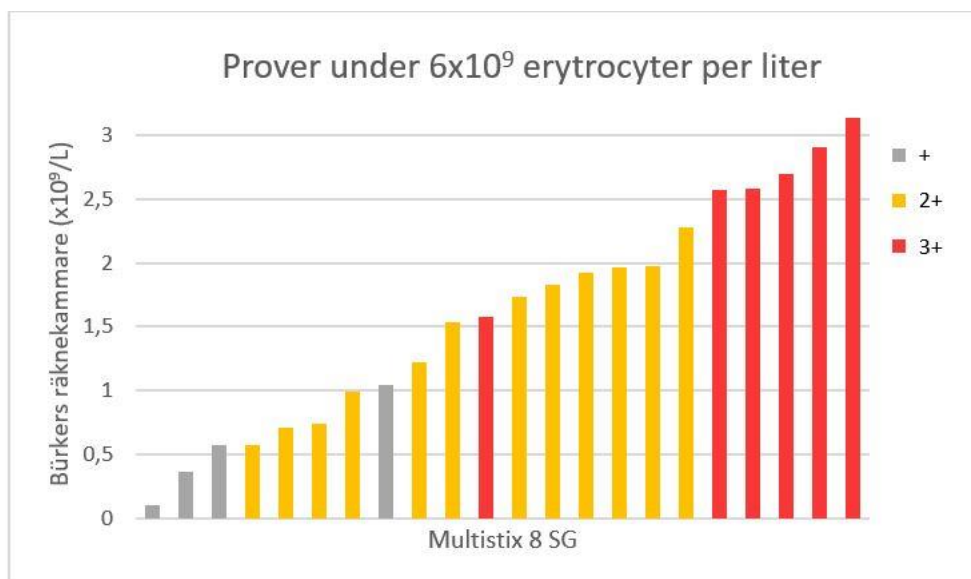
Tabell II: Resultaten från de tre olika metoderna som användes för analys av de 10 prover till vilka olika mängder erythrocyter tillsattes för att överstiga gränsen för en godkänd kontroll, $6 \times 10^9/L$.

Tappningsnummer	Multistix 8 SG	Advia 2120 (x10⁹/L)	Bürkerkammare (x10⁹/L)
3006	3+	<10	6,45
3083-1	3+	<10	7,79
3159-1	3+	<10	6,05
3159-2	3+	<10	6,59
3159-3	3+	<10	6,73
3159-4	3+	<10	7,25
3159-5	3+	<10	8,31
3159-6	3+	<10	8,79
3159-7	3+	<10	9,80
3159-8	3+	10	10,75

Tabell III: Resultaten från samtliga tre metoder för de 8 prover där erythrocyter tillsattes för att erhålla nivåer kring övergången mellan 2+ och 3+ på urinstickan Multistix 8 SG.

<i>Tappningsnummer</i>	<i>Multistix 8 SG</i>	<i>Advia 2120 (x10⁹/L)</i>	<i>Bürkerkammare (x10⁹/L)</i>
3159-9	2+	<10	1,54
3159-10	2+	<10	1,73
3159-11	2+	<10	1,96
3159-12	2+	<10	2,28
3159-13	3+	<10	2,58
3159-14	3+	<10	2,70
3159-15	3+	<10	2,91
3159-16	3+	<10	3,14

Av de prover som erhöll ett värde under $6 \times 10^9/L$ visade 22 prover +, 2+ eller 3+ på teststickan (figur 3). Resultaten från dessa prover visade att det förekom en viss överlappning mellan de olika nivåerna.



Figur 3: Resultatet från Bürkers räknekammare för de 22 prover som erhöll + (grå), 2+ (gul) och 3+ (röd) på urinstickan Multistix 8 SG. Proverna är ordnade efter stigande antal erythrocyter och varje nivå på urinstickan representeras av en färg.

Gränsen vid vilken en komponentkontroll garanteras ett godkänt resultat fastslags till $\leq 2+$ på teststickan. Vid resultat 3+ ska en konfirmerande kvantitativ analys utföras.

DISKUSSION

Syftet med examensarbetet var att hitta en beslutsgräns för bestämning av erythrocytinhålllet i plasmakomponenter som framställs vid beredning av blodkomponenter inför transfusion. Gränsen skulle fastställas genom en jämförelse mellan teststickan Multistix 8 SG, analysmetoden avsedd för cellfattiga vätskor i hematologiinstrumentet Advia 2120 samt manuell räkning av antalet erythrocyter i Bürkers räknekammare. För samtliga av de 38 prover som analyserades erhöles ett resultat från varje av de tre undersökta metoderna (bilaga B).

Figur 2 visar varje kategoris medelvärde hos de 20 komponentkontrollerna med det högsta och lägsta värdet i felstaplarna. Detta för att ge en tydlig bild av vilket område som täcks in. Det, i kombination med figur 3, som visar de 22 prover som erhöles ett värde under $6 \times 10^9/L$ och +, 2+ eller 3+ på stickan, visar att det förekommer en viss överlappning mellan stickans olika nivåer. De kvantitativa mätningarna inom respektive kategori visar alltså på överlappande resultat mellan stickans olika kategorier.

Vid omräkning av det erythrocytantal som anges från tillverkaren om till $\times 10^9/L$ motsvarar 200 erythrocyter/ μL nu $0,2 \times 10^9$ erythrocyter/L, något som inte överensstämmer med de funna resultaten från analyserna. Samtliga angivna värden är 10 gånger lägre än de som faktiskt erhöles för varje kategori på stickan. Anledningen till detta är oklar. De värden som anges är cirkatal men att en avvikelse på just 10 gånger skulle vara ett sammanträffande verkar inte troligt. En möjlig anledning skulle kunna vara att teststickan är avsedd och validerad för användning i urin och att användningen av plasma kan ha påverkat resultaten. Det är något som skulle kunna undersökas genom att jämföra en spädningsserie, bestående av olika erythrocytkoncentrationer, för både plasma och urin. Det skulle även kunna handla om ett tryckfel från tillverkarens sida, något som inte är så troligt då det är en väldigt etablerad metod och därmed borde ha upptäckts tidigare.

Att endast ett av de 38 analyserade proverna erhöles ett siffervärde skiljt från $<10 \times 10^9/L$ var ett väntat resultat då Body fluid-programmet visade sig ha en detektionsgräns vid $10 \times 10^9/L$ och gränsen för en godkänd kontroll är $6 \times 10^9/L$ (22, 25, 44). Det prov som översteg detektionsgränsen hade tillsatts erythrocyter i sådan mängd att detta skulle ske. Samtliga av de 10 prover som tillsattes erythrocyter för att överstiga gränsen för en godkänd kontroll visade i Bürkers räknekammare ett förväntat resultat över denna gräns (tabell II). Samtliga av de 20 ordinarie kontrollerna som genomfördes låg under gränsen för en godkänd kontroll. Av dessa låg 13 prover till och med under $1 \times 10^9/L$ (bilaga B). På grund av att majoriteten av proverna låg under $10 \times 10^9/L$ kunde inte någon direkt jämförelse göras mellan Body fluid-programmet på Advia 2120 och de andra två metoderna.

Gränsen vid vilken en komponentkontroll kan garanteras ett godkänt resultat fastslogs till $\leq 2+$ på teststickan. Vid resultat 3+ ska en konfirmerande kvantitativ analys utföras. Denna gräns valdes utifrån att inga kvantitativa resultat över $2,28 \times 10^9/L$ ses i det undersökta materialet vid denna gräns (tabell III). Om samtliga kategorier på stickan upp till och med 2+ benämns som negativa medan 3+ benämns som positiv kan det ses att inga falskt

negativa resultat erhålls. Stickan har alltså en hög sensitivitet. Denna gräns innebär dock att en del falskt positiva resultat kommer att erhållas. I det undersökta materialet motsvarade detta 2 av 20 produktkontroller (bilaga B). Det kan därför antas att endast ett fåtal kontroller kommer erhålla ett positivt resultat på stickan och kräva vidare analys med en kvantitativ metod trots att de ligger under $6 \times 10^9/L$.

I den serie med 8 prover som gjordes för att undersöka övergången mellan 2+ och 3+ erhöll prov 3159-12 ett resultat på $2,28 \times 10^9/L$ i Bürkers räknekammare och 2+ på urinstickan medan prov 3159-13 erhöll $2,58 \times 10^9/L$ i räknekammaren respektive 3+ på urinstickan (tabell III). Övergången mellan 2+ och 3+ sker alltså enligt den här undersökningen någonstans mellan $2,28$ och $2,58 \times 10^9/L$. Men då teststickan är en semikvantitativ metod och arbetet i stort visar att det förekommer en viss naturlig överlappning mellan de olika kategorierna, kan den exakta övergången inte fastslås.

Som kan utläsas ur figur 3 fanns två prover som enligt resultaten i Bürkers räknekammare erhöll ett oförväntat värde på urinstickan. Prov 2969 med 3+ på stickan innehöll enligt räknekammaren $1,58 \times 10^9$ erythrocyter per liter och prov 3194 innehöll enligt Bürkers räknekammare $1,044 \times 10^9$ erythrocyter per liter samt visade + på stickan (bilaga B). Utifrån resultatet i räknekammaren visade proverna således ett för högt respektive ett för lågt resultat på stickan. Anledningen till det för höga resultatet kan vara en felaktig dopptechnik vid vilken stickan lämnats kvar i provet för länge. Testområdet kan då ha varit i kontakt med provet längre än avsedd tid innan avläsning skedde (38, 39). De två avvikande provresultaten kan också bero på en felräkning i räknekammaren som resulterat i ett felaktigt antal erythrocyter. En tredje felkälla kan vara att proverna inte var tillräckligt blandade innan analys med någon av metoderna. Vilken att de ovan nämnda felkällorna, om någon, som orsakat avvikelserna är svårt att avgöra. Att det inte föreligger några felaktigheter gällande utförandet av analyserna utan att det endast är stickans naturliga variation som visar sig är dock den troligaste anledningen. Om resultaten från Advia 2120 hade erhållits i form av siffervärden istället för endast $<10 \times 10^9/L$ skulle de resultaten kunna ha använts för att ge en indikation på om de funna resultaten var sanningsenliga eller berodde på någon felkälla.

Det Body fluid-program som användes för analys med Advia 2120 är inte det analysprogram som rutinmässigt används vid analys av plasmakontrollerna. Anledningen till att Body fluid-programmet valdes var att det var ett program avsett för cellfattiga vätskor och därmed skulle vara mer sensitivt än det ordinarie helblodsprogrammet (44). Då detta helblodsprogram inte är tillräckligt känsligt för analys av plasma har avdelningen för transfusionsmedicin vid Blekingesjukhuset i Karlskrona egentligen inte tillämpat en optimal kontroll av erythrocytantalet i de tillverkade plasmaenheter. Att detektionsgränsen för Body fluid-programmet var $10 \times 10^9/L$ var inte känt innan arbetet påbörjades. Detta program kan därmed inte användas för konfirmerande analys av produktkontrollerna. Tills att de automatiska kvantitativa metoderna blir mer känsliga är därför Bürkers räknekammare det säkraste alternativet. Enligt de erhållna resultaten kan 10 % av kontrollerna förväntas kräva vidare konfirmerande analys om Multistix 8 SG används som screeningmetod. Detta skulle per år motsvara omkring 20 prover som får räknas i

Bürkers räknekammare. För att helt undkomma detta krävs en vidare utvärdering av Adviametodens mätområde avseende den nedre mätområdesgränsen, där en linjäritet ner till $1 \times 10^9/L$ hade varit optimalt. Culibrk et.al. jämförde Bürkers räknekammare och Cerebrospinal fluid-programmet på Advia 120 och fann då en god korrelation mellan de båda metoderna. Cerebrospinal fluid-programmet hade då först optimerats för analys av erythrocyter i plasmakomponenter (49). En annan fortsatt studie som kan genomföras är därför en jämförelse mellan Bürkers räknekammare och Cerebrospinal fluid-programmet.

Användarmässigt är Bürkers räknekammare den mest tidskrävande metoden. Detta dels på grund av förberedelsetiden men även på grund av den tid det tar att räkna erythrocyterna i mikroskop. Det är den enda av de tre metoderna som innefattar en möjlighet till felaktig spädning av provet. Advia 2120 och Multistix 8 SG har snarlika tidsåtgångar. Analys med Advia 2120 kräver att provet körs via den yttre öppna kanalen vilket innebär att korken måste öppnas manuellt och provet hållas vid aspiration. För analys med Multistix 8 SG måste korken avlägsnas och stickan doppas manuellt innan den placeras i instrumentet. Svårighetsmässigt är analys med Advia 2120 och Multistix 8 SG likvärdiga och metoderna är även enklare än analys med Bürkers räknekammare.

Fördelarna med Multistix 8 SG och Clinitek Advantus™ Analyzer är den enkla användningen som endast innefattar manuell doppling av provet och därefter maskinell avläsning. Den maskinella avläsningen är mer precis än manuell avläsning i både färgtolkning och tidsbedömning. De förekommande felkällorna är att korrekt dopptechnik ska användas, provet ska vara välblandat och att synliga rester av blod kan påverka stickans läsbarhet (38). Teststickan är känslig och kan skilja låga halter av erythrocyter från varandra. Det är just denna känslighet som gör att de negativa resultaten på stickan inte överstiger $2,28 \times 10^9/L$. För att helt utesluta behovet av en konfirmerande analysmetod hade stickan behövt innefatta fler nivåer. Optimalt för analys av erythrocytantal i plasmakomponenter hade varit en sticka vars övergång till högsta nivån skedde vid omkring $5 \times 10^9/L$. Stickkan kan även detektera fritt hemoglobin och förvaring av provet över natten ska därmed i teorin inte påverka resultatet.

Fördelen med den automatiska cellräknaren Advia 2120 är att den räknar ett högt antal celler, närmare bestämt alla celler som finns i de $300 \mu L$ prov som aspireras. Det höga antalet räknade celler ger en hög noggrannhet. Analysen är enkel att utföra och kräver endast ett välblandat prov för att erhålla en representativ bild av dess innehåll. Nackdelen med Body fluid-programmet som användes är den höga detektionsgränsen som gör den olämplig att, utan vidare modifiering för att erhålla högre känslighet, användas för kontroll av plasmaenheter.

Trots att maskinella metoder ständigt förbättras anses fortfarande vissa manuella metoder vara mer pålitliga. Bürkers räknekammare för analys av erythrocytantalet i plasma är en av dessa. Men det är just den mänskliga delen i metoden som blir både dess fördel och nackdel. Fördelen är att mikroskoperingen i många fall ger en tydligare bild av cellerna och de är därmed lättare att skilja åt med det mänskliga ögat än vad det är för ett

instrument. Metoden innefattar också en del moment såsom pipettering och räkning av erythrocyterna vilket är en nackdel då dessa också blir möjliga felkällor när de utförs manuellt. När metoden utförs av en person med erfarenhet och kunskap påverkar dock dessa felkällor inte metoden i så stor utsträckning. Ytterligare en nackdel med metoden är att den är tidskrävande, både när det gäller preparering av prover och räkningen i mikroskopet.

Ett införande av teststickan som en screeningmetod skulle innebära en minskning av arbetsbördan för laboratoriepersonalen, då ett färre antal mer tidskrävande kvantitativa analyser behöver genomföras. Som resultatet av det här arbetet visar kommer då endast 10 % av de 200 kontrollerna att behöva analyseras med den manuella kvantitativa metoden. Mest rationellt och effektivt vore dock att ha en maskinell kvantitativ metod som kunde analysera samtliga kontrollprover. Rent hållbarhetsmässigt görs ingen vinning trots att urinstickan består av en mindre mängd plast än ett EDTA-rör. Detta då de andra två analyserna, antalet trombocyter och antalet leukocyter, som ska genomföras på plasmaenheten utförs i Advia 2120 som kräver EDTA-röret och urinstickan blir alltså ett ytterligare förbrukningsmaterial. Under arbetets gång användes Bürkers räknekammare, även den i plast, vilket bidrog till en ökad åtgång av dessa. Då det är en metod som teoretiskt endast kommer att användas för omkring 20 prover per år bidrar detta dock endast till en liten ökad årlig åtgång.

Eftersom hematologiinstrumentet Advia 2120 är ett välanvänt instrument i den rutinmässiga verksamheten på laboratoriet anpassades analyserna av plasmaproverna tidsmässigt till när de ordinarie proverna inkom i lägst utsträckning. Som en följd av detta genomfördes inte alla tre metoder i samma ordning vid varje tillfälle och inte heller alltid i direkt anslutning till varandra. De två serierna med prover som skapades utifrån samma plasmaenhet analyserades endast med hematologiinstrumentet och teststickan på tillverkningsdagen. Räkning i Bürkers räknekammare genomfördes istället dagen därpå. Vid förvaring av ett prov över natten sker en viss nedbrytning av erythrocyterna i provet. Detta kan påverka resultatet i Bürkers räknekammare genom att ett falskt för lågt resultat då kan erhållas.

Den största svårighet som påträffades under arbetets gång var att programvaran för Body fluid-programmet inte fanns installerad på Advia 2120 vid arbetets början. Då installationen skulle genomföras av speciell personal från Siemens Healthcare Diagnostics kunde detta ske först i slutet av arbetets tredje vecka. Det resulterade i att den praktiska insamlingen av resultat inte kunde påbörjas förrän arbetets fjärde vecka. Att Body fluid-programmet hade en högre detektionsgräns än förväntat var ytterligare en oväntad svårighet, då en jämförelse mellan de tre metoderna inte kunde genomföras på det vis som det var planerat. Dock kunde det fastställas att detta program inte levde upp till förväntningarna, vilket lämnar rum för vidare undersökning och modifiering av analysprogrammet på Advia 2120. Trots de oväntade svårigheterna kunde huvudsyftet att hitta en beslutsgräns för screeningmetoden uppnås, men det fanns inte möjlighet inom ramen för detta arbetet att utveckla den maskinella kvantitativa metoden vidare.

SLUTSATS

Den slutsats som kunde dras ur examensarbetet var att teststickan Multistix 8 SG kan användas som en screeningmetod vid analys av erytrocytinhållet i de tillverkade plasmakomponenterna. Gränsen för godkända resultat vid komponentkontroller är $\leq 2+$. Erhålls resultatet 3+ ska en konfirmerande kvantitativ analys utföras. Resultatet från det undersökta materialet visade att endast ett fåtal 3+resultat kan förväntas vid de rutinmässiga komponentkontrollerna. Den valda gränsen medför därför att ett begränsat antal konfirmerande analyser behöver utföras. Slutsatsen kunde även dras att det Body fluid-program som användes inte är lämpligt som konfirmerande analys av erytrocytinhållet i plasma på grund av dess höga detektionsgräns. Idag är räkning i Bürkers räknekammare det enda alternativet och ytterligare utvärdering av Adviametodens mätområde bör ske med avseende på den nedre mätområdesgränsen.

TACK

Tack till samtlig personal på avdelningen för klinisk kemi och transfusionsmedicin vid Blekingesjukhuset i Karlskrona för ert stöd, intresse och möjligheten att genomföra detta arbete.

Jag vill framföra ett tack till...

... min externa handledare Nicholas Holthuis, överläkare, klinisk kemi och transfusionsmedicin Blekingesjukhuset i Karlskrona.

... min interna handledare Magnus Ståhle, universitetslektor, Linnéuniversitetet Kalmar.

... Helena Falck, biomedicinsk analytiker, transfusionsmedicin Blekingesjukhuset i Karlskrona, för all praktisk hjälp och handledning jag fått under arbetets gång.

... Erica Svensson, Alexander Jeppsson och Margareta Håkansson, biomedicinska analytiker, klinisk kemi Blekingesjukhuset Karlskrona, för all hjälp gällande de hematologiska analyserna.

Jag vill även framföra ett särskilt stort tack till mina kurskamrater Amanda Björk och Annie Bäckström som varit ett stort stöd och funnits vid min sida under hela studietiden.

REFERENSER

1. Sand O, Toverud KC. Människokroppen : fysiologi och anatomi. 2. uppl. ed. Stockholm: Liber; 2007. 544 s. p. 316-321
2. Nationalencyklopedin. Blodplasma [Internet]. Nationalencyklopedin 2018 [cited 2018-04-06]. Available from: <https://www-ne-se.proxy.lnu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/blodplasma>.
3. Nyman M, Carlsson J, von der Lehr N. Blodplasma [Internet]. genteknik.nu: Gentekniknämnden, Karolinska Institutet Science Park; 2015 [cited 2018-04-06]. Available from: <https://genteknik.nu/blodplasma/>.
4. Bjerneroth Lindström G. Blodet och immunförsvaret [Internet]. 1177 Kalmar län 2005 [cited 2018-04-06]. Available from: <https://www.1177.se/Kalmar-lan/Tema/Kroppen/Immunforsvaret/Blodet-och-immunforsvaret/>.
5. Benjamin RJ, McLaughlin LS. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion*. 2012 May;52 Suppl 1:9s-19s.
6. McCann KB, Vucica Y, Famulari S, Bertolini J. Effect of processing methods on colouration of human serum albumin preparations. *Biologicals*. 2009Jan;37(1):32-6.
7. Wootla B, Denic A, Rodriguez M. Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Methods Mol Biol*. 2014;1060:79-110.
8. Wieslab AB. Komplement och komplementbrist [Internet]. Euro Diagnostica; 2018 [cited 2018-05-30]. Available from: <http://www.wieslab.se/diagnostic-services/index.php?headId=4&pageId=4&langId=2&diseaseId=5>.
9. Vincent JL, Russell JA, Jacob M, Martin G, Guidet B, Wernerman J, et al. Albumin administration in the acutely ill: what is new and where next? *Crit Care*. 2014 Jul 16;18(4):231.
10. Landgren K. Erythrocyter, EPK - B [Internet]. Landstinget Blekinge; 2016 [cited 2018-05-30]. Available from: <http://ltblekinge.se/Forvardgivare/Provtagningsanvisningar/Analysportalen/Analyser/Analyser-D-F/Erythrocyter-partikelkoncentration-EPK---B/>.
11. Bain BJ. Blood cells: A practical guide. 4 ed. Blackwell Publishing; 2006. 476 p. 25, 65, 203
12. Ganrot PO, Laurell C-B. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. 7., [omarb.] uppl. Lund: Studentlitteratur; 1997. 676 s. p. 150, 151, 154, 164, 171, 174, 180, 181, 184
13. Benedik PS, Hamlin SK. The physiologic role of erythrocytes in oxygen delivery and implications for blood storage. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2014 Sep;26(3):325-35.
14. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Mar 1;3(3):a011858.
15. Brown HM, Anastasi MR, Frank LA, Kind KL, Richani D, Robker RL, et al. Hemoglobin: a gas transport molecule that is hormonally regulated in the ovarian follicle in mice and humans. *Biol Reprod*. 2015 Jan;92(1):26.
16. Dean L, National Center for Biotechnology Information (U.S.). Blood groups and red cell antigens. [Bethesda, Md.]: NCBI; 2005. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=rbcantigen.TOC&depth=2>
17. Franchini M, Bonfanti C. Evolutionary aspects of ABO blood group in humans. *Clin Chim Acta*. 2015 Apr 15;444:66-71.

18. Eliasson L. Transfusion av blodkomponenter [Internet]. Vårdhandboken2017 [cited 2018-04-08]. Available from: <http://www.vardhandboken.se/Texter/Transfusion-av-blodkomponenter/Oversikt/>.
19. Norda R. Behandling med plasma och Solvent/Detergent-behandlad plasma – bakgrundsdokumentation [Internet]. Läkemedelsverket; 2010 [cited 2018-04-15]. Available from: https://lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrekommendationer/bakg_dok/Plasma_bakgrundsdokumentation_bokm.pdf.
20. van der Meer PF, de Korte D. Active cooling of whole blood to room temperature improves blood component quality. *Transfusion*. 2011 Feb;51(2):357-62.
21. van der Meer PF, de Wildt-Eggen J. The effect of whole-blood storage time on the number of white cells and platelets in whole blood and in white cell-reduced red cells. *Transfusion*. 2006 Apr;46(4):589-94.
22. Transfusionsmedicin. Metodbeskrivningar Komponentberedning. Blekingesjukhuset Karlskrona; 2018.
23. Rudmann SV. Textbook of blood banking and transfusion medicine. 2. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. xviii, 686 s. p. 232-257
24. Gulliksson H, Knutson F. Handbok för blodcentraler. Kapitel 4: Blodkomponenter: framställning och användning: Svensk förening för transfusionsmedicin; 2015. p. 5-7, 11-2, 9.
25. Gulliksson H. Handbok för blodcentraler. Kapitel 5: Blodkomponenter: kvalitetssäkring och kontroll: Svensk förening för transfusionsmedicin; 2014. p. 5-15.
26. EDQM. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components. European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS). 16th ed: Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe; 2010. p. 113, 114, 117-120, 137, 219, 316.
27. Basu D, Kulkarni R. Overview of blood components and their preparation. *Indian J Anaesth*. 2014 Sep;58(5):529-37.
28. Hettich. Roto Silenta 630 RS [Internet]. Andreas Hettich GmbH & Co.KG; 2018 [cited 2018-03-12]. Available from: <https://www.hettichlab.com/en/product/roto-silenta-630-rs/>.
29. MacoPharma. Macopress Smart Revo [Internet]. MacoPharma; 2018 [cited 2018-03-12]. Available from: <http://www.macopharma.com/en/category/transfusion/blood-processing/equipment/macopress-smart-revo/>.
30. Watson JJ, Pati S, Schreiber MA. Plasma Transfusion: History, Current Realities, and Novel Improvements. *Shock*. 2016 Nov;46(5):468-79.
31. Pereira P, Seghatchian J, Caldeira B, Santos P, Castro R, Fernandes T, et al. Sampling methods to the statistical control of the production of blood components. *Transfus Apher Sci*. 2017 Dec;56(6):914-9.
32. Pandey S, Vyas GN. Adverse effects of plasma transfusion. *Transfusion*. 2012 May;52 Suppl 1:65s-79s.
33. GeBlod. Plasmagivning [Internet]. GeBlod.nu 2017 [cited 2018-04-06]. Available from: <https://geblod.nu/blodochblodgrupper/plasmagivning/>.
34. ISPE. What is GMP [Internet]. International Society for Pharmaceutical Engineering; 2018 [cited 2018-04-15]. Available from: <https://www.ispe.org/initiatives/regulatory-resources/gmp/what-is-gmp>.

35. Contreras M, Ala FA, Greaves M, Jones J, Levin M, Machin SJ, et al. Guidelines for the use of fresh frozen plasma. British Committee for Standards in Haematology, Working Party of the Blood Transfusion Task Force. *Transfus Med.* 1992 Mar;2(1):57-63.
36. Medicinsk ordbok. Hypoxemi [Internet]. 2018 [cited 2018-04-05]. Available from: <http://medicinskordbok.se/component/content/article/9-b/53413-hypoxemi>.
37. Hendrickson JE, Tormey CA. Understanding red blood cell alloimmunization triggers. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016 Dec 2;2016(1):446-51.
38. Siemens Healthcare Diagnostics. Siemens Healthcare Diagnostics reagenssticka för urinanalys. 2012.
39. Siemens Healthineers. Innovative urinalysis test strips with ID bands [Internet]. Siemens Healthcare AB; 2018 [cited 2018-04-09]. Available from: <https://www.healthcare.siemens.se/point-of-care-testing/featured-topics-in-poct/urinalysis-featured-topics/innovative-urinalysis-test-strips-id-bands>.
40. Siemens Healthcare Diagnostics. Clinitek Advantus Analyzer: Användarhandbok. Siemens Healthcare Diagnostics Inc.; 2008.
41. Svensk MeSH. Pleura [Internet]. Karolinska Institutet; 2018 [cited 2018-04-12]. Available from: <https://mesh.kib.ki.se/term/D010994/pleura>.
42. Svensk MeSH. Peritoneum [Internet]. Karolinska Institutet; 2018 [cited 2018-04-12]. Available from: <https://mesh.kib.ki.se/term/D010537/peritoneum>.
43. Sundqvist C. Dialys, peritonealdialys [Internet]. *Vårdhandboken*; 2017 [cited 2018-04-12]. Available from: <http://www.vardhandboken.se/Texter/Dialys-peritonealdialys/Oversikt/>.
44. Siemens Healthcare Diagnostics. Advia 2120: Body fluid application. Siemens Healthcare Diagnostics Inc.; 2010. p. 4, 5, 9.
45. Siemens Healthcare Diagnostics. Advia 2120 Hematology Systems: Operator's guide. Siemens Healthcare Diagnostics Inc.; 2010. p. 8-15, 21, 22, 27, 307-309, 320, 365, 367, 368.
46. Siemens Healthcare Diagnostics. Advia 2120i hematology system with autoslide [Internet]. 2018 [cited 2018-04-11]. Available from: <https://www.healthcare.siemens.se/hematology/systems/advia-2120-hematology-system-with-autoslide/technical-specifications>.
47. Klinisk kemi. Handhavandebeskrivning Advia 2120. Blekingesjukhuset Karlskrona; 2018.
48. Nationalencyklopedin. Iso- (förled) [Internet]. Nationalencyklopedin 2018 [cited 2018-05-30]. Available from: <https://www-ne-se.proxy.lnu.se/uppslagsverk/ordbok/svensk/iso->.
49. Culibrk B, Stone E, Levin E, Weiss S, Serrano K, Devine DV. Application of the ADVIA cerebrospinal fluid assay to count residual red blood cells in blood components. *Vox Sang.* 2012 Oct;103(3):186-93.
50. NanoEnTek. C-Chip Instructions: Disposable hemocytometer. NanoEnTek Inc.; 2013.
51. Wikman A, Hildén J-O. Handbok för blodcentraler. Kapitel 11: Validering inom transfusionsmedicin. 2 ed: Svensk förening för transfusionsmedicin; 2012. p. 5, 7.
52. Johansson L. Kvalitetskontroll av leukocytbefriade komponenter. 1 ed: Region Kronoberg; 2018.

53. Johansson M. Studentarbeten [Internet]. Lunds universitet; 2015 [cited 2018-04-18]. Available from: <https://www.forskningsetik.lu.se/forskningsetisk-information/etikprovning/studentarbeten>.
54. Lag (2003:460) om etikprovning av forskning som avser människor, 2003:460 (2003).

BILAGOR

Bilaga A: Beräkningar

Formel för beräkning av antalet erythrocyter per liter från antalet funna erythrocyter i Bürkers räknekammare (52).

$$\frac{\text{antalet funna erythrocyter} \times 2}{0,9 \times 1000} = \text{antalet celler} \times 10^9 \text{ per liter}$$

Bilaga B: Rådata

Redovisning av samtliga 38 provers erhållna resultat ur de tre metoderna Multistix 8 SG, Advia 2120 och Bürkers räknekammare.

Tappningsnummer	Multistix 8 SG	Advia 2120 (x10 ⁹ /L)	Bürkers räknekammare (x10 ⁹ /L)
2923	+/-	<10	0,047
2927	+	<10	0,10
2929	+/-	<10	0,076
2966	2+	<10	0,71
2968	2+	<10	0,57
2969	3+	<10	1,58
3003	2+	<10	0,74
3005	3+	<10	2,58
3006	3+	<10	6,45
3006 (recent.)	+/-	<10	0,1
3007	+	<10	0,36
3060	2+	<10	1,22
3064	2+	<10	1,92
3065	2+	<10	0,99
3081	Neg	<10	0,018
3083	+/-	<10	0,069
3083-1	3+	<10	7,79
3087	+/-	<10	0,024
3159	+	<10	0,57
3193	2+	<10	1,98
3194	+	<10	1,044
3200	2+	<10	1,83
3159-1	3+	<10	6,05
3159-2	3+	<10	6,59
3159-3	3+	<10	6,73
3159-4	3+	<10	7,25
3159-5	3+	<10	8,31
3159-6	3+	<10	8,79
3159-7	3+	<10	9,80
3159-8	3+	10	10,75
3159-9	2+	<10	1,54
3159-10	2+	<10	1,73
3159-11	2+	<10	1,96
3159-12	2+	<10	2,28
3159-13	3+	<10	2,58
3159-14	3+	<10	2,70
3159-15	3+	<10	2,91
3159-16	3+	<10	3,14



Linnéuniversitetet

391 82 Kalmar
Tel 0480-446200
info@lnu.se
Lnu.se