



# Olika pH i cerebrospinalvätska och dess effekt på leukocyters stabilitet

**Sofia Lindberg**

Vårterminen 2015  
Examensarbete, 15 hp  
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp



Institutionen för Klinisk mikrobiologi  
Biomedicinsk laboratorievetenskap  
Biomedicinska analytikerprogrammet  
Examensarbete, 15 hp  
Kursansvarige lärare: Ylva Hedberg Fransson [ylva.hedberg.fransson@umu.se](mailto:ylva.hedberg.fransson@umu.se)

## **Different pH of the Cerebrospinal Fluid and its Effect on Leukocyte Stability**

**Handledare: Stefan Marklund och Anna-Maria Grimmer**

**Institutionen för medicinsk biovetenskap, Klinisk kemi, Umeå universitet**

**Läroproponent: Ylva Hedberg Fransson**

**Examinator: Mari Norgren**

**Datum för godkännande: 2015 – 06 - 09**

## Abstrakt

Cerebrospinalvätska (CSV) pH-kontrolleras huvudsakligen av  $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$  buffertsystemet. Det medför att pH stiger markant om  $\text{CO}_2$  tillåts avgå efter lumbalpunktion. Hur pH-förändring påverkar leukocyters stabilitet är oklart. Studiens syfte var att undersöka hur stabiliteten hos leukocyter påverkas av pH-höjningar som sker till följd av att  $\text{CO}_2$  avgår. CSV och buffertar blandades till olika pH och sedan tillsattes leukocyter. Cellerna räknades på Sysmex XE-5000 samt i Bürkerkammare. Ingen förändring i koncentrationen av mononukleära celler kunde ses för något pH över tid, men det var en signifikant skillnad i cellkoncentration mellan olika pH. En relativt tydlig trend kunde ses där koncentrationen av polymorfkärniga leukocyter minskade under de tre första timmarna för samtliga pH vid cellräkning i Sysmex. Minskade cellkoncentrationen av polymorfkärniga leukocyter observerades vid räkning av celler i Bürkerkammare under hela tidsperioden (0-24 timmar). Signifikant skillnad i cellkoncentrationen noterades vid de olika pH för celler räknade i Sysmex, men inte i Bürkerkammare. Konklusionen av studien var att mononukleära leukocyter var relativt stabila vid olika pH under en längre tidsperiod. Däremot verkar det som att polymorfkärniga leukocyter var mer känsliga för förvaring vid förhöjda pH.

## Nyckelord

Cerebrospinalvätska, pH, leukocyter, buffert, Sysmex XE-5000, Bürkerkammare

# Introduktion

Cerebrospinalvätska (CSV) är i normala fallet en genomskinlig vätska som finns i subaraknoidalrummet samt ventriklarna och omger hjärnan samt ryggmärgen och fungerar som ett skydd. CSV har förutom den skyddande och stötdämpande funktionen även i uppgift att avlägsna ämnen som exempelvis CO<sub>2</sub> och laktat från hjärnans metabolism. Det produceras ungefär 500-600 ml CSV dagligen och största produktionen, cirka 70 %, sker i plexus choroideus som utgörs av många kärlnystan som filtererar plasma till CSV. Resterande del av CSV, 30 %, bildas i hjärnparenkymet (1, 2).

Normal CSV är nästintill protein- samt cell-fri och ska varken innehålla erythrocyter eller polymorfkärniga leukocyter, neutrofiler, samt endast låga nivåer av mononukleära leukocyter, monocytter och lymfocyter. Ett blodigt CSV-prov med onormalt många erythrocyter beror i regel på två orsaker, stickblödningar eller intrakraniella blödningar, oftast subaraknoidalblödningar. Vid bland annat encefaliter och meningiter ses ofta en ökning av leukocytantalet i CSV, så kallad pleocytos. Vid bakteriell meningit ökar framförallt de polymorfkärniga leukocyterna, medan det vid virusmeningit ses ett ökat antal mononukleära leukocyter. Analyser av CSV är ofta akuta, därför är det synnerligen viktigt med snabba och korrekta provsvar för att diagnos ska kunna sättas och behandling påbörjas direkt och därmed öka patientens överlevnadschans (2, 3).

På grund av att CSV innehåller tämligen lite proteiner jämfört med blod, är CSV mycket svagt buffrad och den väsentliga kontrollen av pH sker via CO<sub>2</sub> ↔ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffertsystemet. Den dåliga buffringsförmågan leder i sin tur att pH lätt påverkas när CO<sub>2</sub> avgår från CSV efter lumbalpunktion och pH kan relativt snabbt stiga från 7,4, som är det normala, upp mot pH 9-10 (4-6). De preanalytiska faktorerna som kan påverka pH i CSV är många och man har från tidigare studier visat att framförallt förvaringen av proverna har en stor roll i hur mycket CO<sub>2</sub> som tillåts avgå. Nerfrysning vid -80°C, val av rör och förslutning med täta korkar är några av de faktorer som minskar CO<sub>2</sub>-avgången (7, 8). Vilken effekt denna pH-förändring har på celler i CSV är relativt okänd då lite forskning har gjorts på detta område. Resultatet från en tidigare studie visar att erythrocyternas stabilitet minskar och cellerna därmed lyserar (8). Vid en studie på CSV och bakteriell överlevnad erhöles ett liknade resultat, de bakterier som inkuberats i förhållanden där pH hade ökat hade sämre överlevnad. De såg även en påverkan av pH-ökningen vid agglutinationstester, då det bland annat tog längre tid innan positivitet påvisades, vilket ökar risken för falskt negativa tester. Förvaringen av provet efter en lumbalpunktion har också betydelse för pH. Prover som förvaras i atmosfär med 5 % CO<sub>2</sub> vid 37°C, som i ett cellodlingsskåp, får ingen märkbar förändring av pH, medan ett prov som fått stå i luft vid 37°C visar ökat pH (5).

Det traditionella sättet att räkna leukocyter i CSV har länge varit att celler färgas in med Türks reagens och räknas sedan i Bürkerkammare. Hematologiinstrumentet Sysmex XE-5000 kan, med sitt "body fluid mode", användas för automatiserad analys av leukocyter i flera kroppsvätskor inklusive CSV (9-11). Sysmex XE-5000 är ett instrument som använder fluorescensflödescytometri för att analysera, räkna och differentiera mellan celler. Inga förberedelser krävs före analys, utan provet späds och

cellerna färgas in med fluorescerande polymetinfärg automatiskt i instrumentet. Vid differentiering mellan leukocyter lyseras erythrocyterna och i leukocyternas membran bildas porer, vilka gör att den fluorescerande färgen kan binda till cellernas nukleinsyra. Med laserstrålen på 633 nm kan man differentiera mellan de olika leukocyttyperna samt särskilja dem från andra celler. Laserstrålen kan avge tre olika signaler; side scatter som ger information om den inre cellstrukturen, forward scatter om cellstorleken samt side fluorescens scatter som ger information om mängden RNA/DNA i cellen. Differentieringen av leukocyter sker i en specifik diff-kanal och räkning av erythrocyterna sker i impedans-kanalen. Vid analysen erhålls antalet av de olika cellerna och ett scattergram som visar cluster med de celler som har liknande egenskaper. Vid användning av "body fluid mode" erhålls koncentrationen av leukocyter (WBC-BF) samt erythrocyter (RBC-BF), andelen mononukleära och polymorfkärniga, samt totala antalet kärnförande celler (TC-BF) (12-15).

Studiens syfte var att undersöka hur stabiliteten hos leukocyter påverkas av den pH-höjning som sker till följd av att CO<sub>2</sub> avgår från CSV och därmed kunna förbättra de preanalytiska rutinerna kring provhanteringen.

# Material och metoder

## **Cerebrospinalvätska**

Normala och i princip cellfria CSV-prover samlades in från manliga och kvinnliga patienter vid Klinisk kemi, Norrlands universitetssjukhus, Umeå mellan december 2014 till början av maj 2015. Totalt samlades det in cirka 37 ml cellfri-CSV. Urvalskriterierna var en cellkoncentration på  $<10 \times 10^6$  celler/L och en albuminkoncentration  $<360$  mg/L. Även en mindre mängd, cirka 20 ml, med CSV som inte uppfyllde kriterierna samlades in för pH-kontroll. Proverna centrifugerades, supernatanten hälldes över till ett avkodat rör, korkades och förvarades vid  $-70^\circ\text{C}$ .

## **pH-kontroll av CSV efter bufferttillsats**

Buffringsförmågan hos cellvänliga och atoxiska Hepes- och TRIS-buffertar testades på "slask-CSV" genom mätning av pH i 0,2 M Na Hepes med pH 7,3; pH 7,1; pH 6,9 och pH 6,7 samt 0,2 M TRIS-HCl pH 8,2; pH 8,0; pH 7,8 och pH 7,6. Slask-CSV spädde med en del buffert och nio delar slask-CSV. För Hepes pH 7,3 samt TRIS-HCl pH 8,2 mättes även hur pH förändrades under 24 tim. pH kontrollerades även i slask-CSV innan tillsatts av buffert. Buffertarna var koncentrerade, nära isoton lösning, för att kunna upprätthålla en cellvänlig CSV. Efter försöken valdes den Hepes-buffert ut som gav ett pH nära 7,4 för att representera CSV *in vivo* och TRIS valdes för ett pH nära 8,2 för att företräda ett typiskt prov på labb.

## **Provförberedelser**

CSV tinades, poolades ihop, sterilfiltrerades (Bottle top filter, Sarstedt, Newton, USA) och spädde sedan med en del buffert (0,2 M Na Hepes pH 7,1 respektive 0,2 M TRIS-HCl pH 8,2) och nio delar CSV i två rör för respektive pH. Rören frystes in i  $-70^\circ\text{C}$  och tinades på morgonen då försöken skulle genomföras. För framställande av CSV med riktigt högt pH tilläts ett rör spädd med en del 0,9 % NaCl och nio delar sterilfilterad CSV stå framme i rör med kork över natt. Totalt förbereddes tre rör, ett för respektive pH.

## **Cellpreparationer**

För isolering av mononukleära celler användes Lymphoprep<sup>®</sup> (AXIS-SHIELD, Oslo, Norge). Blodprov togs i ett EDTA-rör och spädde sedan 1:2 med 0,9 % NaCl. Sex ml spädd blod tillsattes till ett centrifugrör och därefter applicerades tre ml Lymphoprep<sup>®</sup> (9,1 % natrium diatrizoat och 5,7 % polysackarider) försiktigt under blodet med en pasteurpipett och korkades. Röret centrifugerades 20 min vid 800 g i en swing-out rotor vid rumstemperatur (RT). Efter centrifugering kunde ett distinkt band med mononukleära celler pipetteras upp. Cellerna spädde med 0,9 % NaCl samt centrifugerades tio min vid 250 g vid RT. Supernatanten kasserades, pelleten resuspenderades i 0,9 % NaCl och centrifugerades igen tio min vid 250 g vid RT. Därefter resuspenderades pelleten i fosfat-buffrad saltlösning (PBS).

För utvinnande av polymorfkärniga celler användes Polymorphprep<sup>®</sup> (AXIS-SHIELD). Blodprov togs i ett EDTA-rör, sedan överfördes fem ml av blodet till ett centrifugrör och fem ml Polymorphprep<sup>®</sup> (13,8 % natrium diatrizoat och 8,0 % Dextran 500) tillsattes försiktigt under blodet med en pasteurpipett och korkades. Röret centrifugerades i en swing-out rotor 30 min vid 500 g vid RT och de

polymorfkärniga cellerna skördades och blandades med 0,9 % NaCl som späts 1:2 med vatten. Cellerna centrifugerades tio min 400 g vid RT, supernatanten avlägsnades och cellerna resuspenderades i spädd NaCl. Cellerna centrifugerades slutligen vid 400 g tio min vid RT och resuspenderades i 0,9 % NaCl.

Cellkoncentrationen fastställdes för både Lymphoprep<sup>®</sup> och Polymorphprep<sup>®</sup> med hjälp av analys i Sysmex och cellerna späddes till en koncentration på  $150 \times 10^6$  celler/L med CSV som buffrats till två olika pH (cirka pH 7,4 och 8,1) samt CSV som fått stå framme över natt.

### **Cellräkning**

Automatisk cellräkning utfördes på Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) med "body-fluid mode" vid fem tillfällen (0; 1, 3; 6 och 24 tim efter celltillsats i CSV) för samtliga tre pH. Instrumentet ställdes om från "helblods mode" till "body-fluid mode", vilket tog cirka 195 sek då instrumentet utförde en "background check" för att undvika kontaminering av provet. Proven analyserades i "open mode" i instrumentets diff-kanal och vid varje analys åtgick cirka 130 µl prov. Varje prov analyserades som dubbelprover, det vill säga två gånger, för alla pH och vid alla tidpunkter.

Manuell cellräkning genomfördes med Bürkerkammare vid fem tillfällen, 0; 1; 3; 6 och 24 tim efter celltillsats i CSV, för alla tre pH. Tio stycken A-rutor räknades för varje prov och tidpunkt. Türks lösning blandades 1:2 med CSV och därefter räknades cellerna i Bürkerkammare med 20× förstoring på objektivet.

### **Statistik**

De statistiska analyserna utfördes i SPSS (IBM SPSS Statistics, version 22). Spearman korrelationsanalys utfördes för jämförelse av analysmetodernas överensstämmelse. Friedmans test genomfördes för att undersöka eventuella signifikanta skillnader i cellkoncentrationen mellan olika pH. Signifikansnivån sattes till  $p < 0,05$ .

### **Etiska överväganden**

Ingen etisk ansökan krävdes då studien var en klinisk metodutveckling samt att materialet bestod av avkodade CSV-prover och ingen härledning till patient kunde göras. Blodprover kom från donator som informerats om studien och därefter gav sin tillåtelse av användning av provet till forskning.

# Resultat

## Effekt på pH efter bufferttillsats i CSV

Start-pH i CSV innan tillsatts av buffert var 8,82 och efter tillsatts av HEPES- och TRIS-buffert med olika pH förändrades pH i CSV i varierande grad (Tab. 1). För HEPES pH 7,3 och TRIS pH 8,2 sågs ingen markant skillnad i pH under 24 tim. För HEPES varierade pH under 24 tim mellan 7,64–7,86 och för TRIS låg värdena mellan 8,46–8,63.

## Cellpreparationernas kvalitet och utbytet av celler

Leukocytkoncentrationen efter genomförd Lymphoprep<sup>®</sup> var  $6263 \times 10^6$  celler/L, varav 97,8 % av dessa var mononukleära celler. Erytrocytkoncentrationen var  $3300 \times 10^6$  celler/L, cirka 30 % av det totala cellantalet. Leukocytkoncentrationen efter genomförd Polymorphprep<sup>®</sup> var  $4122 \times 10^6$  celler/L, varav 98,4 % av dessa var polymorfkärniga celler. Erytrocytkoncentrationen var  $2200 \times 10^6$  celler/L, cirka 30 % av det totala cellantalet.

## Antalet mononukleära celler i CSV med olika pH under tid

Medelvärden för Sysmex dubbelkörningar beräknades för samtliga pH och tidpunkter. För HEPES-buffrad CSV varierade koncentrationen mellan  $96-128 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. Den TRIS-buffrade CSV hade en koncentration mellan  $51-58 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. CSV med högt pH erhöll en cellkoncentration mellan  $80-102 \times 10^6$  celler/L under 24 tim (Fig. 1A).

Cellkoncentrationen vid räkning i Bürkerkammare för HEPES-buffrad CSV blev  $82-96 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. CSV buffrad med TRIS erhöll mellan  $36-68 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. För CSV med högt pH var koncentrationen  $62-96 \times 10^6$  celler/L under 24 tim (Fig. 1B).

Ingen trend i förändring av koncentrationen av leukocyter kunde ses för något pH över tid vid analys med Sysmex eller Bürker-räkning. Däremot fanns en signifikant skillnad i cellkoncentrationen mellan de olika pH, både för celler räknade på Sysmex samt Bürker (Fig. 1).

## Antalet polymorfkärniga celler i CSV med olika pH under tid

Ett medelvärde beräknades för samtliga tidpunkter och pH för Sysmex dubbelkörningar. I HEPES-buffrad CSV var cellkoncentrationen mellan  $133-160 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. Den TRIS-buffrade CSV:n hade en koncentration mellan  $99-136 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. CSV med högt pH erhöll en koncentration mellan  $88-131 \times 10^6$  celler/L under 24 tim (Fig. 2A.)

Vid räkning av celler i Bürkerkammare för HEPES-buffrad CSV blev koncentrationen mellan  $120-156 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. CSV buffrad med TRIS erhöll en koncentration mellan  $74-110 \times 10^6$  celler/L under 24 tim. För CSV med högt pH var koncentrationen mellan  $38-122 \times 10^6$  celler/L under 24 tim (Fig. 2B).

En relativt tydlig trend sågs där koncentrationen polymorfkärniga leukocyter framförallt minskade under de tre första timmarna för samtliga pH vid cellräkning i Sysmex. Vid mätningarna efter tre tim



var förändringen i princip obefintlig (Fig. 2A). Vid Bürkerräkningen erhöles en liknande trend med en minskad koncentration polymorfkärniga leukocyter under hela tidsperioden, 0-24 tim, för TRIS pH 8,2 samt högt pH. För Hapes pH 7,1 var cellkoncentrationen relativt konstant (Fig. 2B). Det fanns en signifikant skillnad i cellkoncentrationen mellan olika pH för celler räknade i Sysmex, men inte i Bürkerkammare.

### **Analysmetodernas korrelation**

Generellt kunde man se en högre cellkoncentration för Sysmexräkningen jämfört mot Bürkerkammare. Analysmetoderna resultat överensstämde bra med 0,886 korrelationskoefficienten vid jämförelse med resultaten från mellan Sysmex och Bürkerkammare, oberoende av pH samt cellpreparationsmetod och ett signifikant p-värde erhöles (Fig. 3).

## Diskussion

De preanalytiska faktorerna som kan påverka pH-förändringar i CSV är många och viktiga att tänka på, för att minska påverkan på provmaterialet vid provhantering (7). Vid denna studie användes CSV som frysts ner till  $-70^{\circ}\text{C}$ , i små rör som tillslutits med kork, för att undvika  $\text{CO}_2$  avgång och därmed en förändring i pH. Inför försöken poolades CSV ihop och sterilfiltrerades för att utgöra jämförelsematerial samt minska risken för bakteriell tillväxt. Därefter tillsattes buffertar för att justera pH. Tre olika pH på buffertarna valdes för att representera tre olika typer av fall, ett som representerar CSV *in vivo*, det vill säga pH 7,4. De två andra pH representerar ett typiskt pH på labb, ungefär pH 8,2, samt ett vid maximal  $\text{CO}_2$  förlust, ungefär pH 9. De två ursprungliga buffertarna med pH 7,3 och 8,2 gav inte det slut-pH i CSV som förväntats och därmed fick de titreras ner. Av de nya buffertarna valdes den som gav bäst slut-pH ut till de riktiga försöken med sterilfiltrerad CSV. Hepes och TRIS-buffert valdes för att de är cellvänliga atoxiska buffertar. Koncentrationen på buffertarna, 0,2 M, valdes för att de skulle vara så isotona som möjligt och därmed undvika lysering eller skrupning av celler. Resultaten visade att det går bra att tillsätta buffert till CSV för att kunna bibehålla ett önskat pH. Förmodligen är ett pH nära 7,4, det vill säga som *in vivo* det mest optimal för cellerna. Det mest optimala pH, för en eventuell buffert som sätts till CSV, bör studeras mer för att kunna bestämma CSV buffringsförmåga och hur CSV samt cellerna påverkas av tillsats av olika typer av buffertar. I framtiden innehåller provtagningsrören vid lumbalpunktion kanske en liten mängd cellvänlig buffert, för att undvika problemet med pH ökning vid labbhantering.

För att preparera fram de två olika celltyperna, mononukleära och polymorfkärniga celler, användes Lymphoprep<sup>®</sup> och Polymorphprep<sup>®</sup>. Metoderna krävde en hel del träning och förberedelser, framförallt av Polymorphprep<sup>®</sup>, innan bra resultat kunde erhållas. Polymorphprep<sup>®</sup> var svårare att jobba med, på grund av vätskans flyktighet. Det var svårare att skörda de polymorfkärniga cellerna eftersom de fanns just ovanför de mononukleära cellerna. Separationen blev generellt något sämre med Polymorphprep<sup>®</sup> än för Lymphoprep<sup>®</sup>, vilket gjorde det svårare att skörda cellerna. Det var lättast att använda en pasteurpipett för att applicera Lymphoprep<sup>®</sup>/Polymorphprep<sup>®</sup> under blodet och därmed minska omblandning mellan blodet och cellseparationsmediet. Andra faktorer som påverkade utfallet av separationen var separationsmediets temperatur, rumstempererad var att föredra jämfört med kylskåpstempererad, samt hur färskt blodet var, helst mindre än två tim. När patientproverna analyserades erhöles bra separation av cellerna och det var relativt lätt att skörda dem. Vid koncentrationsbestämningen i Sysmex erhöles ett bra resultat då det var 97,8 % mononukleära respektive 98,4 % polymorfkärniga leukocyter av det totala cellantalet. Nämnvärt kan vara att koncentrationen av erytocyter var betydligt högre jämfört med vad företaget (AXIS-SHIELD) angav samt att cellpelleten var relativt röd. Enligt dem brukar kontaminationen av erytocyter ligga mellan 3-10 % för Lymphoprep<sup>®</sup> och 2-6 % för Polymorphprep<sup>®</sup> av det totala cellantalet (16-17). Trots den ökade erytocytkontaminationen visar denna studie att Lymphoprep<sup>®</sup> och Polymorphprep<sup>®</sup> kan användas för utvinning av önskade celler från helblod, men det krävs mycket träning.

Sysmex XE-5000 har i flera studier visat bra resultat och kan därför användas kliniskt vid cellräkning i kroppsvätskor, därmed ökar möjligheten för labben att upprätthålla en god 24 tim service med snabba

provsvär. Metoden har visat sig ha vissa begränsningar, bland annat en minskad tillförlitlighet vid cellräkning vid låga cellkoncentrationer och svårigheter med att kunna differentiera mellan mononukleära och polymorfkärniga celler (9-11). Det finns även studier där man avråder användning av automatisk cellräkning då tillförlitligheten är för osäker och där resultaten varierar för mycket (18). Vid denna studie kompletterades den automatiska cellräkningen med manuell räkning i Bürkerkammare och generellt visades en mycket god korrelation mellan de två analysmetoderna. Den manuella räkningen var mer tidskrävande samt krävde mycket mängdträning och erfarenhet för att öka precisionen och just brist på egen erfarenhet kan vara en faktor som kan ha påverkat resultatet. Trots den goda korrelationen syntes ändå en tydlig trend där cellkoncentrationen generellt alltid blev högre vid Sysmexräkningen jämfört med räkning i Bürkerkammare. Orsaken till detta skulle eventuellt kunna vara att Sysmex räknar döda celler som man i mikroskopet endast uppfattar som cellfragment. Liknade resultat med högre cellkoncentration vid Sysmexräkning har setts i tidigare studier och även där verkar det oklart vad som är den bakomliggande orsaken (9, 10).

För att kringgå problemet med dålig precision vid en låg cellkoncentration valdes  $150 \times 10^6$  celler/L som en lämplig koncentration. När cellerna sedan tillsattes till CSV varierade cellkoncentrationen relativt mycket vid tidpunkten noll, men det fanns en signifikant skillnad i cellkoncentrationen mellan de olika pH-värdena för mononukleära celler oberoende av analysmetod samt för de polymorfkärniga cellerna som analyserats på Sysmex. Variationen i cellkoncentrationen kan bland annat berott på att cellerna hann sedimentera ner på botten av förvaringsröret och blev därmed inte tillräckligt omblandade innan de tillsattes till CSV. Ingen tydlig minskning i cellkoncentrationen kunde ses över tid för de mononukleära cellerna. Detta resultat antydde att varken pH eller tid hade någon större roll för de mononukleära cellernas stabilitet i CSV. De polymorfkärniga cellerna minskade för samtliga pH under de tre första timmarna, mätt med Sysmex, men sedan var minskningen nästintill obefintlig. Vid Bürkerkärning sågs en minskning för CSV med TRIS, pH 8,2, samt högt pH under hela tidsperioden. Resultaten indikerar på att polymorfkärniga leukocyter hade en sämre stabilitet och överlevnad i CSV under framförallt de tre första timmarna samt när pH ökade. Möjligen fanns det en grupp polymorfkärniga celler som hade sämre stabilitet och sönderföll under de tre första timmarna och den resterande tiden var det bara de med högre stabilitet kvar. Om detta är fallet eller ej bör undersökas vidare för att öka kunskapen om hur leukocyters stabilitet påverkas av ökat pH under tid i CSV.

Konklusionen av studien var att mononukleära leukocyter var relativt stabila vid olika pH under en längre tidsperiod. Däremot verkar det som att polymorfkärniga leukocyter var mer känsliga för förhöjda pH, tidsaspekter och förvaring. För att verkligen kunna säkerställa hur leukocyters stabilitet påverkas av olika pH i CSV måste mer omfattande studier på detta område göras.

## Tack tillägnas

Jag skulle vilja tacka mina handledare Stefan Marklund och Anna-Maria Grimmer för bra handledning och ovärderlig stöttning genom arbetes gång. Vill även tacka personalen vid Klinisk kemi och Agneta Öberg för all teknisk assistans vid de laborativa momenten.

## Referenser

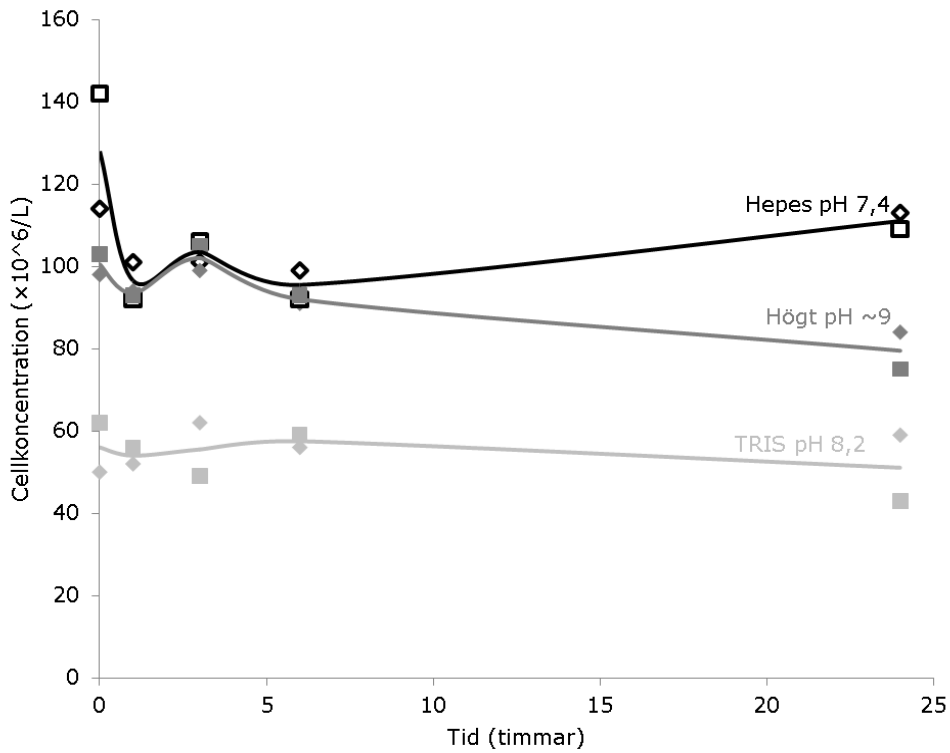
1. NE. Ryggmärgsvätska.  
<http://www.ne.se.proxy.ub.umu.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/ryggm%C3%A4rgsv%C3%A4tska> (2015-03-31)
2. Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E. (2012) Laurells Klinisk Kemi i praktisk medicin, nionde upplagan, Studentlitteratur, ISBN:978-91-44-04787-4, 555-559.
3. Jerrard DA, Hanna JR, Schindelheim GL. Cerebrospinal fluid. J Emerg Med. 2001; 21(2):171-178. doi:10.1016/S0736-4679(01)00360-2
4. Herrera L, Kazemi H. CSF bicarbonate regulation in metabolic acidosis: role of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> formation in CNS. J Apply Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1980; 49(5):778-783.
5. Cunniffe JG, Whitby-Strevens S, Wilcox MH. Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results. J Clin Pathol. 1996; 49(3):249-253. doi: 10.1136/jcp.49.3.249
6. Davies DG. Cerebrospinal fluid sampling technique and Astrup pH and PCO<sub>2</sub> values. J Appl Physiol. 1976; 40(1):123-125.
7. Wuolikainen A, Hedenström M, Moritz T, Marklund SL, Antti H, Andersen PM. Optimization of procedures for collecting and storing of CSF for studying the metabolome in ALS. Amyotroph Lateral Scler. 2009; 10(4):229-236. doi: 10.1080/17482960902871009.
8. Kristensen SR, Salling AM, Kristensen ST, Hansen AB. Unrecognized preanalytical problem with the spectrophotometric analysis of cerebrospinal fluid for xanthochromia. Clin Chem. 2008; 54(11): 1924-1925. doi: 10.1373/clinchem.2008.107367.
9. Li A, Grönlund E, Brattsand G. Automated white blood cell counts in cerebrospinal fluid using the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000. Scand J Clin Lab Invest. 2014; 74(8):673-680. doi: 10.3109/00365513.2014.939994
10. Bore K, Deufel T, Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. Clin Biochem. 2009; 42(7-8):684-691. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.01.025

11. de Jonge R, Brouwer R, de Graaf MT, Luitwieler RL, Fleming C, de Frankijker-Merkestijn M, Sillevius Smitt PA, Boonstra JG, Lindemans J. Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48(5):665-675. doi: 10.1515/CCLM.2010.108.
12. Sysmex. Sysmex XE-5000 Automated Hematology System. <https://www.sysmex.com/ca/en/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-5000-Hematology-Analyzer.aspx> (2015-04-02)
13. Sysmex. Fluorescence flow cytometry. <http://www.sysmex.se/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html> (2015-04-02)
14. Sysmex. WBC differential channel. <http://www.sysmex.se/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/wbc-differential-channel.html> (2015-04-02)
15. Equalis. Body fluids. [http://www.equalis.se/media/126656/johanna-soederlund\\_sysmex.pdf](http://www.equalis.se/media/126656/johanna-soederlund_sysmex.pdf) (2015-04-02)
16. Lymphoprep™ Isolation of human mononuclear cells <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Leaflet%20Lymphoprep.pdf> (2015-05-11)
17. Polymorphprep™ Isolation of human polymorphonuclear cells <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Leaflet%20Polymorphprep.pdf> (2015-05-11)
18. Kleine TO, Nebe CT, Löwer WJ, Dorn-Beineke A. Cell analysis in cerebrospinal fluid (CSF) using Sysmex® hematology analyzers XT-4000I and XE-5000: evaluation with CSF controls of the joint German society for clinical chemistry and laboratory medicine (DGKL). *Cytometry A.* 2012; 81(3):255-264. doi: 10.1002/cyto.a.22014.

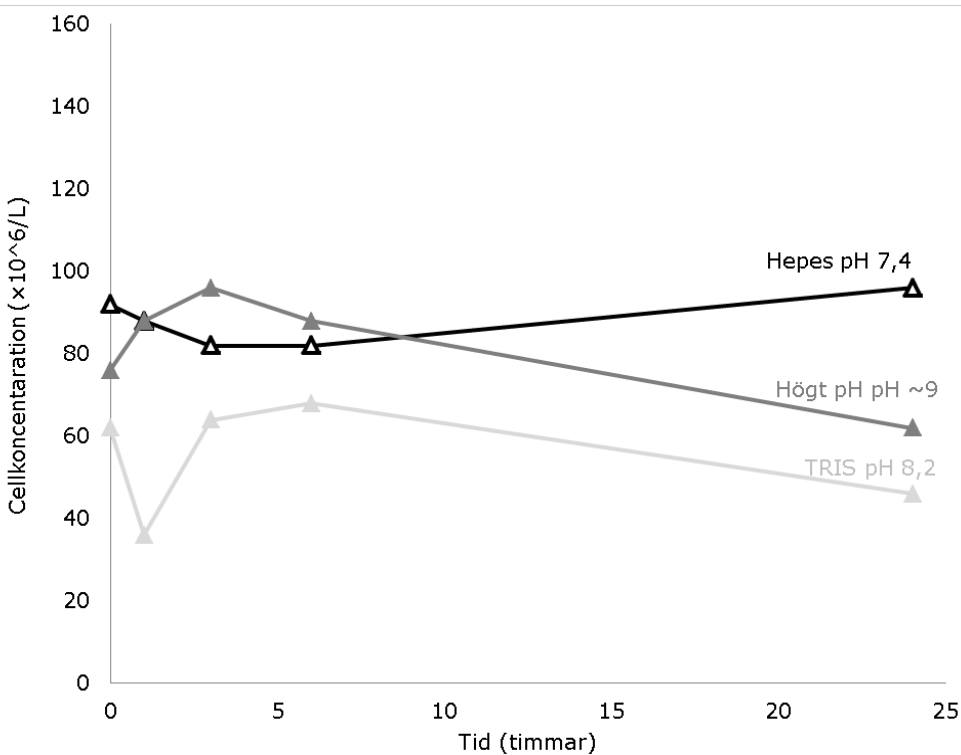
**Tabell 1. Uppmätt pH-värde i CSV med och utan tillsatts av buffert.**

	Uppmätt pH
CSV utan buffert	8,82
CSV + Hepes pH 7,3	7,66
CSV + Hepes pH 7,1	7,44
CSV + Hepes pH 6,9	7,47
CSV + Hepes pH 6,7	7,36
CSV + TRIS pH 8,2	8,46
CSV + TRIS pH 8,0	8,14
CSV + TRIS pH 7,8	8,03
CSV + TRIS pH 7,6	7,85

A



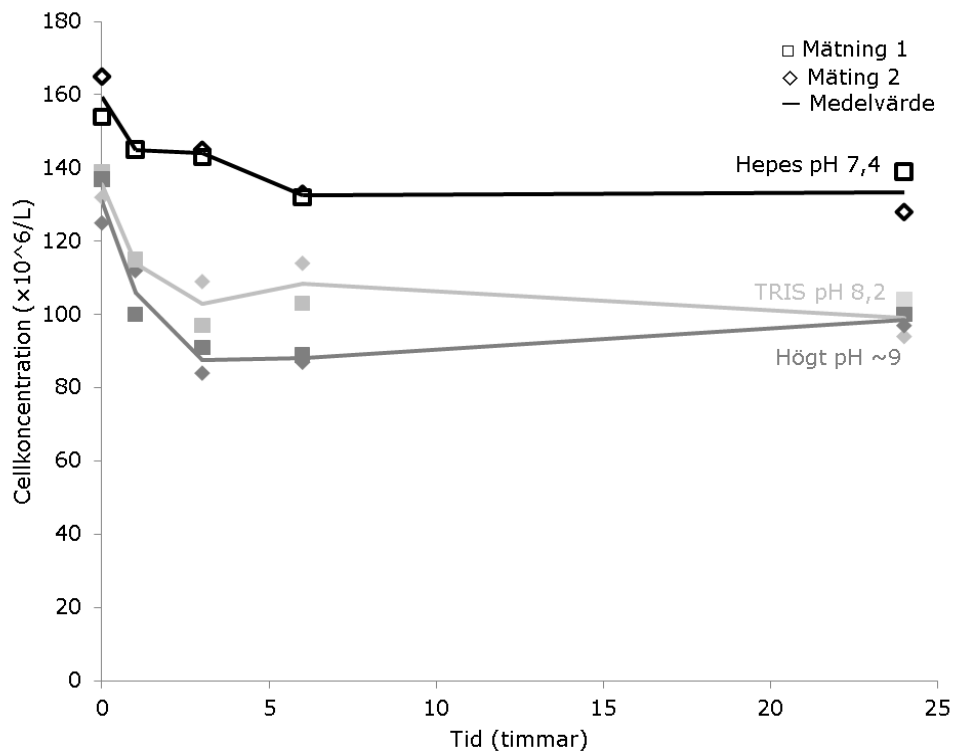
B



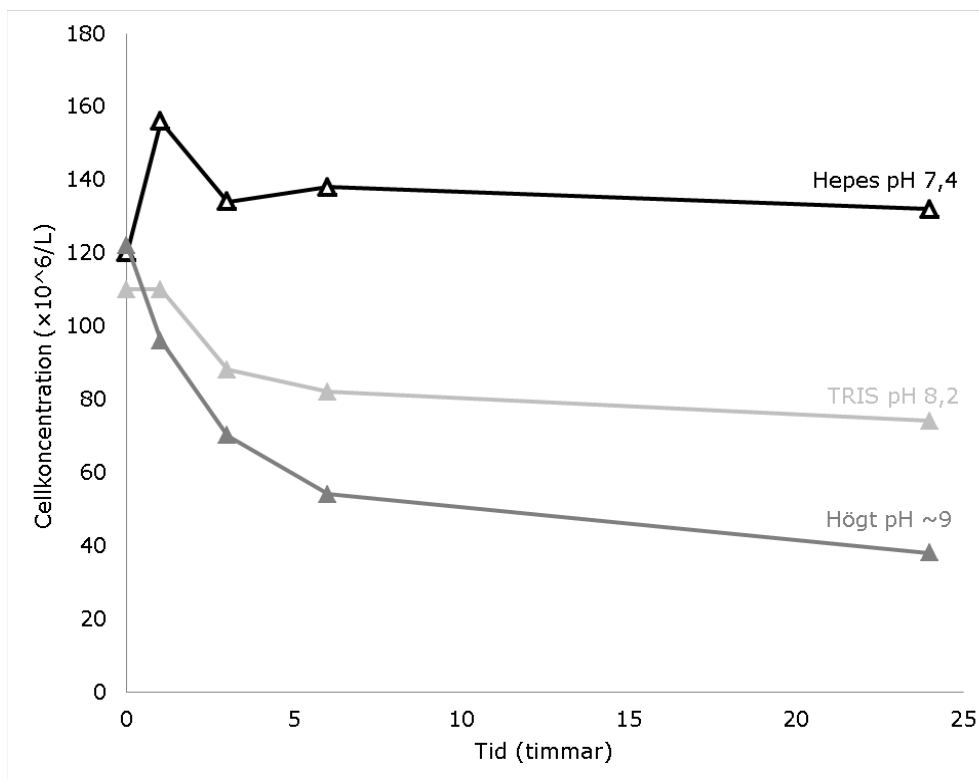
Figur 1. Cellkoncentration av mononukleära leukocyter med A) Sysmex och B) Bürkerkammare, för tre olika pH vid 0; 1; 3; 6 och 24 tim efter celltillsats i CSV. Cellerna preparerades fram med Lymphoprep®. Leukocyterna räknades två gånger i Sysmex och en gång i Bürkerkammare, för varje pH och tidpunkt.



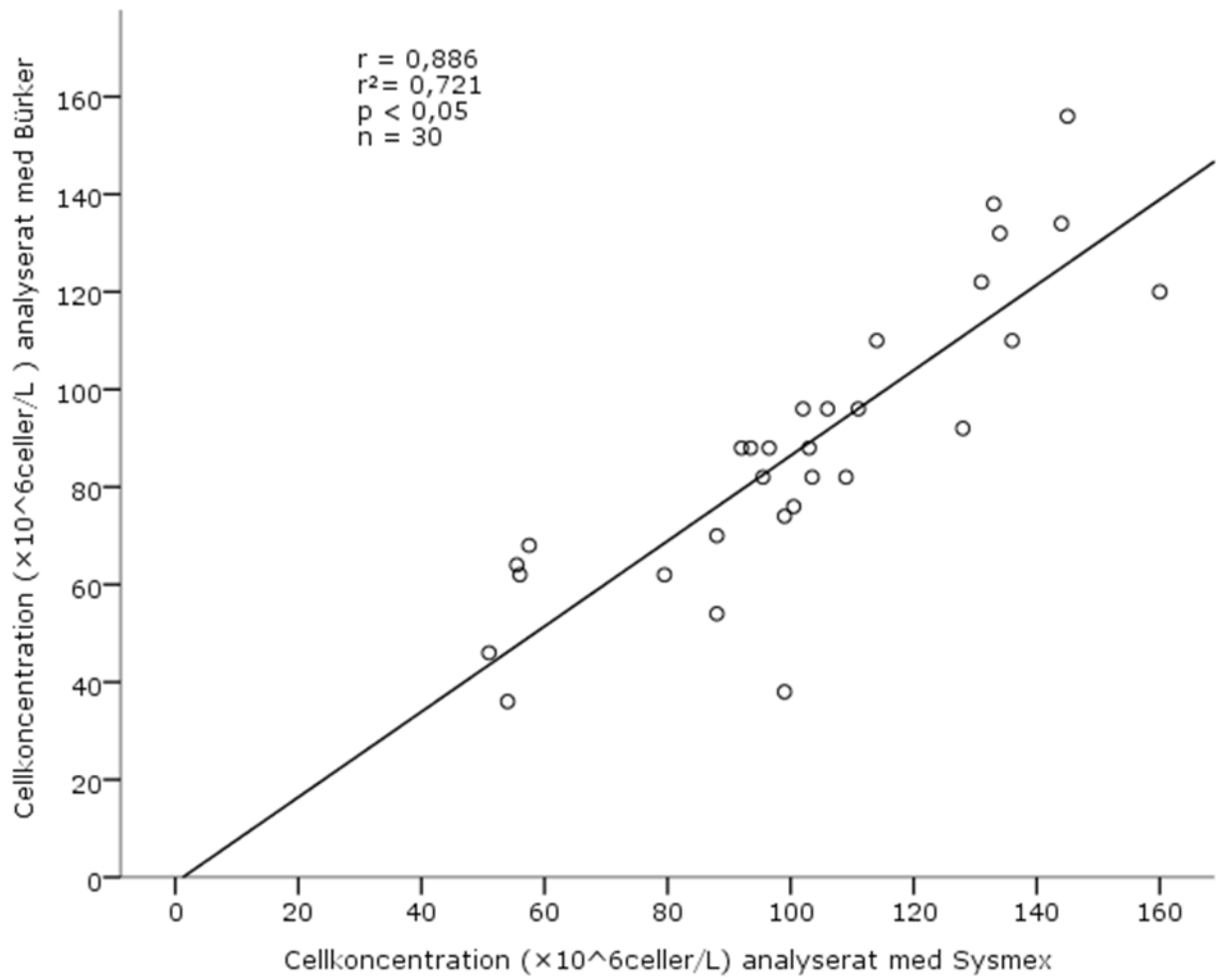
A



B



Figur 2. Cellkoncentrationen av polymorfkärniga leukocyter med A) Sysmex och B) Bürkerkammare, för tre olika pH vid 0; 1; 3; 6 och 24 tim efter celltillsats i CSV. Cellerna preparerades fram med Polymorphprep<sup>®</sup>. Leukocyterna räknades två gånger i Sysmex och en gång i Bürkerkammare, för varje pH och tidpunkt.



Figur 3. Korrelation mellan analysmetoderna, Sysmex och Bürkerkammare, oberoende av pH samt cellpreparationsmetod.