

## Csv-Spektrofotometri

Csv-Spektro,prelsvar **SKA05616**

Csv-Spektro, slutsvar **SKA08502**

### Bakgrund, indikation och tolkning

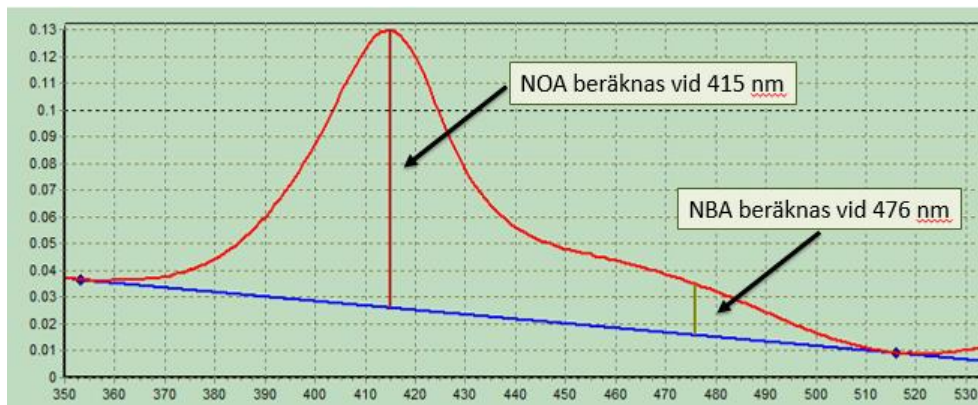
Den huvudsakliga indikationen för Csv-Spektrofotometri är misstänkt subarachnoidalblödning (SAB). Vid blödningar till subaraknoidalrummet tillförs erythrocyter till likvor. Erythrocyterna lyserar i denna miljö och det frisätts oxyhemoglobin som i sin tur enzymatiskt omvandlas till bilirubin. Samtidig förekomst av både oxyhemoglobin och bilirubin i likvor talar således för blödning till subaraknoidalrummet. För att bilirubin ska hinna bildas i tillräcklig mängd ska provtagning (lumbalpunktion) göras tidigast 12 timmar efter symtomdebut. Provet ska ljusskyddas för att undvika nedbrytning av bilirubin i provröret. Provet skall centrifugeras inom 30 min för att undvika att en eventuell stickblödning hemolyserar och orsakar ökning av oxyhemoglobin [1, 2, 3]. Vid stickblödning ses ingen motsvarande ökning av bilirubin eftersom omvandlingen till bilirubin endast sker *in vivo*.

Förekomst och nivå av oxyhemoglobin och bilirubin i likvor bestäms genom absorbansmätning. Vid behov kompletteras med nivåbestämning av bilirubin i plasma samt albumin i likvor och plasma. Resultaten sammanvägs och tolkas avseende förekomst av SAB. Tolkningen utgår från brittiska guidelinens [3] och görs med stöd av mjukvara [4]. Ett preliminärsvärde genereras med automatik och kan efter tekniskt godkännande svaras ut dygnet runt. Ett medicinskt bedömt slutsvar följer på vardagar, dagtid.

### Analysprincip

Likvors absorption av ljus mäts med en spektrofotometer vid våglängder mellan 350 - 600 nm. Oxyhemoglobin har ett absorbansmaximum vid 415 nm och mindre maxima vid 540 och 576 nm. Methemoglobin (sällan förekommande, i detta sammanhang likvärdigt med oxyhemoglobin) har ett maximum vid 406 nm och ett mindre maximum vid 630 nm. Bilirubin har ett maximum kring 455 nm. Protein har låg absorbans i det aktuella våglängdsintervallet.

Vid tolkningen läggs en tangerande baslinje under absorbanskurvan och nettoabsorbansen för oxyhemoglobin (NOA, Net Oxyhaemoglobin Absorbance) resp. bilirubin (NBA, Net Bilirubin Absorbance) beräknas som skillnaden mellan kurvan och baslinjen vid 415 resp. 476 nm (se bild nedan). NBA beräknas vid 476 nm snarare än vid 455 nm för att minska ev. bidrag från oxyhemoglobin.



## Csv-Spektrofotometri

Jämte bestämning av NOA och NBA görs en värdering av kurvan avseende förekomst av en topp (lokalt maximum) i närheten av 415 nm (oxyhemoglobintopp). Dessa tre parametrar (NOA, NBA och förekomst av oxyhemoglobintopp) utgör det viktigaste underlaget för tolkningsalgoritmen. I det fall NBA är ökat utan samtidig förekomst av ökat NOA och oxyhemoglobintopp, så kompletteras dessutom med nivåbestämning av bilirubin i plasma samt albumin i likvor och plasma. Dessa tilläggsanalyser används för att vid behov korrigera NBA för bilirubin härrörande från plasma. De används också för att skilja ut fall med kraftigt ökad albuminhalt i likvor (analysen har då ofrånkomligen lägre specificitet).

Tolknigen av resultaten görs i ett middleware som hämtar mätresultat från instrumenten, stödjer användaren vid tekniskt och medicinskt godkännande samt kommunicerar svar till LIMSRS. Tolkningsstödet utgår från algoritmen i brittiska guidelines [3] med anpassningar för lokala förhållanden med användning av svenska svarstexter istället för engelska samt användning av albumin istället för totalprotein. Tilläggskommentarer infogas också i vissa fall baserat på uppgifter om ljusskydd och tid mellan symtomdebut och lumbalpunktion [4].

## Referensintervall

Varken bilirubin eller oxyhemoglobin ökade [3].

## Metodkaraktistika

### Interferenser och felkällor

- För att bilirubin ska hinna bildas i tillräcklig mängd ska 12 timmar ha förlutit från symtomdebut till lumbalpunktion. Kortare tid medför risk för falskt negativt resultat.
- Bilirubin bryts ner under inverkan av ljus. För att undvika falskt negativt resultat ska likvorprovet ljusskyddas.
- Vissa läkemedel kan ge absorbansökning i det aktuella våglängdsområdet.
- För att undvika att en eventuell sticklödning hemolyserar och ger ökat oxyhemoglobin ska prov centrifugeras och hållas av inom 30 minuter.
- För liten provmängd ger oförutsägbara resultat. Instrumentet har ingen avkänning av provmängd och varnar inte.
- Kyvetten måste sitta helt rakt i hållaren, sitter den snett uppmäts falskt för låga absorbanser och kurvan blir brusig (taggig).
- Metoden är mycket känslig varför den blanklösning som används måste vara helt fri från föroreningar.

### Mätområde

Spektrofotometern (Cary 60) har ett specificerat mätområde på 190-1100 nm resp. +/- 4 AU. Vid analysen Csv-Spektrofotometri nyttjas mätområdet 350-600 nm resp. 0-2,5 AU. Svar avges i form av en text och innehåller inga numeriska data [6].

### Mätosäkerhet

Våglängd, noggrannhet enligt instrumentspec.: +/- 0,5 nm vid 541,96 nm.

Fotometri, noggrannhet enligt instrumentspec.: +/- 0,005 vid 1 AU med NIST 930E filter [6].

Resultat från inkörning – imprecision, totalt alla fyra orter, poolad likvor, 5 repetitioner per ort:

Vågl (nm)	Abs (AU)	CV <sub>tot</sub> (%)
415 nm	0,890	1,1%
455 nm	0,134	2,0%
478 nm	0,094	3,6%

**Csv-Spektrofotometri**

Genomsnittlig diff mot Genesys 10S Vis vid analys av 20 likvorprover med varierande nivåer:

Vågl (nm)	Diff <sub>medel</sub> (AU)
415	0,001
455	0,001
476	0,000

Verifiering av tolkningsalgoritmen med jämförelse mot föregående metod (Genesys 10S Vis och visionLITE) samt läkarbedömning: Samtliga tolkningsfall (N=50) utan anmärkning.

Se vidare valideringsrapport för fullständig information om verifiering av mätprestanda (Cary 60) och tolkningsalgoritm (Visnoba) [5].

**Spårbarhet**

- 1) Absorbans- och våglängsnoggrannhet verifierade med referensfilter som dokumenteras i kalibreringsbevis.
- 2) Via jämförelse med Genesys 10S Vis med visionLITE, spårbar bakåt till Cary spektrofotometer i Helsingborg.

**Ackreditering**

Metoden är ej ackrediterad.

**Referenser**

1. Van Gijn, J., Kerr, R. S., & Rinkel, G. J. E. (2007). Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*, 369(9558), 306–18.
2. Hyllienmark, L., & Zachau, A. C. (2008). Diagnostisk lumbalpunktion. *Läkartidningen*, 105(41), 2844–2849.
3. Cruickshank, A., Auld, P., Beetham, R., Burrows, G., Egner, W., Holbrook, I., Keir, G., et al. (2008). Revised national guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage. *Annals of clinical biochemistry*, 45(Pt 3), 238–44.
4. Visnoba Specifikation Rev 1.2.
5. Validering Cary 60 och Visnoba. Är under arbete.
6. Cary 60 UV-Vis Guaranteed specifications, Agilent technologies, 5990-7881EN, 20111207