B-Leukocyter, B-Neutrofila, B-Diff, Sysmex XN-10 samt XN20

B-Leukocyter	**NPU02593**
B-Diff	**NPU18156**
B-Neutrofila	**NPU02902**
B-Eosinofila	**NPU01933**
B-Basofila	**NPU01349**
B-Lymfocyter	**NPU02636**
B-Monocyter	**NPU02840**

Bakgrund, indikation och tolkning

B-Leukocyter
Bestämning av B-Leukocyter används för att upptäcka leukopeni och leukocytos. Vid leukopeni med nivåer under 1,0 x 10^9/L föreligger kraftigt ökad risk för septicemi. Vid både infektion och leukemi kan såväl sänkta som kraftigt förhöjda värden föreligga. Vid stress och efter måltid fås en lätt förhöjning av antalet cirkulerande leukocyter [8]. Om det totala antalet leukocyter är förhöjt eller sänkt, bör komplettering ske med differential-räkning för att utröna i vilket/vilka cellsystem en rubbning föreligger. Differentialräkning bör också företas vid normalt antal leukocyter om klinisk misstanke föreligger om ett förändrat antal av något särskilt cellslag eller leukemi.

B-Neutrofila, B-Diff
Differentialräkning i cellräknare är bara tillämpligt på normala leukocytpopulationer. Atypiska eller maligna cellpopulationer flaggas ut från cellräknaren för vidare analys med mikroskopi.

B-Neutrofila analyseras med en automatiserad cellräknare. Analysen bör endast användas vid uppföljning av patient med känd diagnos, då instrumentlarm från cellräknaren endast innebär manuell kontroll av koncentrationen neutrofila i mikroskop. Eventuellt fynd av andra cellklasser, såsom blaster, eller avvikande morfologi anges inte i svarsrapporten. Vid akut beställning av B-Neutrofila lämnas svar dygnet runt.

B-Diff (B-Differentialräkning) analyseras med en automatiserad cellräknare och används för bestämning av B-Neutrofila, B-Eosinofila, B-Basofila, B-Lymfocyter samt B-Monocyter. Vid instrumentlarm från cellräknaren, vilket inger misstanke om avvikelse, utförs manuell kontroll i mikroskop. Andra cellklasser samt kommentar om morfologisk avvikelse kan då ingå i svarsrapporten. När mikroskopisk kontroll krävs kan fullständigt svar dröja till nästkommande vardag. Vid akut beställning av B-Diff lämnas dock svar på B-Neutrofila dygnet runt.

Neutrofili, d.v.s. ökning av antalet neutrofila granulocyter, är ett ospecifikt tecken på inflammatorisk reaktion. Vid svåra infektioner och sepsis kan stegringen bli mycket kraftig. I benmärgen finns en reservpool av mogna granulocyter som är ca 20 gånger större än granulocytpoolen i kärlbanan. De senare utgörs av en cirkulerande pool (vilken är den vi mäter) och en marginalpool som finns längs väggarna i mindre vener och snabbt kan rekryteras vid behov. Vid leukemi kännetecknas den vita blodbilden av omogna cellformer vilka påvisas genom mikroskopering. En neutropeni, brist på granulocyter, ses bl a vid benmärgsskada, leukemi eller som läkemedelseffekt. Risk för svår infektion förekommer om antalet sjunker under 1,0 x 10^9/L. Neutropeni kan även vara autoimmunt betingad.

Eosinofili ses vid allergiska tillstånd som astma, läkemedelsallergier och infektioner med vissa parasiter. Även vid bl.a. reumatiska sjukdomar kan eosinofili föreligga.

Basofili ses framför allt vid myeloproliferativa tillstånd.

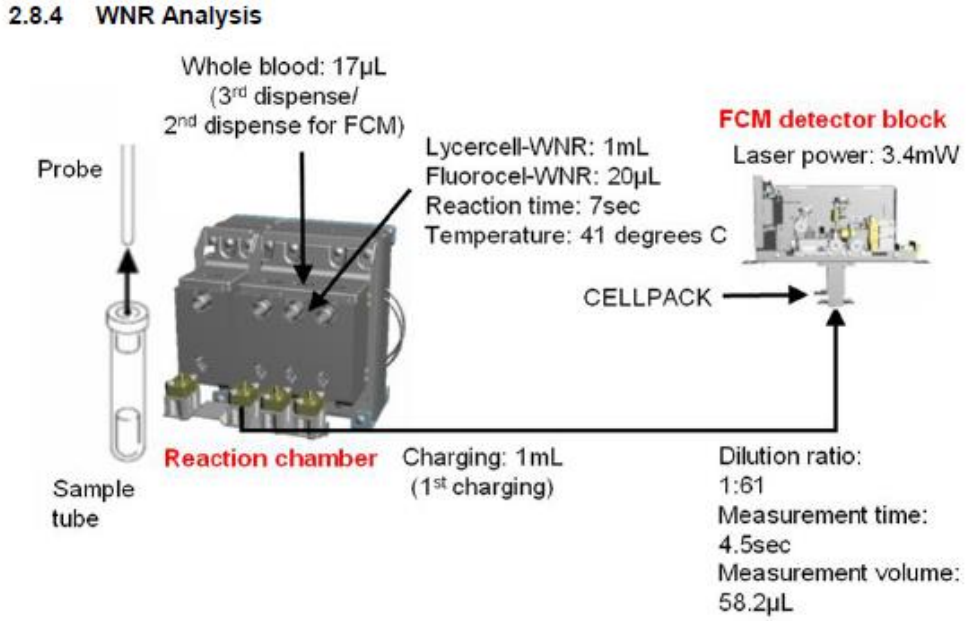
Lymfocytos, d.v.s. ökning av antalet lymfocyter förekommer vid akuta virusinfektioner. Höga och mycket höga värden med en enformig, mogen bild, ses vid kronisk, lymfatisk leukemi. Vid mononukleos ses lymfocyter som är något större än normalt. Lymfopeni, brist på lymfocyter, ses bl a vid behandling med kortikosteroider och cytostatika samt vissa immundefekter.

Monocytos ses vid långdragna inflammatoriska tillstånd såväl infektiösa som icke infektiösa liksom vid maligna sjukdomar.
Erytroblaster förekommer vid grav anemi oavsett anemimekanism (dock ej aplastisk anemi) men är vanligast vid svår hemolytisk anemi. Vid rubbad benmärgsfunktion (leukemi, benmärgsmetastaser) kan erytroblaster återfinnas i perifert blod utan att den erytropoetiska aktiviteten behöver vara hög [8].

Analysprincip

Flödescytometri med halvledarlaser i WNR kanal (White-Nucleated Red cells), B-Basofila, övriga B-Leukocyter(WBC-N), NRBC, se figur 1.

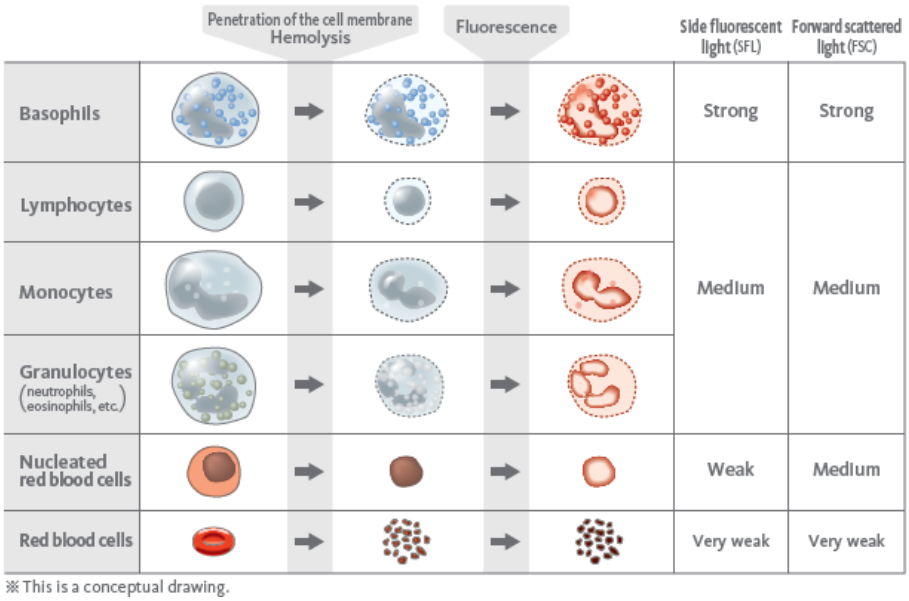
Figur 1



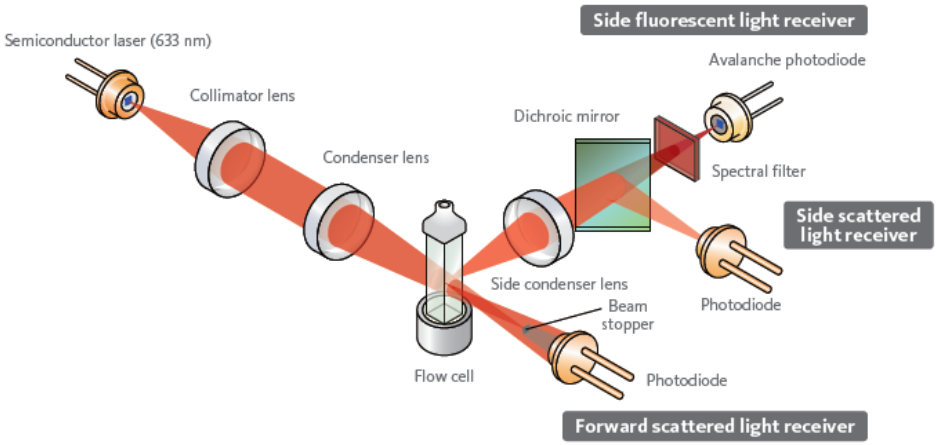
EDTA-blod (17µL) späds med Lysercell WNR (1mL) som innehåller en tensid som lyserar erytrocyterna och permeabiliserar leukocyterna så att färgen kan tränga in genom membranet, se figur 2. Samtliga leukocyter, förutom basofila, krymper. Infärgning av nukleinsyror sker med ett fluoroscerande färgämne, polymetin, vid 41°C i 7 sekunder. Provet injiceras i flödescellen där vätskestrålen fokuseras med s.k. sheath fluid så att bara en cell ryms i strålens bredd. I flödescellen med röd halvledarlaser (635nm) görs tre mätningar varje gång en cell passerar laserljuset. Dels mäts ljusspridningen framåt (forward scatter, FSC) och åt sidan (side scatter, SSC). Dels mäts fluorescens vinkelrätt från laserstrålen (side fluorescens, SFL), se figur 3. FSC d.v.s. cellens skugga ger information om cellstorlek. SFL ger information om leukocyternas innehåll av nukleinsyror. Genom skillnader i storlek och fluorescensintensitet delas celler upp i leukocyter, erytroblaster och basofila och presenteras i scattergram, se figur 4 [1, 2]. Även värde för totalantal kärnförande celler fås från denna kanal.

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

Figur 2

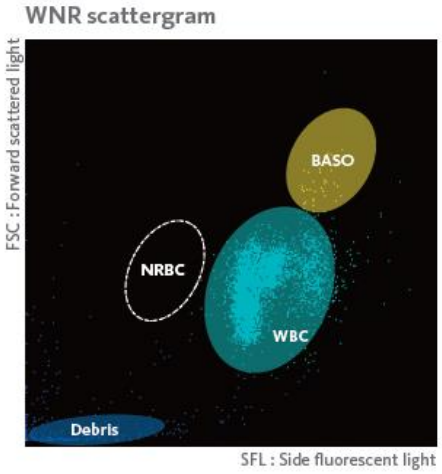


Figur 3



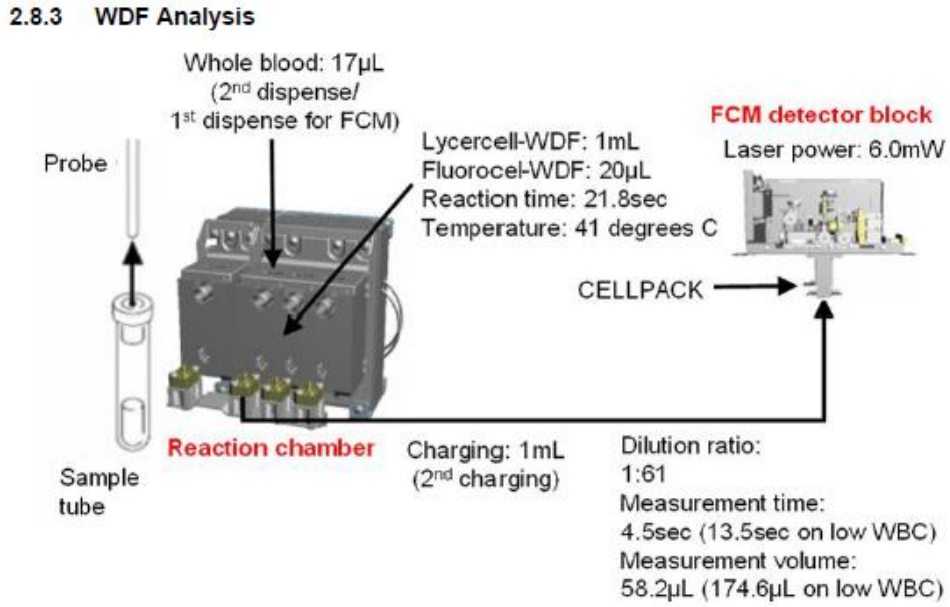
Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

Figur 4



Flödescytometri med halvledarlaser i WDF kanal (White Differential), WBC-D, B-Neutrofila inkl. B-Basofila, B-Eosinofila, B-Lymfocyter, B-Monocyter, omogna granulocyter och detektion av abnormala celler, se figur 5.

Figur 5



EDTA-blod (17µL) späds med med Lysercell WDF (1mL) som innehåller en tensid som lyserar erytrocyterna och permeabiliserar leukocyterna så att färgen kan tränga in genom membranet, se figur 6. Leukocyterna bibehåller sin storlek för bästa separation av cellklasserna och granula i basofila granulocyter löses upp. Infärgning av nukleinsyror sker med ett fluoroscerande färgämne, polymetin, vid 41°C i 21,8 sekunder. Den längre lys/infärgningstiden och närvaro av metanol i färgen påverkar cellernas morfologi och infärgning mer än i WNR-metoden. Provet injiceras i flödescellen där vätskestrålen fokuseras med s.k. sheath fluid så att bara en cell ryms i strålens bredd. I flödescellen med röd halvledarlaser (635nm) görs tre mätningar varje gång en cell passerar laserljuset. Dels mäts ljusspridningen snett framåt (forward scatter, FSC) och åt sidan (side scatter, SSC). Dels mäts fluorescens vinkelrätt från laserstrålen (side fluorescens, SFL), se figur 3.

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

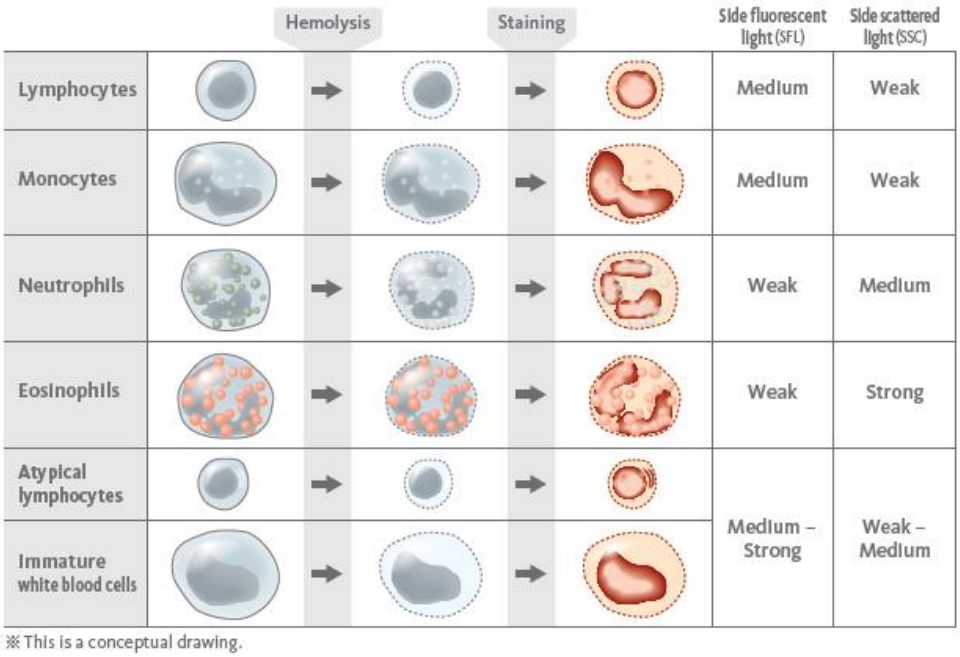
B-Leukocyter_ B-Neutrofila_ B-Diff_ Sysmex XN-10

Gäller för
Klinisk kemi

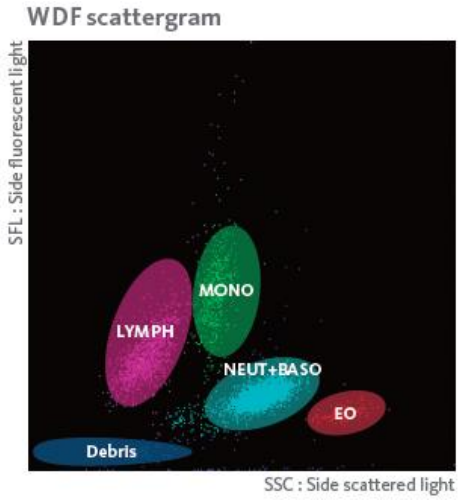
SKÅNE

SSC är ett mått på reflekterande organeller inuti cellen, främst granula och kärnans packning. SFL ger information om leukocyternas innehåll av nukleinsyror. Genom skillnader i SSC och fluorescensintensitet delas leukocyterna upp i lymfocyter, monocyter, neutrofila inkl. basofila och eosinofila och presenteras i scattergram, se figur 7 [1, 2].
Resultat på B-Neutrofila erhålls genom subtraktion av basofila från WNR kanalen.

Figur 6



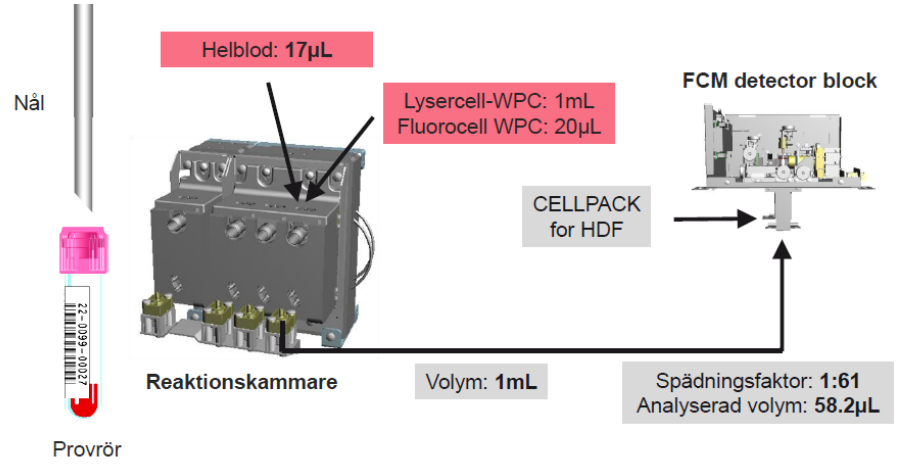
Figur 7



Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

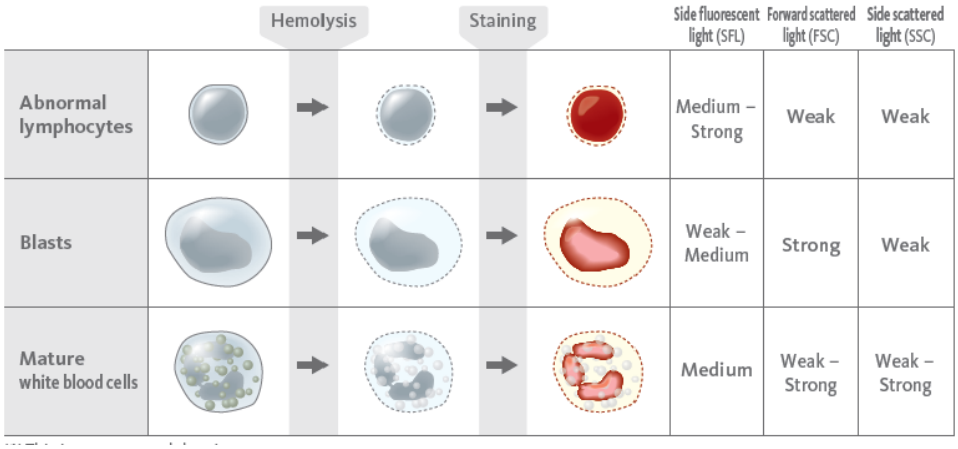
Flödescytometri med halvledarlaser i WPC kanal (White Precursor cells) på XN20, se figur 8. Reflexkanal vid flagga Blast/AbnLympho med detektion av omogna och abnormala celler, WBC-P.

Figur 8



EDTA-blod (17µL) späds med med Lysercell WPC (1mL) som innehåller en tensid som lyserar erytrocyterna och angriper de kolesterolrika domänerna i leukocyternas membran och skapar porer i dessa så att Fluorocell WPC kan tränga in genom membranet. Mogna celler har högre halt lipider i membranet än omogna celler. Vid högt kolesterolinnehåll bildas fler och större porer och vilket medför att cellmaterial läcker ut och cellen krymper. Stora porer underlättar också infärgning av nukleinsyror i cellen, vilket sker med ett fluoroscerande färgämne, polymetin, vid 34°C i en specifik reaktionskammare, se figur 9.

Figur 9



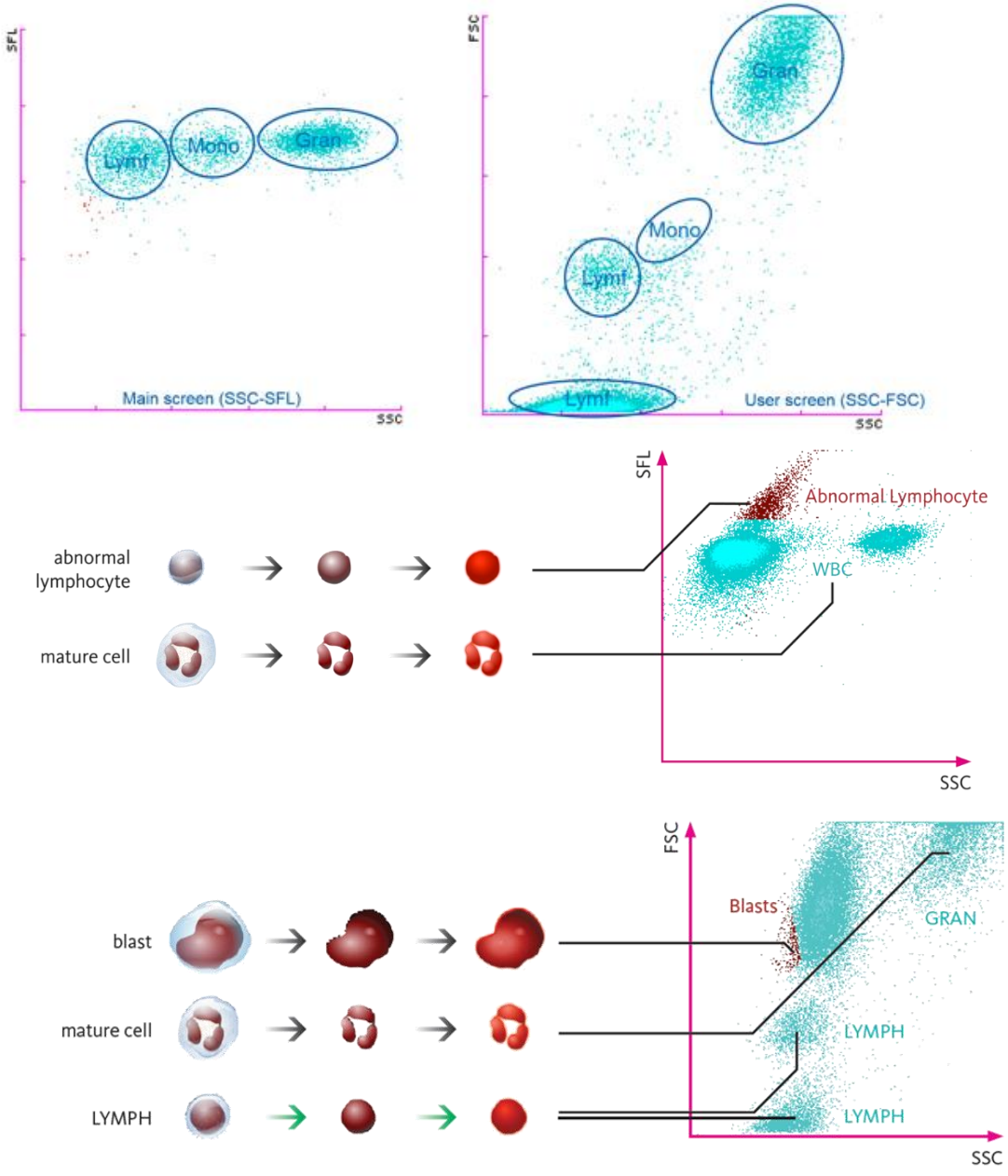
Omogna celler → färre lipider → mindre porer → svårare för fluorokrom att tränga in i cellen och märka in nukleinsyra → hög FSC och låg SFL

Mogna celler → mer lipider → större/fler porer → cellmaterial läcker ut samt underlättar för fluorokrom att tränga in i cellen och märka in nukleinsyra → låg FSC och hög SFL

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

Provet injiceras i flödescellen där vätskestrålen fokuseras med s.k. sheath fluid så att bara en cell ryms i strålens bredd. I flödescellen med röd halvledarlaser (635nm) görs tre mätningar varje gång en cell passerar laserljuset. Dels mäts ljusspridningen snett framåt (forward scatter, FSC) och åt sidan (side scatter, SSC). Dels mäts fluorescens vinkelrätt från laserstrålen (side fluorescens, SFL), se figur 3. SSC är ett mått på reflekterande organeller inuti cellen, främst granula och kärnans packning. FSC ger information om cellernas storlek. SFL ger information om leukocyternas innehåll av nukleinsyror vilket är beroende av både membranets permeabilitet (lipidsammansättning) och DNA samt RNA kvantitet. Genom skillnader i SSC, FSC och fluorescensintensitet separeras cellpopulationerna och omogna samt abnormala celler detekteras och provet flaggas med respektive larm Blast? eller Abn. Lymph? och vid mogna normala icke patologiska leukocyter frisläpps provet, se figur 10[1, 16, 17].

Figur 10



Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

B-Leukocyter_ B-Neutrofila_ B-Diff_ Sysmex XN-10

Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Referensintervall

B-Leukocyter

Vuxna [3]:	3,5-8,8 x 10^9/L
Barn [11]	
0-1 dagar:	9,0-30,0 x 10^9/L
1-6 dagar:	5,0-25,0 x 10^9/L
6 dagar-1 månad :	5,0-20,0 x 10^9/L
1-3 månader:	6,0-18,0 x 10^9/L
3 månader-3år:	6,0-16,0 x 10^9/L
3-6 år:	5,0-15,0 x 10^9/L
6-18 år:	5,0-13,0 x 10^9/L

B-Neutrofila

Vuxna [15] *:	1,7-8,0 x 10^9/L
Barn [12]	
0-1 dagar:	5,5-27,5 x 10^9/L
1-7 dagar:	4,5-22,5 x 10^9/L
7 dagar-3 månader:	1,6-17,5 x 10^9/L
3 månader-1 år:	1,6-5,3 x 10^9/L
1-5 år:	1,6-6,5 x 10^9/L
5-10 år:	2,4-6,5 x 10^9/L
10-16 år	1,2-7,0 x 10^9/L
16-18 år:	1,7-8,0 x 10^9/L

B-Eosinofila

Vuxna[15]:	<0,7 x 10^9/L
Barn [12]	
0-7 dagar:	<2,6 x 10^9/L
7 dagar-1 år:	<1,1 x 10^9/L
1-10 år:	<0,9 x 10^9/L
10-18 år:	<0,7 x 10^9/L

B-Basofila [15]

Vuxna:	<0,3 x 10^9/L
Barn:	<0,3 x 10^9/L

B-Lymfocyter

Vuxna[15]:	1,1-4,8 x 10^9/L
Barn [12]	
0-7 dagar:	3,0-13,5 x 10^9/L
7 dagar-3 månader:	3,0-8,4 x 10^9/L
3 månader-1år:	4,0-8,4 x 10^9/L
1-5 år:	1,8-8,4 x 10^9/L
5-10 år:	1,8-5,0 x 10^9/L
10-16år:	1,5-4,7 x 10^9/L
16-18 år:	1,1-4,8 x 10^9/L

B-Monocyter

Vuxna[15]:	<1,1 x 10^9/L
Barn [12]	
0-1 dagar:	0,2-3,6 x 10^9/L
1-7 dagar:	0,2-2,7 x 10^9/L
7 dagar-3 månader:	0,2-2,0 x 10^9/L
3 månader-5 år:	0,2-1,8 x 10^9/L
5-10 år:	0,2-0,8 x 10^9/L
10-16år:	<0,9 x 10^9/L
16-18 år:	<1,1 x 10^9/L

*Referensintervall omfattar stavkärniga neutrofila (0,0-0,5 x10^9/L) samt segmentkärniga neutrofila (1,7–7,5x10^9/L).

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

B-Leukocyter_ B-Neutrofila_ B-Diff_ Sysmex XN-10

Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Metodkarakteristika

Interferenser och felkällor

Falskt för låga leukocyter vid leukocytaggregat [4].

Falskt för höga leukocyter vid trombocytaggregat, lysresistenta erytrocyter, erytrocytaggregat, kryoproteiner, kryoglobuliner, fibrin och stora trombocyter [4].

Mätområde

B-Leukocyter: 0,00 – 440,0 x10^9/L [4].

Detektionsgräns

B-Leukocyter: 0,01x10^9/L.

Utvärdering från inkörning av metod på Sysmex XN-10 våren 2012.

Mätosäkerhet

Utvärdering från inkörning av metod på Sysmex XN-10 våren 2012.

Nivå B-Leukocyter x10^9/L	XN-L Kristianstad Imprecision CV%	XN-R Kristianstad Imprecision CV%	XN-L Lund Imprecision CV%	XN-R Lund Imprecision CV%	Antal
					30
2,90	2,3	2,1	1,0	2,0	
7,20	1,4	1,1	1,7	1,9	
17,56	0,8	0,8	0,9	1,3	

Spårbarhet

B-Leukocyter – ICSH expertpanel på Cytometri, Clin Lab Heamatol. 1994;16,131-138. Räkningar på 1:500 spädningar utförda på SCC (Semi-automatiserad elektronisk impedans cellräknare) [9].

Ackreditering

Metoden för B-Leukocyter är ackrediterad.

Metoden för B-Diff vuxna (>18 år) är ackrediterad.

Metoden för B-Diff barn (≤18 år) är ej ackrediterad på grund av att spårbarhet för referensintervallen saknas.

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

Referenser

1. Sysmex XN-Series Clinical Case Report Vol 1.
2. Insert Reagens, Fluorocell WNR, Fluorocell WDF 08/2011.
3. NORIP, Nordiska Referensintervallsprojektet 1(10) version 2005-12-14.
4. XN-2000 Instructions for use, Maj 2011.
5. Sysmex produktblad 2011-08-21.
6. Instrumenthandledning Sysmex XN-Serien aktuell version.
7. Instrumenthandledning EPU aktuell version.
8. Blodsjukdomar, Gösta Gahrton och Bengt Lundh Tredje upplagan 1997.
9. Sysmex produktblad XN CAL 02/2011.
10. Sysmex produktblad XN CHECK 02/2011.
11. Hematology: Basic Principles and Practice, 5th ed. On-line version 2008 av Hoffmann.
12. Spårbarhet för referensintervall saknas.
13. Extended IPU, regelverk Skåne aktuell version.
14. Instruktion Larmsvarsrutiner aktuell revision.
15. Nilsson-Ehle P, red. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin, 9:e upplagan. Lund: Studentlitteratur 2012, sid 274.
16. XN series Bruksanvisning, 09-2017.
17. Insert Reagens, Fluorocell WPC 08/2011

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.