

Metodbeskrivning

B-Trombocyter_ Trc-MPV_ B-IPC_ Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

B-Trombocyter, Trc-MPV, B-IPC, Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20

B-Trombocyter	NPU03568
Trc-MPV	NPU03562
B-IPC	NPU29504
Trc-IPF	NPU26796

Bakgrund, indikation och tolkning

Mätning av trombocythalten (B-Trombocyter) ingår i utredning av såväl koagulations- som hematologiska sjukdomar, men även i samband med cytostatikabehandling och utredning av blödningstillstånd. Vid räkning av trombocyter mäts även medeltrombocytvolymen (Trc-MPV) vilken ger en uppfattning om trombocyternas storlek. Dock svårt att mäta tillförlitligt. Unga trombocyter (även benämnda retikulerade) är större än mogna trombocyter och innehåller RNA. B-IPC (*immature platelet concentration*) och Trc-IPF (*immature platelet fraction*), d.v.s. hur mycket denna fraktion utgör av den totala mängden trombocyter, är analyser ännu inte helt etablerade i klinisk rutin men som kan vara av värde vid utredning av en sänkt trombocythalt (trombocytopeni) och för att monitorera benmärgens förmåga att producera trombocyter.

Trombocytopeni kan bero på nedsatt produktion i benmärgen, ökad perifer förbrukning, ökad destruktions eller ändrad fördelning av trombocyterna. Vid ökad perifer konsumtion kommer normal benmärg att svara med ökad produktion [8].

Nedsatt produktion kan bl a ses vid toxisk påverkan (läkemedel, kemikalier, cytostatika), aplastisk anemi, mognadsdefekter (MDS) eller undanträngning av den normala hematopoesen av maligna processer som vid leukemi, myelom eller metastaserande tumörer. Brist på vitamin B12 och/eller folat, men även infektionssjukdomar kan leda till en måttlig trombocytopeni. Ökad perifer destruktions ses framför allt i samband med idiopatisk trombocytopen purpura (ITP), men kan även ses vid SLE och i samband med en del läkemedel. Ökad förbrukning kan ses vid disseminerad intravasal koagulation (DIC). Efter stora traumata som t ex kirurgiska ingrepp ses en övergående måttlig trombocytopeni. Ändrad fördelning av trombocyterna ses framför allt vid splenomegali [8].

Trombocytos (ökning av trombocythalten) ses vid inflammatoriska tillstånd, men även övergående efter trauma eller efter splenektomi. Trombocytemi betecknar också en ökad trombocythalt, men då framför allt vid myeloproliferativa syndrom [8].

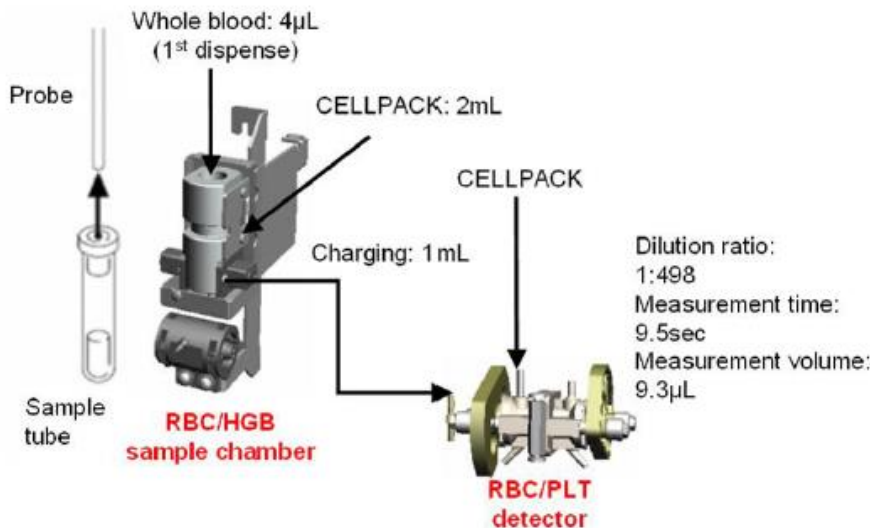
Normal eller sänkt Trc-IPF indikerar en nedsatt produktion i benmärgen [14-15,19]. Förhöjd Trc-IPF tyder på en ökad perifer konsumtion och indikerar att benmärgen svarar adekvat på en sänkt trombocyt nivå. B-IPC kan vara av värde efter blod-/trombocyt-transfusion då Trc-IPF inte är tillförlitligt.

Analysprincip

Impedansmetod (PLT-I, analys i RBC/PLT kanal), se figur 1.

Figur 1 [16]

2.8.1 RBC/PLT Analysis

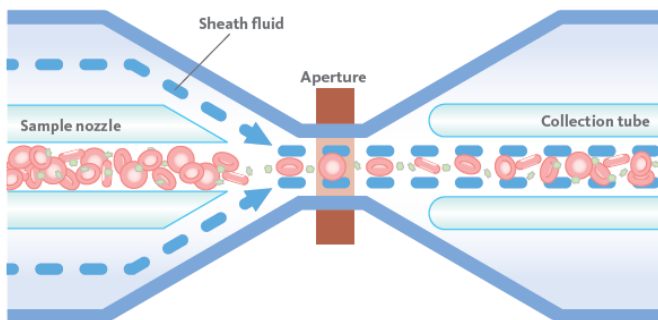


EDTA-blod (4µL) späds med CELLPACK DCL/DST (2mL). Provet injiceras i RBC/PLT detectorn där vätskestrålen fokuseras med s.k. sheath fluid så att bara en cell ryms i strålens bredd, se figur 2. I RBC/PLT detectorn ändras det elektriska motståndet varje gång en cell passerar mellan två elektroder eftersom en cell i en ledande vätska fungerar som en isolator. Detta ger upphov till en elektrisk puls som kan räknas och storleksbestämmas. Antal pulser indikerar partikelantalet och pulsens storlek är proportionell mot cellvolymen. Registrering sker i storleksdistributionshistogram, se figur 3.

B-Trombocyter ($\times 10^9/L$) beräknas som antalet pulser mellan en nedre (2-6 fl) och en övre (12-30 fl) diskriminator [1], dividerat med den analyserade volymen.

Trc-MPV (fL), MPV (Mean Platelet Volume) beräknas utifrån impedans och antal enligt följande: Varje puls räknas och pulsstorleken (Ph) ackumuleras. $V_{trc} = Ph * K$ där K är en omvandlingsfaktor mellan impedans och volym. Summan av pulsvolymerna dividerat med antalet pulser = MPV

Figur 2



Figur 3

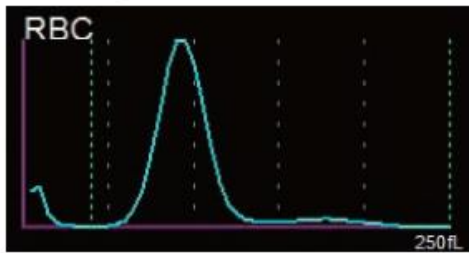
Metodbeskrivning

B-Trombocyter_ Trc-MPV_ B-IPC_ Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20

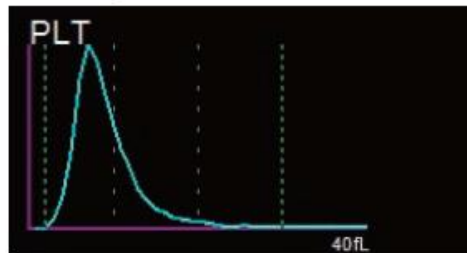
Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

RBC histogram



PLT histogram

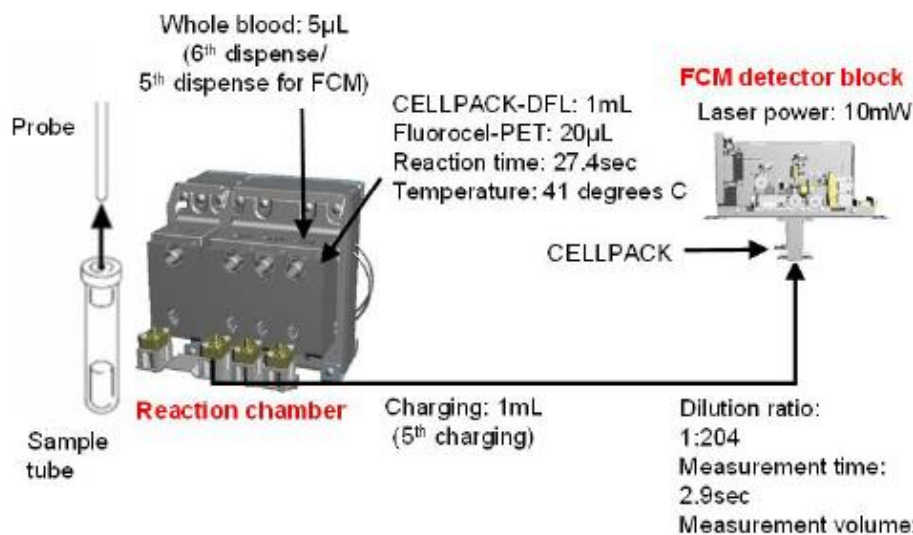


Optisk metod (PLT-O, analys i Ret kanal efter färgning med polymetin), se figur 4.

Figur 4 [16]

2.8.7 RET Analysis

RET analysis



EDTA-blod (5µL) späds med CELLPACK DFL (1mL). Fluorocell RET (20µl) tillsätts för färgning av nukleinsyror med ett fluorescerande färgämne, polymetin, vid 41°C i 27,4 sekunder. Provet injiceras i flödescellen där vätskestrålen fokuseras med s.k. sheath fluid så att bara en cell rymms 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 5. FSC d.v.s. cellens skugga ger information om cellstorlek. SFL ger information om cellernas innehåll av RNA. Resultaten presenteras i scattergram med olika storlek på axlarna för retikulocyter och trombocyter, figur 6. Trombocyter skiljs ut från andra blodceller genom skillnader i storlek och låg fluorescensintensitet [1]. Antal (#) och andel (%) retikulocyter, antal erythrocyter och antal trombocyter kan räknas ut.

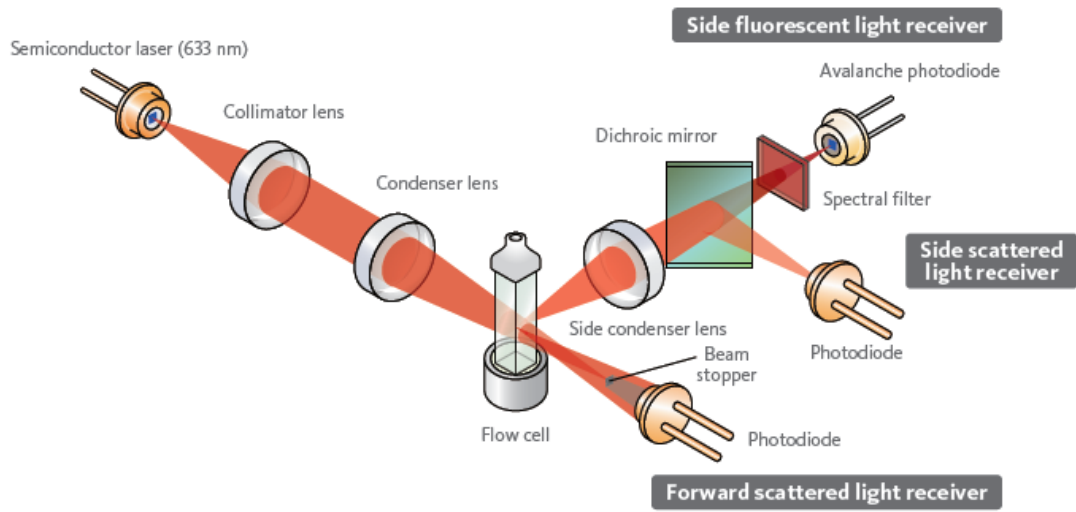
Metodbeskrivning

B-Trombocyter_ Trc-MPV_ B-IPC_ Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20

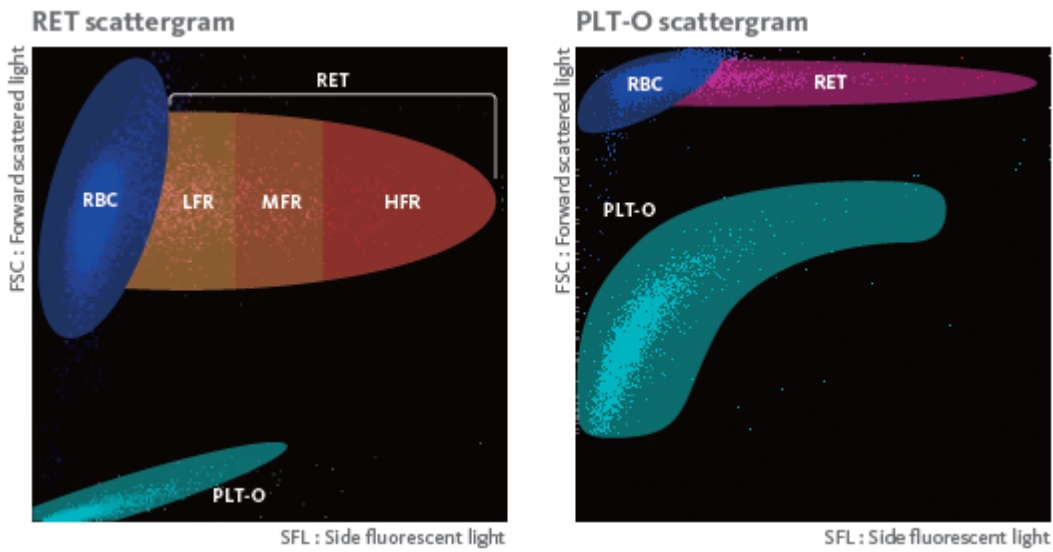
Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Figur 5



Figur 6



Metodbeskrivning

B-Trombocyter_ Trc-MPV_ B-IPC_ Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20

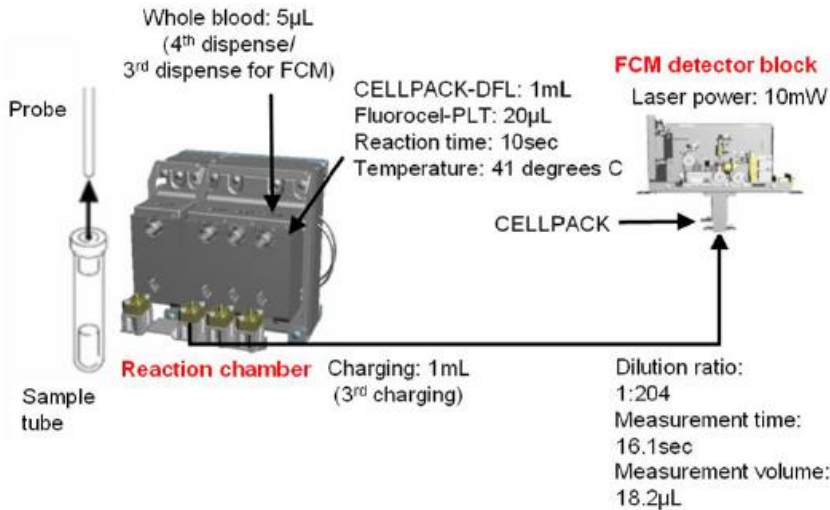
Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Flödescytometri med halvledarlaser i PLT-F kanalen efter färgning med Oxazine, se figur 7.

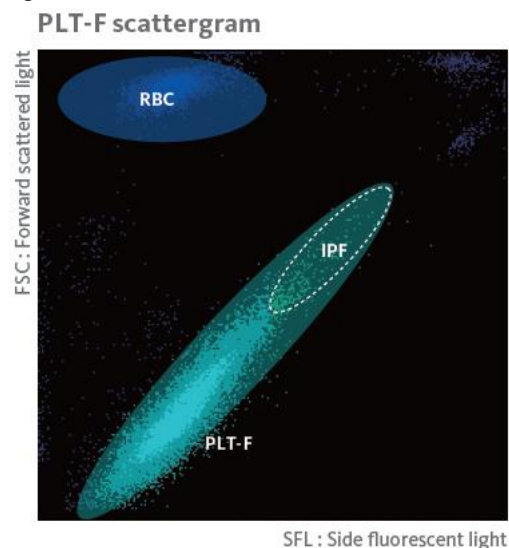
Figur 7 [16]

2.8.5 PLT-F Analysis



EDTA-blod (5µL) späds med CELLPACK DFL (1mL). Fluorocell PLT (20µl) tillsätts för färgning av nukleinsyror med ett fluorescerande färgämne, oxazine, vid 41°C i 10 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). FSC d.v.s. cellens skugga ger information om cellstorlek. SFL ger information om trombocyternas innehåll av RNA. Trombocyter presenteras i scattergram och skiljs från andra blodceller genom sin storlek och fluorescensintensitet, se figur 8. Areal med hög fluorescensintensitet separeras som omogen trombocytfraktion (IPF) s.k. retikulerade trombocyter [14, 15]. Den känsliga fluorescensdetektionen gör att PLT-F kanal kan användas speciellt för låga trombocyter[1, 2].

Figur 8



Metodbeskrivning

B-Trombocyter_ Trc-MPV_ B-IPC_ Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Referensintervall**B-Trombocyter**

Vuxna [3]

Kvinnor: 165 – 387 x 10⁹/LMän: 145 – 348 x 10⁹/L

Barn [12]

1 - 6 dagar: 80 – 350 x 10⁹/L6 - 14 dagar: 80 – 450 x 10⁹/L2 - 4 veckor: 80 – 550 x 10⁹/L1 - 3 månader: 100 – 550 x 10⁹/L3 - 12 månader: 130 – 550 x 10⁹/L1 - 18 år: 125 – 340 x 10⁹/L**Trc-MPV [11]**

Vuxna: 9,4 – 12,6 fL

Trc-IPF [14,19]

Vuxna: 1,1 – 6,1 %

B-IPC

Saknas

Metodkaraktistika**Interferenser och felkällor**

Falskt för låga trombocyter vid trombocyttaggregat, pseudotrombocytopeni, och stora trombocyter.
Falskt för höga trombocyter vid microerythrocyter, fragmenterade erythrocyter, fragmenterade leukocyter och kryoglobuliner [4].

MätområdeB-Trombocyter: 0 – 5000 x 10⁹/L [4]**Detektionsgräns**3 x10⁹/L [4]

Metodbeskrivning

Godkänd av: Camilla Streimer 121358

B-Trombocyter_ Trc-MPV_ B-IPC_ Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Mätosäkerhet

Imprecision vid inkörning av Sysmex XN-10, våren 2012.

Metod	Enhet	Nivå	XN-L, Ksd CV (%)	XN-R, Ksd CV (%)	XN-L, Lu CV (%)	XN-R, Lu CV (%)	antal
PLT-I	x 10 ⁹ /L	34	9,2	8,8	9,3	9,3	30
PLT-O		55	4,1		4,5		30
PLT-F		42	2,9		16		
PLT-I	x 10 ⁹ /L	202	2,4	2,1	3,0	3,0	30
PLT-O		207	4,9		4,2		30
PLT-F		208	3,3		16		
PLT-I	x 10 ⁹ /L	505	1,3	1,7	2,1	1,8	30
PLT-O		510	2,0		2,7		16
PLT-F		519	1,5		16		
Trc-IPF	%	19,2	2,6				16
Trc-IPF		20,2	3,3				16
Trc-IPF		19,5	3,4				16

Imprecision 180104-180301 (lot 7345)

Trc-IPF	%	19,4	2,3				52
Trc-IPF		20,2	3,6				52
B-IPC	x 10 ⁹ /L	15,9	7,4				52
B-IPC		50,9	3,8				52

Spårbarhet

Som referensmetod för fastställande av kalibratorvärde (XN CAL och XN-CAL PF) används ICSH Expert panel på cytometri och ISLH Clin Pathol 2001,115,460-464 [9]. Fastställt från RBC/PLT-förhållandet utfört av fluorescensflödescytometri med trombocyter märkta med monoklonala antikroppar [9].

Ackreditering

B-Trombocyter är ackrediterad.

Trc-MPV, B-IPC och Trc-IPF är ej ackrediterade.

Metodbeskrivning

B-Trombocyter_ Trc-MPV_ B-IPC_ Trc-IPF på Sysmex XN-10 samt XN-20Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Referenser

1. Sysmex XN-Series Clinical Case Report Vol 1.
2. Inset Reagens, Fluorocell PLT, Fluorocell Ret 08/2011.
3. Rustad P, Simonsson P, Felding P, Pedersen M. Nordic Reference Interval Project Bio-bank and Database (NOBIDA): a source for future estimation and retrospective evaluation of reference intervals. Scand J Clin Lab Invest 2004; 64(4):431-8.
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. Nilsson-Ehle P, red. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. Lund: Studentlitteratur, 9:e upplagan 2012:194 -196.
9. Sysmex produktblad XN CAL 02/2011.
10. Sysmex produktblad XN CHECK 02/2011.
11. Sysmex Corporation, Clinical Reference Range Osaka Central Health Administration Center of NTT West Corporation. ESTH00052.
12. Hematology: Basic Principles and Practice, 5th ed. On-line version 2008 av Hoffmann.
13. Sysmex produktblad XN CAL PF 02/2011.
14. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S and Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia Br J Haematol 2004;126:93–99
15. Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ. A Clinical Evaluation of High Fluorescent Platelet Fraction Percentage in Thrombocytopenia Am J Clin Pathol 2006;125:282-287
16. Sysmex Servicemanual, Schematics, Chapter 2.
17. Extended IPU, regelverk Skåne.
18. Larmsvarsrutiner.
19. Sysmex Immature platelets - Clinical use. White paper Haematology, February 2017