

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

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 $1,0 \times 10^9/L$ 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 utrona 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.

Neutrofil, dvs 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 blod bilden 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 $1,0 \times 10^9/L$. 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.

Metodbeskrivning

B-Leukocyter, B-Neutrofila, B-Diff, Sysmex XN-10Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Basofili ses framför allt vid myeloproliferativa tillstånd.

Lymfocytos, dvs 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.

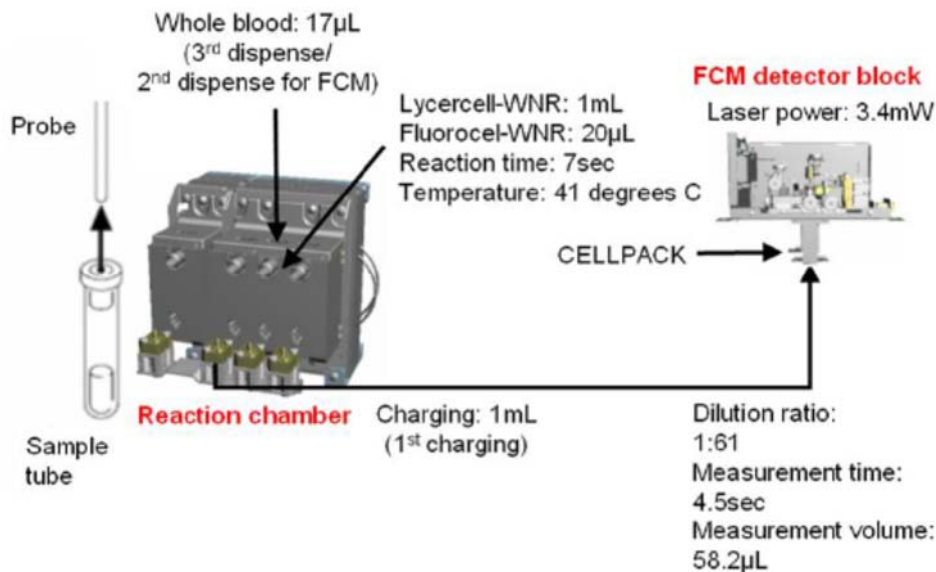
Monocytos ses vid långdragna inflammatoriska tillstånd såväl infektiösa som icke infektiösa liksom vid maligna sjukdomar.

Erythroblaster förekommer vid grav anemi oavsett anemimekanism (dock ej aplastisk anemi) men är vanligast vid svår hemolytisk anemi. Vid rubbad benmärgsfunktion (leukemi, benmärgsmetastaser) kan erythroblaster återfinnas i perifert blod utan att den erythropoetiska aktiviteten behöver vara hög [8].

Analysprincip

Flödescytometri med halvledarlaser i WNR kanal, B-Basofila, övriga B-Leukocyter, B-NRBC, se figur 1.

Figur 1

2.8.4 WNR Analysis

EDTA-blod (17µL) späds med Lysercell WNR (1mL) som innehåller en tensid som lyserar erythrocyterna och permeabiliserar leukocyterna så att färgen kan tränga in genom membranet, se figur 2. Infärgning av nukleinsyror sker med ett fluorescerande 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, erythroblaster och basofila och presenteras i scattergram, se figur 4 [1, 2].

Metodbeskrivning

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

Galler för
Klinisk kemi

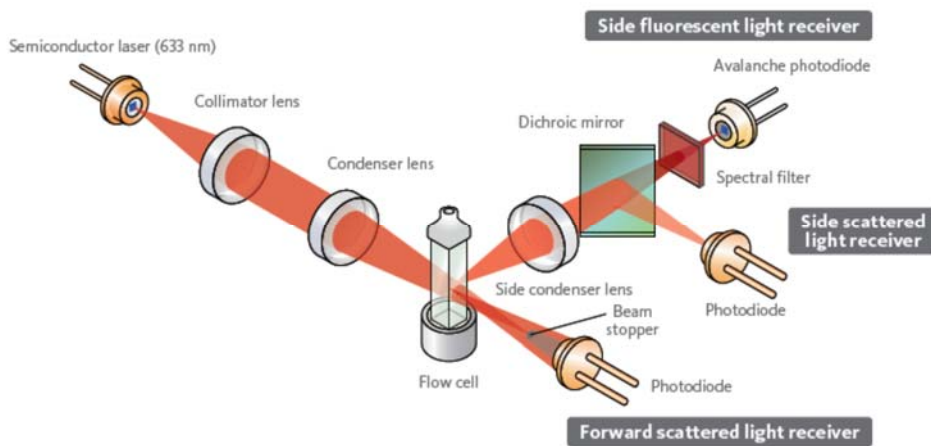
SKÅNE

Figur 2

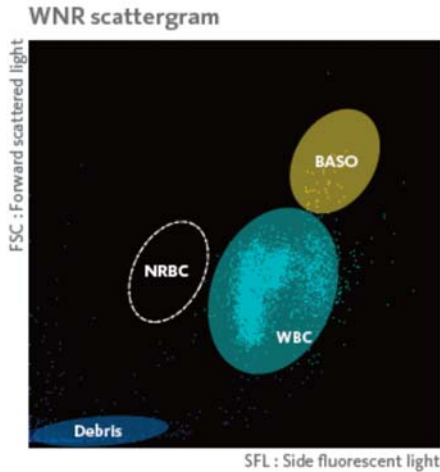
	Penetration of the cell membrane Hemolysis		Fluorescence		Side fluorescent light (SFL)	Forward scattered light (FSC)
Basophils					Strong	Strong
Lymphocytes					Medium	Medium
Monocytes						
Granulocytes (neutrophils, eosinophils, etc.)						
Nucleated red blood cells					Weak	Medium
Red blood cells					Very weak	Very weak

※ This is a conceptual drawing.

Figur 3



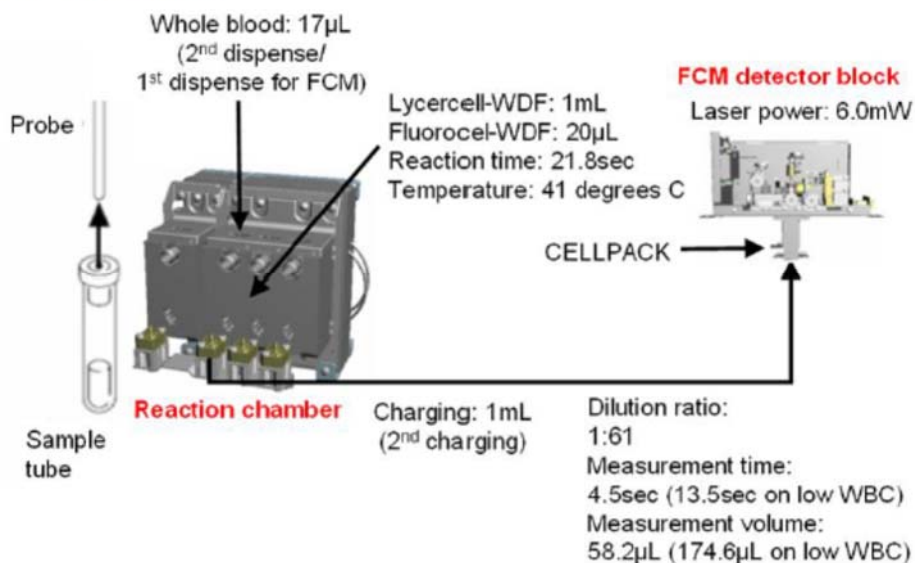
Figur 4



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

Figur 5

2.8.3 WDF Analysis



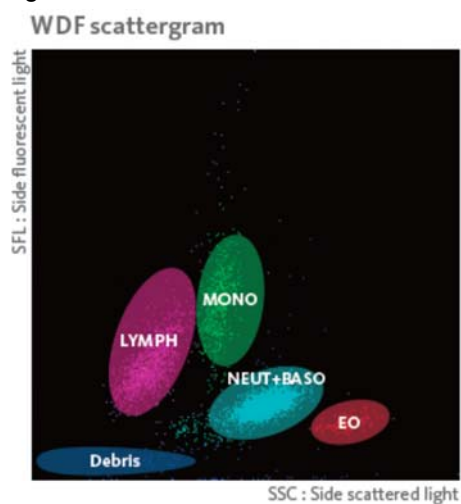
EDTA-blod (17µL) späds med med Lycercell WDF (1mL) som innehåller en tensid som lyserar erytrocyterna och permeabiliserar leukocyterna så att färgen kan tränga in genom membranet, se figur 6. Infärgning av nukleinsyror sker med ett fluorescerande färgämne, polymetin, vid 41°C i 21,8 sekunder. Den längre 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. SSC är ett mått på reflekterande organeller inuti cellen, främst granulor 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

		Hemolysis		Staining		Side fluorescent light (SFL)	Side scattered light (SSC)
Lymphocytes		→		→		Medium	Weak
Monocytes		→		→		Medium	Weak
Neutrophils		→		→		Weak	Medium
Eosinophils		→		→		Weak	Strong
Atypical lymphocytes		→		→		Medium – Strong	Weak – Medium
Immature white blood cells		→		→			

※ This is a conceptual drawing.

Figur 7



Metodbeskrivning

B-Leukocyter, B-Neutrofila, B-Diff, Sysmex XN-10Gäller 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 x10⁹/L) samt segmentkärniga neutrofila (1,7-7,5x10⁹/L).

Metodbeskrivning

B-Leukocyter, B-Neutrofila, B-Diff, Sysmex XN-10Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

Metodkaraktistika**Interferenser och felkällor**

Falskt för låga leukocyter vid leukocyttaggregat [4].

Falskt för höga leukocyter vid trombocyttaggregat, lysresistenta erythrocyter, erythrocytaggregat, kryoproteiner, kryoglobuliner, fibrin och stora trombocyter [4].

MätområdeB-Leukocyter: 0,00 – 440,0 x10⁹/L [4].**Detektionsgräns**B-Leukocyter: 0,01x10⁹/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
2,90	2,3	2,1	1,0	2,0	30
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.

Metodbeskrivning

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

Gäller för
Klinisk kemi

SKÅNE

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.