|  |
| --- |
| B-Trombocyter, Trc-MPV, B-IPC, Trc-IPF påSysmex XN-10  |

**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*), dvs 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 destruktion 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 destruktion 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 trombocytnivå. 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]



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* (x 109/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. Vtrc = Ph \* K där K är en omvandlingsfaktor mellan impedans och volym. Summan av pulsvolymerna dividerat med antalet pulser = MPV

Figur 2



Figur 3



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

Figur 4 [16]

**

EDTA-blod (5µL) späds med CELLPACK DFL (1mL). Fluorocell RET (20µl) tillsätts för färgning av nukleinsyror med ett fluoroscerande 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 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 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 erytrocyter och antal trombocyter kan räknas ut.

Figur 5



Figur 6



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

Figur 7 [16]



EDTA-blod (5µL) späds med CELLPACK DFL (1mL). Fluorocell PLT (20µl) tillsätts för färgning av nukleinsyror med ett fluoroscerande 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. Arean med hög fluorescensintensitet separeras som omogen trombocytfraktion (IPF) s.k. retikulerade trombocyter [14, 15]. Den känsliga fluorescensdetektionen gör att PLT-F kanal kan används speciellt för låga trombocyter[1, 2].

Figur 8



## Referensintervall

**B-Trombocyter**

Vuxna [3]

Kvinnor: 165 – 387 x 109/L

Män: 145 – 348 x 109/L

Barn [12]
1 - 6 dagar: 80 – 350 x 109/L

6 - 14 dagar: 80 – 450 x 109/L
2 - 4 veckor: 80 – 550 x 109/L
1 - 3 månader: 100 – 550 x 109/L
3 - 12 månader: 130 – 550 x 109/L
1 - 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

## Metodkarakteristika

### Interferenser och felkällor

Falskt för låga trombocyter vid trombocytaggregat, pseudotrombocytopeni, och stora trombocyter.
Falskt för höga trombocyter vid microerytrocyter, fragmenterade erytrocyter, fragmenterade leukocyter och kryoglobuliner [4].

### Mätområde

B-Trombocyter: 0 – 5000 x 109/L [4]

### Detektionsgräns

3 x109/L [4]

### Mätosäkerhet

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

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Metod | Enhet | Nivå | XN-L, KsdCV (%) | XN-R, KsdCV (%) | XN-L, LuCV (%) | XN-R, LuCV (%) | antal |
| PLT-IPLT-OPLT-F | x 109/L | 345542 | 9,24,12,9 | 8,8 | 9,34,5 | 9,3 | 303016 |
| PLT-IPLT-OPLT-F | x 109/L | 202207208 | 2,44,93,3 | 2,1 | 3,04,2 | 3,0 | 303016 |
| PLT-IPLT-OPLT-F | x 109/L | 505510519 | 1,32,01,5 | 1,7 | 2,12,7 | 1,8 | 3016 |
| Trc-IPFTrc-IPFTrc-IPF | % | 19,220,219,5 | 2,63,33,4 |  |  |  | 161616 |

Imprecision 180104-180301 (lot 7345)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Trc-IPFTrc-IPF | % | 19,420,2 | 2,33,6 |  |  |  | 5252 |
| B-IPCB-IPC | x 109/L | 15,950,9 | 7,43,8 |  |  |  | 5252 |

### 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.

## Referenser

1. Sysmex XN-Series Clinical Case Report Vol 1.

2. Insert 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

## Provtagning

### Rörtyper

EDTA-rör (lila kork). *Ska vara fyllt med mer än 2/3 av avsedd volym.*

EDTA-Microtainer-rör (lila kork). Ska vara fyllt med 250 - 500 μL.

## Provhantering

### Hållbarhet [14]

EDTA-rör:
B-Trombocyter, B-IPC och Trc-IPF är hållbara 48 timmar i rumstemperatur/kyl.

Trc-MPV är hållbara 24 timmar i rumstemperatur/kyl.

EDTA-Microtainer-rör:

B-Trombocyter, Trc-MPV, B-IPC och Trc-IPF är hållbara 10 timmar i rumstemperatur/kyl.

*Efter kylförvaring ska proverna rumstempereras 20 minuter före analys.*

## Instrument och tillbehör

Sysmex XN-1000 (Landskrona, Simrishamn)

Sysmex XN-2000 (Kristianstad, Hässleholm, Helsingborg, Ängelholm, Ystad, Trelleborg)

Sysmex XN-9000 (Lund, Malmö)

Sysmex TS-10 (Lund, Malmö)

Sysmex RPU 2100R (Lund, Malmö Kristianstad, Helsingborg)

Sysmex SP-10 (Lund, Malmö)

Sysmex DI-60 (Lund, Malmö)

Sysmex Extended IPU

## Reagens

Reagens från Sysmex Corporation [4, 5].

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Beteckning* | *Volym* | *Beskrivning* | *Hållbarhet oöppnad förpackning*  | *Hållbarhet öppnad förpackning.*  | *Farosymbol* | *Artikelnummer* |
| Cellpack DST | 10L | Koncentrat till XN, prepareras i RPU.NaCl, Trisbuffert, EDTA-2K | Se utgångsdatum på fp. | 60 dagar |  | BQ505775 |
| Cellpack DCL | 10L | DiluentNaCl, Trisbuffert, EDTA-2K | Se utgångsdatum på fp. | 60 dagar |  | CU228496 |
| Cellpack DCL | 20L | DiluentNaCl, Trisbuffert, EDTA-2K | Se utgångsdatum på fp. | 60 dagar |  | CT661628 |
| Cellpack DFL | 2x1,5L | Surfactant för detektion av retikulcyter och optiska trombocyter.Tricine buffert | Se utgångsdatum på fp. | 60 dagar |  | BT965910 |
|  | 1L |  |  | 70 dagar |  | AR829995 |
| Fluorocell RET | 2x12ml | Fluorokrom för detektion av retikulocyter och optiska trombocyter.Polymetin, etanol, etylenglykol | Se utgångsdatum på fp. | 90 dagar |  | BN337547 |
| Fluorocell PLT | 2x12ml. | Fluorokrom för detektion av PLT-F.Oxazine, etylenglykol | Se utgångsdatum på fp. | 90 dagar |  | CD994563 |
| Cellclean | 50ml | Natriumhypoklorit(klorinkonc. 5,0 %) | Se utgångsdatum på fp. | - |  | 83401621 |

### Beredning

Cellpack DST är ett koncentrat som bereds till färdigt reagens i RPU (används i Malmö, Lund, Kristianstad, Helsingborg).

Övriga reagens är bruksfärdiga.

## Kalibrator

### Beteckning

Sysmex XN Cal artikelnummer 213523 [9].

### Beredning

Bruksfärdig.

### Kalibreringsförfarande

Se Dokument id C-8573 [Instrumenthandledning Sysmex XN-Serie](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=8573&freeText) [6].

### Kalibreringsfrekvens

Se Dokument id C-8573 [Instrumenthandledning Sysmex XN-Serie](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=8573&freeText) [6].

## Interna kontroller

Kontroller från Sysmex Corporation används [10]. För närvarande används XN-Check L1 och L2.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Beteckning* | *Nivå x109/L PLT-I* | *Nivå x109/L PLT-F* | *Hållbarhet**öppnad ampull* | *Hållbarhet**oöppnad ampull* | *Förvaring* | *Artikelnummer* |
| XN-Check L1 | ca 35 | ca 40 | 7 dygn | Se ampull | Kyl | 213487 |
| XN-Check L2 | ca 200 | ca200 | 7 dygn | Se ampull | Kyl | 213488 |
| XN-Check L3 | ca 500 | ca 475 | 7 dygn | Se ampull | Kyl | 213489 |

### Beredning

Bruksfärdig.

### Kontrollförfarande

Se Dokument id C-8573 [Instrumenthandledning Sysmex XN-Serie](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=8573&freeText) [6].

Hållbarhet oöppnad förpackning se ampull.

Tillverkarens åsatta värden används.

Kontroller analyseras 3 ggr/dygn.

### X-barM

X-barM är ett system baserat på kontroll av flytande medelvärde för utvalda analyser. Patientvärde utan suspekta flaggor registreras i batcher. Antalet i varje batch bestäms utifrån antal analyserade prover/dag/instrument. Instrumentet larmar när medelvärde för en batch faller utanför åsatta gränser. De gränser som tillämpas är +/- 3% av medelvärde för analys Erc-MCV, Erc-MCH och Erc-MCHC och +/- 10% för Trc-MPV. Medelvärdet (target value) baseras på minst 300 patientvärde. Medelvärdet kontrolleras och justeras efter kalibrering.

## Externa kontroller

### Beteckning

EQUALIS, Sverige. Analyseras var 4:e vecka. Gäller endast B-Trombocyter.

## Utförande

Se Dokument id C-8573 [Instrumenthandledning Sysmex XN-Serie](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=8573&freeText) [6].

## Tekniskt/medicinskt godkännande

Interna kontroller ska ligga inom angivna gränser som är registrerade i XN instrumentet. Gränser ändras från lot till lot. Patientmedelvärde följs och instrumentet larmar ut vid avvikelser från inlagda gränser. Övrigt se Dokument id C-8573 [Instrumenthandledning Sysmex XN-Serie](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=8573&freeText) [6].

Patient resultat valideras i Extended IPU, se Dokument id C-8377 [Instrumenthandledning Extended IPU](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=C-8377&freeText) [7].

Valideringsgränser och omkörningsrutiner styrs genom det regelsystem som beskrivs i
Dokument id C-10363 [Extended IPU, regelverk Skåne](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=10363&freeText) [17].

## Svarsrapportering

**Enhet och antal decimaler**

**B-Trombocyter**

Svar anges i 109/L.

Svar anges med heltal.

Värden < 5 x109/L besvaras med < 5 x 109/L.

**Trc-MPV**

Svar anges i fl.

Svar anges med en decimal.

**B-IPC**

Svar anges i 109/L.

Svar anges med en decimal.

**Trc-IPF**

Svar anges i

Svar anges med en decimal.

**Larmgränser B-Trombocyter**:

Se instruktion Dokument id C-7669 [Larmsvarsrutiner](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=7669&freeText) [18].

**Autovalidering**

Resultat autovalideras enligt Dokument id C-10363 [Extended IPU, regelverk Skåne](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=10363&freeText) [17].

## Säkerhetsföreskrifter

Vid arbete med Fluorocell RET, Fluorocell PLT och Cellclean undvik produktkontakt med hud, ögon och kläder. Övriga risker och åtgärder se säkerhetsdatablad Fluorocell RET (21.03.2012), Fluorocell PLT (21.03.2012) och Cellclean (CL-50) (1.2.2).
Övriga reagens är ej klassade som farliga.

Hantering av avfall se Dokument id C-8573 [Instrumenthandledning Sysmex XN-Serie](http://dokument-public360.skane.se/default.aspx?verksamhetsOmradeId=0&dokTypId=0&ortId=0&procId=0&stodProcId=0&docNo=8573&freeText) [6].

## Ansvariga personer

### ProcessledareCamilla Streimer

### Medicinskt ansvarLisa Walther

### MetodansvarJanet Jönsson

## Författare

Ulf Ekström

Janet Jönsson