

Validering af CSV analyseret på Sysmex XN

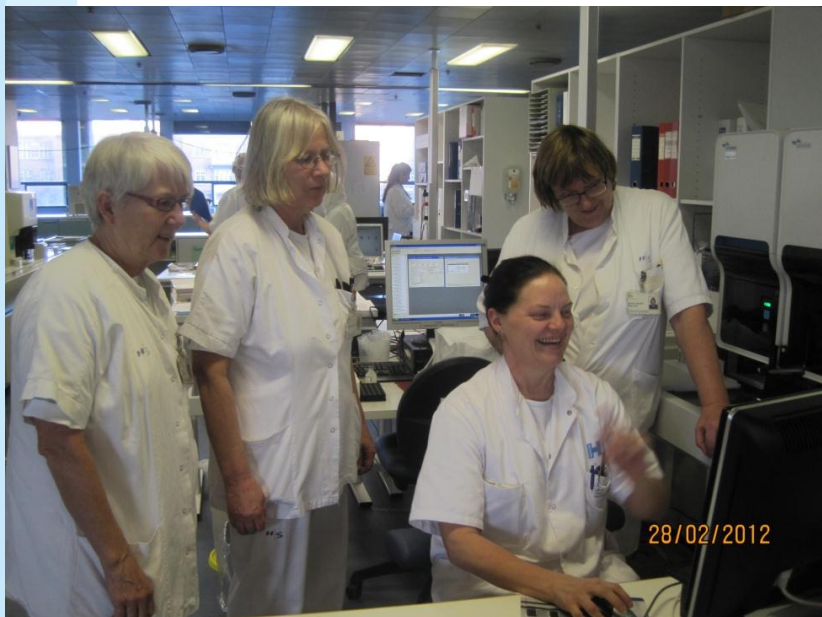
Klinisk Biokemisk afdeling KB3011.

- Margit Grome

Gruppen omkring indkøring af Sysmex XN:

Lone, Annette, Ruth og Bente

Bente og Margit



Antal og type af BF's i 2011:

- CSV. 3050
- ASC: 303
- Ledv. 2
- Pleura: 50

I alt: 3405

Dvs. gennemsnit per uge: **66**

Vi kan også have enkelte pericardie-væsker (3- 5 / år).

Hvad har vi hidtil gjort (celletælling):

Celletælling:

- Gode gamle tællekammermetode:
- Fuchs Rosenthal
- Oplægning ufarvet – eller farvet med leukocytællelevæske (Methylvioleddikesyre).
- Hvis $RBC > 2400 \times 10^6/l$ kan Sysmex **KX21** benyttes.



Detektionsgrænse:

Nedre: WBC og RBC: $3 \times 10^6/l$ og $1 \times 10^6/l$

Øvre svargrænse:

WBC: $40000 \times 10^6/l$, RBC: $200000 \times 10^6/l$

Hvad har vi hidtil gjort (Differentialtælling):

- Hvis leukocytkoncentrationen er
- **$> 10 \times 10^6/l$** udføres differentialtælling.
- Oprettes automatisk af LABKA.

Cytocentrifuge Præparation:



Shandon Cytospin:

Optimalt antal WBC's per pellet:

Ca. 5000

Optimal væskemængde:

300-500 μ l (Max. 500 μ l)

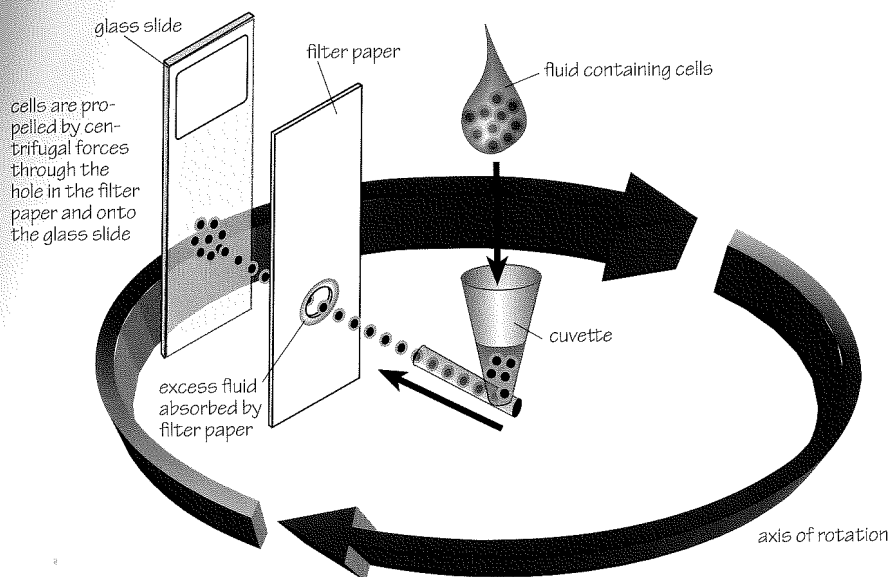
Og der tilsættes altid:

1 dråbe 20% Albumin.

Hastighed:

1000 (700) RPM

Cytocentrifuge Principles

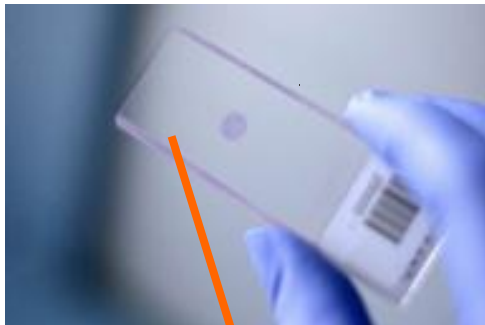


A body fluid sample is added to a cuvette. Using centrifugal force, the cyto-centrifuge machine spins the cuvette and propels cells onto a circular area of a glass slide. Residual fluid is absorbed by filter paper overlying the glass slide.

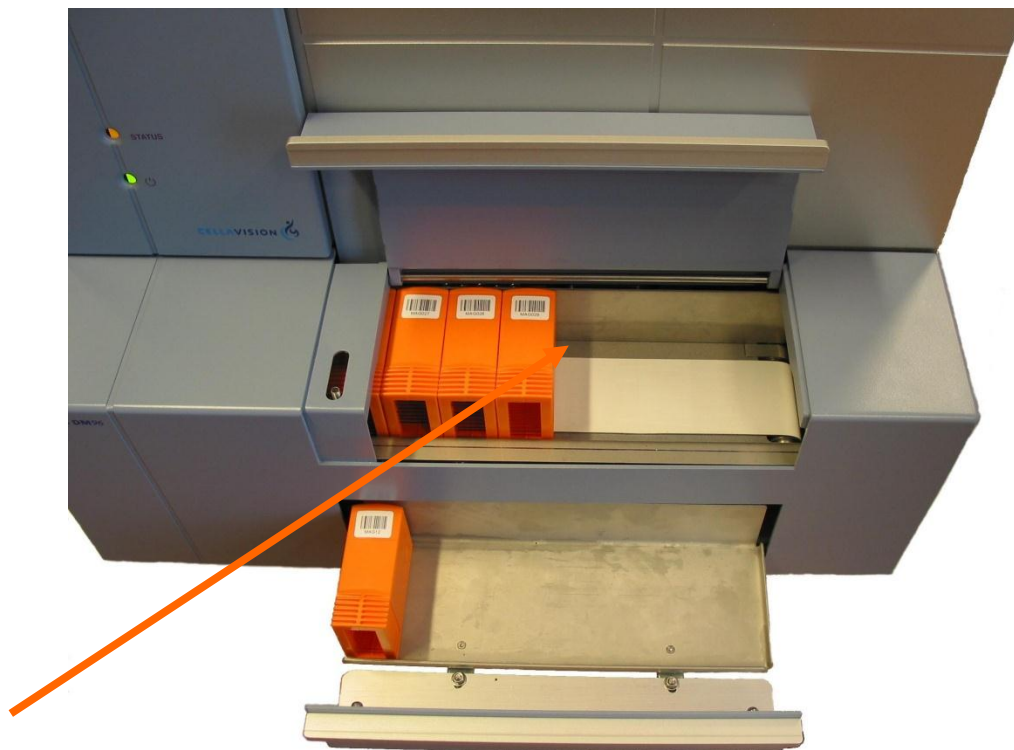
Introduction

13

Cytospin-præp. farvet i SP1000i.



DM96 -indgangsluge



**OBS! BLÅ
kassette til
kropsvæsker.**

Tidligere rutine

Celletyper indtil til 2008:

1. Neutrocytter (PMN)
2. Lymfocytter og monocytter (MN)
3. Uspecificerede celler

• Antal celler : **100**

Siden nov. 2008:

Celletyper (kan defineres af bruger):

1. Neutrocytter
2. Lymfocytter
3. Eosinofilocytter
4. Monocytter/ macrofager
5. Other

200

Differentialtælling CellaVision DM 96 – BF (3 celletyper vises)

Det neurale netværk præ-validerer cellerne, og bioanalytiker kigger alle celler efter – samt ”signer”.

Worklist

Order ID	S
BF30A	1
BF28B	1
BF25B	1
BF24A	1
CB23A	1
CB16A	1
CB24A	1
BF23A	1
BF28A	1

WBC

	Count	%
• Unidentified	-	-
• Neutrophil	95	48.0
• Lymphocyte	6	3.0
• Eosinophil	-	-
• Macrophage	97	49.0
• Other	-	-
Total	198	100

Non-WBC

	Count	%
• Smudge cell	4	-
• Artefact	4	-

Neutrophile →

Makrofager

Lymfocytter

Sysmex XN 1000 med APP: Body Fluid (BF) mode



”manuel analyse”

XN- Hvad er nyt mht Body Fluid ??

Lille mængde prøvemateriale.

- Prøvemængde: 88 µl. Min mængde – 160 µl el. 0,7 ml

Større præcision:

- ”Extended count volumen”: 10,4 µl (WBC)
- (Fuchs Rosenthal 3,2 µl, XE-5000: 2,4 µl)

Fortynding:

- BF-WDF: 1: 20 (Blod 1 : 61)
- BF.RBC: 1:498 (samme som blod 1: 498)

Kontrolmateriale: BF-kontrol

Kontrolmateriale: XN CHECK™ BF

- **Kontrol af:** Totalt antal kerneholdige celler (TNC), WBC, RBC og XN-diff-tælling af WBC.
- **Består af:** Stabiliserede humane RBC og WBC i et konserveringsmedie. 2 niveauer:
 - WBC; level 1 (ca. $75 \times 10^6/l$) og level 2 (ca. $300 \times 10^6/l$).
 - RBC: Level 1 (ca. $25000 \times 10^6/l$) og level 2 (ca. $75000 \times 10^6/l$).
 - Vi kunne godt ønske os lavere værdier i level 1.
- **Holdbarhed ef. åbning:** 30 dage (v. 2 – 8 °C)
- **Forventede værdier:** Anført på datablad /CD.

Kontrolmateriale: XN CHECK™ BF- Værdier for TC-BF

Kontrol

Data

	1	2
• Level	• 1	• 2
• Lot nr.	• QC-12971301	• QC-12971302
• N	• 20	• 21
• middelværdi	• 81,4 x 10⁶/l	• 299 x 10⁶/l
• SD	• 3,30	• 9,51
• CV	• 4,1 %	• 3,2 %
• Target	• 77 x 10⁶/l	• 293 x 10⁶/l

Kontrolmateriale: XN CHECK™ BF- Værdier for TC-RBC

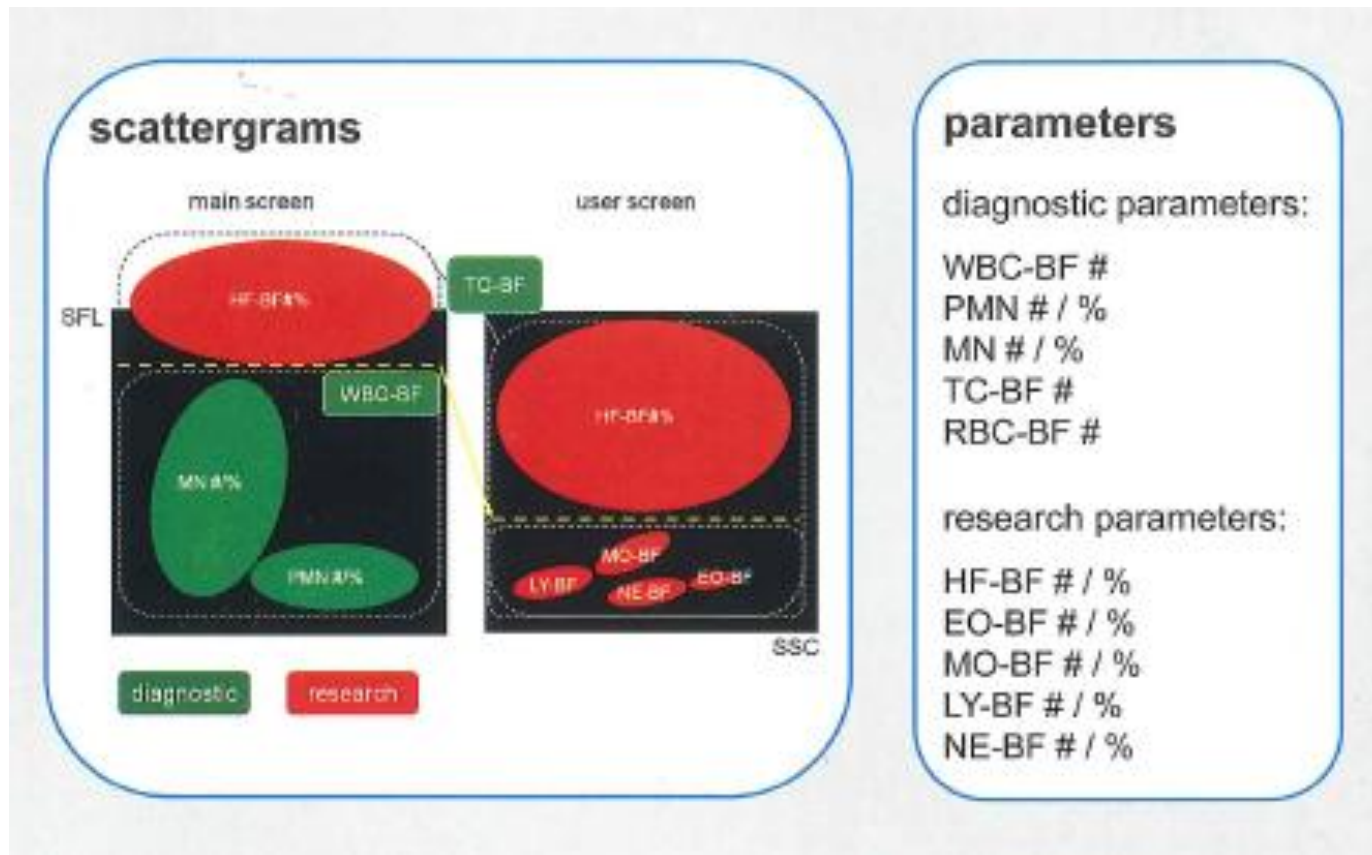
Kontrol

Data

	1	2
• Level	• 1	• 2
• Lot nr.	• QC-12971301	• QC-12971302
• N	• 20	• 20
• middelværdi	• 25100 x 10⁶/l	• 74200 x 10⁶/l
• SD	• 641	• 1795
• CV	• 2,6 %	• 2,4 %
• Target	• 24000 x 10⁶/l	• 73000 x 10⁶/l

SYSMEX XN BF

(Scattergram for kerneholdige celler):



Det lød lovende...MEN

- Vi fik 2 XN til afprøvning.
- Første problem: Prøvetagningsrør.
- Plast-spidsglas kan ikke benyttes →
- Det anbefales at man benytter:
- Sarstedt-rør 62.558.201
- *ML: 5. Ø/mm, 15,3. L/mm : 57,*
-



Måleområde WBC (TC-BF):

- **Sysmex:** Øvre grænse: $10000 \times 10^6/l$
- Nedre grænse: $0 \times 10^6/l$

- **Egne us:**
- 4 CSV-prøver med lav WBC-konc ($< 5 \times 10^6/l$)
- Hver prøve analyseret 10 gange.
- Middelværdi og SD (intramedier) beregnet.
- Detektionsgrænse er **fastsat til $0 + 5 \text{ SD}$.**
- Konklusion: SD: $0,49 \times 10^6/l$,
- **Nedre detektionsgrænse: $3 \times 10^6/l$**

Validering.... Metodesammenligning CSV- WBC tællekammermetoden vs. XN.

- 70 prøver- WBC-konc: 0 – 1500 x 10⁶/l
(*Enkelt høj prøve udeladt, res mikroskop: 7219, XN: 5405*)

Acceptgrænse for gennemsnitlig spredning:

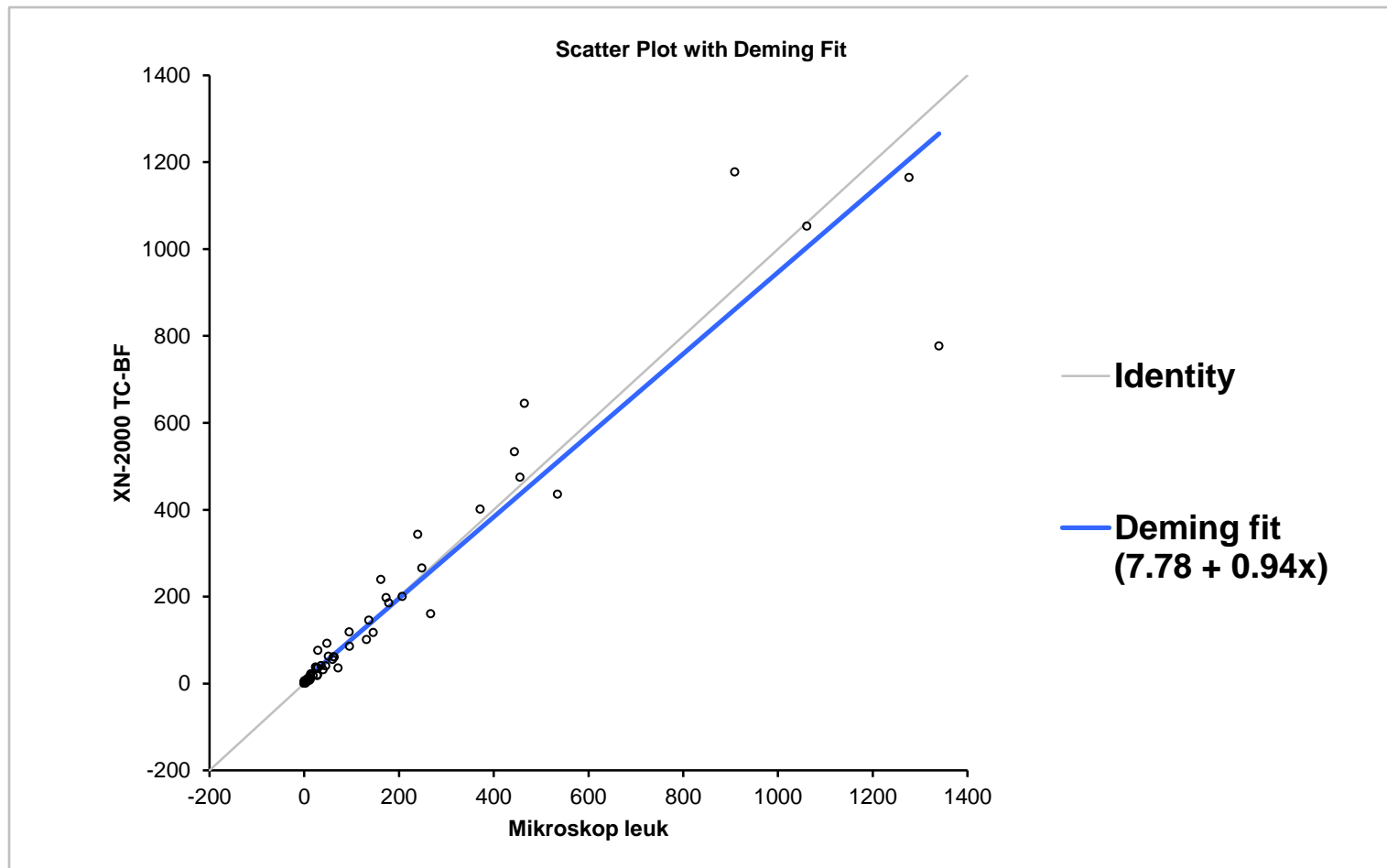
- 15% (relativt) for WBC > 20 x 10⁶/l
- eller 3 x 10⁶/l, for WBC < 20 x 10⁶/l

- Yderl: 6 ascites og 1 pleura..

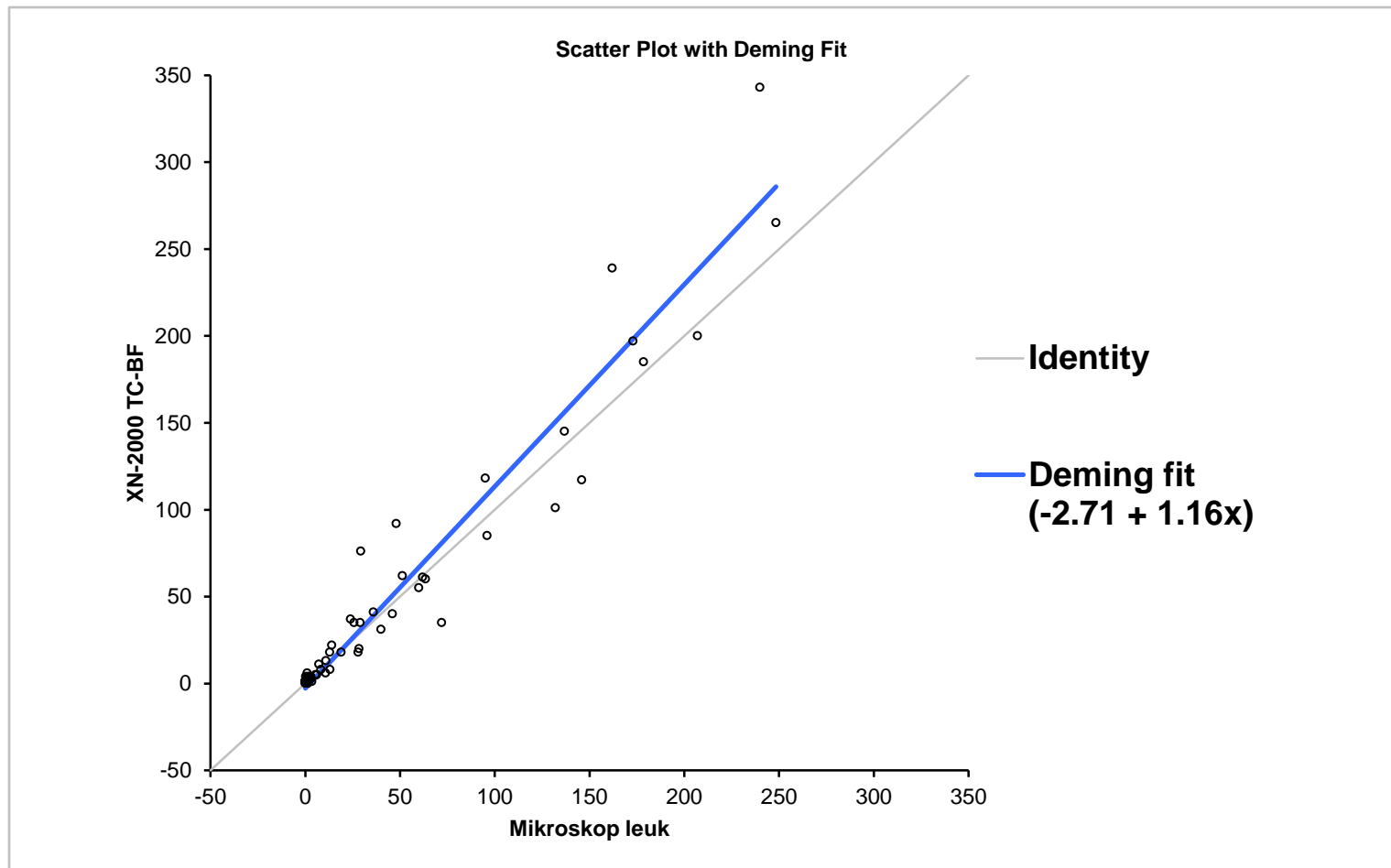
Validering.... Metodesammenligning CSV- WBC tællekammermetoden vs. XN.

Analyse-It	Sæt A (WBC < 1500) N=70	Sæt B (WBC < 250) N=60
Method Comp.- Deming fit.	$Y = 0,94x + 7,8$	$Y = 1,16x - 2,7$
Agreement- Altman Bland test	Bias = -0,7 (95% CI: -20,9 til 19,4)	Bias = 4,3 (95% CI: -1,1 til 9,6)
RegerSSION- Linear:	$R^2 = 0,91$	$R^2 = 0,93$

Validering.... Metodesammenligning CSV- WBC tællekammermetoden vs. XN. WBC < 1500 (n= 70)



Validering.... Metodesammenligning CSV- WBC tællekammermetoden vs. XN. (WBC < 250 (n= 60))



Alarmer ??

Ud af 70 prøver, var kun 1 behæftet med alarm: **WBC**
abnormal scattergram. (Res. WBC: 11 og 13)

Så vi har ikke den store erfaring.

Men vi har besluttet:

- Hvis * eller ... vises, er der stor usikkerhed. ➡ HÅNDTÆLLING.
- Hvis @ vises er måleområdet overskredet. ➡ FORTYND
- WBC abnormal scattergram. ➡ HÅNDTÆLLING

Holdbarhed WBC:

- **CSV:** 1 time – men tælles op til 3 timer
- **Pleuravæske, Ascitisvæske og Ledvæske**
- Prøvemateriale opbevaret i EDTA-rør.
- Tælles normalt straks efter modtagelsen.



Opbevaring og holdbarhed:

BF	Opbevaring	Holdbarhed	Opbevaring	Holdbarhed
CSV	Rumtemp.	1time (udføres op til 3 timer m. kommentar)		
Pleura- Ascites- og ledvæske	Rumtemp.	4 timer	Køl (2- 8 °C)	WBC: 24 timer DIFF: 4 timer

Holdbarhed er taget fra litteraturstudier: Barrett D. Conner: Variations in Pleural Fluid WBC Count and Differential Counts With Different Sample Containers and Different Methods. (CHEST 2003; 123:1181-1187)

Opblanding:

- **CSV, Pleura- og Ascitesvæske**
- Blodvender : 2 – 5 minutter (benyt stopur).
- Med hånden: Forsigtigt, men grundigt 10 – 15 gange.
-
- **Ledvæske**
- Blodvender : 5 – 10 minutter (benyt stopur). Jo mere viskøs væsken er, jo vigtigere er det at få den godt opblandet.

Validering.... Metodesammenligning CSV-WBC tællekammermetoden vs. XN.

- **Konklusion:**
- *Metoden opfylder de opstillede kvalitetskrav og instrumentet kan tages i brug.*

Validering.... Metodesammenligning CSV-RBC tællekammermetoden/ KX 21 vs. XN.

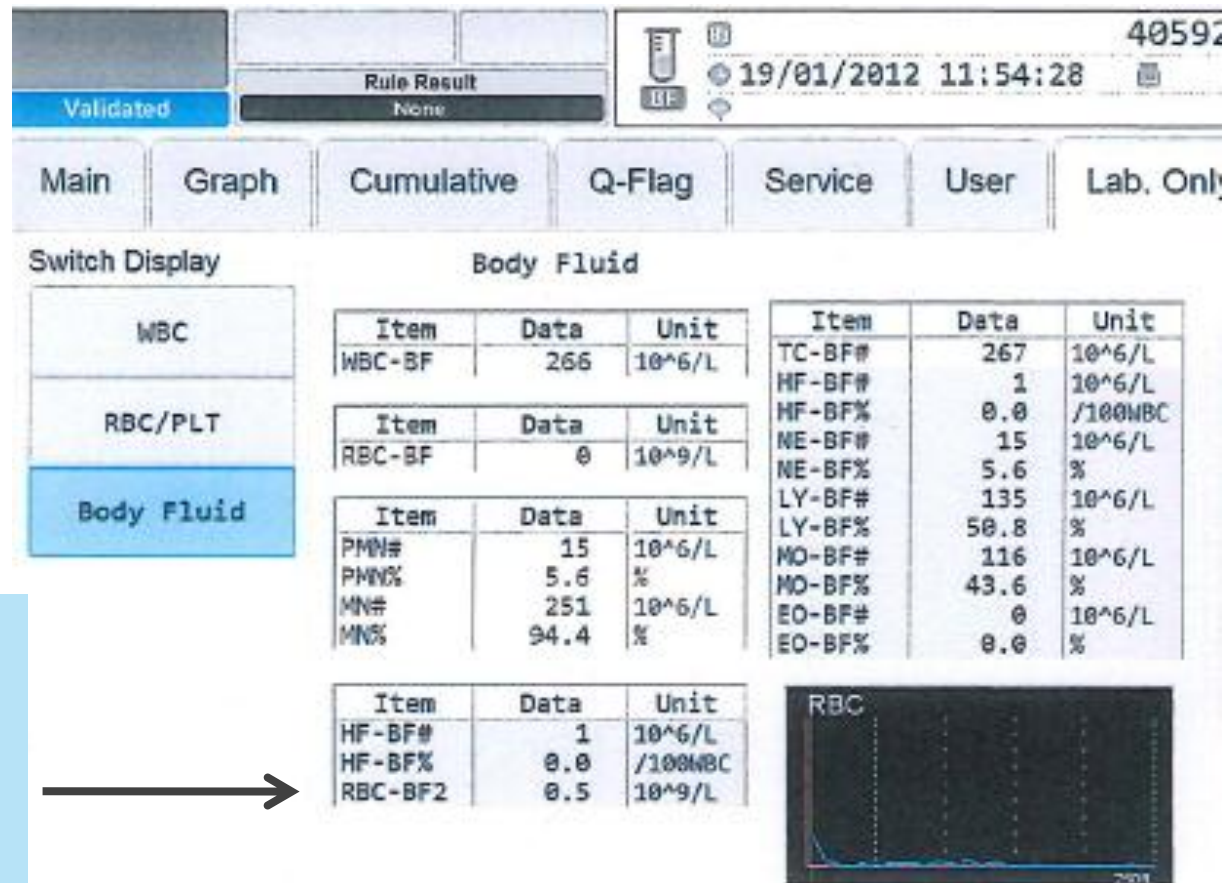
73 CSV prøver, RBC-konc: 0 – 540000 x 10⁶/l

Acceptabel gennemsnitlig spredning:

- 15 % (relativt) for antalskoncentration >3000 x 10⁶/l
- 500 x 10⁶/l (absolut) for antalskoncentration ≤3000 x 10⁶/l.

Nedre RBC-detektionsgrænse.

Sysmex : $0,003 \times 10^6/\mu\text{l} = 3000 \times 10^6/\text{l}$



RBC-BF2
1 decimal.

X1000 =
 $10^6/\text{l}$

Nedre detektionsgrænse RBC-BF (egne us.)

Sysmex: Øvre grænse: $10000 \times 10^6/\mu\text{l}$. Nedre grænse: $3000 \times 10^6/\text{l}$

- Analysering af 5 prøver med lav antalskoncentration af erythrocytter ($<500 \times 10^6/\text{l}$)
- Detektionsgrænsen er fastsat til $0 + 5\text{SD}$
- Middel SD: $52,7 \times 10^6/\text{l}$
- Nedre detektionsgrænse: $264 \times 10^6/\text{l} = \mathbf{300 \times 10^6/\text{l}}$
- En detektionsgrænse på $300 \times 10^6/\text{l}$ er en forringelse af den nuværende grænse, men klinisk acceptabel. I tilfælde, hvor en afdeling ønsker større præcision kan prøven tælles i mikroskop, hvis laboratoriet anmodes derom senest en time efter prøvens modtagelse.

Validering.... Metodesammenligning CSV-RBC tællekammermetoden/ KX 21 vs. XN.

- 7 prøver er udeladt af sammenligningen, fordi det skønsmæssigt er vurderet at afvigelsen er så stor, at det er sandsynligt at der er sket menneskelig fejl eller anden utilsigtet årsag.
- Bla. ”gamle / skrøbelige erythrocytter”.

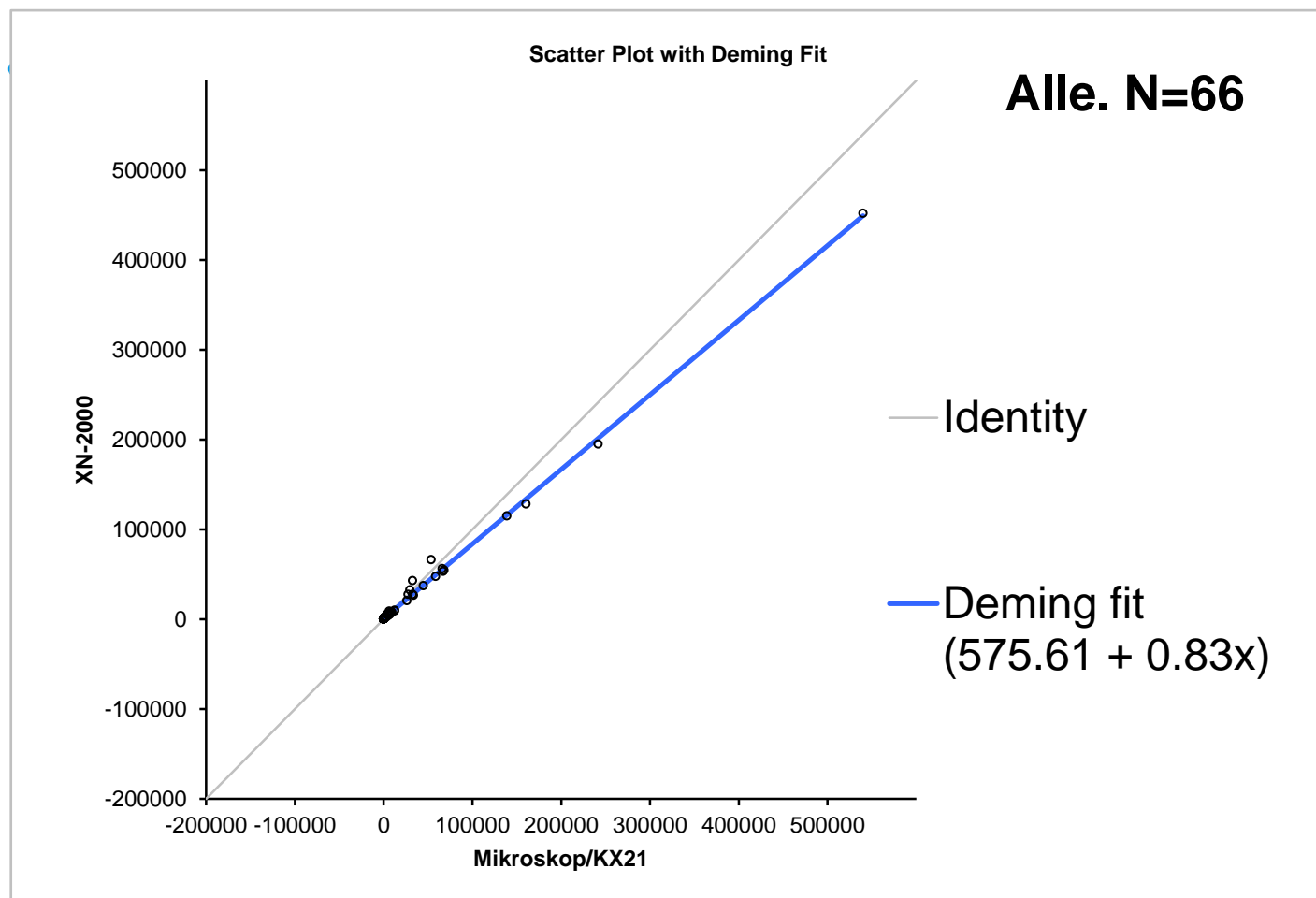
Udeladte CSV- RBC:

Prøve nr.	Mikroskop (x 10 ⁶ /l)	XN-2000 (x 10 ⁶ /l)	Kommentar noteret på analyseark til mikroskop
116	1116	19200	Ingen kommentar
121	137	7700	”Mange gamle ery”
129	140	6600	Ingen kommentar
160	1728	17500	Ingen kommentar
168	304	1300	Ingen kommentar
169	15500	38900	”Der ses utydelige skygger”
172	2860	7600	Ingen kommentar

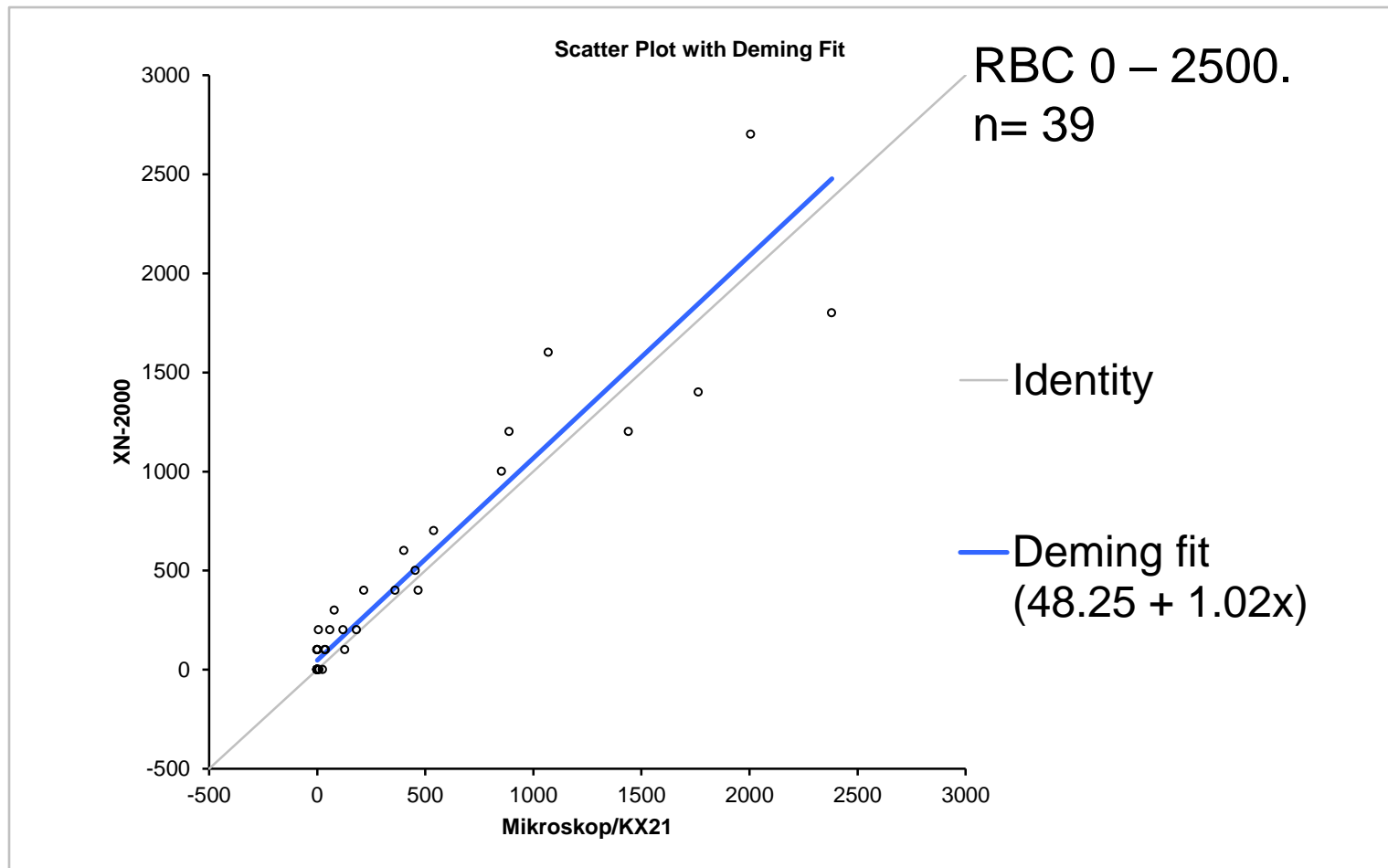
Validering.... Metodesammenligning CSV-RBC tællekammermetoden/ KX21 vs. XN.

Analyse It	Sæt A RBC: 0 – 540000 10 ⁶ /l N=66	Sæt B RBC: 0 – 3000 x10 ⁶ /l N=39
Method Comp.- Deming fit.	$y = 0,83x + 576$	$y = 1,02x + 48$
Agreement- Altman Bland test	Bias = -3825 (95% CI: -7142 to -509)	Bias = 55,3 (95% CI: -10,4 to 120,9)
RegerSSION- Linear:	$R^2 = 1,00$	$R^2 = 0,89$

Validering.... Metodesammenligning CSV-RBC tællekammermetoden/ KX21 vs. XN.



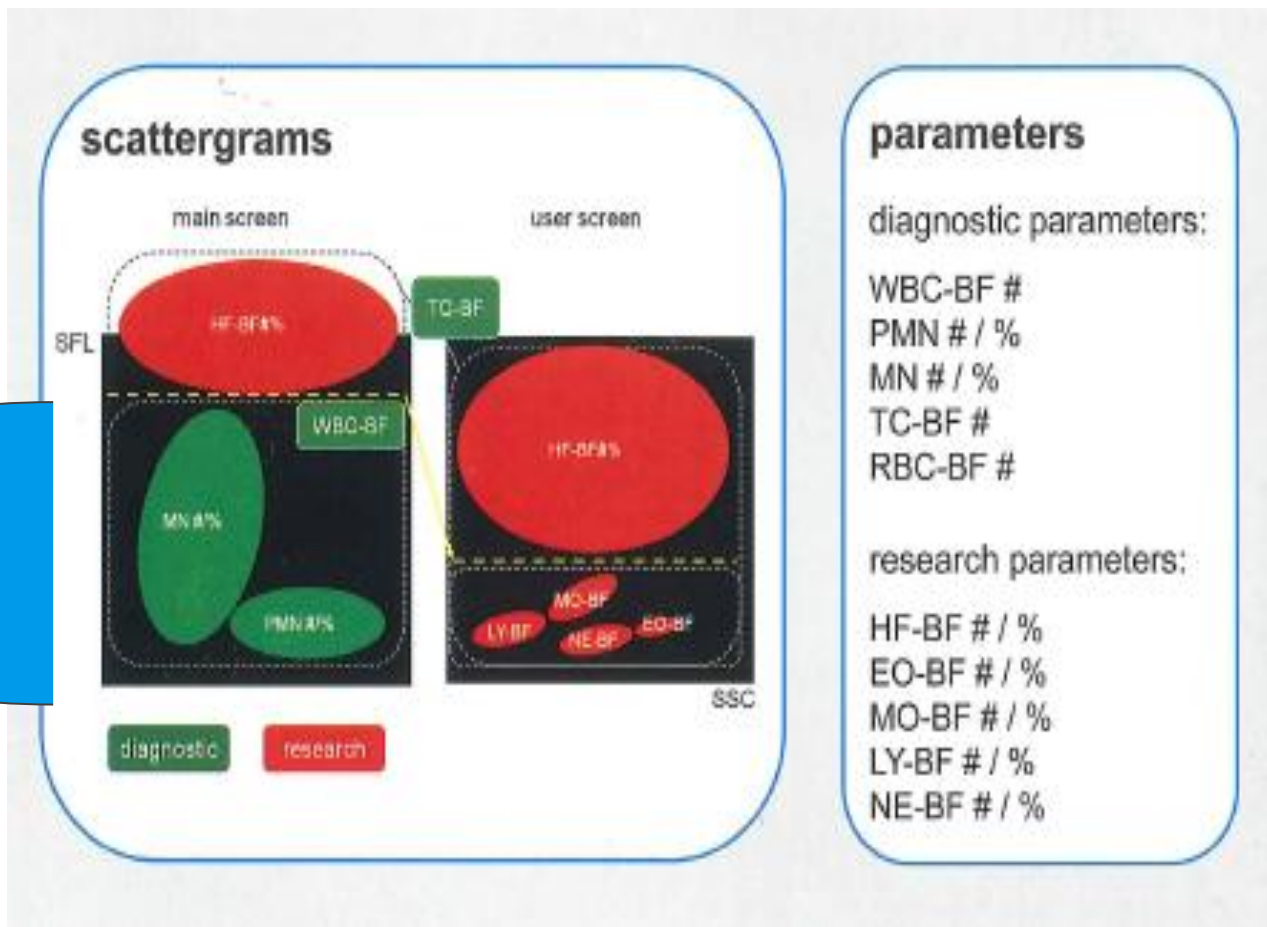
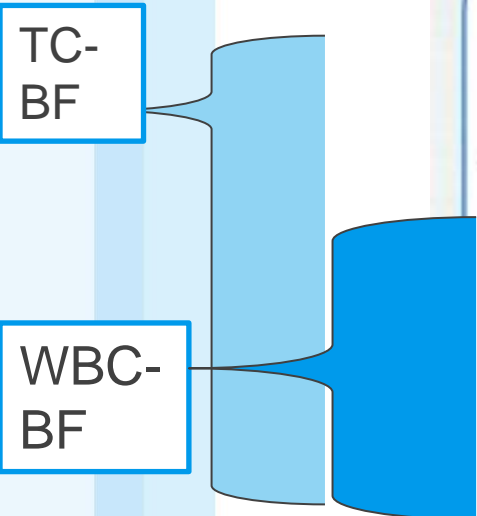
Validering.... Metodesammenligning CSV-RBC tællekammermetoden/ KX21 vs. XN.



Konklusion RBC

- Metoden opfylder de opstillede kvalitetskrav og instrumentet kan tages i brug til rutineproduktion (CSV) snarest.

Hvad med Led-ascites-peritoneal og evt. Bal og pericardievæske ?

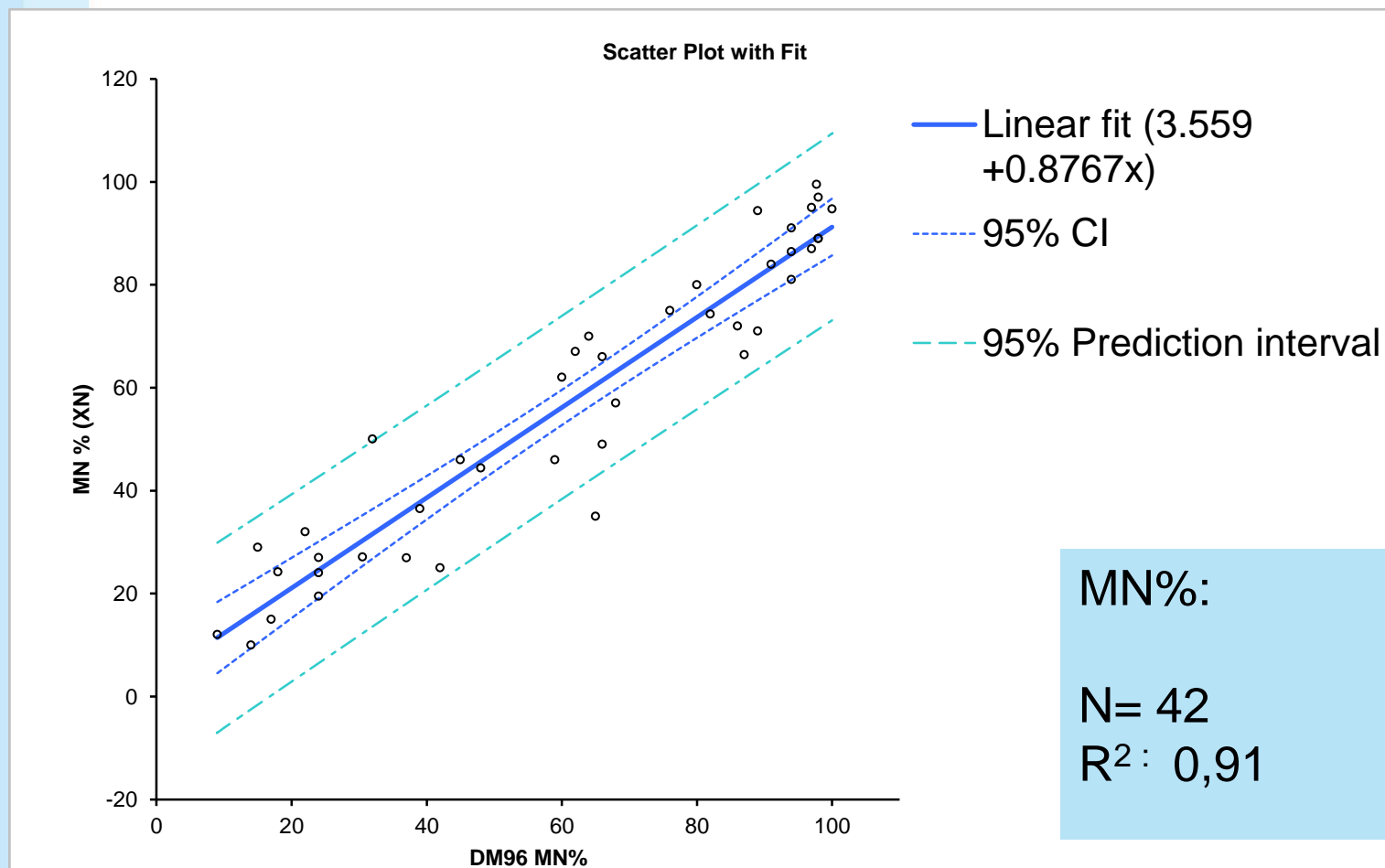


Hvad med Led-ascites-peritoneal og evt. Bal og pericardievæske ?

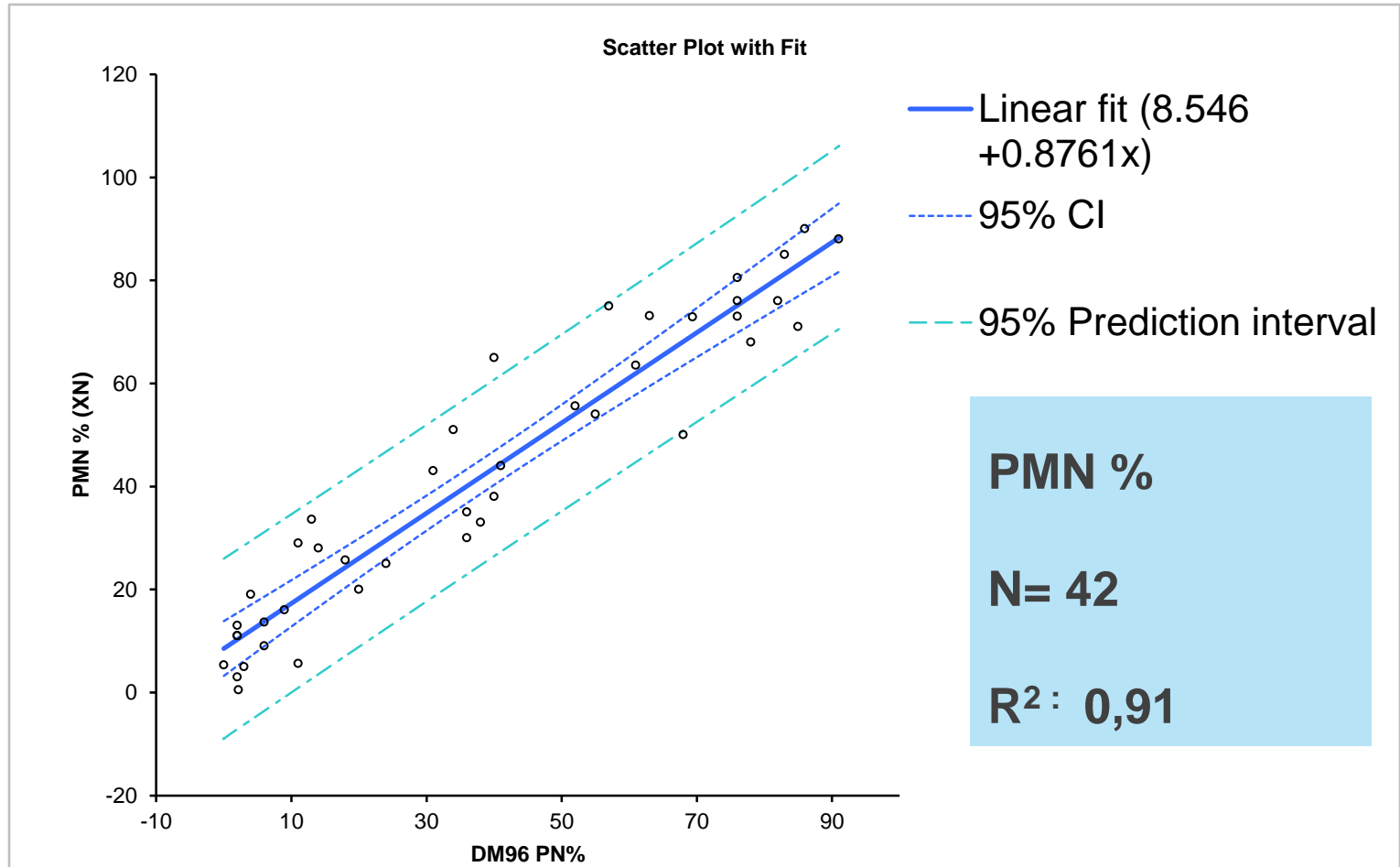
Løbenr	WBC rutine x10 ⁶ /l	TC-BF /XN) x10 ⁶ /l (WBC-BF)	
114	475	353 (351)	Asc (0,5 % meso)
123	42	81 (64)	Asc (ca. 35 % meso)
134	117	107 (82)	Asc (Ot. dom af meso (22 %))
152	534	533 (458) 535 (467)	Plv (m 7% meso + 32 % macro))
156	257	196 (170)	Asc (12% meso)
	576 -699 (638)	592 (521)	BAL

Hvad med MN % og PMN %

(Præp. m. mange smudgede cells er udeladt)



PMN% :



CSV med blaster

Xn Print:

Sample No.: 4059281748
 Patient ID:
 Name:
 Sample Comment:

Ward: Rack:

Position: 19/01/2012 11:51:03 BF
 Doctor:
 Birth: Sex: **118**
 Nickname: XN-2000-1-R

WBC	[10 ⁹ /L]
RBC	[10 ⁶ /ul]
HGB	[mmol/L]
HCT	[Ratio]
MCV	[fL]
MCH	[fmol]
MCHC	[mmol/L]
PLT	[10 ⁹ /L]
RDW-SD	[fL]
RDW-CV	[%]
PDW	[fL]
MPV	[fL]
P-LCR	[%]
PCT	[%]
NRBC	[10 ⁹ /L]
NEUT	[10 ⁹ /L]
LYMPH	[10 ⁹ /L]
MONO	[10 ⁹ /L]
EO	[10 ⁹ /L]
BASO	[10 ⁹ /L]
IG	[10 ⁹ /L]
RET	[%%]
IRF	[%]
LFR	[%]
MFR	[%]
HFR	[%]
RET-He	[fmol]
IPF	[%]

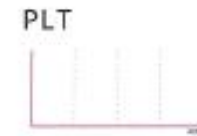
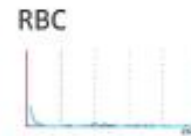
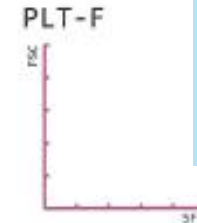
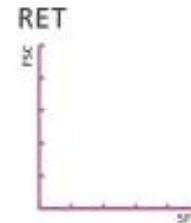
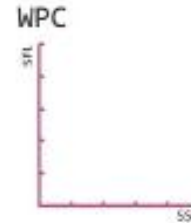
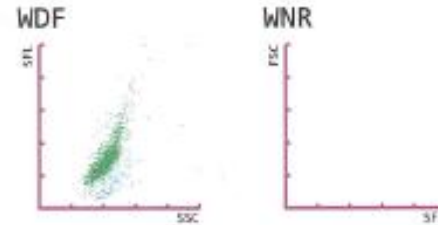
[%]
 [%]
 [%]
 [%]
 [%]
 [%]
 [%]
 [10⁹/L]

WBC-BF	264	[10 ⁶ /L]
RBC-BF	0	[10 ⁹ /L]
MN	250	[10 ⁶ /L]
PMN	14	[10 ⁶ /L]
TC-BF#	265	[10 ⁶ /L]

94.7 [%]
 5.3 [%]

WBC IP Message

RBC IP Message



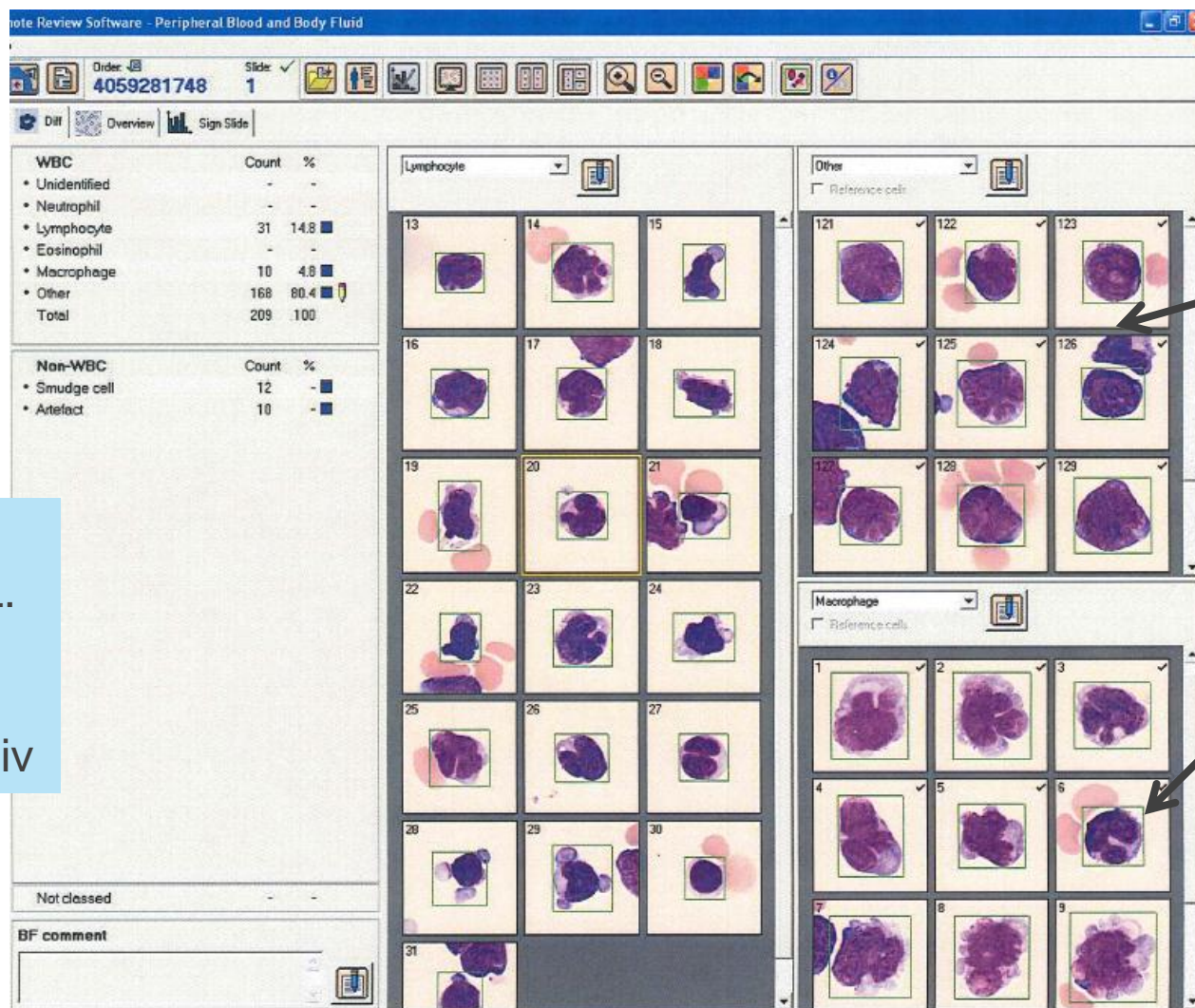
PLT IP Message

Research:
 NE-BF: 5,6 %
 LY-BF : 50,8 %
 MO-BF: 43,6 %

**Ingen
 alarmer**

**MN : 95 %
 PMN: 5 %**

Prøve med blaster (CellaVision DM96)



Ascites-prøve med mesothelceller

Sample No.: 4059839684
 Patient ID:
 Name:
 Sample Comment:

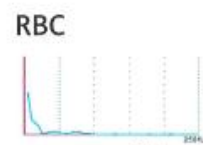
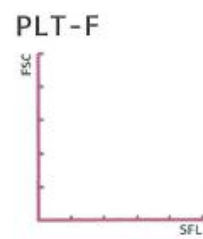
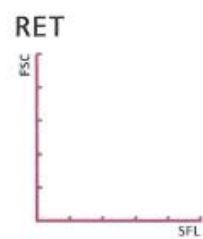
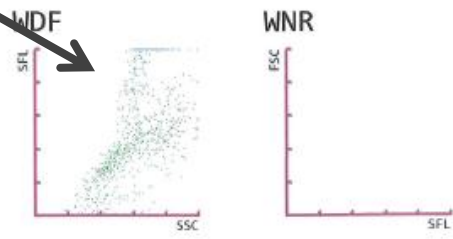
Ward:
 Rack:

Position: 27/01/2012 12:27:38 BF
 Doctor:
 Birth: Sex:
 Nickname: XN-2000-1-R

134

HF -BF

WBC	[10^9/L]
RBC	[10^6/uL]
HGB	[mmol/L]
HCT	[Ratio]
MCV	[fL]
MCH	[fmol]
MCHC	[mmol/L]
PLT	[10^9/L]
RDW-SD	[fL]
RDW-CV	[%]
PDW	[fL]
MPV	[fL]
P-LCR	[%]
PCV	[%]
NRBC	[10^9/L]
NEUT	[10^9/L]
LYMPH	[10^9/L]
MONO	[10^9/L]
EO	[10^9/L]
BASO	[10^9/L]
IG	[10^9/L]
RET	[%%]
IRF	[%]
LFR	[%]
MFR	[%]
HFR	[%]
RET-He	[fmol]
IPF	[%]



WBC-BF	82	[10^6/L]
RBC-BF	0	[10^9/L]
MN	73	[10^6/L]
PMM	9	[10^6/L]
TC BF#	107	[10^6/L]

89.0 [%]
 11.0 [%]

WBC IP Message

RBC IP Message

PLT IP Message

WBC-BF: 82 x10⁶/l

TC-BF#: 107 x 10⁶/l

Forskel: 25 x 10⁶/l

Ascites-prøve med mesothelceller

	XN	Manuel/ DM96		Antalk. XN 10 ⁶ /l	Antalk. Manuel / DM96 x10 ⁶ /l
WBC x 10 ⁶ /l	82 (107)	117			
MN %	89	98			
PMN %	11	2			
Diff:					
HF-BF%	0/100WBC	22 (meso)	HF-BF#	25	26 (meso)
NE-BF %	11	2	NE-BF#	9	2
LY-BF %	12	3	LY-BF #	10	4
MO-BF %	77	73	MO-BF#	63	86
EO-BF %	0	0	EO-BF #	0	0
			Total: 107 x 10⁶/l		

Hvem tæller flest celler ? XN eller CellaVision DM96 ?

- DM96: Tilstræber **200 celler** på Cytospin-præp. Og det lykkes næsten altid.
- XN: Opsug = 10,4 μ l. (Går ud fra at alt bliver brugt ?)
- Ved en WBC-konc. på **10 x 10⁶/l** (= 10 celler/ μ l) svarer 10,4 μ l til 104 celler.
- Ved en konc. på **20 x 10⁶/l** svarer 10,4 μ l til 208 celler.

Navneskift ?

- Vi mener ikke man hverken manuelt (i tællekammer) eller maskinelt kan adskille de kerneholdige celler fra hinanden. (WBC, tumorceller, erythroblaster, svampe, mikroorganismer mv). Dette kan først ske ved differentialtælling i mikroskop.
- Derfor har vi kontaktet LabTerm og fået nyt navn og NPU-kode for CSV og de andre BF. :
- **Csv-Kerneholdige celler; antalk.**
- **Enhed: $\times 10^6/l$**
- **IFCC-IUPAC-kode: NPU028838**
- ..Skal dog først godkendes i harmoniseringsgruppen

Tak for opmærksomheden ;O)

- OBS – Temadag om kropsvæsker i Region H (På Rigshospitalet)
- **Tid og sted:**
- Tirsdag den 9. oktober 2012 klokken 8 – 15
- **Undervisere:**
- Afdelingsbioanalytiker Margit Grome, KB 3011, RH
- Afdelingsbioanalytiker Brian Møllgren, KB 3011, RH
- Overl. Jannik Helweg-larsen, Epidemiafd. M5132, RH
- Afdelingslæge Ole Weis Bjerrum, hæmatologisk afd, RH
- Reservelæge Ronni Plousing, intensiv afd. 4131, RH
- Afdelingslæge Karin Ambruster, Lungemedicinsk afd Y, Gentofte hospital