

Maskinell differensialtelling av hvite blodceller i leddvæske

Av Kristin Lingaas, Heidi Andersen og Inger Berit Hersleth, bioingeniører ved Diakonhjemmet sykehus i Oslo.
E-post: k-lingaa@diakonsyk.no

Artikkelen er fagfellevurdert etter Bioingeniørens retningslinjer.

Innledning

Undersøkelse av leddvæske er helt sentralt for utredning og behandling av ulike typer revmatiske sykdommer. Differensialtelling av hvite blodceller i leddvæske vil kunne gi pasientene raskere diagnose og behandling (1). Det kan bli lettere å skille mellom en inflammatorisk og en ikke-inflammatorisk leddsykdom, samt å vurdere om det foreligger en infeksjons artritt eller en krystallartritt.

Normal leddvæske er fargeløs, klar og har høy viskositet. Antall hvite blodceller er $<0,2 \cdot 10^9 /L$.

Ved ikke-inflammatoriske tilstander er antall hvite blodceller $< 5,0 \cdot 10^9 /L$, med < 50 prosent nøytrofile granulocytter. Inflammatorisk leddvæske er gul, uklar og vanntynn. Antall hvite blodceller er $10,0 - 100,0 \cdot 10^9 /L$, med $50 - 90$ prosent nøytrofile granulocytter. En infeksjons tilstand har vanligvis hvite blodceller $>50,0 \cdot 10^9 /L$ og >95 prosent nøytrofile granulocytter (2). I følge revmatologer vil mononukleære celler være tilstede ved bakteri-

elle artritt og enkelte hissige RA-artritt (3).

Referansem metode for differensialtelling av hvite blodceller i leddvæske er mikroskopi. Dette er en manuell metode som er svært tidkrevende. Metoden krever ekspertise på høyt nivå når det gjelder å identifisere celler, og det er en metode med svært dårlig reproduserbarhet selv blant erfarne bioingeniører (4).

Diakonhjemmet Sykehus har en stor revmatologisk avdeling med regionsansvar for revmatisk sykdom hos voksne.

Avdelingen har pasienter med alle kategorier av revmatisme for utredning og behandling, Vi har mer enn 15 års erfaring med telling av totalt antall hvite blodceller i leddvæske ved hjelp av Coulter STKS, Cell-Dyn 4000 og nå Coulter LH750. Det vil være av diagnostisk betydning å skille mellom poly- og mononukleære celler. I utgangspunktet er hematologimaskinen laget for å kunne telle celler i blod. Tidligere har vi kun gitt ut totalt antall hvite blodceller i leddvæske.

Hensikten med denne studien var å sammenlikne manuell og automatisert metode for differensialtelling av hvite blodceller i leddvæske ved bruk av Coulter LH 750.

Materiale og metoder

Studien er utført i henhold til CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) sine retningslinjer for analysering av leddvæsker (5).

Sammendrag

Referansem metode for differensialtelling av hvite blodceller i leddvæske er en manuell metode; mikroskopi. Dette er en tidkrevende metode.

Vi ville undersøke muligheten for at vår hematologimaskin, Coulter LH 750, kunne differensialtelle hvite blodceller i leddvæske. Automatisk differensialtelling er raskere og analytisk mer presis.

Vi fant ut at det er en høy korrelasjon mellom automatisk og manuell metode. Dette har stor nytteverdi både for pasient og lege. Legen kan lettere skille mellom ulike tilstander og kan raskere stille diagnose.

Nøkkelord: Leddvæske, hvite blodceller, automatisk differensialtelling.

Abstract

Diakonhjemmet Hospital has a large rheumatology department, with regional responsibility for rheumatic disorders in adults. Our former reference method for the differential count of WBC's in synovial fluid was based on microscopy, which was very time-consuming.

The purpose of our project was to examine whether our automatic analyser, Coulter LH 750, could carry out a differential count of WBC's in synovial fluid, not only total WBC.

Determination of the differential WBC count in synovial fluid using Coulter LH 750 is highly correlated to the reference method.

Automatic WBC count is faster and analysis more precise than manual count. Our findings demonstrate that the differential count of WBC in synovial fluid is therefore useful for both patients and physicians.

Key words: Synovial fluid, white blood cells, automatic differential count.

Det ble samlet 50 leddvæsker med gjennomsnittlig totalt antall hvite blodceller $15,6 \cdot 10^9 / L$ med standardavvik 22,1 $\cdot 10^9 / L$ ($0,4-119,1 \cdot 10^9 / L$) fra pasienter på revmatologisk poliklinikk. Leddvæske ble tappet fra hovne ledd i både kne, håndledd og ankel. Leddvæsken ble oppbevart på K2 EDTA-glass (PULS Norge) frem til analysering for å unngå at den koagulerer. Før automatisk differensialtelling ble alle leddvæsker behandlet med permease for å depolymerisere hyalonsyren som gjør leddvæsken seig. 10 μl (20 IE) permease (hyaluronidaseenzym fra CP Pharmaceuticals Ltd Wrexham UK) ble tilsatt en milliliter leddvæske. Leddvæskene ble oppbevart i romtemperatur og tilsatt permease umiddelbart etter prøvetaking (5). Etter 15 minutters inkubering ble prøven analysert på Coulter LH 750 (Nerliens Meszansky AS) på samme måte som blodprøver.

Før manuell differensialtelling ble leddvæskene sentrifugert i minimum fem minutter for å konsentrere cellene. Celleknappen ble slemmet opp i to dråper plasma fra en tilfeldig giver for å gi cellene i leddvæsken et så gunstig miljø som mulig. Det ble laget utstryk i duplikat. Utstrykene ble fiksert og farget ved hjelp av May Grunwald-Giemsas fargemetode. (May Grunwald fargevæske fra Merck KGaA Germany, Giemsa fargevæske fra VWR International Ltd England). I mikroskop ble det utført differensialtelling ved å telle 200 celler i hver leddvæske. Tre bioingeniører som alle er autoriserte på manuell differensialtelling, utførte den visuelle tellingen. Det ble utført en treparts differensialtelling (granulocytter, lymfocytter og monocytter). Det ble brukt to mikroskop: Leica DM 2500 (OneMed) og Zeiss (Zeiss, West Germany). Objektglassene var fra Menzel GmbH + Co KG. Tellingene ble utført blindt, det vil si uten å vite resultatet fra automatisk differensialtelling. Statistikkprogrammet Analyse It ble brukt til å bearbeide resultatene.

For instrumentet brukte vi samme kontrollmateriale som benyttes til differensialtelling av celler i blod. Tre nivå av CBC-kontroller (høy, medium og lav kontroll fra Bergmann Diagnostika) ble brukt som kontroll på totalt antall hvite og differensialtelling. Bakgrunnstilling blir utført hver morgen på maskinen. Akseptert bakgrunnsgrænse på hvite blodceller er oppgitt fra produsent og skal være $< 0,2 \cdot 10^9 / L$.

Latron-kontroll (Beckmann Coulter) ble brukt som en spesiell kontroll på VCS-målingen (volum, konduktivitet og scatter) i flowcellen.

Statistikk

Ved hjelp av statistikkprogrammet Analyse-It brukte vi Pearsons korrelasjonsplot for å finne korrelasjonskoeffisienten r . Deretter ble det gjort Passing & Bablok regresjonsanalyse for å sammenligne automatisk og manuell metode. Passing & Bablok regresjonsanalyse brukes rutinemessig ved vår avdeling ved metodeverifisering.

Resultater

Sammenligning mellom manuell og automatisk metode er vist

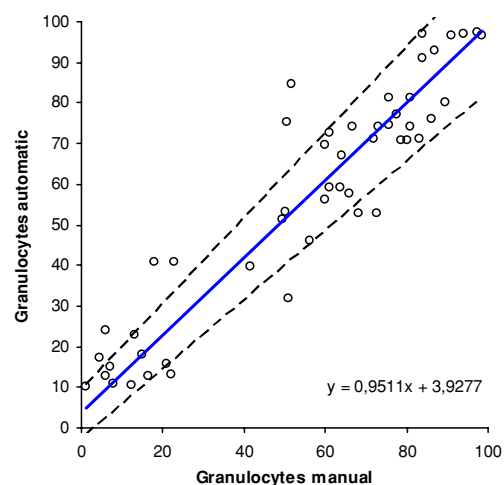


Fig 1. Sammenligning mellom manuell og automatisk differensialtelling av granulocytter i leddvæske. Estimert linje ($y = x$), stiplede linjer angir 95 % konfidensintervall.

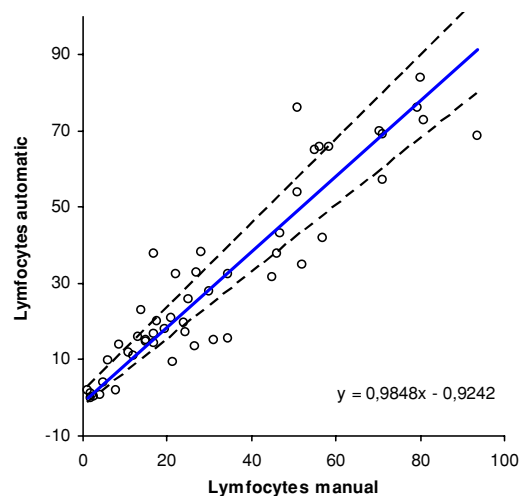


Fig 2. Sammenligning mellom manuell og automatisk differensialtelling av lymfocytter i leddvæske. Estimert linje ($y = x$), stiplede linjer angir 95 % konfidensintervall.

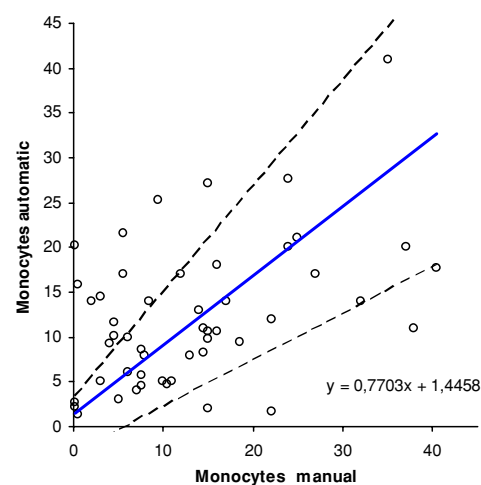


Fig.3 Sammenligning mellom manuell og automatisk differensialtelling av monocytter i leddvæske. Estimert linje ($y = x$), stiplede linjer angir 95 % konfidensintervall.

i figur 1,2 og 3. Regresjonsanalyse mellom de to metodene ble utført både på granulocytter, lymfocytter og monocytter og den lineære regresjonslinjen er vist i alle tre figurene. Pearsons korrelasjonsplot viste en korrelasjonskoeffisient $r = 0,93$, både på granulocytter og lymfocytter. Når det gjelder monocytter fikk vi en korrelasjonskoeffisient $r = 0,44$

Diskusjon

Coulter LH750 får en høyere presisjon ved at den teller opptil 8000 celler. Visuelt telles bare 200 celler. Det er vanskelig å få høy presisjon ved manuell metode. Variasjonskoeffisienten mellom to bioingeniører er tidligere rapportert å være >20 prosent (7). Vi var tre bioingeniører som talte manuelt, og vi utførte kun parallelltelling på de mest vanskelige leddvæskene.

Det er viktig at holdbarheten overholdes slik at permeasen skal kunne virke fullstendig på hyalonsyren og eventuelle sammenklumpinger av hvite blodceller. På grunn av leddvæskenes viskositet er det viktig å sentrifugere i minimum fem minutter (5).

Ut fra resultatene ser vi at det er en høy korrelasjon mellom automatisk og manuell differensialtelling, både når det gjelder lymfocytter og granulocytter. Det er ikke signifikant avvik mellom metodene. Det er foreløpig ikke et ønske fra klinikerne å få oppgitt antall mononukleære celler. Til tross for god korrelasjon mellom automatisk og manuell metode gis derfor ikke ut antall lymfocytter. Når det gjelder monocytterne er det signifikant avvik mellom metodene, og monocytter gis derfor ikke ut ved automatisk differensialtelling. Coulter LH750 teller gjennomsnittlig flere monocytter i hver leddvæske enn vi teller manuelt. Dette kan skyldes at ved manuell differensialtelling er det vanskelig å skille mellom lymfocytter og monocytter. Vi ser også dette ved vurdering av vanlig blodutstryk. I enkelte preparater blir cellene for sterkt farget og de ulike cellene kan derfor være vanskelige å identifisere. Under forbehandlingen kan det også bli tilsatt for lite plasma i forhold til celleantall, dette kan føre til dårlige preparat med ødelagte celler og artefakter.

Leddvæsker med lavt total antall hvite blodceller ($<0,2 \cdot 10^9$ /L) gir relativt dårlig overenstemmelse mellom de to metodene. Lavt antall hvite blodceller i leddvæske byr på utfordringer både for automatisk og manuell telling. Celletallet kan være lavere enn bakgrunngrensene i maskinen. Men det er viktig å nevne at dette er prøver der resultatet har liten klinisk betydning fordi resultatet er normalt. De fleste klinikere er interesserte i nøytrofile granulocytter når telletallet er $> 0,2 \cdot 10^9$ /L (3). Hvis totalt antall hvite blodceller $< 0,2 \cdot 10^9$ /L, registreres svaret som $< 0,2 \cdot 10^9$ /L og antall nøytrofile granulocytter som $< 0,2 \cdot 10^9$ /L. Tidligere studier har vist at det er unødvendig å utføre bakgrunnstest på Coulter LH 750 før hver enkelt leddvæske blir analysert (6). Det ble ikke brukt egne kontrollere for leddvæske siden det er de samme reagensene og de samme kanalene som brukes ved analysing av blodprøver (5).

Feil prøvetaking kan også få konsekvenser for analyseringen.

Hvis prøvetaker ikke treffer inne i selve leddkapselen kan man få tilblending av andre celler fra synovialvevet, for eksempel makrofager og mastceller. Ved blodtilblending kan man få falskt forhøyet antall hvite blodceller. Dette gjelder både manuell og automatisk analysing. Det er svært sjelden at vi får leddvæsker med synlig interferens. Skulle det være tilfelle har vi klare retningslinjer for når prøven kan analyseres og ikke. Synlig blodtilblandede prøver analyseres ikke. Vi er klar over at det kan forekomme interferens som ikke er synlig. Enkelte hematologimaskiner kan på grunn av interferens av synovial- og mesothelceller gi falskt økt leukocytall (1). Vi kan ikke se denne interferensen på scatterplot fra Coulter LH 750. Dette har vi verifisert ved at automatisk og manuell metode viser god korrelasjon.

Konklusjon

Studien viser at det er god korrelasjon mellom manuell og automatisk differensialtelling av leddvæske for granulocytter og lymfocytter. Det er derimot ingen god korrelasjon for monocytter. Vi har med denne studien verifisert at vi kan utføre differensialtelling av hvite blodceller i leddvæske ved hjelp av Coulter LH 750. Vi gir heretter alltid ut antall nøytrofile granulocytter i tillegg til totalt antall hvite blodceller. Differansen vil være mononukleære celler (lymfocytter og monocytter).

Automatisk differensialtelling er raskere og analytisk mer presis enn manuell metode.

Dette gjør at man lettere kan skille mellom ulike tilstander, raskere stille en diagnose og derved gi pasienten bedre behandling.

Litteratur

1. De Jonge R, Brouwer R, Smit M, De Frankrijker-Merkestijn R. J. E, Dolhain M, Hazes J.M.W, Van Toorenenbergen A.W, Lindemans J. Automated counting of white blood cells in synovial fluid. *Rheumatology* 2004; 43:170-3.
2. Glennås A. Leddvæskediagnostikk. *Tidsskr Nor Legeforen* 1990; 110:3246-7.
3. Telefonintervju med revmatologer på Revmatologisk avdeling, Diakonhjemmet sykehus (17.april 2007).
4. Brown W, Keeney M, Chin-Yee I, Johnson K, Lantis K, Finn W, Wolfe N, Kaplan S. Validation of Body Fluid Analysis on the Coulter LH 750. *Laboratory Hematology* 2003; 9:155-159.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guideline. CLSI document H56-A, 2006.
6. Barnes P.W, Eby C.S, Shimer G. An Evaluation of the Utility of Performing Body Fluid Counts on the Coulter LH 750. *Laboratory Hematology* 2004;10: 127-131.
7. Salinas M, Rosas J, Iborra J, Manero H, Pascual E. Comparison of manual and automated cell counts in EDTA preserved synovial fluids. Storage has little influence on the results. *Ann Rheum Dis* 1997;56:622-6.