

Av **LIV JORUNN GARVIK**, bioingeniør ved Blodbanken i Oslo, Oslo universitetssykehus
E-post: LivJorunn.Garvik@ulleval.no

Sammenligning av oppbevaringsløsninger for testceller til indirekte antiglobulinteknikk i glass

Bakgrunn

Ved graviditet og før en mulig transfusjon, skal det tas blodprøver som undersøkes for irregulære blodtypeantistoffer (antistoffscreening). Antistoffscreeningen skal i følge «Veileder for transfusjonstjenesten i Norge» (1) gjøres med indirekte antiglobulinteknikk (IAT) (1). IAT kan brukes på flere måter; i gelkort, kolonner, mikrotiterplater eller glass (2 - 6). Cellene til IAT i glass har tradisjonelt vært fortynnet til 3 % cellesuspensjon med PBS og hatt holdbarhet i ett døgn (3). Blodbanken i Oslo (BiO) bruker IAT i glass til få prøver og må kaste relativt mye av cellesuspensjonene på grunn av den korte holdbarheten. Av denne grunn ønsket vi å gå over til en fortynningsløsning som gir cellene lengre holdbarhet og bestemte oss for å teste ut Ec-Stabilizing solution fra BioRad. Ec-Stabilizing solution gir celler i 3-5 % suspensjon holdbarhet i to uker (7). Vi er ikke kjent med at andre blodbanker i Norge lager celler i 3-5 % suspensjon med Ec-Stabilizing solution til IAT i glass. Produsenten bruker denne eller tilsvarende løsning til cellene de selger til IAT i glass, men vi har ikke klart å finne artikler om utprøving av denne løsningen.

I følge bruksanvisningen (pakningsvedlegget) (7) til Ec-Stabilizing solution skal cellene oppbevares ved +2 til +8 °C, mens de skal ha romtemperatur ved bruk. BiO tar i mot hastep prøver hele døgnet og må alltid ha cellene klare til bruk. Vi ønsket derfor å sammenlikne reaksjonsstyrken til celler oppbevart i romtemperatur og kjøleskap.

Hensikten med denne studien var å undersøke om celler fortynnet med Ec-Stabilizing solution ga forventede positive og negative reaksjoner ut fra fenotypen til cellene, uavhengig av spesifisiteten og styrken til antistoffet. Et viktig poeng i denne undersøkelsen var å finne ut om det var forskjell i resultatene for de svakest antistoffene. Vi ønsket også å teste ut om testcellene løst i Ec-Stabilizing solution var holdbare i to uker.

Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

Artikkelen har utgangspunkt i eksamensoppgaven til forfatteren fra videreutdanning i Statistikk, kvalitetskontroll og kvalitetssikring ved Høgskolen i Oslo.

Materiale og metoder

Studiedesign

Vi laget en firedelt hypotese om at det er ingen forskjell om:

- 1) cellene er fortynnet med PBS eller Ec-Stabilizing solution og oppbevart i romtemperatur
- 2) cellene er fortynnet med PBS eller Ec-Stabilizing solution og oppbevart i kjøleskap
- 3) cellene fortynnet med Ec-Stabilizing solution er oppbevart i romtemperatur eller kjøleskap
- 4) cellene fortynnet med Ec-Stabilizing solution er oppbevart én dag eller to uker.

Prøvemateriale

Vi benyttet plasma/serum prøver fra eksterne kvalitetskontroller (fra Norge, Sverige, England og Belgia) og noen pasientprøver. Identiteten til pasientene ble fjernet før prøvene ble analysert. Siden prøvene ble anonymisert og brukt til metodesammenlikning, var det ikke nødvendig å søke Regional etisk komite (REK) om tillatelse.

Sammendrag

Bakgrunn: Testceller som benyttes til indirekte antiglobulinteknikk i glass fortynnes med fosfatbufret saltvann (PBS). Holdbarheten for testceller i PBS er et døgn. Blodbanken i Oslo ønsket å finne en oppbevaringsløsning som gir testcellene lengre holdbarhet. Hensikten med denne studien var å undersøke om testceller i Ec-Stabilizing solution hadde samme kvalitet som testceller i PBS, og om testcellene da var holdbare i to uker.

Materiale og metode: 37 prøver med 11 antistoff mot antigen innen de fem vanligste blodtypesystemene ble analysert. Cellene i Ec-Stabilizing solution ble oppbevart i romtemperatur og kjøleskap mellom analyseringene. Prøvene ble analysert ved dag 1 (n=35), dag 7 (n=20) og dag 14 (n=36). Alle prøvene ble analysert parallelt med celler i PBS (n=91). Gradering av agglutinasjonene ble omgjort til score (0 -12 poeng).

Resultat: Agglutinasjonsreaksjonene med celler i PBS ga lavere score enn med celler i Ec-Stabilizing solution, uavhengig av om vi ser på alle prøvene eller de enkelte analysedagene og om cellene i Ec-Stabilizing solution var oppbevart i romtemperatur eller kjøleskap. Det var ingen falsk positive resultater.

Konklusjon: Basert på våre resultater fant vi at Ec-Stabilizing solution kan brukes til IAT i glass. Cellene har holdbarhet i to uker, både når de oppbevares i romtemperatur og i kjøleskap.

Nøkkelord: Indirekte antiglobulinteknikk (IAT) i glass. Ec-Stabilizing solution.

Totalt ble 37 prøver analysert. Prøvene inneholdt minst ett anti-stoff innenfor alle de fem vanligste og klinisk viktige blodtyperesystemene (Rh, MNSs, Duffy, Kidd og Kell) (1).

For å få prøver med svake anti-stoffer, ble 26 av prøvene fortynnet. Fortynningene ble gjort med en fortynningsvæske bestående av like deler PBS og blodtypenøytralt serum (AB-serum). Prøvene ble frosset (-20 °C) før første og mellom hver analysering.

Celler

Prøvene ble analysert mot BiOs tre screeningceller og tre utvalgte celler fra BiOs eget cellepanel, slik at alle aktuelle antigen var representert med minst en negativ, en homozygot og en heterozygot celle. Alle cellene var frosset og tint etter metoden i Högmans artikkel (8). Dagen før hver første analysedag ble celler til fortynning med Ec-Stabilizing solution tint og det ble laget to sett; ett sett ble oppbevart i kjøleskap, og det andre settet ble oppbevart i romtemperatur. Cellene fortynnet med PBS var de samme som ble brukt i rutinen.

Analysering

Prøvene ble analysert med nylagede celler fortynnet i Ec-Stabilizing solution; første analysedag (= Dag 1), etter at de var oppbevart én uke (= Dag 7) og etter at de

TABELL 1. Score tabell

Reaksjonsstyrke	Score
4+	12
3,5+	11
3+	10
2,5+	9
2+	8
1,5+	6
1+	5
0,5+	3
Spor	2
0	0

var oppbevart to uker (= Dag 14). Grunnen til at vi analyserte dem også etter én uke, var at vi ønsket et alternativ dersom cellene ikke gav tilfredsstillende resultat etter to uker. Ved alle tre analysedagene ble prøvene også satt opp mot celler fortynnet i PBS.

IAT i glass er en manuell analyse der bioingeniøren som utfører analysen graderer agglutinasjonsreaksjonen makroskopisk fra negativ til 4+. Graderingene for hver prøve ble gjort om til score etter en anerkjent omgjøringstabell (Tabell 1) (6). Deretter summerte vi scoren for de 6

cellene hver prøve ble satt opp mot. Vi fikk da tre scoresummer for hver prøve, en for hver «variant» av celleduspensjoner (celler fortynnet i PBS, celler fortynnet med Ec-Stabilizing solution og som er oppbevart i romtemperatur og celler fortynnet med Ec-Stabilizing solution og som er oppbevart i kjøleskap), hver analysedag. Forskjell i score for hver prøve mellom de tre cellevariantene, ble analysert statistisk (se Tabell 2, 3 og 4). Vi valgte å analysere differansene i score for alle prøvene, for prøvene analysert Dag 1 og Dag 14 (Dag 1 og Dag 14 er mest interessant med tanke på om vi kan ta løsningen i bruk, se over). Alle prøvene ble analysert statistisk fordi vi da fikk mange prøver, og vi antok at «slengere» dermed ville ha mindre betydning.

Statistikk

Statistisk analysering ble gjort med statistikkprogrammet Analyse-IT[®] (statistisk analyseprogram for Microsoft Excel, Analyse-it Software, Ltd.). For å sammenlikne resultater mellom de ulike fortynningsløsningene og oppbevaringstemperaturene (avhengig data) ble Wilcoxon's test for ikke-parametriske data og Passing & Bablok test benyttet.

Wilcoxon's test for paradata ble brukt for å få oversikt over antall positive, negative og like differanser. Wilcoxon's test (9,10) er en ikke-parametrisk test som kan brukes for å analysere differanse mellom to datasett. Testen kan brukes når differansene ikke er normalfordelte, men skal brukes med forsiktighet når mange av prøvene som sammenlignes har like differanser. Det er en regresjonsmodell der $y = a + bx$ og $b = 1$. Er metodene like, vil det ikke bli forskjell i scoren og differansene blir null.

Passing & Bablok test er også en ikke-parametrisk regresjonsanalyse ($y = a + bx$), men her testes det på feil/avvik både i konstantleddet (a) og i stigningskoeffisienten (b). Passing & Bablok test (10, 11) tillater målefeil i en eller begge metodene. Målefeilene må ikke være normalfordelte. Når metodene gir samme resultat blir $a = 0$ og $b = 1$. Denne testen gir ikke ett tall som sier om metode-

Abstract

Background: The test cells used for indirect antiglobulin technique are diluted with Phosphate Buffered Saline (PBS) in a test tube. Test cells in PBS keep for 24 hours. The Bloodbank in Oslo wanted to find a solution for preserving red cells that prolonged the cells' shelf life. The purpose of this study was to investigate whether the test cells in an Ec-Stabilizing solution had the same quality as the test cells in PBS, and whether the test cells would be stable for two weeks.

Material and methods: 37 samples with 11 antibodies to antigen in the five most common bloodgroup systems were investigated. The cells in the Ec-Stabilizing solution were kept at +22°C or at +4°C between the analyses. The samples were analysed on day 1 (n = 35), day 7 (n = 20) and day 14 (n = 36). All samples were analysed simultaneously with the cells in PBS (n = 91). The strength of agglutination was converted into scores (0 -12 points).

Results: Agglutination with the cells in PBS showed lower scores than with the cells in Ec-Stabilizing solution, regardless of whether we looked at all the tests or at each analysis day, and regardless of whether the cells in Ec-Stabilizing solution were kept at +22°C or +4°C. There were no false positive results.

Conclusion: Based on our results we found that Ec-Stabilizing solution can be used for IAT in test tubes. The cells have a shelf life of two weeks, both when stored at +22°C and at +4°C.

Keywords: Indirect antiglobulin technique (IAT) in the test tube. Ec-Stabilizing solution

ne er signifikant forskjellige eller ikke, men man bruker konfidensintervallet (KI) til henholdsvis konstanten og stigningskoeffisienten for å undersøke om det er sannsynlig at metodene er like eller ikke på det nivået man tester på. Passing & Bablok test (10, 11) ble brukt for å sammenligne de ulike celleduspensjonene i denne studien og ble brukt på 5 % nivå. Det betyr at når 95 % av konfidensintervallet (KI) for konstanten (a) omfatter tallet 0, er det 95 % sannsynlig at det ikke er en signifikant forskjell mellom metodene, uavhengig av konsentrasjonen. Tilsvarende gjelder for stigningskoeffisienten (b); hvis 95 % KI for stigningskoeffisienten omfatter tallet 1, er det ikke signifikant forskjell på metodene.

Resultat

Prøvene

Det ble analysert 37 prøver og 11 antistoffer med ulike titer, fordelt på blodtypesystemene Rh, MNSs, Duffy, Kidd og Kell. 26 prøver var fortynnet for å gi svake reaksjoner. Av tekniske årsaker ble ikke alle prøver analysert alle dager; Dag 1 (n=35), Dag 7 (n=20) og Dag 14 (n=36). Alle prøvene ble analysert parallelt med celler i PBS (n=91). Prøvene ble analysert blindet slik at de som utførte analysene ikke viste hvilke antistoffer som var forventet. I to av prøvene fra Dag 1 var det tekniske problemer med cellene fortynnet i PBS. Disse prøvene ble utelatt i sammenligningen med celler i PBS, men kunne tas med i sammenligningen av celler fortynnet med Ec-Stabilizing solution med ulik oppbevaringstemperatur.

Det var ingen falskt positive reaksjoner, men fire falskt negative reaksjoner. Alle resultatene er tatt med i de statistiske beregningene. Alle graderingene ble gjort om til score (etter tabell 1) (6) for den enkelte prøve, for å kunne regne på resultatene statistisk. Til sammen ble 93 scoresummer for de ulike fortynningsløsningene/oppbevaringstemperaturene analysert statistisk.

Statistisk analyse

Gjennomsnittsscore for alle prøvene var 22,3 (0-53) for celler fortynnet i PBS, og 24,8 (0-58) og 25,6 (0-60) for celler fortynnet i Ec-Stabilizing solution oppbevart i henholdsvis romtemperatur og kjøleskap. Medianene var 21,1, 23,0 og 24. Wilcoxon test for paradata (forskjell i score) ble brukt til å sammenligne scoren for celler i PBS mot i Ec-Stabilizing solution. Mange av differansene ble negative. Det var færre negative differanser når celler i Ec-Stabilizing solution oppbevart i romtemperatur eller kjøleskap ble sammenlignet. Resultatene var tilsvarende når vi analyserte resultatene fra Dag 1 eller Dag 14 separat (Tabell 2, 3 og 4).

Passing & Bablok test. Sammenligning av scoren for celler i PBS med celler i Ec-Stabilizing solution, viste at 95 % av konfidensintervallet (KI) til konstanten ikke inneholdt 0 (null) (Figur 1 og 2). Når vi sammenlignet scoren for celler fortynnet med Ec-Stabilizing solution oppbevart i romtemperatur og kjøleskap, omfattet 95 % av KI for konstanten 0 (null) (Figur 3). Avvikene var

TABELL 2. Wilcoxon test for paradata. Celler fortynnet i PBS mot celler fortynnet i Ec-Stabilizing solution, oppbevart ved romtemperatur

	Totalt	Dag 1	Dag 14
Antall prøver	91	35	36
Positive differanser	17	2	11
Negative differanser	59	29	18
Likt (0)	15	4	7
Median differanse	-2,5	-4,5	-1,0
95 % KI	-3,5 til -1,5	-6,0 til -3,0	-3,5 til 0,5
p-verdi	<0,0001	<0,0001	0,2048

TABELL 3. Wilcoxon test for paradata. Celler fortynnet i PBS mot celler fortynnet i Ec-Stabilizing solution, oppbevart i kjøleskap

	Totalt	Dag 1	Dag 14
Antall prøver	91	35	36
Positive differanser	13	1	8
Negative differanser	56	28	18
Likt (0)	22	6	10
Median differanse	-3,0	-4,5	-2,0
95 % KI	-4,0 til -2,0	-6,5 til -3,0	-4,5 til 0,0
p-verdi	<0,0001	<0,0001	0,0168

TABELL 4. Wilcoxon test for paradata. Celler fortynnet i Ec-Stabilizing solution, oppbevart hhv ved romtemperatur og i kjøleskap

	Totalt	Dag 1	Dag 14
Antall prøver	93	37	36
Positive differanser	22	12	6
Negative differanser	39	15	15
Likt (0)	32	10	15
Median differanse	-0,5	-0,5	-0,5
95 % KI	-1,5 til 0	-1,5 til 0,5	-2,0 til 0,0
p-verdi	0,0328	0,2817	0,1386

ikke påvirket av scoren da 95 % av KI til stigningskoeffisienten omfattet 1 (en) i alle sammenligningene.

Diskusjon

Prøvematerialet og celler

Ved metodesammenligning anbefales det å analysere 20 – 40 prøver på alle aktuelle nivåer/konsentrasjoner (11). Vi analyserte prøver med ulike titer i, men valgte flest prøver med svake antistoffer, siden disse er teknisk vanskeligst å påvise og var av den grunn viktigst å få undersøkt. Antall prøver med lavt antistofftiter ble derfor størst.

Prøver med 11 ulike antistoffspesifisiteter (anti-D, anti-E, anti-c, anti-C(w), anti-D og anti-C, anti-K, anti-S, anti-N, anti-Fy(a), anti-Jk(a) og anti-Jk(b)). Antall prøver for

hvert antistoff som ble testet, ble styrt av tilgang på prøvemateriale (en – seks prøver per antistoff). Vi klarte ikke å skaffe fem prøver med antistoff innen Kidd-systemet, men valgte likevel å analysere materialet.

Resultatene for celler i Ec-Stabilizing solution ble sammenlignet med samme dags oppsett av celler i PBS, for å sikre at analyseteknisk variasjon, samt frysing og tining av prøvene, skulle ha minst mulig påvirkning på sammenligningene.

For å sørge for at alle de fem vanligste og klinisk viktige antigenene var representert som homozygote, heterozygote og negative (1) var det tilstrekkelig å teste med seks celler og ikke hele cellepanelet. Det var nødvendig å analysere mot så få celler som mulig fordi IAT-glass bruker fire dråper plasma til hver celle og tilgangen på prøvemateriale er begrenset.

Celler som skulle gi negative reaksjoner ble tatt med for å påvise eventuelle falsk positive reaksjoner. Da blodtypeantistoff kan vise doseeffekt (2, 5), måtte vi ha med både hetero- eller homozygote celler for de ulike antigenene.

Utførelse og avlesning

IAT i glass er en manuell metode der agglutinasjon avleses makroskopisk og graderes. Graderingen kan variere noe fra person til person, særlig for de svakeste reaksjonene.

Betydningen av variasjon i graderingen ble redusert ved å sette opp prøvene mot celler i PBS hver analysedag. Denne mulige variasjonen påvirket derfor i liten grad resultatet av sammenligningene.

Celler fortynnet med PBS sammenliknet med fortynning med Ec-Stabilizing solution

Gjennomsnittsscoren ble lavere ved analysing med celler fortynnet med PBS enn når cellene var fortynnet med Ec-Stabilizing solution, uavhengig av om vi ser på alle prøvene eller de enkelte analysedagene.

Det kan se ut til å være en systematisk forskjell på scoren når cellene er fortynnet med PBS sammenliknet med når de er fortynnet med Ec-Stabilizing solution, enten de er oppbevart i romtemperatur eller i kjøleskap. Forskjellen er tilsvarende om cellene er nylaget eller er oppbevart i to uker.

Passing & Bablok test viste at 95 % av KI til konstanten ikke omfattet 0 ved sammenligning av alle prøvene og prøvene analysert Dag 1. For prøvene analysert

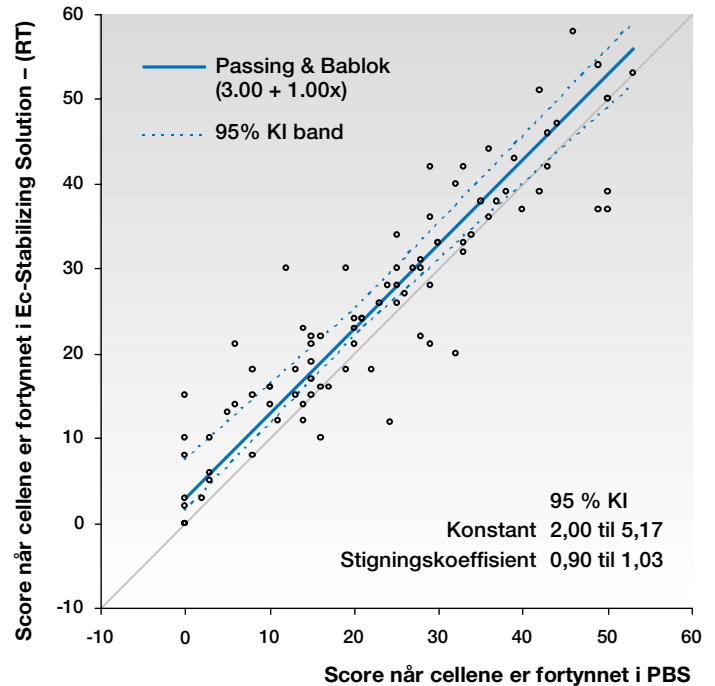


FIGURE 1. Diagram Passing & Bablok; Celler i PBS mot celler i Ec-Stabilizing solution oppbevart ved romtemperatur (RT). KI (Konfidensintervall).

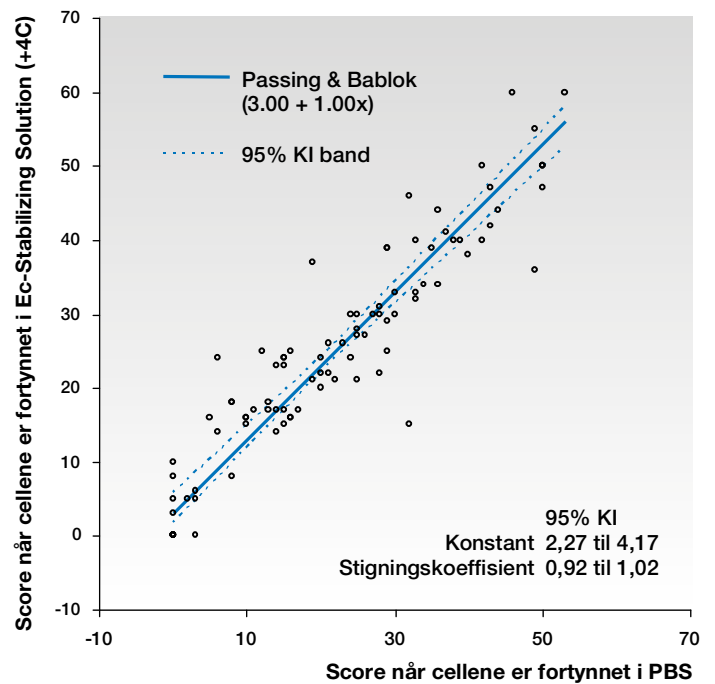


FIGURE 2. Diagram Passing & Bablok; Celler i PBS mot celler i Ec-Stabilizing solution oppbevart i kjøleskap (+4°C). KI (Konfidensintervall).

Dag 14 omfattet 95 % av KI konstanten 0. Det er statistisk signifikant forskjell på metodene ved sammenligning av alle resultatene og resultatene for Dag 1, men ikke for resultatene for Dag 14 (Figur 4). Mulig årsak til denne forskjellen kan være at det er relativt få prøver, noe som gjør at resultatene kan bli påvirket av såkalt

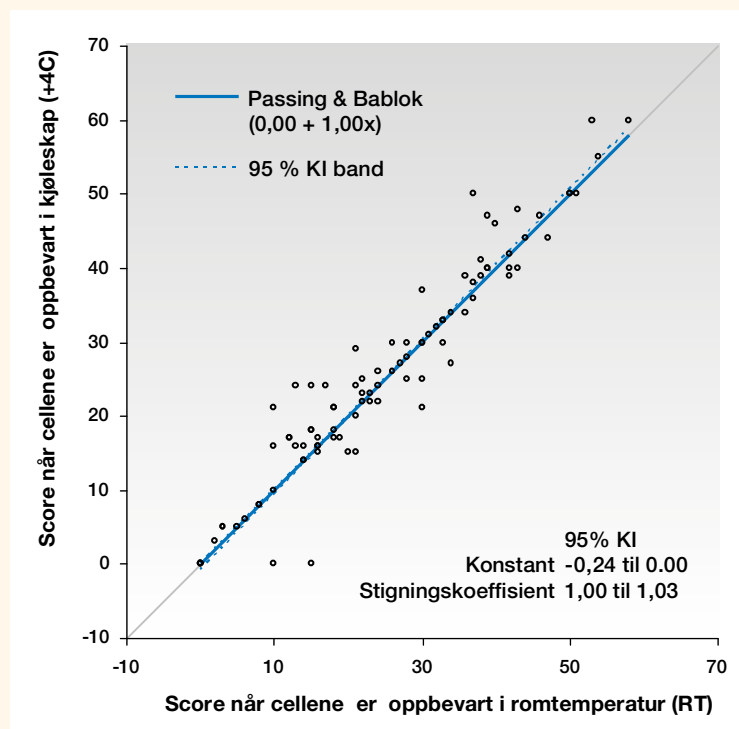


FIGURE 3. Diagram Passing & Bablok; Celler i Ec-Stabilizing solution oppbevart i romtemperatur (RT) og kjøleskap (+4C). KI (Konfidensintervall).

«slengere», men selvsagt kan vi ikke utelukke at alderen til cellene også kan ha betydning. Ingen signifikant forskjell viser at cellene fortynnet med Ec-Stabilizing solution er holdbare og gir forventede reaksjoner i to uker. Når vi ikke har falskt positive resultater, betyr høyere score at agglutinasjonene er sterkere med celler i Ec-Stabilizing solution. Selv om man skal være forsiktig med å bruke Wilcoxon's test når dataene inneholder mange par som gir 0 i differanse, sees tilsvarende i den testen. Det er statistisk signifikant forskjell ($p < 0,0001$) når alle prøvene sammenlignes og for Dag 1, mens det Dag 14 er statistisk signifikant forskjell ($p = 0,0168$) når cellene i Ec-Stabilizing solution er oppbevart i kjøleskap, og ingen signifikant forskjell når de er oppbevart i romtemperatur ($p = 0,2048$) (Tabell 2 og 3).

Kan celler fortynnet med Ec-Stabilizing solution oppbevares i romtemperatur?

Passing & Bablok test viste ingen statistisk signifikant forskjell uavhengig av om vi så på alle prøvene, prø-

Takk

Takk til seksjonsleder Unni Bergerud og seksjonsoverlege Cigdem Akalin Akkøk for faglig støtte i forbindelse med planlegging, gjennomføring og oppfølging av studien og ved skriving av denne artikkelen. I tillegg rettes en stor takk til bioingeniørene ved seksjonen som bidro med mye av den praktiske gjennomføringen av studien.

vene som ble analysert Dag 1 eller Dag 14, (Figur 3). I alle tilfellene omfattet 95 % av KI til konstanten 0.

Wilcoxon's test for paradata viste at det var statistisk signifikant forskjell ved sammenligning av alle prøver ($p = 0,0328$), mens det ikke var statistisk signifikant forskjell ved sammenligning av resultatene fra Dag 1 eller Dag 14 (Tabell 4). Den mest sannsynlige årsaken til denne forskjellen kan være det relativt høye antallet like differanser, da dette er en av svakhetene med Wilcoxon's test for paradata.

Konklusjon

Analysering med celler i Ec-Stabilizing solution gir høyere score enn med celler fortynnet i PBS også når mange av antistoffene var fortynnet til å gi svake reaksjoner. I denne sammenheng betyr en høyere score sterkere agglutinasjon, noe som gjør at analysen blir lettere å lese av og muligheten til å oppdage svake blodtypeantistoff kan bli større. Det er ingen signifikant forskjell på scoren om cellene i Ec-Stabilizing solution oppbevares i to

uker, i romtemperatur eller kjøleskap. Selv om vi bare hadde fire antistoffer innen Kidd-systemet var resultatene overbevisende med tanke på at det er så stor sannsynlighet for å få sterkere agglutinasjon. Det sees ingen falsk positive reaksjoner. Ut fra disse funnene gikk BiO over til å bruke celler fortynnet med Ec-Stabilizing solution til IAT i glass. ■

Referanser

- Veilederen for transfusjonstjenesten i Norge, 6. utgave 2009, Helsedirektoratet, IS-1414.
- Fagerhol M.K, Solheim B.G. Immunologi og transfusjon. Helsedirektoratet Oslo 1995: Universitetsforlaget (kapittel 6).
- Roback J.D, Combs M.R, Grossman B.J, Hillier C.D. Technical Manual Sixteenth Edition, AABB, Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide, (Sixteenth Edition), Maryland, USA 2008: AABB. (Kapitel 15, 16 og Methods).
- Daniels G, Bromilow I. Essential Guide to Blood Group, Oxford, UK 2008: Blackwell.
- Klein H.G, Anstee D.J. Edition, Blood Transfusion in Clinical Medicine (Mollison's 11th) Oxford, UK 2005: Blackwell. (Kapitel 8).
- Issitt P.D, Anstee D.J. Applied Blood Group Serology, (Forth Edition), Durham, USA 1999: Montgomery Scientific Publications. (Kapitel 3 og 6)
- Pakningsvedlegg for Ec-Stabilizing solution, DiaMed AG, Cressier s/Morat, Sveits.
- Högman C.F et al. A simple method for high-quality frozen red cells in blood group serology. Transfusion 1986; 22:434-436.
- Aalen O.O et al. Statistiske metoder i medisin og helsefag, Oslo 2008: Gyldendal Akademisk.
- Mehus L.L. Kongress: Metodeverifisering – Verifisering av riktighet. Bioingeniøren 6/7 2010.
- Bolann B.J. Riktig svar på biokjemiske analyser. En innføring i analytisk kvalitetsovervåking, Bergen 2009: Fagbokforlaget.