

Beregning og måling af, hvordan erythrocyt-størrelse påvirkes af P-Natrium

Ny forskning viser, at MCH er mere velegnet end MCV til klassificering af anæmi.

Når Sysmex XE 2100 måler erythrocytternes Middel Celle Volumen (MCV), fortyndes blodet med CellPack fortyndingsvæske (CPK). Hvis det osmotiske tryk i patientens plasma, og dermed i erythrocytterne, afviger fra det osmotiske tryk i CPK, vil forskellen udlignes ved, at vand passerer gennem erythrocyttens membran inden for millisekunder efter fortyndingen. Erythrocytternes volumen vil derfor ændres, og den målte MCV er derfor forskellig fra patientens reelle MCV. Da Middel Celle Hæmoglobin (MCH) ikke påvirkes af det osmotiske tryk og desuden er stabil over tid, er MCH en mere pålidelig parameter til udredning af anæmi end MCV.

Hæmatologiapparat

Automatiseret hæmatologisk udstyr måler rutinemæssigt hæmatologiske parametre, såsom antallet af erythrocytter (Ery), hæmoglobin (Hb) og erythrocytternes størrelse. Ud fra disse målte hæmatologiske parametre beregnes derefter B-Erythrocyt Volumen Fraktion (EVF = hæmatokrit), gennemsnitlig erythrocyt celle volumen (MCV), gennemsnitlig hæmoglobinindhold (MCH) og gennemsnitlig hæmoglobinkoncentration (MCHC). Hvis der er fejl i målingerne, vil de beregnede parametre også blive forkerte.

Anæmi

Ved diagnosticeringen af anæmi benyttes MCV ofte til at opdele anæmi i mikro-, normo- og makrocytær anæmi. Derefter kan rekvireres yderligere blodprøver, såsom P-Ferritin og P-Cobalamin, så patientens anæmi forhåbentlig kan klassificeres, og den rette behandling påbegyndes. MCV er dermed en vigtig indgang til udredning af anæmi.

Sysmex XE 2100

Den fuldautomatiske hæmatologiske Sysmex XE 2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Kansai, Japan) fortynder blodet 500 gange: 4 µl blod + 1996 µl CellPack (CPK) fortyndingsvæske. CPK har samme osmotiske tryk som normalt plasma

(referenceinterval P-Natrium = 137-142 mmol/L). Størrelsen af erythrocytterne måles, samtidig med at antallet af erythrocytter tælles (ledningsevne-princippet). Det tager ca. 10 sekunder fra fortyndingen af blodet, indtil målingen af de 11,7 µL fortyndet blod starter, og målingen tager ca. 13 sekunder. I alt tælles og måles ca. 100.000 erythrocytter.

Fortynding af erythrocytter

Plasma indeholder osmotisk aktive partikler som fx K^+ , Na^+ , carbamid, glukose mv. Væsken inden i erythrocytterne indeholder tilsvarende mængde osmotisk aktive partikler, som der er i plasma. Dermed er der osmotisk ligevægt over erythrocyttens cellemembran. For at opretholde den osmotiske ligevægt over cellemembranen benyttes en såkaldt isotonisk væske, når erythrocytter/plasma skal fortyndes. Isotonisk betyder, at væsken har samme osmolalitet som plasma. Da Na^+ er dominerende positive ion i plasma, kan P-Natrium bruges som et estimat for osmolaliteten i plasma. Når erythrocytterne fortyndes med den isotoniske CPK, vil der være osmotisk ligevægt over cellemembranen, og erythrocytterne bibeholder deres form og volumen.

Mulig fejlmåling af MCV

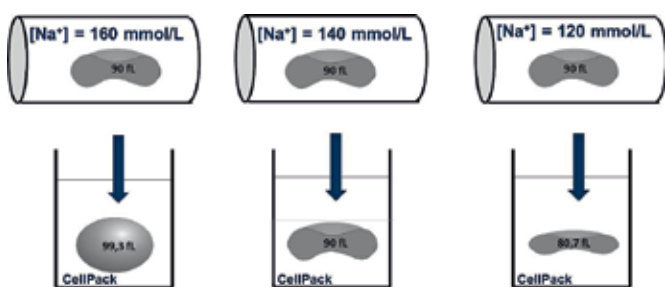
Væsken i erythrocytterne har samme osmolalitet som det omgivende plasma. Patienter med afvigende osmolalitet, dvs. unormal natriumkoncentration, har derfor også erythrocytter, hvis osmolalitet afviger fra CPK. Når disse erythrocytter fortyndes med CPK, vil der ikke være osmotisk ligevægt mellem yder- og indersiden af erythrocytten. For at genoprette denne ligevægt vil vand passere cellemembranen, indtil en ny ligevægt opstår, da hverken hæmoglobin eller osmotisk aktive partikler kan passere cellemembranen. Denne nye ligevægt over erythrocytmembranen vil indtræde få millisekunder efter fortyndingen med CPK. Jo mere patientens P-Natrium afviger fra CPK's natriumkoncentration, jo mere vand vil passere cellemembranen og dermed ændre volumen og form af erythrocytten.



Af bioanalytikerunderviser//
Jens Peter Philipsen
 Nordsjællands Hospital,
 Klinisk Biokemisk Afdeling, Hillerød



Af adjunkt //
Kirsten Vikkelsø Madsen
 Professionshøjskolen Metropol,
 Det Sundhedsfaglige og Teknologiske
 Fakultet, Institut for Teknologi,
 Bioanalytikeruddannelsen,
 København



Figur 1.

Ved fortynding af erythrocytter påvirkes både formen og størrelsen af erythrocytter, hvis fortyndingsvæskens osmolalitet er forskellig fra erythrocyttens intracellulære osmolalitet. CellPack (CPK) har en natriumkoncentration svarende til normalt plasmas indhold af natrium. Når erythrocytter fra en patient med P-Natrium = 160 mmol/L fortyndes med CPK, vil erythrocytten svulme op. Når erythrocytter fra en patient med P-Natrium = 140 mmol/L, vil erythrocytternes form og størrelse være uændret. Hvorimod når erythrocytter fra en patient med en P-Natrium = 120 mmol/L fortyndes med CPK, vil erythrocytterne skrumpes.

Teoretisk beregning af fejl på MCV-måling

En gennemsnitlig erythrocyts volumen er 90 fL og består af ca. 72 % vand, svarende til 64,8 fL H₂O (1), resten af erythrocytten består hovedsagelig af hæmoglobin, hvis volumen ikke ændres. Men vandfasens volumen kan ændres, da vand kan passere cellemembranen og dermed kan ændre erythrocyttens størrelse og form.

Hvis erythrocytter fra en patient med en P-Natrium = 120 mmol/L, fortyndes med CKP, som estimeres til at have [Na⁺] ≈ 140 mmol/L, vil volumen af vandfasen ændres fra 64,8 fL til:

$$64,8 \text{ fL} \cdot (120 \text{ mmol/L}) / (140 \text{ mmol/L}) = 55,5 \text{ fL}, \text{ altså en ændring på } -9,3 \text{ fL}, \text{ hvilket også vil være fejlen på MCV-målingen.}$$

Tilsvarende, hvis erythrocytter fra en patient med en P-Natrium = 160 mmol/L fortyndes med CKP, vil volumen af vandfasen ændres fra 64,8 fL til:

$$64,8 \text{ fL} \cdot (160 \text{ mmol/L}) / (140 \text{ mmol/L}) = 74,1 \text{ fL}, \text{ dvs. en fejlmåling på } +9,3 \text{ fL.}$$

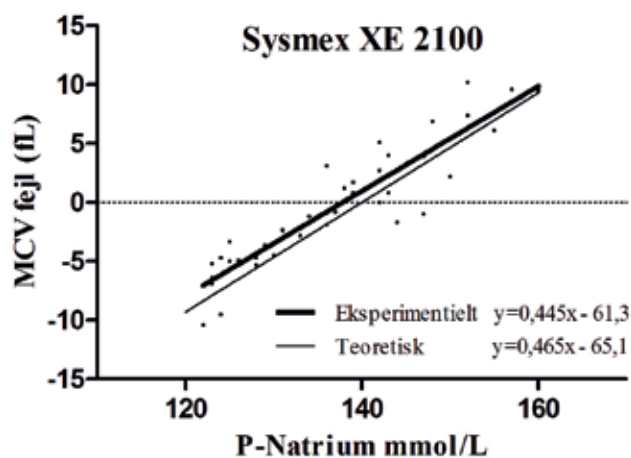
Ud fra ovenstående beregninger er hældningen bestemt til 0,465 fL/mmol og afskæring til -65,1 fL ($Y = 0,465X - 65,1$), se figur 2. Teoretisk vil MCV måles korrekt, når P-Natrium = 140 mmol/L. Hvis P-Natrium ændres 1 mmol/L, vil MCV teoretisk ændres 0,47 fL.

Eksperimentel måling af fejl på MCV

For at undersøge, om Sysmex XE 2100 måler MCV korrekt, blev der udvalgt blodprøver fra 41 forskellige patienter, hvor der både blev analyseret P-Natrium (målt på Cobas Integra 800, Roche Diagnostics, Schweitz) og alle de hæmatologiske parametre. Erythrocytternes korrekte størrelse (= $MCV_{\text{reference}}$) *in vivo* blev bestemt via måling af centrifugeret EVF (Centrifuged Packed Cell Method)(2) efterfulgt af følgende beregning: $MCV_{\text{reference}} = EVF / (B\text{-Erythrocytter})$.

Fejlen på MCV målt på Sysmex blev beregnet med følgende formel: $MCV_{\text{sysmex}} - MCV_{\text{reference}}$.

Resultaterne viser, at der er en korrelation mellem P-Natrium



Figur 2.

Korrelation mellem P-Natrium og MCV fejlmålingen.

Teoretisk: Den tynde linje repræsenterer den teoretiske MCV-fejl, når erythrocytter fortyndes med CellPack (CPK). Hvis patientens P-Natrium afviger 20 mmol/L fra CPK, måler Sysmex XE 2100 teoretisk MCV 9,3 fL forkert.

Eksperimentelt: Prikkerne viser de eksperimentelt fundne MCV-fejl målt i patienter med P-Natrium mellem 122-160 mmol/L. Den kraftige linje repræsenterer lineær regression på de fundne resultater (n = 41). Hvis patientens P-Natrium afviger 20 mmol/L fra CPK, måles Sysmex XE 2100 MCV 8,9 fL forkert.

og MCV-fejlen, se figur 2. Den eksperimentelt fundne lineære regression (hældning = 0,445 fL/mmol, skæring = -61,3 fL), ($R^2 = 0,852$) er meget lig den teoretisk fundne, se figur 2. Når P-Natrium = 140 mmol/L, måles MCV korrekt. Hvorimod ændres P-Natrium 1 mmol/L, vil MCV ændres 0,45 fL.

MCH som alternativ til MCV

Formålet med at analysere blod er at måle hver enkelt parameter så korrekt som muligt, således at lægerne kan diagnosticere patienterne hurtigt og korrekt. MCH er en anden hæmatologisk parameter, som giver tilsvarende informationer som MCV. MCH beregnes ud fra følgende formel:

$$MCH = (B\text{-Hæmoglobin}) / (B\text{-Erythrocytter})$$

Da hæmoglobinmålingen og antallet af erythrocytter ikke påvirkes af det osmotiske tryk, og disse to målinger også er stabile over tid, vil vi stærkt anbefale at benytte MCH frem for MCV til klassificering af anæmi.

Publicering

Resultaterne præsenteret i denne artikel er et uddrag fra artiklen: "Hypo- and hypernatremia results in inaccurate erythrocyte mean corpuscular volume measurements *in vitro*, when using Sysmex XE 2100", som netop er blevet publiceret i *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* (2015; 75: 588-594). □

Fra eksperiment til videnskabelig artikel



Referencer

- 1 Kaushansky, K., Lichtman, M., Beutler, E., Kipps, T., Seligsohn, U., Prchal, J. Williams *Hematology*, Eighth Edition. 2011. McGraw-Hill Medical.
- 2 Bull, BS., Fujimoto, K., Houwen, B., Klee, G., van HL., van Assendelft OW. *et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for "surrogate reference" method for the packed cell volume. Lab Hematol* 2003;9(1):1-9.

FRA EKSPERIMENT TIL VIDENSKABELIG ARTIKEL

Kontakt professionshøjskolens studieleder, hvis du har et projekt, som du gerne vil have publiceret i et videnskabeligt tidsskrift, lyder rådet fra bioanalytiker Jens Peter Philipsen og adjunkt Kirsten Vikkelsø Madsen. De har netop fået udgivet en videnskabelig artikel efter et frugtbart samarbejde og en lang, sej proces

”Patienter med blodmangel risikerer at blive fejltestet”, lød overskriften på Ekstra Bladets netnyheder. I artiklen var citater fra en bioanalytiker og en forsker fra Metropol, og baggrunden var, at de netop havde publiceret en videnskabelig artikel om fejlkilderne ved MCV-måling på Sysmex. Med Metropols kommunikationsafdeling og Videnskab.dk som mellemmand var artiklens konklusioner nået helt ud til populærpressen.

Overskrifter i pressen er dog langt fra hovedformålet for bioanalytiker Jens Peter Philipsen fra Nordsjællands Hospital, Hillerød og Kirsten Vikkelsø Madsen, adjunkt på bioanalytikeruddannelsen, Professionshøjskolen Metropol, som sammen har skrevet artiklen.

”Jeg prædiker som en anden missionær: I skal bruge MCH i stedet for MCV! Hvis jeg kan få nogen overbevist om det, har jeg nået meget. Den største gevinst vil jo være, hvis vores arbejde kan få laboratorierne til at ændre praksis,” siger Jens Peter Philipsen.

Og Kirsten Vikkelsø Madsen uddyber, hvorfor bioanalytikerfaglig forskning er nødvendig:

”Forventningen fra lægerne er jo, at laboratoriets analysesvar er korrekte. De er ikke vant til at sætte spørgsmålstegn ved det. Så her kan vi bioanalytikere være en kæmpe kompetence for lægerne.”

Gentog tidligere forsøg

Artiklen om de mulige fejlkilder ved analyser for anæmi er publiceret i The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation i 2015. Men kimen blev lagt mange år tidligere.

I 2003 publicerede afdelingsbioanalytikerne Bente Philipsen og Nina Kjær fra Jens Peter Philipsens daværende arbejds-

plads i Holstebro en artikel i bioanalytikerens fagblad. Titlen var ”Patienter med forstyrrelser i væskebalancen får målt forkert MCV”, og undersøgelsen var lavet på hæmatologiudstyr fra Advia.

Så da Jens Peter Philipsen i 2004 flyttede fra Holstebro til Hillerød satte han sig for at undersøge, om standardtesten på hæmatologiudstyret fra Sysmex gav samme fejlmålinger.

”Over en periode på tre måneder målte og indsamlede jeg data og efterprøvede resultaterne manuelt,” fortæller Jens Peter Philipsen.

Resultatet var, at standardtesten for anæmi på Sysmex-udstyret gav samme fejlmålinger hos patienter med saltubalance, som det tidligere forsøg på Advia havde påvist. Hvis ikke klinikere og bioanalytikere er opmærksomme på det, risikerer disse patienter en forkert behandling.

Jens Peter Philipsen ville gerne have sin viden ud til andre laboratorier.

”Jeg havde behov for en samarbejdspartner for at få resultaterne ud,” konstaterer han.

Tidligere kollega tilbød hjælp

Løsningen kom, da Kirsten Vikkelsø Madsen i 2012 blev ansat som adjunkt på bioanalytikeruddannelsen ved Metropol. Hun og Jens Peter Philipsen var gamle bekendte fra Holstebro Sygehus, hvor Kirsten i 1991-1994 var hospitalslaborantelev, og Jens Peter Philipsen hendes instruktionslaborant. Kendt for sin brændende interesse for hæmatologi.

Til begges glædelige overraskelse mødtes de nu igen som vejledere på en studerendes bachelorprojekt. Jens Peter fortalte Kirsten om sit eksperiment, baggrund og resultater.

”Jeg kender jo Jens Peter og ved, at når

det er ham, der har lavet det, ja, så er materialet i orden. Så jeg kontaktede institutchefen og fik grønt lys til, at vi arbejdede videre med projektet med henblik på en videnskabelig artikel. Professionshøjskolen Metropol er ved at opbygge et forskningsmiljø, og dette projekt passede fint ind i professionshøjskolens forskningsstrategi,” fortæller hun.

Selvom hæmatologi ikke er Kirstens nuværende fagspeciale, har hun som kandidat og ph.d. i molekylærbiologi de forskningskundskaber og -erfaring med videnskabelige artikler, som Jens Peter Philipsen efterlyste. Hun har desuden et netværk med andre forskere, som hun kunne sparre med i processen.

Kirsten Vikkelsø Madsen udarbejdede en grovskitse, og så gik artiklen ellers frem og tilbage mellem dem, indtil de var enige: ”Nu prøver vi at sende den ind.”

Det var på Jens Peter Philipsens anbefaling, at de sendte udkastet ind til The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation.

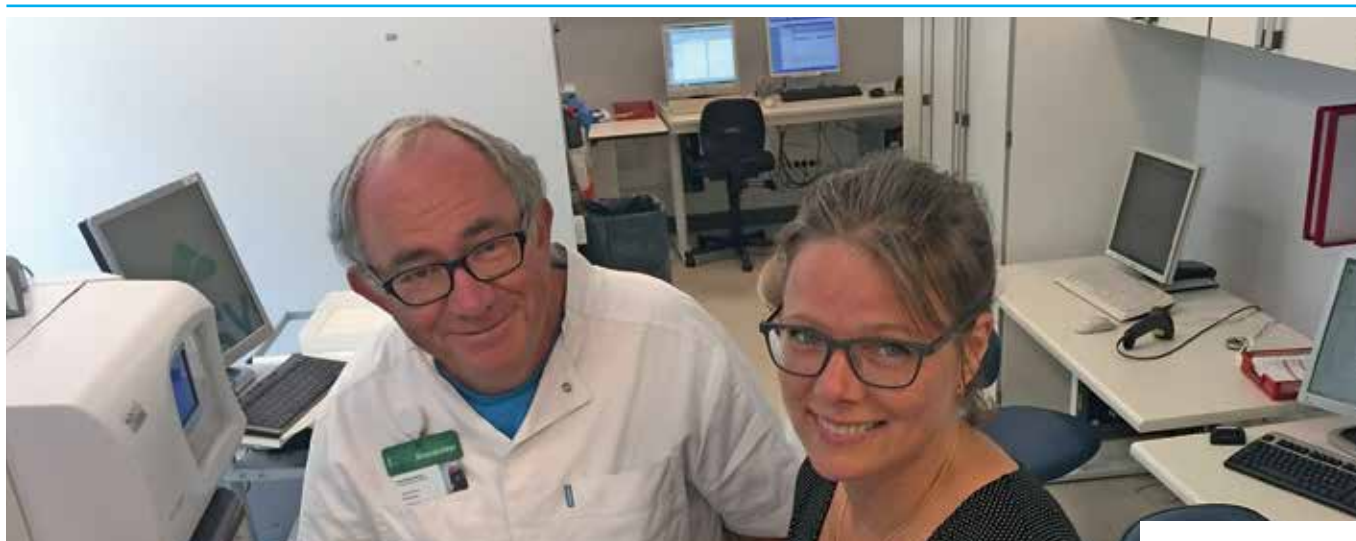
”Det er et tidsskrift, der læses på de danske laboratorier, så vi når bedst ud til målgruppen gennem det,” forklarer han.

Kontante reviewers

Artiklen blev sendt ind til tidsskriftet i januar 2014, hvorefter den blev gennemtygget af tre reviewers. De tre personers identitet er hemmelig, men de er udvalgt af redaktøren, fordi de har ekspertise inden for det hæmatologiske område. Og de lagde ikke fingrene imellem.

Jens Peter Philipsen og Kirsten Vikkelsø Madsen fik et helt A4-ark tilbage spækket med kommentarer, og de var ”ikke overvejende positive, men konstruktive”, husker de.

Så det var på med vanten igen i et kæmpe redigeringsarbejde, hvor Kirsten



OM

JENS PETER PHILIPSEN

Uddannelse: 1972-5 uddannelse til hospitalslaborant, 1983-4 videreuddannelse til ledende og instruerende laborant, 1999-2001 diplomleder for sundhedssektoren. **Arbejde:** 1975-1981 bioanalytiker, Odense Sygehus og Dronning Ingrid's Hospital, Nuuk Grønland. 1984-6 afdelingslaborant Holstebro Sygehus, 1986-96 Underviser Holstebro sygehus, 1996-2004 Ledende bioanalytiker Holstebro Sygehus, 2004- Underviser Nordsjællands Hospital, Hillerød.

OM

KIRSTEN VIKKELSØ MADSEN

Uddannelse: 1991-4 hospitalslaborantelev, Klinisk Biokemisk Afdeling, Holstebro Centralsygehus. Molekylærbiolog fra Roskilde Universitets Center i 2007. Ph.d. fra Københavns Universitet i 2012. **Arbejde:** 2012- Adjunkt på Professionshøjskolen Metropol, underviser for bioanalytikerstuderende. Har tidligere arbejdet som bioanalytiker, blandt andet i Holstebro, Nuuk og på LIFE, og som produktspecialist indenfor laboratorieudstyr.

gik hver enkelt kommentar igennem, og endnu et forsøg blev tilføjet. De sendte ind igen den 14. oktober samme år.

Artiklen kom retur med nye kommentarer. De sendte ind igen.

"Processen gentoges hele tre gange, og til sidst kom der endda en fjerde reviewer på. Det var en hård proces," husker Kirsten Vikkelsø Madsen og tilføjer:

"Men rigtig mange af deres kritikpunkter var relevante, og den endelige artikel er blevet meget bedre og meget mere tydelig, end den var fra start."

Klar bioanalytikerfaglig forskning

Artiklens reviewers ønskede blandt andet, at forskningen også havde indeholdt kliniske forsøg. Men her holdt de to forfattere fast.

"Det er et teknisk forsøg, vi har lavet, og vi har argumenteret for alle de ting, vi har udført, og den proces, vi har haft," forklarer Kirsten og fastslår:

"Som bioanalytikerfaglig forskning sidder artiklen lige i skabet. Den indeholder teknisk apparatur, analysemetode, analyseprincipper, cellebiologi, fysiologi, fysik, kemi og fysisk kemi. Det kan simpelthen ikke blive mere bioanalytikerfagligt."

Jens Peter Philipsen supplerer:

"Ja, desuden rummer artiklen meget af det, en bioanalytiker skal kunne, nemlig at vurdere et svar og afgøre, om det er patienten, der er syg, eller udstyret, der måler fejl."

Søg hjælp til publicering

Jens Peter og Kirsten er sikre på, at der rundtomkring i landet er bioanalytikere,

som ligesom Jens Peter har projekter og ideer liggende, som med hjælp fra en forskningskyndig kan sættes sammen til et videnskabeligt projekt og skrives sammen til en videnskabelig artikel.

"Men vi er nødt til at have hjælp fra andre med forskningserfaring. Der bør etableres samarbejder mellem uddannelsesinstitutionerne og klinikken. Og vi skal have de unge på banen," siger Jens Peter Philipsen.

"Ja, det drejer sig om at komme i gang og få hjælp til processen. Kontakt fx studielederen på professionshøjskolen, og få en kontakt til en forsker. Der ligger så meget derude, som venter på at blive publiceret," siger Kirsten Vikkelsø Madsen. □