

AF BIOANALYTIKER EMILIE FRIJS JØRGENSEN  
KLINISK IMMUNOLOGISK AFDELING  
HOSPITAL NORDSJÆLLAND-HILLERØD

BIOANALYTIKER SABINE ERIKSEN  
KLINISK IMMUNOLOGISK AFDELING  
RIGSHOSPITALET

# Fejlcentrifugeret blod behøver ikke kasseres

**Professionsbachelorprojekt viser, at der under en fejlcentrifugering af fuldblod ikke sker nogen uoprettelig skade af de endelige blodprodukters kvalitet.**

**Proceduren, som efterfølger fejlcentrifugering af fuldblod, er forskellig for de forskellige sygehuse. Derfor ønskede vi at finde en fælles procedure til håndtering af fejlcentrifugeret fuldblod.**

Danmark er selvforsynende med blodprodukter takket være en uvurderlig indsats fra det frivillige danske donor-korps. Fuldblodsportioner fra frivillige ubetalte donorer centrifugeres og separeres til tre forskellige blodkomponenter; henholdsvis SAG-M (erythrocytter), plasma og buffy coat, som senere bliver til trombocyt-koncentrat (TK). Produkterne undergår løbende kvalitetskontrol, således at der sikres behørig høj kvalitet til videre brug til patienter i forskellige kliniske situationer.

Udgangspunktet for vores undersøgelse var at finde den mest hensigtsmæssige procedure for håndtering af fejlcentrifugerede fuldblodsportioner med henblik på mulig klinisk anvendelse. Vi undersøgte, hvorvidt de tre forskellige blodprodukter efter opblanding, re-centrifugering samt separation kunne honorere de anbefalinger til kvaliteten, som stilles af Council of Europe [1].

## Udviklede egen metode

Særligt opmærksomme var vi på, om trombocytterne blev yderligere aktiveret af denne ekstra behandling. For at trombocytter er funktionelle, skal de helst være i hvilende tilstand, når de indgives til patienter, da effekten af trombocytter ligger i, at de bliver aktiveret i patienten til gavn for hæmostasen. Når trombocytter aktiveres, aktiveres de først reversibelt og siden til irreversibelt [2]. Ved en ekstra centrifugering er der en vis risiko for, at trombocytterne bliver irreversibelt aktiverede,

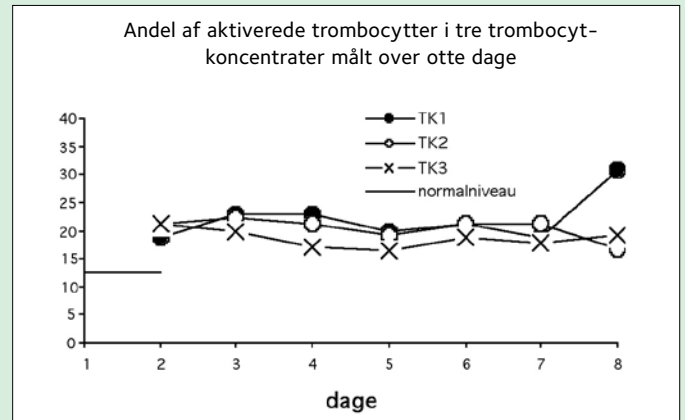
og sker dette, kan trombocytterne ikke anvendes klinisk.

Til undersøgelse af trombocytters irreversible aktivering udviklede vi en metode, hvor vi vha. receptorer på trombocytternes overflade kunne detektere en eventuel irreversibel aktivering. Hermed belyses kvaliteten af blodprodukter fra en fejlcentrifugeret fuldblodsportion, hvilket kan hjælpe til en standardiseret procedure i landets blodbanker.

Projektet viste, at disse fejlcentrifugerede blodprodukter opfyldte de internationale anbefalinger. Dog var der et højt leukocytantal i SAG-M, hvilket antageligt kan afhjælpes med en leukocytfiltrering. Den øgede andel aktiverede trombocytter i TK, som er opstået som følge af de to centrifugeringer, vil ikke komme til udtryk i den endelige TK. Blot skal man sikre sig, at en buffy coat fra en fejlcentrifugeret blodportion puljes med tre rutinefremstillede buffy coats.

## Metode

Tolv fuldblodsportioner blev centrifugeret med bunden opad, hvorefter portionerne blev opblandet og derefter centrifugeret almindeligt. De fejlcentrifugerede fuldblodsportioner blev herefter fraktioneret (separeret) som i rutinen. Efterfølgende fremstilledes tre TK ud fra fire puljede buffy coats af samme ABO- og Rhesus-type, blandet med trombocyttopbevaringsvæsken T-sol. De valgte analyser, som udførtes på de



Figur 1: Aktiverede trombocytter  
Figuren viser det procentvise antal af aktiverede trombocytter i de tre trombocyt-koncentrater (TK) fremstillet ud fra fejlcentrifugerede buffy coats over en tidsperiode på otte dage. Det forventede normalaktiveringsniveau var 12,8 %.

tre forskellige typer produkter, blev valgt således, at resultaterne kunne vurderes op imod kvalitetsanbefalingerne fra Council of Europe.

### Plasma

Antallet af leukocytter og erythrocytter i plasma blev målt vha. flowcytometri (FACS Calibur Becton Dickinson (BD)), og trombocytallet blev målt på Sysmex XE-2100 (Sysmex). Til detektion af leukocytter anvendtes kittet Leuco-Count (BD) efter proceduren beskrevet i indlægssedlen. Til detektion af erythrocytter anvendtes anti-Glycophorin A (Ramcon A/S) efter fremgangsmetoden beskrevet i kittets indlægsseddel. Disse analyser blev kun udført én gang på hvert produkt, da antallet af restceller ikke kan stige under videre opbevaring. På Klinisk Immunologisk afdeling i Hillerød, hvor projektet blev udført, er disse analyser validerede anvendte metoder til kvalitetssikring af blodprodukter.

### SAG-M

Prøvemateriale fra SAG-M-portionerne blev analyseret på Sysmex XE-2100, hvor der blev udført hæmatologiske analyser. I blandt disse analyser var hæmatokritværdi (HCT), hæmoglobin (HB) samt erythrocytantal (RBC). Derudover målte vi hæmolyse i produkterne på fotometeret Plasma/Low Hb Fotometer (Hemocue®). Her fulgte vi den fremgangsmetode, som bruges under kvalitetssikring af SAG-M-produkter i rutineproduktionen. De to analyser blev

udført hvert femte døgn i 37 dage. SAG-M-produkterne blev opbevaret i køleskab ved ca. 4 °C i 37 døgn.

Der blev skabt en referenceramme for de fejlcentrifugerede produkter ud fra data fra rutine-fremstillede produkter fra kvalitetssikring af SAG-M og plasmaproducter fra blodbanken, Nordsjællands Hospital – Hillerød.

### Trombocyt-koncentrat

Den første måledag på TK målt antal af restceller på Sysmex XE-2100; forinden var TK vurderet for swirling. Swirling er et fænomen, der opstår, hvis trombocytterne ikke er irreversibelt aktiveret. Til måling af trombocytaktiviteten anvendtes vores egen udviklede analysemodel. I analysemodellen anvendtes flowcytometri, da det er en anerkendt metode til påvisning af ændringer i måden, membranglykoproteiner udtrykkes på [4, 10], som netop sker ved aktivering af trombocytter. Andel af aktiverede trombocytter blev målt vha. flowcytometri (FACS Calibur, BD).

Analysen blev udført hver dag i syv dage fra dag 2 til dag 8. Resultaterne fra flowcytometeret blev omregnet således, at vi fandt det procentvise antal af hvilende og irreversibelt aktiverede trombocytter.

For at have et sammenligningsgrundlag for TK blev der fremstillet fire TK efter fremgangsmetoden brugt i rutinen. Et teknisk uheld umuliggjorde imidlertid videre analysering på TK'erne,

hvorfor analyserne kun blev udført på andet døgn.

Til statistisk sammenligning af resultaterne blev der anvendt to non-parametriske test. Til sammenligning af de fejlcentrifugerede produkters resultater og kvalitetssikringens resultater blev der udført en Mann Withney test, beregnet vha. computerprogrammet SPSS. Til sammenligning af blodprodukterne over et tidsforløb blev der benyttet Wilcoxon's test.

Til sammenligning af trombocytparametrene blev der udført Lineær regression vha. computerprogrammet STAT-Graphics.

### Resultater

For en række udvalgte parametre sammenlignede vi værdier fra blodprodukter fra fejlcentrifugerede fuldblodportioner med værdier fra den rutinemæssige kvalitetssikring, se tabel 1.

Plasma blev vurderet på mængden af restceller målt dag 1. Der var statistisk signifikant forskel mellem antallet af leukocytter samt trombocytter mellem de to metoder; dog var der ikke statistisk signifikant forskel mellem antallet af erythrocytter. Overordnet sås, at de rutinefremstillede plasmaproducter indeholdt flere restceller end plasmaproducter fra fejlcentrifugerede fuldblodportioner. I alle produkterne var antallet af restcellerne dog inden for den ramme, som Council of Europe anbefaler se tabel 1.

**TABEL 1: SAMMENLIGNING AF RUTINE-FREMSTILLEDE OG FEJL-CENTRIFUGEREDE PORTIONER MED COUNCIL OF EUROPE'S ANBEFALINGER**

Produkt	Parametre	Council of Europe's anbefalinger	Rutine-fremstillede produkter	Fejl-centrifugerede produkter
Plasma	Eryocytantal	< 6,0 x 10 <sup>9</sup> /L	0,41 x 10 <sup>9</sup> /L	0,20 x 10 <sup>9</sup> /L
	Leukocytantal	< 0,1 x 10 <sup>9</sup> /L	15 x 10 <sup>6</sup> /L	3,34 x 10 <sup>6</sup> /L
	Trombocytantal	< 50 x 10 <sup>9</sup> /L	11,17 x 10 <sup>9</sup> /L	2,17 x 10 <sup>9</sup> /L
SAG-M	Leukocytantal	< 4,14 x 10 <sup>9</sup> /L	2,8 x 10 <sup>9</sup> /L	8,4 x 10 <sup>9</sup> /L
	HCT	0,50-0,70	0,6	0,7
	Hæmoglobin	> 9,2 mmol/L	11,2 mmol/L	14,9
	Hæmolyse	< 0,8 %	< 0,8 %	< 0,8 %
TK	Leukocytantal	< 0,2 x 10 <sup>6</sup> /L	5,0 x 10 <sup>6</sup> /L	0,08 x 10 <sup>6</sup> /L
	pH	6,4 – 7,4	7,0 – 7,1*	6,8 – 7,4

Oversigt for sammenligning af Council of Europe's anbefalinger, rutine-fremstillede og fejlcentrifugerede middelværdier, målt dag 1. De to værdier, der er fremhævet, er værdier, som falder uden for Council of Europe's kvalitetskrav. \*Denne værdi blev kun målt over to dage.

SAG-M-produkterne blev vurderet ud fra de udvalgte hæmatologiske parametre og hæmolyse målt hver femte dag samt antallet af leukocytter og trombocytter målt dag 1.

Der var et væsentligt større antal restleukocytter i de fejlcentrifugerede SAG-M-produkter end i portioner fra den rutinemæssige kvalitetssikring, og de oversteg anbefalingerne fra Council of Europe.

Der var statistisk signifikant fald i HCT-middelværdierne fra de fejlcentrifugerede SAG-M-produkter mellem dag 1 og dag 5 samt mellem dag 1 og dag 37. Værdierne var konstante i perioden dag 5 til dag 37.

Der var endvidere signifikant forskel i HCT-middelværdien mellem de to fremstillingsmetoder på dag 1, uden at disse middelværdier faldt uden for rammerne af Council of Europe's anbefalinger, se tabel 1. To enkelte HCT-målinger fra dag 1 var på 0,8.

Hæmolyseprocenten steg gennem opbevaringsperioden for de fejlcentrifugerede SAG-M produkter, men forblev under hele forløbet < 0,8 %, ligesom kvalitetssikringens hæmolyseresultater. Derfor følger denne parameter Council of Europe's anbefalinger.

De tre TK, fremstillet ud fra buffy coat fra fejlcentrifugerede fuldblodsportioner, blev vurderet ud fra antallet af resterythrocytter og -leukocytter samt andelen af irreversibel aktiverede trombocytter. De rutinefremstillede TK indeholdt ca. seks gange så mange restleukocytter, som TK'erne fremstillet ud fra fejlcentrifugerede fuldportioner, se tabel 1. Antallet af leukocytter i de fejl-

centrifugerede TK fulgte Council of Europe's anbefalinger.

Over det syv dages opbevaringsforløb af TK sås heller ikke nogen væsentlig forskel i pH, og i alle koncentratene sås der swirling.

Første måledag så vi en forskel i den procentvise andel af aktiverede trombocytter mellem de to fremstillingsmetoder. TK fra fejlcentrifugerede fuldblodsportioner indeholdt ca. 1,5 gange flere aktiverede trombocytter end de rutinefremstillede TK. Alle tre koncentrat forblev uændrede de første syv dage, hvorefter det ene koncentrat udviklede en stigning observeret dag 8; se figur 1.

### Diskussion

Vi undersøgte, hvorvidt kvaliteten og holdbarheden af de forskellige blodprodukter blev ændret grundet en yderligere opblanding samt centrifugering af blodportionerne. Processer, som vil være nødvendige, hvis den oprindelige fuldblodsportion var blevet fejlcentrifugeret.

Kvaliteten af plasma blev ikke påvirket i de fejlcentrifugerede plasmaprodukter. De fejlcentrifugerede produkter indeholdt færre restceller i forhold til rutinens. Trods forskellen i antallet af restceller mellem de to metoder kan plasmaet fra begge metoder stadig anvendes klinisk, da værdierne følger Council of Europe's anbefalinger.

Den ekstra centrifugering havde m.h.p. SAG-M-produkterne ikke påvirket kvalitet eller holdbarhed betydeligt. Den

eneste væsentlige forskel var, at antallet af restleukocytter i de fejlcentrifugerede SAG-M-produkter var blevet fordoblet.

Ifølge Council of Europe's anbefalinger skal 90 % af produkterne opfylde kravet om, at SAG-M-produkter skal indeholde < 1,2 x 10<sup>9</sup> restceller/enhed [1]. I vores tilfælde var der kun 25 % procent af vores produkter, som lå inden for Council of Europe's anbefalinger. Vi anbefaler derfor, at SAG-M produkter fra fejlcentrifugerede fuldblodsportioner leukocytfilteres.

HCT-værdierne på 0,8 for to fejlcentrifugerede SAG-M-produkter på dag 1 falder uden for Council of Europe's anbefalinger. Dette kan skyldes den individuelle variation i HCT-værdien fra de to donorer. HCT-værdierne var dog allerede inden for Council of Europe's anbefalinger på anden måledag; dag 5. Dette tyder på en tidligere fejlmåling, og derfor tager vi ikke højde for disse to afvigelser.

Selvsagt ville det have været ideelt med to fuldblodsportioner fra samme individ, således at begge metoder kunne testes uden at blive påvirket af individuel variation; men dette var ikke praktisk muligt.

Til trods for de to omtalte HCT-værdier, lå alle HCT-middelværdierne inden for de rammer, som Council of Europe anbefaler.

Hæmolysen steg i løbet af opbevaringsperioden på 37 døgn. Dette var at forvente, da erythrocytterne generelt ikke er lige gamle, når de bliver høstet. Det betyder, at de over tid vil gå til grunde, betinget af deres alder i forhold

til en levedygtighed på ca. 120 dage. Hæmolysesprocenten for begge fremstillingsmetoder overskred dog på intet tidspunkt anbefalingerne fra Council of Europe.

TK fremstillet ud fra fejlcentrifugerede fuldblodsportioner indeholdt færre leukocytter end de koncentrat, der var fremstillet ud fra de rutinefremstillede buffy coats. Leukocytantalet fulgte i begge tilfælde Council of Europe's anbefalinger.

Der var ingen forskel i swirling mellem de forskelligt fremstillede TK. I første omgang udelukkede det, at en centrifugering aktiverede flere trombocytter, da det ikke visuelt kunne påvises, at trombocytternes morfologi var blevet ændret.

De fire rutinefremstillede TK havde en aktiverings-middelværdi på 12,8 % på første måledag. Til sammenligning havde de TK, der var fremstillet ud fra buffy coats fra fejlcentrifugerede fuldblodsportioner, en middelværdi på 20,4 %, dog stabile over tid.

Pga. et for lille antal produkter kunne vi ikke udføre en egentlig statistisk test, men en simpel sammenligning af værdierne viste, at trombocyt koncentrat, fremstillet af buffy coats fra fejlcentrifugerede fuldblodsportioner, indeholdt 1,5 gange flere aktiverede trombocytter.

Hvis man sammenligner med andres fund af andel af aktiverede trombocytter i TK, undersøgt med flowcytometri, er observationerne varierende.

Bagamery et al. fandt en andel af aktiverede trombocytter, dag 1, på 22 % [3], og på 21 % ved et andet forsøg [4]. Wang et al. fandt en andel af aktiverede trombocytter, dag 1, på 12+/-7 % [6]. Disse varierende fund gør det vanskeligt at fremsætte et fast normalniveau for andelen af aktiverede trombocytter i rutinefremstillede TK. Det bliver dermed også vanskeligt at afgøre betydningen af de 1,5 gange flere aktiverede trombocytter fra de fejlcentrifugerede portioner i vores forsøg. En direkte sammenligning kompliceres yderligere af, at forskerne i de omtalte artikler opbevarer trombocytterne i plasma, hvor vi i vores forsøg suspendede dem i T-sol.

Trods 1,5 gange flere aktiverede trombocytter ved TK fra fejlcentrifugerede fuldblodsportioner mener vi ikke, det vil have den store betydning. Under normale omstændigheder vil det ikke ske, at man ville pulje fire fejlcentrifugerede buffy coats. Skulle risikoen for en sådan situation alligevel opstå, må

man i dette tilfælde være opmærksom på, at to fejlcentrifugerede buffy coats ikke kommer til at indgå i det samme TK. En fejlcentrifugeret buffy coat med eksempelvis 20 % aktiverede trombocytter ville således blive puljet med tre rutinecentrifugerede buffy coats med ca. 13 % aktiverede trombocytter. Hermed ville den samlede andel af aktiverede trombocytter i trombocyt koncentratet være ca. 15 %, og således ikke betydeligt højere end 13 %.

Over et otte dages tidsinterval fandt vi, at der ikke var sket en betydelig ændring i det procentvise antal af aktiverede trombocytter. Antallet af aktiverede trombocytter holdt sig på omkring 20 % over hele forløbet på nær en enkelt stigning, dag 8 (se figur 1). Wang et al. fandt, at trombocytterne ikke bliver yderligere aktiveret over 5 dage [5]. Turner et al. fandt derimod, at der aktiveres signifikant flere trombocytter over en 7 dages opbevaringsperiode [7]. Matsubayashi et al. fandt, at antallet af aktiverede trombocytter steg indtil dag 3, hvorefter antallet forblev konstant [6].

Vi anvendte i dette forsøg validerede og standardiserede metoder til kvalitets sikring af blodprodukter samt en ny ikke-valideret metode til kvantificering af procentvis antal aktiverede trombocytter.

Antallet af prøver blev valgt på baggrund af etiske overvejelser. Vi fandt det ikke acceptabelt at fremstille rutineprodukter, der udelukkende skulle anvendes som kontrolprøver. Derimod var det acceptabelt at anvende data fra rutinen som sammenligningsgrundlag.

Projektet blev desuden begrænset af overvejelserne af, hvor mange blodportioner vi kunne tillade os at bruge. Derfor skal projektet ikke ses som en større undersøgelse, men blot et mindre studie.

På trods af denne begrænsning mener vi alligevel, at observationerne er entydige og tilstrækkelige som baggrund for vores konklusion; hvor vi mener at kunne anbefale, at man kan anvende en fejlcentrifugeret fuldblodsportion. Dog bør man leukocytfiltrere SAG-M og sikre sig, at én fejlcentrifugeret buffy coat puljes med tre normalcentrifugerede buffy coats.

Læs hele bachelorprojekt opgaven på [www.dbio.dk](http://www.dbio.dk) under fagbladet/faglige artikler.

Fejlcentrifugerede blodprodukter behandles forskelligt på landets hospitaler. På Rigshospitalet anvendes alle komponenter, på Gentofte og Odense Universitets Hospital kasseres buffy coat, mens de to andre komponenter anvendes.

På Hospital Nordsjælland - Hillerød blev alle komponenter tidligere kasseret. Nu følges projektets anbefalinger.

Selvom antallet af fejlcentrifugerede fuldblodsportioner ikke er stort, ca. 0,05 % på 12 måneder på Hospital Nordsjælland - Hillerød, er hver eneste blodportion nødvendig, da der på Sjælland er mangel på både blod og bloddonorer.

## REFERENCER

- 1) Council of Europe Publishing; Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 11. Edition, 2005.
- 2) Hoffbrand, Pettit og Moss; Essential haematology, Blackwell Science 4. Edition 2001.
- 3) Bagamery, K. et al.; Are platelets activated after rapid, one-step density gradient centrifugation? Evidence from flow cytometric analysis, Clin. Lab. Haem. 2005, 27, 75-77. Blackwell publishing Ltd.
- 4) Bagamery, K. et al.; Flow cytometric analysis of CD41-labeled platelets isolated by rapid, one-step optiprep method from human blood, Cytometry Part A 65A: 84-87 2005 Wiley-Liss, Inc.
- 5) Wang, C, et al.; Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates, Pergamon. Transfusion Science 20 1999, 129-139. Elsevier Science Ltd.
- 6) Matsubayashi, H. et al. Platelet membrane early activation markers during prolonged storage, Pergamon. Thrombosis research. 93 1999, 151-160. Elsevier Science Ltd.
- 7) Turner, C. P. et al.; In vitro function of platelets concentrates prepared after filtration of whole blood or buffy coat pools, Vox Sanguinis 2005 88, 164-171. Blackwell publishing Ltd.