



Examensarbete, 15 hp  
Kandidatexamen i Biomedicinsk laboratorievetenskap  
Höstterminen 2018

# Lipemi-interferens vid mätning av Hb på Sysmex XN-10 och HemoCue Hb 201+

Sebastian Andersson

Naturvetenskapliga Fakulteten

## Populärvetenskaplig sammanfattning

Röda blodkroppar, erythrocyter, är fulla av hemoglobin (Hb) som binder syre för transport från syrerika till syrefattiga delar av kroppen. Blodbrist, anemi, innebär att mängden Hb som cirkulerar i blodomloppet är lägre än vad som krävs för effektiv syresättning av kroppens vävnader. Bristen kan uppstå till följd av förlust av erythrocyter, hämmad nybildning eller brist på någon av de byggstenar som krävs.

För att mäta Hb kan man utnyttja att Hb-molekylen absorberar ljus av en viss våglängd. Om man mäter hur mycket av ljuset som passerar utan Hb jämfört med minskningen av ljusets intensitet med prov närvarande kan skillnaden användas för att beräkna hur mycket Hb provet innehåller. Denna metod är förstas beroende av att andra ämnen som absorberar eller sprider ljus av samma våglängd inte förekommer.

Lipoproteiner fungerar som transportmedel för fettmolekyler i kroppen och förekommer i olika storlekar. De största lipoproteinerna ökar i antal direkt efter intag av fettrik mat och vid olika sjukdomar som exempelvis diabetes mellitus, alkoholism samt lever- och njursjukdomar. Ökad koncentration av lipoproteiner i blodet kallas lipemi. Plasma från ett blodprov med hög koncentration av stora lipoproteiner ser grumligt ut och dessa sprider ljus. Sådan spridning av ljus sker även i helblod som då ger ett falskt för högt resultat vid mätning av Hb-koncentration eftersom det inte går att skilja på hur mycket av ljuset som absorberats av Hb och hur mycket som spridits av lipoproteinerna.

Olika instrument använder olika metoder för att motverka störningar från lipemi. Sysmex XN-10 är den apparat som i första hand används för Hb-mätning på klinisk kemi vid Skånes universitetssjukhus i Lund och i andra hand används HemoCue Hb 201+. Sysmex XN-10 använder fettlösande medel som ska minimera påverkan från lipoproteiner och HemoCue mäter ljusgenomträngligheten vid två våglängder där värdet från den andra kompenserar för grumligheten. Sysmex XN-10 har också en optisk kanal (HGB-O) som är till för att räkna och mäta retikulocyter och deras Hb-innehåll men ger då också ett beräknat värde på Hb-koncentrationen i hela provet. Syftet med denna studie var att undersöka om den optiska kanalen överensstämmer med den fotometriska för mätning av Hb-koncentration på Sysmex XN-10. Därefter utvärdera hur mycket lipemi påverkar mätningen av Hb-koncentrationen med

de tre nämnda metoderna samt vilken som påverkas minst. Till sist undersöks om det föreligger ett samband mellan ökad Hb-koncentration och lipemi i plasma.

Mätvärden från prover som analyserats i både den fotometriska och den optiska kanalen på Sysmex XN-10 under november månad, totalt 392 stycken, jämfördes med hjälp av Spearmans rangkorrelationstest. För att undersöka påverkan av lipemi användes färdiganalyserade prover som spikades med Intralipid, en fettlösning som brukar användas för näringstillförsel. Differenserna mellan provernas Hb-koncentration före och efter tillsats användes för att statistiskt påvisa signifikanta skillnader. För att undersöka om lipiderna i plasman orsakade höjningen av Hb-koncentrationen jämfördes också Hb i både helblod och plasma före och efter centrifugering.

Metodjämförelsen mellan den fotometriska och den optiska kanalen visade god korrelation men stor spridning. Den fotometriska metoden på XN-10 och HemoCue visade båda signifikant skillnad mellan lipemiskt och icke-lipemiskt prov. Den optiska metoden visade ingen signifikant skillnad men däremot stor spridning av differenserna både för höga och för låga värden. Detta kan eventuellt förklaras av metodens känslighet för hemolys som ofta förekommer tillsammans med stark lipemi. HemoCue Hb 201+ visade en liten differens på 3 g/L med liten spridning av värdena. Höjningen av Hb i den lipemiska plasman var signifikant högre än den höjning som uppmättes i blodprovet.

Slutsatsen är att den fotometriska och den optiska metoden på Sysmex XN-10 är jämförbara för Hb-mätning. HemoCue Hb 201+ är den mest pålitliga av de tre metoderna för Hb-mätning i lipemiska prover och den falska höjningen av Hb-värde i helblod motsvarades inte av utslaget av Hb-mätningen i provets plasma.

**Författare/Author**

Sebastian Andersson

**Titel**

Lipemi-interferens vid mätning av Hb på Sysmex XN-10 och HemoCue Hb 201+

**Engelsk titel**

Lipemic interference on the measurement of Hb on Sysmex XN-10 and HemoCue Hb 201+

**Handledare/Supervisor**

Skrivhandledare Prof. Leg. BMA Bodil Hernroth, Högskolan Kristianstad

Labb-handledare Leg. BMA Christina Jönsson, Klinisk kemi, Skånes universitetssjukhus Lund

**Examinator/Examiner**

Prof. Leg. BMA Ann-Sofi Rehnstam-Holm, Högskolan Kristianstad

**Sammanfattning**

Anemi kan uppstå till följd av förlust av erythrocyter eller försämrad produktion av nya erythrocyter. För att upptäcka och följa upp patienter med anemi är det viktigt att korrekt kunna mäta hemoglobinkoncentrationen (Hb) i blodet. En vanlig metod för att mäta Hb-koncentration är fotometri i kombination med en kemisk omvandling. Liksom alla mätningar med ljus är dessa känsliga för turbiditet i provet. Lipemi är en vanlig källa till turbiditet som kan uppstå till exempel som följd av en fettrik måltid, diabetes mellitus, lever- eller njursjukdomar, alkoholism och vissa läkemedel. Olika instrumenttillverkare har olika metoder för att motverka interferensen av lipemi. Sysmex hematologi-instrument XN-10 använder en fettlösande bärarvätska i sin fotometriska kanal (HGB) och HemoCue mäter vid en andra våglängd som ska kompensera för turbiditet. Sysmex XN-10 har också en optisk kanal (HGB-O) som är till för att räkna retikulocyter genom att mäta deras nukleinsyra- samt Hb-innehåll men ger då också ett beräknat värde på Hb-koncentrationen i hela provet.

Syftet med denna studie var att jämföra HGB och den HGB-O för bestämning av Hb-koncentrationen i helblod. Båda kanalerna jämfördes även med HemoCue Hb 201+ vid bestämning av Hb-koncentrationen i svårt lipemiska prover. Hb-mätning på plasma från motsvarande prover utfördes också för att undersöka om värdet motsvarade Hb-höjningen i de lipemiska proverna.

Prover analyserade med både HGB och HGB-O på Sysmex XN-10 på klinisk kemi vid Skånes universitetssjukhus i Lund under november månad 2018 (n = 392) jämfördes med hjälp av Spearmans rangkorrelationskoefficient. Lipemi simulerades med fettemulsionen Intralipid i totalt 32 prover. Färdiganalyserade patientprover från föregående dag delades i ett lipemiskt prov med Intralipid tillsats och ett nollprov med tillsats av NaCl-lösning i en motsvarande volym. Differenserna mellan de lipemiska- och nollprovernas Hb-värden testades för signifikans med icke-parametrisk Wilcoxon's teckenrangtest. Kruskal-Wallis samt Dunns's tester användes för att visa på signifikanta skillnader mellan de tre metoderna. Signifikansnivån sattes vid  $p < 0,05$ .

Resultaten visade god korrelation mellan HGB - och HGB-O Hb-värden med ett Spearman korrelationsvärde på 0,982. Jämförelsen av metoderna vid lipemi visade signifikant skillnad mellan nollprov och lipemiskt prov för HGB- ( $p < 0,001$ ) men inte HGB-O ( $p = 0,11$ ) på XN-10. HemoCue Hb 201+ visade också signifikant skillnad ( $p < 0,001$ ) vid lipemi men med lägre median-värde än HGB och mindre spridning än HGB-O. HGB-O:s median-värde tydde på minst lipemipåverkan men spridningen av differenserna var stor. Spridningen av HGB-O resultaten kan bero på hemolys då endast intracellulärt Hb mäts i denna kanal. Resultaten i denna studie tyder på att HemoCue-metoden är den mest pålitliga vid Hb-mätning av lipemiska prover och därmed det lämpligaste komplementet till HGB-metoden.

**Ämnesord**

Hemoglobin, Lipemi, Interferens, Sysmex XN-10, Optisk kanal, HemoCue Hb 201+

## **Abstract**

Anemia can arise from either loss of erythrocytes or impaired production of new erythrocytes. In order to discover and evaluate the treatment of anemic patients, correct Hb measurements are important. A common method to measure Hb concentration is photometry in combination with chemical conversion of the Hb. Like all light-dependent methods this suffers from a vulnerability to turbidity that scatters light. Lipemia is a common cause of turbidity caused by e.g. recent intake of high fat foods, diabetes mellitus, liver or kidney disease, alcoholism and some drugs. Manufacturers of Hb analyzers use different methods to counter the influence of interference from lipemia on measurements. Sysmex XN-10 analyzers use a fat dissolving sheath fluid in its photometric channel (HGB) and HemoCue measures absorbance at a second wavelength to compensate for turbidity. Sysmex XN-10 also has an optic channel (HGB-O) for counting reticulocytes by measuring their nucleic acid and Hb content. At the same time this channel measures Hb equivalents of erythrocytes and gives a calculated value of Hb content in the entire sample.

The aim of this study was to compare the photometric and the optical channels for measuring Hb concentration in whole blood. Both the Sysmex XN-10 channels were compared with HemoCue Hb 201+ when measuring Hb concentrations in lipemic samples. Plasma Hb concentration was determined for the corresponding samples in order to investigate correlation between elevation in Hb concentration with and without simulated lipemia and in the plasma after centrifugation.

Samples analyzed at Skånes University Hospital in Lund during the month of November 2018 (n = 392) using both HGB and HGB-O on XN-10 were compared using Spearman's signed correlations coefficient. Lipemia was simulated by using the fat emulsion Intralipid in a total of 32 samples. Samples collected and analyzed on the previous day was used for the study. Each sample was split into one part with added Intralipid to form a lipemic sample and one part with NaCl-solution of the same volume as Intralipid in the lipemic sample. The differences between lipemic and non lipemic samples was tested for significance by the non-parametric Wilcoxon's signed ranks test for each of the methods.

Significance between the three methods was tested by using Kruskal-Wallis and Dunn's tests. Level of significance was set to  $p < 0.05$ .

The results showed good correlation between earlier test run on both HGB and HGB-O with a Spearman correlation score of 0,982. A significant difference was found between lipemic and non lipemic samples with the photometric method ( $p < 0,001$ ) but not the optical method ( $p = 0,11$ ) on XN-10. HemoCue Hb 201+ also showed a significant difference ( $p < 0,001$ ) between lipemic and non lipemic samples but a lower median than HGB and less deviation than HGB-O. The median of HGB-O indicated that it was influenced the least by lipemia of the three methods but had the greatest deviation of the differences. The greater deviation of HGB-O values may have been caused by hemolysis since the method measures intra cellular Hb. HemoCue shows according to this study the slightest deviation of the three methods and a less heightened median value compared to HGB which confirms the methods suitability as complement to HGB when dealing with lipemic samples.

## **Keywords**

Hemoglobine, Lipemia, Interference, Sysmex XN-10, Optical channel, HemoCue Hb 201+

# Innehåll

1. Inledning .....	7
1.1. Anemi .....	7
1.2. Sysmex hematologi-instrument .....	8
1.3. HemoCue Hb 201+ .....	8
1.4. Lipemisk interferens vid Hb-mätning.....	9
1.5. Syfte.....	10
2. Material och metod .....	11
2.1. Urval för jämförelse av HGB och HGB-O Hb-mätning på Sysmex XN-10.....	11
2.2. Provmaterial och beredning av lipemiska prover .....	11
2.3. Jämförelse av Hb i helblod och plasma .....	12
2.4. Kvalitetssäkring .....	12
2.5. Statistiska metoder.....	12
2.6. Etiska aspekter.....	13
3. Resultat .....	13
3.1. Jämförelse av HGB och HGB-O Hb-mätning på Sysmex XN-10 .....	13
3.2. Jämförelser av mätningar på helblod med lipemi.....	15
3.3. Jämförelse av Hb i helblod och plasma .....	16
4. Diskussion.....	17
Referenser.....	20

# 1. Inledning

## 1.1. Anemi

Lägre Hemoglobin(Hb) -koncentration än vad som är optimalt för individen leder till syrebrist i vävnaderna som i sin tur normalt sett leder till en uppreglering av erythrocytproduktionen. Om denna produktion inte fungerar som den ska eller inte räcker till för att kompensera för bristen, utvecklas anemi. World Health Organization (WHO) definierar anemi som Hb under 120 g/L för kvinnor och under 130 g/L för män (Gahrton & Juliusson, 2012). Lågt Hb-värde kan bero på förlust av erythrocyter genom hemolys eller blödning men också fel i produktionen, erytropoesen, som sker i benmärgen. Sjukdomar som påverkar benmärgen kan således påverka erytropoesen liksom näringsbrister då erytropoesen är beroende av tillgång på främst järn, vitamin B<sub>12</sub> och folat (Gahrton & Juliusson, 2012).

Viktiga mätvärden utöver Hb-värdet vid anemiutredning är retikulocytantalet och erythrocyternas medelcellsvolym, eftersom olika brister leder till förminskade eller förstörade erythrocyter. Retikulocyter är celler i mognadsstadiet före mogna erythrocyter som har gjort sig av med sin cellkärna och lämnat benmärgen. Retikulocytantalet talar alltså om ifall det sker nyproduktion av erythrocyter (Gahrton & Juliusson, 2012).

Eftersom erythrocyter har en livslängd på ca 120 dygn (Gahrton , 2012) kan det dröja innan anemi till följd av järnbrist upptäcks (Levy & Schapkaitz, 2018). Möjligheten att analysera Hb-innehållet i retikulocyter har därför utvecklats av bland andra Sysmex (Levy , 2018). Om Hb-innehållet i nyproducerade reticulocyter är lågt talar det för att kroppens järnreserver är slut. Stiger Hb-innehållet efter behandling med exempelvis järntillskott talar det för att behandlingen fungerar och patienten behöver inte vänta tills det finns tillräckligt många mogna erythrocyter innan uppföljningsprover kan tas (Osta et al., 2013).

Bestämning av Hb-koncentration är en vanlig analys både inom primärvård och slutenvård. Det går att mäta Hb-koncentration med olika metoder och det är viktigt att resultaten överensstämmer mellan dem och att andra ämnen i blodet inte interfererar med mätningen.

## 1.2. Sysmex hematologi-instrument

För mätning av Hb-koncentrationen i den fotometriska kanalen (HGB) tillsätts natriumlaurylsulfat (SLS) som dels löser upp erythrocyternas cellmembran så att de lyserar och släpper ut allt innehåll, dels orsakar en konformationsändring hos Hb (Matsushita, Tanaka, Sakairi & Tanaka, 2011). Konformationsändringen gör heme-gruppens järnjon mer mottaglig för oxidation av syreatomer som därefter binder SLS-molekyler. Absorbansen av SLS-bundet Hb mäts vid 555 nm efter att samma mätning gjorts på spädningsvätskan som blank. Blankens absorbansvärde dras från provets mätvärde innan beräkning med hjälp av standardkurva ger Hb-koncentrationen (Matsushita et al., 2011).

Sysmex XN-10 har även en optisk kanal där cellerna utsätts för reagens som luckrar upp cellmembranen och fluorescensmärker nukleinsyror inuti cellerna (Sysmex, u.å.). Cellerna får sedan passera mellan en ljuskälla och detektorer som fångar upp det ljus som sprids åt sidorna av cellen och av den fluorescerande märkningen. Ljusspridningen ger information om cellernas granulering samtidigt som fluorescensintensiteten ger information om mängden DNA och RNA som cellerna innehåller (Sysmex, u.å.). Tillsammans gör dessa parametrar det möjligt att skilja olika celltyper åt, även erythrocyter från retikulocyter i olika mognadsstadier då deras nukleinsyrainnehåll varierar (Arneith & Menschikowski, 2015). Samtidigt ges ett beräknat mått på erythrocyters och retikulocyters Hb-innehåll utifrån ljusspridningen (Maconi, Cavalca, Danise, Cardarelli & Brini, 2009; Osta et al. 2013).

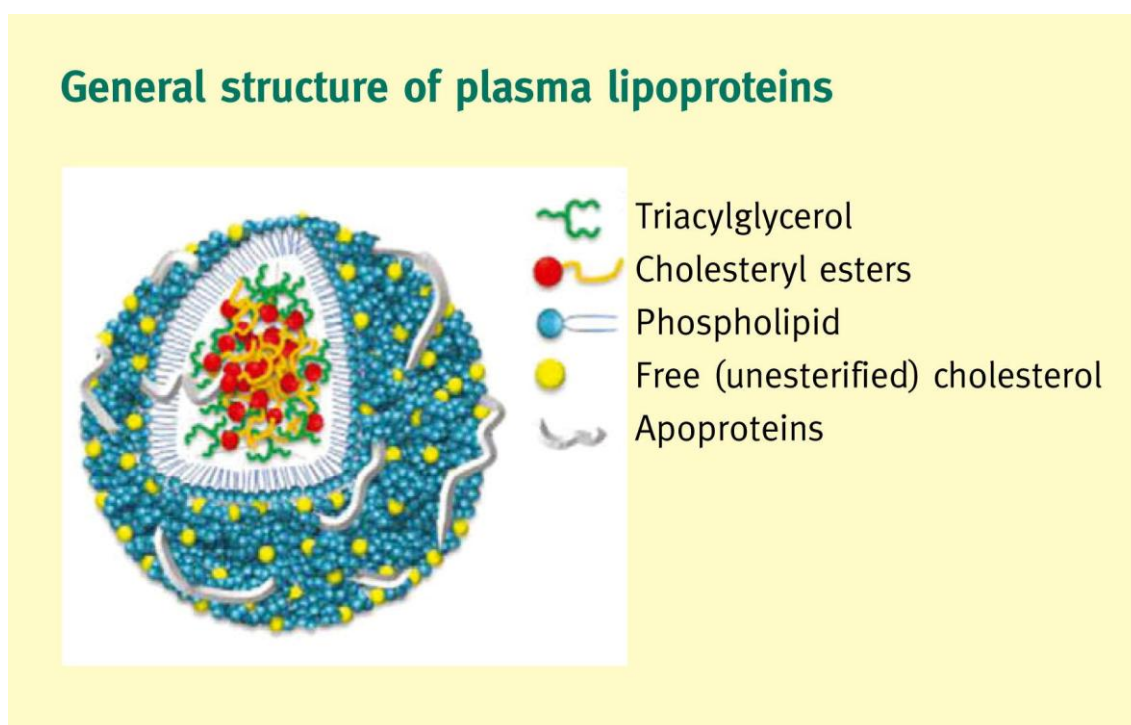
## 1.3. HemoCue Hb 201+

HemoCue 201+ är ett patientnära instrument för Hb-mätning med engångskuvetter innehållande reagens. En blodsdroppe suggs upp i en engångskuvett med hjälp av kapillärkraften där erythrocyterna hemolyseras och genomgår kemiska reaktioner som slutar i azid-Hb (Hudson-Thomas, Bingham & Simmons, 1994). När kuvetten placeras i instrumentet mäts azid-Hb:ets absorbans vid 570 nm samtidigt som en kompensationsmätning vid 880 nm sker (Hiscock, Kumar & Simmons, 2015). Mätningen vid 880 nm är till för att kompensera för turbiditet och leukocyter som kan ge falskt för höga värden (Hudson-Thomas et al., 1994).



## 1.4. Lipemisk interferens vid Hb-mätning

Lipider, fettmolekyler, är svårslösliga i vatten och kan därför inte effektivt transporteras i fri form med blodomloppet (Nilsson-Ehle, 2003). Istället bildas lipoproteiner som består av ett fosfolipidmembran med instuckna proteiner som omsluter en mängd lipider (Figur 1). Den hydrofila delen av fosfolipiderna och proteinerna riktas utåt mot omgivningen medan den lipofila delen riktas inåt mot lipiderna som transporteras. På så sätt blir lipoproteinerna vattenlösliga och kan följa med blodomloppet (Nilsson-Ehle, 2003).



Figur 1. Lipoproteiners generella struktur (Griffin 2013).

Lipoproteinerna delas in i klasser baserade på deras densitet (Nilsson-Ehle, 2003). Lipoproteinerna som bildas strax efter födointag är relativt stora med mycket lipider med låg densitet i förhållande till proteiner som har hög densitet, och kallas kylomikroner. Ju mer fett måltiden innehöll desto mer lipider packas i varje kylomikron och därmed ökar dess storlek (Griffin, 2013). Under sin passage genom kapillärerna i olika vävnader utsätts kylomikronerna för enzymet lipoproteinlipas som bryter ner lipiderna till fettsyror som kan absorberas av kringliggande celler (Nilsson-Ehle, 2003). Efterhand som lipiderna bryts ner överförs membranets proteiner till en annan form av lipoprotein med låg andel lipider i förhållande till proteiner, high density lipoprotein

(HDL). HDL återför proteinerna till levern och nybildade kylomikroner (Griffin, 2013; Nilsson-Ehle, 2003). När kylomikronresterna når levern binder de till receptorer på hepatocyternas ytor och absorberas (Nilsson-Ehle, 2003). I levern packas nyupptagna och nybildade lipider i en lipoproteinform som kallas very low density lipoprotein (VLDL) med högre densitet än kylomikroner. Lipiderna i VLDL omsätts på samma sätt som i kylomikroner av lipoproteinlipas tills bara en rest återstår som antingen återupptas av levern eller omvandlas till low density lipoprotein (LDL). LDL innehåller främst kolesterol och hela LDL-partiklar tas efterhand upp av celler i behov av kolesterol (Nilsson-Ehle, 2003).

Lipoproteiner i kylomikron- och VLDL-storlekar absorberar och sprider ljus vilket ger plasman ett vitt, opakt utseende vid höga koncentrationer. Spektrofotometriska analyser som bygger på att analyten absorberar ljus av en viss våglängd kan ge falskt för högt resultat om ljuset absorberas eller sprids av lipoproteinerna, en interferens som kallas lipemi (Kroll, 2004). Hur mycket en mätning påverkas beror på vilken våglängd som används då lipoproteiner absorberar våglängder i intervallet 300 nm – 700 nm med högre absorbans ju kortare våglängden är (Nikolac, 2013).

Bakgrunden till lipemi kan vara nyligt intag av fettrik mat som höjer lipoproteinkoncentrationen i blodet under 5-6 timmar (Griffin 2013). Vissa sjukdomar kan också öka risken för lipemi, exempelvis diabetes mellitus, alkoholism, lever- och njursjukdomar, HIV-infektion och vissa mediciner (Kroll 2004; Mainali, Davis & Krasowski, 2017).

## **1.5. Syfte**

- Jämföra den fotometriska HGB-metoden och den optiska HGB-O för Hb-mätning på Sysmex XN-10.
- Undersöka hur mycket lipemi påverkar Hb-mätningarna på båda kanaler på Sysmex XN-10 och HemoCue Hb 201+ och avgöra om någon av metoderna påverkas mindre än de andra.
- Undersöka om Hb-mätningar av plasma avskild från lipemiska prover motsvarar eventuell höjning av Hb-värdet i helblod.

## 2. Material och metod

Studien utfördes på laboratoriet för klinisk kemi på Skånes universitetssjukhus i Lund.

### 2.1. Urval för jämförelse av HGB och HGB-O Hb-mätning på Sysmex XN-10

För jämförelsen mellan den fotometriska-kanalen (HGB) med den optiska kanalen (HGB-O) hämtades data från tidigare analyser utförda av laboratoriets personal under november månad 2018 från instrumentets mjukvara. I båda Sysmex XN-10 kanalerna hade 392 prover analyserats och dessa användes för att jämföra överensstämmelsen.

### 2.2. Provmaterial och beredning av lipemiska prover

Lipemipåverkan på Hb-koncentrationsbestämning av helblod i EDTA med Sysmex XN-10 (Sysmex, Japan) både med HGB och med HGB-O samt fotometriskt med HemoCue Hb 201+ (HemoCue, Sverige) testades genom att jämföra prover utan och med tillsats av Intralipid (Fresenius Kabi, Sverige). Intralipid är en näringslösning som innehåller sojaoolja, äggfosfolipider, glycerol, natriumhydroxid samt vatten. Totalt analyserades 32 prover. Ett protokoll för studien utformades efter inledande försök med färdiganalyserade patientprover och med donerat blod från två frivilliga personer. Ett lipemi-index på 500, analyserat spektrofotometriskt vid 660 nm och 700 nm på Cobas c701 (Roche, Schweiz), bestämdes som målvärde eftersom detta anses högt både i litteraturen och av erfarenhet på det lokala laboratoriet. Koncentrationen av Intralipid som gav ett lipemi-index på ca 500 beräknades motsvara 2,9 mg/ml.

Färdiganalyserade patientprover från föregående dag som var näst i tur att kasseras användes till försöken. Urvalet (n=32) baserades i första hand på rörens fyllnadsgrad för att få tillräcklig mängd prov att arbeta med och i andra hand på plasmans klarhet för att undvika redan lipemiska prover. Därefter kontrollerades provets tidigare uppmätta HGB-värde för att få en spridning av prover, från lågt Hb <100 g/l till högt Hb >160 g/l och värden däremellan. Ingen hänsyn togs till patientens ålder, kön, sjukdomsbild eller andra parametrar.

Från varje ursprungsrör pipetterades 1480 µl helblod till ett rör med 21 µl Intralipid. För att skapa ett nollprov med samma spädning av Hb pipetterades ytterligare 1480 µl

helblod till ett andra rör med 21 µl 0,9 % NaCl-lösning. De nya rören fick nya märkningar som inte var kopplade till ursprungsrören som därefter slängdes i riskavfall.

Efter noggrann blandning analyserades HGB via complete blood count och HGB-O via retikulocytkanalen på Sysmex XN-10 i manuellt läge. Proverna hälldes därefter över till false bottom-rör som krävdes för senare centrifugering och underlättade pipettering. Hb-mätning på HemoCue Hb 201+ gjordes genom att pipettera 20 µl helblod som en droppe på en hydrofob plastfilm. Från droppen fylldes en mätkuvett (HemoCue Kuvett Glucose 201) som rymmer ca 10 µl. Kuvetten placerades i instrumentet som efter fotometrisk mätning av absorbansen gav ett värde på Hb-koncentrationen.

### **2.3. Jämförelse av Hb i helblod och plasma**

Ett centrifugeringsprogram inför mätning av plasma-Hb valdes enligt tester utförda av Zeng et al., (2013) som konstaterade att 550 x g i 3 minuter var optimalt för att separera plasma från blodceller med minsta möjliga påverkan på kylomikronerna. Det blev då ett tunnare lipidlager ovanpå plasman som var lättare att få med vid plasmaseparationen jämfört med det för laboratoriets standardprogram för centrifugering. Efter centrifugering avskildes plasman med transferpipett till nya rör för att genomgå samma analyser som helblodet på Sysmex XN-10 båda kanaler och HemoCue Hb 201+.

### **2.4. Kvalitetssäkring**

Interna kontroller analyseras två gånger per dygn på XN-10 som har en detektionsgräns för Hb mellan 0 – 260 g/L. På HemoCue Hb 201+ analyseras interna kontroller en gång per vecka samt innan patientprover analyseras. Detektionsgränser för HemoCue Hb 201+ är 0,7 – 256 g/L.

### **2.5. Statistiska metoder**

Jämförelse av HGB och HGB-O med framtagna data från tidigare analyser jämfördes med Spearmans rangkorrelationskoefficient och ett Bland-Altman diagram.

Eftersom proverna inte valdes ut helt slumpmässigt och data inte var normalfördelad användes icke-parametriska jämförelser. Wilcoxons teckenrangtest användes för att avgöra om det förekom signifikanta skillnader mellan nollprover och lipemiska prover för vardera instrumentet. Kruskal-Wallis test gjordes på differenserna av de lipemiska

proverna och nollproverna för att visa signifikant skillnad mellan de tre metoderna. Vid signifikans med Kruskal-Wallis test utfördes Dunn's test för parvis jämförelse, för att identifiera vilka metoder som skiljde sig åt.

Wilcoxon's teckenrangtest användes också för att jämföra Hb-höjningen i helblod med Hb-värdet i plasma.

Signifikansnivån sattes till  $p < 0,05$  och statistiska tester utfördes i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (IBM, USA). Diagram för att visa linjärt samband och Bland-Altmandiagrammen gjordes i Excel (Microsoft, USA).

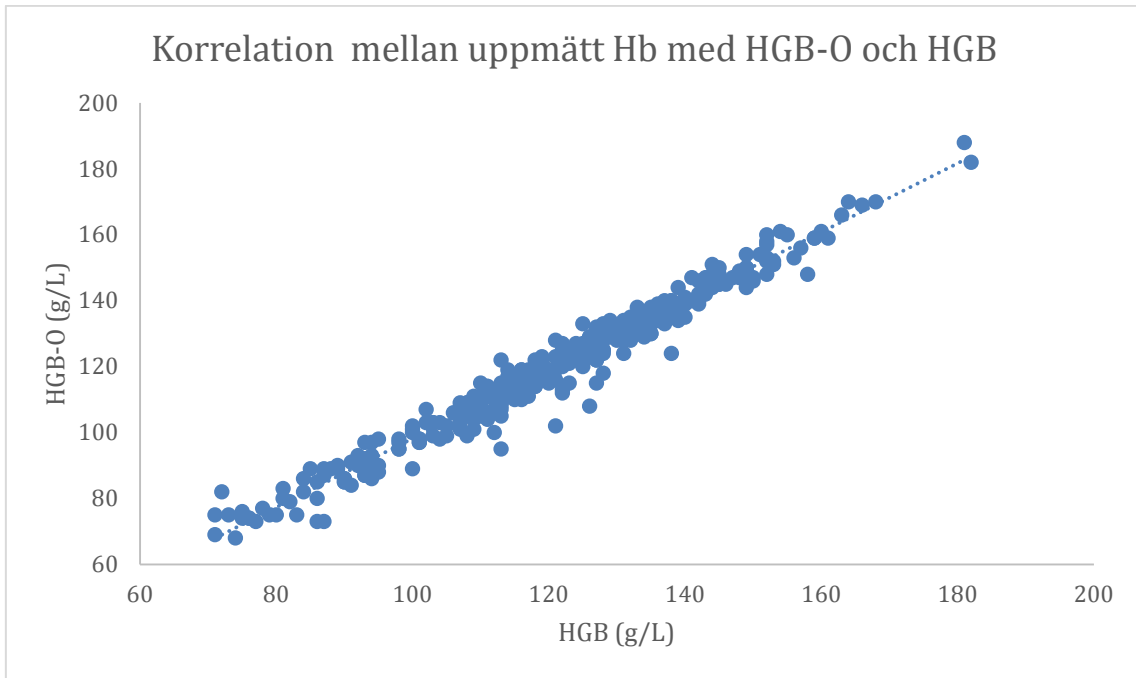
## **2.6. Etiska aspekter**

Eftersom studien utfördes på oidentifierade prover krävdes inget etiskt tillstånd.

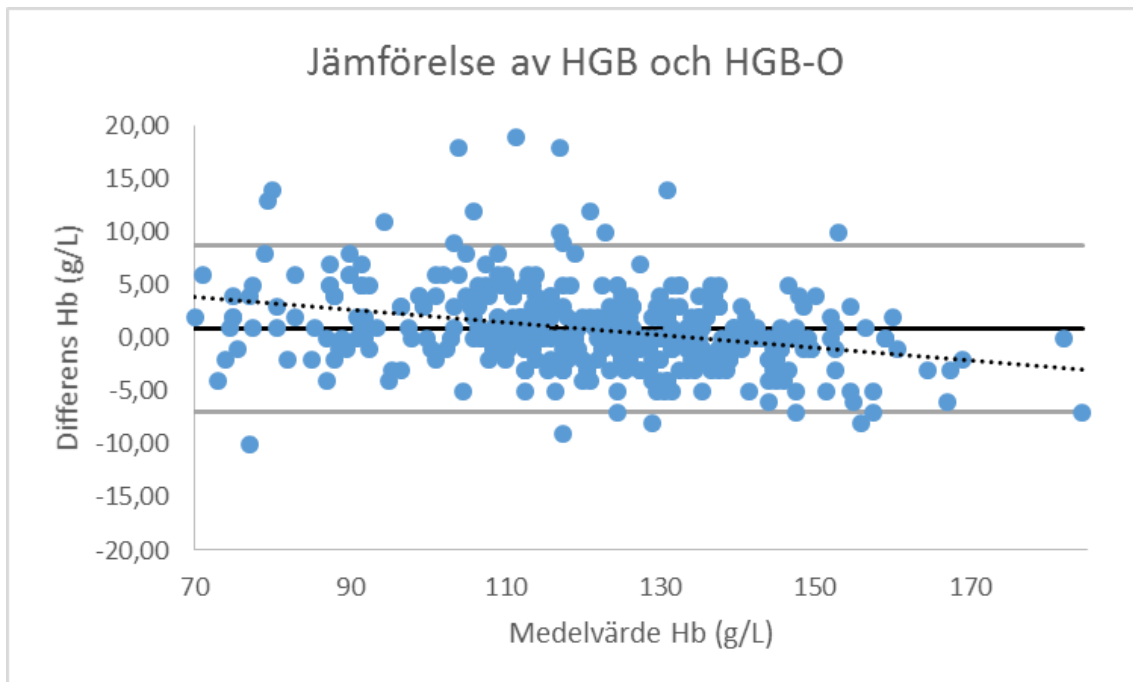
# **3. Resultat**

## **3.1. Jämförelse av HGB och HGB-O Hb-mätning på Sysmex XN-10**

I Figur 2 syns ett linjärt samband mellan HGB och HGB-O mätningarna från de 392 proverna. Korrelationen undersökt med Spearmans rangkorrelationskoefficient visade god korrelation ( $r^2 = 0,982$ ) inom mätintervallet 70-190 g/L. Tabell 1 i Bilaga 1 visar att medianen av differenserna mellan de jämförda värdena är 0 med en variationsvidd på 29 g/L. Figur 3 visar ett Bland-Altmandiagram över differenserna HGB - HGB-O av uppmätta Hb-värden mot medelvärdet för varje prov.



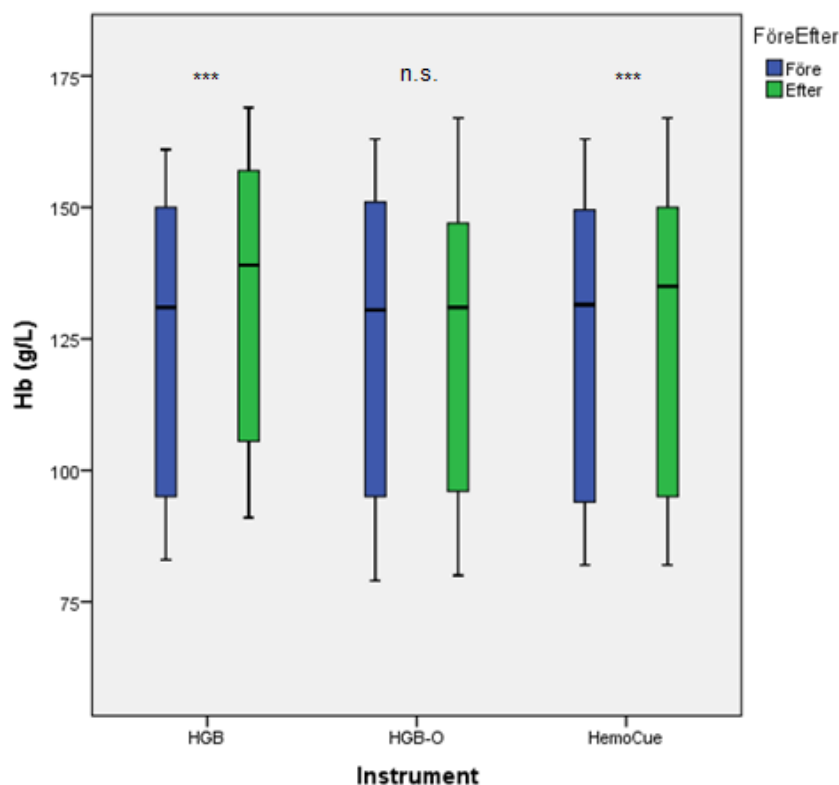
Figur 2. Korrelationsanalys av 392 Hb-värden uppmätta med HGB-O och HGB.



Figur 3. Bland-Altman diagram över differenserna av Hb uppmätta med HGB - HGB-O mot medelvärdet för varje mätning. Den starka linjen i mitten är medelvärdet för alla mätningarna och de svagare yttre linjerna är gränserna för två standardavvikelser.

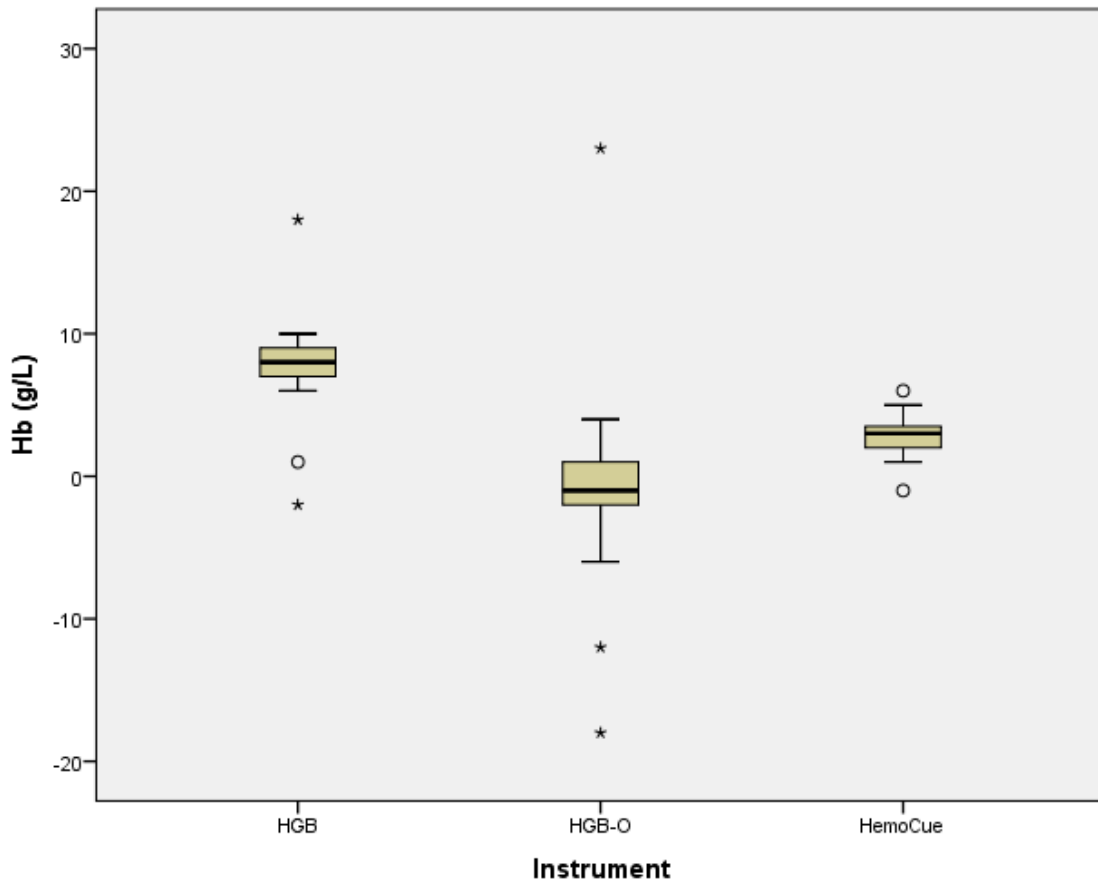
### 3.2. Jämförelser av mätningar på helblod med lipemi

Totalt analyserades 32 provers Hb-värden, som redovisas i Tabell 1, Bilaga 2, vilkas spridning åskådliggörs i Figur 4. Signifikant skillnad mellan mätvärdena från de lipemiska proverna jämfört med nollproverna fanns för HGB ( $p < 0,001$ ) och HemoCue ( $p < 0,001$ ) men inte för HGB-O ( $p = 0,11$ ) enligt Wilcoxons teckenrangtest.



Figur 4. Boxplot visar mätvärden före och efter tillsats av Intralipid för respektive metod \*\*\* indikerar  $p < 0,001$  och n.s. icke signifikant.

För att kunna jämföra metoderna sinsemellan beräknades differensen mellan varje lipemiskt prov och dess motsvarande nollprov. I Tabell 2, Bilaga 1, kan värdena från Figur 4 utläsas. HGB visar högst medianvärde och alltså störst positiv förskjutning av Hb-mätningarna vid lipemi. Medianen är lägst för HGB-O, medan variationsvidden samtidigt är störst inom samma grupp. HemoCue-gruppens median ligger mellan de båda andra och har minst variationsvidd. I Figur 5 åskådliggörs differensernas spridning med outliers och extremvärden utmärkta.



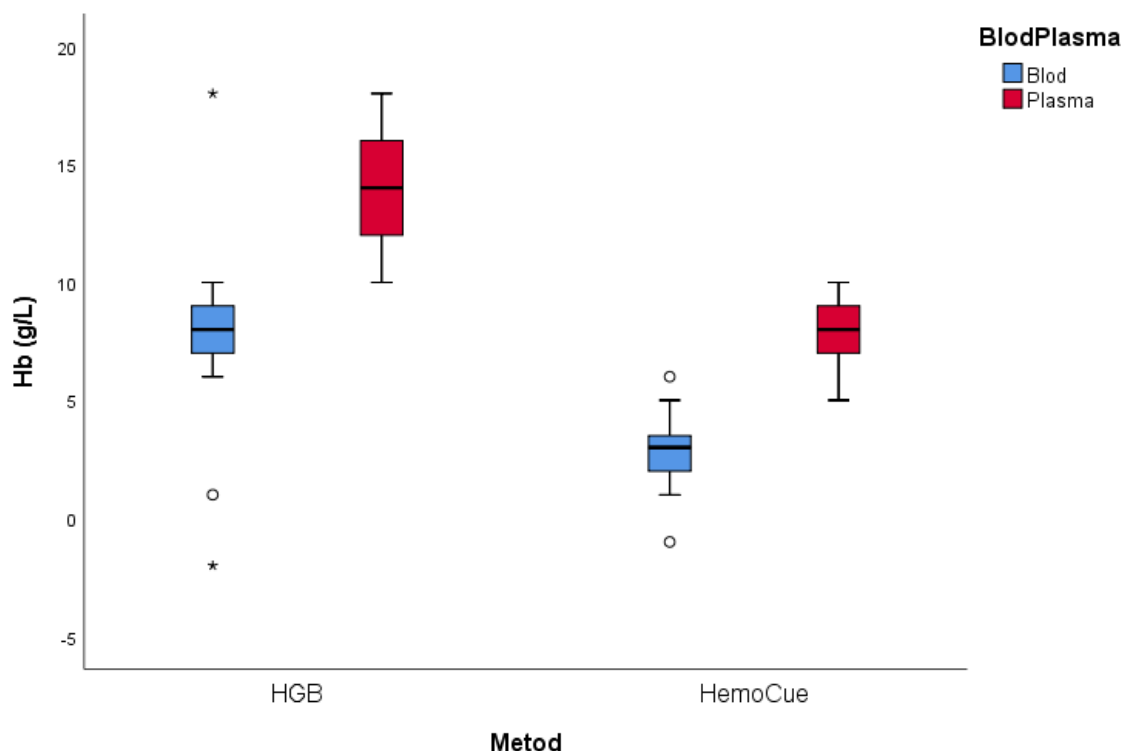
Figur 5. Boxplot över spridningen av differenserna mellan lipemiskt- och nollprov för respektive metod.

Kruskal-Wallis test visade signifikant skillnad ( $p < 0,001$ ) mellan de tre grupperna varpå Dunn's test visade att signifikant skillnad mellan varje testat par HGB – HGB-O ( $p < 0,001$ ), HGB – HemoCue ( $p < 0,001$ ) och HGB-O – HemoCue ( $p = 0,001$ ).

### 3.3. Jämförelse av Hb i helblod och plasma

Samtliga mätvärden redovisas i Tabell 2, Bilaga 2. Den avskilda plasman från de lipemiska proverna innehöll synbar hemolys, medan motsvarande nollprov inte gjorde det. HGB-O som inte mäter fritt hemoglobin gav inga mätvärden från plasma eftersom det saknades hela celler att mäta på. Differenserna av Hb mätt med HGB och HemoCue i de lipemiska proverna (Tabell 3, Bilaga 1) och motsvarande nollprover beräknades både för helblod och plasma (Figur 6). Med Wilcoxon's parade teckenrangtest visades signifikant högre skillnad i plasma än i helblod både vid mätningarna med HGB ( $p < 0,001$ ) och HemoCue ( $p < 0,001$ ).





Figur 6. Boxplot diagram som visar differensen av Hb i lipemiska prover och dess motsvarande nollprov både för helblod och plasma mätta med HGB och HemoCue-metoderna. Differenserna av Hb mätt med HGB och HemoCue i de lipemiska proverna (Tabell 3, Bilaga 1) och motsvarande nollprover beräknades både för helblod och plasma

## 4. Diskussion

Spearman's rangkorrelationskoefficientstest visar god korrelation mellan HGB och HGB-O vilket överensstämmer med en tidigare studie av Berda-Haddad et al., (2016). Differensernas median var 0 och medelvärdet var 0,83 vilket också tyder på att metoderna överensstämmer väl. Däremot är spridningen stor (standardavvikelsen 4,5 gånger högre än medelvärdet) och den var störst vid lägre Hb. I det intervallet var det en tendens till högre värde på HGB-kanalen. Högre resultat för HGB kan eventuellt bero på hemolys som inte mäts i den optiska kanalen eftersom denna kräver intakta celler för mätning (Berda-Haddad et al., 2016).

I denna studie användes Intralipid för att simulera lipemi. Denna skiljer sig från naturlig lipemi eftersom Intralipiden saknar proteiner och främst bildar fettpartiklar i medelstor kylomikronstorlek (Kroll, 2004). Studien missar därmed eventuella variationer som VLDL och mindre lipoproteiner skulle ge. I brist på bättre alternativ är det dock vedertaget att använda fettemulsioner för tester av lipemi-interferens eftersom det inte

är möjligt att frysa lipemiska prover utan att de förstörs (Nikolac et al., 2013). Då testerna i denna studie bygger på fotometriska och optiska mätningar som främst påverkas av turbiditet (Nikolac, 2013) och därmed mindre av vilken sammansättning av lipoproteinklasser det är bör lipemi-simuleringen anses acceptabel.

Differensen mellan lipemiska och nollprover gav med HGB-O-metoden ett medianvärde nära 0, vilket innebär god överensstämmelse, men gav samtidigt stor spridning både över och under 0. Detta skulle kunna förklaras av ett samband mellan lipemi och hemolys (Bashir, Wiltshire, Carddigan & Thomas, 2013; Mainali, Davis & Krasowski, 2017) som kan bero på att cellmembranens lipidsammansättning förändras vid hög koncentration av lipider (Dimeski & Jones, 2011). Eftersom HGB-O mäter intracellulärt Hb och eventuellt missar fritt Hb som läckt ut från celler som spruckit (Berda-Haddad et al. 2016), skulle höjningen av uppmätt Hb kunna vägas upp av en sänkning till följd av hemolys. Vid mätning med HGB- och HemoCue-metoderna hemolyseras erythrocyterna innan Hb genomgår kemisk omvandling och borde därför inte påverkas av redan förekommande hemolys i provet.

För lipidsimuleringen användes prover som hade stått i uppmot ett dygn i rumstemperatur, vilket inte påverkar Hb-värdet, men cellvolymen ökar till följd av att erythrocyterna sväller (de Baca, Gulati, Kocher & Schwarting, 2006). Om cellvolymen ökar bör rimligen koncentrationer av analyter i cellen minska, däribland Hb. Eftersom mätningen av Hb sker på hela celler med HGB-O bör det utredas om hållbarheten för Hb är kortare i denna kanal än för HGB.

De fotometriska HGB- och HemoCue-metodernas positiva förskjutning som sågs då differenserna mellan lipemiska och nollprover jämfördes motsvarar förväntningarna på att man erhåller ett falskt förhöjt värde när lipid-partiklarna sprider ljuset. HGB-analyserna gav störst förskjutning och större spridning än HemoCue. Dessa instrument mäter vid olika våglängder, 555 nm respektive 570 nm som i sig kan orsaka skillnad. Dock är den största skillnaden mellan metoderna att HemoCue mäter vid en andra våglängd för att kompensera för turbiditet från lipemi. HGB mäter en blank bestående av lösningsmedel och kompenserar därmed inte direkt för turbiditet. Enligt Sysmex-tillverkaren ska deras SLS-reagens minimera interferens av lipemi (Sysmex, u.å.) men denna studie indikerar att det inte lyckas fullt ut vid högt lipemiskt index.

Att differensen i Hb-värde mellan nollprov och lipemiskt prov skulle motsvaras av Hb-värdet i plasma för motsvarande prov visade sig inte stämma. Mycket av plasma-Hb mätt med HGB och HemoCue utgjordes troligen av fritt Hb efter hemolys. Som nämntes i ett tidigare stycke finns ett samband mellan lipemi och hemolys och det går inte här att avgöra hur stor andel av resultatet som utgörs av hemolys eller av lipider.

Studien skulle kunna utvecklas med undersökning av hemolyspåverkan på Hb-mätning med den optiska kanalen på XN-10. Försök liknande de som genomförts med lipemi skulle kunna utföras med hemolytiska prover, eventuellt med en gradient av prover med stigande hemolys. Lipemistudien skulle också kunna förbättras med en serie av prover med stigande lipemi. Svårigheten med detta ligger i att det krävs relativt stora provvolymerna för att göra en spädningsserie. Tillräckligt många frivilliga som donerar blod till studien eller blodpåsar från bloddonatorer skulle kunna vara möjliga lösningar. Autentiska lipemiska patientprover hade varit ett bra alternativ som även hade gett variation av olika lipoproteinstorlekar. Tyvärr visade sig starkt lipemiska patientprover vara ovanliga under de två månader som denna studie pågick och nedfrysning är som tidigare nämnts olämpligt.

## Slutsats

Jämförelsen mellan HGB och HGB-O för Hb-mätning på Sysmex XN-10 visade god korrelation men stor spridning kring medelvärdet. Spridningen tyder på att metoderna påverkas olika mycket av lipemi och/eller hemolys vilket bör utredas vidare.

HGB-metoden mätte ett falskt förhöjt Hb-värde vid hög lipemi och skillnaden gick inte att mäta i avskild plasma. Även HemoCue mätte ett falskt förhöjt värde men lägre jämfört med HGB-kanalen på Sysmex- XN-10 vilket talar för att HemoCue Hb 201+ är ett bra komplement vid hög turbiditet. HGB-O var däremot inte bättre än HGB eller HemoCue Hb 201+ för Hb-mätning vid lipemi enligt resultaten i denna studie.

## Tackord

Stort tack till Christina Jönsson och Lisa Walther för all handledning och stöd under arbetet. Tack till övrig personal på Klinisk kemi Skånes universitetssjukhus i Lund för hjälp och utlåning av material. Tack till Bodil Hernroth för tålmodig skrivhandledning.

## Referenser

Arneth, B. M. & Menschikowski, M. (2015). Technology and New Fluorescence Flow Cytometry Parameters in Hematological Analyzers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 29, ss. 175-183. DOI: 10.1002/jcla.21747

Bashir, S., Wiltshire, M., Carddigan, R. & Thomas, S. (2013). Lipaemic plasma induces haemolysis in resuspended red cell concentrate. *Vox Sanguinis*, 104, ss. 218 – 224. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2012.01660.x

Berda-Haddad, Y., Faure, C., Boubaya, M., Arpin, M., Cointe, S., Frankel, D., Lacroix, R. & Dignat-Geroge, F. (2016). Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition. *International Journal of Laboratory Hematology*, 39, ss. 32 - 41. DOI: 10.1111/ijlh.12565

de Baca, M. E., Gulati, G., Kocher, W. & Schwarting, R. (2006). Effects of Storage of Blood at Room Temperature on Hematologic Parameters Measured on Sysmex XN-2100. *Labmedicine*, 37(1), ss. 28 - 36. DOI: 10.1309/1EERK1M02QFJRX6P

Dimeski, G. & Jones, B. W. (2011). Lipaemic samples: Effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. *Biochemica Medica*, 21(1), ss. 86-94. DOI: 10.11613/BM.2011.016

Gahrton, G. & Juliusson, G. (2012). *Blodets sjukdomar*. 1. uppl., Lund: Studentlitteratur.

Griffin, A. B. (2013). Lipid metabolism. *Surgery*, 31(6), ss. 267-272. DOI: 10.1016/j.mpsur.2013.04.006

Hudson-Thomas, M., Bingham, K. C. & Simmons W. K. (1994). An evaluation of the HemoCue for measuring haemoglobin in field studies in Jamaica. *World Health Organization*, 72(3), ss. 423 – 426. ISSN: 0042-9686

Hiscock, R., Kumar, D. & Simmons, S. W. (2015). Systematic review and meta-analysis of method comparison studies of Masimo pulse co-oximeters (Radical-7 or Pronto-7) and HemoCue absorption spectrometers (B-Hb or 201+) with laboratory haemoglobin estimation. *Anaesthesia and Intensive Care*, 43(3), ss. 342 – 350. ISSN: 0310-057X

Kroll, M. H. (2004). Evaluating interference caused by lipemia. *Clinical chemistry*, 50(11), ss. 1968-1969. DOI:10.1373/clinchem.2004.038075

Levy, S. & Schapkaitz, E. (2018). The clinical utility of new reticulocyte and erythrocyte parameters on the Sysmex XN 9000 for iron deficiency in pregnant patients. *International Journal of Laboratory Hematology*, 40, ss. 683-690. DOI: 10.1111/ijlh.12904

- Mainali, S., Davis, S. R. & Krasowski, M. D. (2017). Frequency and causes of lipemia interference of clinical chemistry laboratory tests. *Practical Laboratory Medicine*, 8, ss. 1-9. DOI: 10.1016/j.plabm.2017.02.001
- Matsushita, H., Tanaka, Y., Sakairi, K. & Tanaka Y. (2011). XN-Series Clinical Case Report. Vol. 1.
- Maconi, M., Cavalca, L., Danise, P., Cardarelli, F. & Brini, M. (2009). Erythrocyte and reticulocyte indices in iron deficiency in chronic kidney disease: comparison of two methods. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 69(3), ss. 365-370. Doi: 10.1080/00365510802657673
- Nikolac, N. (2013). Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochemia Medica*, 24(1), ss. 57-67. DOI: 10.11613/BM.2014.008
- Nikolac, N., Simundic, A-M., Miksa, M., Lima-Oliveira, G., Salvagno, G. L., Caruso, B. & Guidi, G. C. (2013). Heterogeneity of manufacturers' declarations for lipemia interference – An urgent call for standardization. *Clinica Chimica Acta*, 426, ss. 33 – 40. DOI: 10.1016/j.cca.2013.08.015
- Nilsson-Ehle, P. (red.) (2003). *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. 8. uppl., Lund: Studentlitteratur.
- Osta, V., Caldirola, M. S., Fernandez, M., Marcone, M. I., Tissera, G., Pennesi, S. & Ayuso, C. (2013). Utility of new mature erythrocyte and reticulocyte indices in screening for iron-deficiency anemia in a pediatric population. *Internation Journal of Laboratory Hematology*, 35, ss. 400-405. DOI: 10.1111/ijlh.12030
- Sysmex. (u.å.). *RET/PLT-O Channel*. [www.sysmex.se](http://www.sysmex.se). [2018-12-06].
- Sysmex. (u.å.). *SLS detection method*. [www.sysmex.se](http://www.sysmex.se). [2018-12-017].
- Zeng, S-G., Zeng, T-T., Jiang, H., Wang, L-L., Tang, S-Q., Sun, Y-M., Ying, B-W. & Jia, Y-Q. (2013). A Simple, Fast Correction Method of Triglyceride Interference in Blood Hb Automated Measurement. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27, ss. 341-345. DOI: 10.1002/jcla.21568

## Bilaga 1

Tabell 1. Beskrivande statistik över differenserna mellan uppmätta HGB och HGB-O värden från 392 prover.

	HGB - HGB-O (g/L)
Median	0
Medelvärde	0,86
Standardavvikelse	3,9
Variationsvidd	29
Minimum	-10
Maximum	19

Tabell 2. Beskrivande statistik över differenserna mellan lipemiska prover och motsvarande nollprover för varje metod.

	HGB	HGB-O	Hemocue
Median	8,00	-1,00	3,00
Medel	7,81	-0,938	2,72
Standardavvikelse	3,02	6,15	1,44
Variationsvidd	20,0	41,0	7,00
Minimum	-2,00	-18,0	-1,00
Maximum	18,0	23,0	6,00

Tabell 3. Beskrivande statistik över differenserna mellan lipemisk plasma och nollplasma.

	HGB (g/L)	HemoCue (g/L)
Median	14	8
Medel	14	8
Standardavvikelse	2	1
Variationsvidd	8	5
Minimum	10	5
Maximum	18	10

## Bilaga 2

Rådata från helblodproverna och deras respektive nollprover presenteras i Tabell 3.

Motsvarande data för provernas plasma-Hb presenteras i Tabell 4.

*Tabell 4. Mätvärden från nollprover och motsvarande prover spikade med Intralipid.*

Provnummer	Lipemiskt HGB (g/L)	Nollprov HGB (g/L)	Lipemiskt HGB-O (g/L)	Nollprov HGB-O (g/L)	Lipemiskt HemoCue (g/L)	Nollprov HemoCue (g/L)
181128HA	163	154	155	154	156	154
181128HB	169	161	167	163	167	163
181128HC	159	152	150	151	156	153
181129HC	166	157	158	157	161	158
181129HB	159	151	148	150	154	150
181129HA	164	156	158	159	160	155
181130HE	165	156	161	160	158	157
181130HD	155	149	146	152	150	149
181130HC	155	147	146	146	149	147
181130HB	165	156	154	160	162	157
181127MB	142	144	136	148	136	134
181127MA	140	139	130	148	127	125
181127HB	149	143	146	151	146	143
181127HA	155	146	146	150	148	147
181128MA	142	132	131	133	136	133
181128MB	127	119	116	117	122	120
181128MC	134	127	123	123	129	127
181129MC	137	129	131	129	136	137
181129MB	139	132	131	131	136	131
181129MA	136	127	128	126	133	130
181130MA	138	130	134	130	135	132
181127LB	110	92	118	95	91	88
181127LA	101	95	108	112	88	87
181128LA	102	95	96	96	102	96
181128LB	95	86	88	90	94	91
181128LC	96	87	84	86	92	90
181129LC	91	83	80	79	86	82
181129LB	106	98	96	94	101	97
181129LA	100	93	88	90	95	93
181130LC	105	95	93	95	97	95
181130LB	92	83	82	82	88	85
181130LA	90	83	82	83	88	86

Tabell 5. Mätvärden från lipemisk plasma med respektive nollprover utan tillsat Intralipid.

Provnumm er	Nollprov		Lipemiskt	Nollprov
	Lipemiskt HGB (g/L)	HGB (g/L)	HemoCue (g/L)	HemoCue (g/L)
181128HA	16	0	9	0
181128HB	17	0	10	0
181128HC	15	0	8	0
181129HC	17	0	9	0
181129HB	17	0	10	0
181129HA	18	0	10	0
181130HE	17	1	9	0
181130HD	11	0	5	0
181130HC	15	0	8	0
181130HB	17	0	10	0
181127MB	15	0	9	0
181127MA	18	0	8	0
181127HB	15	0	9	0
181127HA	17	0	10	0
181128MA	15	0	9	0
181128MB	14	0	8	0
181128MC	14	0	7	0
181129MC	13	0	7	0
181129MB	14	0	7	0
181129MA	14	0	8	0
181130MA	15	0	9	0
181127LB	13	0	7	0
181127LA	12	0	7	0
181128LA	12	0	7	0
181128LB	11	0	6	0
181128LC	10	0	6	0
181129LC	10	0	5	0
181129LB	12	0	7	0
181129LA	12	0	6	0
181130LC	11	0	6	0
181130LB	12	0	7	0
181130LA	11	0	7	0