NTNU

FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- og naturvitenskapelige universitet

Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Holdbarhetsstudie av celler (leukocytter) i bronkialskyllevæske (BAL)

Stability study av cells (leucocytes) in bronchoalveolar lavage (BAL)

Av / by

Ivan Munyemera

Sema Amer

Trondheim, 2019

Forord

Denne oppgaven ble gitt av Laboratoriet i Gastrosenteret, Seksjon prøvetaking og pasientnær analyse, Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital i forbindelse med bacheloroppgave 3. studieår ved program for bioingeniørfag, avdeling for teknologi, NTNU. Oppgaven var meget relevant og har byd på faglige utfordringer men den har også vekket vår nysgjerrighet for forskningstema.

En ekstra varm takk går til vår fagveileder Jorunn Aabjørnsrød. Jorunn sørget for at vi fikk fantastisk god opplæring i alle analysemetodene og passet på at vi skjønte både prinsipper og praktisk utførelse av metodene. Hun sørget for at arbeidet på laboratoriet var trygt, stressfritt og behagelig for alle de involverte partene. Vi takker deg for det «lille-ekstra» du ga til oss!

Takk til andre ansatte og seksjonsleder Per Hepsø ved Seksjon prøvetaking og pasientnær analyse for et varmt og vennlig arbeidsmiljø. Det takkes også ansatte på bronkoskopistua på Lungeavdelingen som sørget for at vi fikk prøvemateriale

Vi retter en stor takk til Marthe Aune, seksjonsleder Seksjon for hematologi, Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital og Ingrid Alsos Lian (medisinsk veileder) for uvurderlig hjelp til databehandling, statistiske beregninger og bearbeidelse av resultater. Vi takker Marthe for hennes "open door policy" der vi når som helst kunne komme for veiledning.

Sist, men ikke minst sendes en takk til vår prosessveileder Asle Andreas Grislingås for god veiledning i rapportskriving og samkjøring av hele prosjektet.

Trondheim, 19.05.2019

Sema Amer

Ivan Munyemera

Sammendrag

Bronkialskyllevæske også kjent som “bronchoalveolar lavage”/BAL) har hatt økende aksept som prøvemateriale når det gjelder diagnostisering og overvåking av diverse lungesykdommer særlig interstitielle lungesykdommer (ILD). Mye av dette skyldes det at BAL er lett å gjennomføre, trygg og godt-tolerert av pasientene. Riktig identifisering og telling av inflammatoriske cellene (leukocytter) i BAL prøver gir BAL sin diagnostiskverdi. Dette strengt foruretsetter opprettholdelse av god stabilitet/levedyktighet av disse cellene under bestemte oppbevaringsvilkår etter prøvetaking. Det fysiologiske saltvannet som brukes til å skylle distale luftveiene og alveolene har lav pH og er fattig på næringsstoff som proteiner og lipider. Dette betyr at celler holder seg dårligere i BAL sammenlignet med naturlig kroppsvæsker under bestemte oppbevarings forhold, siden cellemembranene lettere går i oppløsning ved.lav konsentrajon av lipider og proteiner.

I fagmiljøet er det begrenset kunnskap om holdbarheten til celler i BAL prøver oppbevart i rom- og/eller kjøleskaps temperatur. Dette gjør det vanskelig å standardisere prosedyre for behandling av BAL prøver. Til tross for dette er det overraskende få studier på hvordan holdbarheten av BAL cellene endrer seg på en temperatur- og tidsavhengig måte. Dette forskningsprosjektet har som hovedmål å kartlegge holdbarhet til celler fra BAL, ved å utføre celletelling i BAL prøver oppbevart både i rom- og kjøleskaps-temperatur ved hhv. 1, 2, 4 og 24 timer etter prøvetaking. Det var også ønskelig å finne ut om fargekvaliteten var like god uavhengig av henstandstid og oppbevarings temperatur. For å få til dette ble det utført total celletelling av leukocytter på ADVIA 2120i og differensial celletelling av leukocytter farget med May Grunwald Giemsa (MMG) og mastfarging ved hjelp av cytosentrifugeringsmetode og mikroskopi.

Analyseresultatene fra automatisert telling av totalt antall leukocytter (WBCP og WBCB) tyder på at Leukocytter var stabile opptil 4 timers henstand både i romtempererte og kjøleskap-prøver. Observasjoner fra mikroskopi viste uttalte desintegrajon av cellene i prøver oppbevart i romtemperatur, en utvikling som virket til å ha blitt dempet ved nedkjøling av prøver i kjøleskaps temperatur. Etter 24 timers henstand i romtemperatur ble det observert dårlig fargekvalitet på cellene i for av fargeflekker og variasjon i fargeintensitet (hyper- og hypokromasi). Basert på kvalitetskravene virket makrofager til å klare seg fint opptil 24 timers henstand mens lymfocytter så ut til å være stabile opptil 2 timer. Det ble ikke trukket noen empiriske konklusjoner på grunn av ikke-tilstrekkelig populasjonsstørrelse. I tillegg bestod populasjonen av en overvekt av prøver med lave celle-konsentrasjoner der telle-usikkerheten er stor. Fremtidige holdbarhetsstudier anbefales til å ha populasjonsstørrelse på opptil 40 prøver, hvor en bør inkludere prøver med relativt høyere måleverdier (ca. $0,2 * 10^9$/L) og flere henstandstider særlig mellom 4 og 24 timer.

Abstract

The use of bronchoalveolar lavage (BAL) as sample material for diagnostic and monitoring of several lung diseases has been on steady in the past few decades. This has mainly been attributed to the fact that BAL is easy to perform, safe and well tolerated by patients. The diagnostic value of BAL is dependent on proper identification and counting of leucocytes in BAL samples which is consequently totally dependent on maintenance of cellular stability/viability under given storage conditions. In comparison with natural body fluids like blood plasma, the physiological saline water in which leucocytes are suspended is unfit as storage medium for cells. This is because of it has lower pH and low content of nourishment (protein, lipids and electrolytes). Cells in BAL samples are therefore thought to have limited stability/viability.

Generally, there is limited information about the stability of cells in BAL samples stored at room and fridge temperature. This has made the standardization of pre-analytical steps for sample treatment of BAL quite challenging. Despite this scarcity of knowledge, there are surprisingly few clinical stability studies of how cells in BAL samples are affected by storage temperature and standing time. The main objective of this stability study is to investigate the stability of cells in BAL samples after 1, 2, 4 and 24 hours` storage at both room and fridge temperature. Additionally, the quality of May Grunwald Giemsa (MMG) and mast cell-staining would also be evaluated. This was achieved by performance of a total cell-count of leucocytes with ADVIA2120i and a differential cell-count of MGG- and mast stained cells via cyto-sentrifugation and microscopy.

The results from automated total cell count (WBCP and WBCB) suggest that leucocytes were stable in a period approaching 4 hours under storage at both rom and fridge temperature. Observation of moderately to severely deformed cells in BAL samples stored at room temperature for 24 hours suggested poor sample quality at these specific storage conditions. However, the degree of cellular deformation was less in samples stored at fridge temperature compared to samples stored in room temperature, which suggested that cooling down BAL samples could probably have a positive effect on cell stability. The quality of MGG and mast cell staining seemed to be compromised in samples stored at room temperature for prolonged periods of time (24 hours). This was based on the increased observation of color stains and variation in color intensity (hyper and hypo-chromicity) in samples stored at room temperature for 24 hours. Based on quality criteria, macrophages seemed stable up to 24 hours storage, while lymphocytes seemed to be stable only up to 2 hours. No empirical conclusions were drawn in this study about the stability of cells in BAL samples. This was mainly due to a small sample size and the presence of large number of samples with low cell count which consequently led to low precision in measurements (data). Future studies would be recommended to have sample size of up to 40 samples and more time-intervals between sampling and analysis especially between 4 and 24 hours.

Innholdsfortegnelse

Abstract III
1.0 Innledning 1
1.2 Cellemembran stabilitet og celle levedyktighet 2
1.2.1 Non-lamellar transformasjoner 3
1.3 Luftveiene 4
1.4 Mastceller 5
1.5 Lungesykdommer 6
1.5.1 Interstitielle lungesykdommer 6
1.6 Bronkoskopi 7
1.7 BAL (broncho-alveolar lavage) 8
1.7.1 BAL prøvebehandling 8
1.8 BAL celletelling 9
1.8.1 Automatisert celletelling 9
1.8.2 Manuell differensial celletelling 11
1.9 Problemstilling 14
2.0 Materiale og metode 15
2.1 Prøvemateriale og håndtering 15
2.2 Telling av totalt antall leukocytter på ADVIA 2120i 15
2.2.1 Kontroller 15
Prosesskontroll 16
2.3 Differensial- og mastcelletelling (Cytosentrifugering metode) 16
2.3.1 Tillaging av cytospinpreparat 16
2.4 Farging av celler i BAL (cytospin preparater) 17
2.4.1 MGG farging (fargekar metode) 17
2.4.2 Mastfarging (fargestav metode) 17
2.5 Mikroskopering 17
2.6 Databehandling 18
2.6.1 Repeterbarhet 18
2.6.2 Korrelasjon og regresjon 18
2.6.3 Holdbarhetstest 19
2.7 Beregningsformler 20
3.0 Resultater 21
3.1 Holdbarhet 21
3.1.1Holdbarhet på totalt antall leukocytter i BAL prøver oppbevart i romtemperatur. 21
3.1.2 Holdbarhet på totalt antall leukocytter i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur 24
3.1.3 Holdbarhet på Makrofager i BAL prøver oppbevart i romtemperatur 28
3.1.3 Holdbarhet på Lymfocytter i BAL prøver oppbevart i romtemperatur 29

3.1.4 Holdbarhet på Mastcelle i BAL prøver oppbevart i romtemperatur 31
3.1.5 Holdbarhet på Makrofager i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur 32
3.1.6 Holdbarhet på Lymfocytter i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur 34
3.1.7 Holdbarhet på Mastcelle i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur 35
4.0 Diskusjon 37
5.0 Konklusjon 44
6.0 Kildeliste 45
7.0 Vedlegg 47

1.0 Innledning

1.1 Holdbarhetsstudier; generelle kriterier og vurdering

Ifølge Arne Åsberg (overlege medisinsk biokjemi ved St. Olavs Hospital) kan holdbarhet defineres som «prøvematerialets evne til å beholde opprinnelig måleverdi innenfor definerte grenser når det lagres under definerte forhold i et definert tidsrom» (Kristin M et al., 2014). Flere fysiske og kjemiske faktorer kan påvirke prøvematerialets stabilitet. Disse kan blant annet inkludere; oppbevaringstemperatur, oppbevaringstid, transport, sentrifugering pH, lys med mer (Astrid Mette 2018). Hoved hensikten med holdbarhetsstudier er å finne ut om prøvematerialet (analytten) endrer seg så lite under spesifikke forhold slik dets antatte kliniske nytteverdi bevares. I kliniske laboratorier benyttes det to metoder for testing av holdbarhet; batch og buksemetode. Holdbarhetsstudier baserer seg på to kriterier, gjennomsnittlig endringer i flere prøver og endringer i enkeltprøve:

1. **Endringer i gjennomsnitt av flere prøver**

Den sanne gjennomsnittlige endringen ved hver oppbevaringstid er ukjent, men denne estimeres ved å måle gjennomsnitt og dets 90 % konfindensintervall. Grensene til dette konfidensintervallet sammenlignes med den maksimale tillate systematiskfeil (%Bias/akseptområde), og kravet for holdbarhet er at disse grensene bør være mindre enn akseptområde med 95% sikkerhet. Akseptområde er det største avvik som det målte gjennomsnittet kan ha uten at målemetoden risikerer å miste sin nytteverdi. Akseptområde kan med andre ord uttrykkes slik; utgangs-gjennomsnitt ± maksimal tillate systematisk feil (%Bias) (Kristin et al. 2014; Solem 2013).

Det er tre mulige utfall etter sammenligning av grensene til gjennomsnittes 90% KI og akseptområde:

- Oppfyllelse av holdbarhetskriteriet: Dette går ut på av hele konfidensintervallet ligger innenfor akseptområde. Dette tilsier en 95% sikkerhet for at den sanne gjennomsnittlige endringen er mindre enn det tillate bias.
- Ikke oppfyllelse av holdbarhetskriteriet: Dette går ut på av hele konfidensintervallet ligger utenfor akseptområde. Dette tilsier en 95% sikkerhet for at den sanne gjennomsnittlige endringen er større enn det tillate bias.
- Tvilstilfelle: Dette går ut på at konfidensgrensene krysser enten kun en eller begge akseptgrensene. Slike tvilstilfelle kan oppklares enten ved å øke antall prøver slik at 90% KI innsnevres eller ved å vurdere kriteriet som angår endringer av enkeltprøve (se kriteriet 2).

2. **Vurdering av endringer i den enkelte prøven**

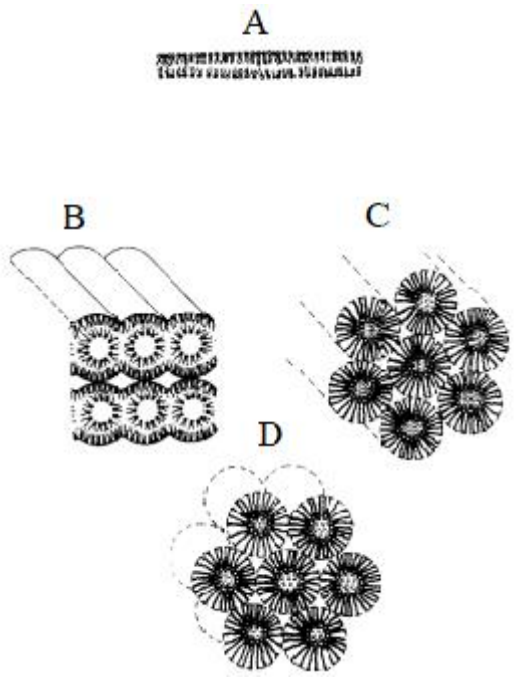
Her vurderes det om måleresultatet til hver enkeltprøve ligger innenfor akseptområde. Akseptområde her kan defineres som utgangs-måleverdien ± tillat totalfeil, der totalfeil er summen av systematisk feil og tilfeldig feil (Gunnar 2013)**.** For at prøvemateriale skal anses som holdbart er det et krav om at ikke mer enn en prøve skal ha måleverdi som er utenfor akseptområde.

Det er vanlig at det kreves at begge kriteriene oppfylles dersom prøvemateriale skal anses til å ha god holdbarhet under bestemte faktorer (Kristin et al. 2014).

1.2 Cellemembran stabilitet og celle levedyktighet

De primære funksjonene for cellemembraner er å avgrense celler fra sine omgivelser ved å fungere som en barriere mot passiv diffusjon av stoffer inn og ut av cellene. På denne måten preserverer cellemembraner cellenes distinktive identitet fra omgivelsene samtidig som de bidrar til å skille subcellulære komponenter fra hverandre(Alberts et al. 2002). Det er konsensus om at biologiske membraner har lipid bilag som deres grunnleggende strukturelle komponent. Tap av integriteten til lipid bilag ville ført til økt diffusjon av stoffer inn og ut av cellene, noe som fremmer celledød. Det kan konkluderes med at stabiliteten av lipid bilaget i cellemembraner spiller en nøkkelrolle i cellenes levedyktighet (Alberts et al. 2002; Yeagle 1989).

Lipid bilag i cellemembraner forekommer i en likevekt mellom to faser; lamellar (bilag) fase og non-lamellar fase. Av disse to fasene er lamellar fasen den normale og optimale fasen for cellemembranenes funksjonalitet. Det er dermed forbundet økt celle levedyktighet men cellemembraner i lamellar fasen. I non-lamellar fase dannes det micelle-strukturer innad lipid bilaget. Disse mi-cellene kan ha ulike fasonger som blant annet tubulær, kubisk og heksagonal II (figur 1). I non-lamellar fase (særlig heksagonal II) er cellemembraner ustabile og dermed blir celle levedyktighet også nedsatt(Quinn 1985).



Figur 1: Illustrasjon av molekylære strukturene til celle membran i lamellar/lipid bilag fase (A) og non-lamellar fase (B-D). Micellene i non-lamellar fase kan ha ulike fasonger som tubulær (B), heksagonal II (C) og kubisk (D)(Quinn 1985).

1.2.1 Non-lamellar transformasjoner

Polymorfisme kan være et aktuelt fenomen for lipid bilag fordi deres morfologiske egenskaper kan endre seg avhengig av en rekke intrinsiske og ekstrinsiske faktorer. Intrinsiske faktorer er direkte relatert til sammensetningen av komponentene i cellemembran. Dette kan for eksempel være tilstedeværelse av ikke-mettede lipider i lipid bilaget som er kjent for å fremme non-lamellar transformasjoner i celle membran. Studier om cellemembran stabilitet har vist at ekstrinsiske faktorer som pH, temperatur, konsentrasjon av kationer (særlig divalente og polyvalente), lipider og proteiner påvirker membran integritet og levedyktigheten av celler. Som det allerede er nevnt ovenfor, non-lamellar fase er ugunstig konfigurasjon for cellemembraner siden det er forbundet med redusert membran integritet(de Kruijff and Cullis 1980; Quinn 1985).

En rekke ekstrinsiske faktorer har blitt korrelert med økt non-lamellar transisjon i cellemembraner og den medfølgende reduksjonen i celle stabilitet. Det har for eksempel blitt rapportert at elektrostatiske interaksjoner mellom kationer som Ca^{2+} og negativt ladet fosfolipider øker non-lamellar endringer i cellemembraner. Ekstreme temperaturer og pH har også blitt forbundet med non-lamellar transformasjoner i cellemembraner(Quinn 1985).

Andre studier viser at økt konsentrasjon av proteiner/peptider og lipider i oppbevaringsmedium har en positiv virkning på cellenes stabilitet. Det har for eksempel vært rapportert at celler oppbevart i medium tilsatt

albumin og poly-L-lysin var mer stabile enn celler oppbevart i medium med lave konsentrasjoner av både proteiner og lipider.
En mulig mekanisme for proteinenes stabiliserende effekt på celler er foreslått til å være at proteiner kan danne et belegg som dekker over den ekstracellulære overflaten av cellemembraner. Dette gjør at det hindres interaksjoner mellom fosfolipidene og komponenter som fremmer non-lamellar endringer i cellemembraner. Det for eksempel ble rapportert at poly (L-lysin) hindret binding av Ca^{2+} kationer til cellemembran og dermed fremmet celle stabilitet på denne måten(de Kruijff and Cullis 1980).

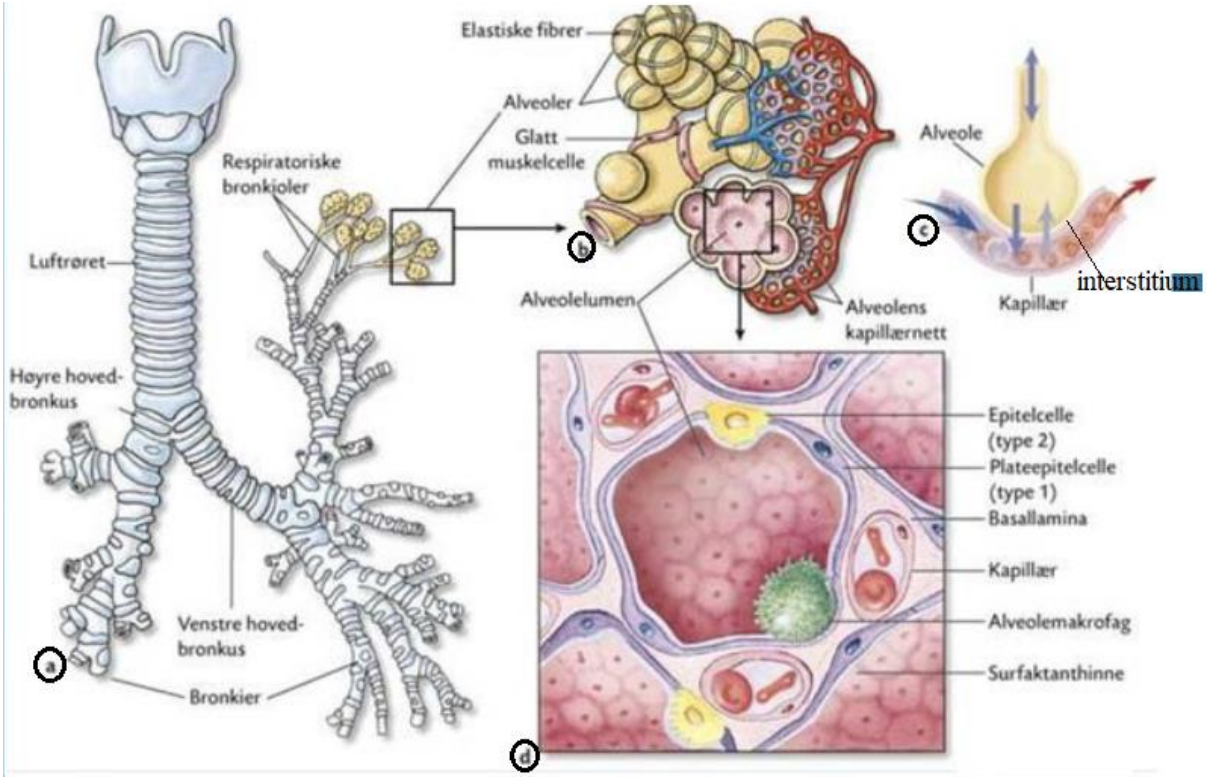
Lipider som for eksempel kolesterol og fosfatidyletanolamin (FE) kan være nødvendige for levedyktighet av mammalske celler. Disse lipidene har en regulerende effekt på diverse membranproteiner/enzymer. Det har for eksempel blitt rapportert at Na^{+}/K^{+} ATPaser, Ca^{2+} ATPaser og protein kinaser trenger kolesterol for å opprettholde deres aktivitet(Alberts et al. 2002; Yeagle 1989). Proteiner og lipider deltar i en rekke membran relaterte og intracellulære prosesser som kollektivt regulerer celle levedyktighet. På bakgrunn av dette kan det forventes større stabilitet hos celler oppbevart i protein/lipid rikt medium enn celler oppbevart i lipid/protein-fattig medium som for eksempel spinalvæske og bronkialskyllevæske (BAL).

1.3 Luftveiene

Hos pattedyr kan luftveiene deles opp i to hovedgrupper; øvre luftveiene (nesen, svelget og munnhulen) og nedre luftveiene (strupehodet, luftrøret, luftrørs forgreininger og alveolene). Luftrøret (trakea), bronkiene og de største bronkiolene (til og med terminale bronkioler) er kledd av et respiratorisk epitellag. Det epitellaget består av pseudolaget sylinder epitelceller med flimmerhår (cilia), slimproduserende celler (goblet celler) og basale celler (Barbara, Geraldine, and Phillip 2013).
Mellom terminale bronkioler og alveoler ligger det overgangssonen som også kalles respiratoriske bronkioler på grunn av deres evne til gassutveksling. I motsetning til større bronkioler og de store luftrørs forgreininger er respiratoriske bronkioler kledd innvendig av et enkelt lag med kubiske epitelceller. Cellene i dette epitellaget er hverken cilierte eller slimproduserende. Respiratoriske bronkioler munner ut i alveoler. Alveoler er blæreformet utposninger som er omringet av et nettverk av kapillærer og bindevev. Alveolær veggen består av pulmonal interstitium, enlaget plateepitel mot alveolene og endotel lag mot kapillærene. Pulmonal interstitium er avgrenset på den ene siden med alveolær enlaget plateepitel og endotel laget på den andre siden (Barbara, Geraldine, and Phillip 2013; Olav et al. 2006).

Pulmonal interstitium består blant annet av kollagene fibre, elastin fibre, fibroblaster og glatte muskelceller. Tykkelse på alveolær veggen er direkte proporsjonal med tettheten av pulmonal interstitium og omvendt proporsjonal med gassutveksling mellom alveolene og kapillærene. I normale lungevev skal alveolar veggen (interstitium) være tynn (0,0006-0,0008 mm) for å tillate effektiv gassutveksling (Olav et al.

2006). Patologiske tilstander som fører til økt tetthet av pulmonal interstitium eller skade på epitellag kan også føre til fortykket alveolær veggen som i sin tur kan redusere gassutvekslingen mellom alveolene og kapillærene. Dette er vanlig å observere hos pasienter med interstitielle lungesykdommer.



Figur 2: Diagram av strukturene av nedre luftveiene der a-viser luftrør med forgreiningene, b-viser generell organisering av bronko-alveolar struktur, men c og d-viser detaljert oppbygging av alveoler (Olav et al. 2006).

1.4 Mastceller

mastceller er vevsceller i immunsystemet hos vertebrate dyr. Mastceller medierer inflammatoriske responser som allergiske reaksjoner og overfølsomhet (hypersensitivitet). De er spredt gjennom kroppens bindevev, særlig under overflaten av huden, i luftveiene, i fordøyelsessystem, i nærheten av blodkar og lymfekar, og i urinveiene.

I sine granuler lagrer mastceller en rekke ulike kjemiske mediatorer, disse inkluderer histamin, interleukiner, heparin samt forskjellige enzymer.

Ved ekstracellulær degranulering frigjøres de ulike kjemiske mediatorene. Disse kan i sin tur medierer lokale hypersensitivitets responser som er karakteristiske for allergiske/inflammatoriske reaksjoner. Slike reaksjoner inkluderer; økt permeabilitet av blodkar-dette gir hevelse/ødem og migrasjon av immunceller til vevet, sammentrekning av glatt muskler og økt slimproduksjon (Kindt et al. 2007; Kara 2018).

1.5 Lungesykdommer

Lungesykdommer kan grupperes etter underliggende patologiske mekanismer. I hovedsak kan de deles i to kategorier; obstruktive og restriktive. I dette prosjektet skal det fokuseres på restriktive lungesykdommer fordi bronkoalveolær lavage (BAL) er mest relevant for disse som utredningsmetode.

1.5.1 Interstitielle lungesykdommer

Interstitielle lungesykdommer (ILD) er en fellesbetegnelse for en gruppe lungesykdommer som er karakterisert av inflammatorisk infiltrat inni pulmonal interstitium samt lignende kliniske, radiologiske og patologiske egenskaper (Reisner 2013). ILD kan være både akutte og kroniske, med kjent eller ukjent (idiopatisk) årsak, og kan gi både milde og livstruende symptomer. Studier om lungefunksjon viser at ILD har et restriktivt sykdomsmønster der lungenes evne til utvidelse og gassutveksling blir redusert-noe som fører til hypoksi. Dette kan hovedsakelig skyldes en fortykkelse av interstitium som følge av inflammasjon, arrdannelse og ødem(Reisner 2013; WebMed 2005).

Det finnes flere typer ILD med en kjent underliggende årsak. Et godt eksempel er interstitiell pneumoni som kan forårsakes av bakterier (mycoplasma pneumoniae), virus og sopp. Ulike typer interstitielle pneumonier har vært forbundet med inhalasjon av irritanter som asbestos, kullstøv, silicastøv, kornstøv og noen medikamenter(Travis et al. 2013).
Inhalasjon av organiske støvpartikler som når distale luftveiene og alveolene har vært tilknyttet hypersensitivitetspneumonitt (også kjent som ekstrinsisk allergisk alveolart). Den patologiske mekanismen bak hypersensitivitetspneumonitt (HP) er mediert både av immunkomplekser (typer III reaksjoner) og immunceller (type IV reaksjoner). Ved akutt HP er det typisk med nøytrofil infiltrat inn i alveolene og respiratoriske bronkiolene. Ved sen ("delayed") hypersensitivitet, slik det er ved kronisk HP er det typisk med økt antall mononukleære immunceller og granuloma (Travis et al. 2013).

ILD typer med kjente årsaker utgjør en liten del av ILD. For en stor del av ILD er den underliggende årsaken fremdeles uavklart. Denne kategorien av ILD som også går under navnet idiopatisk ILD kan romme følgende restriktive lungesykdommer; pulmonal sarkoidose, "usual interstitial pneumonia/UIP)", idiopatisk pulmonal fibrose, nonspesifikk interstitiell pneumonitt, "desquamative interstitial pneumoni" med mer(Ju Ryu et al. 2007; Meyer et al. 2012).

Usual interstitial pneumonia (UIP)

Dette er ILD type forårsaket av ukjente antigener. Som det går fram i navnet er dette den vanligste type av idiopatisk ILD. UIP er karakterisert av kronisk inflammasjon i interstitium samt omfattende fibrose i alveolar septa. Milde tilfeller av UIP forbindes med et cellerikt inflammatorisk eksudat der lymfocytter dominerer. Ved alvorlige UIP tilfeller er det typisk med diffuse alveolar skader, betydelige opphopning av lymfocytter og plasmaceller i alveolar veggene samt hyperplasi av type II pneumocytter. Som følge av alveolitt og den påfølgende fibrose, vil de distale luftveiene krympe sammen. Ved langtkommet UIP er det vanlig å observere cyst-lignende oppklaringer som er spredt rundt i tett arr-vev ("honeycomb" strukturer(Reisner 2013).

Utredning av ILD

Differensialdiagnostisering av ILD kan by på store utfordringer. Dette forklarer hvorfor det benyttes en kombinasjon av ulike teknikker til diagnostisering av ILD. Bildediagnostikk benyttes som rutine teknikk i ILD diagnostikk. Dette kan foregå som røntgenbilder av lungene, Computed tomografi (CT) skann og/eller høy-resolusjons CT skann (HRCT). Siden ILD har et restriktivt mønster har lungefunksjonstester vært brukt som diagnose teknikk for å påvise nedsatt lungevolum/kapasitet som er typisk symptom ved ILD. Disse teknikkene kombineres med undersøkelse av celle-profil i distale luftveiene og alveoler ved hjelp av bronkialskyllevæske (BAL) (Meyer et al. 2012).

1.6 Bronkoskopi

Enkelte lungesykdommer krever direkte undersøkelse av slimhinner i luftveiene. I slike tilfeller kan bronkoskopi være en nyttig diagnostisk metode. I denne metoden benyttes et bronkoskop til inspisering av slimhinner i luftveiene. Bronkoskop er en tynn bøyelig slange utstyrt med lyskilde og kamera. Bronkoskopi utføres av en spesialist (lungelege) etter grundig utredelse (røntgen, lungefunksjonsmålinger med mer) av en lege og alle andre relevante prøver (blant annet surstoff innhold i blodet) er utført.

De aktuelle pasientene forberedes for bronkoskopi ved å gjennomgå en 2-4 timers fasteperiode, lokalbedøvelse på tunge- og svelget kombinert med beroligende medisin. Bronkoskopi utføres ved at bronkoskopet forsiktig føres inni munnen eller nese, ned gjennom halsen til nedre luftveiene. Bronkoskopet kan da brukes til å hente både vevsprøver (biopsier) og celleprøver. Celleprøver hentes via BAL teknikk der slimhinner som dekker distale luftveiene skylles med saltvann og skylle-vannet suges opp (Terje and Merethe 2016).

1.7 BAL (broncho-alveolar lavage)

Bildediagnostiske metoder som røntgen og "high resolution computed tomography" (HRCT) benyttes som rutine utredningsmetoder for en rekke lungesykdommer, ILD inklusivt. I tilfeller der bildediagnostikk ikke gir entydig diagnostisk informasjon kan BAL cellulære analyser bidra til å oppklare ILD diagnostikk. BAL er en prøvetaking teknikk der det ved hjelp av saltvann (0,9 %) hentes opp et representativt miljø (cellulært og ikke-cellulært) fra respiratoriske bronkioler og alveoler.

Dette utføres ved at slimhinner som dekker distale nedre luftveiene og alveolene via et bronkoskop skylles med 100 - 300 ml sterilt 0,9% saltvann og skyllevannet suges opp (Meyer et al. 2012; Skjønsberg 2014). Skyllevannet skal inneholde både cellulære og ikke-cellulære komponenter av slimhinner, og ideelt sett være representativt for miljøet i prøvetakingspunktene. Det er viktig å ta i betraktning at en betydelig del av saltvannet kan diffundere ut i lungevevet. For at BAL prosedyre skal anses som optimalt må opp til 30 % av det innsprøytede saltvannet hentes ut av lungene. Ifølge American thoracic society (ATS), anbefales det at minst 5% av innsprøytede saltvann skal gjenfinnes for at BAL prøver skal anses som brukbare (Meyer et al. 2012; Patel and Ullah 2019).

Funn av et økt antall inflammatoriske celler (≥ 15% lymfocytter, 3% nøytrofiler, 1% eosinofiler, og 0,5% mastceller) i BAL korrelerer sterkt med økt sannsynlighet for bestemte typer ILD. Etter riktig BAL cellulær analysering, genereres det ILD-type spesifikke cellulære profiler. Eksempler på disse BAL cellulære profiler inkluderer; økt BAL eosinofili i eosinofilsk pneumoni/medikament relaterte reaksjoner, BAL lymfocytose i sarkoidose og hypersensitivitet pneumonitt (HP), BAL nøytrofili i UIP med mer(Ju Ryu et al. 2007). Disse opplysningene kan i konteksten av sykehistorien, kliniske symptomer og radiografiske/bilde undersøkelser (HRCT) bidrar til differensialdiagnostisering av ILD. Økning i antall BAL celler observeres også ved lungekreft og røyking(Meyer et al. 2012).

1.7.1 BAL prøvebehandling

Det finnes en rekke pre-analytiske faktorer som kan påvirke BAL prosedyre og tolkning av resultatene som for eksempel; underliggende sykdommer, valg av prøvetakings område i lungevev, mengde innsprøytede- og gjenfunnet saltvann, sugetrykk, type prøvebeholdere, lagringstemperatur og lengden på tidsintervall mellom prøvetaking- og analysering(Keith C 2007; Meyer et al. 2012; Skjønsberg 2014).

Det er stor konsensus om at BAL væsken bør ikke samles i prøverør der cellene kan adherere på overflaten av rørveggene. Av denne grunn er plastiske prøverør foretrukket framfor glassrør. ATS anbefaler at BAL prøver som oppbevares ved romtemperaturen bør analyseres innen en time etter prøvetaking. Disse anbefalinger kommer på bakgrunn av at BAL er veldig fattig på næring (lite protein og lipid innhold) noe som kan ha negativ effekt på opprettholdelse av cellulær integritet. I dette fagfeltet er det frarådet med forlenget

tidsintervaller mellom prøvetaking og analysering. Dersom det skal gå over en time før prøvene analyseres blir det anbefalt at prøvene oppbevares i kjøleskaps temperatur (4°C) opptil 24 timer (Meyer et al. 2012).

1.8 BAL celletelling

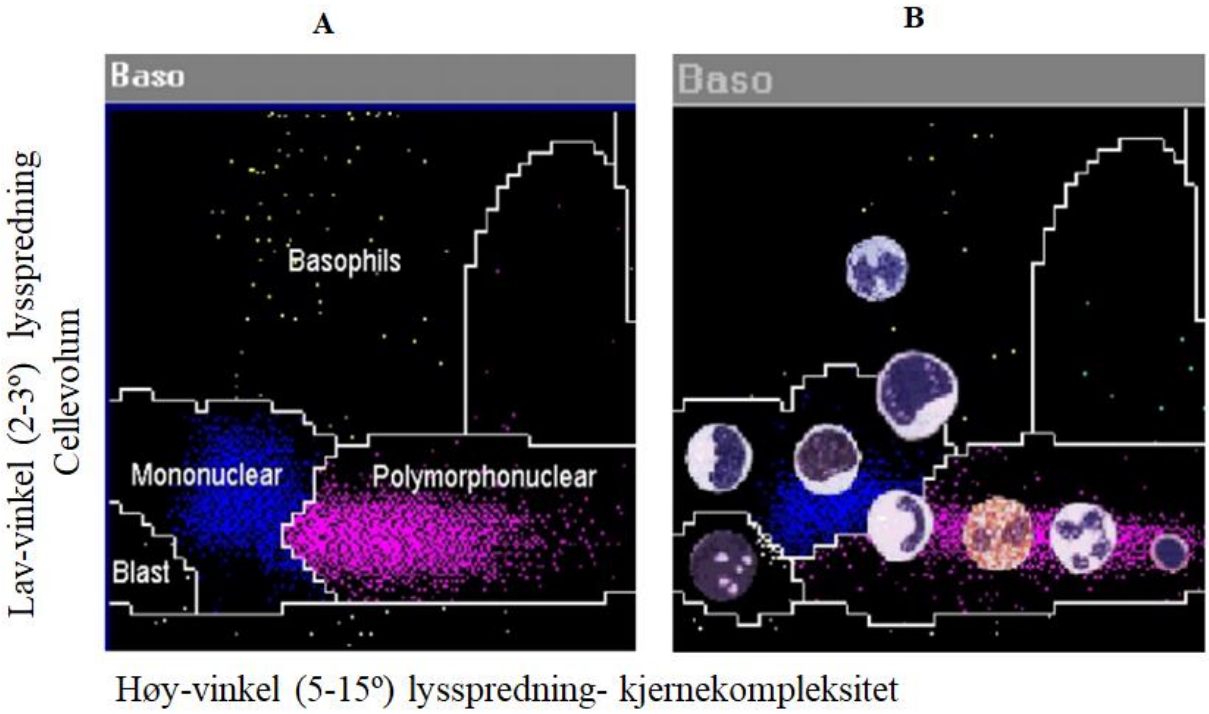
Som nevnt ovenfor blir BAL cellene hentet fra slimhinnene i nedre luftveier og oppbevart i en nærings-fattig væske (saltvann). Basert på dette kan det forventes at disse cellene kan det ikke utelukkes at gjennomgått morfologiske og biokjemiske endringer som kan påvirke celletelling. For å oppnå pålitelige resultater fra telling av BAL celler benyttes det en kombinasjon av automatisert og manuell celletellings metoder.

1.8.1 Automatisert celletelling

Totalt antall celler i BAL prøver kan telles blant annet av automatiserte hematologi instrumenter med flow-cytometri teknologi. Det finnes mange ulike slike instrumenter, men det skal legges vekt på ADVIA2120i på grunn av dets relevans for akkurat denne oppgaven. ADVIA 2120i er et våttkjemi hematologi instrument som utfører kvalitative og kvantitative analyser av diverse analytter i kroppsvæsker. Prøvematerialer som kan analyseres på ADVIA2120i kan inkludere EDTA-fullblod /plasma, leddvæske, pleuravæske, spinalvæske, bronkialskyllevæske (BAL) med mer. Maskinen utfører en kombinasjon av total celletelling av hematopoietiske celler og 5-parts differensial celletelling av disse cellene (basofiler, lymfocytter, nøytrofiler, eosinofiler og monocytter) (Carden 2005). Cellulære analyser på ADVIA2120i baserer seg på en kombinasjon av to analyseprinsipper; perox og baso.

1.8.1.1 Baso analyseprinsipp

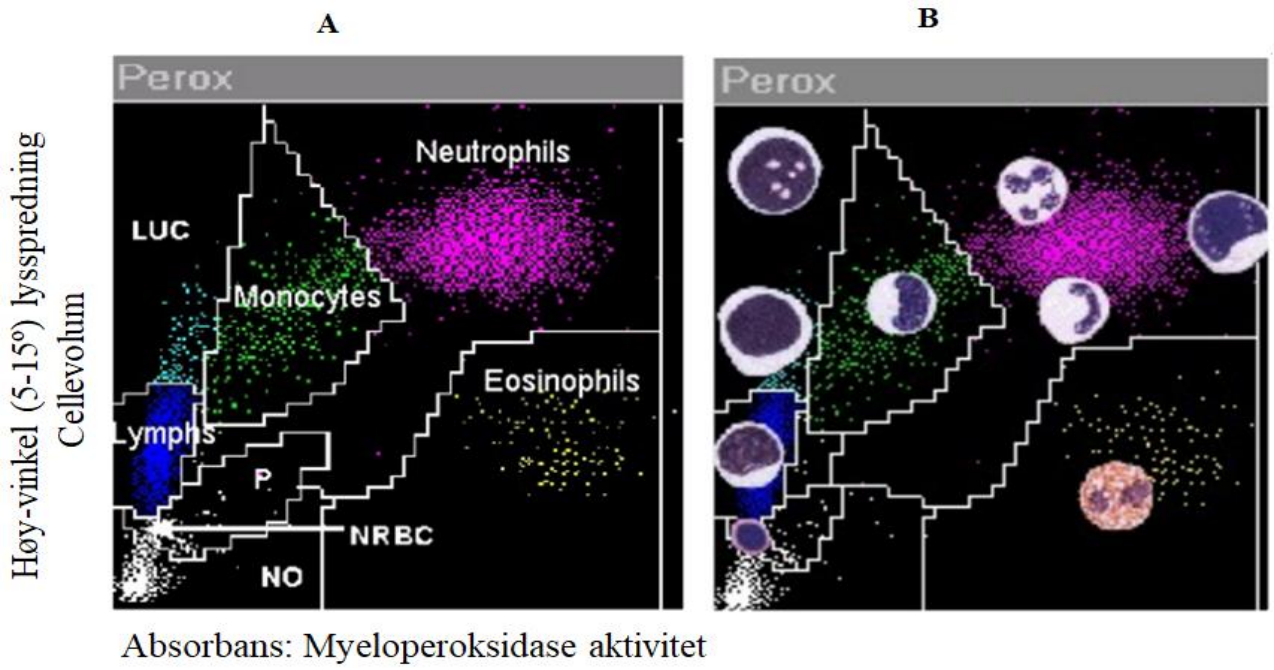
I baso kanalen blir erytrocytter og trombocytter ødelagt etterfulgt av at alle leukocytter bortsett fra basofiler strippes for deres cellemembran og cytoplasma. Cellekjerner og intakte basofiler føres enkeltvis gjennom en flowcelle der de bestråles med monokromatisk lys. Lyset som treffer cellene/cellekjernene blir spredt ut ifra cellestørrelse og kjerne-kompleksitet. Det spredte lyset måles ved lav vinkel (2-3º) for cellevolum og høy vinkel (5-15º) for kjerne-kompleksitet (figur 3). I tillegg til å oppgi total antall leukocytter, genereres det baso plot med 4 cellepopulasjoner; mononuklære (MN), polymorfnuklære (PMN), blaster and basofiler (figur 3) (Carden 2005).



Figur 3: Bilde av et cytogram generert fra baso kanalen der leukocytter fordeles i spesifikke cellepopulasjoner etter kjernekompleksitet og cellevolum. A viser en generell fordeling av leukocytter i bestemte cellepopulasjoner mens B viser en mer detaljert (spesifikk celletype) fordeling av leukocytter i cellepopulasjoner (Carden 2005).

1.8.1.2 Perox Analyseprinsipp

I perox kanalen blir erytrocytter lysert først etterfulgt av fiksering og myeloperoksidase-farging av leukocytter. Her blir det kun de peroxidase-holdige leukocytter som farges. Cellene føres enkeltvis gjennom en flowcelle der de bestråles med monokromatisk lys. Lysspredning detekteres ved (5-15º) og representerer cellevolum. Det måles også absorbans som representerer den intracellulære myeloperoksidase innhold. Det genereres et cytogram fra perox kanalen der lysspredning (cellestørrelse) ligger på Y-aksen og absorbans (myeloperoxidase-innhold) ligger på X-aksen. På cytogrammet er leukocyttene delt opp i cellepopulasjoner etter cellestørrelse og peroksidase-innhold (figur 4). (Carden 2005).

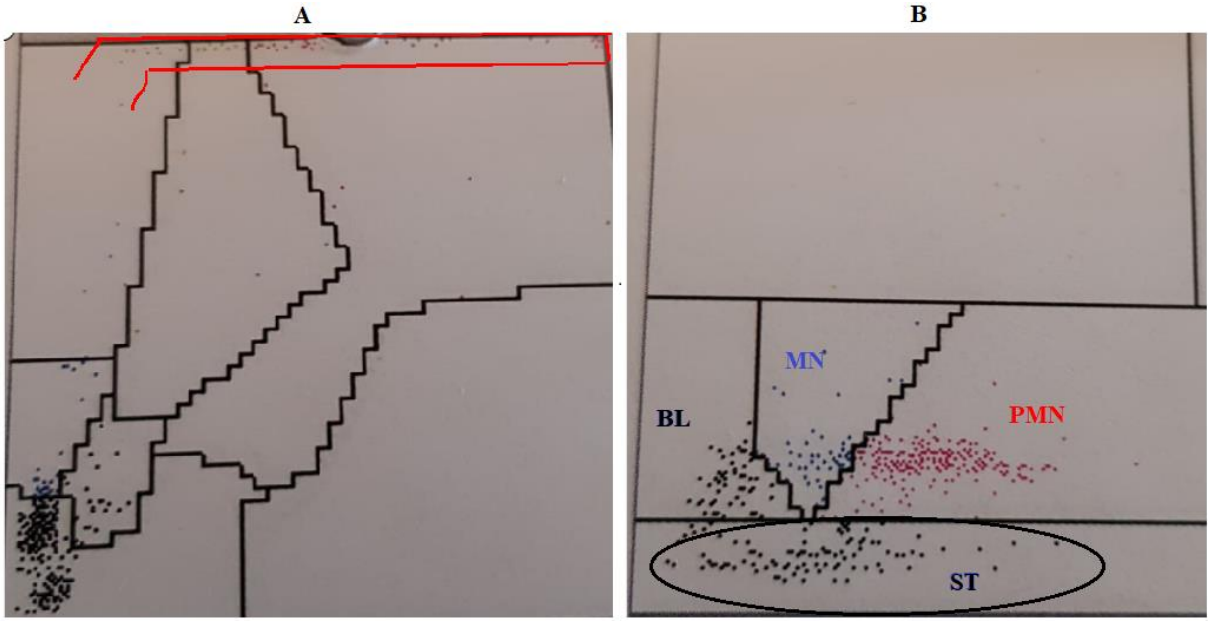


Figur 4: Bilde av et cytogram generert fra perox kanalen der leukocytter lokaliseres i bestemte cellepopulasjoner etter cellevolum og enzymaktivitet for myeloperoksidase (Carden 2005).
A viser en generell fordeling av leukocytter i bestemte cellepopulasjoner mens B viser en mer detaljert (spesifikk celletype i ulike modningsfaser) fordeling av leukocytter i cellepopulasjoner.

Målte verdiene for totalt antall leukocytter bør behandles med forsiktighet. Det er fordi at disse instrumentene kan ha manglende evne til å skille leukocytter fra ikke-hematopoietiske celler særlig epitelceller. Av denne grunnen kan verdier på totalt antall leukocytter i BAL anses som gyldig kun når epitelceller utgjør mindre enn 5 % av dette tallet (Keith C. and Ganesh, 2007).

1.8.2 Manuell differensial celletelling

BAL celler har en tendens til å undergå morfologiske og biokjemiske endringer. Dette kan ha uheldige konsekvenser for fordeling av BAL cellene i cellepopulasjon på cytogram. Dette kan for eksempel forekomme i form av; overlappende cellepopulasjoner, kraftige uoverensstemmelse over fordeling av celler mellom baso- og perox cytogrammene, mange celler plassert i «støy område» på baso-plottet og celler som plasseres den ytterste øvre kanten på perox plottet (figur 5). Disse utfordringene gjør at automatisert (maskinell) differensial celletelling kan anses som ikke pålitelig. Dette gjør at manuell differensial celletelling (cytosentrifugering) foretrekkes som alternativ metode.



Figur 5: Bilder av cytogram genert fra perox-kanal (A) og Baso-kanal (B) etter analysering av en BAL prøve. Cellene i figur A er plassert på den øverste kanten i cytogrammet (se merkert området). I figur B står; MN for mononuklære celler, PMN for polymorfnuklære celler, BL for blastceller og ST for støy (celledebris og andre artifakter).

1.8.2.1 Cytosentrifugering metode

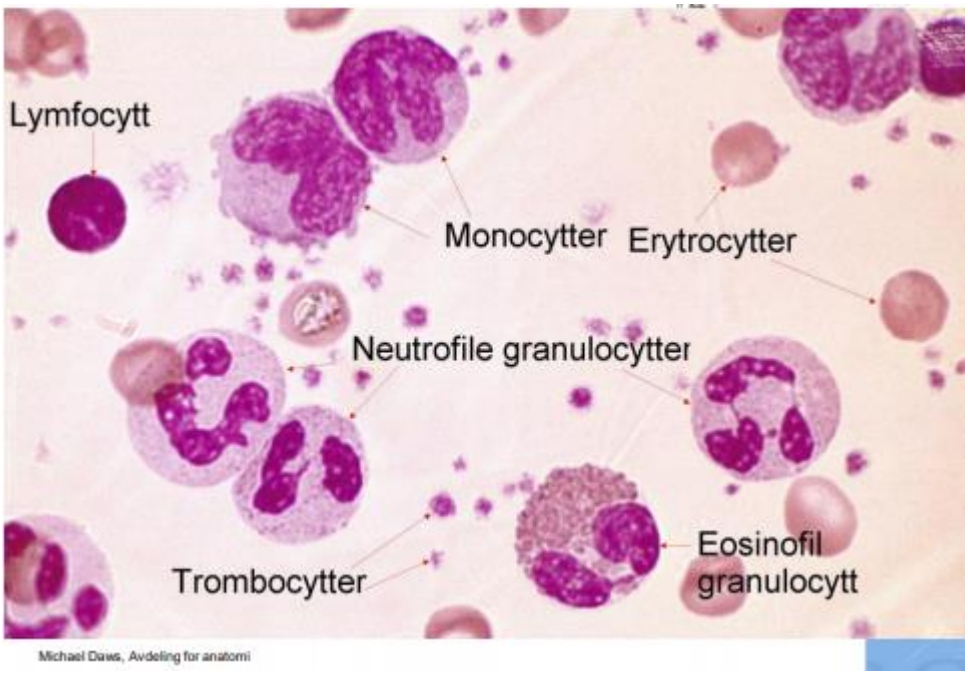
I cytosentrifugering metode blir det dannet et konsentrat (knapp) av celler via cytosentrifugering av BAL prøver. Celle-knappene farges med May-Grunwald-Giemsa og toluidinblått (mastfarging) før manuell differensial celletelling kan utføres under et mikroskop (Bain 2017). I tillegg til differensial celletelling, tillater denne metoden visuell inspisering av BAL prøver. Ved å mikroskopere kan man observere; andre typer celler enn leukocytter, mikrober (bakterier, sopp), ødelagte celler, farge utfellinger og vurdere kvaliteten på både BAL prøver og fargene (MGG og mastfarging).

May-Grunwald Giemsa farging

May-Grunwald Giemsa (MGG) farging er en blanding av to nøytrale fargevæsker, May Grunwald og Giemsa. May-Grunwald farge består av en sur komponent (eosin) og en basisk komponent (metylenblått). Giemsa-farge er sammensatt av eosin-Y (sur komponent) og to basiske fargekomponenter; azurblått (metakromatisk grunnfarge) og metylenblått(Bain 2017).

MGG fargemetoden er basert på elektrostatiske interaksjoner mellom farge-komponentene og målmolekylene. De basiske farge-komponentene har en netto positiv ladning og vil dermed binde seg til negativt ladet biologiske molekyler. Dette inkluderer nukleinsyrer og proteiner i cellekjernen og heparin-holdige basofile granula. Eosin er et surt farge-molekyl med netto negativ ladning og vil dermed interagere med alkaliske biologiske molekyler. Erytrocytter og eosinofile granula farges rød/rosa ved interaksjon med eosin.
Cellekjernene farges med varierende intensitet av lilla-fargen på grunn av en kombinasjon av basiske (Azurblått) og sure (eosin) farge-komponenter.

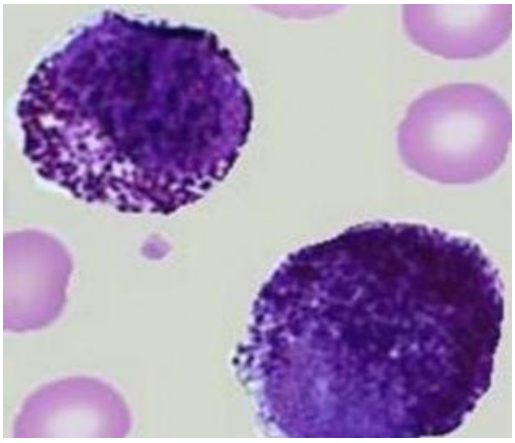
Effekten av MGG farging (farge intensitet) kan påvirkes av følgende faktorer; blandingsforhold mellom de to fargevæskene, pH i fargeløsningen, fiksering (metanol konsentrasjon og fikseringstid) og inkuberingstid i badene med fargeløsningene (Histalim 2005).



Figur 6: Bilde av leukocytter etter farging med May Grunwald Giemsa (MGG)(Michael 2014).

Mastfarging med toluidinblått

Toluidinblått er et basisk fargestoff som har stor affinitet for sure vevskomponenter (biologiske molekyler) som for eksempel nukeinsyrer og sure polysakkarider og mastcelle granula. I cytoplasma til mastceller finnes det mange granuler som inneholder blant annet histamin og heparin. Etter farging med toluidinblått vil histamin og heparin i granuler interagere med fargestoffet slik at granulene får en sterk blåfarge. I mikroskopet ser mastceller ut som celler med mange sterkt blåfarget korn i cytoplasma mens de andre cellene har en svak blå/grå farge (Nicola 2014; Sridharan and Shankar 2012).



Figur 7: Bilde av mastceller farget med toluidinblått. De heparin- og histaminholdige granulene blir farget med en sterk blåfarge. På grunn av et høyt antall granuler i cytoplasma, blir cellekjernen utydelig (Kindt et al. 2007)

1.9 Problemstilling

Bronkialskyllevæske kan benyttes som prøvemateriale til diagnose av interstitielle lungesykdommer (ILD). Cellulære og ikke-cellulære komponenter i BAL skal være representativt for fysiologiske tilstander i distale luftveiene (respiratoriske bronkioler) og alveolene. Det er en viss usikkerhet tilknyttet stabiliteten av cellene i BAL: For det første, dette er celler som forlot sitt naturlige/fysiologiske medium (fullblod) og migrerte til det parenkymale vevet i et inflammatorisk eksudat(Reisner, 2013; WebMed, 2005). Det er ukjent hvor godt egnet væsken i lungevev er til oppbevaring av disse cellene. For det andre, det inflammatoriske eksudatet blandes med 0,9% saltvann under dannelse av BAL væske som er et unaturlig, protein og lipid-fattig oppbevaringsmedium for celler(Ju Ryu et al. 2007). Til tross for den usikkerheten tilknyttet celle-stabilitet i BAL væske, finnes det begrenset forskning på holdbarheten av celler i BAL prøver og fargekvalitet av BAL celler som er farget med MGG og Toluidinblå (mastfarging).

Med dette som bakgrunn har denne oppgaven to mål: Det første er å finne ut om holdbarheten til celler i BAL prøver endrer seg på tids og temperaturavhengig måte. Det andre målet er å undersøke hvordan kvaliteten av May-Grunwald-Giemsa og mastcelle fargene på BAL celler holder seg når disse cellene oppbevares i rom og kjøleskaps temperatur 1, 2, 4 og 24 timer etter prøvetaking (se materiale og metode).

2.0 Materiale og metode

2.1 Prøvemateriale og håndtering

Det ble utlevert 21 anonymiserte bronkialskyllevæske (BAL) prøver fra Lunge avdelingen ved St. Olavs hospital. For hver BAL prøve ble det laget to alikvoter på 5 ml i plastrør, der den ene ble oppbevart i romtemperatur og den andre i kjøleskap (4-6º).

2.2 Telling av totalt antall leukocytter på ADVIA 2120i

Det ble utført telling av totalt antall leukocytter i BAL prøver etter prosedyren «Bronkialskyllevæske (BAL). Telling av totalt antall celler. AMB; ID 9545» (vedlegg 1). Før analysering av BAL prøvene ble maskinen kontrollert for god analytisk kvalitet ved analysering av prosess- og test point (normal) kontrollprøver. Analysering av BAL prøvene ble utført kun når leukocytt-parametere som WBCP, WBCP, baso valid cells og differensialtelling fra kontrollprøvene var godkjent.

Alle BAL prøver som ble analysert på ADVIA var sikret i lukkede prøverør. Dette var for å eliminere og/eller redusere smittefare (tuberkulose) som kan tilknyttes BAL prøver.

ADVIA 2120i har et lineært flow-cytometri system, dette gjør at analysene blir utsatt for påvirkning av «carry over» (prøve rester). For å minimere effekten av «carry over» ble det analysert sterilt saltvann (0,9%) foran hver BAL prøve.

Det ble utført to paralleller med telling av totalt antall leukocytter i BAL prøver oppbevart i romtemperatur 1, 2, 4 og 24 timer etter prøvetaking. BAL prøver oppbevart i kjøleskap ble først analysert 2 timer og deretter 4 og 24 timer etter prøvetaking (to paralleller). Dette er fordi prøvene ofte ikke ankommer lab før det har gått cirka 1 time, derfor vil kjøleskap-prøven være lik romtemperatur-prøven ved 1 time.

Etter celletelling på ADVIA 2120i ble antall leukocytter oppgitt fra perox kanalen (WBCP) og baso kanal (WBCB) registrert. Bortsett fra WBCP og WBCB ble totalt antall leukocytter også oppgitt på en annen format, nemlig «baso valid cells».

2.2.1 Kontroller

Test point (Normal) kontroll

Dette er en kommersiell kontroll som produseres av produsenten av ADVIA 2120i (Siemens). Den består av stabiliserte celler (røde og hvite) fra mennesker og dyr, simulerte leukocytter og en trombocytt-komponent i konserveringsmiddel. Test point kontroll kan være på tre nivåer; lav, normal og høy. Det er viktig at den er romtemperert og godt blandet før analysering (Grethe and Wedø Tonje 2016).

Prosesskontroll

Siden ADVIA 2120i må kontrolleres jevnlig i løpet arbeidsdagen blir det for dyrt å bruke den kommersielle kontrollen (Test point). Prosesskontroll blir løsning på dette problemet. Dette er en «In house» kontroll som lages ved seksjonen for hematologi, AMB. Kontrollen består av prosessert CPD blod der blodcellene er stabiliserte. Hver batch av prosesskontrollen skiftes ut etter 14 dager (Grethe and Wedø Tonje 2016).

2.3 Differensial- og mastcelletelling (Cytosentrifugering metode)

For å kunne utføre manuell differensial celletelling av leukocytter og mastcelletelling i BAL prøvene er det nødvendig at cellene samles opp i et cellekonsentrat (celleknapp). Cellene i celleknappen kan synliggjøres ved via bestemte fargemetoder som MGG og mastfarging. Telling av de ferdig fargede BAL cellene utføres under mikroskopet.

2.3.1 Tillaging av cytospinpreparat

Cytospinpreparat til differensial- og mastcelletelling ble laget ved 1, 2, 4 og 24 timer for romtemperatur-prøver, men kun ved 24 timer for kjøleskap-prøver. Hoved grunnen til dette var å avsløre hvilke celletyper som ble ødelagt/borte særlig hos de prøvene der det registreres fall i antall leukocytter.Tillaging av cytospinpreparat ble utført etter prosedyren på laboratoriet i Gastrosenteret ved gastrosenteret ved St. Olavs hospital («Cytosentrifugering, Hettich Universal 320. Bruksanvisning. AMB; ID 2938»).

På grunn av smittefare (tuberkulose) ble all håndtering av BAL utført i avtrekk inntil ferdig farget preparat. Utstrykkglass med skrivefelt ble merket med pasient identitet, fargemetode (MGG/mastfarging), oppbevarings temperatur (rom/kjøleskap) og type prøvemateriale (BAL). Disse ble montert på holdere sammen med filterkuvetter. De ferdig monterte cytospin ble plassert i cytosentrifugerotor og satt i avtrekk.
Til filterkuvettene ble det pipettert 200 µL ferskt blandet BAL prøve. Dette gjaldt kun for de BAL prøvene med et leukocytt-tall som var lik eller under 0,25 (WBCP ≤
0,25). Dette var fordi ønskes at ikke skal være veldig mange celler på cytospinpreparat fordi dette gjør manuell celletelling vanskelig. Dette leukocytt-tallet var lavt nok slik at det ikke var nødvendig med fortynning av prøvene. Når WBCP > 0,25 ble prøvene fortynnet med fosfatbufretsaltvann (PBS) ifølge tabell i prosedyre.

BAL prøvene ble sentrifugert i cytosentrifuge ved 1000 omdreininger (RPM) i 5 minutter. De ferdig sentrifugerte prøvene ble returnert til avtrekk der cytospin apparatet ble demontert. Utstryksglass ble visuelt inspisert for å se etter celleknapper og deretter lagt til kort tørking i luft før farging av cellene. Dette ble utført for alle de 21 prøvene oppbevart ved romtemperatur (1, 2, 4 og 24 timer) og kun ved 24 timer for kjøleskap-prøvene.

2.4 Farging av celler i BAL (cytospin preparater)

Til farging av cytospin preparatene ble det benyttet prosedyrene fra laboratoriet på Gastrosenteret ved St. Olavs Hospital (May Grunwald-Giemsa/mastfarging. AMB; ID 9545 og 4651). Prosedyrene inneholder en beskrivelse av fremgangsmåte samt detaljert informasjon om tillaging av fargeløsning til både MGG-farging og mastfarging. Til farging av BAL celler ble benyttet ferdiglagede fargeløsninger som var laget av bioingeniørene ved laboratoriet. Disse fargeløsningene var kontrollert for god kvalitet (pH, utfellinger og konsentrasjon) og var godkjent til bruk.

2.4.1 MGG farging (fargekar metode)

Cytospin preparatene fikseres i metanol i 15 minutter. Etter metanol-fiksering ble preparatene plassert i fargekar med May Grunwald i 5 minutter etterfulgt av 15 minutter i fargekar med Giemsa. Etter et kort skyll i buffer plasseres preparatene 5 minutter i et annet bufferkar. Ferdig farget preparatene lufttørkes før de monteres på dekkglass ved hjelp av lim (eukitt). Når limet var tørket og dekkglasset satt fast, ble preparatene oppbevart i preparatboksen (dette gjelder også for mastfarging).

2.4.2 Mastfarging (fargestav metode)

Etter en kort luft tørking ble cytospin preparatene plassert i et fuktekammer. Dette var for å forhindre at mastfargen skulle tørke ut under fargingen av cellene. I fuktekammer ble celle-knappene på preparatene dekket helt med mastfarge-løsningen i minst 30 minutter. Deretter ble fargeløsningen vasket vekk med en svak stråle av kaldt vann. Etter farging ble cellene fiksert med absolutt etanol ved å helle cirka 5 ml absolutt etanol over.

2.5 Mikroskopering

Det ble utført manuell differensialtelling av leukocytter i MGG-preparat via mikroskopi. Dette utføres ved å telle totalt 200 celler (100 celler x 2) ved 40X objektiv i forskjellige optimale synsfelt. Et optimalt synsfelt var definert som et felt der cellene ikke lå over hverandre og der den riktige fordeling av celletyper reflekteres. Et slikt synsfelt skal består av en overvekt av den celletyper det er mest av og et underskudd av den celletype det er minst av på preparatet.

De forskjellige type leukocytter ble registrert på en celleteller (Counter AC-12). Antall telte nøytrofile granulocytter, lymfocytter, makrofager og eosinofiler granulocytter ble hentet fra celletelleren og den prosentvise andel ble beregnet for hver leukocytt-type. Dette ble gjentatt slik at det totalt sett ble utført to

paralleller med differensial celletelling på hver BAL prøve. I tillegg ble funn av erytrocytter, lungeepitelceller, plateepitelceller, mikrober, farge kvaliteten og graden av eventuelt ødelagte celler kommentert. Til manuell telling av mastceller ble det benyttet 40X objektivet til telling av mastceller i 25 forskjellige synsfelt. Dette ble gjentatt slik at det totalt sett ble utført to paralleller med telling av mastceller for hver BAL prøve.

2.6 Databehandling

Det var tre typer rådata som ble generert fra ADVIA 2120i etter telling av totalt antall leukocytter i BAL prøvene ved de bestemte tidspunktene; WBCP (fra perox kanal), WBCB (fra baso kanal) og baso valid cells (gjelder for både baso og perox kanal). ADVIA 2120i starter med å generere en absolutt-celletall (valid cells) fra både perox og baso kanalene fram til cellekonsentrasjon på 200 * 10^6/L. Når verdiene på «baso valid cells» overstiger 200 * 10^6/L blir de omregnet til WBCB verdier (celletall * 10^9/L).

Det ble lagt vekt på rådata som var generert ved de to ekstreme tidspunktene; 1 time (fersk prøve) og 24 timer etter prøvetaking. På disse data ble det utført repeterbarhetstest, korrelasjon- og regresjonstest og holdbarhetstest.

2.6.1 Repeterbarhet

Dette gikk ut på vurdering av analysemetodens presisjon ved å sammenligne den prosentvise koeffisient variasjon (% $CV_{analytisk}$) mot tillat presisjonsgrenser ved hvert oppbevarings tidspunkt. Differansen (d) mellom de to parallellene for hver BAL prøve ble benyttet som grunnlag for beregning av standard avvik. Denne veien om differansene ble valg fordi datasettet var generert fra en populasjon som består av forskjellige individer (n=21) men ikke gjentatte uavhengige målinger av ett og samme individ. For å unngå negativt fortegn på differanse-verdiene ble disse opphøyet til andre potens (d^2). Standardavviket (d^2) og gjennomsnitt for populasjonen ved hvert oppbevarings tidspunkt ble beregnet og videre benyttet til beregning av % CV.

Per dagens dato finnes det ingen etablerte presisjonskrav for både cellulære og ikke-cellulære analytter i bronkialskyllevæske. Av denne grunnen ble det benyttet vilkårlige presisjonskrav på 20 % angitt av medisinsk ansvarlig på avdeling for medisinsk biokjemi på St. Olavs Hospital. For å vurdere analysemetodens presisjon ble den beregnede % CV ble sammenlignet med presisjonskravet for leukocytter i BAL væske.

2.6.2 Korrelasjon og regresjon

Det ble utført korrelasjon og regresjonsanalyse mellom bestemte par med rådata (tabell 1). WBCP-rådata ble plottet på x-aksen fordi perox kanalen *kan* ha en viss evne til å utelukke telling av ikke-hematopoietiske celler som for eksempel epitelceller (fra øvre luftveiene), pneumocytter og andre typer parenkymale celler. Det var da en viss mistanke om at WBCP rådata kunne *muligens* inneholdt mindre usikkerhet.

Determinasjonskoeffisienten (R^2) og korrelasjonskoeffisienten (r) fra korrelasjonsanalysen ble benyttet til å vurdere graden av sammenheng mellom de aktuelle sett med rådata. Et matematisk uttrykk av denne sammenhengen ble generert etter lineære regresjonsanalyse. Stigningstallet (β) og avskjæringspunkt med Y-aksen (α) og deres 95 % konfidensintervall ble benyttet til vurdering systematisk feil.

Tabell 1: Oversikt over korresponderende par med rådata etter leukocytt-telling på ADVIA. Det ble benyttet gjennomsnittsverdier til parallellene som rådata.

Korrelasjon og regresjonsanalyse	Antall leukocytter (rådata) telt på ADVIA (**x-aksen**)	Antall leukocytter (rådata) telt på ADVIA (**y-aksen**)
1	WBCP	WBCB
2	WBCB	WBCB-valid cells
3	WBCP	WBCP-valid cells

2.6.3 Holdbarhetstest

BAL prøvene som ble analysert en time etter prøvetaking ble definert som ferske prøver. Det ble beregnet endring i antall celler i BAL målt ved 1 time og de andre oppbevaringstidene (1t-2t; 1t-4t og 1t-24t). Dette ble gjort for både totalt antall leukocytter (automatisert celletelling) og de forskjellige leukocytt-typene (manuell differensial celletelling). Kvaliteten på dataene fra manuell differensial celletelling ble kontrollert ved å sammenligne dem med akseptområde for tillat avvik. Dette akseptområde basert på 95% KI for 100 manuell-telte celler (Cartwright, 1968). Tallverdier fra den beregnede endringen ble benyttet til å beregne den gjennomsnittlige endringen- og dens 90% konfindensintervall, standardavvik, «standard mean of error» (SEM) og t-kritisk verdien. Disse ble benyttet videre i statistisk vurdering av holdbarheten av BAL cellene.

Statistikk krav for holdbarhet

Til vurdering av holdbarhet av BAL celler ble 90% konfidensgrensene til den gjennomsnittlige endringen mellom fersk prøve (1 time/utgangspunkt) og prøvene ved de øvrige oppbevaringstidpunktene (2, 4 og 24 timer) sammenlignet øvre og nedre grensene for tillat bias. Det ble notert om begge konfidensgrensene lå tydelig innenfor eller utenfor grensene for tillat bias. Ved tvilstilfeller der konfidensgrensene krysset en eller begge grenser for tillat bias ble den målte endringen i hver enkeltprøve sammenlignet med tillat totalfeil. Her var det ønskelig at ikke mer enn en prøve skulle ha endring større enn tillat totalfeil.

Pr. i dag fins det lite dokumentasjon om krav for tillat bias og tillat totalfeil for både cellulære og ikke-cellulære analytter i bronkialskyllevæske (Meyer and Raghu 2000). Ifølge en publikasjon av «The American Thoracic Society» anbefales at celleviabilitet bør være over 80-90% for at differensialtellinger skal være gyldige. Ut fra dette har man satt krav til tillat bias på 15 % og tillat totalfeil på 30%, basert på medisinsk skjønn.

2.7 Beregningsformler

Alle beregningene som ble brukt i denne oppgaven ble utført i Excel. Disse inkluderer; gjennomsnitt, endring, konfindensintervall, standardavvik, «standard mean of error» (SEM), t-kritisk og grenseverdier for tillat bias- og tillat totalfeil

SEM = standardavvik/ROT(n), der n er antall BAL prøver det vil si 21, og antall frihetsgrader er 20

90 % KI = gjennomsnittlig endring $\mp$ (2-sidig t-kritisk verdi * SEM) der $\alpha = 5\%$

Standardavvik (d^2) = ROT($\Sigma d^2/(2*n)$)

% CV = (standard avvik (d^2)/populasjonen gjennomsnitt) *100

Riktighetskrav (tillat bias) = % bias for leukocytter i BAL $\mp$ endring i fersk prøve (utgangs verdi dvs 1 time)

3.0 Resultater

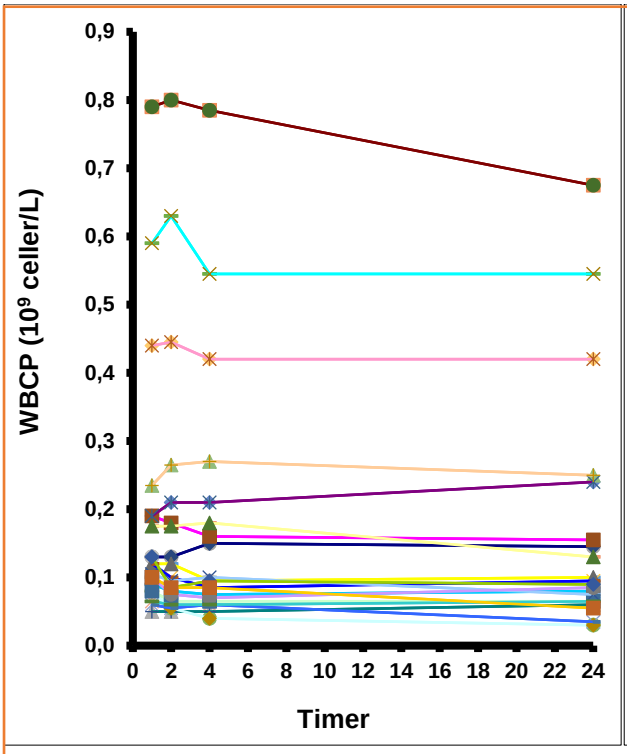
I dette holdbarhetsstudie ble det benyttet 21 anonymiserte BAL prøver. For hver BAL prøve ble det laget to alikvoter, der den ene ble oppbevart i romtemperatur og den andre i kjøleskaps temperatur (4-6º). 1, 2, 4 og 24 timer etter prøvetaking ble både romtempererte og kjøleskaps prøver analysert for totalt antall leukocytter på ADVIA 2120i, og analysesvar ble oppgitt som WBCB, WBCP og baso valid cells. Mastceller og differensial telling av leukocyttene ble utført manuelt ved 1, 2, 4 og 24 timer på romtempererte prøver, men kun ved 24 timer på kjøleskaps prøver. Resultatene fra; holdbarhet på cellene i BAL prøver, sammenligning av WBCB, WBCP- og baso valid cells og analysemetodenes presisjon (repeterbarhet) følger nedenfor. Analysesvar fra enkelte prøver som hadde stort avvik fra resten av populasjonen ble ekskludert. Dette gjelder for analyseresultater fra pasient 6 som hadde veldig høye verdier i forhold til resten av populasjonen. Dette er fordi slike ekstreme verdier medfører økt variasjon i datamateriale samtidig som det påvirker middelverdi. Dette kunne svekke kvaliteten på analyseresultatene.

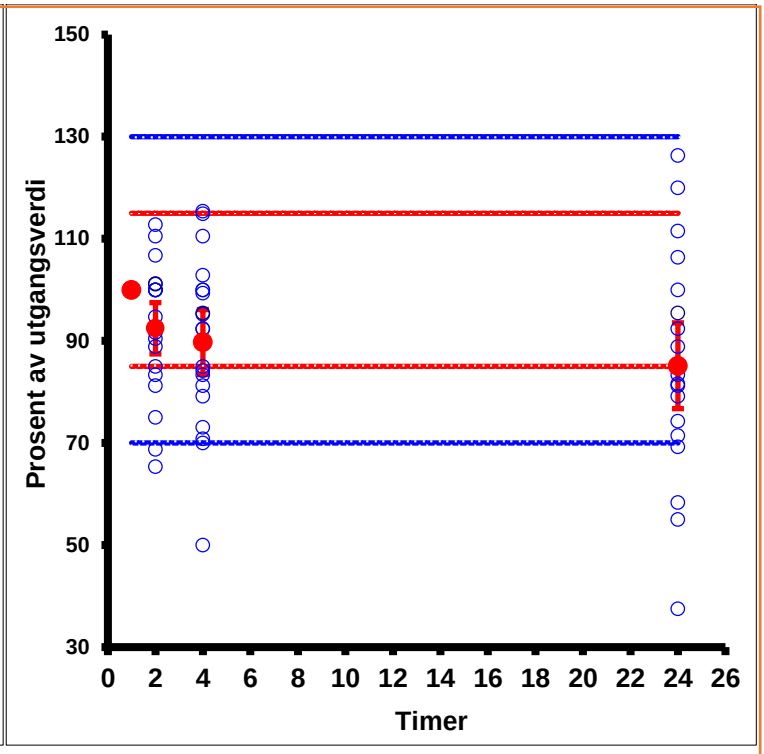
3.1 Holdbarhet

Resultatene ble benyttet til å vurdere effekten av henstandstid (1, 2, 4 og 24 timer) på celler i BAL prøver (n=20) oppbevart både i romtemperatur og kjøleskaps temperatur. Endring i antall leukocytter og mastceller ble beregnet som middelverdi ved hvert henstands tidspunkt i prosent av utgangsverdi. Utgangsverdier defineres som måleverdier ved 1 time. Den gjennomsnittlige endringen ved hvert tidspunkt og sitt 90% konfidensintervall sammenlignes oppimot grensene for tillat bias på 15,0 %. Endring i antall leukocytter og mastceller i enkelt prøve sammenlignes med grensene for tillat totalfeil på 30,0 %.

3.1.1Holdbarhet på totalt antall leukocytter i BAL prøver oppbevart i romtemperatur.

Resultatene illustrert i figur 8 og 9 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for totalt antall leukocytter fra perox- og baso kanal på ADVIA2120i (WBCP, WBCB). Det ble undersøkt endring i totalt antall leukocytter ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 8B, 9B). Endring i enkelt prøve ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også vurdert mot aksept grensene for tillat totalfeil. Denne variasjonen i totalt antall leukocytter i enkelt prøve ble også visualisert i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur 8A, 9A)



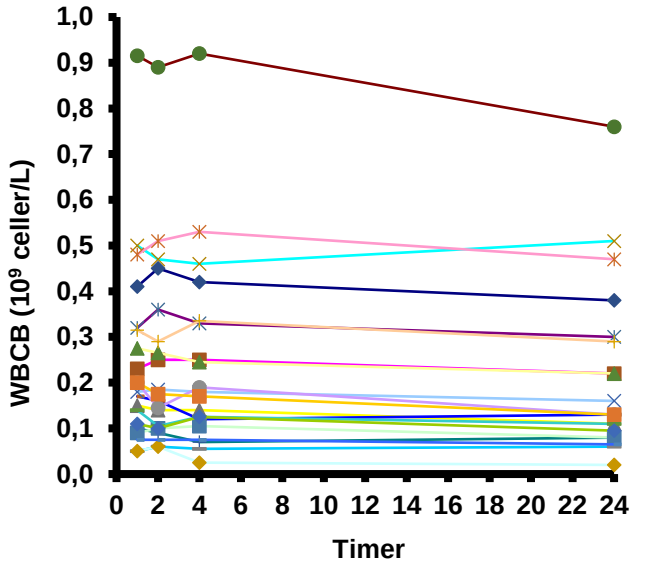


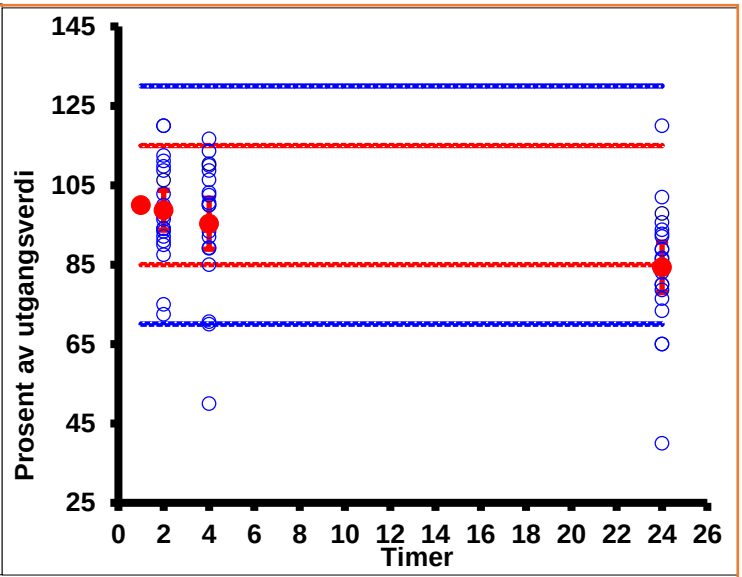
***Figur 8A**. Grafisk fremstilling av variasjon i måleverdier for totalt antall leukocytter (WBCP) i en populasjon (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser måleverdier for totalt antall leukocytter målt i perox kanal (WBCP) på ADVIA 2120i. Linjene viser hvordan totalt antall celler i en enkelt prøve endrer seg i det gitte tidsintervallet.*

***Figur 8B**. Grafisk fremstilling over endring i totalt antall leukocytter (WBCP) i romtempererte BAL prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Figur 8A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,03 til 0,8 * 10^9 celler/L. Enkelt prøve-relaterte endringer i WBCP verdier ved 2 og 4 timer viser ikke tydelig retning. Det blir registrert en lett økning og/eller reduksjon i totalt antall leukocytter hos noen prøver og ingen merkbare endringer hos andre. Generelt blir det registrert en reduksjon i WBCP verdier hos de aller fleste prøver etter 24 timers henstand, men denne reduksjonen var tydeligere hos noen enn andre. En lignende utvikling observeres også for WBCB.

Figur 8B viser en generell reduksjon i totalt antall leukocytter (WBCP) ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdien. Denne reduksjonen virker å være tidsavhengig og mer merkbar ved 24 timer enn ved 2 og 4 timer. Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnitt endring ved 2 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Det nedre konfindensintervallet for endring ved 4 timer så vidt krysser den nedre grensen for tillat bias, men det er kun en enkelt prøve der endringer i WBCP overstiger den ene (nedre) grense for tillat totalfeil. Antall leukocytter (WBCP) er da innenfor de satte krav til holdbarhet for disse tidspunktene. Etter 24 timers henstand i romtemperatur overstiger konfindensintervall for gjennomsnittlig endring nedre grensen for tillat bias (figur 8B). I tillegg vises det at det er opptil 3 enkelt prøver der endringer i WBCP ved 24 timer overstiger nedre grensen for tillat totalfeil, antall leukocytter er utenfor krav til holdbarhet.





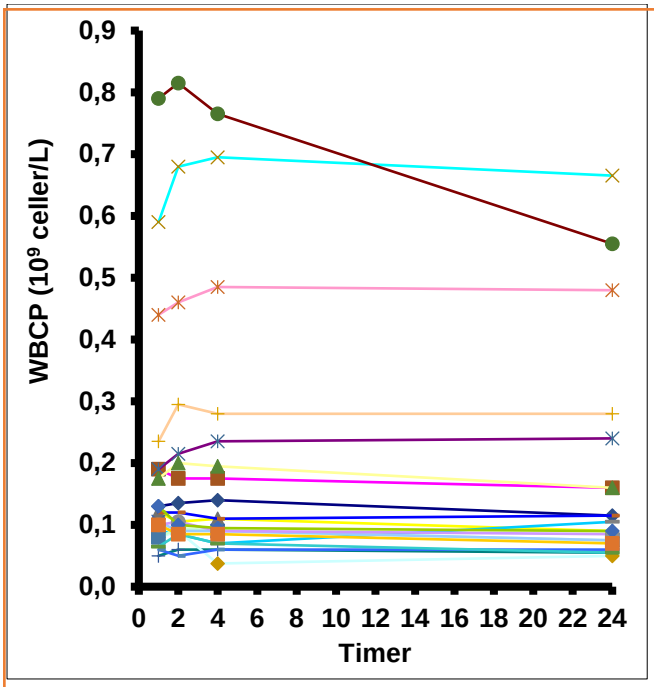
***Figur 9A**. Grafisk fremstilling av variasjon i måleverdier for totalt antall leukocytter (WBCB) i populasjonen (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser måleverdier for totalt antall leukocytter målt i baso kanal (WBCB) på ADVIA 2120i. Linjene viser hvordan totalt antall celler i en enkelt prøve endrer seg i det gitte tidsintervallet.*

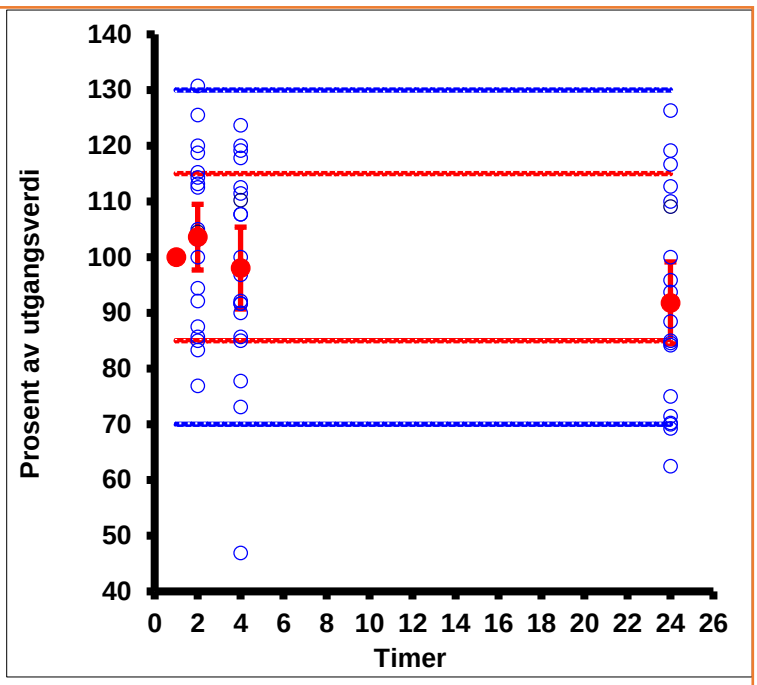
***Figur 9B**. Grafisk fremstilling over endring i totalt antall leukocytter (WBCB) i romtempererte BAL prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Figur 9A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,02 til 0,92 * 10^9 celler/L. Figur 9B viser en generell reduksjon i totalt antall leukocytter (WBCB) ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdien. Denne reduksjonen virker å være tidsavhengig og mer merkbar ved 24 timer enn ved 2 og 4 timer. Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnitt endring ved 2 og 4 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Antall leukocytter (WBCB) er da innenfor de satte krav til holdbarhet for disse tidspunktene. Etter 24 timers henstand i romtemperatur overstiger konfindensintervall for gjennomsnittlig endring nedre grensen for tillat bias (figur 9B). I tillegg vises det at det er opptil 2 enkelt prøver der endringer i WBCB ved 24 timer overstiger nedre grensen for tillat totalfeil, antall leukocytter er utenfor krav til holdbarhet.

3.1.2 Holdbarhet på totalt antall leukocytter i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur

Resultatene illustrert i figurene 10, 11 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for totalt antall leukocytter fra perox- og baso kanal på ADVIA2120i (WBCP, WBCB). Det ble undersøkt endring i totalt antall leukocytter ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 10B, 11B). Endring i enkelt prøve ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også testet mot aksept grensene for tillat totalfeil. Denne variasjonen i totalt antall leukocytter i enkelt prøve ble også visualisert i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur 10A, 11A)



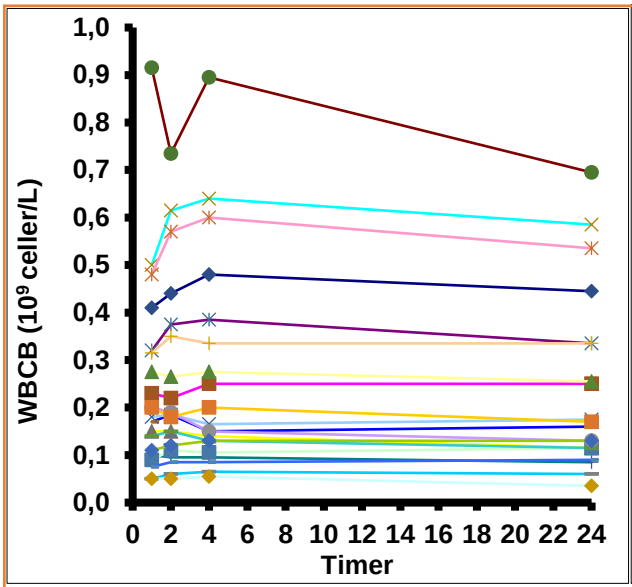


***Figur 10A**. Grafisk fremstilling av variasjon i måleverdier for totalt antall leukocytter (WBCP) i en populasjon (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser måleverdier for totalt antall leukocytter målt i perox kanal (WBCP) på ADVIA 2120i. Linjene viser hvordan totalt antall celler i en enkelt prøve endrer seg i det gitte tidsintervallet.*

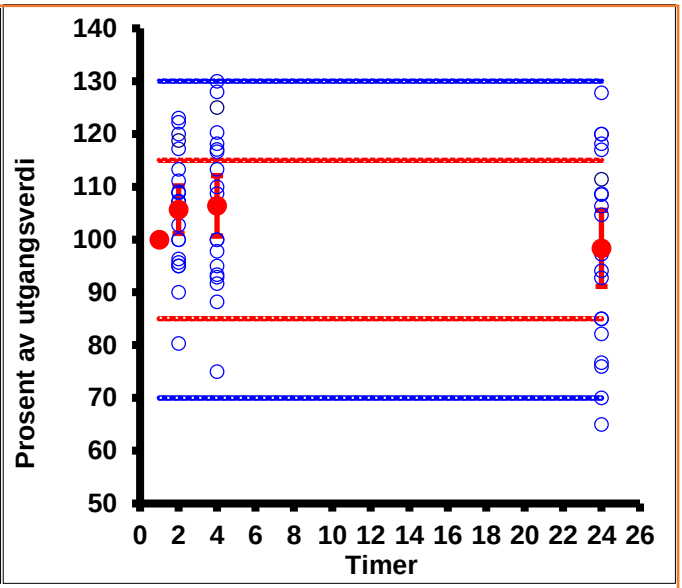
***Figur 10B**. Grafisk fremstilling over endring i totalt antall leukocytter (WBCP) i kjøleskap-prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdi). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Figur 10A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,04 til 0,82 * 10^9 celler/L. Enkelt prøve-relaterte endringer i WBCP verdier ved 2, 4 og 24 timer viser ikke tydelig retning. Det blir registrert en lett økning og/eller reduksjon i totalt antall leukocytter hos noen prøver og ingen merkbare endringer hos andre. Generelt observeres en lignende utvikling også for WBCB.

Figur 10B viser lett endring i totalt antall leukocytter (WBCP) ved 2 og 4 timer i forhold til utgangsverdien. Etter 24 timers henstand i kjøleskap, blir det observert en tydelig reduksjon i WBCP-verdier. Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnittlig endring ved 2 og 4 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Antall leukocytter (WBCP) er da innenfor de satte krav til holdbarhet for disse tidspunktene. Det nedre konfindensintervallet for endring ved 24 timer så vidt krysser den nedre grensen for tillat bias, men det er flere enkelt prøver der endringer i WBCP overstiger den ene (nedre) grense for tillat totalfeil, antall leukocytter (WBCP) er da utenfor de satte krav til holdbarhet ved 24 timer (figur 10B).



***Figur 11A**. Grafisk fremstilling av variasjon i måleverdier for totalt antall leukocytter (WBCB) i populasjonen (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser måleverdier for totalt antall leukocytter målt i baso kanal (WBCB) på ADVIA 2120i. Linjene viser hvordan totalt antall celler i en enkelt prøve endrer seg i det gitte tidsintervallet.*



***Figur 11B**. Grafisk fremstilling over endring i totalt antall leukocytter (WBCB) i kjøleskap-prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Figur 11A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,04 til 0,92 * 10^9 celler/L. Figur 11B viser lett endring (økning) i totalt antall leukocytter (WBCB) ved 2 og 4 timer i forhold til utgangsverdien, men det stabiliserer seg tilbake til utgangsverdien ved 24 timer. Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnittlig endring ved 2, 4 og 24 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Antall leukocytter (WBCB) er da innenfor de satte krav til holdbarhet for disse tidspunktene (figur 11B).

Tabell 2: Statistisk sammenligning (paret T-test) av totalt antall leukocytter i BAL prøver telt i Baso (WBCB)- og perox (WBCP) kanalene på ADVIA 2120i for romtempererte prøver (ved 1 og 24 timer) og kjøleskapsprøver (ved 24 timer). Det oppgis totalt antall leukocytter målt henholdsvis 1time og 24 timer etter prøvetaking, og analysesvar utgis som celle-konsentrasjon (10^9 celler/L). Beregningene som ble gjort for både WBCB og WBCP var basert på gjennomsnittsverdiene (Mean). Baso:perox ratio oppgir prosentvise over- og/eller under estimering av Baso-målinger i forhold til perox-målinger.

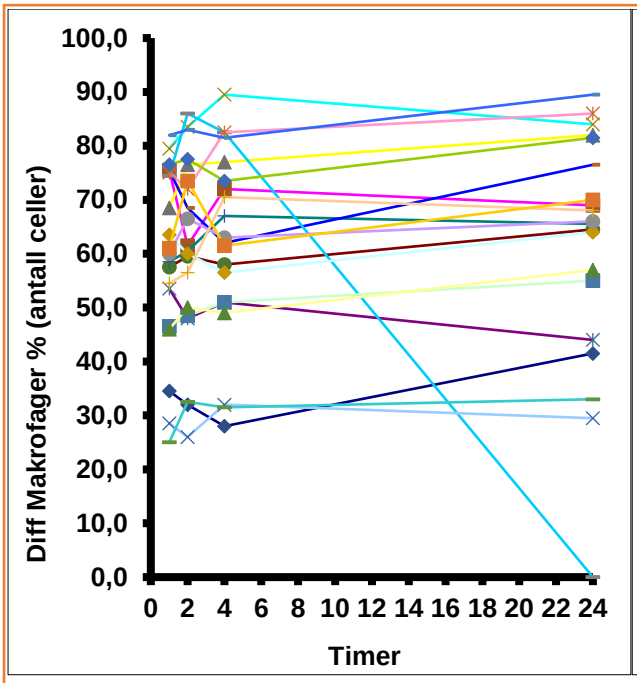
	1 time Rom		24 timer Rom		24 timer Kjøl	
	WBCP (10^9/L)	WBCB (10^9/L)	WBCP (10^9/L)	WBCB (10^9/L)	WBCP (10^9/L)	WBCB (10^9/L)
Gjennomsnitt	0,192	0,248	0,16975	0,216	0,179	0,24075
Observasjoner	20	20	20	20	20	20
Pearson-korrelasjon	0,926		0,953		0,904	
frihetsgrader	19		19,000		19	
T-observert	-3,201		-3,645		-3,386	
P(T<=t) ensidig	0,002		0,001		0,002	
T-kritisk, ensidig	1,729		1,729		1,729	
Baso:Peroks ratio (%)	29,167		27,246		34,497	

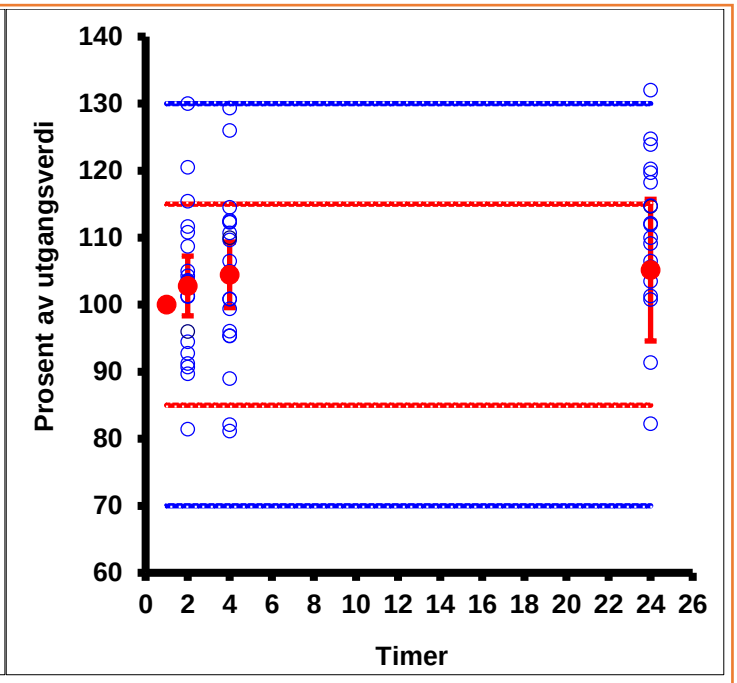
Tabell 2 viser at det var statistiske signifikante forskjeller mellom baso verdier (WBCB) og perox verdier (WBCP). Det vises at gjennomsnittlige WBCB verdiene var generelt høyere enn WBCP verdiene ved alle henstandstidspunkter både i rom- og kjøleskaps temperatur. Størrelsen på denne overestimering av WBCB i forhold til WBCP var på rundt 30 %

3.1.3 Holdbarhet på Makrofager i BAL prøver oppbevart i romtemperatur

Resultatene i figur 12 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for manuell telling av makrofager i BAL prøver oppbevart i romtemperatur. På grunn av lite mengde datamateriale ble ikke måledata for manuell telling av nøytrofile granulocytter og eosinofile granulocytter inkludert i holdbarhets tester.

Det ble undersøkt endring i antall makrofager ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 12B). Endring i enkelt prøve ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også testet mot aksept grensene for tillat totalfeil. Utviklingen i antall makrofager visualiseres i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur 12A)





***Figur 12A**. Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte makrofager i BAL prøver (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser antall makrofager per 100 celler. Linjene viser hvordan antall makrofager i en enkelt prøve endrer seg i de gitte tidsintervallene.*

***Figur 12B**. Grafisk fremstilling over endring i antall makrofager i romtempererte prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

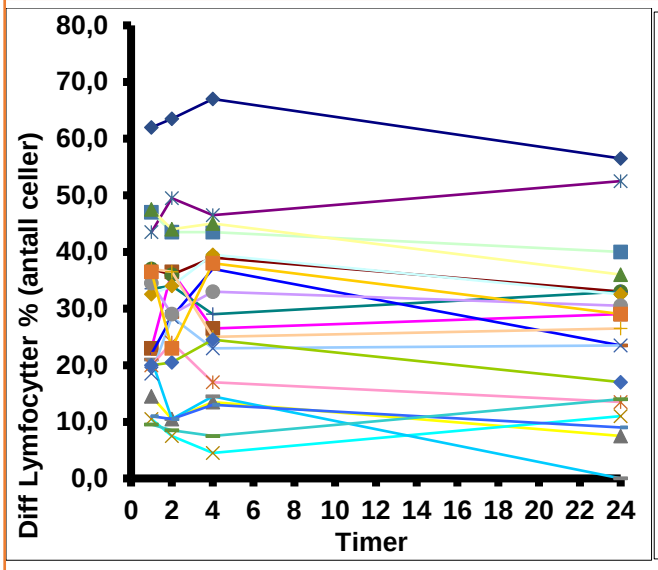
Figur 12A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,0 til 90,0 celler. Enkelt prøve-relaterte endringer i antall makrofager ved 2, 4 og 24 timer viser ikke tydelig retning. Det blir registrert en lett økning og/eller reduksjon i antall makrofager hos noen prøver og ingen merkbare endringer hos andre. En lignende utvikling observeres også for lymfocytter og mastceller (figur 12A og 12A).

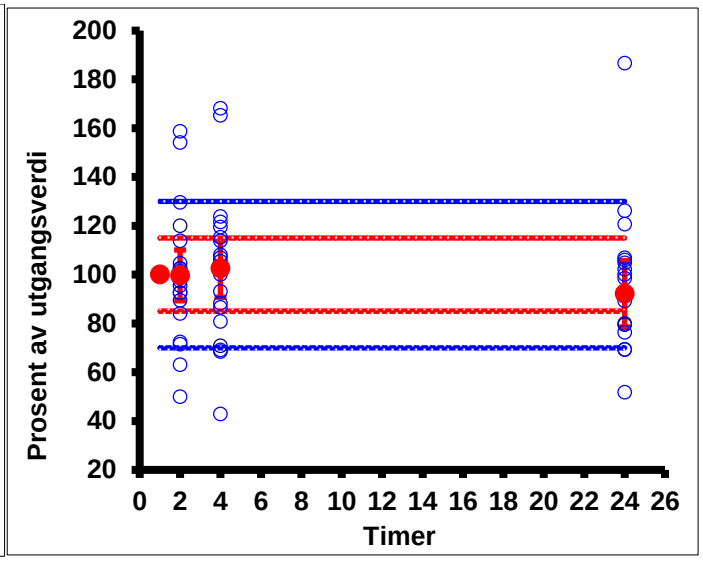
I snitt ser det ut til å være økt celletall over tid (figur 12B). Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnitt endring ved 2 og 4 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Det øvre konfindensintervallet for endring ved 24 timer så vidt krysser den øvre grensen for tillat bias, men det er kun en enkelt prøve der endringer i makrofag-tallet overskrider den ene (øvre) grense for tillat totalfeil. Antall makrofager er da innenfor de satte krav til holdbarhet for disse tidspunktene.

3.1.3 Holdbarhet på Lymfocytter i BAL prøver oppbevart i romtemperatur

Resultatene illustrert i figur13 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for manuell telling av lymfocytter i BAL prøver oppbevart i romtemperatur. På grunn av lite mengde datamateriale ble ikke måledata for manuell telling av nøytrofile granulocytter og eosinofile granulocytter inkludert i holdbarhets tester.

Det ble undersøkt endring i antall lymfocytter ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 13B). Endring i enkelt prøve ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også vurdert mot aksept grensene for tillat totalfeil. Utviklingen i antall lymfocytter visualiseres i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur13A)





***Figur 13A**. Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte lymfocytter i BAL prøver (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser antall lymfocytter per 100 celler. Linjene viser hvordan antall lymfocytter i en enkelt prøve endrer seg i de gitte tidsintervallene.*

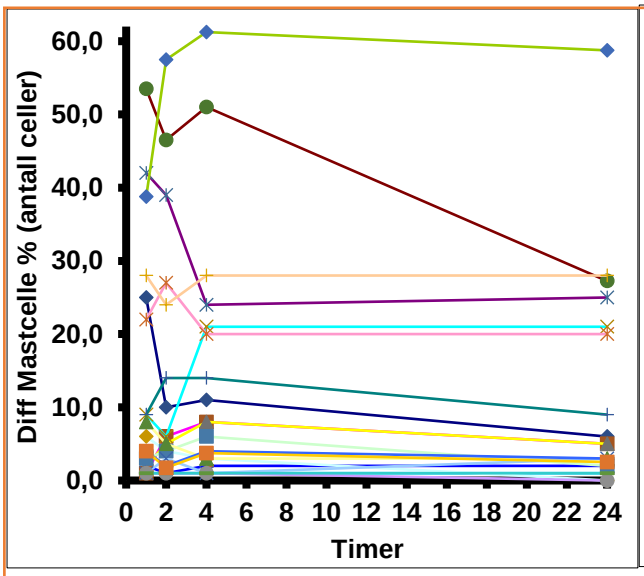
***Figur 13B**. Grafisk fremstilling over endring i antall lymfocytter i romtempererte prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

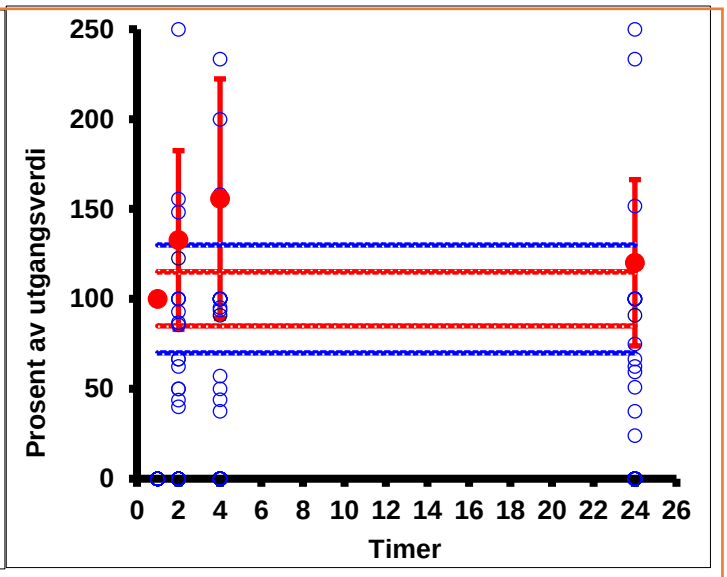
Figur 13A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,0 til 67,0 celler. Generelt registreres utydelige endringer i antall makrofager ved 2 og 4 timer i forhold til utgangsverdi. Etter 24 timers henstand i romtemperatur registreres det en reduksjon i antall lymfocytter i forhold til utgangsverdien (figur 13B). Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnitt endring ved 2 og 4 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Antall lymfocytter er da innenfor de satte krav til holdbarhet for disse tidspunktene. Det nedre konfindensintervallet for endring ved 24 timer så vidt krysser den nedre grensen for tillat bias, men det er flere enn en (totalt to) enkelt prøver der endringer i makrofag-tallet overskrider både nedre og øvre aksept grensene for tillat totalfeil. Antall lymfocytter er utenfor de satte krav til holdbarhet ved 24 timer.

3.1.4 Holdbarhet på Mastcelle i BAL prøver oppbevart i romtemperatur

Resultatene illustrert i figur14 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for manuell telling av mastceller i BAL prøver oppbevart i romtemperatur. På grunn av lite mengde datamateriale ble ikke måledata for manuell telling av nøytrofile granulocytter og eosinofile granulocytter inkludert i holdbarhets tester.

Det ble undersøkt endring i antall mastceller ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 14B). Endring i enkelt prøve ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også testet mot aksept grensene for tillat totalfeil. Utviklingen i antall mastceller visualiseres i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur 14A)





***Figur 14A**. Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte mastceller i BAL prøver (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser antall mastceller fra 25 ulike synsfelt. Linjene viser hvordan antall mastceller i en enkelt prøve endrer seg i de gitte tidsintervallene.*

***Figur 14B**. Grafisk fremstilling over endring i antall mastceller i romtempererte prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

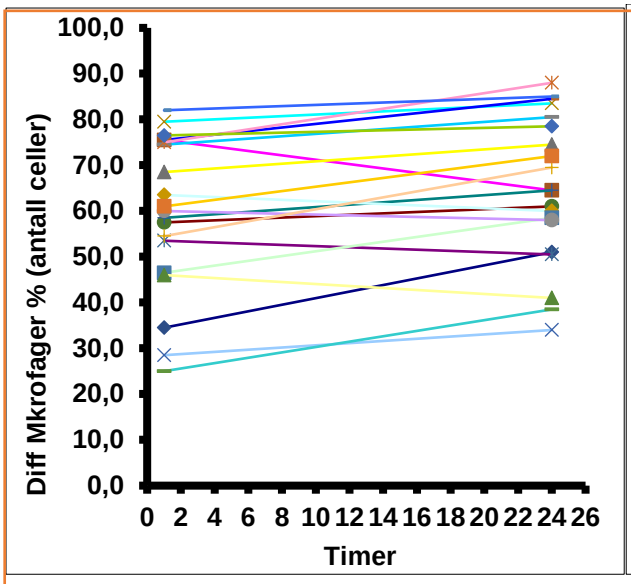
Tilstedeværelse av lave måleverdier (antall mastceller < 10 celler) som det var mange av (n=12) påfører disse resultatene variasjon og upresisjon. Dette er fordi avviket pleier å være stort ved lave verdier slik at presisjonskravet ikke oppfylles. Resultatene som fremvises i figurene 14A og 14B er basert på hele populasjon og inkluderer både lave og høye måleverdier. I et forsøk på å redusere spredning i datamateriale ble prøvene med lave måleverdier eliminert (figurene 21A og 21B, vedlegg 10). Det samme gjelder analyseresultatene for kjøleskap-prøvene (figurene 22A og 22B, vedlegg 11)

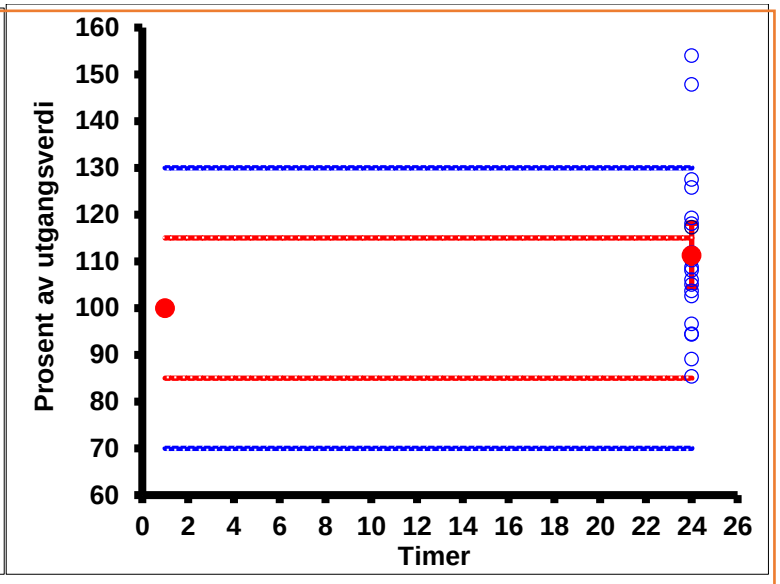
Figur 14A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,0 til 62,0 celler. Generelt registreres en tydelig økning i antall mastceller ved 2, 4 og 24 timer i forhold til utgangsverdi (figur 14B). Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnitt endring ved 2, 4 og 24 timer ligger utenfor aksept grensene for tillat bias, samtidig som endring i flere enkelt prøve overskrider aksept grensene for tillat totalfeil. Antall mastceller er da utenfor de satte krav til holdbarhet for disse tidspunktene.

3.1.5 Holdbarhet på Makrofager i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur

Resultatene i figur15 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for manuell telling av makrofager i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur. På grunn av lite mengde datamateriale ble ikke måledata for manuell telling av nøytrofile granulocytter og eosinofile granulocytter inkludert i holdbarhetstestene.

Det ble undersøkt endring i antall makrofager ved 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 15B). Endring i enkelt prøve ved 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også testet mot aksept grensene for tillat totalfeil. Utviklingen i antall makrofager visualiseres i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur 15A)





***Figur 15A**. Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte makrofager i BAL prøver (n=20). Hver linje representerer utviklingen av antall makrofager fra utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) til sluttverdi (24 timer ved kjøleskaps temperatur) hos enkelt prøve. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve mens Y-aksen viser antall makrofager per 100 celler.*

***Figur 15B**. Grafisk fremstilling over endring i antall makrofager i kjøleskap-prøver ved 24 timer i forhold til utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) X-aksen viser henstandstid i timer mens Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

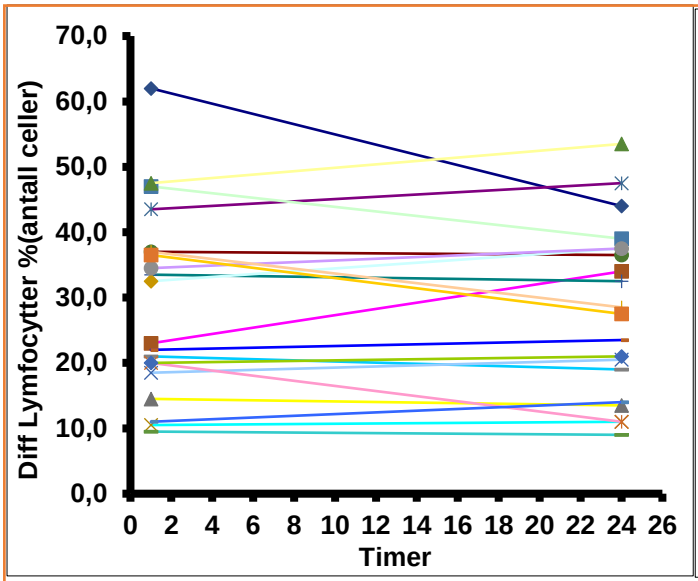
Figur 15A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 25,0 til 88,0 celler. Enkelt prøve-relaterte endringer i antall makrofager ved 24 timer viser ikke tydelig retning. Det blir registrert en lett økning og/eller reduksjon i antall makrofager hos noen prøver og ingen merkbare endringer hos andre. En lignende utvikling observeres også for lymfocytter og mastceller (figur 15A og 15A).

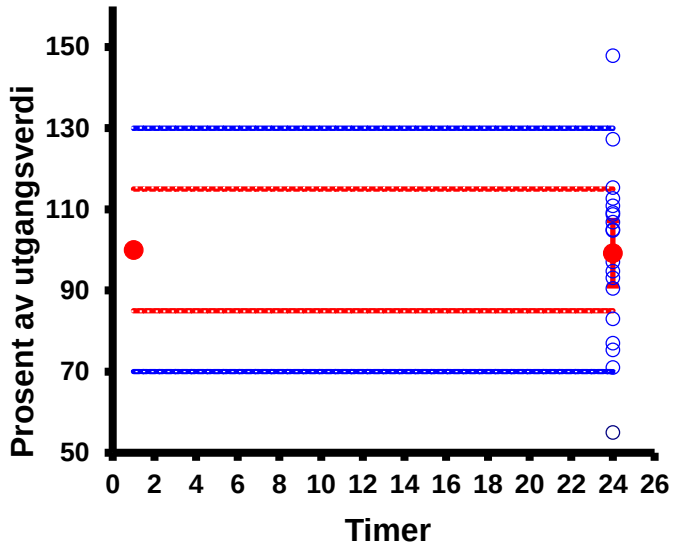
Generelt registreres en økning i antall makrofager ved 24 timer i forhold til utgangsverdi (figur 15B), og det øvre konfindensintervallet for endringen her tydelig overskrider den øvre grensen for tillat bias. I tillegg er det mer enn en (totalt to) enkelt prøver der endringene i makrofag-tallet overskrider den ene (øvre) grense for tillat totalfeil. Antall makrofager er utenfor de satte krav til holdbarhet etter 24 timer henstand i kjøleskaps temperatur.

3.1.6 Holdbarhet på Lymfocytter i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur

Resultatene i figur 16 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for manuell telling av Lymfocytter i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur. På grunn av lite mengde datamateriale ble ikke måledata for manuell telling av nøytrofile granulocytter og eosinofile granulocytter inkludert i holdbarhetstestene.

Det ble undersøkt endring i antall lymfocytter ved 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 16B). Endring i enkelt prøve ved 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også vurdert mot aksept grensene for tillat totalfeil. Utviklingen i antall lymfocytter visualiseres i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur 16A)





***Figur 16A**. Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte lymfocytter i BAL prøver (n=20). Hver linje representerer utviklingen av antall makrofager fra utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) til sluttverdi (24 timer ved kjøleskaps temperatur) hos enkelt prøve. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve mens Y-aksen viser antall lymfocytter per 100 celler.*

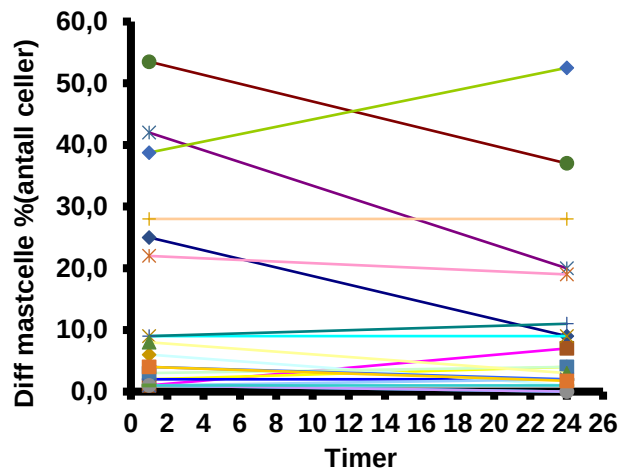
***Figur 16B**. Grafisk fremstilling over endring i antall lymfocytter i kjøleskap-prøver ved 24 timer i forhold til utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) X-aksen viser henstandstid i timer mens Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

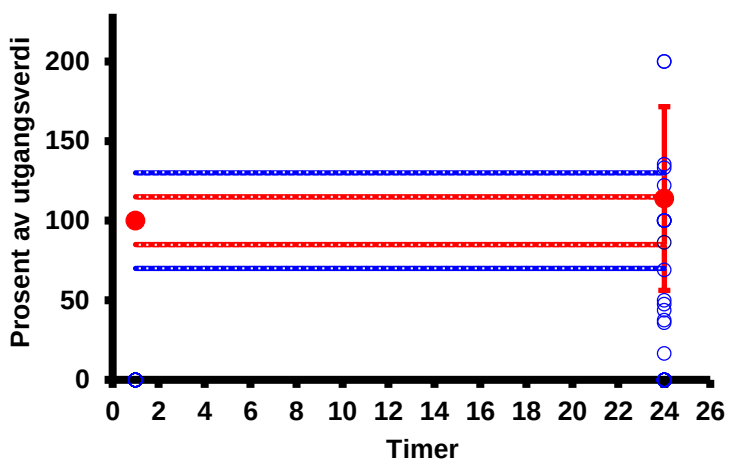
Figur 16A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 9,0 til 62,0 celler. Figur 18B viser relativt svake endringer i antall lymfocytter ved 24 timer i forhold til utgangsverdi, og konfindensintervallet for endringen her ligger godt innenfor grensene for tillat bias. Antall lymfocytter er utenfor de satte krav til holdbarhet etter 24 timer henstand i kjøleskaps temperatur.

3.1.7 Holdbarhet på Mastcelle i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur

Resultatene i figur 17 ble beregnet på grunnlag av måleverdier for manuell telling av Mastcelle i BAL prøver oppbevart i kjøleskaps temperatur. På grunn av lite mengde datamateriale ble ikke måledata for manuell telling av nøytrofile granulocytter og eosinofile granulocytter inkludert i holdbarhetstestene.

Det ble undersøkt endring i antall mastceller ved 24 timer i forhold til utgangsverdi ved 1 time, og i så fall om denne endringen ligger innenfor aksept grensene for tillat bias (figur 17B). Endring i enkelt prøve ved 24 timer i forhold til utgangsverdi ble også testet mot aksept grensene for tillat totalfeil. Utviklingen i antall mastcelle visualiseres i form av prøve-spesifikke farge kodet linjer (figur 17A)





***Figur 17A**. Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte mastceller i BAL prøver (n=20). Hver linje representerer utviklingen av antall mastceller fra utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) til sluttverdi (24 timer ved kjøleskaps temperatur) hos enkelt prøve. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Y-aksen viser antall mastceller fra 25 ulike synsfelt.*

***Figur 17B**. Grafisk fremstilling over endring i antall mastceller i kjøleskap-prøver ved 24 timer i forhold til utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) X-aksen viser henstandstid i timer mens Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Figur 17A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 0,0 til 54,0 celler. Figur 19B viser en økning i antall mastceller ved 24 timer i forhold til utgangsverdi, og konfindensintervallet for endringen her overskriver både øvre og nedre grensene for tillat bias. Antall mastceller er utenfor de satte krav til holdbarhet etter 24 timer henstand i kjøleskaps temperatur.

4.0 Diskusjon

Siden på 1970 tallet har det vært en stadig økning i bruk bronkialskyllevæske som prøvemateriale til diagnostikk av diverse lungesykdommer særlig interstitielle lungesykdommer (ILD). Til tross for dette finnes det overraskende få kliniske studier om hvordan holdbarheten av BAL cellene endrer seg på en temperatur og tidsavhengig måte. Med dette kommer det store utfordringer tilknyttet standardisering av prosedyre for behandling av BAL prøver. I dette forskningsprosjekt har det blitt undersøkt hvordan holdbarheten av celler i BAL prøver ved oppbevaring i romtemperatur eller i kjøleskaps-temperatur etter 1, 2, 4 og 24 timer. Nedenfor diskuteres resultatene fra automatisert og manuell celletelling av leukocytter i BAL prøver.

Holdbarhet på totalt antall leukocytter i BAL prøver oppbevart i romtemperatur.

I romtempererte BAL prøver ble det observert en tilsynelatende tidsavhengig reduksjon i totalt antall leukocytter målt i perox kanal (WBCP). Konfidensintervallet til gjennomsnitt endring i WBCP-verdier ved 2 timer lå godt innenfor akseptabelt område (tillatt bias) (figur 8B). Dette kan tyde på at tap av leukocytter i BAL celler har satt i gang men trolig i relativt små grader at prøvene kan fremdeles anses som holdbare.

Etter 4 timers henstand i romtemperatur reduserte WBCP verdier enda mer slik at avviket fra utgangsverdien ble enda større. Det ble observert at den nedre delen av 90 % konfidensintervallet til endringen tangerte (eller lett krysset) den nedre aksept grensen for tillatt bias (figur 8B). Dette skapte et tvilstilfelle som ble oppklart ved hjelp av enda et kvalitetskriteria (tillat totalfeil). Det var ikke mer enn en enkelt prøve der avvik mellom utgangsverdi og WBCP verdier ved 4 timer lå utenfor aksept område for tillatt totalfeil. Det ligger mye usikkerhet bak denne bestemmelsen siden det lå flere lave måleverdier tett inntil denne grensen. Oppfyllelse av dette kvalitetskravet gjør at BAL prøvene kunne trolig anses som holdbare etter 4 timers henstand i romtemperatur. Resultatene fremvist i figur 8B kunne tyde på at BAL prøver tåler å oppbevares i romtemperatur borte mot 4 timer uten at totalt antall leukocytter (WBCP) endre seg såpass så mye at det innføres betydelig mengde systematisk feil i analyseresultatene. Som forventet fortsatte reduksjonen i totalt antall leukocytter ved forlenget oppbevaring av BAL prøver i romtemperatur. Figur 8B viser tydelig at nedre delen av konfidensintervall til endring ved 24 timer overskred for tillatt bias. Det er viktig å legge vekt på at de oppnådde WBCP målinger i dette forsøket lå i et konsentrasjonsområde nær den funksjonelle-sensitivitets grensen for ADVIA2120i på 0,05 * 10^9/L. Med så lave konsentrasjoner er det stor risiko for at maskinen gir usikre tall estimat på celle-konsentrasjon. Fortolkninger av disse resultatene bør dermed behandles med forsiktighet.

I likhet med WBCP var endringen i totalt antall leukocytter målt i baso kanal (WBCB) preget av en generell reduksjon i WBCB verdier. Det ble observert relativt lite endring i WBCB verdier ved 2 timer i forhold til utgangsverdien men fra 4 til 24 timer ble det observert at WBCB verdier reduserte på en tidsavhengig måte (figur 9B).

Det er viktig å påpeke uoverensstemmelse for oppfyllelse av kvalitetskrav om tillat bias mellom WBCP og WBCB ved 4 timer (figurene 8A og 9A). Mens konfidensintervall for endring i WBCP verdier så vidt krysset den nedre grensen for tillat bias, lå konfidensintervall for endring i WBCB verdier godt innenfor område for tillat bias. En mulig forklaring på denne uoverensstemmelse kan være en kombinasjon av at det var utilstrekkelig antall prøver og at en betydelig del av disse hadde lave celle-konsentrasjon. Dette kan da ha bidratt større spredning i 90 % konfidensintervallet for gjennomsnittlige endring i WBCP verdier ved 4 timer. En økning i antall prøver med relativt høyere celle-konsentrasjon (ca.$0,2*10^9$/L) ville bidratt til å tette dette konfidensintervallet slik at det kunne mest sannsynlig havnet innenfor område for tillat bias.

Det at konfidensintervall for endring i WBCB ved 4 timer lå innenfor akseptabelt område må fortolkes med forsiktighet på grunn av to hovedgrunner:

1) Målinger i baso kanal baserer seg på cellekjerner som er kjent for å være stabile sammenlignet med hele celler. Denne stabiliteten av cellekjernene kan da manifestere seg i WBCB verdier som også holder seg stabile. Det kan ikke utelukkes at det relativt stabile WBCB-data var mindre følsom for endringene i totalt antall celler mellom utgangsverdi og ved 4 timer.

2) Sammenlignet med perox kanal har baso kanal mindre diskriminantene evne til å skylle leukocytter fra ikke-hematopoietiske celler (ikke-hvite blodceller). Dette kan skyldes at i baso kanalen telles cellekjerner for alle typer celler i prøven (både leukocytter og ikke-leukocytter). Et godt eksempel på slike celler i BAL prøver kan være lunge epitelceller fra bronkiole-slimhinner og plateepitel celler fra alveoler (figur 25 **I**). Det kan da ikke ses bort ifra at ikke-hematopoietiske celler bidrar til WBCB verdier. Dette ble påvist da statistiske sammenligninger (parret T-test) viste at WBCB verdier var gjennomsnittlig høyere en WBCP verdier med cirka 30% (tabell 2). Bidraget fra ikke-hematopoetiske celler kunne bidratt til å gi et upresist inntrykk av lite avvik i totalt antall leukocytter mellom utgangspunktet og ved 4 timer. Oppsummert kan den ovennevnte uoverensstemmelsen muligens skyldes noe lav følsomhet for endringer i WBCB som kan komme av cellekjerne-stabilitet og/eller bidraget fra cellekjerner av ikke-hematopoietiske celler i prøven.

Etter 24 timers henstand i romtemperatur gikk mange leukocytter i oppløsning slik at det ble registrert en kraftig reduksjon i totalt antall leukocytter fra begge analyse-kanalene (baso og perox). I likhet med WBCP ble det observert at nedre delen av konfidensintervall til endring i WBCB verdier ved 24 timer overskred nedre

grensen for tillatt bias (figur 9A). Dette kunne tilsi at BAL prøvene ikke var holdbare etter 24 timers henstand i romtemperatur. En mulig forklaring på reduksjonen i antall celler i BAL prøve kan være at disse cellene oppbevares i fysiologisk saltvann (0,9%) som er en dårlig erstatning for det naturlige oppbevaringsmedium (blodplasma). Saltvannet har lavere pH (< 7,4). Det er naturlig å tro at avvik i totalt antall celler og den generelle cellulære sammensetning mellom 24 timer gammel prøve og 1 time gammel (fersk) prøve vil være stort og at prøven ikke vil være representativt for pasientens reelle lungetilstand.

Som fremvist i figurene 8A og 9A var måleverdier for totalt antall leukocytter i enkelt prøve variert. Dette ble også observert under mikroskopi der noen prøver hadde intakte celler mens andre hadde celler med varierende grader av deformasjoner-fra små membran skade til "smudge" (figurene 23 og 24 i vedlegg 12 og 13). Denne utydeligheten i utviklingen av målinger for totalt antall leukocytter kan ikke skyldes analytiske faktorer siden alle prøvene ble behandlet likt og ifølge godt etablerte prosedyrene. I tillegg viste beregningene av analysemetodens presisjon (repeterbarhet) at presisjonskravet (CV ≤ 20,0%) ble oppfylt (tabell 3, vedlegg 4). En mulig forklaring på den utydelige utviklingen i målinger for totalt antall leukocytter kan være intra-individuelle forskjeller mellom prøver/pasienter. Det må påpekes at BAL prøvene ble tatt fra pasienter med ulike typer og omfang av lungesykdommer, fra nesten friske til veldig syke. Det er da naturlig å mene at disse cellene pasient-prøvene vil ha ulik stabilitet.

Holdbarhet på totalt antall leukocytter i BAL prøver oppbevart i kjøleskaptemperatur.

I kontrast med romtempererte BAL prøver ble det observert mindre fall i totalt antall leukocytter (WBCP) i prøvene som var oppbevart i kjøleskaptemperatur ved alle henstandstidene (figur 10A). Den tydelige tidsavhengige reduksjonen i WBCP verdier som ble observert i romtempererte prøver endret seg til et noe utydelig og svakt mønster i kjøleskap-prøver. Konfidensintervall for endringer i WBCP ved 2 og 4 timer holdt seg innenfor område for tillat bias, noe som tilsier god holdbarhet ved disse tidene.

Det er viktig å gjøre oppmerksom på forskjeller mellom romtempererte og kjøleskap-prøver når det gjelder endringer i WBCP ved 24 timer. Konfidensintervall til endringene i WBCP i romtempererte prøver hadde tydelig overskredet den nedre grensen til område for tillat bias. Denne utviklingen så ut til å ha blitt reversert i kjøleskap-prøver der kun en liten del av konfidensintervall så vidt krysset den nedre grensen av område for tillat bias. Dette kunne tolkes som en forbedring av holdbarhet som kom av nedkjøling av prøvene. Men tiltros for denne antatte forbedringen ble det observert at det var flere enkelt prøver der variasjon i måleverdier var

større enn tillat totalfeil. Ut ifra dette kan det postuleres at kjøleskap-prøver ikke var holdbar etter 24 timers henstand.

Dette resultatet viste at nedkjøling av BAL prøvene i kjøleskaptemperatur kan muligens ha en positiv effekt på holdbarhet av prøvene. Dette var i enighet med observasjoner fra mikroskopering av MGG-fargede cytospinpreparat som viste reduksjon i antall og omfang av deformerte celler i kjøleskap-prøver i forhold til romtempererte prøver. Selv om leukocyttene fra de forskjellige prøvene ble preget ulikt, ble det generelt observert mindre avvik på kvaliteten på cellene og fargen mellom 1 og 2 timer og, 4 og 24 timer i kjøleskap-prøver.

Figur 11B viste at det var relativt små avvik i WBCB verdier mellom utgangsverdien og målinger ved 2 og 4 timer. Konfidensintervall til endringene i WBCB ved disse tidspunktene lå innenfor område for tillat bias. I tillegg ble det ikke observert enkelt prøver der avvik i WBCB verdier mellom 1 time og, 2 og 4 timer var større enn tillat totalfeil. Dette kunne tilsi at BAL prøvene kan være stabile opptil 4 timers henstand i kjøleskap. Etter 24 timers henstand i kjøleskap var det vanskelig å observere noen merkbare endringer i WBCB verdier i forhold til utgangsverdi. Dette ble også reflektert i konfidensintervallet som lå godt innenfor område for tillat bias. Til Tross for dette kunne det ikke bestemmes at prøvene var holdbare. Dette er på grunn av at det ble observert at flere enn en prøve hadde en variasjon i WBCB verdier som var større enn den tillate totalfeil.

Som nevnt tidligere er baso verdier mer stabile enn WBCP verdiene. Denne stabiliteten kommer av at det målinger baserer seg på telling av cellekjerner som er kjent for å være stabile og baso kanalens manglende evne til å diskriminere leukocytter fra ikke-hematopoietiske celler. Denne stabiliteten av WBCB verdier bringer med seg fare for redusert følsomhet for reelle endringer i totalt antall leukocytter, og dette kan være en mulig feilkilde å være oppmerksom på.

Den observerte nedkjølingseffekten på holdbarheten av BAL prøvene må tolkes med forsiktighet. Dette er fordi det var noe lavt antall prøver (n=20) til å konkludere med hensyn til hvor mye totalt antall leukocytter (WBCP/WBCB) synket. Dette kunne oppklares i forsøk med større populasjonsstørrelse og flere henstandstider, særlig mellom 4 og 24 timer.

Holdbarhet på antall leukocytter etter manuell differensial celletelling

Leukocytter i BAL prøver skal ha vandret fra sitt naturlig miljø (blodplasma) og samlet seg i slimhinner i nedre luftveier hvor de holder seg i en viss tid før de suspenderes i fysiologisk saltvann. I forhold til blodplasma har BAL prøver lavere pH (< 7,4) og er fattig på fett, lipider og andre type næring. Slike stressende forhold får leukocyttene til å gjennomgå både biokjemiske og morfologiske endringer som for eksempel endret cellevolum, kjernelobularitet og økt desintegrering. Disse cellulære endringene kan ha uheldige konsekvenser for plassering av BAL cellene i riktig cellepopulasjon i baso og perox cytogram. Dette ville i sin tur føre til feil i automatisert differensial celletelling på ADVIA2120i.

Manuell differensialtelling blir et godt alternativ men denne metoden er generelt upresis. Dette er fordi utfall av celletelling kan variere ut ifra sentrifugering, kvaliteten av fargeprosessen, hvor på cytospinpreparat tellingen utføres og faglig kunnskap til utføreren (Keith C and Ganesh, 2007). Alle disse faktorene gjør at resultatene fra manuell differensialtelling av leukocytter i BAL prøver bør tolkes med forsiktighet.

Holdbarhet på manuell telte makrofager

Det ble observert en lett økning i antall makrofager i romtempererte prøver ved 2,4 og 24 timer. Den samme trenden ble i kjøleskap-prøver ved 24 timer. Dette motstride forventningene om reduksjon i antall celler (makrofager) etter henstand i romtemperatur. Det er viktig å nevne at makrofager kan inneholde flere enn en kjerne. Når disse flerkjernede makrofager begynne å desintegrere slik at cytoplasma deles opp, kan det dannes celle-lignende fragmenter som kan forveksles med ekte makrofager. En mulig forklaring på den observerte økningen i antall makrofager kunne være at makrofag-fragmenter (som det ble flere av ved lenger henstand) ble feilaktig telt som makrofager. I tillegg ble det observert registrert noen prøver der lymfocytter var oppsvulmede og endret morfologien sin slik at de lignet på små makrofager. Dette ble observert ved 4 timer og i økende grad ved 24 timer. Slike lymfocytter kunne også bidratt til å gi falskt forhøyet tall på makrofager.

Figuren 12B viste kvalitetskrav for tillat bias og tillat totalfeil ble oppfylt både ved 2 og 4 timer. Dette kunne dermed tolkes at makrofager kan være stabile opptil 4 timers henstand i romtemperatur. Selv om konfidensintervall kom så vidt over øvre grensen for tillat bias, kan det være sannsynlig at makrofager holdt seg stabile etter 24 timers henstand i romtemperatur. Denne vurderingen var basert på oppfyllelse av kvalitetskrav om tillat totalfeil. Figur 15B viste at ingen av de to kvalitetskravene ble oppfylt når det gjelder endringer i antall makrofager etter 24 timers henstand i kjøleskaptemperatur. Dette var overraskende siden det var forventet en positiv nedkjølingseffekt på holdbarhet. Hva dette kunne ha kommet av er ukjent.

Holdbarhet på manuell telte lymfocytter

Figur 13B viste at hverken kravet om tillat bias eller tillat totalfeil ble oppfylt etter 4 og 24 timers henstand i romtemperatur. Det var bare ved 2 timer der det ble observert at konfidensintervall til endring i antall lymfocytter i forhold til utgangsverdien holdt seg innenfor område for tillat bias. Dette kunne tyde på at lymfocytter var stabile bare opptil 2 timers henstand i romtemperatur. Dette resultatet bør behandles med stor forsiktighet fordi det ble notert at kvaliteten på lymfocytter var ganske variabelt med prøven/pasient. Det ble for eksempel observert at lymfocytter i enkelt prøve var preget ulikt; i noen prøver var lymfocytter krympet (uten synlig lett cytoplasma) og hyperkromatiske, disse kunne lett forveksles med fargeflekker, i andre prøver var de oppsvulmede og lignet på små makrofager (vedlegg 13). Omfanget av slike morfologiske endringer på lymfocytter økte i takt med henstandstid. Dette kan ha påvirket påliteligheten av resultatene.

Figur 16B viste at konfidensintervallet til endringer i antall lymfocytter fra kjøleskap-prøver ved 24 timer lå godt innenfor område for tillatt bias. Dette kunne tyde på at nedkjøling kan positiv effekt på holdbarheten av lymfocytter i BAL prøver.

Holdbarhet på nøytrofile- og eosinofile granulocytter

Etter telling av nøytrofile- og eosinofile granulocytter ble det generert lite datamateriale. Generelt ble det telt mellom 0 til 5 celler i alle prøver og variasjon i slike lave verdier ble for høy at presisjonskrav ikke ble oppfylt. Vurdering av stabiliteten av disse cellene baserte seg observasjoner gjort under mikroskopering av cytospinpreparat. Generelt ble det observert en tilsynelatende tidsavhengig reduksjon i nøytrofile granulocytter. Etter 4 timers henstand ble det observert at flere celler gikk i oppløsning og etterlot seg rosa/lysbrun-fargede flekker ("spøkelser"). Den utviklingen ble forsterket etter 24 timers henstand og var mer tydelig i romtemperatur enn kjøleskaptemperatur (figur 24**E** og 24**F**).

I motsetning til nøytrofile granulocytter, så det ut som om eosinofile granulocytter klarte seg mye bedre både i rom og kjøleskaptemperatur. Det ble observert tydelig deformasjoner (degranulering, ujevn plasmamembran og endrede kjerne-struktur) særlig ved 24 timers henstand i romtemperatur, men cellene var intakte og fremdeles lett gjenkjennbare.

Holdbarhet på mastceller

Det ble observert en tydelig økning i antall mastceller i romtempererte prøver ved alle henstandstidene (figur 14B). Dette var det motsatte av den forventede utviklingen siden det normalt vis forventes at antall celler enten holder seg stabil eller reduserer, men ikke øke. Disse forventningene bygger på at BAL er unaturlig væske med ugunstige forhold for cellene. Forklaring på økning i antall mastceller er spekulativ, men det kan mistenkes at andre celletyper kunne gjennomgått degenerative endringer som muligens fikk dem til å ta opp mastfargen og dermed lignet på mastceller. Det må også nevnes at det ble observert betydelig uforutsigbarhet tilknyttet observasjoner under mikroskopering av mastfarge-preparat. Observasjon av deformerte mastceller (figur 23, vedlegg 12) fulgte ikke noe mønster med hensyn til oppbevaringstemperatur og henstandstid. Ødelagte celler ble observert i ferske prøver (1 time) og 24 timers prøver både i rom og kjøleskaptemperatur.

Ingen av kvalitetskravene ble oppfylt ved alle henstandstidene både i rom og kjøleskaptemperatur, noe som kunne tyde på av mastceller ikke var stabile. Men det må påpekes at kvaliteten på analyseresultatene mastceller ikke var tilstrekkelig bra. Populasjonen består av en overvekt med lave verdier på mastceller, der 12 av 20 prøver hadde mindre enn 10 mastceller. Den store variasjonen som tilknyttes slike lave verdier kan ha bidratt til å utvide 90% konfidensintervall (KI). Dette er fordi "standard error of mean" (SEM) som inngår i beregning av KI øker i takt med økende variasjon i data. Økning i SEM vil i sin tur bidra til stor 90% KI (se delkapittel 2.7). Det ble gjort forsøk på å bedre datamateriale ved å eliminere prøver med lave verdier (figur 21B, vedlegg 10), men det ble for få antall prøver (n=8) til å utføre statistiske signifikante vurderinger av holdbarhet (standardisert krav på 20-40 prøver i holdbarhetsstudier). Eventuelt kan det vurderes spørsmål om kvalitetskravene ble litt for strenge for mastceller

5.0 Konklusjon

Etter manuell og maskinell telling av leukocytter i BAL prøver ble det generelt observert at kvalitetskravene for tillat bias (15,0%) og tillat totalfeil (30,0%) ble oppfylt for endring i totalt antall leukocytter (WBCP og WBCB) borte mot 4 timer både i rom og kjøleskaptemperatur. Det så ut som om omfanget av disse endringene var mindre i kjøleskaptemperatur i forhold til romtemperatur. Dette kunne tyde på at nedkjøling av BAL prøver kan muligens ha en positiv effekt på cellenes stabilitet. Kvalitetskravene ble ikke oppfylt etter 24 timers henstand både i rom og kjøleskaptemperatur. Dette kunne tyde på at BAL prøver hadde dårlig holdbarhet etter lenger henstand. I tillegg ble det påvist at WBCB verdier var mer stabile og høyere (ca. 30%) enn WBCP verdier. Dette kunne gjøre WBCB verdier mindre følsomme for endringer, dette kunne medføre en risiko for at reelle endringer i totalt antall leukocytter ikke kom til uttrykk.

En generell økning i antall makrofager ved alle henstandstidene både i romtempererte og kjøleskap-prøver var et motstridende funn i forhold til forventninger. Dette ble tilskrevet mulig dannelse av celle-lignende fragmenter etter desintegrering av flerkjernede makrofager. Makrofagene så ut til å være stabile opptil 24 timers henstand i romtemperatur. Dette korresponderte den generelle observasjonen av at intakte makrofager i mikroskopet ved alle tidspunktene. Av uforståelige grunner virket det som om makrofagene ikke var stabile etter 24 timers henstand i kjøleskap.

Resultatene tydet på at lymfocytter var stabile bare opptil 2 timers henstand i romtemperatur. Samtidig ble det observert variasjon i kvalitet på lymfocytter både når det gjaldt cellestruktur og fargekvalitet. Vurdering av cytospinpreparat tydet på nøytrofile granulocytter var stabile opp til 2 timer i romtemperatur, ved 4 timer hadde en betydelig del av dem gått i oppløsning og etter 24 timer var det veldig sparsomt med nøytrofiler. Men denne utviklingen virket til å ha blitt dempet i kjøleskap-prøver. Eosinofile granulocytter virket å være preget i mindre grad sammenlignet med nøytrofile granulocytter. Det ble observert intakte eosinofile med riktig farge-kvalitet selv etter 24 timers henstand i romtemperatur. Analyseresultatene for mastceller var ikke av tilstrekkelig kvalitet for å kunne utføre vurdering av deres stabilitet.

Alt i alt, gir analyseresultatene en sterk antydning om at romtempererte BAL prøver kan være holdbare borte mot 4 timer og at nedkjøling av prøvene i kjøleskap kan ha positiv effekt på holdbarheten av disse prøvene. Funnene gjort her peker på at BAL romtempererte BAL prøvene ikke bør vente lenger enn 24 timer før analysering. Ved henstand lenger enn 24 timer bør prøvene helst oppbevares i kjøleskaptemperatur. Dette er bare antydninger, ikke fastsatte konklusjoner. For å dra mer sikre konklusjoner burde forsøket hatt populasjonsstørrelse på opptil 40 prøver med relativt høyere måleverdier (ca.0,2*10^9/L) og flere henstandstider særlig mellom 4 og 24 timer.

6.0 Kildeliste

▪ Keith C., Meye, and Raghu Ganesh. 2007. "THE CLINICAL UTILITY OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE CELLULAR ANALYSIS IN INTERSTITIAL LUNG DISEASE: AN ATS CLINICAL PRACTICE GUIDELINE." *University of Wisconsin School of Medicine and Public Health*.

Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science.

Astrid Mette, Husby. 2018. *Blodprøvetaking I Praksis*. Cappelen Damm Akademisk.

Bain, Barbara J. 2017. "Preparation and Staining Methods for Blood and Bone Marrow Films." In *Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition)*, edited by Barbara J. Bain, Imelda Bates, and Michael A. Laffan, 50–60. Elsevier. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702066962000047.

Barbara, Young, O'Dowd Geraldine, and Woodford Phillip. 2013. "Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas." Adlibris. November 1, 2013. https://www.adlibris.com/no/bok/wheaters-functional-histology-a-text-and-colour-atlas-9780702047473?fbclid=IwAR21gr0CUhsMRefjnIc2C3NZT-WTkcz_UacdFbpueODS6wugWriESFT5S4A.

Carden, Jennings. 2005. "The ADVIA 2120 Hematology System: Flow Cytometry-Based Analysis of Blood and Body Fluids in the Routine Hematology Laboratory." ResearchGate. 2005. https://www.researchgate.net/publication/7944491_The_ADVIA_2120_Hematology_System_Flow_Cytometry-Based_Analysis_of_Blood_and_Body_Fluids_in_the_Routine_Hematology_Laboratory.

Grethe, Hellem, and Nygaard Wedø Tonje. 2016. "ADVIA2120i; Oppstart, Bruk, Avslutt Og Vedlikehold." *Avdeling for Medisinsk Biokjemi, AMB. 1.5-EQS*.

Gunnar, løvås. 2013. *Statistikk for Universitetet Og Høyskoler*. Oslo: Universitetsforlag.

Histalim. 2005. "May-Grünwald Giemsa." *Histalim* (blog). 2005. https://www.histalim.com/home/activities/our-services/histology/may-grunwald-giemsa/.

"Interstitiell lungesykdom / Autoimmun Lungefibrose & Revmatisk sykdom." n.d. *BINDEVEVSSYKDOMMER.NO* (blog). Accessed March 25, 2019. https://bindevevssykdommer.no/lungesykdom/interstitiell-lungesykdom-revmatisk-sykdom/.

Ju Ryu, Yon, Man Pyo Chung, Joungho Han, Tae Sung Kim, Kyung Soo Lee, Eun-Mi Chun, Sun Young Kyung, et al. 2007. "Bronchoalveolar Lavage in Fibrotic Idiopathic Interstitial Pneumonias." *Respiratory Medicine* 101 (3): 655–60. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.06.003.

Kara, Rogers. 2018. "Mast Cell | Biology." Encyclopedia Britannica. desember 2018. https://www.britannica.com/science/mast-cell.

Keith C, Meyer. 2007. "Bronchoalveolar Lavage as Diagnostic Tool." *Department of Medicine, Section of Allergy, Pulmonary and Critical Care Medicine: University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison; Wisconsin* 28: 546–60. https://doi.org/10.1955/s-20007-991527.

Kindt, Thomas J, Richard A Goldsby, Barbara Anne Osborne, and Janis Kuby. 2007. *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman.

Kristin, M Aakre, Rustad Pål, Eilertsen Heidi, Kalfoss Torill, Åsberg Arne, and Helen Kristoffersen Ann. 2014. "Nasjonalt Prosjekt for Standardisering Av Holdbarhetsforsøk." *Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetssikring (NKK)*,.

Kruijff, B. de, and P.R. Cullis. 1980. "The Influence of Poly(l-Lysine) on Phospholipid Polymorphism Evidence That Electrostatic Polypeptide-Phospholipid Interactions Can Modulate Bilayer/non-Bilayer Transitions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 601: 235–40. https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90528-3.

Meyer, Keith C., and Ganesh Raghu. 2000. "THE CLINICAL UTILITY OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE CELLULAR ANALYSIS IN INTERSTITIAL LUNG DISEASE: AN ATS CLINICAL PRACTICE GUIDELINE." In . K4/910 Clinic Science Center 600 Highland Avenue Madison, WI 53792-9988.

Meyer, Keith C., Ganesh Raghu, Robert P. Baughman, Kevin K. Brown, Ulrich Costabel, Roland M. du Bois, Marjolein Drent, et al. 2012. "An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung

Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185 (9): 1004–14. https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0320ST.
Michael, Daws. 2014. "Blod Og Beinmarg." *Universitet I Oslo, Avdeling for Anatomi*, February.
Nicola, Parry. 2014. "Toluidine Blue – A Histology Stain for Mast Cells (and Other Things!)." *Bitesize Bio* (blog). January 28, 2014. https://bitesizebio.com/19048/toluidine-blue-a-histology-stain-for-mast-cells-and-other-things/.
Olav, Sand, Sjaastad Øystein V, Haug Egil, and Bjålie Jan G. 2006. "Menneskekroppen." Tanum. 2006. https://www.tanum.no/_menneskekroppen-9788205348073.
Patel, Pujan H., and Saad Ullah. 2019. "Bronchoalveolar Lavage." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430762/.
Quinn, P J. 1985. "A Lipid-Phase Separation Model of Low-Temperature Damage to Biological Membranes." *Department of Biochemistry, King's College, London (KQC'), London, W8 7AH, U.K.*, 128–46.
Reisner, Howard. 2013. *Essentials of Rubin's Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins.
Skjønsberg, Ole Henning. 2014. "bronko-alveolær lavage." In *Store medisinske leksikon*. http://sml.snl.no/bronko-alveol%C3%A6r_lavage.
Solem, A. 2013. "Holdbarhet Av prøvemateriale.AMB" 1.5.
Sridharan, Gokul, and Akhil A Shankar. 2012. "Toluidine Blue: A Review of Its Chemistry and Clinical Utility." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 16 (2): 251–55. https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081.
Terje, Johannessen, and Kvam Merethe. 2016. "Bronkoskopi." NHI.no. April 21, 2016. https://nhi.no/sykdommer/lunger/undersokelser/bronkoskopi/.
Travis, William D., Ulrich Costabel, David M. Hansell, Talmadge E. King, David A. Lynch, Andrew G. Nicholson, Christopher J. Ryerson, et al. 2013. "An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188 (6): 49–51. https://doi.org/10.1164/rccm.201308-1483ST.
WebMed, Med. 2005. "Lung Diseases Overview." WebMD. 2005. https://www.webmd.com/lung/lung-diseases-overview.
Yeagle, P. L. 1989. "Lipid Regulation of Cell Membrane Structure and Function." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3 (7): 1833–42.

7.0 Vedlegg

Vedlegg 1: Telling av totalt antall celler (farging og differensialtelling)

Bronkialskyllevæske (BAL). Telling av totalt antall celler. Farging og differensialtelling. AMB

Forfatter: Ellen Marie Hageler | Gyldig fra: 28.03.2018 | Revisjon: 2.1
Godkjent av: Kristine Bodal Solem | Revisjonsfrist: 27.03.2020 | ID: 9545

Hensikt og omfang

Prosedyren beskriver telling av leukocytter i bronkialskyllevæske (BAL) på Advia 2120i, tillaging og farging av cytospinpreparat med **May-Grünwald/Giemsa** og **Mastfarging**. Svarrapportering i NSL beskrives.

Grunnlagsinformasjon

Farging av cytospinpreparat gjør det mulig å differesialtelle og å finne og telle eventuelle mastceller.

Differensialtelling kan bidra til å påvise infeksiøse og inflammatoriske lungesykdommer, og avgrense aktuelle differensialdiagnoser ved mistanke om interstitiell lungesykdom inkludert sarkoidose.
Ved å differensialtelle cellene i BAL ser man om cellefordelingen er normal. Avvikende differensiering kan skyldes ulike sykdommer. Ved lungeasbestose kan evt. asbestfibre påvises.

Flere studier på telling av celler i bronkialskyllevæske (BAL) oppgir at andel **mastceller** er en brukbar indikasjon for å skille mellom forskjellige diagnoser ved interstitiell lungesykdom (betennelsesforandringer i lungevevet). Mastceller finnes i økt antall i BAL ved medikament-indusert interstitiell lungesykdom og ved hypersensitivitetspneumonitt (allergisk alveolitt).

Tolkning

Relativ fordeling av cellepopulasjoner hos frisk ikke-røyker farget med **May-Grünwald/Giemsa**:

Celler som telles	Differensialtelling %	Avvik %
Makrofager	89	+/- 3
Nøytrofile granulocytter	1	+/- 1
Eosinofile granulocytter	<1	
Lymfocytter	8	+/- 2

I tillegg kan det i utstryk finnes erytrocytter, epitelceller, mikrober, monocytter, basofile granulocytter og plasmaceller.

Det er økning av

lymfocytter ved:	neutrofile granulocytter ved:	eosinofile granulocytter ved:
Sarkoidose	Bakteriell pneumoni	Astma
Tuberkulose	Sigarettrøyking	Eosinofil pneumoni
Virusinfeksjon	Rheumatoid arthrit	Idiopatisk lungefibrose

I **Mastfarget** utstryk finnes og telles mastceller.

Ansvar

Bioingeniør

Arbeidsbeskrivelse

Analyseprinsipp

For **May-Grünwald/Giemsafarging** se May-Grunwald/Giemsa farging. AMB

Mastcellenes cytoplasma inneholder mange små korn. I mikroskopet ser det ut som om de har "forspist" seg på partikler. Kornene inneholder bl.a. histamin og heparin. Når mastcellene farges med toluidinblått, blir kornene farget sterkt blå. Slik kan mastcellen identifiseres.

Prøvemateriale

Ved bronkoskopi blir litt væske (NaCl 0.9%) skylt ned i alveolene og suget opp igjen sammen med celler. Det er viktig at prøven blir sendt på plastrør, fordi makrofagene kan feste seg til glass. Bronkialskyllevæsken leveres i 10 mL plastrør fra Lungeavdelingen

Rekvirering

Rekvirenten bestiller selv analysen i **RoS**.
Ved rekvirering i **NSL** er materialkoden BS og analysepakken har kode 9906.

Analyseinstrument og utstyr

Se Advia 2120i; oppstart, bruk og vedlikehold. AMB
Se Cytosentrifugering, Hettich Universal 320. Bruksanvisning. AMB
Se May-Grunwald/Giemsa farging. AMB

Reagenser

Cytospinnpreparat:
PBS (fosfatbufret saltvann)
1 tablett Phosphat buffered saline løses i 100 mL sterilt vann.(Tablettene kan brukes utover holdbarhetsdatoen).
Etter oppløsning er løsningen holdbart i 6 måneder i kjøleskap, eller til utfelling.
Leverandør: PBS, Oxoid Code BR14: Nerlien Meszansky AS

May-Grünwald/Giemsafarging se May-Grunwald/Giemsa farging. AMB

Mastfarging:
Toluidinblått

· 0,5 M HCl	· 200 mL	· Leverandør: VWR INTERNATIONAL AS
· Toluidinblått	· 1 g	· Leverandør: SIGMA-ALDRICH NORWAY AS

0,5 M HCl:

Lag 200 mL 0,5 M HCl. Bruk en målekolbe på 200 mL. Fyll opp med litt renset vann og tilsett 8,1 mL 38 % HCl (12,39 mol/L). Fortynn med renset vann til merket.

Løs **1 g toluidinblått** i 200 mL 0,5 M HCl. Oppbevar på flaske.

Hematoxylin

Løsning 1:

· Renset vann	500 mL	
· Hematoxylin	1 g	Leverandør: SIGMA-ALDRICH NORWAY AS

Løs 1 g hematoxylin i 500 mL renset vann og varm til kokepunktet, bruk magnetrører.

Løsning 2:

· Renset vann	500 mL	
· $NaIO_3$	200 mg	Leverandør:VWR INTERNATIONAL AS
· $KAl(SO_4)_2 * 12H_2O$	50 g	Leverandør:VWR INTERNATIONAL AS

Løs 200 mg $NaIO_3$ og 50 g $KAl(SO_4)_2*12H_2O$ i 500 mL renset vann.

Avkjøl løsning 1 og bland med løsning 2.

Ferdig fargeløsning

Bland toluidinblått og hematoxylin i forholdet 2+1. F.eks: 6 mL toluidinblått og 3 mL hematoxylin. Filtrer før bruk.

Absolutt alkohol 5 mL Leverandør: Antibes

Eukittlim for montering av dekkglass har St. Olav nummer 4013178.

Merkepliktige stoffer med rød skrift, se sikkerhetsdatablad for mer informasjon.

Utførelse

Bland godt før det totale antall celler telles på Advia 2120i. Bruk telletallet fra peroxkanalen. Her diskrimineres epitelceller som ikke skal være med i celletallet.

May-Grünwald/Giemsa farging og **Mastfarging** i BAL gjøres parallelt. Prosedyren frem til ferdig cytospin er den samme for begge farginger.

Lag 2 cytospinpreparat av BAL.

Cytosentrifugering:

Det totale væskevolum som settes i filterkuvetten skal være 200 µL.
Alle prøver med telletall > 0,25 må fortynnes med **PBS (fosfatbufret saltvann).**
Det skal brukes 50 µL BAL ved telletall 1,0 $x10^9$ /L = 50.000 celler

Ved andre telletall: 1 x 50µL = Advia-telletall x X µL
Antall µL BAL (X) = 50/telletall Advia (se tabell)

Antall µL PBS = 200µL – antall µL BAL.
Først settes antall µL skyllevæske på, og så antall µL PBS (totalt 200µL max).

Ved telletall ≤ 0,25 sentrifugeres 200 µL BAL i cytosentrifugen.

Sentrifuger 2 preparater.

Fortynningstabell

Advia telletall	µL BAL	µL PBS
2,0	25	175
1,5	33	166
1,0	50	150
0,8	60	140
0,7	70	130
0,6	80	120
0,5	100	100
0,4	125	75
0,3	150	50
≤ 0,25	200	0

Når preparatene er tørre, fikseres og farges 1 preparat med May-Grünwald/Giemsa og 1 preparat blir Mastfarget.

May-Grünwald/Giemsafarging se May-Grunwald/Giemsa farging. AMB

Mastfarging:

Bruk et cytospinpreparat som legges i fuktekammer. Legg to trepinner under objektglasset.

Drypp med fargevæske (dekk godt der cellene ligger). La ligge i 30 min. Pass på at fargevæsken ikke renner av preparatet. Skyll under rennende vann og skyll til slutt med 5mL absolutt alkohol. La preparatet tørke, ta på eukittlim og dekkglass. Det er nå ferdig til telling av mastceller.

Differensialtelling og telling av mastceller.

Differensialtelling: Tell 200 celler med forstørrelse 40. Flytt litt rundt i preparatet ved telling. Prosentdelen makrofager, lymfocytter, nøytrofile- og eosinofile granulocytter angis.
Funn av epitelceller eller erytrocytter legges som kommentar på linja for Differensialtelling.
Angi graden av **epitelceller-** eller **erytrocytt-tilblanding** slik: NEG, pr.synsfelt: eller synsfeltet dekket av - .
Synlig (makroskopisk rød BAL) kalles blodig.

Kommenter eventuell forekomst av mikrober og plasmaceller.

Kornene i cytoplasmaet på **mastcellen** blir farget blå, de andre cellene vises bare som skygger. Flytt rundt i preparatet når du teller. Summen av antall mastceller i 25 synsfelt på forstørrelse 40 oppgis som svar.

Svarrapportering

Skriv ut arbeidsliste "BALDIFF" fra NSL. Skriv på resultatene. Merk svarlinja for Diff med semikolon. Funn av erytrocytter, epitel, mikrober, basofile granulocytter eller plasmaceller legges da som kommentar her. Legg inn resultatene i NSL. Sett arbeidslister og Advia-utskrifter i merket perm.

Litteratur

Etter prosedyre for telling og farging av celler i BAL skrevet av professor Leif Bjermer. Lungeavd. St. Olavs Hospital.

Guideline om BAL (PUBMED):

An **official American Thoracic Society clinical practice** guideline: the **clinical** utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease.

Meyer KC et al. **American Thoracic Society** Committee on BAL in Interstitial Lung Disease.

Am J Respir Crit Care Med. **2012** May 1;185(9):1004-14

Relaterte dokumenter

Cytosentrifugering, Hettich Universal 320. Bruksanvisning. AMB

May-Grunwald/Giemsa farging. AMB

Vedlegg 2. May-Grunwald/Giemsa farging

Dekkglass 50 x 24 MM	St. Olavs art.nr: 4010658
Filterpapir Whatman sortbånd 589-1150MM	St. Olavs art.nr: 4014890

Reagenser

Metanol, CH_3OH, 2,5L	St.Olavs art. nr: 4013177 Merck 1.06009
A-løsning (kaliumdihydrogenfosfat-løsning), 0,066 mol/L 8,982 g KH_2PO_4 løses i 1000 mL renset vann, type 2 Bruk magnetrører Løsningen oppbevares i kjøleskap	St.Olavs art. nr: 4012610 Merck 104873
B-løsning (dinatriumhydrogenfosfat-buffer), 0,066 mol/L 11,747 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O løses i 1000 mL renset vann, type 2 Bruk magnetrører. Løsningen oppbevares i kjøleskap	Merck 106580
Sørensens fosfatbuffer, stamløsning, pH 6.8 508 mL A-løsning 492 mL B-løsning Oppbevares i kjøleskap	
Sørensens fosfatbuffer, bruksløsning 250 mL Sørensens fosfatbuffer stamløsning fortynnes til 5000 mL med renset vann, type 2 Oppbevares ved romtemperatur	
May-Grünwalds (eosin-methylenblått-løsning) 2,5L Oppbevares ved romtemperatur	St.Olavs art. nr: 4013604 Merck 1.01424
May-Grünwald bruksløsning 100 mL May-Grünwald 100 mL Sørensen fosfatbuffer, bruksløsning Oppbevares ved romtemperatur. Holdbar 2 døgn.	
Giemsas (azur eosin methylenblått-løsning), 0,5L Oppbevares ved romtemperatur	St.Olavs art. nr: 4013605 Merck 1.09204
Giemsa bruksløsning 180 mL Sørensens fosfatbuffer, bruksløsning 20 mL Giemsa Filtrer bruksløsningen med sortbånd filterpapir 589-1150MM Oppbevares ved romtemperatur. Holdbar 2 døgn.	

Merkepliktige stoffer med rød skrift, se sikkerhetsdatablad for mer informasjon
Alle produkter leveres av VWR International

Utførelse

Hell metanolen i **første** fargekar, May-Grünwald bruksløsning i det **andre**, Giemsa bruksløsning i **tredje** fargekar og Sørensens fosfatbuffer bruksløsning i **de to siste** fargekarene.

Plasser utstryk som skal farges i stativer.

Det er plass til maksimalt 20 utstryk pr. stativ hvis utstrykene plasseres "rygg mot rygg".

Fikseres i metanol i **15 min.**

Farges med May-Grunwald bruksløsning i **5 min**.

Farges med Giemsa bruksløsning i **15 min**.

Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre riktig fremgangsmåte ved fiksering og farging av blod- og benmargsutstryk og andre cytologiske preparater med May Grünwald/Giemsa farging.
Fargingen gjør det mulig å differensialtelle celler.

Se relatert dokument: Blodutstryk - tillaging og ansvar for vurdering. AMB

Grunnlagsinformasjon

Ved å farge preparater med May Grünwald /Giemsa blir det mulig å vurdere cellenes morfologi i mikroskop. Utstrykene fikseres med metanol innen 4 timer. Utstrykene kan imidlertid stå ufiksert over natten uten større forringelse.

Hvis utstryk står ufiksert ved romtemperatur i flere dager, vil en få en bakgrunn av tørket plasma (lys blå), som vil gjøre vurdering av preparatet vanskeligere.

Metanol skiftes minst annenhver dag for å unngå at væske fra utstrykene forårsaker artefakter i preparatene.

Ansvar

Bioingeniør

Arbeidsbeskrivelse

Analyseprinsipp

Ved denne fargeteknikken blir den sure kjernesubstansen og det alkaliske cytoplasma farget i ulik grad i cellene. De sure gruppene i nukleinsyrer og proteiner i cellekjerner og cytoplasma bestemmer opptaket av basisk farge (azurblått). Intensiteten av den lilla fargen i cellekjerner er et resultat av blandingen av et eosin Y- og acure B-DNA kompleks. Granula i cytoplasma på nøytrofile granulocytter blir svakt farget av azurblått komplekser. Eosinofile granula inneholder alkaliske grupper som farges sterkt av den sure komponenten i fargevæskene. Basofile granula inneholder heparin som har affinitet til den basiske komponenten i fargevæskene. Effekten av sterk/svak, rød/blå farging avhenger av likevekten mellom de to fargevæskene i tidsavhengig reaksjon. DNA bindes raskt, RNA senere og hemoglobin enda senere. Tilstedeværelsen av basiske grupper på hemoglobinmolekylet resulterer i affinitet til sur farge og blir farget av eosin (rød).

Ph i løsningen, fiksering og fikseringstid, blandingsforhold mellom fargevæsker og tiden for farging kan influere på fargeresultatet.

Analysemateriale

Utstryk av blod og beinmarg.
Cytospin-preparat av for eksempel spinalvæske og bronkialskyllevæske.

Utstyr

Fargekar (plastkar med lokk)	Leverandør: VWR international
Stativ til objektglass (innsats i rustfritt stål)	Leverandør: VWR international
Pinsetter	Leverandør: VWR international
Trakt, kolbe, målesylinder	Leverandør: VWR international
Objektglass med merkefelt 26 x 76 MM	St. Olavs art.nr: 4006058
Eukitt, 0,1L	St. Olavs art.nr: 4013178

Overflødig farge skylles av i neste kar ved å dyppe stativet opp og ned i Sørensens fosfatbuffer bruksløsning noen ganger.

Stativet flyttes til siste bad med Sørensens fosfatbuffer bruksløsning for henstand i **5 min.**

Prosessen styres med stoppeklokke. Tørk av baksiden av objektglassene med cellestoff dyppet i metanol. La forsiden lufttørke.

Fargede preparater kan monteres med dekkglass. Lim dem (og bevar dem) med Eukitt.

Bruk eventuelt hansker. Stativene flyttes med pinsetter. Vi behandler biologisk materiale i åpne kar, og det krever forsiktighet med hensyn på smittefare.

Væsker i alle kar skiftes annenhver dag eller ved behov. Merkepliktige stoffer (med rød skrift) kastes i 10L-avfallsdunk på laboratoriet for organiske løsemidler, avfallsnummer 7042.

Hver mandag blir karene skiftet og desinfisert med Vircon. Alt utstyr sendes deretter til vask i Substratlaboratoriet, 3.etasje i Laboratoriesenteret. Bruk portør for transport.

Fulle avfallsdunker kan settes på avfallsrom 432.01.022. Bestill henting av Logistikk og Forsyning, Intern Transport til sentralt lager og avhending.

Litteratur

Practical Haematology: Dacie and Lewis, 9. edition, side 49-51.

Vedlegg 3: Prosodyre for Cytosentrifugering, Hettich Universal 320

Cytosentrifugering, Hettich Universal 320. Bruksanvisning. AMB

Forfatter: Ellen Marie Hageler	Gyldig fra: 28.02.2018	Revisjon: 2.2
Godkjent av: Kristine Bodal Solem	Revisjonsfrist: 28.02.2020	ID: 2938

Hensikt og omfang

Prosedyren skal beskrive bruk av Hettich Universal 320 cytospin-sentrifuge.

Grunnlagsinformasjon

Ved cytosentrifugering får man en oppkonsentrering av forskjellig cellemateriale slik at cellenes morfologi kan studeres ved hjelp av mikroskopi. Det er en kvalitativ metode for væsker med lavt celletall slik som spinalvæske og bronkialskyllevæske, og ved uthenting av celler ved celleseparering.

For spinalvæske: se
Cytosentrifugering. AMB
For bronkialskyllevæske:se
Bronkialskyllevæske (BAL). Telling av totalt antall celler. Farging og differensialtelling. AMB
For celleseparering som sendes til patologen for FISH bestemmelse, og for nedfrysing i biobank se
Prøver til Norsk forskningsbiobank for myelomatose. AMB

Ansvar

Bioingeniører ved Seksjon prøvetaking og pasientnær analyse, laboratoriet i Gastrosenteret.

Arbeidsbeskrivelse

Utstyr

Skaffevare:
Materialnummer 4025493, hvite filterkuvetter fra Nerliens Mezsansky AS.

Utførelse

En viss konsentrasjon av celler i en suspensjon sentrifugeres mot et objektglass med **hastighet 1000 RPM i 5 minutter**. Suspensjonen kan eventuelt fortynnes i følge prosedyre. Cellene blir slynget slik at de ligger jevnt spredt utover, og det blir mulig å studere dem samlet og enkeltvis. Preparatet behandles (farges) i etterkant.

1. Merk objektglasset med data på pasienten.
2. Sett objektglasset med den frostete enden opp og cellfunnel disp. sample chamber - trakten fast i metallholderen.
3. Sett metallholderen i sentrifugen. Husk motvekt.
4. Tilsett celleløsningen. Pass på at mengde og fortynning velges i følge prosedyre.
5. Sett på indre lokk til det høres et klikk.
6. Fest ytre lokk. Velg start. Vi bruker bare ett program og en hastighet.
7. Når sentrifugen er ferdig vil det høres et signal.
8. Åpne ytre og indre lokk, og ta preparatet ut av metallholderen. Trakt og filter skal kastes, metallholderen brukes om igjen.
9. La preparatet lufttørke før videre behandling (farging).
10. Etter farging – markér eventuelt med tusj på baksiden av objektglasset rundt området cellene treffer glasset slik at det er lett og finne igjen i mikroskop.

Preparatene farges i følge prosedyre.
For bronkialskyllevæske:se

Vedlegg 4: Variasjon (% CV) i totall antall leukocytter fra Baso- og peroks kanalene på ADVIA 2120i og manual i mastcelle (n=20)

Henstandsstid (timer)	WBCB (10^9/L)		WBCP (10^9/L)		Baso valid cells(10^6/L)		Sum av mastceller i 25 synsfelt	
	% CV	Mean	% CV	Mean	% CV	Mean	% CV	Mean
1 Time	8,3	0,25	10,7	0,19	7,8	239,7	12,9	10,3
24 Time (rom)	8,8	0,22	9,5	0,17	8,8	219,1	18,4	7
24 Time (kjøl)	6,5	0,24	8,7	0,18	5,9	234,2	25,0	7,5

Tabell 3: Oversikt over beregnet variasjon (% CV) i totall antall leukocytter fra ADVIA 2120i oppgitt som WBCB, WBCP og Baso valid cells og manuelt telte mastceller. BAL prøvene er gruppert etter oppbevarings temperatur (rom og kjøleskap) og tidsintervall mellom prøvetaking og analysering

Vedlegg 5: Statistisk sammenligning (parret T-test) av totalt antall leukocytter i BAL prøver telt Peox- (WBCP) og Baso Valid cells i kanalene på ADVIA 2120i for romtempererte prøver (ved 1 og 24 timer) og kjøleskap prøver (ved 24 timer).

	1 time Rom		24 timer Rom		24 timer Kjøl	
	WBCP (10^9/L)	Baso Valid (10^6/L)	WBCP (10^9/L)	BasoValid (10^6/L)	WBCP (10^9/L)	BasoValid (10^6/L)
Gjennomsnitt	0,192	239,7	0,1698	219,675	0,179	234,5
Observasjoner	20	20	20	20	20	20
Pearson-korrelasjon	0,900158		0,953		0,889725	
frihetsgrader	19		19		19	
T-observert	-6,36837		-6,331812827		-6,840797	
P(T<=t) ensidig	2,0719E-06		2,235E-06		7,88841E-07	
T-kritisk, ensidig	1,729132812		1,72913		1,72913	
Baso:Peroks ratio(%)	124743,75		129310,9		130906	

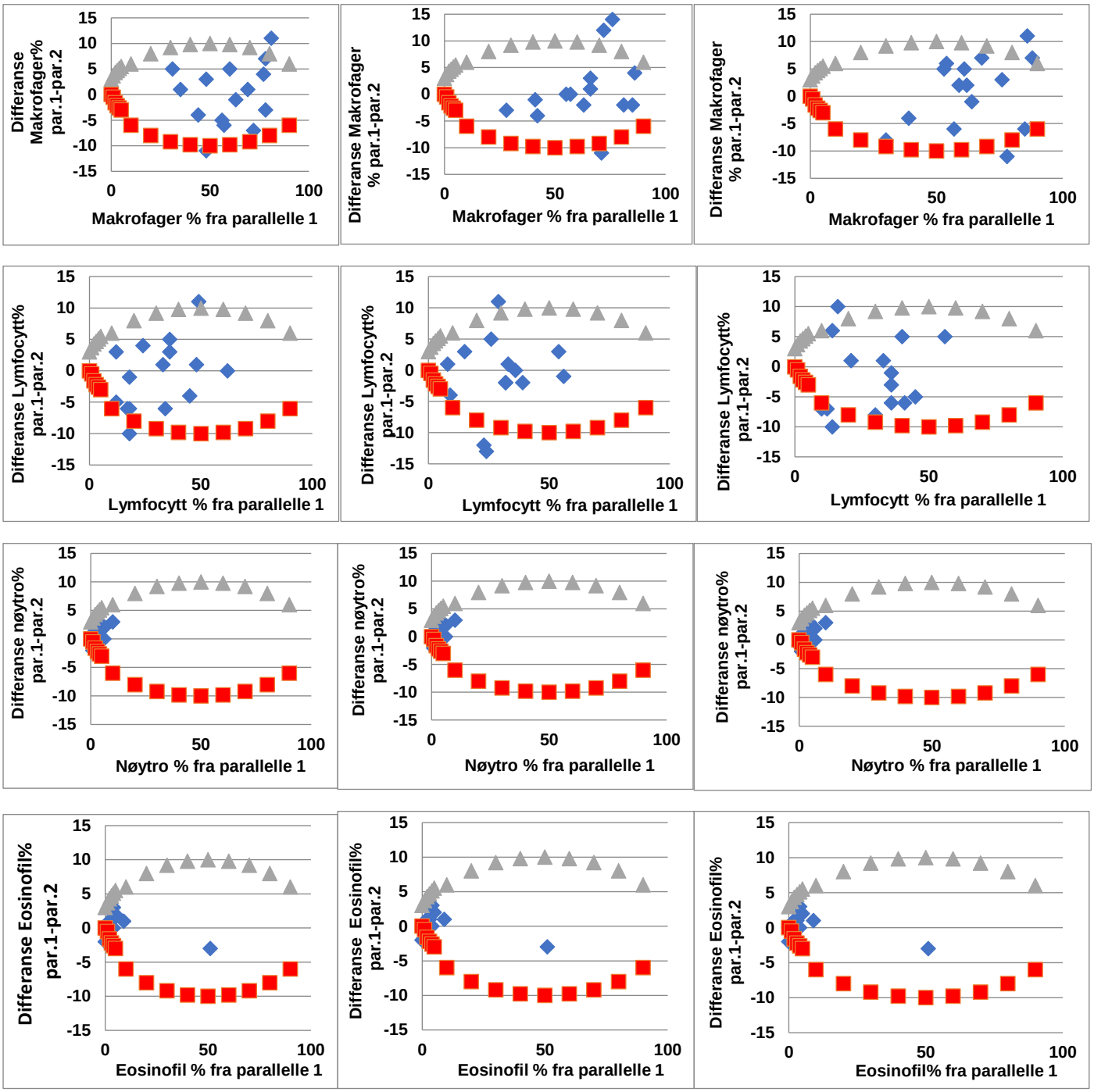
Tabell 4: Statistisk sammenligning (parret T-test) av totalt antall leukocytter i BAL prøver telt i peox (WBCP) og Baso valid cells kanalene på ADVIA 2120i for romtempererte prøver (ved 1 og 24 timer) og kjølaskap prøver (ved 24 timer). Det oppgis total antall leukocytter målt henholdsvis 1time og 24 timer etter prøvetaking, og analysesvar utgis som celle-konsentrasjon (10^9 celler/L). Beregningene som ble gjort for både WBCP og Baso valid cells var basert på gjennomsnittsverdiene (mean). Baso : perox ratio oppgir prosentvise over- og/eller under estimering av Perox-målinger i forhold til Baso valid målinger.

Vedlegg 6: Statistisk sammenligning (parret T-test) av totalt antall leukocytter i BAL prøver telt i Baso (WBCB)- og Baso valid cells kanalene på ADVIA 2120i for romtempererte prøver (ved 1 og 24 timer) og kjøleskpsprøver (ved 24 timer)

	1 time Rom		24 timer Rom		24 timer Kjøl	
	WBCB (10^9/L)	BasoValid (10^6/L)	WBCB (10^9/L)	BasoValid (10^6/L)	WBCB (10^9/L)	BasoValid (10^6/L)
Gjennomsnitt	0,248	239,7	0,216	219,7	0,24075	234,5
Observasjoner	20	20	20	20	20	20
Pearson-korrelasjon	0,970002035		0,98000028		0,968115749	
frihetsgrader	19		19		19	
T-observert	-6,367871986		-6,331232045		-6,840024517	
P(T<=t) ensidig	2,07405E-06		2,23812E-06		7,90069E-07	
T-kritisk, ensidig	1,729132812		1,729132812		1,729132812	
Baso:Peroks ratio (%)	96553,23		101601,389		97303,946	

Tabell 5: Statistisk sammenligning (parret T-test) av totalt antall leukocytter i BAL prøver telt i Baso (WBCB)- og Baso valid cells kanalene på ADVIA 2120i for romtempererte prøver (ved 1 og 24 timer) og kjøleskap prøver (ved 24 timer). Det oppgis total antall leukocytter målt henholdsvis 1time og 24 timer etter prøvetaking, og analysesvar utgis som celle-konsentrasjon (10^9 celler/L). Beregningene som ble gjort for både WBCB og Baso valid cells var basert på gjennomsnittsverdiene (mean). Baso : perox ratio oppgir prosentvise over- og/eller under estimering av baso-målinger i forhold til baso valid-målinger.

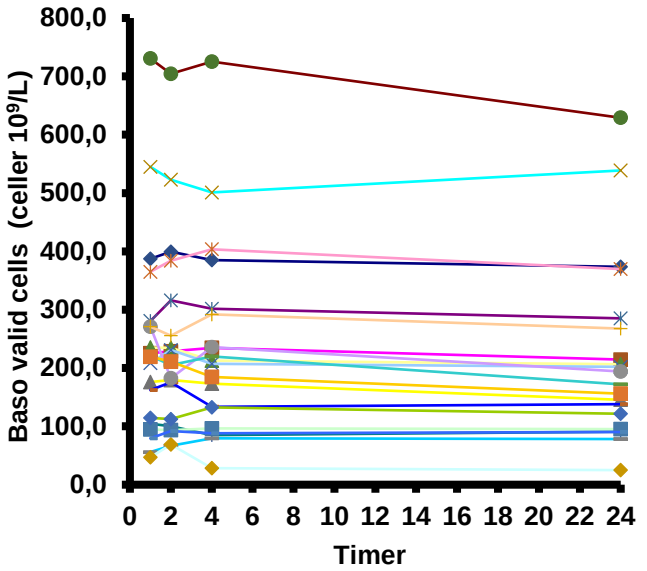
Vedlegg 7: Variasjon i manuell differensial telling testet mot 95% konfindensintervall for tillat avvik

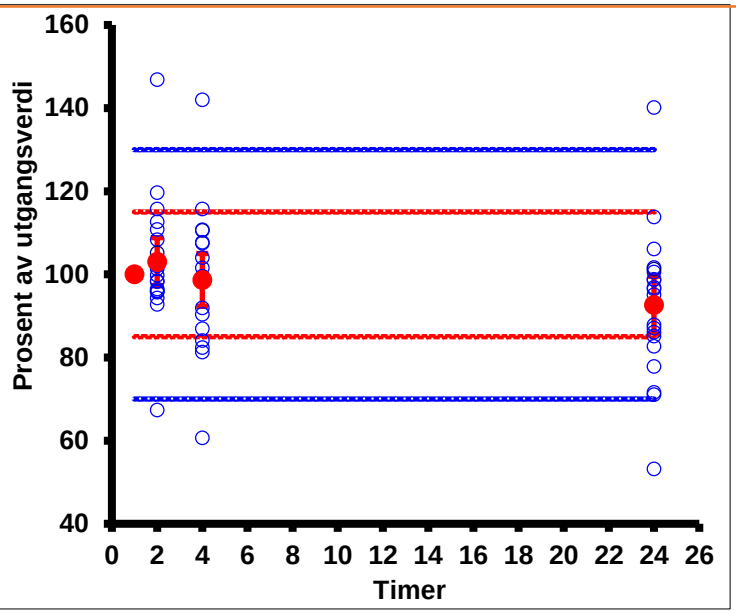


1 time rom	24 timer rom	24 timer kjøl

Figur 18: Grafisk fremstilling av 100 cellers manuell differensial telling med 95% konfindensintervall (n=15). X-aksen(e) viser prosentvise antall (parallelle 1) av makrofager, lymfocytter, eosinofile granulocytter og nøytrofile granulocytter, og henstandstidene i timer samt oppbevarings temperaturer. Y-aksen(e) viser differensene mellom parallellene 1 og 2 etter telling av de aktuelle leukocytt-typene. De firkantene representerer avviket mellom de to parallellene. De røde firkantene viser nedre 95% konfindensintervall for tillat avvik mens de grå trekantene viser øvre konfidensintervall for tillat avvik for manuell differensial telling.

Vedlegg 8: Resultater av Baso Valid cells i romtemperatur





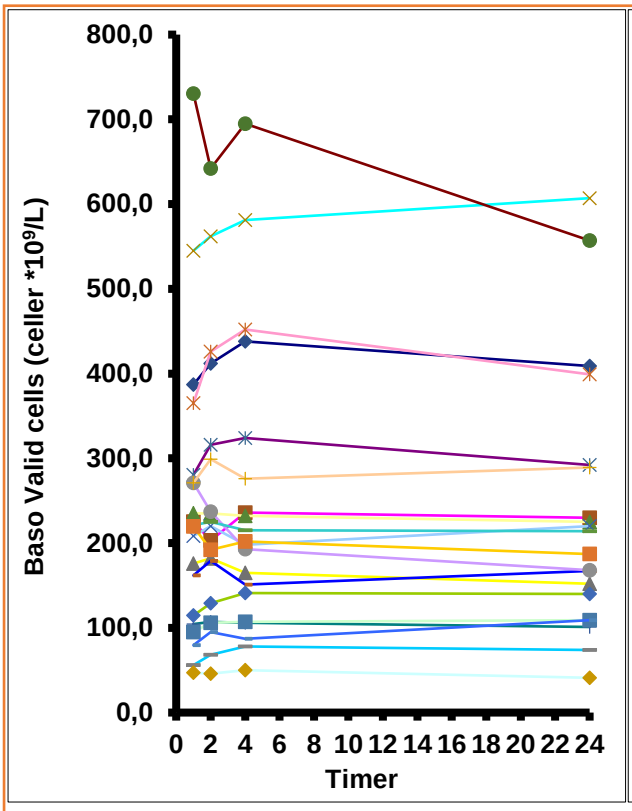
***Figur 19A**. Grafisk fremstilling av variasjon i måleverdier for totalt antall leukocytter (baso valid cells) i populasjonen (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser måleverdier for totalt antall leukocytter målt på ADVIA 2120i. Linjene viser hvordan totalt antall celler i en enkelt prøve endrer seg i det gitte tidsintervallet.*

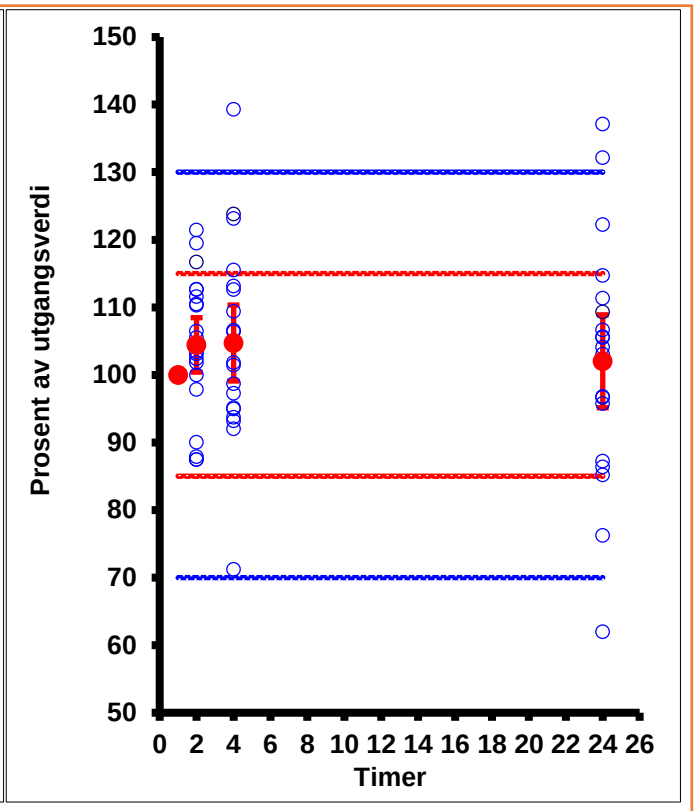
***Figur 19A**. Grafisk fremstilling over endring i totalt antall leukocytter (baso valid cells) i romtempererte BAL prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Analyseresultatene for baso valid cells skal være riktige ved verdier opptil 200*10^9/L. Når denne grensen overskrides blir det gjort en korrigering slik at analyseresultatene utgis som baso verdier (WBCB). Resultatene som fremvises i figurene 19A og 19B er basert på måleverdier over (n=10) og under (n=10) 200*10^9/L. Dette gjør at disse resultatene ikke blir helt riktige.

Figur 19A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 25 til 630 celler. Figur 19B viser svake endringer i totalt antall leukocytter (baso valid cells) ved 2 og 4 timer i forhold til utgangsverdien. Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnitt endring ved 2 og 4 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Endringer i baso valid cells-verdier mellom 1 time og, 2 og 4 timer er dermed ikke statistisk signifikant. Det nedre konfindensintervallet for endring ved 24 timer tangerer den nedre grensen for tillat bias, men ved tilfeller blir både nedre og øvre aksept grenser for tillat totalfeil overskredet (figur 19B). Endringer i totalt antall leukocytter (baso valid cells) mellom 1 time og 24 timer er dermed statistisk signifikant.

Vedlegg 9: Resultater av Baso Valid cells i kjøl temperatur



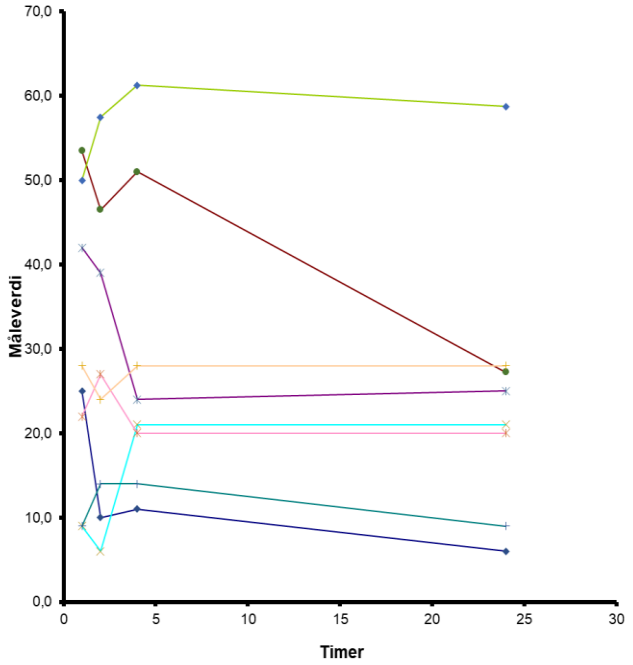


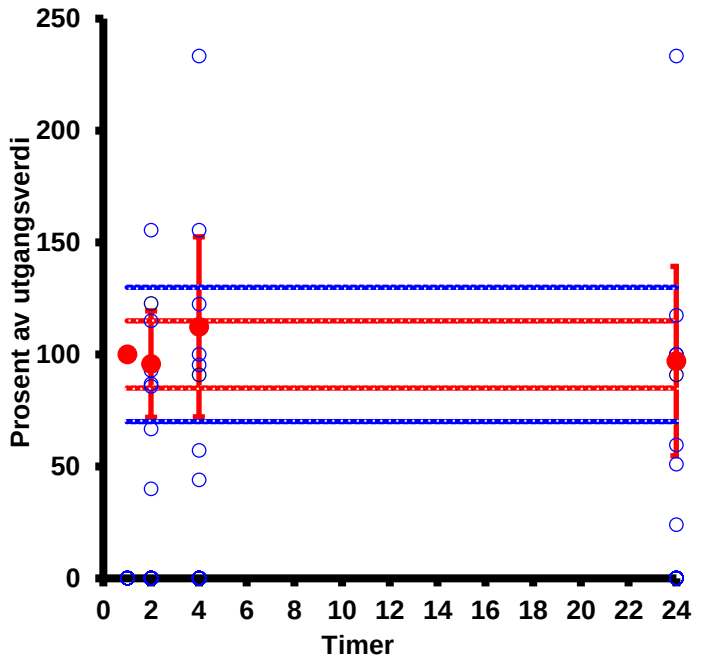
***Figur 20A**. Grafisk fremstilling av variasjon i måleverdier for totalt antall leukocytter (baso valid cells) i populasjonen (n=20). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser måleverdier for totalt antall leukocytter målt på ADVIA 2120i. Linjene viser hvordan totalt antall celler i en enkelt prøve endrer seg i det gitte tidsintervallet.*

***Figur 20A**. Grafisk fremstilling over endring i totalt antall leukocytter (baso valid cells) i kjøleskap-prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Figur 20A viser at prøvene som ble analysert var spredt fra cirka 41,0 til 730,0 celler. Figur 20B viser lett endring (økning) i totalt antall leukocytter (baso valid cells) ved 2 og 4 timer i forhold til utgangsverdien, men det stabiliserer seg tilbake til utgangsverdien ved 24 timer. Det 90 % konfindensintervallet for gjennomsnittlig endring ved 2, 4 og 24 timer ligger innenfor aksept grensene for tillat bias. Endringer i baso valid cells verdier mellom 1 time og, 2, 4 og 24 timer er dermed ikke statistisk signifikant (figur 20B).

Vedlegg 10: **Holdbarhet på Mastcelle i BAL prøver oppbevart i romtemperatur**

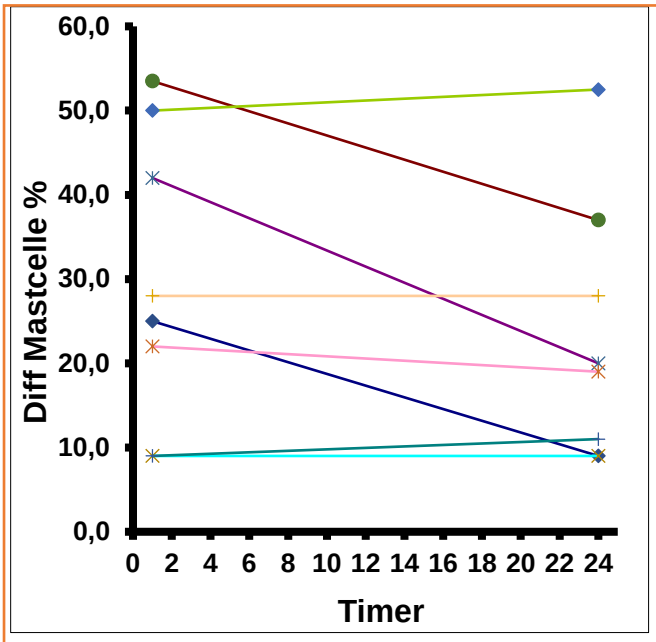


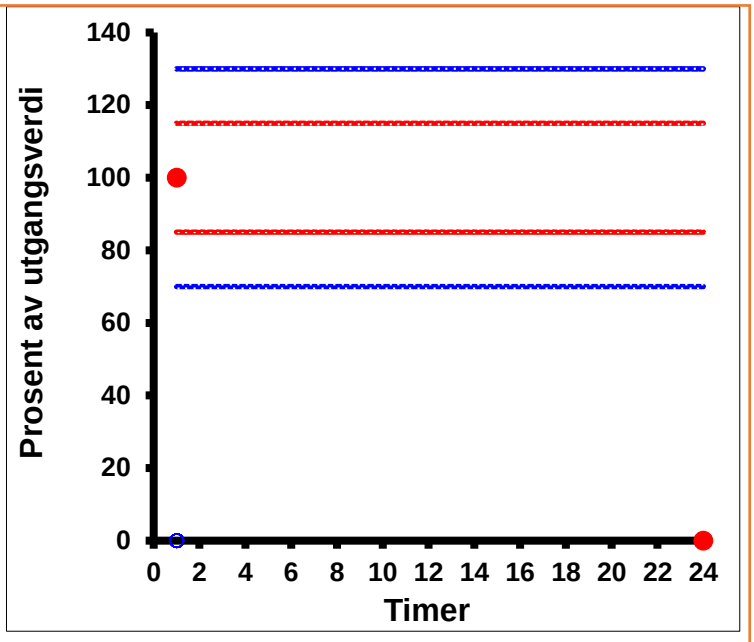


Figur 21A. *Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte mastceller i romtemperatur i BAL prøver (n=8). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser antall mastceller fra 25 ulike synsfelt. Linjene viser hvordan antall mastceller i en enkelt prøve endrer seg i de gitte tidsintervallene.*

Figur 21B*. Grafisk fremstilling over endring i antall mastceller i romtempererte prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Vedlegg 11: Holdbarhet på Mastcelle i BAL prøver oppbevart i kjøl temperatur

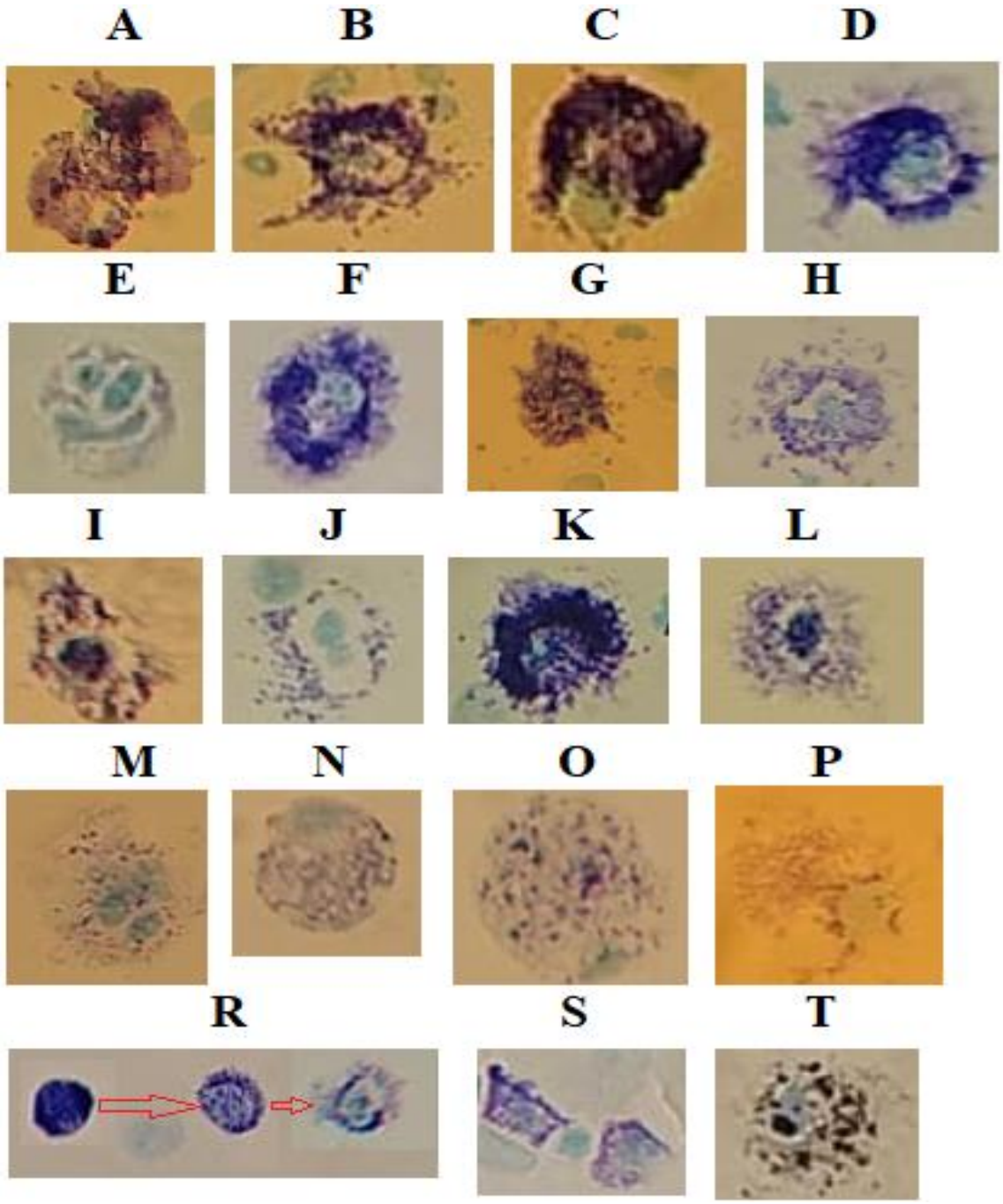




***Figur 22A**. Grafisk fremstilling av variasjon i manuell telte mastceller i BAL prøver (n=8). Hver linje representerer utviklingen av antall mastceller fra utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) til sluttverdi (24 timer ved kjøleskaps temperatur) hos enkelt prøve. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Y-aksen viser antall mastceller fra 25 ulike synsfelt.*

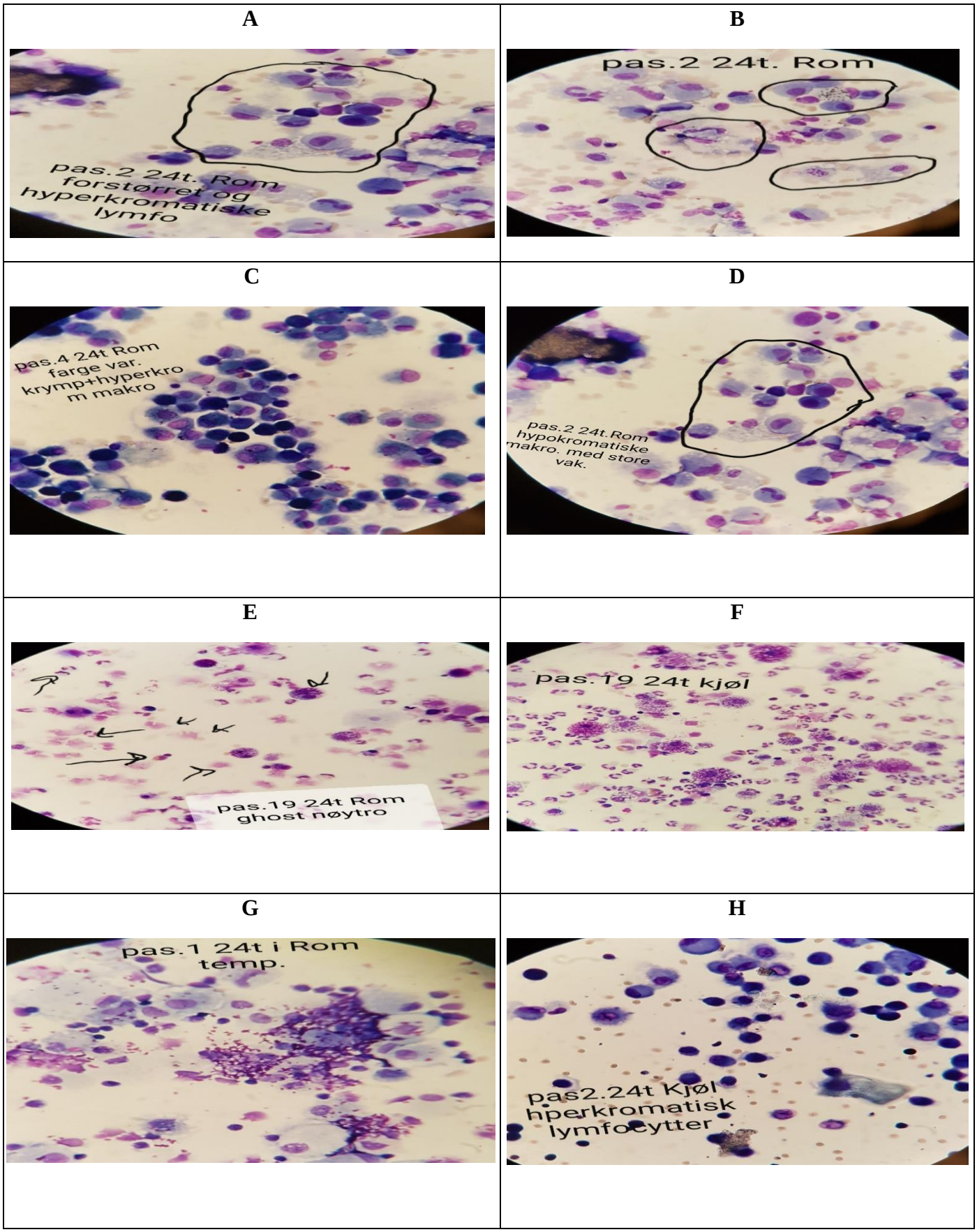
***Figur 22B**. Grafisk fremstilling over endring i antall mastceller i kjøleskap-prøver ved 24 timer i forhold til utgangsverdi (1 time ved romtemperatur) X-aksen viser henstandstid i timer mens Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Vedlegg 12: Bilder av eksempler på deformerte mastceller



Figur 23: Oversikt over samling av forskjellige eksempler på deformerte mastceller (A-T). Disse ble tatt fra både romtempererte prøver og kjøleskap-prøver og ved alle henstandstidene (1, 2, 4 og 24 timer)

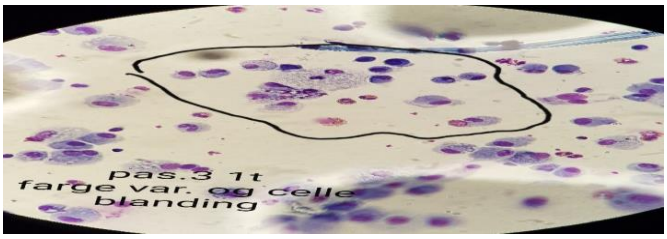
Vedlegg 13: Bilder av eksempler på deformerte leukocytter



Figur 24: Bildene A-H viser eksempler på ulike former på celle-deformasjon både i romtempererte prøver og kjøleskap-prøver etter 24 timers henstand

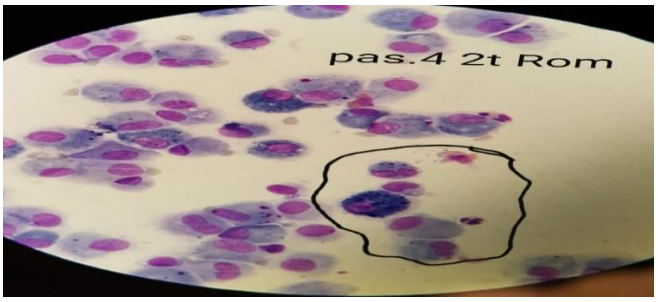
I

J

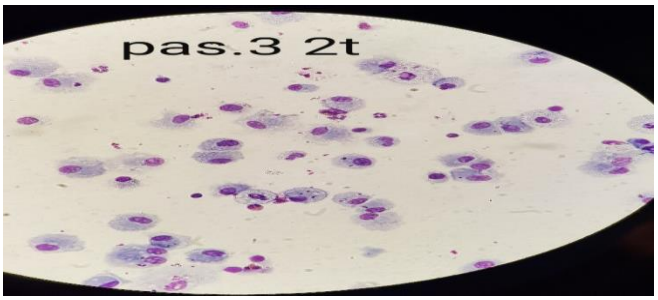


Figur 25: Bilder viser eksempler på celler som kan finnes i fersk (henstand < 1 time) BAL prøve. **I** viser lungeepitelceller mens **J** viser av hyper- og hypokromatiske makrofager. Noen makrofager har også kraftig vakuolisert cytoplasma.

K



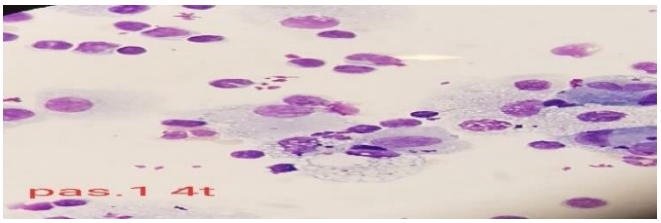
L



Figur 26: Bildene K og L viser eksempler på ulike former på celle-deformasjon av leukocytter i romtempererte prøver etter2 timers henstand. K viser variasjon i farge og cellefasong mens L viser makrofager med kraftig vakuolisert cytoplasma og ujevn plasmamembran

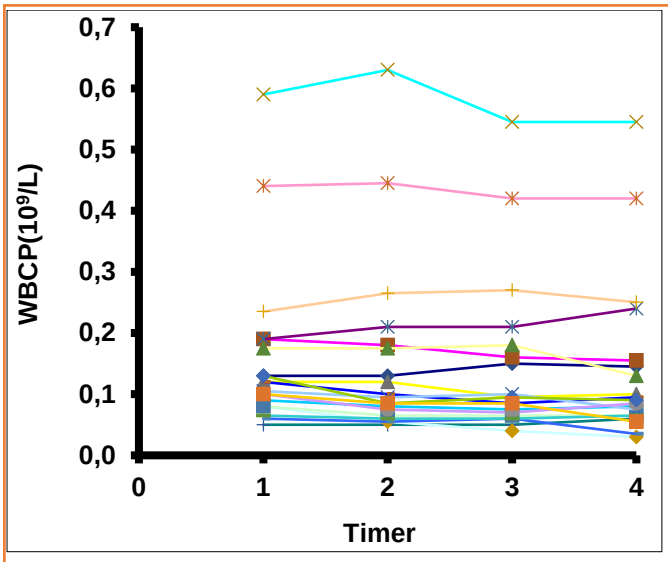
M

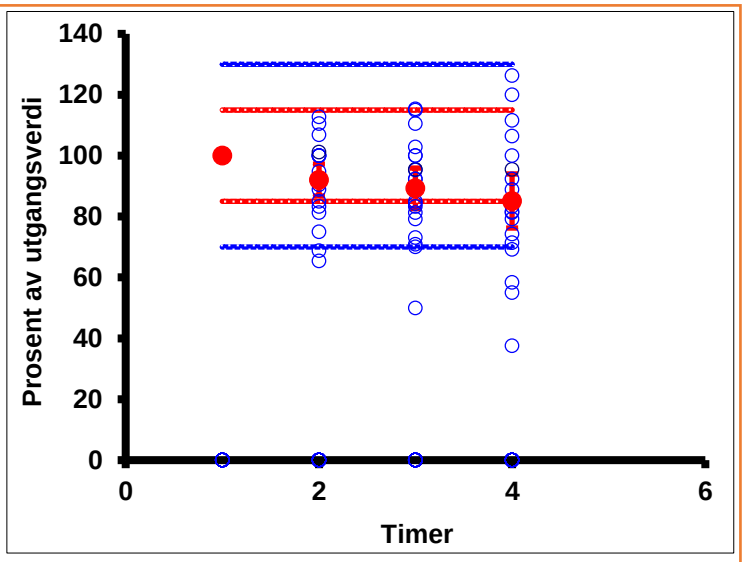
N



Figur 27: Bildene M og N viser eksempler på ulike former på celle-deformasjon av leukocytter i romtempererte prøver etter 4 timers henstand. M viser variasjon i farge og hyperkromatiske makrofager som smeltet sammen mens N viser ødelagte celler som er slått sammen til å danne en udefinert cellegruppe («smudge»).

Vedlegg 14: WBCP rådata i romtemperatur





***Figur 28A**. Grafisk fremstilling av variasjon i måleverdier for totalt antall leukocytter (WBCP) i en populasjon (n=19). Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve oppbevart i romtemperatur. X-aksen viser henstandstid i timer for den enkelte prøve. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Y-aksen viser måleverdier for totalt antall leukocytter målt i perox kanal (WBCP) på ADVIA 2120i. Linjene viser hvordan totalt antall celler i en enkelt prøve endrer seg i det gitte tidsintervallet.*

***Figur 28B**. Grafisk fremstilling over endring i totalt antall leukocytter (WBCP) i romtempererte BAL prøver gjennom de oppgitte tidsintervallene. X-aksen viser henstandstid i timer. Her vises de spesifikke tidsintervallene mellom prøvetaking og prøve-analysering. Målingene utført etter 1 timers henstand anses som nullverdi (utgangsverdien). Y-aksen viser prosent endring fra utgangsverdien. De vannrette røde linjene viser grensene for tillat bias på 15,0 %, mens de blå linjene viser grensene for tillat totalfeil på 30,0 %. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette røde linjene representerer øvre og nedre 90% konfidensintervall for gjennomsnittene. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi.*

Vedlegg 15: WBCP rådata i romtemperatur

Pasient nummer	1 time	gjennom snitt	2 time	gjennom snitt	4 time	gjennom snitt	24 time	gjennom snitt
1	0,13	0,13	0,12	0,13	0,16	0,15	0,14	0,145
1	0,12		0,13		0,14		0,15	
2	0,18	0,19	0,18	0,18	0,15	0,16	0,18	0,155
2	0,2		0,18		0,17		0,13	
3	0,12	0,12	0,12	0,12	0,1	0,095	0,12	0,1
3	0,12		0,11		0,09		0,08	
4	0,56	0,59	0,6	0,63	0,5	0,545	0,55	0,545
4	0,62		0,66		0,59		0,54	
5	0,17	0,19	0,21	0,21	0,22	0,21	0,26	0,24
5	0,21		0,2		0,2		0,22	
6	6,75	6,58	6,53	6,43	5,96	6,08	1,87	2,695
6	6,41		6,33		6,2		3,52	
7	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06
7	0,05		0,04		0,05		0,06	
8	0,11	0,12	0,1	0,1	0,1	0,085	0,09	0,095
8	0,12		0,09		0,07		0,1	
9	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,075	0,08	0,08
9	0,1		0,07		0,07		0,08	
10	0,1	0,08	0,08	0,055	0,05	0,04	0,03	0,03
10	0,06		0,03		0,03		0,03	
11	0,07	0,08	0,06	0,065	0,05	0,065	0,08	0,065
11	0,09		0,07		0,08		0,05	
12	0,17	0,175	0,17	0,175	0,17	0,18	0,15	0,13
12	0,18		0,18		0,19		0,11	
13	0,11	0,105	0,11	0,095	0,1	0,1	0,08	0,075
13	0,1		0,08		0,1		0,07	
14	0,44	0,44	0,48	0,445	0,43	0,42	0,41	0,42
14	0,44		0,41		0,41		0,43	
15	0,09	0,1	0,08	0,075	0,07	0,07	0,08	0,085
15	0,11		0,07		0,07		0,09	
16	0,24	0,235	0,24	0,265	0,25	0,27	0,26	0,25
16	0,23		0,29		0,29		0,24	
17	0,07	0,06	0,06	0,055	0,06	0,06	0,03	0,035
17	0,05		0,05		0,06		0,04	
18	0,06	0,065	0,05	0,06	0,06	0,06	0,07	0,065
18	0,07		0,07		0,06		0,06	
19	0,8	0,79	0,81	0,8	0,71	0,785	0,67	0,675
19	0,78		0,79		0,86		0,68	
20	0,18	0,13	0,08	0,085	0,1	0,095	0,08	0,09
20	0,08		0,09		0,09		0,1	
21	0,1	0,1	0,08	0,085	0,08	0,085	0,06	0,055
21	0,1		0,09		0,09		0,05	

Vedlegg 16: WBCB rådata i romtemperatur

Pasient nummer	1 time	gjennom snitt	2 time	gjennom snitt	4 time	gjennom snitt	24 time	gjennom snitt
1	0,41	0,41	0,44	0,45	0,41	0,42	0,36	0,38
1	0,41		0,45		0,42		0,4	
2	0,24	0,23	0,25	0,25	0,26	0,25	0,23	0,22
2	0,22		0,24		0,23		0,2	
3	0,14	0,15	0,14	0,14	0,13	0,14	0,12	0,11
3	0,16		0,14		0,14		0,1	
4	0,51	0,5	0,44	0,47	0,41	0,46	0,49	0,51
4	0,49		0,5		0,5		0,53	
5	0,31	0,32	0,37	0,36	0,34	0,33	0,3	0,3
5	0,33		0,35		0,32		0,29	
6	7,09	6,91	6,57	6,62	5,83	6,1	2,24	3,56
6	6,72		6,67		6,37		4,88	
7	0,1	0,1	0,08	0,09	0,06	0,07	0,09	0,08
7	0,09		0,1		0,08		0,07	
8	0,17	0,17	0,16	0,16	0,13	0,12	0,13	0,13
8	0,16		0,15		0,1		0,13	
9	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,055	0,05	0,06
9	0,04		0,06		0,06		0,07	
10	0,06	0,05	0,1	0,06	0,03	0,025	0,03	0,02
10	0,04		0,02		0,02		0,01	
11	0,08	0,09	0,11	0,095	0,11	0,105	0,08	0,08
11	0,1		0,08		0,1		0,08	
12	0,25	0,275	0,28	0,265	0,22	0,245	0,23	0,22
12	0,3		0,25		0,27		0,21	
13	0,18	0,18	0,2	0,185	0,17	0,18	0,17	0,16
13	0,18		0,17		0,19		0,15	
14	0,44	0,48	0,49	0,51	0,53	0,53	0,46	0,47
14	0,52		0,53		0,53		0,48	
15	0,21	0,2	0,15	0,145	0,2	0,19	0,11	0,13
15	0,19		0,14		0,18		0,15	
16	0,32	0,315	0,28	0,29	0,32	0,335	0,3	0,29
16	0,31		0,3		0,35		0,28	
17	0,07	0,075	0,07	0,075	0,08	0,075	0,07	0,065
17	0,08		0,08		0,07		0,06	
18	0,16	0,14	0,11	0,105	0,14	0,125	0,11	0,11
18	0,12		0,1		0,11		0,11	
19	0,93	0,915	0,87	0,89	0,92	0,92	0,73	0,76
19	0,9		0,91		0,92		0,79	
20	0,12	0,11	0,12	0,1	0,13	0,125	0,1	0,095
20	0,1		0,08		0,12		0,09	
21	0,18	0,2	0,16	0,175	0,16	0,17	0,15	0,13
21	0,22		0,19		0,18		0,11	

Vedlegg 17: Baso valid celler rådata i romtemperatur

Pasient nummer	1 time	gjennom snitt	2 time	gjennom snitt	4 time	gjennom snitt	24 time	gjennom snitt
1	379	387	409	399,5	389	385	349	373,5
1	395		390		381		398	
2	228	225,5	233	228,5	240	234,5	227	214,5
2	223		224		229		202	
3	170	176	181	179,5	156	173	154	145,5
3	182		178		190		137	
4	542	545	481	523	462	501	521	538,5
4	548		565		540		556	
5	264	280,5	319	316	303	301,5	289	285
5	297		313		300		281	
6	5476	5335,5	5422	5281,5	4877	4910	2136	3017
6	5195		5141		4943		3898	
7	107	104,5	86	100	70	85	97	91
7	102		114		100		85	
8	156	162	178	175,5	149	133,5	131	138
8	168		173		118		145	
9	64	56	66	67	77	79,5	72	78,5
9	48		68		82		85	
10	53	47	26	69	18	28,5	39	25
10	41		112		39		11	
11	84	95	99	93,5	100	96,5	96	95,5
11	106		88		93		95	
12	212	235	245	234,5	192	212,5	206	206,5
12	258		224		233		207	
13	203	208,5	250	231	192	207	215	202
13	214		212		222		189	
14	336	365	369	384	398	403,5	358	369,5
14	394		399		409		381	
15	289	271	186	182,5	238	235,5	160	194
15	253		179		233		228	
16	274	271	247	255,5	274	292	278	267,5
16	268		264		310		257	
17	84	79,5	84	92	91	88	96	90,5
17	75		100		85		85	
18	240	221	213	205	232	220	166	172
18	202		197		208		178	
19	749	730,5	697	704,5	714	725,5	604	629
19	712		712		737		654	
20	122	114,5	122	112,5	139	132,5	127	121,5
20	107		103		126		116	
21	201	219,5	218	211	178	184,5	176	156
21	238		204		191		136	

Vedlegg 18: WBCP rådata i kjøl temperatur

Pasient nummer	2 time	gjennom snitt	4 time	gjennom snitt	24 time	gjennom snitt
1	0,11	0,135	0,14	0,14	0,11	0,115
1	0,16		0,14		0,12	
2	0,17	0,175	0,18	0,175	0,14	0,16
2	0,18		0,17		0,18	
3	0,11	0,105	0,11	0,11	0,09	0,09
3	0,1		0,11		0,09	
4	0,7	0,68	0,67	0,695	0,69	0,665
4	0,66		0,72		0,64	
5	0,22	0,215	0,21	0,235	0,25	0,24
5	0,21		0,26		0,23	
6	6,57	6,6	6,54	6,45	5,14	5,205
6	6,63		6,36		5,27	
7	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,055
7	0,06		0,07		0,05	
8	0,11	0,12	0,09	0,11	0,11	0,115
8	0,13		0,13		0,12	
9	0,09	0,085	0,06	0,07	0,13	0,105
9	0,08		0,08		0,08	
10	0,08	0,09	0,005	0,0375	0,03	0,05
10	0,1		0,07		0,07	
11	0,11	0,095	0,09	0,09	0,07	0,075
11	0,08		0,09		0,08	
12	0,19	0,2	0,19	0,195	0,16	0,16
12	0,21		0,2		0,16	
13	0,1	0,09	0,09	0,09	0,07	0,075
13	0,08		0,09		0,08	
14	0,46	0,46	0,47	0,485	0,48	0,48
14	0.46		0,5		0,48	
15	0,11	0,105	0,1	0,09	0,09	0,085
15	0,1		0,08		0,08	
16	0,3	0,295	0,25	0,28	0,28	0,28
16	0,29		0,31		0,28	
17	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07	0,06
17	0,05		0,06		0,05	
18	0,08	0,085	0,06	0,07	0,06	0,055
18	0,09		0,08		0,05	
19	0,83	0,815	0,79	0,765	0,55	0,555
19	0,8		0,74		0,56	
20	0,1	0,1	0,1	0,095	0,09	0,09
20	0,1		0,09		0,09	
21	0,08	0,085	0,08	0,085	0,07	0,07
21	0,09		0,09		0,07	

Vedlegg 19: WBCB rådata i kjøl temperatur

Pasient nummer	2 time	gjennom snitt	4 time	gjennom snitt	24 time	gjennom snitt
1	0,41	0,44	0,47	0,48	0,47	0,455
1	0,47		0,49		0,44	
2	0,22	0,22	0,26	0,25	0,27	0,25
2	0,22		0,24		0,23	
3	0.16	0,15	0,15	0,14	0,11	0,115
3	0,15		0,13		0,12	
4	0,64	0,615	0,65	0,64	0,57	0,585
4	0,59		0,63		0,6	
5	0,37	0,375	0,37	0,385	0,32	0,335
5	0,38		0,4		0,35	
6	6,99	6,755	6,49	6,61	5,54	5,405
6	6,52		6,73		5,27	
7	0,11	0,095	0,1	0,095	0,09	0,085
7	0,08		0,09		0,08	
8	0,18	0,185	0,15	0,15	0,15	0,16
8	0,19		0,15		0,17	
9	0,06	0,06	0,07	0,065	0,05	0,06
9	0,06		0,06		0,07	
10	0,06	0,05	0,06	0,055	0,04	0,035
10	0,04		0,05		0,03	
11	0,11	0,11	0,1	0,105	0,1	0,115
11	0,11		0,11		0,13	
12	0,26	0,265	0,27	0,275	0,27	0,255
12	0,27		0,28		0,24	
13	0,19	0,185	0,16	0,165	0,17	0,175
13	0,18		0,17		0,18	
14	0,58	0,57	0,66	0,6	0,52	0,535
14	0,56		0,54		0,55	
15	0,18	0,19	0,16	0,15	0,14	0,13
15	0,2		0,14		0,12	
16	0,33	0,35	0,33	0,335	0,33	0,335
16	0,37		0,34		0,34	
17	0,08	0,085	0,07	0,085	0,09	0,09
17	0,09		0,1		0,09	
18	0,14	0,15	0,16	0,13	0,13	0,115
18	0,16		0,1		0,1	
19	0,68	0,735	0,88	0,895	0,7	0,695
19	0,79		0,91		0,69	
20	0,13	0,12	0,13	0,13	0,13	0,125
20	0,11		0,13		0,12	
21	0,18	0,18	0,19	0,2	0,17	0,17
21	0,18		0,21		0,17	

Vedlegg 20: Baso Valid celler rådata i kjøl temperatur

Pasient nummer	2 time	gjennom snitt	4 time	gjennom snitt	24 time	gjennom snitt
1	375	412	418	438	419	409
1	448		458		398	
2	208	203	242	236	237	230
2	197		230		222	
3	190	182	185	165	161	152
3	173		145		142	
4	595	562	581	581	595	607
4	529		580		618	
5	307	316	319	324	275	292
5	324		329		309	
6	5397	5372	5269	5223	4408	4517
6	5347		5177		4626	
7	118	107	115	106	104	101
7	95		96		97	
8	172	179	146	151	163	167
8	185		156		171	
9	63	68	81	78	63	74
9	72		74		85	
10	59	46	52	50	46	41
10	33		48		35	
11	105	106	100	107	94	109
11	106		114		123	
12	229	235	233	232	236	225
12	240		231		213	
13	209	220	194	198	212	220
13	231		201		227	
14	435	426	497	452	387	399
14	417		406		411	
15	232	237	214	193	168	168
15	241		172		167	
16	292	299	272	276	277	289
16	306		280		300	
17	93	95	72	87	107	109
17	97		102		111	
18	226	225	248	215	223	214
18	224		182		205	
19	680	642	698	695	559	557
19	603		691		554	
20	142	129	134	141	125	140
20	116		148		155	
21	200	192	189	202	179	187
21	184		215		194	

Vedlegg 21: Rådata for manuelt telte Makrofager

Pasient nr.	1 Time	2 Time	4 Time	24 Time (rom)	24 Time (kjøl)
1	34,50	32,00	28,00	41,50	51,00
2	75,50	61,50	72,00	69,00	64,50
3	68,50	76,50	77,00	82,00	74,50
4	79,50	83,50	89,50	84,00	83,50
5	53,50	48,00	51,00	44,00	50,50
6	57,50	59,50	58,00	64,50	61,00
7	58,50	60,50	67,00	65,50	64,50
8	75,50	68,50	62,00	76,50	84,50
9	74,50	86,00	82,50	0,00	80,50
10	63,50	60,00	56,50	64,00	60,00
11	46,50	48,50	51,00	55,00	58,50
12	46,00	50,00	49,00	57,00	41,00
13	28,50	26,00	32,00	29,50	34,00
14	75,00	72,00	82,50	86,00	88,00
15	60,00	66,50	63,00	66,00	58,00
16	54,50	56,50	70,50	68,00	69,50
17	82,00	83,00	81,50	89,50	85,00
18	25,00	32,50	31,50	33,00	38,50
19	76,50	77,50	73,50	81,50	78,50
20	61,00	73,50	61,50	70,00	72,00

Vedlegg 22: Rådata for manuelt telte Lymfocytt

Pasient nr.	1 Time	2 Time	4 Time	24 Time (rom)	24 Time (kjøl)
1	62,00	63,50	67,00	56,50	44,00
2	23,00	36,50	26,50	29,00	34,00
3	14,50	10,50	13,50	7,50	13,50
4	10,50	7,50	4,50	11,00	11,00
5	43,50	49,50	46,50	52,50	47,50
6	37,00	36,00	39,00	33,00	36,50
7	33,50	34,00	29,00	33,00	32,50
8	22,00	28,50	37,00	23,50	23,50
9	21,00	10,50	14,50	0,00	19,00
10	32,50	34,00	39,50	32,50	37,50
11	47,00	43,50	43,50	40,00	39,00
12	47,50	44,00	45,00	36,00	53,50
13	18,50	28,50	23,00	23,50	20,50
14	20,00	24,00	17,00	13,50	11,00
15	34,50	29,00	33,00	30,50	37,50
16	37,00	36,50	25,00	26,50	28,50
17	11,00	10,50	13,00	9,00	14,00
18	9,50	8,50	7,50	14,00	9,00
19	20,00	20,50	24,50	17,00	21,00
20	36,50	23,00	38,00	29,00	27,50

Vedlegg 23: Rådata for manuelt telte Nøytrofile granulocytter

Pasient nr.	1 Time	2 Time	4 Time	24 Time (rom)	24 Time (kjøl)
1	2,00	3,50	2,00	0,50	2,00
2	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
3	8,50	5,00	3,50	1,00	4,50
4	6,00	5,00	4,00	3,00	2,00
5	2,00	1,50	2,00	2,00	1,00
6	4,00	3,50	2,00	2,00	1,50
7	4,00	3,00	2,50	1,00	1,50
8	2,50	3,00	1,00	0,00	0,00
9	2,00	1,50	1,50	0,00	0,00
10	1,50	2,00	2,50	0,50	0,50
11	4,00	6,50	5,00	4,00	1,50
12	5,00	5,00	4,50	4,00	3,50
13	0,50	1,00	0,50	0,50	0,50
14	4,00	3,50	0,50	0,00	0,50
15	2,50	2,50	2,00	1,50	2,50
16	3,00	2,50	0,50	1,00	0,00
17	6,50	6,50	5,00	1,50	1,00
18	65,00	57,00	59,00	49,00	51,50
19	2,00	1,00	2,00	0,50	0,00
20	3,00	3,50	0,50	0,50	0,50

Vedlegg 24: Rådata for manuelt telte Eosinofil

prøve nr	1 Time	2 Time	4 Time	24 Time (rom)	24 Time (kjøl)
1	1,50	1,00	2,00	1,50	3,00
2	1,00	1,50	1,00	1,50	1,00
3	8,50	8,00	6,00	9,50	7,50
4	4,00	4,00	2,00	2,00	3,50
5	1,00	1,00	0,50	1,50	1,00
6	1,50	1,00	1,00	0,50	1,00
7	4,00	2,50	1,50	0,50	1,50
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	2,50	2,00	1,50	0,00	0,50
10	1,50	4,00	1,50	3,00	1,50
11	2,50	1,50	0,50	1,00	1,00
12	1,50	0,50	1,50	3,00	2,00
13	52,50	44,50	44,50	46,50	45,00
14	1,00	0,50	0,00	0,50	0,50
15	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00
16	4,00	4,50	4,00	4,50	4,00
17	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00
18	0,50	1,50	2,00	4,00	1,00
19	1,00	1,00	0,00	1,00	0,50
20	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00

Vedlegg 25: Rådata for manuelt telte Mastcelle

Pasient nr.	1 Time	2 Time	4 Time	24 Time (rom)	24 Time (kjøl)
1	25,00	10,00	11,00	6,00	9,00
2	1,00	6,00	8,00	5,00	7,00
3	2,00	5,00	8,00	5,00	4,00
4	9,00	6,00	21,00	21,00	9,00
5	42,00	39,00	24,00	25,00	20,00
6	53,50	46,50	51,00	27,25	37,00
7	9,00	14,00	14,00	9,00	11,00
8	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00
9	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
10	6,00	4,00	3,00	0,00	1,00
11	3,00	4,00	6,00	2,00	4,00
12	8,00	5,00	3,00	3,00	3,00
13	1,00	3,00	1,00	3,00	2,00
14	22,00	27,00	20,00	20,00	19,00
15	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
16	28,00	24,00	28,00	28,00	28,00
17	4,00	2,00	4,00	3,00	2,00
18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
19	38,75	57,50	61,25	58,75	52,50
20	4,00	1,75	3,75	2,50	1,75

Vedlegg 26: Utstyr

Fargekar (plastkar med lokk)	Leverandør: VWR International
Stativ til objektglass (innsats i rustfritt stål)	Leverandør: VWR International
Pinsetter	Leverandør: VWR International
Målesylinder	Leverandør: VWR International
Objektglass med merkefelt 26x76 MM	St. Olavs art.nr:4006058
Advia 2120	Advia2120
Cyto-sentrifugering	Hettich Universal 320
Automatpipette	(10-100µl), (100-1000µl)
Mikroskop	Nikon ECLIPSE 80i
345/12 Assistent Counter AC-12	345/12 Assistent Counter AC-12
Dekkglass 50x24 MM	St.Olavs art.nr:4010658
Filtrerpapir Whatman sortbånd 589-1150 MM	St.Olavs art.nr:4014890