



# NTNU

Kunnskap for en bedre verden

# Bacheloroppgave

**BI301305 Bacheloroppgave Bioingeniør**

**Stabilitetstesting og vurdering av nytt reagens på ABX**

**Micros ES 60**

Kandidatnummer: 611 og 614

Totalt antall sider inkludert forsiden: 48

Innlevert Ålesund, 23.05.16

## Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none"><li>• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.</li><li>• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.</li><li>• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.</li></ul>	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. <a href="#">Universitets- og høgskoleloven</a> §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

# Publiseringsavtale

Studiepoeng: 15

Veileder: Martin Oma og Heidi Engstrøm

## Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja  nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja  nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja  nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja  nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13/Evl. §13](#))

Dato: 23.05.2016

## **Forord**

Vi er to bioingeniørstudenter på 3. året NTNU Ålesund som har skrevet denne besvarelsen. Det var Bergman Diagnostika AS for Horiba som trengte noen til å teste et nytt reagens, hvor de tok kontakt med NTNU Ålesund avd. for biologiske fag og kom med dette som et forslag til bacheloroppgave.

Denne tiden har vært veldig utfordrende men har samtidig lært oss nye og spennende ting. Det mest utfordrende ved oppgaven var nok planleggingen i begynnelsen og den praktiske delen med analyseringen. Siste steget av prosjektet hvor vi satt sammen oppgaven til en fullstendig besvarelse var moro fordi vi kunne se tilbake på alt som var oppnådd.

Denne bacheloroppgaven kunne ikke blitt gjennomført uten de frivillige, som stilte opp ved blodprøvetakingen. Vi hadde noen vanskelige krav med tanke på både oppmøte og sted ved prøvetakingen. Derfor rettes det en stor takk for hjelpen til alle som møtte opp.

Vi vil gjerne få takke produksjef og faglig veileder Martin Oma fra Bergman Diagnostika AS for råd og god hjelp fra start til slutt og tildeling av prosjektet.

Det vil også rettes en takk mot skriveveileder Anne S. Røsvik og prosessveileder Heidi Engstrøm for hjelp og veiledning på skolen.

## **Sammendrag**

Dette prosjektet er skrevet på vegne av Horiba og Bergman Diagnostika AS, hvor oppgaven var å teste stabiliteten på et nytt reagens som Horiba har laget, på to like ABX Micros ES 60. Den praktiske delen gikk ut på å analysere flere runder med anonymiserte pasientprøver. Først for å sjekke om maskinene var samkjørte, deretter for å se om det nye reagenset tilfredsstilte bestemte krav. Vår oppgave var å utføre disse analyseringene og sende resultatene videre til Horiba, hvor de tok seg av vurdering av resultatene. Til tross for dette er det lagt frem resultater i besvarelsen og diskutert rundt disse for oppgavens del. Det viste seg at stabilitetstesting ga signifikante forskjeller mellom reagensene Minilysebio og Minilyse LMG, og at optimal analyseringstid av prøvene ligger på mellom 20 minutter og to timer. Skal prøven analyseres etter to timer bør den oppbevares kjølig for best resultat.

## Innholdsliste

<b>1 Innledning</b> .....	3
<b>1.1 Problemstilling</b> .....	4
<b>1.2 Teoridel</b> .....	4
1.2.1 Minilyse LMG .....	4
1.2.2 Minilysebio .....	5
1.2.3 Impedansmåling.....	5
1.2.4 Fotometrisk måling .....	6
1.2.5 Hemoglobin .....	6
1.2.6 3-parts diff (lymfocytter, monocytter og granulocytter).....	7
1.2.7 Tosidig t-test i par.....	7
<b>2 Material og metode</b> .....	8
<b>2.1 ABX Micros ES 60</b> .....	8
<b>2.2 Reagenser, kontroller og kalibrator</b> .....	9
2.2.1 Minilyse LMG og Minilysebio .....	9
2.2.2 Kontroller .....	9
2.2.3 Kalibrator .....	9
<b>2.3 Praktisk</b> .....	10
2.3.1 Blodprøvetaking.....	10
2.3.2 Merking av prøveglass.....	10
2.3.3 Tidstabell .....	11
2.3.4 Analysering .....	11
2.3.5 Prøveresultat .....	12
2.3.6 Prøverør og -materiale .....	13
<b>3 Resultater</b> .....	14
<b>3.2 Sammenligning av reagens</b> .....	17
<b>3.3 Lagringsomgivelser og -tid</b> .....	21

<b>4</b>	<b>Diskusjon</b> .....	23
4.1	Sammenligning av maskinene .....	23
4.2	Sammenligning av reagens .....	23
4.3	Lagringsomgivelser og –tid .....	23
4.4	Feilkilder .....	24
4.5	Metodiske problem.....	25
4.6	Fordeler med nytt reagens.....	25
<b>5</b>	<b>Konklusjon</b> .....	26
<b>6</b>	<b>Kilder</b> .....	27
<b>7</b>	<b>Vedlegg</b> .....	29
7.1	<b>Vedlegg 1: E-mail fra Horiba Medical</b> .....	30
7.2	<b>Vedlegg 2: Brukerhåndbok ABX Micros ES60. S.263-264</b> .....	32
7.3	<b>Vedlegg 3: Tidstabell</b> .....	34
7.4	<b>Vedlegg 4: Videre statistiske tester</b> .....	35
7.5	<b>Vedlegg 5: E-mail fra Martin Oma, «for ferskt blod»</b> .....	36
7.6	<b>Vedlegg 6: Tre-parts diff kurve «for nytt blod»</b> .....	37
7.7	<b>Vedlegg 7: Samtykkelsesskjema for prosjekt</b> .....	38
7.8	<b>Vedlegg 8: Godkjenning fra NSD</b> .....	40
7.9	<b>Vedlegg 9: Sammensetning og toksisitet av Minilyse LMG</b> .....	42
7.10	<b>Vedlegg 10: Sammensetning og toksisitet av Minilysebio</b> .....	43

## 1 Innledning

Grunnen til at valget falt på denne bacheloroppgaven, var at vi ønsket en som skilte seg litt ut. Her ble vi nysgjerrige på den medisinsktekniske utfordringen og om det var mulig at det nye reagenset uten cyanid ville fungere like bra som det forrige.

Det var produksjef Martin Oma hos Bergman Diagnostika AS som kontaktet NTNU i Ålesund for å høre om noen kunne påta seg oppgaven med å teste ut et nytt reagens, på en maskin de leverer fra et fransk firma, Horiba. Dette hørtes ut som en svært spennende oppgave, som har stor relevans i fagfeltet vi utdanner oss til, og som vi vil dra nytte av erfaringsmessig ved en senere anledning i arbeidslivet.

Dette var en litt annerledes bacheloroppgave hvor løpet var lagt opp på forhånd av det franske firmaet Horiba, mer bestemt deres underavdeling Horiba Medical. De sendte oss en protokoll sammen med maskiner og utstyr, på hva som skulle testes ut og hvordan det skulle utføres. Jobben vår ble å få satt opp en gjennomførbar plan av prosjektet slik at tidsfristen ble overholdt, fordi Horiba Medical var interessert i å få resultatene raskest mulig. Men samtidig sørge for at planen var mulig å gjennomføre uten at det gikk utover resultatene.

I denne oppgavebesvarelsen beskrives det hvordan det nye reagenset virker, forskjellen på den gamle og den nye og hva slags resultater som fremkom av testene. Deretter prøver man å trekke en konklusjon ut i fra resultatene. Det er firmahemmeligheter når det kommer til sammensetningen av reagensene. På grunn av dette har det blitt gitt relativt lite og vage forklaringer på hvordan reagensene faktisk fungerer. Analyseprinsippet til maskinen for de parameterne som undersøkes, forklares i avsnittet om teori. Det er Horiba Medical sin oppgave å vurdere resultatene, men det blir forsøkt å diskutere seg frem til et resultat med tanke på bacheloroppgaven.



## 1.1 Problemstilling

Vår problemstilling er “*Stabilitetstesting og vurdering av nytt reagens på ABX Micros ES 60*”. Hvor vi hovedsakelig lurer på; Er det nye reagenset like bra nok som det gamle? Derfor skal det undersøkes om det er signifikant forskjell på det nye reagenset Minilysebio og det gamle Minilyse LMG. Parameterne som testes er hemoglobin og differensieringen mellom lymfocytter, monocytter og granulocytter. Parallelt med dette undersøker vi optimal lagringstid og lagringsomgivelser (romtemperatur ca. 22 °C eller kjølig ca. 4°C) av prøvematerialet for Minilysebio.

## 1.2 Teoridel

Her forklares det hva de to forskjellige reagensene er og hensikten med den nye i forhold til den gamle, hvor Minilysebio er ny og Minilyse LMG er gammel. Det blir også forklart om de ulike deteksjonsmetodene og parameterne.

Horiba Medical har laget et nytt reagens med navnet Minilysebio som de vil ha testet ut på deres ABX Micros ES 60 analysemaskin. Dette for å se om det fungerer like optimalt som deres gamle reagens, Minilyse LMG (LMG står for Lymfocytt, Monocytt og Granulocytt). Ved tillaging av Minilysebio har firmaet hatt fokus på et cyanidfritt reagens, siden dette etterhvert har blitt en stor forespørsel fra kundene til Horiba Medical. En annen fordel med det nylagede reagenset er at det ikke er oksygensensitivt slik som Minilyse LMG.

Minilyse LMG og Minilysebio er lyserende løsninger som brukes for in vitro-diagnostikk. De er utviklet for lysing av erythrocytter, telling og differensiering av hvite blodceller og hemoglobinbestemmelse.

### 1.2.1 Minilyse LMG

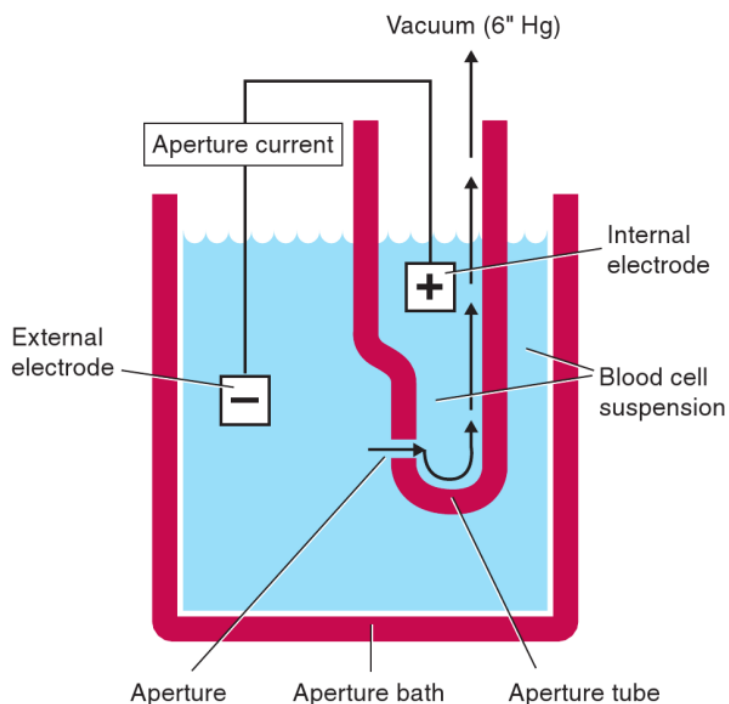
Dette reagenset baserer seg på Drabkin's metode som er en cyanmethemoglobinmetode. Når reagenset blandes med blodet lyseres erythrocyttene og hemoglobin blir frigitt. Kaliumferricyanid oksiderer toverdig jernioner ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i hemoglobinmolekylet til treverdig jernioner ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Når denne oksidasjonen inntreffer får vi methemoglobin. Methemoglobinet kombineres deretter med cyanidioner ( $\text{CN}^-$ ) for å danne cyanmethemoglobin. Dette er en stabil tilstand som leses av fotometrisk ved 550 nm (se vedlegg 7.1).

### 1.2.2 Minilysebio

Dette er det nye reagenset Horiba Medical har laget. Minilysebio gjør erytrocyttenes cellemembran mer flytende, og når en surfaktant blir tilsatt vil hemoglobinet bli frigitt. En surfaktant minsker overflatespenningen til erytrocyttene. (1) Alt av jernioner som er festet til hemoglobin vil bli oksidert og resulterende komplekser er kvantifisert fotometrisk ved 550 nm. (Se vedlegg 7.1) Sammenlignet med Minilyse LMG er konsentrasjonen av dodekyltrimetylammoniumklorid lavere i Minilysebio som gjør den mer miljøvennlig, og siden den er cyanidfri er den også mindre helsefarlig. (Se vedlegg 7.1, 7.9 og 7.10)

### 1.2.3 Impedansmåling

Ved impedansmåling, måles den elektriske motstanden mellom to elektroder. Hver elektrode er plassert på hver sin side av en kalibrert mikroåpning. Elektrisk strøm passerer kontinuerlig mellom elektrodene. Fortynnet prøvematerialet blir sendt gjennom åpningen, der én og én celle passerer, som øker den elektriske motstanden mellom elektrodene. Den økte elektriske motstanden er da proporsjonal med cellestørrelsen (Se vedlegg 7.2). Impedansmåling blir brukt ved telling av leukocytter, samt 3-parts diff (Lymfocytter, granulocytter og monocytter). Siden de ulike granulocytterne (nøytrofile, basofile og eosinofile) er av lik størrelse, er det ikke mulig å skille disse fra hverandre med impedansmåling.



**Figur 1:** Måleprinsipp for impedansmåling (2)

### 1.2.4 Fotometrisk måling

Fotometri betyr lysmåling. Ved fotometrisk måling måler man fall i lysintensiteten ved en spesifikk bølgelengde etter det har passert en løsning. (3) I denne oppgaven brukes fotometri ved bestemmelse av hemoglobin. Konsentrasjonen av en gitt analytt i løsningen vil være direkte proporsjonal med absorbert lys (absorbans). Det er bokstaven  $c$  i formelen under som er den ukjente, som man vil regne seg frem til. Dette kan gjøres ved bruk av Beers lov:

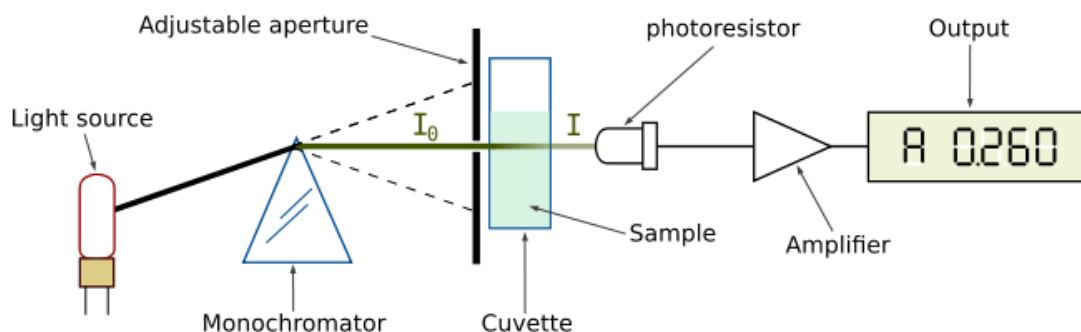
$$A = abc$$

$A$  = Absorbans

$a$  = Absorptivitet (parameter på hvor mye et stoff absorberer lys ved en hvis bølgelengde per mol)

$b$  = Lysveien gjennom kyvetten i centimeter

$c$  = Konsentrasjon av analytt i gram per liter



**Figur 2:** Måleprinsipp for fotometrisk måling. (4)

Følgende formel er hvordan maskinen regner ut verdien for absorbans:

$$A = -\log \frac{I_s}{I_r}$$

$A$  = Absorbans

$I_s$  = Lysintensiteten til transmittert lys gjennom en løsning

$I_r$  = Lysintensiteten til transmittert lys gjennom en referansekyvette

### 1.2.5 Hemoglobin

Et hemoglobinmolekyl består av fire heme-grupper, mer spesifikt protoporfyrin IX +  $\text{Fe}^{2+}$ , og to polypeptidkjedepar som er ulike. Det finnes seks ulike polypeptidkjeder hemoglobin kan bli bygget med ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  og  $\zeta$ ). To  $\alpha$ -kjeder og to  $\beta$ -kjeder er mest vanlig hos voksne. (5) Måten

dette proteinet og jernet henger sammen på, avgjør hvor mye oksygen som kan bli bundet til den røde blodcellen. (6) Når de røde blodcellene dør blir hemoglobinmolekylene frigjort. Nedbrytingen av det frigjorte hemoglobinet foregår i milten, leveren og benmargen. I denne prosessen blir jernet frigjort og brukt om igjen ved ny produksjon av røde blodceller i benmargen. (7)

### 1.2.6 3-parts diff (lymfocytter, monocytter og granulocytter)

Det finnes to hovedformer for hvite blodceller; Segmenterte granulocytter og mononukleære celler. De segmenterte granulocytterne kjennetegnes ved et kornet cytoplasma og en lappedelt cellekjerne. De mononukleære cellene har en hel kjerne uten korn i cytoplasmaet. Lymfocytter og monocytter går innunder kategorien mononukleære celler. (8) Differensialtellingen i dette prosjektet går ut på at man ser på den prosentvise fordelingen av lymfocytter, monocytter og granulocytter i blodet.

### 1.2.7 Tosidig t-test i par

En t-test anvendes i situasjoner hvor man skal vurdere kvantitative observasjoner. Standardavvik er ukjent og estimeres med empirisk verdi. T-test viser seg svært nyttig når nye analytiske metoder skal vurderes eller når to metoder skal sammenlignes. (9)

I en tosidig test finner man ut om metoden for Minilysebio og Minilysebio LMG gir signifikant forskjellige verdier for hemoglobin og 3-parts diff. For å finne  $T_{\text{Observert}}$  verdi brukes følgende formel:

$$t_{\text{obs}} = \left| \bar{x}_d - 0 \right| \frac{\sqrt{n}}{s_d} = \left| \bar{x}_d \right| \frac{\sqrt{n}}{s_d}$$

## 2 Material og metode

### 2.1 ABX Micros ES 60

Horiba Medical produserer ABX Micros ES 60 som en av sine mindre hematologimaskiner i produktserien. Dette er et nytt apparat som har tatt over for den tidligere Advia/ABX Micros 60. På grunn av sin størrelse og kapasitet er denne maskinen beregnet for mindre laboratorier som for eksempel legekontorer.



**Figur 3:** ABX Micros ES 60 (10). I midten er informasjonsskjerm, nederst til høyre er open tube-del hvor prøven suges opp i maskinen og har en innebygd miniprinter på toppen av maskinen (sees ikke på figuren).

Denne maskinen utfører de fleste typer av hematologianalyser, kan fås med eller uten CRP-analyse og velge om man vil ha open- eller closed tube-del hvor prøven suges opp. Som nevnt tidligere vil det kun fokuseres på hemoglobin og 3-parts diff-tellingen (lymf-, mono- og granulocytter) i denne oppgaven.

Dette er en lett og kompakt maskin som kun trenger 10µL fullblod i en prøve for å klare og analysere og gi et resultat. Fra prøven blir sugd opp i maskinen via en nål til den er ferdig analysert, tar det 1 minutt. Den måler og identifiserer ved hjelp av fotometri og impedans. Med integrert barkodeleser eller ved bruk av en håndholdt barkodeleser er det raskt å skanne inn pasient-ID for analysering av en blodprøve. Med closed tube-versjonen kan ABX Micros ES 60 ta inntil 50 prøver pr. time og 60 prøver pr. time med open tube. Maskinen utfører en

vaskesyklus etter 50 analyseringer med en blanktesting i etterkant. Den har et lagringsminne på inntil 1000 pasientresultater med histogram. Foretrukket prøveglass til maskinen er EDTA-glass, helst med K<sub>3</sub>-EDTA men K<sub>2</sub>-EDTA kan også brukes. (11)

På siden av maskinen oppbevares reagenset og clean solution, mens diluent kommer i en litt større pakning og blir plassert i nærheten av maskinen med en slange koblet til. Waste-boksen må tømmes manuelt og derfor holdes under oppsyn ved analysering slik at den ikke overfylles.

## 2.2 Reagenser, kontroller og kalibrator

Her blir det forklart kort om reagensene, kontrollene og kalibrator som ble brukt i forsøket. Reagensene består som tidligere nevnt av en gammel type Minilyse LMG og den nye de har laget Minilysebio. På grunn av firmahemmelighet angående det nye reagenset har vi lite opplysninger om dette.

### 2.2.1 Minilyse LMG og Minilysebio

Oversikt over reagensene vi har fått fra Horiba Medical. Se vedlegg 7.9 og 7.10 for sammensetning og toksisitet av reagensene som er hentet fra sikkerhetsdatatablad.

### 2.2.2 Kontroller

Det var tre ulike nivåer på kontrollene som ble brukt; low, normal og high. Dette blir anbefalt å bruke fra Horiba Medical. Kontrollene ble analysert på starten og slutten av arbeidsdagen (kl. 09:00 - 22:00).

**Tabell 1:** Oversikt over kontroller som ble brukt i analyseringen.

Referansenr.	Beskrivelse
2042208	ABX Minotrol 16 - 2L      2 x 2.5 mL
2042209	ABX Minotrol 16 - 2N      2 x 2.5 mL
2042202	ABX Minotrol 16 - 2H      2 x 2.5 mL

### 2.2.3 Kalibrator

Til forsøket på ABX Micros ES 60 ble ABX Minocal (Referansenummer 2032002) brukt som kalibrator. Det er ikke mulig å endre hvor mange celler maskinen teller, dermed må man ha en

faktor som den skal gange tallet med for å få riktig svar. For å beregne ny faktor for maskinen ble følgende formel brukt:

$$\text{Ny faktor} = \frac{\text{Fasit verdi}}{\text{Målt verdi}} * \text{Gammel faktor}$$

ABX Minocal ble analysert tre ganger, og gjennomsnittet av disse tre analysene er målt verdi i formelen. Fasitverdi fulgte med som pakningsvedlegg til ABX Minocal, og gammel faktor er en faktor Horiba Medical hadde satt da maskinen ble laget.

Når det ble byttet reagens på maskinene måtte også faktoren for hemoglobin bli endret for å få riktig resultat, siden hemoglobin blir påvirket av det nye reagenset.

## **2.3 Praktisk**

For at den praktiske delen av prosjektet skulle gå best mulig, var det viktig at detaljene ble planlagt. Dette ble gjort ved å merke prøver, lage et grundig tidsskjema og gjennomgå preanalyse før prosjektet ble iverksatt. I dette avsnittet forklares det hvordan de forskjellige delene av prosjektet ble organisert.

### *2.3.1 Blodprøvetaking*

Analysing og blodprøvetaking ble utført ved NTNU Ålesund på deres laboratoriet. Utvalget av personer valgt til blodprøvetaking var tilfeldig. Kriteriet for utvalget av personene var at de hadde gode årer, slik at det ikke ville oppstå eventuelle feilkilder som bruk av mindre nål, langvarig stase, etc. For å utføre dette prosjektet måtte blodprøven bli tatt innenfor et intervall på fem minutter, slik at man fikk tatt flest mulig personer på en dag. Da ville det ikke bli forsinkelse med leveringen av analyseresultatene til Horiba Medical.

I dette forsøket ble Helse Bergens prosedyre for blodprøvetaking for venepunksjon brukt. (12) Den ble fulgt ved alle blodprøvetakingene for å få minst mulig feilkilder.

### *2.3.2 Merking av prøveglass*

Til den praktiske gjennomføringen var det viktig at prøveglassene ble merket riktig. Et system som sikret pasientens ID og sikkerhet ved anonymisering ble laget. Det ble søkt om godkjenning av prosjektet hos Norsk senter for forskningsdata (NSD). De meldte at det ikke var nødvendig med godkjenning fordi pasientprøvene var anonyme (se vedlegg 7.8). I samtykkesskjemaet

står det at det ble samlet inn navn og personnummer (se vedlegg 7.7), men det ble ikke utført for det var ikke nødvendig for prosjektet. Deretter ble det påført nummer og bokstaver på prøveglassene som forteller når prøven skal analyseres, og om den skal stå kjølig eller i romtemperatur. Dette gjorde at det ble mer effektiv gjennomføring for selve analysen av prøven, fordi vi måtte taste inn prøvenummer manuelt hver gang en prøve ble analysert.

### 2.3.3 Tidstabell

I begynnelsen av bachelorprosjektet var en stor del av planleggingen å lage en tidstabell (Se vedlegg 7.3) for å se hvordan, og om kriteriene for oppgaven kunne gjennomføres. Den praktiske delen vi laget en tidstabell for, måtte gjennomføres raskest mulig etter ønske fra Horiba Medical. Tidstabellen som ble laget sikret at gjennomføringen av analyseringen ved bruk av begge typer reagenser ble effektiv og riktig.

### 2.3.4 Analysering

Det praktiske arbeidet kan bli sett på som to faser. Første fase var å analysere blodprøver for å sjekke om begge maskinene ga likt svar. 15 ulike prøver ble analysert to ganger på hver maskin. Da var begge maskinene koblet til gammelt reagens, Minilyse LMG. I denne fasen var det 3-parts diff-telling som skulle sammenlignes, og dette ble satt som krav fra Horiba Medical:

**Tabell 2:** Maksimal tillatt differanse mellom maskinene

Lymfocytter (%)	Monocytter (%)	Granulocytter (%)
± 1	± 1	± 2

For å finne ut differansen mellom maskinene for en prøve, ble det tatt gjennomsnitt av parallellkjøringen på hver maskin. Så tar man snittverdien for den ene maskinen minus snittverdien for den andre. Dermed plotter man inn differansen for hver prøve inn i en graf, der vi kan se om den kommer utenfor maksimal tillatt differanse. Eventuelt kan man se om det er en tendens til at den ene maskinen gir generelt høyere/lavere resultater enn den andre maskinen.

I andre fase undersøkte man nytt reagens mot gammelt, optimal lagringstid og lagringsomgivelser (kjølig, ca. 4 °C eller romtemperatur, ca. 22 °C). Maskinene var utstyrt med hvert sitt reagens, som ble byttet på ca. hver tredje dag slik at hvert reagens fikk like mye tid på



hver maskin. Deretter ble det analysert 30 prøver, to ganger på hver maskin ved følgende tider etter prøvetaking:

**Tabell 3:** *Oversikt over analysetidspunkt etter prøvetaking.*

<b>Person X</b>		
<b>Rør 1 (Ca. 22 °C)</b>	<b>Rør 2 (Ca. 4 °C)</b>	<b>Rør 3 (Ca. 22 °C)</b>
5 min	1 time	1 time
10 min	2 timer	2 timer
15 min	6 timer	6 timer
20 min	24 timer	24 timer
25 min	48 timer	48 timer
30 min		

Det ble tatt tre EDTA-rør fra hver testperson ved blodprøvetakingen. Rør nummer én til analysen fra fem minutter til 30 minutter, mens de to andre skulle analyseres ved én time til 48 timer. Rør nummer to stod i kjøleskap og rør nummer tre i romtemperatur mellom analyseringene.

Oppvarming og blanding av prøver som sto i kjøleskap ble standardisert slik at det ikke skulle utgjøre en feilkilde. De ble tatt ut 15 minutter før analysering slik at de fikk romtemperatur.

Det ble brukt en del tid til planlegging i dette prosjektet. På grunn av omfanget av denne oppgaven var det viktig å sette opp en tidstabell for analysering og blodprøvetaking. Dette gjorde at prosjektet ble utført på mest mulig effektiv måte, uten at Horiba Medical måtte vente for lenge på resultatet. Firmaet presiserte at de ønsket resultatene så fort som mulig da vi fikk utlevert prosjektet.

### *2.3.5 Prøveresultat*

Alle analyseringer og prøveresultat ble direkte overført til en bærbar PC etter ferdig analysering på maskinene. Disse resultatene ble lagret som en Excel-fil slik at de ble forståelig, for deretter å bli sendt videre til vår veileder Martin Oma som sendte resultatene til Horiba Medical. Oppsettet til overføring av data fra ABX Micros ES 60 til PC var allerede utført av Horiba Medical, derfor trengte gruppen bare å koble de sammen.

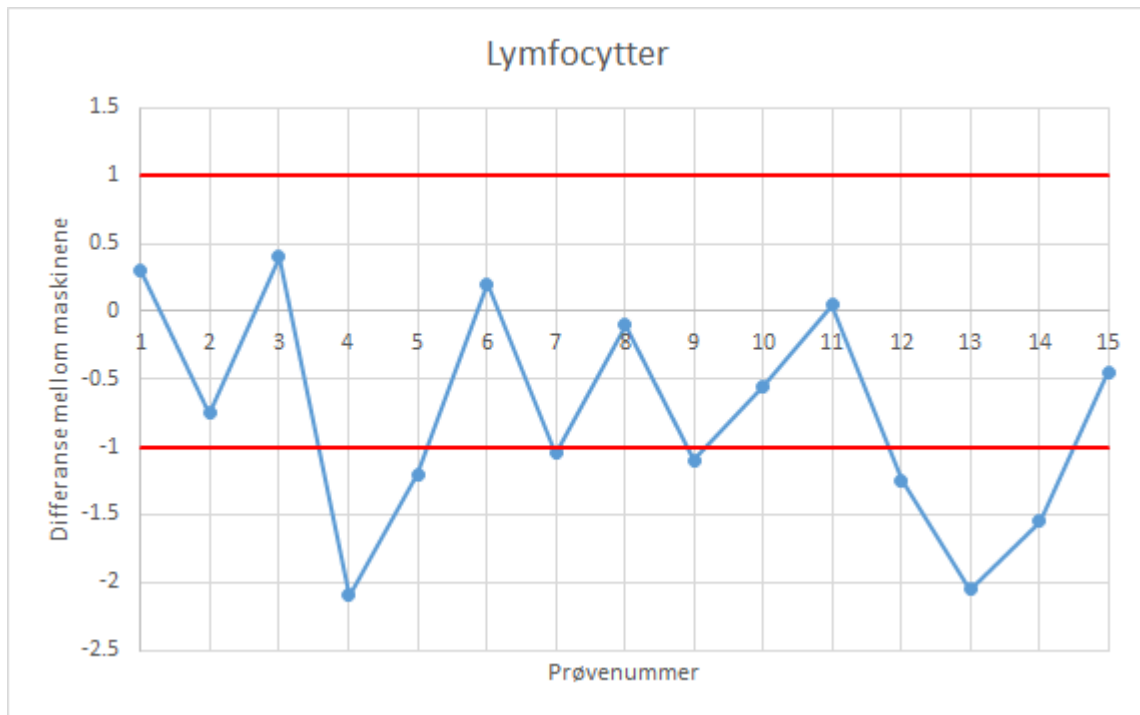
### *2.3.6 Prøverør og -materiale*

Prøverørene benyttet i dette prosjektet er EDTA-rør. Innsiden av rørene er kledd med EDTA som hindrer koagulasjon ved å binde  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  kreves for at koagulasjonskaskaden skal inntreffe. EDTA brukes mest ved hematologiske og genomiske undersøkelser siden den bevarer de cellulære komponentene i blodet. (13)

### 3 Resultater

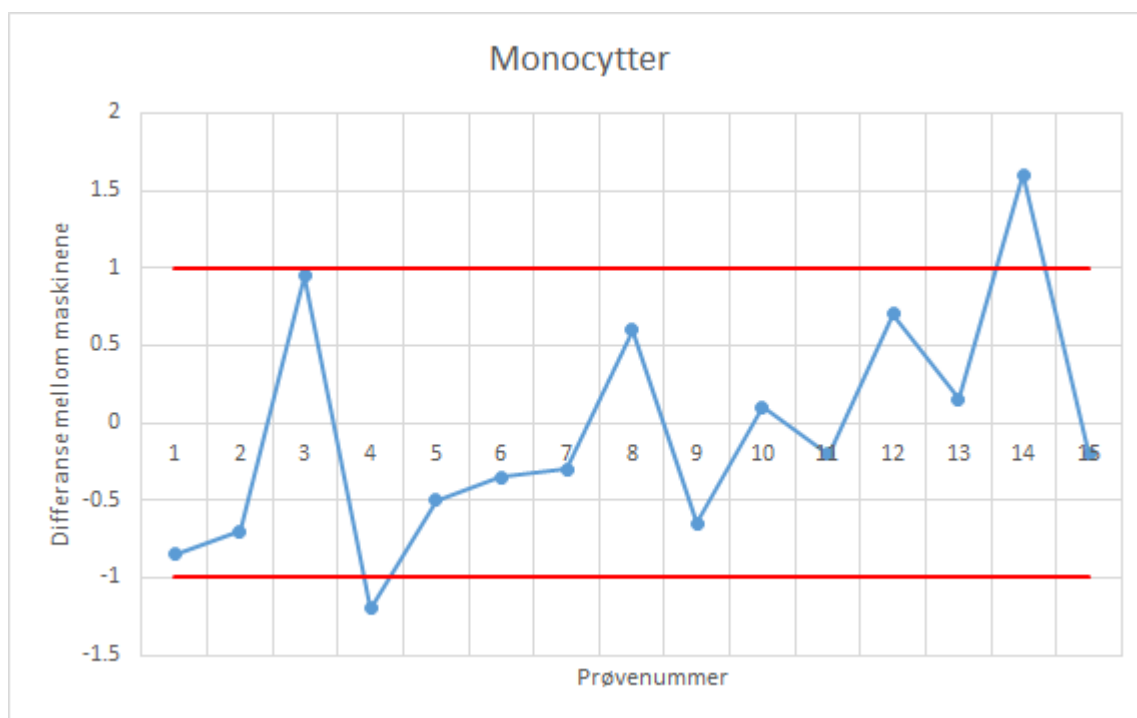
#### 3.1 Sammenligning av maskinene

For lymfocytter falt syv av prøvene utenfor akseptområdet på differansen mellom maskinene. Det kan sees en liten trend der den ene maskinen ofte gir høyere verdi. Se diagram 1.



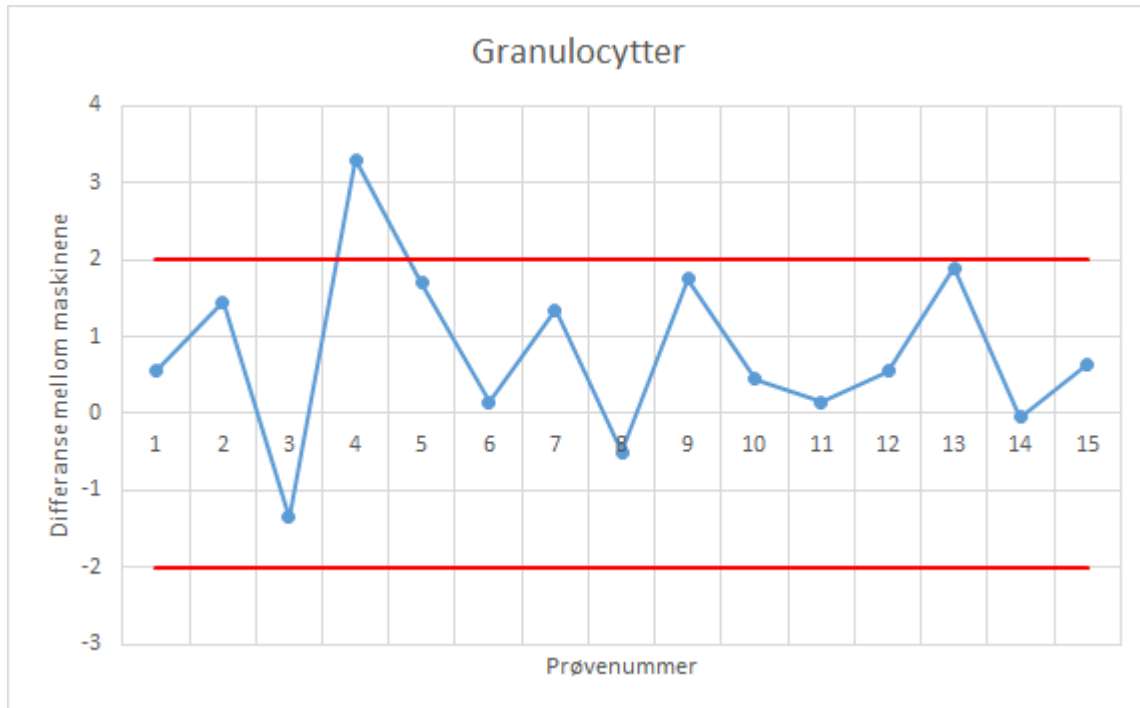
**Diagram 1:** *Differansen mellom maskinene for hver prøve for lymfocytter. Maksimal tillatt differanse er  $\pm 1$ .*

For monocytter har to prøver havnet utenfor akseptområdet. Se diagram 2.



**Diagram 2:** *Differansen mellom maskinene for hver prøve for monocytter. Maksimal tillatt differanse er  $\pm 1$ .*

For granulocytene har kun en av prøvene havnet utenfor akseptområdet. Kan sees en liten trend der den ene maskinen ofte gir høyere verdi. Se diagram 3.



**Diagram 3:** *Differansen mellom maskinene for hver prøve for granulocytter. Maksimal tillatt differanse er  $\pm 2$ .*

### 3.2 Sammenligning av reagens

**Tabell 4:** Resultat for hemoglobin

Analysetid	Minilysebio, A		Minilyse LMG, B		Differanse = A – B	
	(g/dl)		(g/dl)			
<b>5 min</b>	14.29		14.18		0.11	
<b>10 min</b>	14.31		14.22		0.09	
<b>15 min</b>	14.4		14.28		0.12	
<b>20 min</b>	14.38		14.31		0.07	
<b>25 min</b>	14.4		14.31		0.09	
<b>30 min</b>	14.44		14.32		0.12	
	<b>22 °C</b>	<b>4 °C</b>	<b>22 °C</b>	<b>4 °C</b>	<b>22 °C</b>	<b>4 °C</b>
<b>60 min</b>	14.3	14.4	14.3	14.3	0	0.1
<b>2 timer</b>	14.4	14.4	14.3	14.3	0.1	0.1
<b>6 timer</b>	14.3	14.4	14.3	14.2	0	0.2
<b>24 timer</b>	14.4	14.5	14.4	14.4	0	0.1
<b>48 timer</b>	14.5	14.4	14.3	14.3	0.2	0.1

Det utføres en tosidig t-test i par for å sammenligne reagensene. Hypotesene settes slik:

$$H_0 : \mu_d = 0 \quad H_1 : \mu_d \neq 0$$

Ved 95% konfidensnivå får vi en  $T_{\text{Kritisk}}$  verdi ( $T_{0.025, 10}$ ) på 2.228.  $T_{\text{Observert}}$  blir regnet til 11.799.

Siden  $T_{\text{Observert}} > T_{\text{Kritisk}}$  anser man at reagensene gir signifikante forskjeller, vi forkaster  $H_0$ .

**Tabell 5: Resultat for lymfocytter**

Analysetid	Minilysebio, A		Minilyse LMG, B		Differanse = A – B	
	(%)		(%)			
<b>5 min</b>	34.8		34.5		0.3	
<b>10 min</b>	34.5		34.2		0.3	
<b>15 min</b>	34.3		34		0.3	
<b>20 min</b>	34.1		33.8		0.3	
<b>25 min</b>	34.3		33.6		0.7	
<b>30 min</b>	34.1		33.7		0.4	
	<b>22 °C</b>	<b>4 °C</b>	<b>22 °C</b>	<b>4 °C</b>	<b>22 °C</b>	<b>4 °C</b>
<b>60 min</b>	34.4	34.3	34.1	34	0.3	0.3
<b>2 timer</b>	34.3	33.9	34.1	33.9	0.2	0
<b>6 timer</b>	33.1	33.1	33.7	33.5	-0.6	-0.4
<b>24 timer</b>	32.9	33.5	33.7	33.3	-0.8	0.2
<b>48 timer</b>	35.3	33.5	33.6	33.6	-1.7	-0.1

Det utføres en tosidig t-test i par for å sammenligne reagensene. Hypotesene settes slik:

$$H_0 : \mu_d = 0 \quad H_1 : \mu_d \neq 0$$

Ved 95% konfidensnivå får vi en  $T_{\text{Kritisk}}$  verdi ( $T_{0.025, 10}$ ) på 2.228.  $T_{\text{Observert}}$  blir regnet til 2.285.

Siden  $T_{\text{Observert}} > T_{\text{Kritisk}}$  anser man at reagensene gir signifikante forskjeller, vi forkaster  $H_0$ .

**Tabell 6:** Resultat for monocytter

Analysetid	Minilysebio, A		Minilyse LMG, B		Differanse = A – B	
	(%)		(%)			
5 min	6.1		5.6		0.5	
10 min	5.3		4.8		0.5	
15 min	4.7		4.1		0.6	
20 min	4.2		3.7		0.5	
25 min	4.2		3.6		0.6	
30 min	4.2		3.5		0.7	
	22 °C	4 °C	22 °C	4 °C	22 °C	4 °C
60 min	4.1	4.4	3.4	4	0.7	0.4
2 timer	4.4	4.5	3.7	3.8	0.7	0.7
6 timer	5.6	4.1	4.6	3.5	1	0.6
24 timer	12.7	4	11.6	3.2	1.1	0.8
48 timer	17.5	4.1	15.6	3.3	1.9	0.8

Det utføres en tosidig t-test i par for å sammenligne reagensene. Hypotesene settes slik:

$$H_0 : \mu_d = 0 \quad H_1 : \mu_d \neq 0$$

Ved 95% konfidensnivå får vi en  $T_{\text{Kritisk}}$  verdi ( $T_{0.025, 10}$ ) på 2.228.  $T_{\text{Observert}}$  blir regnet til 8.774.

Siden  $T_{\text{Observert}} > T_{\text{Kritisk}}$  anser man at reagensene gir signifikante forskjeller, vi forkaster  $H_0$ .



**Tabell 7: Resultat for granulocytter**

Analysetid	Minilyse LMG, A		Minilysebio, B		Differanse = A – B	
	(%)		(%)			
5 min	59.8		59		0.8	
10 min	61		60.3		0.7	
15 min	61.9		61		0.9	
20 min	62.4		61.6		0.8	
25 min	62.8		61.6		1.2	
30 min	62.8		61.7		1.1	
	22 °C	4 °C	22 °C	4 °C	22 °C	4 °C
60 min	62.5	62	61.5	61.3	1	0.7
2 timer	65.5	62.3	61.3	61.6	4.2	0.7
6 timer	61.7	63	61.2	62.7	0.5	0.3
24 timer	54.8	63.3	54.5	62.5	0.3	0.8
48 timer	50.9	63.2	47.2	62.4	3.7	0.8

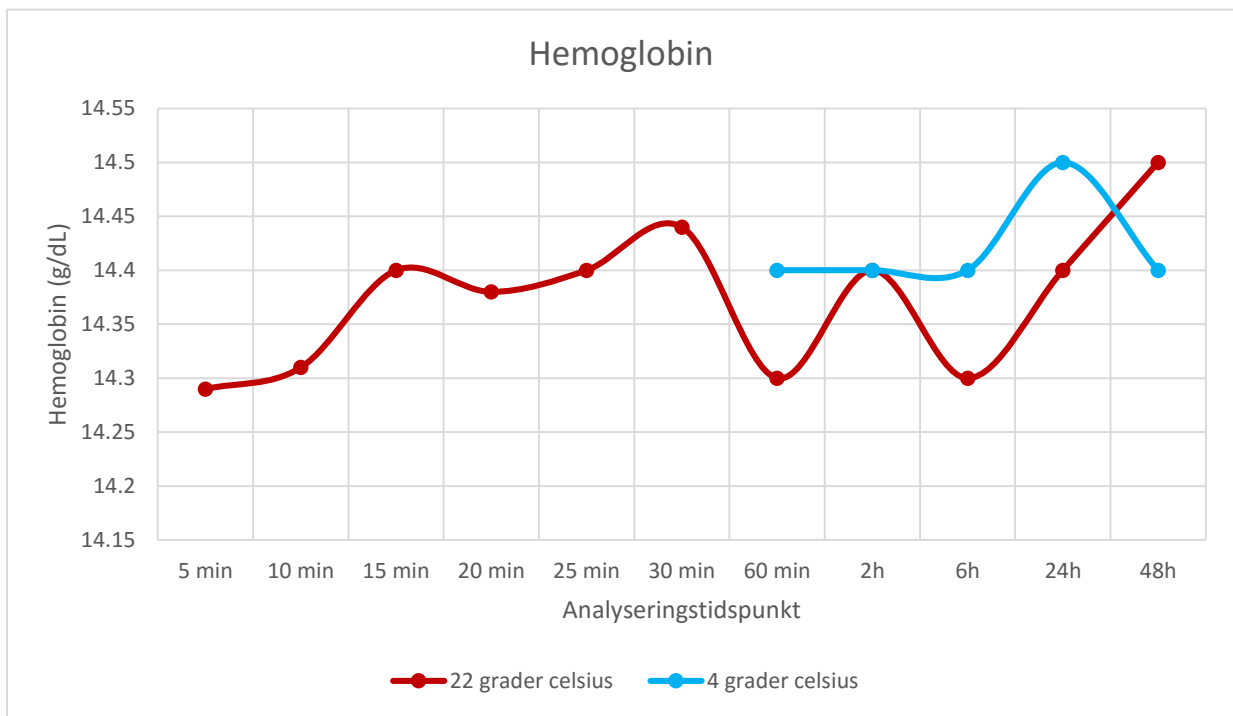
Det utføres en tosidig t-test i par for å sammenligne reagensene. Hypotesene settes slik:

$$H_0 : \mu_d = 0 \quad H_1 : \mu_d \neq 0$$

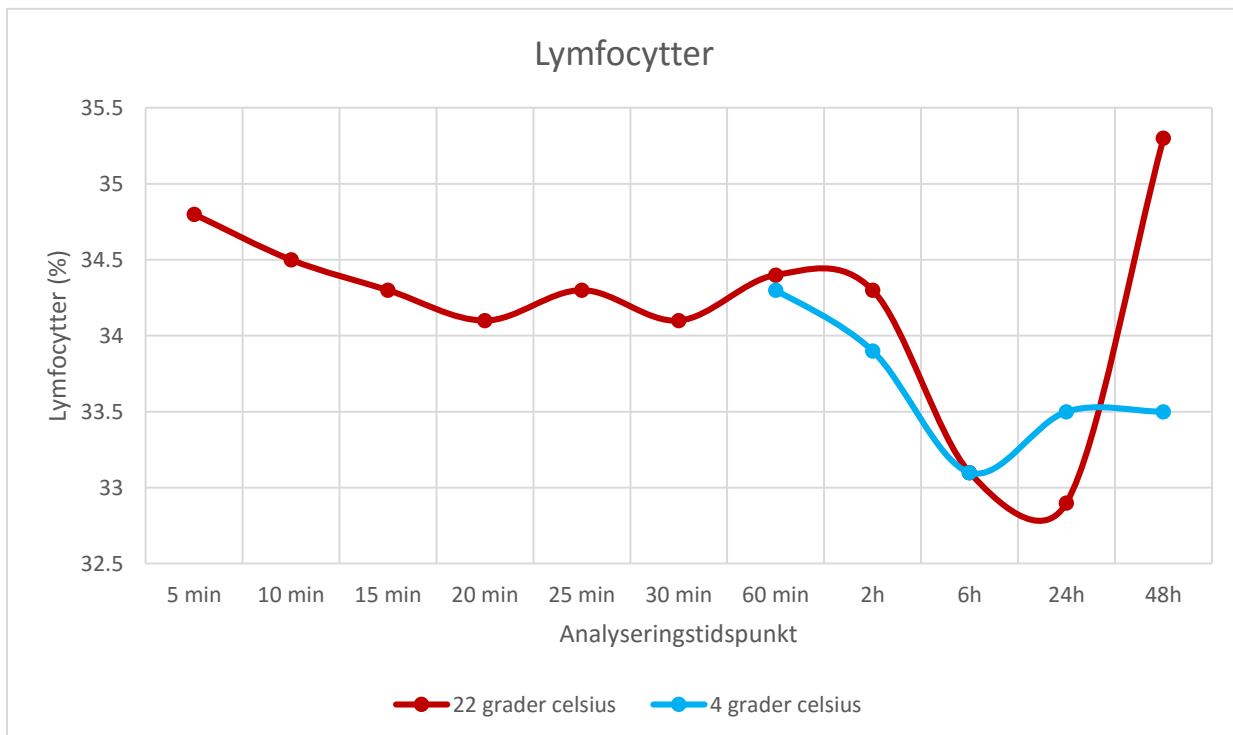
Ved 95% konfidensnivå får vi en  $T_{\text{Kritisk}}$  verdi ( $T_{0.025, 10}$ ) på 2.228.  $T_{\text{Observert}}$  blir regnet til 4.003.

Siden  $T_{\text{Observert}} > T_{\text{Kritisk}}$  anser man at reagensene gir signifikante forskjeller, vi forkaster  $H_0$ .

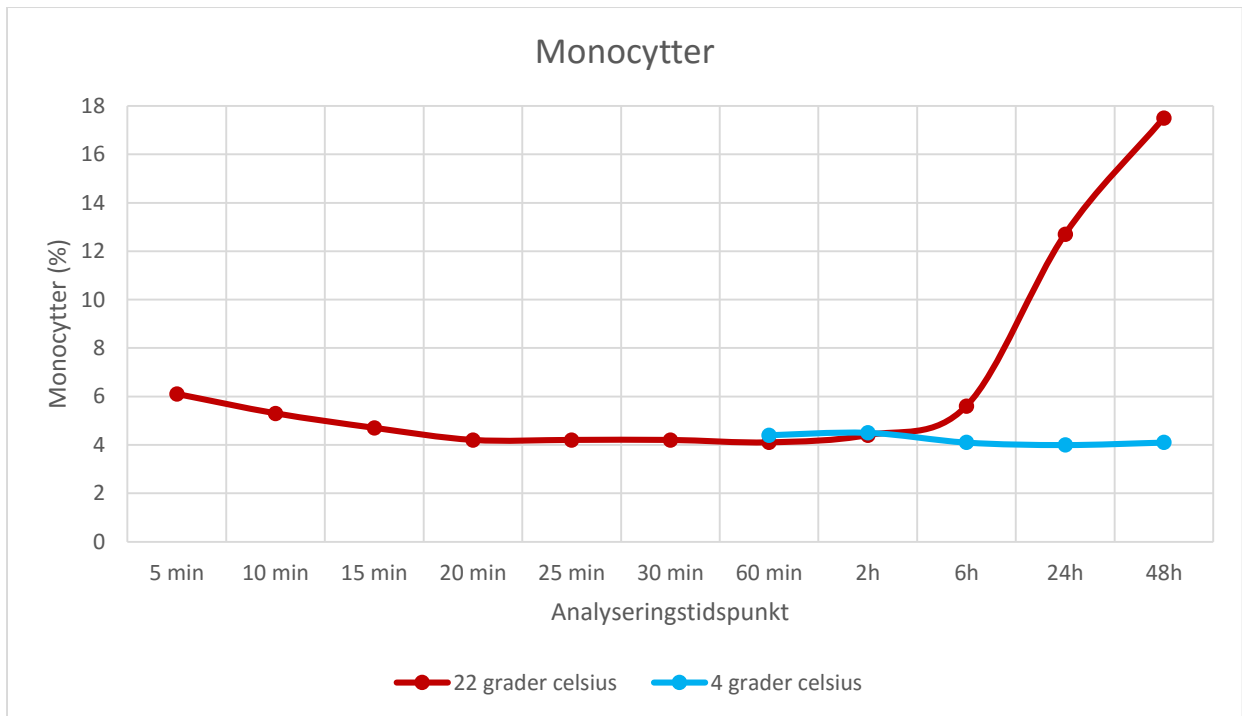
### 3.3 Lagringsomgivelser og -tid



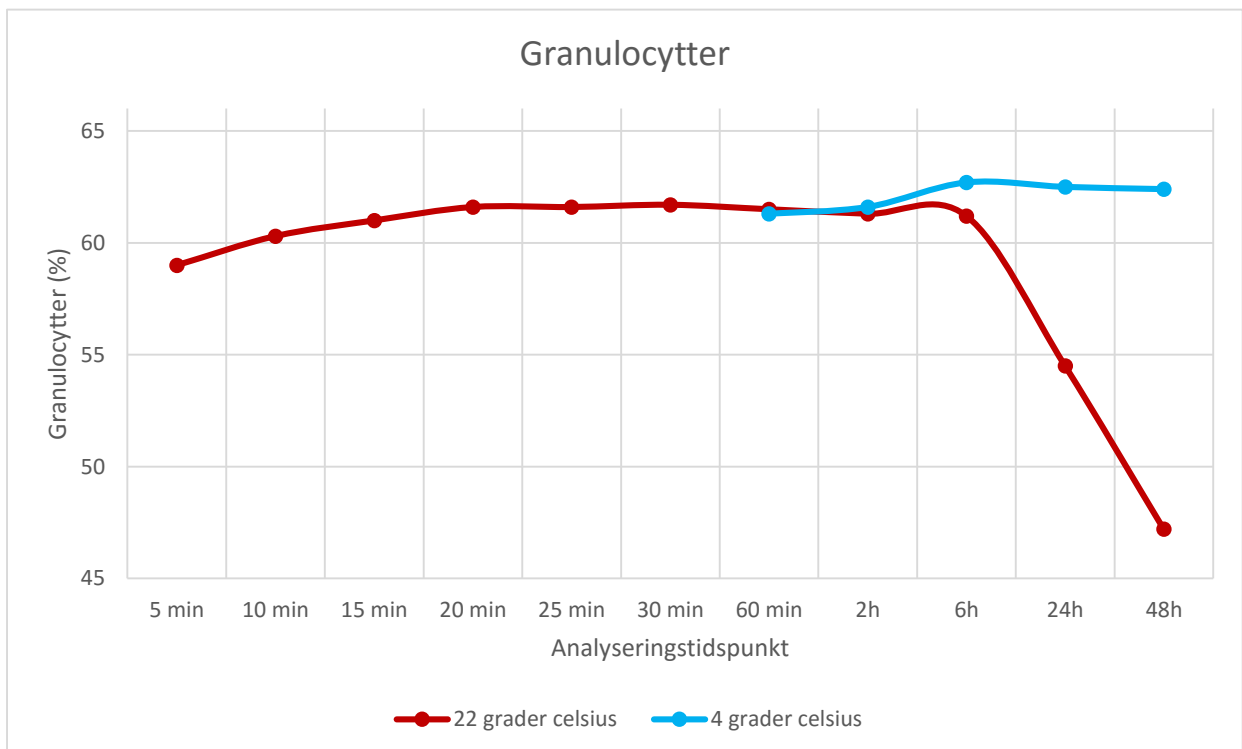
**Diagram 4:** Endring i hemoglobinkonsentrasjon over tid i romtemperatur og kjøleskap med reagenset Minilysebio.



**Diagram 5:** Endring i lymfocyttkonsentrasjon over tid i romtemperatur og kjøleskap med reagenset Minilysebio.



**Diagram 6:** Endring i monocyttkonsentrasjon over tid i romtemperatur og kjøleskap med reagenset Minilysebio.



**Diagram 7:** Endring i granulocyttkonsentrasjon over tid i romtemperatur og kjøleskap med reagenset Minilysebio.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Sammenligning av maskinene

For lymfocytene har hele syv prøver kommet utenfor akseptområdet, mens for monocytene var det kun to utenfor og på granulocytene kun en. Dette vil påvirke analysesvaret og det statistiske resultatet i neste fase der vi sammenligner reagensene. I protokollen stod det ingenting om at prøver skal analyseres om igjen e.l. hvis det ble for stor differanse. Dermed gikk man videre til fase to i forsøket.

### 4.2 Sammenligning av reagens

Ut ifra de statistiske testene utført for hvert parameter, så kan man ikke si at reagensene gir samme svar. Derimot ifølge en e-mail fra Horiba Medical (se vedlegg 7.1) så har de kommet frem til at det ikke er signifikante forskjeller mellom reagensene, ved andre studier de har arrangert. Grunnen til dette kan være at i de statistiske testene som er gjort i denne oppgaven, så ser man om reagensene gir eksakt samme svar. Derfor er det et ganske eksakt krav som skal tilfredsstilles. Hvis man gir høyde for en liten slingringsmonn mellom reagensene ser man at de ikke gir signifikante forskjeller på enkelte av parameterne (se vedlegg 7.4).

Hemoglobin og lymfocytter gir ikke signifikante forskjeller siden  $T_{\text{Observert}} < T_{\text{Kritisk}}$ , men at man ennå ikke kan si det samme for monocytter eller granulocytter. Allerede her så kan man spørre om de egentlig gir samme svar, når man selv må legge inn slingringsmonn slik at det tilfredsstiller t-testen.

I første fase der maskinene ble sammenlignet, ser man at den ene maskinen gir konsekvent høyere resultat enn den andre på to av parameterne (lymfocytter og granulocytter), noe som vil påvirke den statistiske testen. Derimot motvirkes dette i liten grad, fordi det ble byttet jevnlig hvilken maskin som hadde Minilysebio og Minilyse LMG. Dermed “jevner” dette ut resultatet, men det er ikke til å ignorere at maskinene gir ulike svar.

### 4.3 Lagringsomgivelser og –tid

For hemoglobin ser man at på det meste svinger hemoglobinkonsentrasjon på  $\pm 0.2$  g/dl som er lite. Grafen viser ingen klar trend på om det bør oppbevares kjølig eller i romtemperatur, eller om det må analyseres innen et visst tidsrom. De små variasjonene i konsentrasjonen kan like så

godt være tilfeldige.

På 3-parts-diffen (lymfocytter, monocytter og granulocytter) ser man at forholdene endrer seg de første 20 minuttene, der lymfocytene og monocytene minker og granulocytene øker. Det har ikke blitt gjort noe særlig forskning på dette området, dermed kan man ikke si noe på grunnen for dette (se vedlegg 7.5 og 7.6).

Fra 25 minutter til to timer så er de relativt stabile der resultatene varierer minimalt i forhold til hverandre. Etter seks timer i romtemperatur begynner lymfocytter, monocytter og granulocytter å endre dramatisk i konsentrasjon. I kjøleskap etter seks timer så er fortsatt konsentrasjonen for monocytter og granulocytter relativt stabilt, men for lymfocytene varierer det en del, dog ikke like mye som prøven i romtemperatur.

Med hensyn på diagrammene 4-7 ble denne tidslinjen for x-aksen valgt. Intervallet mellom 24 timer og 48 timer ble kuttet ut, fordi det ville ha blitt vanskelig å fremstille diagrammet på en ryddig og oversiktlig måte.

#### **4.4 Feilkilder**

En mulig feilkilde i dette forsøket kan være vaskesyklusene til maskinene. Maskinene utførte vaskesykluser etter 50 analyseringer med en blanktesting i etterkant. På grunn av dette gjorde det at noen av prøvene ble hengende etter med inntil 10 minutter på det lengste ved analysering. Prøvene ble derfor ikke analysert ved eksakt tidspunkt. Men dette gjelder ikke alle prøvene, så hvis man tar gjennomsnittet av prøvene vil det nok likevel lande på et relativt sikkert svar for den gjeldende analysen.

Det dukker alltid opp ulike variabler man ikke får gjort noe med når det gjelder blodprøvetaking. Vi hadde et par tilfeller hvor blodåren til pasienten var vanskelig å lokalisere, som kan ha gjort at prøven ble analysert ca. 1 minutt senere enn hva som var meningen når vi fulgte tidstabellen. Vi måtte også avbryte den ene prøvetakingen fordi pasienten begynte å føle seg dårlig, dermed ble ikke det siste prøveglasset fylt helt opp. Anslår at prøveglasset ble ca. 90% fullt. Om dette fikk noe å si for blandeforholdet av fullblod og K<sub>3</sub>-EDTA og dermed resultatet er vanskelig å si.

#### **4.5 Metodiske problem**

Analysemaskinene bruker ca. ett minutt fra å suge inn prøvematerialet til resultatet foreligger. På grunn av dette og med tiden brukt til å skrive inn lab nummeret manuelt, var det en stor begrensning for utførelsen av prosjektet. Måten Horiba Medical hadde forespeilet at prosjektet skulle gjennomføres ga veldig lite slingringsmonn. Derfor ble det praktiske forandret litt på etter konsultasjon med faglig veileder Martin Oma. Det ble brukt tre prøveglass istedenfor å fordele én prøve i flere rør. Det ville også sikre mindre feilkilder ved å bruke tre prøveglass pr. pasient. På det meste skulle det utføres 20 analyser på en halvtime, som gjorde det svært krevende å opprettholde eksakt analysetidspunkt for enkelte av prøvene. Maskinen utfører rensesykluser etter 50 analyseringer med en blanktesting etter. Er den ikke fornøyd med resultatet fra blanktesting kjørte den enda en rensesyklus. Dette førte til at enkelte prøver ble forsinket med opp til ti minutter på det meste.

På grunn av analysering av prøver ved seks timer etter prøvetaking, så førte det til veldig lange og slitsomme dager på laboratoriet, der dagen startet klokken ni om morgenen og holdt på helt til klokken 22-23 tiden om kvelden. Men for å imøtekomme ønsket til Horiba Medical om at testingen skulle gjennomføres raskest mulig, måtte det utføres på denne måten.

#### **4.6 Fordeler med nytt reagens**

En av fordelene med det nye reagenset Minilysebio er at det ikke er sensitivt for oksygen. Dette gjør at det er mer håndterbart og vil gi mindre feilkilder enn det gamle reagenset. Selvfølgelig har man også den mer åpenbare fordelen ved at den er cyanidfri og dermed blir langt mindre giftig og skadelig for både miljøet og den som håndterer reagenset.

## 5 Konklusjon

Ved sammenligningen av ABX Micros ES 60 maskinene var det flere uteliggere på de forskjellige parameterne. Dette tyder på at maskinene varierer litt i svarresultatene. Det vi kan se fra grafene er en trend der den ene maskinen gir nesten konsekvent høyere lymfocyttsvar enn den andre. Samme gjelder for granulocytter men på motsatt maskin.

Man måtte ved flere anledninger analysere kontrollene om igjen til maskinene godkjente kontrollene. De ble alltid godtatt hvis vi startet en rensesyklus først.

Prosjektet viser at det er signifikante forskjeller mellom reagensene Minilysebio og Minilyse LMG, når man ser på grafresultatene og t-testen som ble utført.

Generelt sett hvis blodprøven skal analyseres etter to timer, bør den stå kjølig. Ut i fra resultatene vil det være mest gunstig å la blodprøvene stå i ca. 20 min før analysering, for at blodet skal få stabilisert seg. Prøvene som ble tatt er mest stabile mellom 20 minutter og to timer.

Som tiltak kan det gjøres videre testing, da dette prosjektet førte til ulikt resultat i forhold til Horiba Medical.

## 6 Kilder

---

1 Surfactants. The Essential Chemical Industry Online. 2013. Hentet 21 mai 2016. Tilgjengelig fra: <http://www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/surfactants.html>

2 Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. Hematology: Clinical principles and applications. 8th ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2012. S. 599

3 Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Tietz NW. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier; 2008. S. 64-66

4 Spectrophotometry. Wikipedia. Wikimedia Foundation Hentet 9 mai 2016. Tilgjengelig fra: <https://en.wikipedia.org/wiki/spectrophotometry>

5 Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. Hematology: Clinical principles and applications. 8th ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2012. S. 116-120

6 Hemoglobin, hva er det. NHI.no. Hentet 3 mai 2016. Tilgjengelig fra: <http://nhi.no/graviditetsoraklet/svangerskap-og-fodselsykdommer/hemoglobin-hva-er-det-3056.html>

7 Hemoglobin – Store medisinske leksikon. Store norske leksikon. Hentet 3 mai 2016. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/hemoglobin>

8 Blod – Store medisinske leksikon. Store norske leksikon. Hentet 3 mai 2016. Tilgjengelig fra <https://sml.snl.no/blod#menuitem2>

9 Helbæk M. Statistikk for kjemikere. Trondheim: Tapir Akademisk Forlag; 2001. S. 102-104

10 Bilde av ABX Micros ES 60. Hentet 30 april 2016. Tilgjengelig fra: <http://www.labix.com.ua/ru/goods/abx-micros-es-60-3-diff-18-parametrov>



---

11 ABX Micros ES 60. - HORIBA. Hentet 24 april 2016. Tilgjengelig fra:

<http://www.horiba.com/medical/products/hematology/abx-micros/abx-micros-es-60-details/abx-micros-es-60-5801/>

12 Blodprøvetaking. Helse Bergen. Hentet 11 april 2016. Tilgjengelig fra: <http://www.helse-bergen.no/no/omoss/avdelinger/lkb/sider/provetaking.aspx>

13 Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Tietz NW. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier; 2008. S. 48

## 7 Vedlegg

7.1 E-mail fra Horiba Medical .....	30
7.2 Brukerhåndbok ABX Micros ES 60. S. 263-264.....	32
7.3 Tidstabell.....	34
7.4 Videre statistiske tester .....	35
7.5 E-mail fra Martin Oma, «For ferskt blod».....	36
7.6 Tre-parts diff kurve på «For ferskt blod» .....	37
7.7 Samtykkelsesskjema for prosjektet.....	38
7.8 Godkjenning fra NSD .....	40
7.9 Sammensetning og toksisitet av Minilyse LMG.....	42
7.10 Sammensetning og toksisitet av Minilysebio .....	43

## 7.1 Vedlegg 1: E-mail fra Horiba Medical

**Fra:** [cecile.chabert@horiba.com](mailto:cecile.chabert@horiba.com) [mailto:[cecile.chabert@horiba.com](mailto:cecile.chabert@horiba.com)]

**Sendt:** 18. april 2016 10:48

**Til:** Martin Oma

**Kopi:** [christophe.duroux@horiba.com](mailto:christophe.duroux@horiba.com)

**Emne:** RE: SV: Tr : Minilysebio\_project

Dear Martin,

Thank you for the results.

Excuse me for the delay to answer, I will try to explain as clearly as I can the difference between both lysis and the environment interest to use Minilysebio.

We decided to develop a cyanid free lysis because we had customers requests of a "cyanid free lysis" and it was not the case for minilyse LMG.

Methods to measure the hemoglobin content utilize spectrophotometry to quantitate the amount of the oxygen-carrier protein in the sample. The requirements of any spectrophotometric method to measure hemoglobin in a blood sample are double:

1. The method must release all the hemoglobin from the red blood cell in which it is sequestered.
2. The method must convert all the hemoglobin in the sample into a single chromogenic species, regardless of which is the native form of hemoglobin when the reaction has begun.

Hemoglobin is determined in a dedicated channel.

The **ABX Minilyse LMG**, is based on the classical method using Drabkin's:

It's the cyanmethemoglobin method. The principle of this method is that when blood is mixed with the reagent, the erythrocytes release hemoglobin in the solution. The ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ) of the hemoglobin molecules are oxidized by potassium ferricyanide to ferric ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ). This oxidation results in the formation of methemoglobin.

Methemoglobines combines with the cyanide ions ( $\text{CN}^-$ ) to form cyanmethemoglobin, a stable compound read photometrically at a wave length of 550nm.

**ABX miniLysebio** a non-cyanide method solubilizes the erythrocyte (RBC) cell membrane. After adding surfactant agent, the hemoglobin is released. All the heme-iron is oxidized and the resulting complexes are quantified by spectrophotometry at a wavelength of 550nm.

You are right when you said that both reagent are very similar, we can't indicate the exact composition of the product in the MSD but as you can see dodecyltrimethylammonium chloride is reduced, and toxicity is lower for minilysebio because we removed cyanid.

We did some validation tests on different instruments to validate the performance with both lysis and we did not observed significant differences except a risk of bias on LMG results for micros according to the delay between sample collection and the run on the instrument. It's why we asked you to do this test.

I hope to have answer to your request.

Best regards

**Cécile Chabert**

Clinical Quality and QC Manager

Phone : +33 (0)4 67 14 17 99

**[www.horiba.com/medical](http://www.horiba.com/medical) [cecile.chabert@horiba.com](mailto:cecile.chabert@horiba.com)**



HORIBA ABX SAS  
Parc Euromédecine - Rue du Caducée  
BP 7290  
34184 Montpellier CEDEX 4 - FRANCE

Phone : +33 (0)4 67 14 17 99

[www.horiba.com/medical](http://www.horiba.com/medical)

[cecile.chabert@horiba.com](mailto:cecile.chabert@horiba.com)



Please consider the impact on the environment before printing this e-mail.

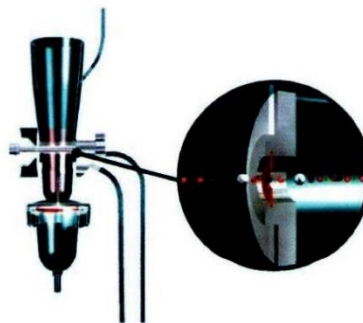
The information contained in the present e-mail and in the attached files, if any, is strictly confidential and intended for the exclusive use of the intended addressee(s). Copy, transmission, diffusion in whole or in part to another person than the intended addressee(s) is strictly prohibited. If you received this e-mail or document by mistake, please delete it and advise us immediately by e-mail, phone or fax. Thank you in advance.

## 7.2 Vedlegg 2: Brukerhåndbok ABX Micros ES 60. S.263-264

### 2.2. Deteksjon av røde blodlegemer og blodplater

#### 2.2.1. Deteksjonsprinsipper

- Måling av impedansvariasjon generert av passering av celler gjennom en kalibrert mikroåpning.
- Blodprøven fortynnes i elektrolytten (strømleder) ABX Minidil LMG og trekkes gjennom den 50 µm-kalibrerte mikroåpningen i mini flow-cytometeret. To elektroder plasseres på hver sin side av åpningen. Elektrisk strøm passerer kontinuerlig gjennom elektrodene.
- Når en celle passerer gjennom åpningen, øker den elektriske motstanden mellom de to elektrodene proporsjonalt med cellevolumet.



1 = Spenningstopper for RBC og PLT

- De elektriske pulsene som genereres, har meget lav spenning og blir forsterket. Det elektroniske systemet analyserer dem og eliminerer bakgrunnsstøyen.
- **Resultater:** Antall celler telt per volumenhet X kalibreringskoeffisient

**RBC-histogram** (Distribusjonskurver på 256-kanaler fra 30 fl til 300 fl).

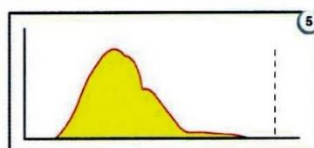
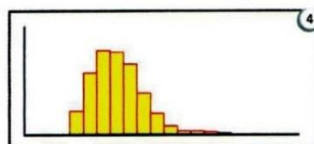
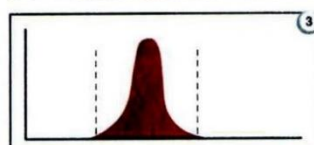
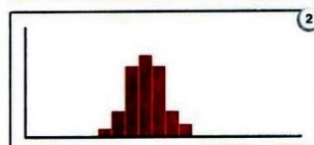
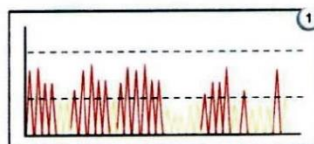
2 = Analog konvertering for RBC

3 = Dataintegring og plotting av RBC-distribusjonskurve

**PLT-histogram** (Distribusjonskurver på 256-kanaler fra 2 fl til en mobil terskel). Denne terskelen beveger seg i henhold til mikrocyttpopulasjonen som er til stede i analyseområdet.

4 = Analog konvertering for PLT

5 = Dataintegrasjon og plotting av PLT-distribusjonskurven



### 2.2.2. Tekniske egenskaper

- Metode: impedans
- Åpningsdiameter: 50 µm
- Tellevakuum: 200 mb
- Telleperiode: 2 (eller 3) x 6 s
- Innledende blodvolum: 10 µL
- Volum for ABX Minidil LMG: 2500 µL
- Endelig fortynningsfrekvens: 1/15000

Primær fortynning for RBC og PLT:

- Blod: 10 µL
- Volum for ABX Minidil LMG: 1700 µL
- Fortynning: 1/170

Sekundær fortynning for RBC og PLT:

- Fortynning: 28,3 µL (fra den primære fortynningen)
- Volum for ABX Minidil LMG: 2500 µL
- Fortynning: 1/88,3

**Endelig fortynning:  $1/170 \times 1/88,3 = 1/15000$**

## 2.3. Hemoglobinmåling

---

### 2.3.1. Måleprinsipper

Lyseringsreagensen bryter ned RBC-cellemembranen og frigjør hemoglobin i cellen. Hemoglobinet, som frigjøres av lyseringsreagensen, kombineres med kaliumcyanidet fra lyseringsreagensen og danner en kromogen cyanmethemoglobinforbindelse. Denne forbindelsen måles via den optiske delen av WBC/HGB-kammeret ved hjelp av spektrofotometri ved en bølgelengde på 550 nm.

### 2.3.2. Tekniske egenskaper

- Metode: Fotometri
- Bølgelengde: 550 nm
- Blodvolum: 10 µL
- Volum av ABX Minidil LMG: 2100 µL
- Volum av ABX Minilyse LMG: 500 µL
- Endelig fortynningshastighet: 1/260

Endelig HGB-resultat representerer: oppnådd absorbansverdi X kalibreringskoeffisienten.

### 7.3 Vedlegg 3: Tidstabell

Pasient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mandag 11/4-2016										
10:00										
10:05	5									
10:10	10									
10:15	15									
10:20	20									
10:25	25									
10:30	30									
10:35										
10:40		5								
10:45	Obs!	10								
10:50		15								
10:55		20								
11:00	60	25								
11:05		30								
11:10										
11:15			5							
11:20		Obs!	10							
11:25			15							
11:30			20							
11:35		60	25							
11:40			30							
11:45	Obs!									
11:50				5						
11:55			Obs!	10						
12:00	2h			15						
12:05				20						
12:10			60	25						
12:15				30						
12:20		Obs!								
12:25					5					
12:30				Obs!	10					
12:35		2h			15					
12:40					20					
12:45				60	25					
12:50					30					
12:55			Obs!							
13:00						5				
13:05					Obs!	10				
13:10			2h			15				
13:15						20				
13:20					60	25				
13:25						30				
13:30				Obs!						
13:35							5			
13:40						Obs!	10			
13:45				2h			15			
13:50							20			
13:55						60	25			
14:00							30			
14:05					Obs!					
14:10								5		
14:15							Obs!	10		
14:20					2h			15		
14:25								20		
14:30							60	25		
14:35								30		
14:40						Obs!				
14:45									5	
14:50								Obs!	10	
14:55						2h			15	
15:00									20	
15:05								60	25	
15:10									30	
15:15							Obs!			
15:20										5
15:25								Obs!	10	
15:30							2h			15
15:35										20
15:40									60	25
15:45	Obs!									30
15:50								Obs!		

## 7.4 Vedlegg 4: Videre statistiske tester

<b>Hemoglobin</b>						
Minilysebio	Minilyse LMG	Diff	Sd	Tillatt differanse	T-Observert	
14.29	14.18	0.1100	0.025298	0=	11.79909954	
14.31	14.22	0.0900		0.1=	1.31101106	
14.4	14.28	0.1200				
14.38	14.31	0.0700				
14.4	14.31	0.0900				
14.44	14.32	0.1200		<b>Signifikansnivå</b>	<b>T-kritisk</b>	
14.37	14.3	0.0700		95	T(0.025 , 10)	2.228
14.36	14.29	0.0700				
14.37	14.27	0.1000				
14.45	14.41	0.0400				
14.45	14.34	0.1100				
	Mean diff:	0.0900				
<b>%Lymfocytter</b>						
Minilysebio	Minilyse LMG	Diff	Sd	Tillatt differanse	T-Observert	
34.8	34.5	0.3000	0.376044	0=	2.285124425	
34.5	34.2	0.3000		0.1=	1.403146576	
34.3	34	0.3000				
34.1	33.8	0.3000				
34.3	33.6	0.7000				
34.1	33.7	0.4000		<b>Signifikansnivå</b>	<b>T-kritisk</b>	
34.4	34.05	0.3500		95	T(0.025 , 10)	2.228
34.1	33.9	0.2000				
33.1	33.6	-0.5000				
33.2	33.5	-0.3000				
34.4	33.6	0.8000				
	Mean diff:	0.2591				
<b>%Monocytter</b>						
Minilysebio	Minilyse LMG	Diff	Sd	Tillatt differanse	T-Observert	
6.1	5.6	0.5000	0.264575	0=	8.774964387	
5.3	4.8	0.5000		0.1=	7.521398046	
4.7	4.1	0.6000				
4.2	3.7	0.5000				
4.2	3.6	0.6000				
4.2	3.5	0.7000		<b>Signifikansnivå</b>	<b>T-kritisk</b>	
4.3	3.7	0.6000		95	T(0.025 , 10)	2.228
4.4	3.8	0.6000				
4.9	4.1	0.8000				
8.3	7.4	0.9000				
10.8	9.4	1.4000				
	Mean diff:	0.7000				
<b>%Granulocytter</b>						
Minilyse LM	Minilysebio	Diff	Sd	Tillatt differanse	T-Observert	
59.8	59	0.8000	0.949067	0=	4.002925858	
61	60.3	0.7000		0.1=	3.653464076	
61.9	61	0.9000				
62.4	61.6	0.8000				
62.8	61.6	1.2000				
62.8	61.7	1.1000		<b>Signifikansnivå</b>	<b>T-kritisk</b>	
62.3	61.4	0.9000		95	T(0.025 , 10)	2.228
62.8	61.5	1.3000				
62.4	61.9	0.5000				
59	58.5	0.5000				
58.7	54.8	3.9000				
	Mean diff:	1.1455				



## 7.5 Vedlegg 5: E-mail fra Martin Oma, «for ferskt blod»

Hei

Det er nok korrekt at blodbilde endrer seg litt når man analyserer hematologi-prøver raskt etter prøvetaking.

Tror ikke jeg vet om at det er publisert noe materiale på dette, men jeg har sett det «in live» - se vedlagte eksempel som jeg benytter i opplæring på celledeller. Her ser man tydelig at 3-diff kurven «dras mot venstre» på prøven som er analysert først.

Hvor mye dette påvirker prøvesvarene er nok varierende fra instrument-type til instrument-type.

Som du vet holder Aleksander og Silje på kullet ditt med en oppgave hvor de bl.a. analyserer ferske prøver hvert 5. minutt etter prøvetaking. Hensikten med dette er nok bl.a. at produsenten ønsker å se hvor raskt prøven blir stabil med de forskjellige reagensene som blir evaluert.

☺

**Hilsen Martin**

**Bergman Diagnostika AS**

**Martin Oma**

*Bioingeniør / Produksjef / Product Manager*

Mobiltf.: +47 92 46 21 56

Sentralbord: +47 63 83 57 50

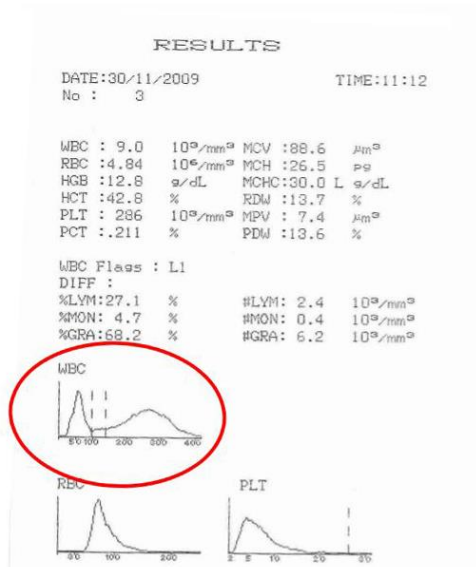
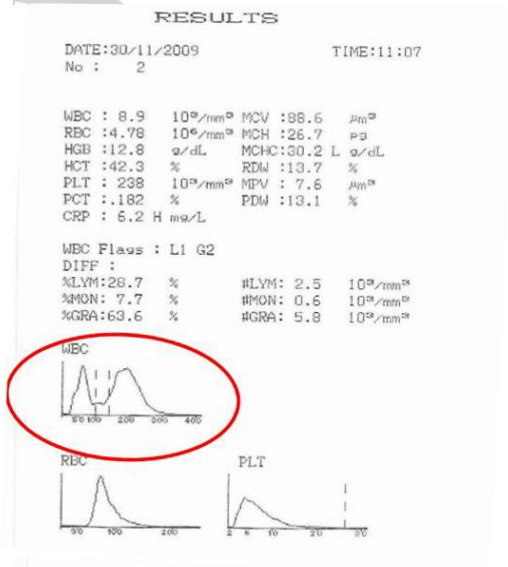
Jogstadveien 21, 2007 Kjeller

[martin.oma@bergmandiag.no](mailto:martin.oma@bergmandiag.no)

[www.bergmandiag.no](http://www.bergmandiag.no)

## 7.6 Vedlegg 6: Tre-parts diff kurve «for nytt blod»

# For "nytt" blod



## 7.7 Vedlegg 7: Samtykkesskjema for prosjekt

[Stabilitetstesting av nytt reagens | 16.03.2016 | v.1]



FORESPØRSEL OM DELTAKELSE I FORSKNINGSPROSJEKTET

### [STABILITETSTESTING AV NYTT REAGENS]

Dette er et spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt for å teste ut et nytt reagens fra Bergman Diagnostika AS. Tidligere har de brukt reagenset Minilyse LMG som er svært giftig. Bergman Diagnostika AS har utviklet et nytt reagens Minilysebio og vi vil se om dette virker like godt som det gamle. I denne sammenheng trenger vi blodprøver for å se på stabiliteten til det nye reagenset.

Prosjektet har prosjektnummer 48149 hos Norsk Senter for forskningsdata.

#### HVA INNEBÆRER PROSJEKTET?

Prosjektet innebærer å ta blodprøver. Det hele vil ta ca. 5 minutter og det er ingen forberedelse før prøvetaking.

I prosjektet vil vi innhente og registrere opplysninger om deg. Det vil bli registrert navn, fødselsnummer og blodprøveresultater.

#### MULIGE FORDELER OG ULEMPER

Ved å være med i prosjektet samtykker du til at det blir tatt venøs blodprøve (stikk i arm).

#### FRIVILLIG DELTAKELSE OG MULIGHET FOR Å TREKKE SITT SAMTYKKE

Det er frivillig å delta i prosjektet. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke. Dersom du trekker deg fra prosjektet, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til prosjektet, kan du kontakte:

Aleksander Skaland +47 95 88 12 99

[aleksander.skaland@gmail.com](mailto:aleksander.skaland@gmail.com)

Silje Vinkenes +47 92 28 11 34

[vinkenes@gmail.com](mailto:vinkenes@gmail.com)

#### HVA SKJER MED INFORMASJONEN OM DEG?

Informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Du har rett til innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg og rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene som er registrert.

Alle blodprøver vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjenkende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger gjennom en navneliste.

Prosjektleder har ansvar for den daglige driften av forskningsprosjektet og at opplysninger om deg blir behandlet på en sikker måte. Informasjon om deg vil bli slettet ved prosjektslutt. Deltakere vil ikke kunne bli gjenkjent i publisering av prosjektet.

#### HVA SKJER MED PRØVER SOM BLIR TATT AV DEG?

Prøvene som tas av deg skal oppbevares i en biobank på NTNU i Ålesund. Prøvene blir lagret i kjøleskap med kun labkode og prøvetakingstidspunkt som ikke vil kunne spores tilbake til person uten navneliste hos prosjektleder.

Biobanken opphører etter prosjektslutt (juni 2016). Alle blodprøver vil bli sent til destruering og navnelister vil bli makulert.

### SAMTYKKE TIL DELTAKELSE I PROSJEKTET

#### JEG ER VILLIG TIL Å DELTA I PROSJEKTET

Sted og dato

Deltakers signatur

Deltakers navn med blokk bokstaver

## 7.8 Vedlegg 8: Godkjenning fra NSD



Anne Synnøve Røsvik  
Avdeling for biologiske fag NTNU i Ålesund

6009 ÅLESUND

Vår dato: 09.05.2016

Vår ref: 48149 / 3 / ASF

Deres dato:

Deres ref:

### TILBAKEMELDING PÅ MELDING OM BEHANDLING AV PERSONOPPLYSNINGER

Vi viser til melding om behandling av personopplysninger, mottatt 31.03.2016. Meldingen gjelder prosjektet:

48149	<i>Stabilitetstesting av nytt reagens</i>
<i>Behandlingsansvarlig</i>	<i>NTNU, ved institusjonens øverste leder</i>
<i>Daglig ansvarlig</i>	<i>Anne Synnøve Røsvik</i>
<i>Student</i>	<i>Aleksander Skaland</i>

Etter gjennomgang av opplysninger gitt i meldeskjemaet og øvrig dokumentasjon, finner vi at prosjektet ikke medfører meldeplikt eller konsesjonsplikt etter personopplysningslovens §§ 31 og 33.

Dersom prosjektopplegget endres i forhold til de opplysninger som ligger til grunn for vår vurdering, skal prosjektet meldes på nytt. Endringsmeldinger gis via et eget skjema, <http://www.nsd.uib.no/personvern/meldeplikt/skjema.html>.

Vedlagt følger vår begrunnelse for hvorfor prosjektet ikke er meldepliktig.

Vennlig hilsen

Kjersti Haugstvedt

Amalie Statland Fantoft

Kontaktperson: Amalie Statland Fantoft tlf: 55 58 36 41

Vedlegg: Prosjektvurdering

Kopi: Aleksander Skaland [aleksander.skaland@gmail.com](mailto:aleksander.skaland@gmail.com)

*Dokumentet er elektronisk produsert og godkjent ved NSDs rutiner for elektronisk godkjenning.*



### Prosjektvurdering - Kommentar

---

Prosjektnr: 48149

På e-post mottatt 06.05.2016, informerte student at det kun skal innhentes **anonyme** opplysninger i prosjektet. Prosjektet vil dermed ikke omfattes av meldeplikten etter personopplysningsloven.

Det ligger til grunn for vår vurdering at alle opplysninger som behandles **elektronisk** i forbindelse med prosjektet er anonyme.

Med anonyme opplysninger forstås opplysninger som ikke på noe vis kan identifisere enkeltpersoner i et datamateriale, verken:

- direkte via personentydige kjennetegn (som navn, personnummer, epostadresse el.)
- indirekte via kombinasjon av bakgrunnsvariabler (som bosted/institusjon, kjønn, alder osv.)
- via kode og koblingsnøkkel som viser til personopplysninger (f.eks. en navneliste)
- eller via gjenkjennelige ansikter e.l. på bilde eller videoopptak.

Personvernombudet legger videre til grunn at navn/samtykkeerklæringer ikke knyttes til sensitive opplysninger.



## 7.9 Vedlegg 9: Sammensetning og toksisitet av Minilyse LMG

### SECTION 3: Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Product/ingredient name	Identifiers	%	Classification		Type
			67/548/EEC	Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]	
dodecyltrimethylammonium chloride	EC: 203-927-0 CAS: 112-00-5	>=2,5 - <5	Xi; R36/37/38 N; R51/53  See Section 16 for the full text of the R-phrases declared above.	Acute Tox. 4, H302 Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 Aquatic Acute 1, H400  See Section 16 for the full text of the H statements declared above.	[1]

### SECTION 12: Ecological information

#### 12.1 Toxicity

Product/ingredient name	Result	Species	Exposure
ABX Minilyse LMG 1L  dodecyltrimethylammonium chloride	EC50 1,01 to 9,99 mg/l	Daphnia	48 hours
	NOEC 1 mg/l	Daphnia	48 hours
	Acute EC50 190 µg/l Fresh water	Algae - Pseudokirchneriella subcapitata	96 hours
	Acute LC50 0,06 mg/l	Daphnia	48 hours

## 7.10 Vedlegg 10: Sammensetning og toksisitet av Minilysebio

### SECTION 3: Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Product/ingredient name	Identifiers	%	Classification		Type
			67/548/EEC	Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]	
Dodecyltrimethylammonium chloride	EC: 203-927-0 CAS: 112-00-5	>=1 - <2,5	Xi; R36/37/38 N; R51/53  See Section 16 for the full text of the R-phrases declared above.	Acute Tox. 4, H302 Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 Aquatic Acute 1, H400  See Section 16 for the full text of the H statements declared above.	[1]

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health or the environment, are PBTs or vPvBs or have been assigned a workplace exposure limit and hence require reporting in this section.

### SECTION 12: Ecological information

#### 12.1 Toxicity

Product/ingredient name	Result	Species	Exposure
Dodecyltrimethylammonium chloride	Acute EC50 190 µg/l Fresh water	Algae - Pseudokirchneriella subcapitata	96 hours
	Acute LC50 0,06 mg/l	Daphnia	48 hours