

Lin Alsedir
Marit Stormo

Sammenligning av celletap ved bruk av ulike metoder i forbindelse med preparering av prøver til immunfenotyping ved flowcytometri

Comparison of cell loss using different methods for preparation of samples for immunphenotyping by flow cytometry

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag
Mai 2024

Lin Alsedir
Marit Stormo

Sammenligning av celletap ved bruk av ulike metoder i forbindelse med preparering av prøver til immunfenotyping ved flowcytometri

Comparison of cell loss using different methods for preparation of samples for immunphenotyping by flow cytometry

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gjennomført ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim, som avsluttende prosjekt for Bachelor i Bioingeniørfag. Oppgaven ble gitt av lege Henning Sørensen Øfsteng, spesialbioingeniør Gunnhild Vatne Leirvik og fagansvarlig bioingeniør Trude Iversen Westgård ved Enhet for Cytometri, Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin ved St Olavs Hospital.

Vi ønsker å takke våre faglige veiledere, Gunnhild og Trude, som har bidratt til god praktisk opplæring og faglig veiledning. Vi takker også vår veileder Henning for faglig veiledning relatert til oppgavens kliniske nytte. Vi retter en stor takk til vår prosessveileder Toril Holien for veiledning og rådgivning under skriveprosessen, og for grundige og raske tilbakemeldinger. Til slutt vil vi takke ansatte ved Enhet for Cytometri for å ha tatt oss godt imot i bachelorperioden.

Lin Alsedir
Lin Alsedir

Marit Stormo
Marit Stormo

Trondheim, 20.05.2024

Sammendrag

Formålet med oppgaven er å sammenligne celletapet ved automatisk (LWA) og manuell opparbeidelsesmetode og to ulike vaskebuffere for prøver til immunfenotyping ved flowcytometri. Enhet for Cytometri ved St. Olavs Hospital benytter ikke LWA til preparering av beinmargsprøver og lymfeknuter, derfor er det ønskelig å automatisere prepareringen. Samtidig må det tas hensyn til hvilken metode som gir minst celletap for å oppnå høyest mulig sensitivitet. Det er også ønskelig å undersøke om man har høyere celletap ved bestemte lymfocyt-subpopulasjoner.

Det ble gjennomført en riktighetsstudie og presisjonsstudie for å sammenligne LWA-ene med hverandre, og for å bestemme hvilke LWA-er som skulle benyttes til videre studier. Til presisjonsstudien ble samme prøve analysert to ganger daglig i fire døgn. Til riktighetsstudien ble det analysert ulike blodprøver i ulike cellenivå. Til presisjons- og riktighetsstudien ble alle prøvene analysert på alle LWA-er og manuell metode. Det ble også gjennomført en buffer- og metodesammenligningsstudie på tre ulike prøvematerialer, for å sammenligne to bufferer ved manuell metode og LWA. Dette ble gjort for å se hvilken som gir minst celletap.

Basert på presisjonsstudien og riktighetsstudien var det ikke stor forskjell mellom LWA-ene og manuell metode. LWA-2 er eldst og LWA-1 vasker dårligst, dermed ble LWA-3 og LWA-4 som var mest lik hverandre valgt til videre studie. Buffer- og metodesammenligningsstudie viser at manuell metode i kombinasjon med CellWash ga mest %celletap hos beinmarg og lymfeknuter. På blod derimot var det likt %celletap ved alle metodene. Når det gjelder %celletap av lymfocytter i blodprøver ble det funnet at LWA-4 i kombinasjon med vaskebuffer ga høyest gjennomsnittlig %celletap. Det var likt celletap ved alle lymfocyt-subpopulasjonene.

Ut av våre resultater viste det seg at det er høyere celletap på beinmargsprøver og lymfeknuter enn blod. De to materialene ga høyere celletap ved bruk av manuell metode i kombinasjon med CellWash til preparering, ellers var det greit å automatisere analysering av beinmarg. Generelt sett var vaskebuffer best i kombinasjon med manuell metode, og CellWash best i kombinasjon med LWA. LWA-4 med vaskebuffer ga høyest %celletap av lymfocytter, og det er ingen spesifikk lymfocyt-subpopulasjon som ga høyere celletap.

Abstract

The purpose of this project is to compare the cell loss by automatic (LWA) and manual preparation methods and two different buffers for samples for immunophenotyping by flowcytometry. Enhet for Cytometri at St. Olav's Hospital does not use LWA for the preparation of bone marrow samples and lymph nodes, therefore it is beneficial to automate their preparation. At the same time, we must consider which preparation method causes the least cell loss to achieve the highest possible sensitivity. It is also beneficial to investigate whether there is higher cell loss in certain subpopulations.

An accuracy study and precision study were completed to compare the LWAs with each other, and to determine which LWAs should be used for further studies. For the precision study, the same sample was analyzed twice a day for four days. For the accuracy study, different blood samples were analyzed at different cell levels. For the precision and accuracy study, all samples were analyzed on all LWAs and manual method. A buffer and method comparison study were also completed on three different materials, to compare two buffers by manual method and LWA. This was done to see which method and buffer causes the least cell loss.

Based on the precision study and the accuracy study, there was not much difference between the LWAs and the manual method. LWA-2 is the oldest and LWA-1 had problems washing RBC, thus LWA-3 and LWA-4 were chosen for further study. The buffer and method comparison study shows that the manual method in combination with CellWash produced the most % cell loss in bone marrow and lymph nodes. In blood, on the other hand, there was the same % cell loss with all methods. Regarding the % cell loss of lymphocytes in blood samples, it was found that LWA-4 in combination with vaskebuffer gave the highest average % cell loss. Cell loss was similar for all lymphocyte subpopulations.

Our results showed that there is higher cell loss in bone marrow samples and lymph nodes than in blood. The two materials had higher cell loss when using the manual method in combination with CellWash for preparation, otherwise it was fine to automate the analysis of bone marrow. In general, vaskebuffer was best in combination with the manual method, and CellWash was best in combination with LWA. LWA-4 with vaskebuffer produced the most % cell loss of lymphocytes, and there is no specific lymphocyte subpopulation that produced higher cell loss.

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunnsteori	1
1.1.1	Flowcytometri	1
1.1.2	Immunfenotyping	2
1.1.3	Hematopoietiske stamceller	3
1.1.4	CD-antigener	3
1.1.5	Gating	4
1.1.6	Klinisk betydning	4
1.1.7	EuroFlow	7
1.2	Hensikt med oppgaven	7
2	Materiale og metode.....	8
2.1	Materiale.....	8
2.1.1	LWA.....	8
2.1.2	Antistoffer	9
2.1.3	Reagenser	9
2.1.4	Prøvemateriale.....	11
2.2	Metode.....	12
2.2.1	Prøveflyt under opparbeidelse.....	12
2.2.2	Presisjonsstudie	13
2.2.3	Riktighetsstudie.....	14
2.2.4	Sammenligningsstudie mellom ulike buffere og mellom manuell og automatisk prepareringsmetode	16
3	Resultat.....	22
3.1	Presisjonsstudie	22
3.2	Riktighetsstudie.....	23
3.2.1	Konfidensintervall	23
3.2.2	Differanse	24
3.2.3	Regresjon og korrelasjon.....	26
3.3	Buffer- og metodesammenligning.....	29
3.3.1	95% Konfidensintervall av blodprøver og beinmarg	29
3.3.2	Resultat av totalt %celletap for de ulike prøvematerialene.....	30
3.3.3	Resultater av %celletap av lymfocytter i blodprøver	32
3.3.4	Celletap ved ulike subpopulasjoner av lymfocytter	33
4	Diskusjon.....	34

4.1	Hvorfor er vi interessert i celletap?	34
4.2	Presisjonsstudie	35
4.2.1	Vurdering av CV%	35
4.2.2	Studiens begrensninger og vurdering av pålitelighet	35
4.3	Riktighetsstudie	36
4.3.1	Konfidensintervall	36
4.3.2	Diskusjon av resultater	36
4.3.3	Studiens begrensninger	38
4.4	Valg av LWA	38
4.5	Buffer- og metodesammenligning.....	39
4.5.1	Sammenligning av buffere og metoder	39
4.5.2	Prøvemateriale.....	40
4.5.3	Celletap av lymfocytter	40
4.5.4	Er det et tilfeldig celletap av lymfocytt-subpopulasjoner?.....	41
4.5.5	Studiens begrensninger	41
5	Konklusjon	41
	Bidrag	42
6	Referanser.....	42
7	Vedlegg	44
7.1	LWA programmer	44
7.2	RÅDATA PRESISJONSSTUDIE	46
7.3	konfidensintervall fra riktighetsstudie.....	49
7.4	Resultat fra riktighetsstudie.....	49
7.5	Differanseplot riktighetsstudie	51
7.6	Regresjonsanalyse riktighetsstudie	51
7.7	Konfidensintervall Buffer- og metodesammenligningsstudie.....	52
7.8	Resultater fra Buffer- og metodesammenligning	54
7.9	Resultater lymfocytter	56
7.10	Celletap av lymfocytt-subpopulasjoner.....	56
7.11	LWA-ER	57

Liste over forkortelser

ALL: Akutt lymfatisk leukemi

AML: Akutt myeloid leukemi

BM: Beinmarg

BSA: Bovint serumalbumin

CW: Cell Wash

FSC: Forward Scatter

KLL: Kronisk lymfatisk leukemi

KML: Kronisk myeloid leukemi

LK: Lymfeknute

LWA: Lyse Wash Assistant

MRD: Minimal Residual Disease

PBS: Fosfatbufret saltvann (Phosphate-buffered saline)

SSC: Side Scatter

VB: Manuell Vaskebuffer

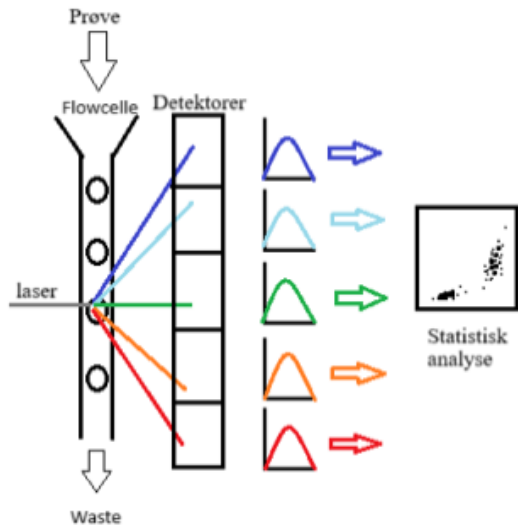
1 INNLEDNING

De fleste analyser i medisinske laboratorier er ønskelig å automatisere, men det er viktig at metoden ikke påvirker påliteligheten til resultatene. I denne oppgaven skal det undersøkes om det er ulikheter i celletap mellom automatisk og manuell preparering av prøver til immunfenotyping ved flowcytometri. Det skal også sjekkes om ulike buffere gir ulikt celletap. Stort celletap kan gi for lavt antall celler til vurdering, noe som kan føre til feildiagnostikk.

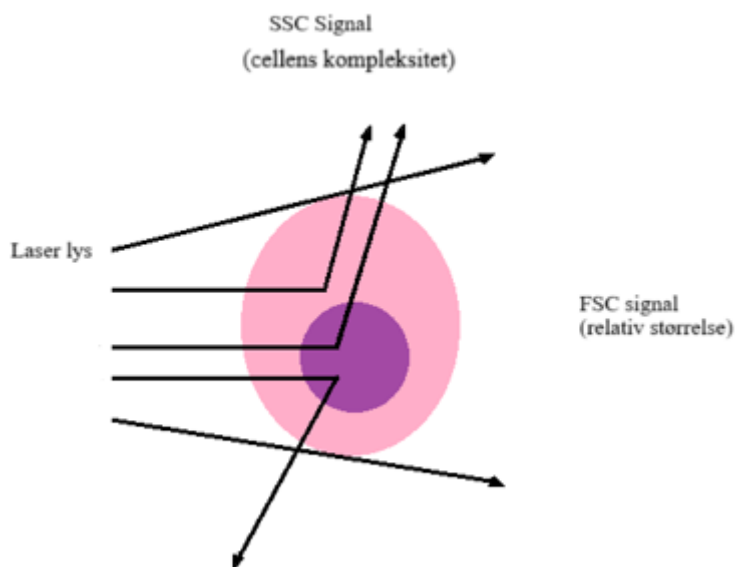
1.1 BAKGRUNNSTEORI

1.1.1 Flowcytometri

Flowcytometri er en metode som benyttes blant annet til telling og vurdering av celler i væskefase. [Flowcytometeret består av tre hovedsystemer: et væskebasert, et optisk og et elektronisk system.](#) I væskesystemet strømmer prøven med cellene inn, og cellene passerer en og en gjennom en laserstråle. Når cellene passerer gjennom laserstrålen, vil de spre lyset. Hvis de er merket med en fluorescerende markør vil de emitte fluorescens. Lyssignalene blir samlet i det optiske systemet som sorterer signalene til ulike detektorer. Lyssignalene som treffer detektorer, blir omgjort til numeriske verdier i det elektroniske systemet. Resultatene presenteres som et plot i instrumentets programvare, og vurderes av bioingeniører og leger. De benyttes til å utføre en klinisk vurdering av pasienter. Flowcytometerets arbeidsflyt er vist i figur 1. Forward scatter (FSC signal) forteller oss om cellens relative størrelse, mens side scatter (SSC signal) forteller oss om cellenes kompleksitet. ~~(1) Dette er vist i figur 2.~~ (What Is Multicolor Flow Cytometry | Cell Sorting Techniques, 2024) [Dette er vist i figur 2.](#)



Figur 1: Flowcytometerets arbeidsflyt. Celler strømmer gjennom flowcellen og passerer laserlyset. Ulike lasere aktiverer ulike fluorokromer og signalene blir sortert til ulike detektorer. Lyssignalene som treffer detektorene, blir omgjort til numeriske verdier og plottet i instrumentets programvare. Figuren er inspirert av en figur utarbeidet av BD BioSciences. (What Is Multicolor Flow Cytometry | Cell Sorting Techniques, 2024)

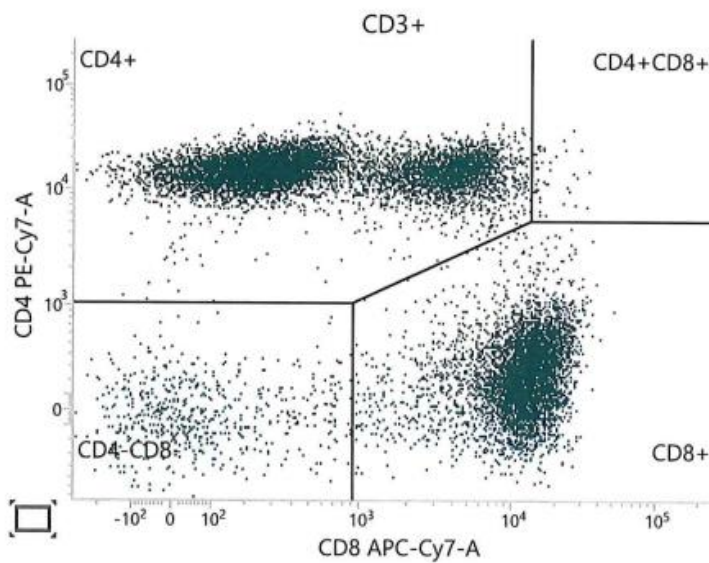


Figur 2: Cellens lysspredning. Figuren viser hvordan lyset spres når det treffer en celle. FSC gir informasjon om cellens relative størrelse, og SSC gir informasjon om hvor granulert cellen er. På cytogrammet representerer hver prikk en celle. X-aksen representerer FSC og jo større cellen er jo lengre til høyre i cytogrammet plasseres den. Y-aksen representerer SSC, og jo mer granulert en celle er jo høyere opp i cytogrammet plasseres den. Figuren er inspirert av en figur utarbeidet av BD BioSciences. (What Is Multicolor Flow Cytometry | Cell Sorting Techniques, 2024)

1.1.2 Immunfenotyping

Monoklonale antistoffer med en fluorescerende markør (fluorokrom) vil emitte fluorescerende lys når fluorokromen blir eksitert av laseren. Dersom et antigen på en celle har bundet et komplementært antistoff merket med en fluorokrom vil det fluorescerende lyssignalet detekteres i flowcytometeret når cellen passerer laseren. Fluorokromen gjør det dermed mulig å telle hvor mange celler som har bundet det spesifikke antistoffet. Ulike

fluorokromer emitterer lys i ulike farger/bølgelengder, og ved bruk av ulike fluorokromer kan man skille mellom forskjellige cellepopulasjoner eller celleaktivitet. Ulike celletyper har ulike kombinasjoner av antigener. Ved å bruke ulike fluorokromer på hvert monoklonale antistoff kan celletyper gjenkjennes fra kombinasjonen av fluorescensfarger de emitterer. (*What Is Multicolor Flow Cytometry | Cell Sorting Techniques*, 2024) Figur 3 viser et eksempel ved bruk av to ulike antistoffer, hver merket med ulike fluorokromer, som gjør det mulig å skille mellom fire forskjellige cellepopulasjoner.



Figur 3: Populasjonsfordeling på flowcytometer. Immunfenotyping ved bruk av to ulike antistoffer med to ulike fluorokromer. Dette gjør det mulig å skille mellom fire ulike subpopulasjoner.

1.1.3 Hematopoietiske stamceller

Alle typer blodceller stammer fra de samme umodne cellene kalt for hematopoietiske stamceller. Cellene befinner seg i perifert blod og beinmargen. En hematopoietisk stamcelle kan differensiere enten til myeloid eller lymfoid stamcelle. Myeloide stamceller kan videre differensiere til enten monocytt, megakaryocytt, granulocytter eller rød blodcelle. Lymfoide stamceller som denne oppgaven fokuserer mest på, kan differensiere til enten NK-celler eller lymfocytter (T-celler eller B-celler). (*Definition of Hematopoietic Stem Cell - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI*, 2011)

1.1.4 CD-antigener

Cluster of Differentiation antigener (CD-antigener) er overflatemolekyler på leukocytter. Disse antigenene detekteres ved å benytte anti-leukocytt monoklonale antistoffer. Deteksjon av disse overflateantigenene kan benyttes til å finne ut av cellenes differensieringsstadier. Det

kan også gi informasjon om cellens aktivitet. Ved immunfenotyping kan disse CD-antigenene benyttes til å skille mellom ulike leukocyt sub-populasjoner. Dette gjøres ved å bruke en kombinasjon av forskjellige monoklonale antistoffer. Tabell 1 viser et utvalg av CD-antigener og hvilke leukocytter hos mennesker de er uttrykt på. (Cruse et al., 2004)

Tabell 1: Tabellen viser hvilke CD-antigener som er uttrykt på ulike leukocytter hos mennesker. (Cruse et al., 2004)

CD-antigen	Leukocyt
CD45	Alle leukocytter
CD3	T-celler
CD4	T-celler, MHC-2
CD8	T-celler, MHC-1
CD19	B-celler
CD16/56	NK-celler

1.1.5 Gating

«Gating» er en teknikk som omhandler å separere ulike subpopulasjoner av celler i et cytogram. Gating gjøres ofte manuelt basert på kjennskap til hvor de ulike subpopulasjonene vanligvis befinner seg i cytogrammet. Det finnes retningslinjer for hvordan gatene skal plasseres, men det må alltid gjøres en individuell vurdering ettersom cellene kan variere mellom pasienter. (Staats et al., 2019)

1.1.6 Klinisk betydning

1.1.6.1 Klinisk betydning av celletap

Celletap i denne oppgaven dreier seg om hvor mye celler som tapes under preparering før analysing på flowcytometeret. Enhet for Cytometri ved St.Olavs Hospital har satt en grense på minimum 200 000 celler per rør som utgangspunkt for å kunne utføre en diagnostisk vurdering. Grensen sørger for god sensitivitet og spesifisitet. Man er interessert i å fange opp hematologiske kreftceller inkludert lymfom- og leukemi-celler. Høyere celletap kan forårsake feil diagnostisering på grunn av risiko for tap av maligne hematologiske celler.

Dersom det er mindre enn 200 000 celler i røret vil det være høyere risiko for å miste de maligne cellene. Likevel kommer det an på andel maligne celler i prøven. Dersom det er f.eks bare er 100 000 celler og funn på malignitet i omtrent 70 % av disse cellene, er det tilstrekkelig med 100 000 celler for å utlevere diagnose på malignt funn.

Øvre grense for celletallet per rør er mer fleksibel, og kan endres i henhold til prøvematerialet og rekvirert analyse. Dersom det er rekvirert analyse av minimal residual disease (MRD), vil det vanligvis kreve mer enn 1000 000 celler for å detektere de få maligne cellene. Området som skal undersøkes i denne oppgaven er 200 000- 1000 000 celler per rør. Prøver som skal

undersøkes for blant annet leukemi og lymfom vil vanligvis analyseres med et celletall i dette området.

1.1.6.2 Lymfom

Lymfom er en type blodkreft som er forårsaket av en abnormal endring i DNA-et til lymfocytter. Disse lymfocytene utgjør en del av det lymfatiske systemet og derfor vil lymfom finnes seg ofte i lymfeknuter. Lymfeknuter befinner seg over hele kroppen og derfor kan lymfom-celler med deres ukontrollerte differensiering spre seg til flere ulike kroppsdeler. (*Lymphoma Action / What Is Lymphoma?*, 2022)

Lymfom deles inn i to hovedtyper; Hodgkin og Non-Hodgkin lymfom. Ved begge typene vil den ukontrollerte celledelingen undertrykke deling av de andre immuncellene. Hodgkin lymfom karakteriseres av mikroskopisk funn av Reed-Sternberg celler (RS) og Hodgkin celler. RS-celler kjennetegnes med deres størrelse og tydelig kjernemorfologi. Det finnes ulike typer RS-celle, f.eks. klassisk RS-celle, og lacunarceller. Hodgkin celler som er mononukleære er større enn normale lymfocytter, men mindre enn RS-celler. God prognose av Hodgkin lymfom forutsetter rask behandling. (*Lymphoma Action / What Is Lymphoma?*, 2022) (*Hodgkin's Lymphoma | Find Out About This Cancer | LLS*, 2022)

Non- Hodgkin lymfom er mer komplisert enn Hodgkin lymfom og den har ikke RS-celler. Non-Hodgkin Lymfom har opptil 60 undertyper. Forskjellen er at noen undertyper er mer aggressive og vokser mye raskere enn andre. Dersom cellene ikke behandles til riktig tid, vil de ta over normale celler og immunsystemet vil ikke klare å bekjempe dem. Aggressive celler krever rask behandling, mens behandling av langsomt-voksende celler kartlegges basert på blant annet hvor rask cellene deler seg. ~~(5)-(7)~~(*Lymphoma Action / What Is Lymphoma?*, 2022)_(*Non-Hodgkin lymphoma*, 2022)

1.1.6.3 Leukemi

Leukemi er en betegnelse på kreft som oppstår i stamceller i beinmargen. Den muterte stamcellen deler seg og utvikler seg til en kreftcelle som vokser ukontrollert og undertrykker den normale celleproduksjonen. Leukemier blir klassifisert ut ifra hvilke blodceller kreften har oppstått i og hvor rask sykdomsutviklingen er. Det finnes 4 hoved-klassifiseringer av leukemier: Akutt lymfatisk leukemi (ALL), kronisk lymfatisk leukemi (KLL), akutt myeloid leukemi (AML) og kronisk myeloid leukemi (KML). ~~(8)~~(*Leukemia | Leukemia and Lymphoma Society*, 2024)

Ved ALL har det oppstått en mutasjon i en lymfatisk stamcelle. Dette fører til ukontrollert celledeling av leukemiske lymfoblaster som ikke utvikler seg lengre enn det første cellestadiet. På grunn av ukontrollert deling blir det enormt mange leukemiske lymfoblaster som blokkerer produksjonen av normale celler. Pasienten får dermed lite friske blodceller som kan gi mange ulike komplikasjoner. ALL har en rask utvikling og det er dermed viktig med rask behandling. (9)(*Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults*, 2022)

KLL skyldes en mutasjon i en lymfatisk stamcelle som skal utvikles til en B-celle. Dette gir ukontrollert celledeling av leukemiske lymfoblaster, men utviklingen er langsommere enn ved ALL. Siden disse leukemiske lymfoblastene ikke har samme funksjon som en frisk B-celle vil pasientens immunforsvar svekkes, ettersom antall friske B-celler er lavere. De leukemiske cellene vil også blokkere noe av celleproduksjonen i beinmargen, og over tid kan de leukemiske cellene lekke ut i blodbanen. (10)(*Chronic Lymphocytic Leukemia*, 2023)

AML er en mutasjon i en myeloid stamcelle som fører til ukontrollert produksjon av leukemiske myeloblaster. Den leukemiske myeloblasten vil ikke kunne utvikle seg til et videre cellestadium. Den ukontrollerte produksjonen gjør at det hopper seg opp med leukemiske myeloblaster i beinmargen og produksjonen av normale celler blir blokkert. Det fører til for mange leukemiske myeloblaster og for lite friske, funksjonelle blodceller. Det kan gi blant annet anemi, nøydropeni og trombocytopeni. AML har en rask utvikling, og det er dermed viktig med rask behandling. (11)(*Acute Myeloid Leukemia in Adults*, 2023)

KML er en langsomt utviklende leukemi som oppstår i myeloide stamceller. KML er alltid forårsaket av BCR-ABL1-fusjonsgenet, som finnes på et abnormalt kromosom kjent som «Philadelphia kromosomet». BCR-ABL1-fusjonsgenet dannes mellom en translokasjon av ABL-genet på kromosom 9 og BCR-genet på kromosom 22. Fusjonsgenet BCR-ABL1 danner det abnormale kromosom 22 som er kalt Philadelphia kromosomet. Stamceller med BCR-ABL1-fusjonsgenet deler seg raskere enn normale stamceller, og gir en overproduksjon av granulocytter. Over tid kan det oppstå flere mutasjoner som fører til at granulocytene ikke modnes, og gir overproduksjon av myeloblaster. Denne fasen kalles «blastkrise» og kan ligne på en akutt leukemi. (12)(*Chronic Myeloid Leukemia*, 2023)

1.1.6.4 MRD

MRD er en betegnelse som brukes for å beskrive en tilstand når kroppen fortsatt har et lite antall kreftceller igjen etter kreftbehandling. Antall patogene celler kan være såpass små at de ikke kan påvises med tradisjonelle metoder, som hematologiske tester eller mikroskopi. Til

analyse av MRD brukes vanligvis beinmargsprøver, og prøven kan analyseres ved flowcytometri. MRD positivt resultat betyr at «rester» av kreftceller var detektert, mens MRD negativt resultat betyr at rester ikke var detektert. MRD resultater kan brukes til å sjekke effektivitet av kreftbehandling, om kreften er i remisjon, eller tilbakefall av kreft.

(13)(*Minimal Residual Disease (MRD)*, 2019)

Enhet for Cytometri ved St. Olavs Hospital benytter manuell preparering ved analyse av alle beinmargsprøver til MRD, fordi man mistenker at automatisk vask med Lyse Wash Assistant (LWA) gir større celletap. Prøver til MRD inneholder oftest et lite antall patogene celler, og det er dermed viktig å begrense celletapet så mye som mulig. Dersom de patogene cellene mistes under preparering, kan det gi et falskt negativt svar.

1.1.7 EuroFlow

Enhet for Cytometri ved St. Olavs Hospital er standardisert etter EuroFlow sine retningslinjer. EuroFlow er en internasjonal organisasjon som utvikler, standardiserer og validerer flowcytometriske tester. Testene benyttes til diagnostikk, evaluering av behandlingseffektivitet og subklassifisering av hematologiske maligniteter. Siden 2006 har EuroFlow vært støttet av EU-kommisjonen som et Specific Targeted Research Project (STREP). EuroFlow utvikler opplæringsressurser, deler ut standardiserte protokoller, arrangerer seminarer, og utfører kvalitetvurderings-program for å forbedre kvalitet og pålitelighet på flowcytometriske analyser. (14)(*About EuroFlow*, 2024)

1.2 HENSIKT MED OPPGAVEN

Hensikten med oppgaven er å sammenligne celletap ved bruk av ulike metoder og buffere i forbindelse med prøvepreparering til immunfenotyping ved flowcytometri. Minimalt celletap er viktig for å oppnå høyest mulig sensitivitet. Det er spesielt viktig for prøver med lavt celletall eller prøver hvor patogene celler er i fåtall.

Celletallet benyttes blant annet til å si noe om tilbakefall av kreftceller etter behandling. Ved tilbakefall vil antall patogene celler vanligvis være lavt og vanskelig å detektere. Dersom celletapet er stort, er det stor risiko for å miste det få tallet patogene celler under preparering. Høyt celletap kan dermed føre til feil diagnostisering.

Tidligere observasjoner tyder på at preparering av beinmarg og lymfeknute med LWA gir større celletap enn manuell preparering. På grunnlag av dette har Enhet for Cytometri ved St. Olavs Hospital bestemt å benytte manuell metode til preparering av lymfeknute og beinmarg. Det er også gjort tidligere observasjoner som tyder på at bufferen (Cell Wash) som benyttes

ved LWA gir større celletap ved preparering av beinmarg og lymfeknute, enn bufferen (manuell vaskebuffer) som benyttes ved manuell preparering.

På grunnlag av observasjonene er det ønskelig å sammenligne celletapet, for å finne ut om preparering med LWA kan benyttes på lik linje som manuell preparering. Preparering med LWA sparer tid og arbeid for ansatte. Det er også ønskelig å undersøke om de ulike bufferene har en betydning for celletapet.

Det er viktig at celletallet er høyt nok, og at metoden er pålitelig når legene skal vurdere pasientens tilstand. Dersom celletapet er stort, er det risiko for å miste eventuelle patogene celler. Noen prøvematerialer som f.eks. lymfeknuter kan ha lavt celletall, og derfor er det viktig å redusere celletapet under preparering. Dette kan påvirke tolkning av pasientens tilstand.

Problemstillingen for denne oppgaven blir dermed:

Hvilken prepareringsmetode og vaskebuffer gir minst celletap av hvite blodceller og er best egnet til immunfenotypiske analyser ved flowcytometri? Har prøvematerialet betydning for celletapet?

2 MATERIALE OG METODE

2.1 MATERIALE

2.1.1 LWA

LWA utfører en automatisert preparering av prøver for analysering på flowcytometer. LWA har kapasitet til å preparere 40 prøver samtidig ved bruk reagenser vist i tabell 19 i vedlegg 7.1. Prøvematerialet tilsettes i Falcon-rør (5ml, Polystyrene Round Bottom Tube) og plasseres i karusellbrønner. Det tilsettes desinfeksjonsmiddel i wastebeholderen for å minimere smitterisiko. Den manuelle vaskebufferen inneholder bovint serumalbumin (BSA), og dersom denne benyttes på LWA må man tilsette 0,5 mL antiskumkonsentrat i wastebeholderen. (15) Prøvene blir lysert, inkubert, blandet, sentrifugert og vasket. Den automatiserte prøveprepareringer fjerner røde blodlegemer, blodplater, og gjenværende proteiner. Produktet er vaskede hvite blodceller. Fremgangsmåten for bruk av LWA er hentet fra St.Olavs interne kvalitetsprosedyrer og rutiner (ikke offentlige).

Basert på type og mengde prøvemateriale kan ulike programmer på LWA benyttes. I løpet av denne oppgaven ble det benyttet 3 programmer: (Sollihaug, 2022).

- ➔ LYSE/WASH/FIX 0-29 µL: Benyttes for blod og beinmarg med prøvevolum <30µL
- ➔ LYSE/WASH/FIX 30-69 µL: For blodmarg med prøvevolum 30-69 µL
- ➔ LYSE/WASH/FIX 70-100 µL: For blod og beinmarg med prøvevolum 70-100 µL

For lymfeknuter blir det alltid brukt program 0-29 µL, uavhengig av mengde prøvemateriale. Grunnen til det er at lymfeknute har veldig lite RBC.

2.1.2 Antistoffer

I buffer- og metodesammenligningsstudien ble noen prøver merket med antistoff mot CD45 (BD CD45 (2D1) V500-C), for å gjøre det enklere å gate beinmarg og lymfeknute. Noen prøver ble merket med en 6-farge antistoff-mix, for å vurdere celletap av lymfocyt subpopulasjoner. BD MultiTest 6-color TBNK (BD BioScience) inneholdt CD3 FITC, CD16 PE + CD56 PE, CD45 PerCP-Cy5-5, CD4 PE-Cy7, CD19 APC, CD8 APC-Cy7. Se tabell 2 for oversikt over antistoffene.

Tabell 2: Antistoffløsninger. Tabellen viser hvilke antistoffløsninger som ble brukt i buffer- og metodesammenligningsstudiet. Den viser også hvilke antistoffer løsningen inneholder, og hvilken fluorokrom som er festet til antistoffet.

Antistoffløsning	Antistoff	Fluorokrom
BD Multitest 6-color TBNK Katalognummer: 337166 Leverandør: BD Bioscience	CD3	FITC
	CD16	PE
	CD56	PE
	CD45	PerCP-Cy5-5
	CD4	PE-Cy7
	CD19	APC
	CD8	APC-Cy7
BD CD45, klon 2D-1 Katalognummer: 655873 Leverandør: BD Bioscience	CD45	V500-C

2.1.3 Reagenser

Tabell 3 under viser hvilke reagenser som har blitt brukt i oppgaven. Tabellen viser både innhold og funksjon til reagensene. Noen av reagensene levert av produsenten BD Biosciences har ikke oppgitt innhold, på grunn av bedriftshemmelighet.

Tabell 3: Reagenser. Tabellen viser reagenser som er benyttet i oppgaven, hva de inneholder og reagensets funksjon. Noen av reagensene levert av produsenten BD Biosciences har ikke oppgitt innhold, på grunn av bedriftshemmelighet. De er merket med en strek under «innhold».

Reagens	Innhold	Funksjon
BD FACSTM Flow Sheath Fluid	-	En væske som hjelper til med transport av celler gjennom flowcytometeret, og sørger for at de ligger i midten av væskestrømmen.

Leverandør: BD BioSciences Katalognummer: 342003		Dette er viktig for at cellene skal passere enkeltvis gjennom flowcellen. Væsken minimaliserer også rusk og sørger for et høyere fluorescerende signal.
BD™ Zero Foam Leverandør: BD BioSciences Katalognummer: 650071	65% skumdempende ingredienser (silikoner utgjør mesteparten)	Reagenset er viktig for å hindre for mye skumdannelse. Benyttes ved bruk av manuell vaskebuffer på LWA, ettersom den kan gi mye skum.
BD FACSTM Lysing solution Leverandør: BD BioSciences Katalognummer: 349202	<ul style="list-style-type: none"> • 25 - <50% diethylene glycol • <10% formaldehyde • 3 - <5% methanol 	Reagenset benyttes hovedsakelig til lysering av RBC og preservering av leukocytter.
BD CellWash Leverandør: BD BioSciences Katalognummer: 349524	-	Vasker bort lyserte RBC.
Vaskebuffer manuell, «in house»	PBS med 2mM EDTA og 0.2% BSA.	
TransFix Leverandør: Nordic Biosite Katalognummer: TBF-20-1	-	Er et næringsmiddel som gir cellene lengre levetid slik at prøven får lengre holdbarhet. («TransFix - Cell Stabilisation Reagents for Use in Flow Cytometry», 2024)
FACSClean Leverandør: BD BioSciences	-	Brukes som desinfeksjon i wastebeholder for å minimalisere smitterisiko. FACSClean dreper celler og mikrober.

Katalognummer: 340345		
--------------------------	--	--

2.1.4 Prøvemateriale

I denne oppgaven ble det benyttet fullblod, beinmarg og lymfeknute. Til riktighets- og presisjonsstudiene ble det benyttet fullblod fra pasienter og blodgivere. I buffer- og metodesammenligningsstudien ble det benyttet både fullblod, beinmarg og lymfeknute fra pasienter.

Fullblod er blod slik det eksisterer i kroppen. Blodet inneholder alle typer celler: erytrocytter, trombocytter, leukocytter og plasma. Plasma og erytrocytter utgjør mesteparten av fullblodet. Rør med EDTA som antikoagulant benyttes til fullblodanalyser i denne oppgaven.

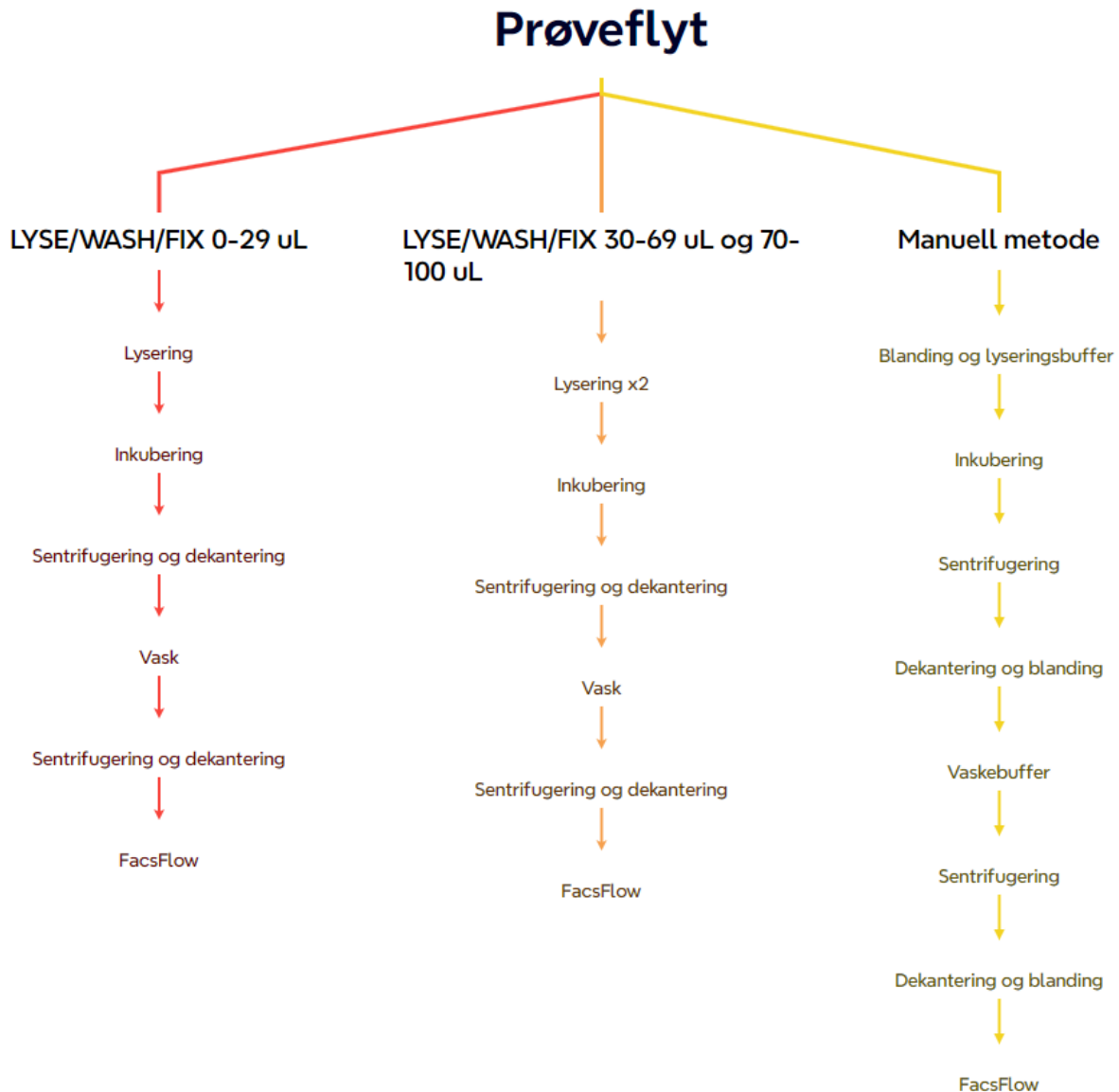
Beinmarg er et vev som finnes i beinhulene, og er sterkt vaskularisert og innervert. Den består av to hovedcelletyper: stromaceller (retikulære celler, fibroblaster, endotel, adipocytter) og hematopoietiske celler. Funksjonelt sett fungerer det som primærstedet for hematopoese og er en viktig del av det retikuloendoteliale systemet. (Gulati et al., 1988)

Lymfeknuter har en nyrelignende form og er lokalisert i flere steder i kroppen, blant annet nakken, mage, og underarmer. De er sammenkoblet gjennom lymfekar. Lymfeknutene inneholder stort andel av lymfocytter og utgjør dermed en viktig del av kroppens immunforsvar. Knutene har en oppgave å filtrere stoffer som strømmer gjennom lymfe. Lymfe kommer inn i lymfeknutene via flere afferente kar og filtreres før de forlater knutene via efferente kar. (Bujoreanu & Gupta, 2024; *Definition of Lymph Node - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI*, 2011).

2.2 METODE

2.2.1 Prøveflyt under opparbeidelse

Før prøvene skal analyseres på flowcytometeret må de prepareres enten på LWA eller manuelt. Figur 4 viser prøvens gang under preparering.



Figur 4: Prøveflyt. Figuren viser prøvens gang ved de ulike prepareringsmetodene. Figuren er basert på tabell 19 i vedlegg 7.1.

Prøver som er tilsatt TransFix og som skal merkes med antistoff må vaskes for å fjerne TransFixen før antistoff-tilsetning. Dette er for å ha riktig forhold mellom celler og antistoff. Det er også for å unngå at TransFix påvirker antistoffbindingen. Til vasking av TransFix tilsettes prøven 2-4 mL manuell vaskebuffer, og prøven sentrifugeres i 5 min ved 540 RCF (g). Etter sentrifugering og dekantering blir prøven blandet med vortex og merket med

antistoffer. Etter antistoff-merking blir prøven inkubert, lysbeskyttet i 30 min. Videre blir prøvene preparert som vist i figur 4.

Flowcytometrene var klargjort ut fra enhetens rutiner med tanke på kalibrering og kontroller.

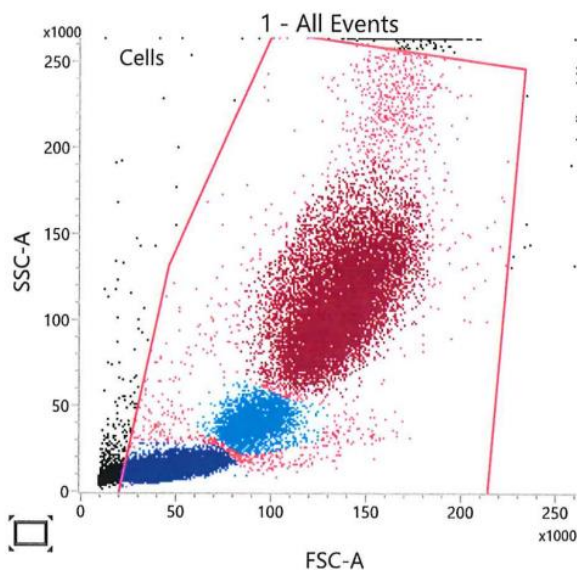
2.2.2 Presisjonsstudie

Presisjonsstudien ble benyttet til å sammenligne LWA-ene med hverandre og for å finne ut hvilke LWA-er som skulle brukes i videre studier. Dette ble gjort ved å preparere samme blodprøve (BG-4) to ganger om dagen over fire dager, på alle LWA-ene og manuell preparering. Hvert oppsett (serie) inneholdt to paralleller, og seriene ble preparert av ulike personer. På grunn av cellenes holdbarhet var det ikke mulig å utføre studien over lengre tid enn fire dager. På dag tre og fire var prøven tilsatt TransFix for å bevare cellene. TransFix fortynner blodprøven, og celletallene måtte dermed ganges med fortynningsfaktor. For å beregne inter-serie-presisjon ble formel 1 benyttet. WBC/rør etter vask ble beregnet ved bruk av formel 2. Innsugd volum på flowcytometeret er 60 µL per minutt. I presisjonsstudien var innsugingstiden per rør på ett minutt.

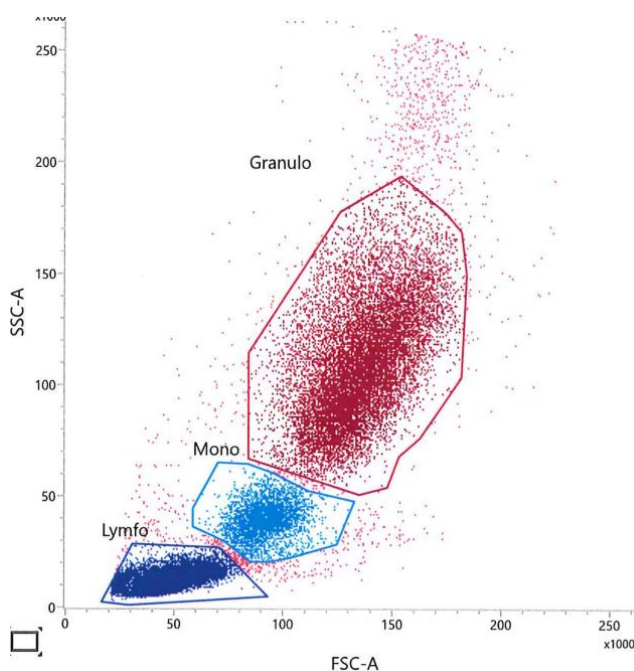
$$CV\% = \frac{SD}{x_{mean}} \cdot 100\% \quad (\text{Formel 1})$$

$$\frac{\text{Antall celler}(\text{flowcytometer})}{\text{Innsugd volum } (\mu\text{L})} \cdot \text{prøvevolum} = \text{antall WBC/rør etter vask} \quad (\text{Formel 2})$$

I presisjonsstudien ble totalt antall WBC, granulocytter, monocytter og lymfocytter gatet. Gatene ble plassert som vist i figurene 5 og 6. Rusk ble gatet bort for å få et reelt og pålitelig celletall.



Figur 5: Gating av totalt WBC. Bildet viser at WBC er satt i samme gate, og rusk er gatet bort.



Figur 6: Gating av tre ulike cellepopulasjoner. Det er satt en gate for hver av de tre populasjonene (lymfocytter, monocytter og granulocytter).

2.2.3 Riktighetsstudie

I riktighetsstudien ble celletap på LWA-ene sammenlignet mot celletapet ved manuelle metoden. I studien ble det analysert prøver på ulike celle-nivå; høyt, middels og lavt. Det ble analysert en parallell av hver prøve på hver metode. Pasient-prøver ble benyttet som prøver med høyt celle-nivå (omtrent 1000 000 celler per parallell). Blodgiverprøver (BG) ble benyttet til paralleller med middels celle-nivå (omtrent 500 000 celler per parallell), og paralleller med

lavt celle-nivå (omtrent 100 000 celler per parallell). Det ble gjennomført differensial-telling av alle prøvene, og basert på WBC-tallet ble det bestemt mengde pipettert fra hver prøve til hver parallell. Celletallet og pipettert volum ble benytt i formel 3 til beregning av WBC-tallet per rør før vask. Ønskelig celletap er på <50%, og det forventes å miste rundt 20%.

$$\frac{WBC \cdot 10^9/L}{10^3} \cdot \text{prøvevolum } (\mu L) = \text{antall WBC/rør før vask} \quad (\text{Formel 3})$$

Etter opparbeidelse ble sluttvolumet målt, og prøvene ble analysert på flowcytometer. Celletallet fra flowcytometeret og målt sluttvolum benyttes til beregning av WBC/rør etter vask, ved bruk av formel 2. I riktighetsstudien var innsugingsvolumet på flowcytometeret 60 μL .

For å finne mengde celletap beregnes differansen mellom beregnet WBC/rør før og etter vasking. Prosent celletap blir beregnet ved hjelp av formel 4. Ved å finne gjennomsnittlig %celletap på hver LWA kan man velge hvilken som er mest hensiktsmessig å bruke i videre studier.

$$\frac{\text{Celletap}}{\frac{WBC}{\text{rør før vask}}} \cdot 100\% = \% \text{celletap} \quad (\text{Formel 4})$$

I riktighetsstudien ble totalt antall celler, granulocytter, monocytter og lymfocytter gattet. Gatene ble plassert på samme måte som i presisjonsstudien.

For å kunne trekke ut en pålitelig konklusjon ifra riktighetsstudien må det være nok antall prøver. For å finne ut av dette, ble det beregnet 95% konfidensintervall av %celletap ved LWA-ene og manuell metode. For å regne ut 95% konfidensintervall ble det benyttet en funksjon på Excel kalt “deskriptiv statistikk”. Nedre og øvre grense ble beregnet ut ifra data som ble generert av denne Excel-funksjonen, ved hjelp av formel 5. Beregnet øvre og nedre grense ble benyttet til å regne ut en intervallbredde. Intervallbredde beregnes ved å trekke nedre grense ifra øvre grense.

$$\text{Gjennomsnitt} \pm \text{konfidenskoeffisient (95\%)} \quad (\text{Formel 5})$$

Beregnet intervallbredde ble sammenlignet med akseptert intervallbredde på ≤ 10 .

Intervallbredde ≤ 10 er satt av enhet for Cytometri ved St.Olavs Hospital. En verdi som er innenfor bredden indikerer tilstrekkelig antall prøver, mens en intervallbredde større enn 10 vil gi mer usikkerhet. Resultater ifra manuell metode ble benyttet som referanse til å utføre statistiske tester.

Det ble beregnet differanse i %celletap mellom manuell metode og hver av LWA-ene.

Differansen i %celletap ble benyttet til å regne ut 95% konfidensintervall. Dette ble gjort for å vurdere om det er en signifikant forskjell mellom LWA-ene og manuell metode. Enhet for cytometri aksepterer en forskjell i %celletap på $\leq 10\%$. 95% konfidensintervall er beregnet ved hjelp av Excel funksjonen "deskriptiv statistikk".

Beregnet differanse av %celletap mellom manuell og hver av LWA-ene ble også brukt til å lage et differanseplot. Differanseplot ble generert ved hjelp av en Excel-funksjon kalt for punktdiagram. Beregnet antall WBC i prøven ble plassert på X-aksen, mens differansen i %celletap ble plassert på Y-aksen. Hvert punkt i plotet representerer en prøve. Akseptabel forskjell er 10%. Den røde linjen er 0. Jo nærmere punktene er linjen, dess likere er metodene.

Korrelasjonsdiagram ble generert ved hjelp av en Excel-funksjon kalt for punktdiagram. Manuell metode som er representert på X-aksen ble valgt som en referanse metode, mens de ulike LWA-ene som er representert på Y-aksen ble valgt som en "ny metode". Ved å bruke "diagramutforming" på Excel ble det trukket en regresjonslinje med regresjonsligning og determinasjons-koeffisient mellom prikkene. Hver prikk representerer en prøve og jo nærmere prikken er til regresjonslinjen, dess bedre sammenheng er det mellom manuell metode og LWA. Korrelasjonskoeffisient (r) bergenes ved å ta kvadratroten av determinasjons-koeffisient (R^2). Det ble også utarbeidet en likhetslinje. Regresjonslinjen og likhetslinjen ble sett i forhold til hverandre for å vurdere om det er signifikant forskjell mellom metodene.

2.2.4 Sammenligningsstudie mellom ulike buffere og mellom manuell og automatisk prepareringsmetode

I denne sammenligningsstudien ble celletap ved bruk av CellWash (CW) sammenlignet med manuell vaskebuffer (VB), og manuell preparering sammenlignet med automatisk preparering på LWA. Dette ble gjort ved å preparere fire paralleller av samme prøve, to på LWA og to ved manuell preparering. Av de to parallellene ved hver metode ble en parallell vasket med CellWash og en med manuell vaskebuffer. For å spare tid ble det benyttet to LWAer slik at

parallellele kunne prepareres samtidig, og for å unngå å måtte skifte vaskebuffer mellom hver parallell. Etter preparering ble sluttvolumet målt. Beregningen av celletap ble gjort på samme måte som i riktighetsstudien ved hjelp av formel 2 og 3, med et annet innsugingsvolum på 120 µL. Økt innsugingsvolum vil gi tilstrekkelig antall celler til vurdering av subpopulasjonene. Celletapet beregnes ved å finne differansen mellom antall WBC/rør før og etter vask. Studien ble gjennomført over flere uker på grunn av tilgjengeligheten av prøvemateriale.

2.2.4.1 Lymfocytter

Den mest interessante celletypen for Enhet for Cytometri er lymfocytter. Derfor ble det også beregnet %celletap av lymfocytter i blodprøver. Det er kun prøver som ble differensial-tellet ved hematologen som kunne benyttes. Antall lymfocytter per rør før vask ble beregnet med utgangspunktet i differensialtelling ved bruk av formel 6. Noen differensialtellinger oppga lymfocyttandelen i prosent eller antall lymfocytter i enheten $10^3/\mu\text{L}$. Disse ble omgjort til enheten $10^9/\text{L}$ for å kunne benytte formel 6. Deretter ble celletapet av lymfocytter beregnet på samme måte som tidligere beregning av det totale celletapet.

$$\frac{\text{Lymfocytt} \cdot 10^9/\text{L}}{10^3} \cdot \text{prøvevolum} (\mu\text{L}) = \text{antall lymfocytter/rør før vask} \quad (\text{Formel 6})$$

2.2.4.2 Tilfeldig celletap

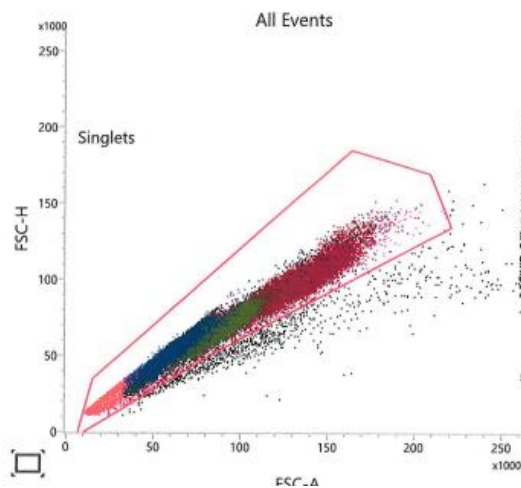
Enhet for Cytometri er også interessert i å bekrefte at celletap ved lymfocytt-subpopulasjoner er tilfeldig fordelt. For å finne ut av dette ble prosentandelen for de ulike subpopulasjonene fra flowcytometeret benyttet. Utarbeidet prosentandel er beregnet ut ifra CD3+ og CD3- lymfocytter. CD4+ og CD8+ subpopulasjoner utgjør til sammen CD3+ lymfocytter, mens CD19+ og CD16+56+ utgjør til sammen CD3- lymfocytter. Resultatet i prosent på de ulike subpopulasjonene ble sammenlignet med en referanseverdi og referanseområde. (Comans-Bitter et al., 1997). Blodprøvene som ble brukt til denne sammenligningen er fra friske blodgivere, og dermed antas det at subpopulasjonene er innenfor referanseområde dersom det er relativt likt celletap av alle subpopulasjonene.

2.2.4.3 Prøvemateriale

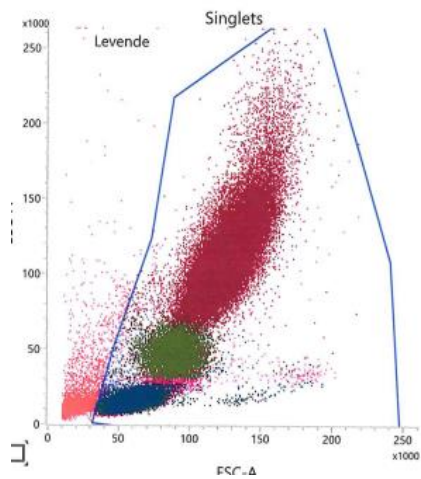
Prøvematerialet som ble benyttet i buffer- og metodesammenligningsstudien var fullblod, lymfeknute og beinmarg. Blodprøver fra blodgivere ble bestilt fra blodbanken. Lymfeknute, fullblod og beinmarg ble hentet fra pasientprøver som var ferdig verifisert. Tre blodprøver, tre beinmargsprøver og tre lymfeknuter ble merket og gatet ved hjelp av 6-farge antistoff mix. Resten av prøvene ble merket og gatet ved hjelp av anti-CD45.

2.2.4.4 Gating

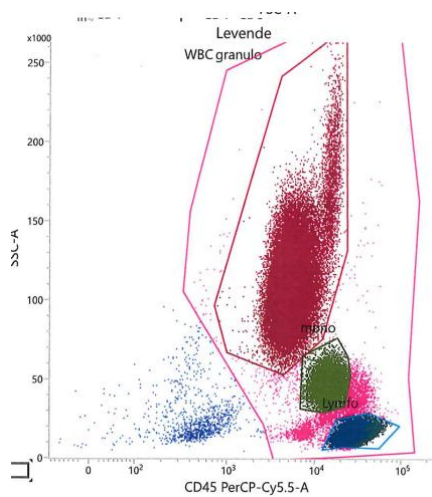
Prøvene ble analysert og gatet på BD FACSLyric™ «Lyrica 3» i programvaren BD FACSuite Clinical Application. Ved gating av 6-farge antistoff mix ble først enkeltliggende celler (singlettene) gatet, slik at celler som har festet seg til hverandre (dubletter) ikke blir med. Dette er vist i figur 7. På cytogrammet med singlettene ble levende celler gatet for å fjerne rusk som vist i figur 8. Totalt antall WBC, granulocytter, monocyttter og lymfocytter ble gatet ut ifra levende celler som vist i figur 9. Videre ble CD3+ lymfocytter og NOT CD3+ lymfocytter gatet som vist i figur 10. På cytogrammet med CD3+ lymfocytter gatet ut ifra CD4+, CD8+, dobbelpositive og dobbeltnegative lymfocytter som vist i figur 11. På cytogrammet med NOT CD3+ lymfocytter, ble CD19+, CD16/56+, dobbelpositive og dobbeltnegative lymfocytter gatet som vist i figur 12.



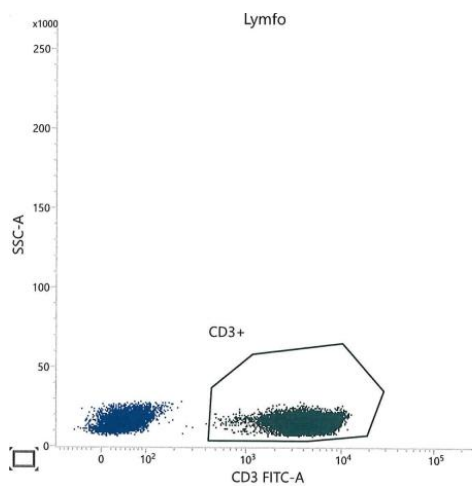
Figur 7: Gating av singletter (enkeltliggende celler). Dette gjør det mulig å fjerne dubletter (celler som har festet seg til hverandre).



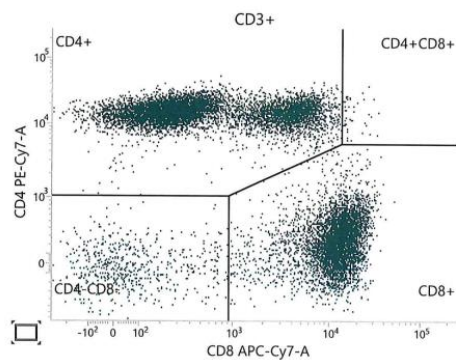
Figur 8: Gating av levende celler. Alle tre populasjonene ble satt i samme gate og rusk ble fjernet.



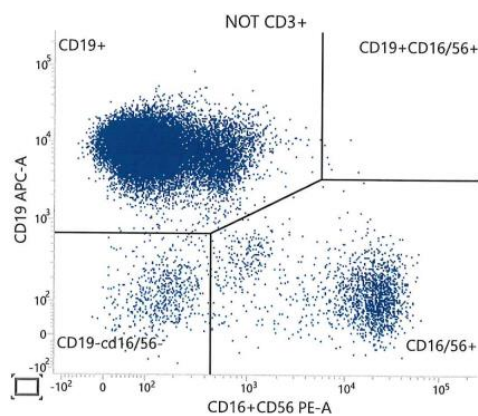
Figur 9: Gating av WBC. Alle celler som ligger til høyre for 10^3 på X-aksen er CD45+ celler. Alle tre populasjonene er satt sammen i et felles rosa gate, og hver av dem ble også satt i egen gate. WBC-tallet ble hentet ut ifra den felles rosa gaten.



Figur 10: Gating av CD3+ lymfocytter. Populasjonen til høyre er CD3+, mens populasjonen til venstre er ikke CD3+.

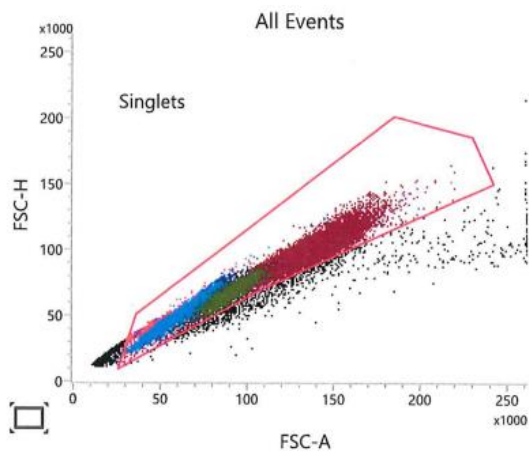


Figur 11: Gating av subpopulasjoner for CD3+ lymfocytter (T-celler). Populasjonene oppe til venstre CD4+ (T-hjelpere), ofte ligger T-hjelpere i to populasjoner og gates derfor ikke som CD4+CD8+. Populasjonene nede til høyre er CD8+ (cytotoxiske T-celler).

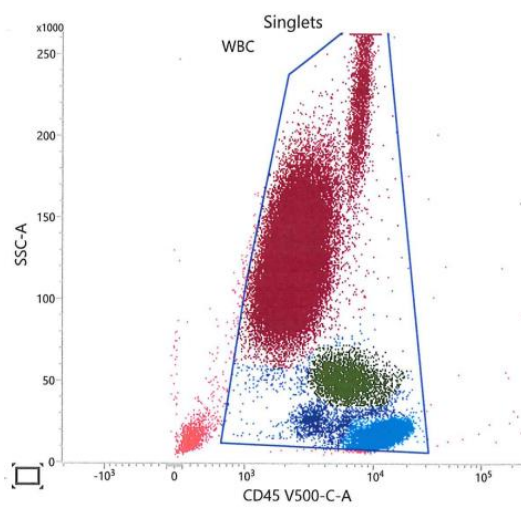


Figur 12: gating av subpopulasjoner for CD3+ lymfocytter. Populasjonen oppe til venstre er CD19+ (B-celler). B-celler ligger ofte i to populasjoner. Populasjonen nede til høyre er CD16/56+ (NK-celler).

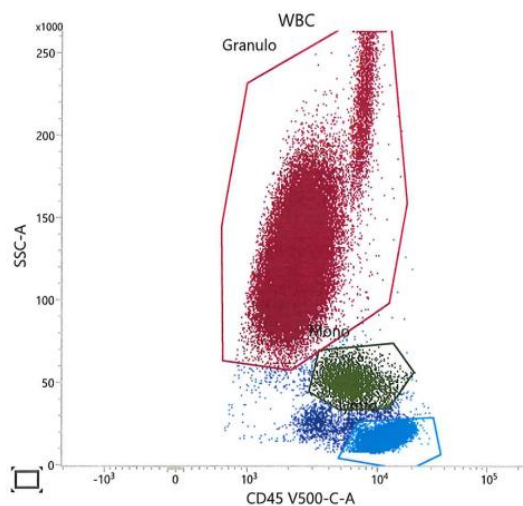
Ved gating av CD-45 antistoff ble først singletter gattet som vist i figur 13. Deretter ble totalt antall WBC gattet som vist i figur 14. Til slutt ble granulocytter, monocytter og lymfocytter gattet som vist i figur 15.



Figur 13. Gating av singletter (enkeltliggende celler). Dette gjør det mulig å fjerne dubletter (celler som har festet seg til hverandre).



Figur 14. Gating av totalt antall WBC. Alle tre populasjonene ble satt i samme gate og rusk ble fjernet. WBC-tallet ble hentet ifra denne gaten. Cellene som ligger til høyre for 10^3 på X-aksen er CD45+.



Figur 15: Gating av granulocytter, monocytter og lymfocytter. Hver av de tre ulike cellepopulasjonene ble satt i egen gate. Cellene som ligger til høyre for 10^3 på X-aksen er CD45+.

3 RESULTAT

3.1 PREISJONSSTUDIE

For å finne ut om LWA-ene var tilnærmet like og for å bestemme hvilke LWA-er som skulle benyttes i videre studier, ble presisjonen sammenlignet mellom de fire LWA-ene og manuell metode. Beregnet CV% for de ulike metodene ble satt opp og sammenlignet i tabell 4.

Tabell 4: Resultater fra presisjonsstudien. Tabellen viser beregnet CV% for hver metode. Noen av målepunktene ble fortynnet med TransFix for å forlenge cellers holdbarhet og deres CV% ble derfor beregnet i henhold til fortynningen. 0,77 og 0,83 er ulike fortynningsfaktorer. Se vedlegg 7.2 for rådata.

CV%	LWA-1	LWA-2	LWA-3	LWA-4	Manuell	Gjennomsnitt
Målepunkter u/TransFix	8%	13%	10%	8%	9%	10%
Målepunkter m/0,77 fortynningsfaktor	7%	1%	13%	12%	15%	10%
Målepunkter m/0,83 fortynningsfaktor	5%	7%	6%	9%	5%	6%
Gjennomsnittlig CV%	7%	7%	10%	10%	10%	-

De oppnådde resultatene viser at det ikke er en betydelig forskjell i presisjonen mellom de ulike instrumentene.

3.2 RIKTIGHETSSTUDIE

3.2.1 Konfidensintervall

For å finne ut av om det er nok antall prøver til studien, ble det beregnet et 95% konfidensintervall av %celletap ved alle fem metodene. Enhet for Cytometri på St.Olavs Hospital aksepterer intervallbredde på ≤ 10 . Konfidensintervallene og intervallbredden er presentert i tabell 5. Se tabell 26 i vedlegg 7.3 for Excel-beregninger.

Tabell 5: 95% Konfidensintervall for %celletapet for hver metode. Ønsket intervallbredde er ≤ 10 .

95% KI	LWA-1	LWA-2	LWA-3	LWA-4	Manuell
Nedre grense	22%	13%	15%	19%	22%
Øvre grense	28%	21%	24%	27%	29%
Intervallbredde	6	8	9	8	7

Ved sammenligning av metodene ble manuell metode valgt som referansemetode. For å finne ut av om det er en signifikant forskjell mellom LWA-ene og manuell metode, ble det beregnet et 95% konfidensintervall for differansen av %celletap. Enhet for Cytometri aksepterer en forskjell i %celletap på $\leq 10\%$. Konfidensintervallene er presentert i tabell 6. Se tabell 27 i vedlegg 7.3 for Excel-beregninger.

Tabell 6: 95% Konfidensintervall for differansen av %celletapet mellom LWA-ene og manuell metode.

95% KI	LWA-1	LWA-2	LWA-3	LWA-4
Nedre grense	-2%	-6%	-3%	-1%
Øvre grense	3%	-10%	-9%	6%

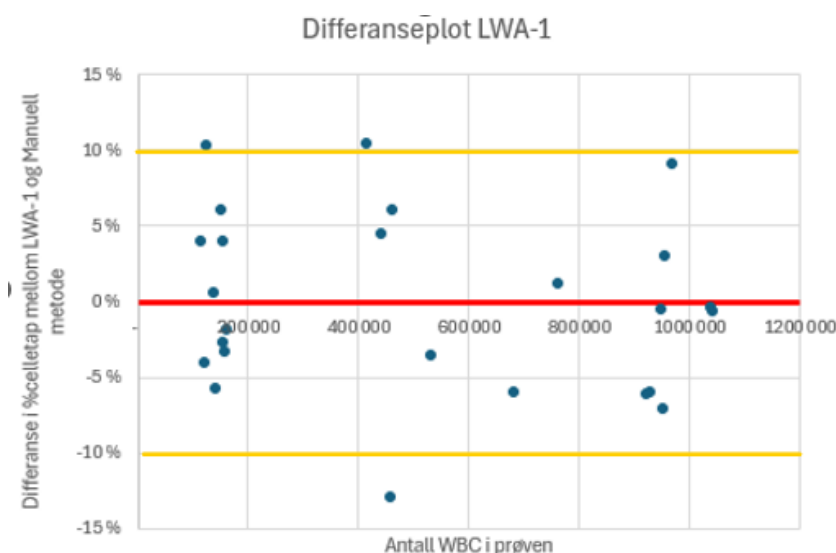
For å sammenligne celletapet på LWA-ene og for å bestemme hvilke LWA-er som skal benyttes i videre studie ble celletapet på LWA-ene sammenlignet med manuell referansemetode. Celletapet ble sjekket på prøver i lavt, middels og høyt nivå. Tabell 7 viser gjennomsnittlig %celletap, og er utarbeidet av resultater fra vedlegg 7.4.

Tabell 7: Resultater fra riktighetsstudiet. Tabellen viser gjennomsnittlig %celletap for hver metode i ulike nivå. Forventet celletap er rundt 20%. Se vedlegg 7.4 for rådata.

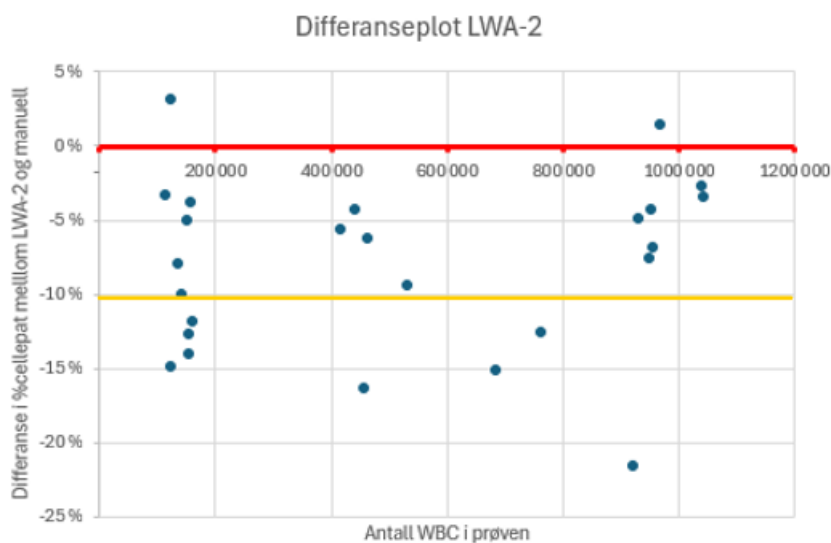
Celletap	LWA1	LWA2	LWA3	LWA4	Manuell	Gjennomsnitt
Lavt nivå	27%	18%	19%	21%	26%	22%
Middels nivå	21%	11%	11%	20%	21%	17%
Høyt nivå	27%	22%	27%	28%	28%	26%
Totalt gjennomsnitt	25%	17%	19%	23%	25%	-

3.2.2 Differanse

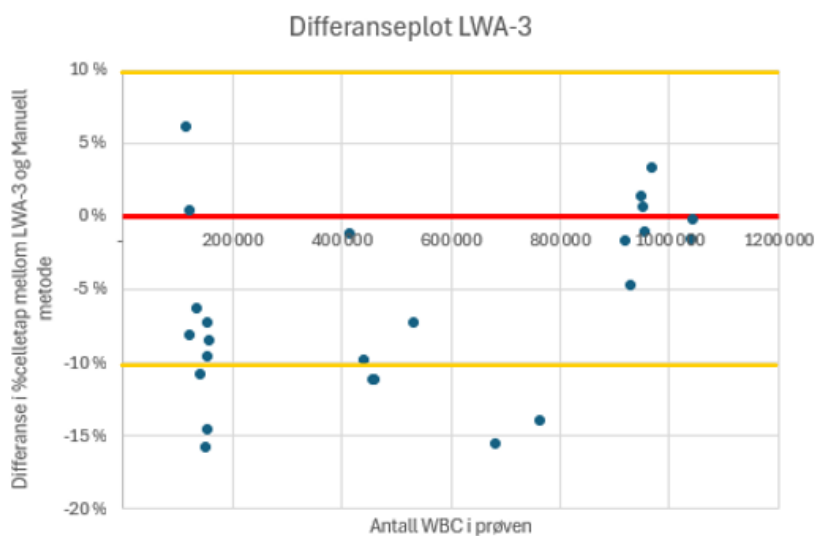
For å sammenligne %celletapet mellom hver LWA og manuell metode ble det utarbeidet differanseplot. Hver prikk representerer en prøve. Jo nærmere prikkene ligger den røde linjen, dess likere er metodene. Enhet for Cytometri ved St Olavs Hospital aksepterer en forskjell i celletap på $\leq 10\%$. Figur 16 presenterer differanseplottet for LWA-1, figur 17 for LWA-2, figur 18 for LWA-3 og figur 19 for LWA-4. Differanseplot ble utarbeidet fra dataene vist i vedlegg 7.5.



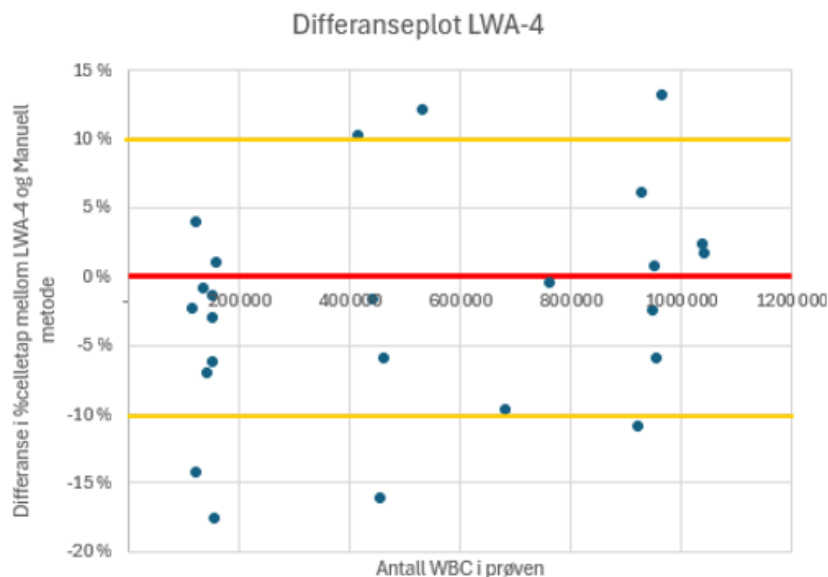
Figur 16 : Differanseplot mellom LWA-1 og manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Y-aksen er differansen i %celletap mellom LWA-1 og manuell metode. X-aksen representerer beregnet antall WBC i prøven. Dette er cellenivåer som ble bestemt ved å pipettere spesifikke prøvevolum basert på WBC-tall fra hematologen.



Figur 17: Differanseplot mellom LWA-2 og manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Y-aksen er differansen i %celletap mellom LWA-2 og manuell metode. X-aksen er beregnet antall WBC i prøven. Dette er cellenivåer som ble bestemt ved å pipettere spesifikke prøvevolum basert på WBC-tall fra hematologen.



Figur 18: Differanseplot mellom LWA-3 og manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Y-aksen er differansen i %celletap mellom LWA-3 og manuell metode. X-aksen er beregnet antall WBC i prøven. Dette er cellenivåer som ble bestemt ved å pipettere spesifikke prøvevolum basert på WBC-tall fra hematologen.



Figur 19: Differanseplot mellom LWA-4 og manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Y-aksen er differansen i %celletap mellom LWA-4 og manuell metode. X-aksen er beregnet antall WBC i prøven. Dette er cellenivåer som ble bestemt ved å pipettere spesifikke prøvevolum basert på WBC-tall fra hematologen.

3.2.3 Regresjon og korrelasjon

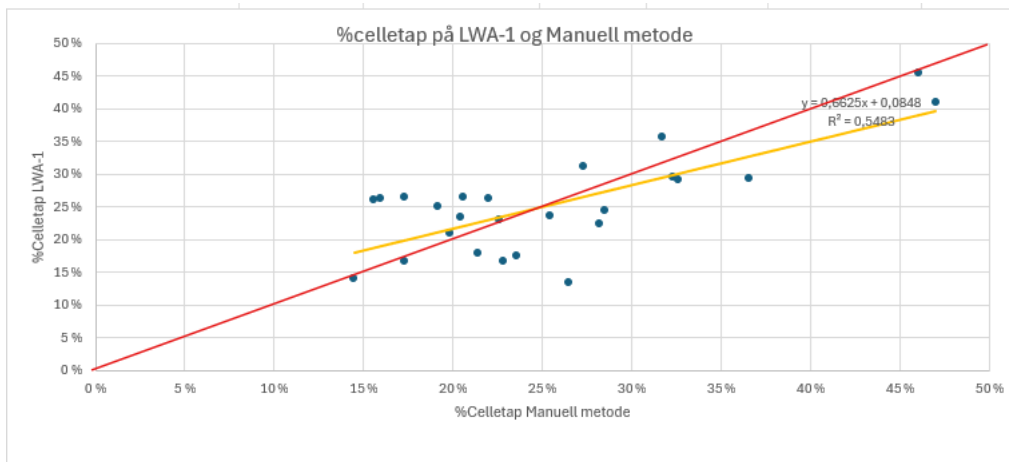
For å beregne om det er konstant eller proporsjonal feil mellom LWA-ene og manuell metode ble det utført en regresjonsanalyse. Regresjonsanalysen gir likningen $y = ax + b$. Dersom 95% konfidensintervallet for a inneholder 1 er det ikke proporsjonal forskjell mellom metodene. Dersom 95% konfidensintervallet til b inneholder 0 er det ikke konstant forskjell mellom metodene. Resultatene fra regresjonsanalysen er presentert i tabell 8, og dataene er hentet fra vedlegg 7.6.

Tabell 8: Regresjonsanalyse som sammenligner LWA-ene med manuell metode. Regresjonsanalysen regner ut ligningen $y = ax + b$. Dersom 95% KI for a inneholder 1, er det ingen signifikant proporsjonal forskjell mellom metodene. Dersom 95% KI for b inneholder 0, er det ingen signifikant konstant forskjell mellom metodene.

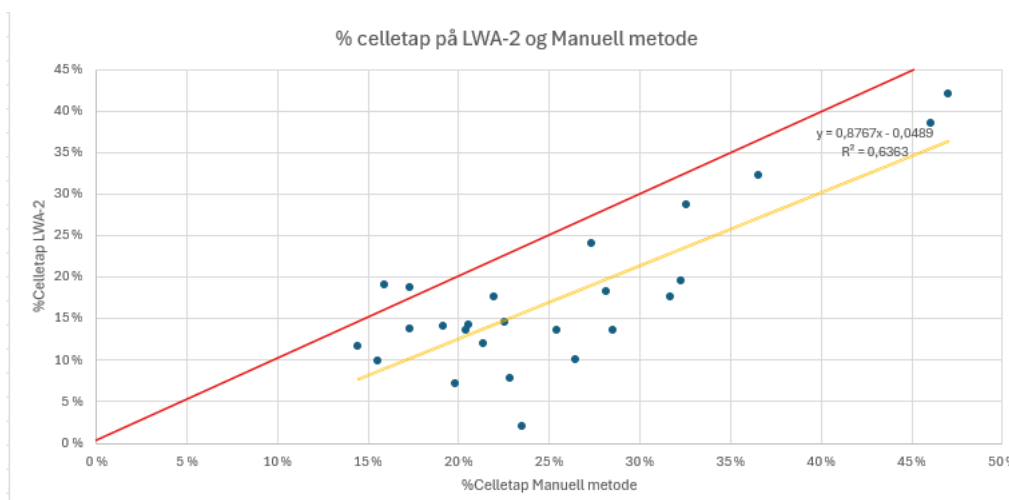
$y = ax + b$	LWA-1	LWA-2	LWA-3	LWA-4
b	0,0848	-0,0489	-0,0632	0,0337
95% KI, b	0,0154 – 0,1542	-0,1253 – 0,0276	-0,1468 – 0,0204	-0,0705 – 0,1379
a	0,6625	0,8767	1,0137	0,7803
95% KI, a	0,4031 – 0,9219	0,5908 – 1,1626	0,7012 – 1,3262	0,3909 – 1,1698

Det ble utarbeidet korrelasjonsdiagram for å sjekke korrelasjonen mellom manuell referansemetode og hver LWA. Figur 20 viser korrelasjonsdiagram for %celletap på LWA-1 og manuell metode, figur 21 for LWA-2 og manuell metode, figur 22 viser for LWA-3 og

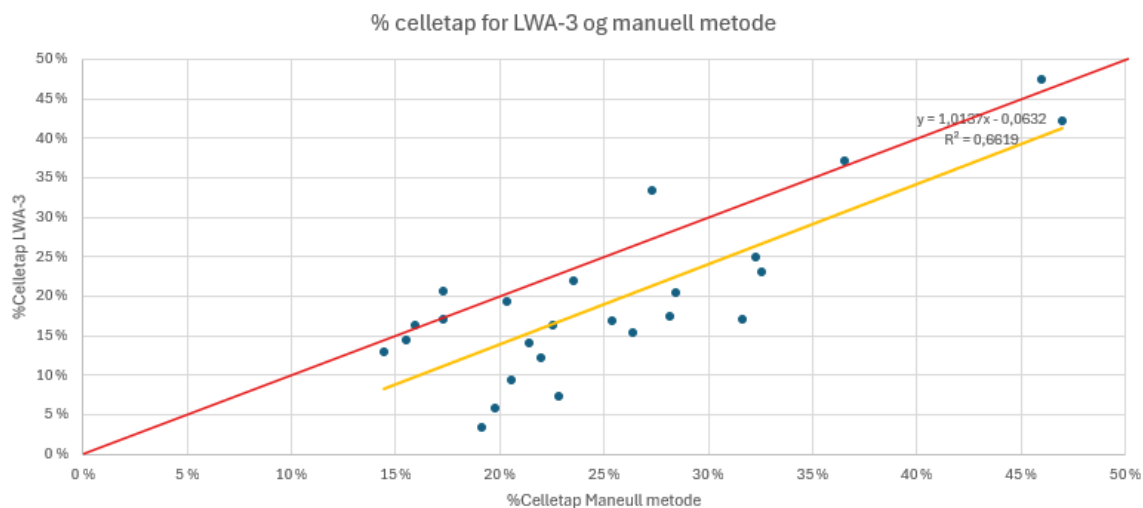
manuell metode, og figur 23 viser for LWA-4 og manuell metode.



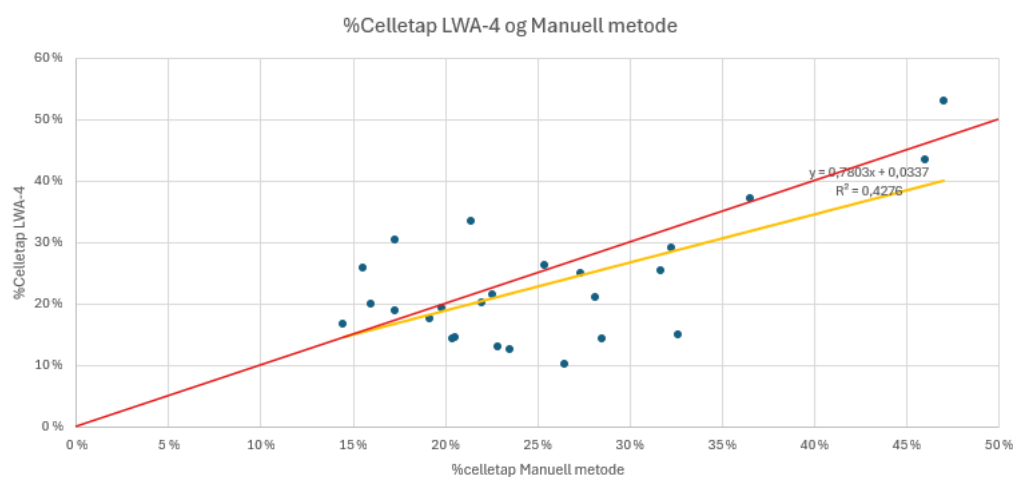
Figur 20: Korrelasjonsdiagram for %celletap på LWA-1 og Manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Jo nærmere prikkene er til den gule regresjonslinjen, dess bedre korrelasjon har de. Den røde linja representerer likhetslinjen. Dersom det er ikke en signifikatforskjell mellom metodene, vil den gule regresjonslinjen overlapse den røde likhetslinjen.



Figur 21: Korrelasjonsdiagram for %celletap på LWA-2 og Manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Jo nærmere prikkene er til den gule regresjonslinjen, dess bedre korrelasjon har de. Den røde linja representerer likhetslinjen. Dersom det er ikke en signifikatforskjell mellom metodene, vil den gule regresjonslinjen overlapse den røde likhetslinjen.



Figur 22: Korrelasjonsdiagram for %celletap på LWA-3 og Manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Jo nærmere prikkene er til den gule regresjonslinjen, dess bedre korrelasjon har de. Den røde linja representerer likhetslinjen. Dersom det er ikke en signifikatforskjell mellom metodene, vil den gule regresjonslinjen overlape den røde likhetslinjen.



Figur 23: Korrelasjonsdiagram for %celletap på LWA-4 og Manuell metode. Hver prikk representerer en prøve. Jo nærmere prikkene er til den gule regresjonslinjen, dess bedre korrelasjon har de. Den røde linja representerer likhetslinjen. Dersom det er ikke en signifikatforskjell mellom metodene, vil den gule regresjonslinjen overlape den røde likhetslinjen.

Deretter ble korrelasjonskoeffisient (r) beregnet ut fra determinasjonskoeffisienten (R^2) fra regresjonslinjen på korrelasjonsdiagrammene. Korrelasjonskoeffisienten forteller hvor nært punktene ligger i forhold til en rett linje. Den forteller noe om den lineære sammenhengen mellom referansemetoden og den nye metoden. Korrelasjonskoeffisienten vil ha en verdi på $-1 \geq r \leq 1$. Dersom det er god korrelasjon mellom referansemetoden og den nye metoden vil r

$\geq \pm 0,95$. Tabell 9 viser beregnet korrelasjonskoeffisient mellom manuell referansemetode og hver LWA.

Tabell 9: Tabellen viser beregnet korrelasjonskoeffisient «r» mellom LWA-ene og manuell referansemetode. Korrelasjonsfaktoren r bør være $r \geq \pm 0,95$ for at det skal være god korrelasjon mellom metodene.

Manuell metode sammenlignet med:	LWA-1	LWA-2	LWA-3	LWA-4
Korrelasjonskoeffisient r	0,74	0,80	0,81	0,65

Basert på resultatene fra riktighetsstudien og presisjonsstudien ble LWA-3 og LWA-4 benyttet i videre studier. Dette valget ble tatt på grunnlag av at LWA-2 er eldst og LWA-1 vasker RBC dårligst. LWA-3 og LWA-4 er mest lik hverandre og har en akseptabel CV% i forhold til kravet.

3.3 BUFFER- OG METODESAMMENLIGNING

3.3.1 95% Konfidensintervall av blodprøver og beinmarg

For å finne ut om det var nok prøver til studien ble det beregnet et 95% konfidensintervall av %celletapet for hver metode med ulike buffere. Dersom det er tilstrekkelig med prøver er intervallbredden ≤ 10 . Tabell 10 viser konfidensintervallene og intervallbredden for blodprøvene. Tabell 11 viser konfidensintervallene og intervallbredde for beinmargsprøvene. Tabell 12 viser konfidensintervallene og intervallbredde for lymfeknuteprøvene.

Tabell 10: 95% konfidensintervall av blodprøver. Tallene er utarbeidet i Excel og rundet av til en desimal. Se tabell 34 i vedlegg 7.7 for Excel-beregninger.

	LWA-3 CW	LWA-4 VB	Manuell CW	Manuell VB
Nedre grense	19%	28%	23%	21%
Øvre grense	29%	38%	32%	28%
Intervallbredde	10	10	9	7

Tabell 11: 95% konfidensintervall for beinmargsprøver. Tallene er utarbeidet i Excel og rundet av til en desimal. Se tabell 35 i vedlegg 7.7 for Excel-beregninger.

	LWA-3 CW	LWA-4 VB	Manuell CW	Manuell VB
Nedre grense	35%	38%	83%	39%
Øvre grense	44%	47%	87%	49%
Intervallbredde	9	9	5	10

Tabell 12: 95% konfidensintervall for lymfeknuteprøver. Tallene er utarbeidet i Excel og rundet av til en desimal. Se tabell 36 i vedlegg 7.7 for Excel-beregninger.

	LWA-3 CW	LWA-4 VB	Manuell CW	Manuell VB
Nedre grense	49%	31%	87%	37%
Øvre grense	79%	71%	100%	64%
Intervallbredde	30	41	12	27

3.3.2 Resultat av totalt %celletap for de ulike prøvematerialene

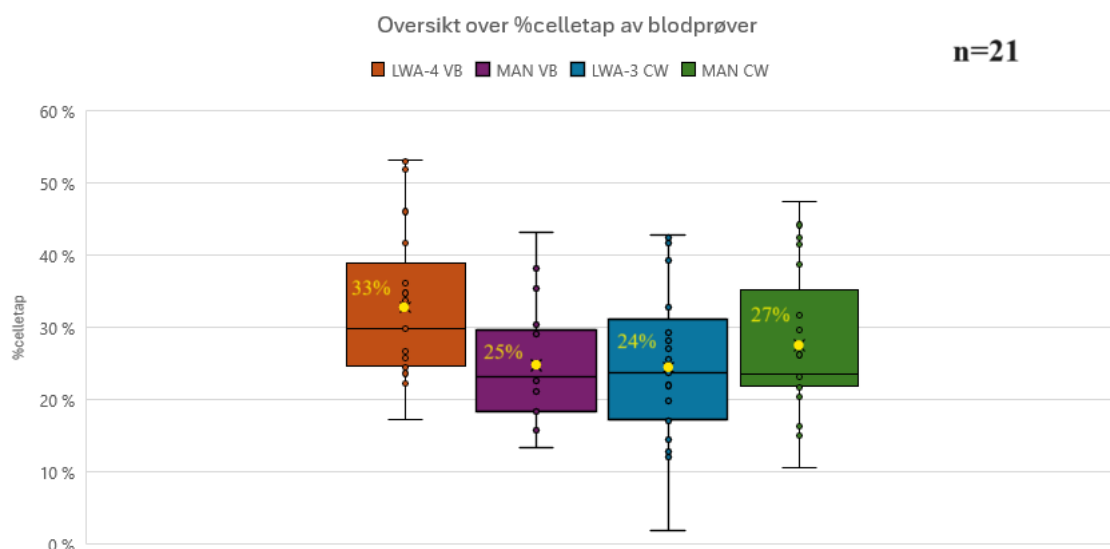
Tabell 13 viser gjennomsnittlig %celletap for blodprøver, beinmarg og lymfeknute ved de ulike metodene og bufferene.

Tabell 13: Resultater av totalt %celletap ved buffer- og metodesammenligningsstudien. Tabellen viser gjennomsnittlig %celletap ved Lyse Wash Assistant (LWA) og manuell metode, og mellom CellWash (CW) og manuell vaskebuffer (VB). Se vedlegg 7.8 for rådata.

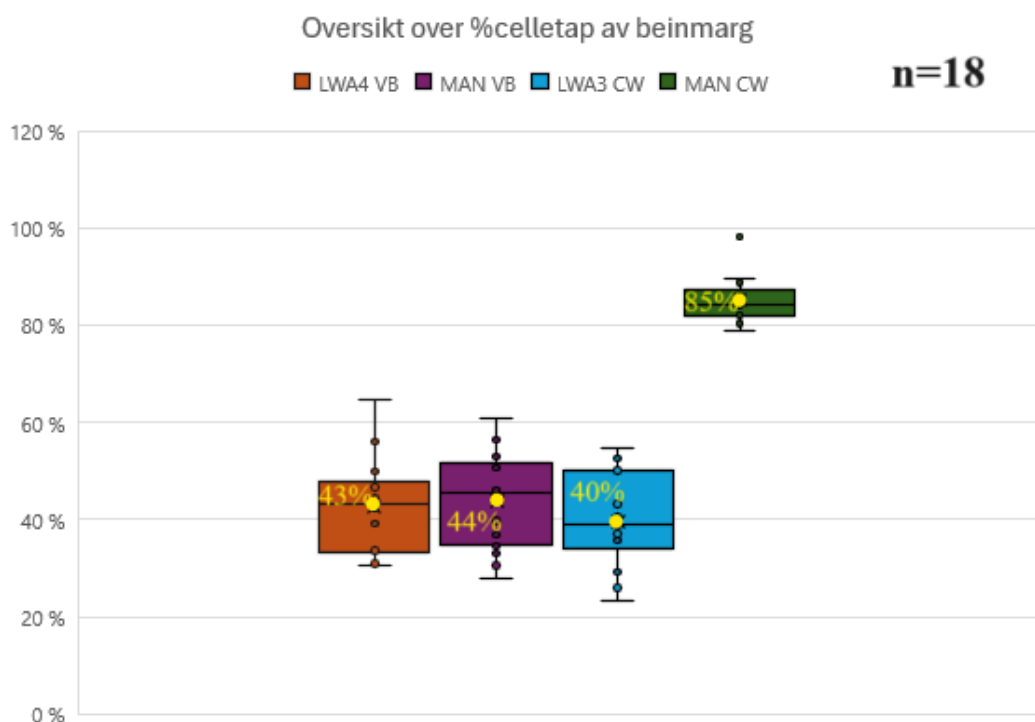
Prøvemateriale	LWA-3 CW	LWA-4 VB	Manuell CW	Manuell VB
Blod	24%	33%	27%	25%
Beinmarg	40%	43%	85%	44%
Lymfeknute	64%	51%	93%	50%

Resultatene ble deretter presentert i boksdiagram for å gi en visuell fremstilling av resultatene.

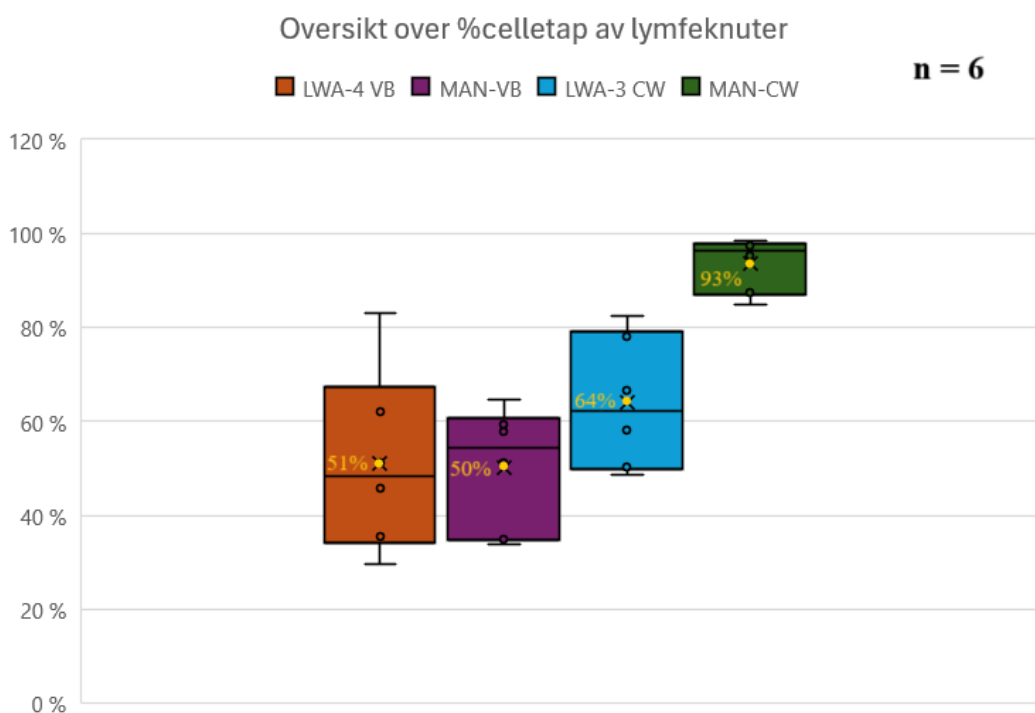
Figur 24 viser en oversikt over totalt %celletap av blodprøvene, figur 25 viser en oversikt over %celletap av beinmargsprøvene, og figur 26 viser en oversikt over %celletap av lymfeknutene.



Figur 24: Boksdiagram som viser oversikt over totalt %celletap av blodprøver ved bruk av ulike metoder og bufferer. Det ble benyttet 21 blodprøver. Krysset med gul prikk representerer gjennomsnittlig %celletap. Den horisontale streken i boksene representerer medianen. Den vertikale linjen, «whisker», som går gjennom boksene representerer variansen. Punktene på linjen representerer prøvene. Dersom punkter ligger over eller under whiskerene er det en slenger.



Figur 25: Boksdiagram som viser oversikt over totalt %celletap av beinmarg ved bruk av ulike metoder og buffere. Det ble benyttet 18 beinmargsprøver. Krysset med gul prikk representerer gjennomsnittlig %celletap. Den horisontale streken i boksene representerer medianen. Den vertikale linjen, «whisker», som går gjennom boksene representerer variansen. Punktene på linjen representerer prøvene. Dersom punkter ligger over eller under whiskerene er det en slenger.



Figur 26: Boksdiagram som viser oversikt over totalt %celletap av lymfeknuter ved bruk av ulike metoder og buffere. Det ble benyttet 6 lymfeknuter. Krysset med gul prikk representerer gjennomsnittlig %celletap. Den horisontale streken i boksene representerer medianen. Den vertikale linjen, «whisker», som går gjennom boksene representerer variansen. Punktene på linjen representerer prøvene. Dersom punkter ligger over eller under whiskerene er det en slenger.

3.3.3 Resultater av %celletap av lymfocytter i blodprøver

Videre ble det beregnet %celletap av lymfocytter i blodprøver. For å beregne om det var nok prøver til studien ble det beregnet et 95% konfidensintervall og intervallbredde. Tabell 14 viser 95% konfidensintervallet for %celletap av lymfocytter i blodprøver. Gjennomsnittlig %celletap av lymfocytter for hver metode er presentert i tabell 15.

Tabell 14: 95% konfidensintervall for %celletap av lymfocytter i blodprøver. Tallene er utarbeidet i Excel og rundet av til en desimal. Se tabell 37 vedlegg 7.7 for Excel-beregninger.

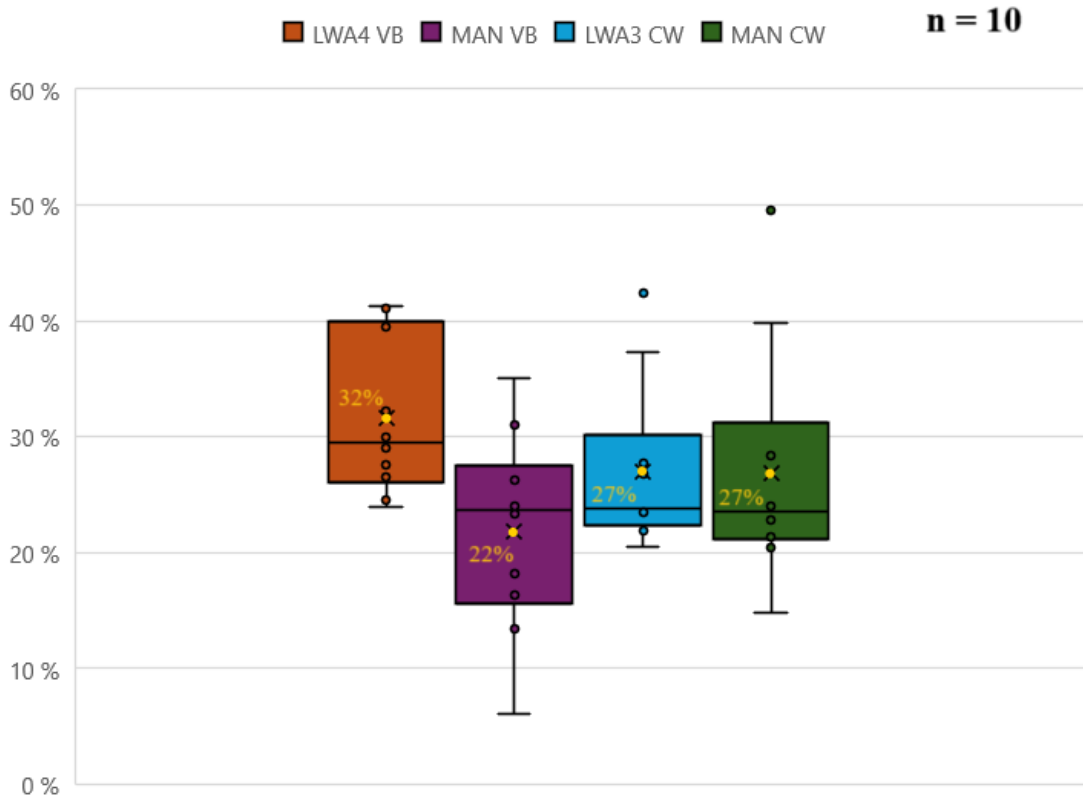
95% KI	LWA-3 CW	LWA-4 VB	Manuell CW	Manuell VB
Nedre grense	22%	27%	20%	16%
Øvre grense	32%	36%	34%	28%
Intervallbredde	10	10	15	12

Tabell 15: Resultater fra %celletap av lymfocytter. Tabellen viser gjennomsnittlig %celletap ved LWA og manuell metode, og ved CellWash (CW) og manuell vaskebuffer (VB). Se vedlegg 7.9 for rådata.

Gjennomsnitt	LWA-3 CW	LWA-4 VB	Manuell VB	Manuell CW
%celletap av lymfocytter	27%	32%	22%	27%

Resultatene fra tabell 15 ble deretter visuelt presentert i et boksdigram, som vist i figur 27.

Oversikt %celletap av lymfocytter i blodprøver



Figur 27: Boksdiagram som viser oversikt over %celletap av lymfocytter i blodprøver ved bruk av ulike metoder og buffere. Det ble benyttet 10 blodprøver med differensialtelling. Krysset med gul prikk representerer gjennomsnittlig %celletap. Den horisontale streken i boksene representerer medianen. Den vertikale linjen, «whisker», som går gjennom boksene representerer variansen. Punktene på linjen representerer prøvene. Dersom punkter ligger over eller under whiskerene er det en slenger.

3.3.4 Celletap ved ulike subpopulasjoner av lymfocytter

For å finne ut om det er tilfeldig eller spesifikt celletap av lymfocytt-subpopulasjoner ble resultater fra blodprøver sammenlignet opp mot et referanseområde. Størrelsen av subpopulasjonene er relativ i forhold til antall lymfocytter. Blodprøvene som ble benyttet er fra friske blodgivere, derfor antas det at verdiene skal være innenfor referanseområdet med mindre det er mer celletap ved enkelte subpopulasjoner. Tabell 16 viser referanseverdi og referanseområdet for ulike lymfocytt-subpopulasjoner i blod hos voksne. (Comans-Bitter et al., 1997). Tallene er hentet fra tabellen presentert i tabell 47 i vedlegg 7.10.

Tabell 16: Referanseverdier for lymfocytt-subpopulasjoner i blod hos voksne. (Comans-Bitter et al., 1997)

Lymfocytt-subpopulasjon	Referanseverdi	Referanseområde
CD3+	72%	55 – 83 %
CD19+	12%	6 – 19 %
CD16+56+	13%	7 – 31 %
CD4+/CD8+ ratio	1,9	1,0 – 3,6

Tabell 17 viser gjennomsnittet av %celletap fra lymfocyt-subpopulasjonene i blodprøvene analysert med 6-farge antistoffmix. Se tabell 46 i vedlegg 7.10 for rådata.

Tabell 17: Resultater av lymfocyt-subpopulasjoner ved ulike metoder. Tabellen viser resultater fra blodprøver merket med 6-farge antistoffmix, lymfocyt-subpopulasjonene er relative i forhold til antall lymfocytter.

Gjennomsnittlig relativ størrelse av lymfocyt-subpopulasjoner	LWA-4 VB	Manuell VB	LWA-3 CW	Manuell CW
CD3+	77%	77%	77%	77%
CD19+	10%	11%	11%	11%
CD16+/CD56+	12%	12%	12%	12%

Tabell 18 viser gjennomsnittet av CD4+/CD8+ ratioen fra blodprøvene analysert med 6-farge antistoffmix. CD4+ og CD8+ inngår i CD3+ subpopulasjonen, og dermed ble ratioen beregnet for å kunne vurdere om vi mister like mye av hver subpopulasjon.

Tabell 18: CD4+/CD8+ ratio ved ulike metoder. Tabellen viser gjennomsnittlig CD4+/CD8+ ratio fra blodprøver merket med 6-farge antistoff. CD4+/CD8+ ratioen kan fortelle noe om vi har mistet mer av en av subpopulasjonene.

	LWA-4 VB	Manuell VB	LWA-3 CW	Manuell CW
CD4+/CD8+ ratio	2,5	2,4	2,4	2,4

Resultatene viser høyere celletap ved beinmarg og lymfeknuter enn ved blod. CellWash i kombinasjon med manuell metode ga mest celletap på beinmarg og lymfeknute. Blodprøvene viser at det ikke er signifikant forskjell i celletap mellom metodene og bufferene, men litt høyere celletap på LWA-4 VB. Celletap av lymfocytter viser lignende resultater som totalt celletap i blod. Det er heller ikke påvist høyere celletap ved spesifikke lymfocyt-subpopulasjoner.

4 DISKUSJON

4.1 HVORFOR ER VI INTERESSERT I CELLETAP?

Som nevnt på tidligere må man tilstrekkelig antall celler for å kunne vurdere tilbakefall av kreftceller etter behandling. Høyt celletap kan gi feil diagnostisering som kan føre til sen behandling av kreftpasienter. For å minimalisere celletapet mest mulig har laboratoriet ved

Enhet for Cytometri tatt hensyn til valg av prepareringsmetode basert på blant annet prøvematerialet. F.eks. har de bestemt å unngå bruk av LWA ved analysering av beinmargsprøver og lymfeknuter, på grunnlag av mistenkt høyere celletap enn ved manuell preparering. Det er også viktig å minimalisere celletapet mest mulig med tanke på prøvetaking. Dette gjelder f.eks. beinmargsprøver og lymfeknuter som har en belastende prøvetaking for pasienter, er tidskrevende for helsepersonell og ikke minst kostbart.

4.2 PREISJONSSTUDIE

4.2.1 Vurdering av CV%

Enhet for Cytometri ved St.Olavs Hospital satt en øvre grense for CV% mellom seriene på 10%. En endring på 10% i celletallet vil ikke ha stor betydning for den kliniske vurderingen. I denne studien ble det påvist at alle metodene hadde en gjennomsnittlig CV% innenfor satt grense. Dette er en indikasjon på at metodene har en god presisjon mellom seriene. Beregnet gjennomsnittlig CV% viser ikke en betydelig forskjell mellom metodene. Likevel viser det at LWA-1 og -2 er mest lik hverandre, mens LWA-3, -4 og manuell også er mest lik hverandre.

CV% på fortynnede målepunkter ble beregnet for å se om TransFix påvirket presisjonen. CV% på målepunkter m/0,77 fortynning er beregnet ut ifra bare en serie. Dette kan føre til lavere pålitelighet enn om man har flere målepunkt. Fortynnede og ufortynnede målepunkter viser ikke betydelig forskjell, noe som kan indikere at bruk av TransFix ikke påvirker presisjonen. Målepunkter m/0,83 fortynning viser en lavere CV%. Disse målepunktene ble analysert sist i studien, og en mulig årsak kan være forbedret pipettering.

4.2.2 Studiens begrensninger og vurdering av pålitelighet

Vanligvis ønskes det å gjennomføre presisjonsstudie over 20 dager eller mer for å beregne dag-til-dag variasjon (Bolann & Åsberg, 2020). Cellene i prøvematerialet som skal analyseres med flowcytometri har holdbarhet på 4 døgn med TransFix. Dermed var det ikke mulig å gjennomføre presisjonsstudien over lengre enn 4 dager. Færre målepunkter minsker påliteligheten til studien.

Ulike feilkilder kan ha innvirkning på resultatene fra studien. En mulig feilkilde er f.eks. prøverørene som har stått lenge før de ble analysert. Dette kan føre til at cellene dør, som igjen fører til større variasjon mellom målepunktene fra dag-til-dag. Menneskelige feilkilder må regnes med, spesielt ved manuell preparering. Mulige feilkilder er unøyaktig pipettering ved starten av studien og for lite blanding med vortex etter dekantering. For lite blanding kan føre til at cellene sitter igjen i bunnen av røret etter sentrifugering, og celletallet blir lavere.

På målepunktet som ble preparert på LWA-ene på dag 4 ble ikke TransFix vasket bort. Dette vil i praksis ikke ha så stor betydning, men kan gi litt mindre celletall.

4.3 RIKTIGHETSSTUDIE

Enhet for Cytometri ved St. Olavs Hospital forventer et celletap på rundt 20% under preparering av prøver på LWA og manuell metode. Det er ønskelig å ikke miste mer enn 50% totalt sett for hele analyseprosedyren, ettersom dette kan påvirke den kliniske vurderingen. Det kan føre til at det blir for lavt antall celler til vurdering. Dermed er vi interessert i å finne ut hvilken LWA som hadde minst celletap.

4.3.1 Konfidensintervall

Det ble utarbeidet 95% konfidensintervall for %celletap for hver metode. Beregnet intervallbredde forteller noe om det var tilstrekkelig antall prøver. Som tabell 5 viser er alle metodene innenfor tillatt intervallbredde. Dette tyder på at det er tilstrekkelig antall prøver.

Det ble også utarbeidet et 95% konfidensintervall på differansen mellom manuell metode og LWA-ene for å sjekke om det er signifikant forskjell mellom metodene. Som tabell 6 viser, inneholder ikke konfidensintervallene for LWA-1 og LWA-4 null, som tyder på at det ikke er en signifikant forskjell mellom dem og manuell metode. Konfidensintervallene til LWA-2 og LWA-3 inneholder derimot ikke null, som tyder på at det er signifikant forskjell mellom dem og manuell metode. Begge intervallene er negative, som indikerer at det er lavere celletap på LWA-2 og -3 enn ved manuell metode.

4.3.2 Diskusjon av resultater

Som resultatene viser ser vi at alle metodene har et akseptabelt %celletap, men LWA-2 og -3 har litt mindre %celletap i forhold til de andre. Fra våre resultater ser vi også at prøver med høyt celletall viser mest %celletap. Prøver fra høyt nivå er hentet fra verifiserte pasientprøver, mens lavt og middels nivå er fra blodgivere. Pasientprøver kan muligens ha høyere celletap, ettersom pasientprøver ofte inneholder patologiske celler og er vanskeligere å gate.

4.3.2.1 Vurdering av differanseplot

Differanseplot for LWA-1 viser at prøvene har en stor spredning som indikerer at metodene er ikke helt like. Likevel viser plotet at de aller fleste prøvene ligger innenfor tillatt grense. Dette indikerer at forskjellen mellom LWA-1 og manuell metode er akseptabel.

Differanseplotet for LWA-2 viser at de fleste prøvene ligger under den røde linjen. Dette indikerer at manuell referansemetode hadde mer celletap enn ved LWA-2. Mange prøver var utenfor tillat grense, som indikerer at det er større forskjell mellom metodene.

Differanseplot for LWA-3 viser en spredning som tyder på at det er forskjell mellom metodene. De fleste prøvene ligger under den røde linjen, som tyder på at manuell metode gir mer celletap enn LWA-3 ved disse prøvene. Likevel ligger de fleste innenfor tillatt grense, som indikerer at det er akseptabel forskjell mellom metodene.

Differanseplotet for LWA-4 viser en større spredning enn ved LWA-1 og LWA-3. Dette indikerer større forskjell sammenlignet med manuell referansemetode. Likevel ligger de aller fleste prøvene innenfor tillatt grense. Dette tyder på at det er akseptabel forskjell mellom metodene.

4.3.2.2 Vurdering av regresjon og korrelasjonsdiagram

Regresjonsanalysen for LWA-1 viser at 95% konfidensintervallet for skjæringspunktet «b» ikke inneholder null, som indikerer konstant feil. Hele konfidensintervallet ligger over 0, som indikerer at LWA-1 gir konstant høyere celletap enn manuell metode. 95% konfidensintervallet til X-variabel «a» inneholder ikke én, som indikerer proporsjonal feil. Siden regresjonslinjen er stigende indikerer dette at jo større celletapet er, dess større forskjell er det mellom metodene. Likevel krysser regresjonslinjen med likhetslinjen, som indikerer at det ikke er signifikant forskjell mellom metode.

Regresjonsanalysen for LWA-2 viser at 95% konfidensintervallet for skjæringspunktet «b» inneholder null, som indikerer at det ikke er konstant feil. 95% konfidensintervallet for X-variabel «a» inneholder én som indikerer at det ikke er proporsjonal feil. Likevel ser vi at hele regresjonslinjen ligger under likhetslinjen, som indikerer signifikant forskjell mellom metodene. Regresjonslinjen ligger under likhetslinjen som tyder på at LWA-2 gir mindre celletap enn manuell metode.

Regresjonsanalysen for LWA-3 viser at 95% konfidensintervallet for skjæringspunktet «b» inneholder null, som indikerer at det ikke er konstant feil. 95% konfidensintervallet for X-variabel «a» inneholder én, som indikerer at det ikke er proporsjonal feil. Hele regresjonslinjen ligger under likhetslinjen som indikerer at det er signifikant forskjell, og at LWA-3 gir mindre tap enn manuell metode.

Regresjonsanalysen for LWA-4 viser at 95% konfidensintervallet for skjæringspunkt «b» inneholder null, som indikerer at det ikke er konstant feil. 95% konfidensintervallet for X-variabel «a» inneholder én som indikerer at det ikke er proporsjonal feil. Regresjonslinjen krysser med likhetslinjen, som tyder på at det ikke er signifikant forskjell mellom metodene.

Korrelasjonsdiagrammene for de ulike LWA-ene viser at det er svak korrelasjon mellom manuell metode og LWA-ene. Dette indikerer at celletapet har lite sammenheng mellom metodene, og det er noe tilfeldig hvor mye som går tapt. Ut ifra korrelasjonskoeffisient «r» ser det ut som at LWA-3 har best korrelasjon med manuell metode, mens LWA-4 har lavest korrelasjon med manuell metode.

4.3.3 Studiens begrensinger

En begrensing med studien er at pasientprøver er vanskeligere å gate, på grunn av høyere celletall og abnormaliteter i cellepopulasjoner. Derfor kan manuell gating være en feilkilde som kan føre til feil beregnet %celletap for prøvene i høyt nivå (pasientprøvene).

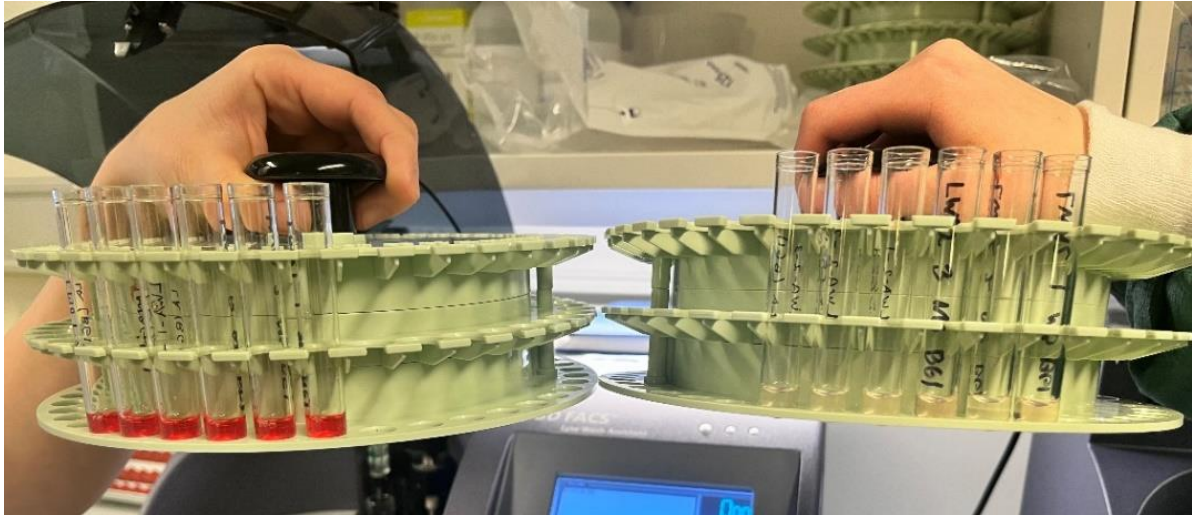
En annen mulig feilkilde er menneskelig feil under manuell prøvepreparering. Dette kan føre til større usikkerhet i resultatene fra manuell metode.

En annen begrensing ved studien er at differanseplot helst skal inneholde 40-100 prøver. I vår studie ble det analysert rundt 20 prøver som øker usikkerheten til differanseplotene.

4.4 VALG AV LWA

Riktighetsstudien og presisjonsstudien ble gjennomført for å finne ut hvor like LWA-ene er, og for å velge hvilke av dem som skulle brukes videre i buffer- og metodesammenligningsstudien. Resultatet ifra riktighets- og presisjonsstudien viser at LWA-ene er ganske like, og alle kan derfor brukes videre. Det trengtes bare to LWA-er til videre studie, LWA-3 og LWA-4 ble valgt. LWA-1 har vi valgt bort fordi den vasker bort RBC dårligere, på grunn av en defekt pumpe. Se figur 28. Blanke prøver med sterk rød farge indikerer dårlig vasking. Dårlig vasking vil forårsake for mye rusk og det vil øke risiko for feil gating og WBC-tallet ifra flowcytometeret blir ikke troverdig nok. LWA-2 var det eldste instrumentet, se vedlegg 7.11, som var en av grunnene til at den ble valgt bort.

Presisjonsstudien viser også at LWA-3 og LWA-4 har mest like paralleller, begge har CV% på 10%. LWA-2 derimot har lavere CV% på 7%, som er mest lik LWA-1. Det var viktig å velge de to instrumentene som ga mest lik preparering, derfor valgte vi å benytte LWA-3 og LWA-4 til videre studie.



Figur 28: Prøvepreparering på LWA-1 og -3. Bildet viser prøver preparert på LWA-1 til venstre og LWA-3 til høyre. Vi ser at prøvene fra LWA-1 har en sterkere rød farge som indikerer at instrumentet ikke har vasket bort RBC ordentlig. Prøvene er blanke som tyder på at det er vaskingen er problemet, dersom prøvene hadde vært blakket indikerer det dårlig lysering.

4.5 BUFFER- OG METODESAMMENLIGNING

Under buffer- og metodesammenligningsstudien ble det analysert seks lymfeknuter på grunn av lite tilgjengelighet av prøvemateriale. På grunnlag av dette er resultatene fra lymfeknuter upålitelige, og vi ser dermed bort ifra disse når vi vurderer celletap forårsaket av buffer og metode. Resultatene i utarbeidet 95% konfidensintervall for blodprøver og beinmargsprøver vist i tabell 10 og 11 viser at alle metodene har en intervallbredde innenfor den tillate bredden. Dette indikerer at det er tilstrekkelig antall prøver til å trekke en pålitelig konklusjon ifra dataene.

4.5.1 Sammenligning av buffere og metoder

I denne studien ble de to ulike buffere sammenlignet mot hverandre. Som tabell 3 viser har bufferene ulikt innhold. Begge inneholder fosfatbufret saltvann (PBS). Manuell vaskebuffer inneholder BSA, som skummer mye, derfor benyttes det antifoam på LWA. Vanligvis benyttes CellWash på LWA, men for å teste begge buffere ble manuell vaskebuffer også benyttet på LWA i denne studien. CellWash er levert av BD og er anbefalt å bruke på LWA fra samme leverandør.

Resultatene i tabell 13 tyder på at bufferen har ikke stor påvirkning på celletapet i blodprøver. Ved analysing av beinmargsprøver derimot ser vi en større forskjell mellom bufferene. Bruk av CellWash i kombinasjon med manuell metode ga ca. dobbelt så mye celletap i forhold til CellWash på LWA og metodene med manuell vaskebuffer. En mulig årsak til dette kan være at CellWash er levert av BD og dermed tilpasset LWA-ene. Basert på dette viser det seg at

CellWash er mest egnet til bruk på LWA, mens vaskebuffer er mest egnet til manuell preparering.

Ved å sammenligne de to bufferene på LWA ser vi at de gir ikke en betydelig forskjell i celletap. Se tabell 13. Det indikerer at både vaskebuffer og CellWash kan benyttes på LWA-ene. Vi ser at det er litt høyere celletap ved bruk av vaskebuffer, men en mulig årsak er at det ble brukt to ulike LWA-er.

4.5.2 Prøvemateriale

Ut fra resultatene fra buffer og metode-sammenligningsstudien vist i tabell 13, ser vi at det er minst gjennomsnittlig %celletap på blod. Vi ser at beinmarg gir mer %celletap enn blod, og lymfeknute gir høyest %celletap. Resultatene fra lymfeknute er upålitelige ettersom alle konfidensintervallene har en intervallbredde høyere enn tillatt bredde. Resultatene fra blod og beinmarg er derimot pålitelig nok, ettersom intervallbreddene er innenfor tillatt bredde, som vist i tabell 10 og 11.

Ved å sammenligne %celletapet av beinmargsprøver ble det funnet relativt likt celletap mellom metodene, med unntak av CellWash i kombinasjon med manuell metode. I boksdiagrammet for beinmarg ser vi at boksen for manuell CellWash overlapper ikke med de andre boksene. Dette indikerer at denne metoden er signifikant forskjellig sammenlignet med de andre metodene. Boksene for de andre metodene derimot overlapper hverandre, som tyder på at det ikke er en signifikant forskjell. Basert på dette kan beinmargsprøver prepareres både manuelt og automatisk, med unntak av å kombinere CellWash med manuell metode.

Som boksdiagram for lymfeknuter viser, er det også påvist mer celletap i manuell metode kombinert med CellWash enn ved de andre metodene. Boksen som representerer manuell CellWash overlapper ikke med noen av de andre boksene. Dette indikerer en signifikant forskjell mellom manuell CellWash og de andre metodene. Boksene for de andre metodene derimot overlapper hverandre, som kan indikere at det ikke er en signifikant forskjell. Diagrammet viser også at LWA-3 CellWash gir litt høyere gjennomsnittlig %celletap enn de to metodene med manuell vaskebuffer. Likevel kan ikke disse resultatene benyttes til å trekke en pålitelig konklusjon, siden det ikke var nok prøver.

4.5.3 Celletap av lymfocytter

Intervallbredden på manuell metode med CellWash og manuell metode med vaskebuffer er høyere enn tillatt intervallbredde. Dette indikerer at det er for lite prøver og at studien dermed

har lite pålitelighet. LWA-4 vaskebuffer og LWA-3 CellWash var derimot innenfor tillatt intervallbredde og mer pålitelig.

Resultatene viser at det ikke var en betydelig forskjell i %celletap av lymfocytter i forhold til %celletap av totalt WBC i blod. Dette indikerer at det ikke er mer eller mindre celletap av lymfocytter i forhold til andre cellepopulasjoner. Som resultatene i tabell 15 viser er det høyere %celletap av lymfocytter ved LWA-4 med vaskebuffer enn ved de andre metodene. Manuell metode med vaskebuffer hadde lavest %celletap, men resultatene er ikke helt pålitelige. Det skulle helst vært analysert flere prøver, men som nevnt tidligere kunne det bare benyttes prøver med differensialtelling. På grunn av tidsbegrensing var det heller ikke mulig å analysere flere prøver.

4.5.4 Er det et tilfeldig celletap av lymfocytt-subpopulasjoner?

Ved å sammenligne gjennomsnittlig relativ størrelse av de ulike lymfocytt-subpopulasjonene med referanseområder for populasjonene, ser vi at det er tilfeldig celletap. Dette vil si at det er ikke en spesifikk cellepopulasjon som gir høyere celletap enn andre og tapet er tilfeldig fordelt. CD4+/CD8+ ratio beregnet ved de ulike metodene er også innenfor referanseområdet. Dette indikerer at det er høyere celleandel av CD4+ celler enn av CD8+ celler, som forventet.

4.5.5 Studiens begrensninger

En av studiens begrensninger var at det måtte benyttes to LWA-er for å spare tid og for å preparere parallellene samtidig. Det var også for å unngå å skifte vaskebuffer mellom hver parallell. LWA-3 og -4 ligner hverandre, men er fortsatt to ulike instrument som fører til en ekstra variabel i studien. Instrumentene ble f.eks. levert på laboratoriet med ett års mellomrom som vist i vedlegg 7.11.

En annen begrensning for denne studien var tilgang på prøvemateriale. Laboratoriet mottok seks cellerike lymfeknuter som vi kunne benytte til studien vår i løpet av bachelorperioden. Dette var ikke et tilstrekkelig antall prøver. Dermed kan vi ikke trekke en pålitelig konklusjon ut fra oppnådde resultater fra lymfeknuter.

5 KONKLUSJON

Prøvematerialet har betydning for celletapet. Ut ifra våre resultater viser det seg at beinmargsprøver og lymfeknuter gir høyere celletap enn blodprøver ved alle metodene. Manuell metode i kombinasjon med CellWash ga mest celletap ved beinmarg og lymfeknute. De andre metodene derimot var ikke signifikant forskjellige. Dette vil si at preparering av

beinmargsprøver kan automatiseres, ut ifra våre resultater. På blod var det likt celletap ved de ulike metodene, som vil si at både LWA og manuell metode kan benyttes til prøvepreparering.

Ut ifra resultatene våre er det vanskelig å konkludere hvilken buffer som gir minst celletap. Dette kommer an på hvilken metode bufferene benyttes i kombinasjon med, og hvilket prøvemateriale som analyseres. Generelt sett var vaskebuffer best i kombinasjon med manuell metode, og CellWash best i kombinasjon med LWA.

LWA-4 med vaskebuffer ga mest %celletap av lymfocytter. Celletapet ved lymfocyt-subpopulasjonene er tilfeldig fordelt, og man mister ikke mer ved en spesifikk subpopulasjon.

Ettersom det var lite tilgjengelighet på lymfeknuter var det ikke tilstrekkelig antall prøver, og resultatene på lymfeknuter er upålitelige. Det kan dermed være ønskelig å undersøke dette materialet nærmere i fremtidige studier.

BIDRAG

M.S. og L.A. bidratt likt til planlegging, innsamling og fremstilling av data, og til analysering av prøver. Resultatene ble tolket i samarbeid mellom begge studentene. Begge har også bidratt likt til utforming av figurer og tabeller samt til litteratursøk. Når det gjelder skriveprosessen var begge like involvert.

6 REFERANSER

About EuroFlow. (2024). <https://euroflow.org/about/>

Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. (2022). Hentet 26. mars 2024, fra

https://www.lls.org/sites/default/files/2022-07/PS33_AdultALL_2022_FINAL.pdf

Acute Myeloid Leukemia in Adults. (2023). Hentet 26. mars 2024, fra

https://www.lls.org/sites/default/files/2023-06/PS32_Adult_AML_2023.pdf

BD FACSTM Lyse Wash Assistant | Sample Tube Batch Processing. (2024).

<https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/instruments/sample-prep-systems/facs-lyse-wash-assistant>

- Bolann, B. J., & Åsberg, A. (2020). I *Riktig svar på biokjemiske analyser* (1. utgave, s. 21). CAPPELEN DAMM AS.
- Bujoreanu, I., & Gupta, V. (2024). Anatomy, Lymph Nodes. I *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557717/>
- Chronic Lymphocytic Leukemia*. (2023). Hentet 26. mars 2024, fra https://www.lls.org/sites/default/files/2023-07/PS34_CLL_Booklet_2023.pdf
- Chronic Myeloid Leukemia*. (2023). Hentet 26. mars 2024, fra https://www.lls.org/sites/default/files/2023-06/PS31_CML_2023.pdf
- Comans-Bitter, W. M., de Groot, R., van den Beemd, R., Neijens, H. J., Hop, W. C. J., Groeneveld, K., Hooijkaas, H., & van Dongen, J. J. M. (1997). Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhoodReference values for lymphocyte subpopulations. *The Journal of Pediatrics*, *130*(3), 390. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(97\)70200-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(97)70200-2)
- Cruse, J. M., Lewis, R. E., & Wang, H. (2004). CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. *Immunology Guidebook*. <https://doi.org/10.1016/B978-012198382-6/50027-3>
- Definition of hematopoietic stem cell—NCI Dictionary of Cancer Terms—NCI* (nciglobal,ncienterprise). (2011, februar 2). <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/hematopoietic-stem-cell>
- Definition of lymph node—NCI Dictionary of Cancer Terms—NCI* (nciglobal,ncienterprise). (2011, februar 2). <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/lymph-node>
- Gulati, G. L., Ashton, J. K., & Hyun, B. H. (1988). Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *2*(4), 495–511.

Hodgkin's Lymphoma | Find Out About This Cancer | LLS. (2022).

<https://www.lls.org/lymphoma/hodgkin-lymphoma>

Leukemia | Leukemia and Lymphoma Society. (2024). <https://www.lls.org/leukemia>

Lymphoma Action | What is lymphoma? (2022, juni 30). <https://lymphoma-action.org.uk/about-lymphoma/what-lymphoma>

Minimal Residual Disease (MRD). (2019). Hentet 25. mars 2024, fra

https://www.lls.org/sites/default/files/National/USA/Pdf/Publications/FS35_MRD_Final_2019.pdf

Non-Hodgkin lymphoma. (2022). <https://www.lls.org/lymphoma/non-hodgkin-lymphoma>

Sollihaug, K. (2022). *FACS Lyse/Wash Assistant, oppstart, bruk og vedlikehold.* AIT. Enhet for Cytometri.

Staats, J., Divekar, A., McCoy, J. P., & Maecker, H. T. (2019). Guidelines for Gating Flow Cytometry Data for Immunological Assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2032. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9650-6_5

TransFix—Cell Stabilisation Reagents for use in Flow Cytometry. (2024). *Cytomark.*

<https://www.cytomark.co.uk/transfix/>

What is Multicolor Flow Cytometry | Cell Sorting Techniques. (2024).

<https://www.bdbiosciences.com/en-no/learn/applications/multicolor-flow-cytometry>

7 VEDLEGG

7.1 LWA PROGRAMMER

Tabell 19: tabell over programmene på LWA + manuell metode

	LYSE WASH FICS 70-100 µL	LYSE WASH FICS 0-29 µL	LYSE WASH FICS 30-69 µL	Manuell
Lyseringsbuffer	900 µL	900 µL	900 µL	3 mL
Inkubasjon	6 min	10 min	5 min	10 min

Sentrifugering Dekantering	Precipitation G Force: 461 G Precipitation Time: 10 sec Wash G Force: 350 G Wash Volume: 0 μ L	-	Precipitation G Force: 461 G Precipitation Time: 10 sec Wash G Force: 350 G Wash Volume: 0 μ	Force: 540 g Tid: 5min
Lyseringsbuffer -buffer	900 μ L	-	500 μ L	-
Manuell vaskebuffer	-	-	-	3 mL
Inkubasjon:	5 min	-	3 min	-
Sentrifugering og dekantering	-	-	-	Force: 540 g Tid: 5min
PBS-Wash	Precipitation G Force: 461 g Precipitation Time: 10 sec Wash G Force: 350 G Wash Volume: 9000 μ L	Precipitation G Force: 461 G Precipitation Time: 10 sec Wash G Force: 350 G Wash Volume: 6400 μ L	Precipitation G Force: 461 G Precipitation Time: 10 sec Wash G Force: 350 G Wash Volume: 6400 μ L	-
FIX (FACS Flow)	100 μ L i 10 sec	100 μ L i 10 sec	100 μ L i 10 sec	300 μ L

7.2 RÅDATA PRECISIONSSTUDIE

Tabell 20: Resultat fra LWA-1. Ulike farger under "WBC/rør etter vask" representerer ulike fortynninger med Transfix. Rosa er målepunkter som er uforynnet, grønn (fortynningsfaktor 0.77) og oransje (fortynningsfaktor 0.83) er fortynt med 200uL TransFix. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2.

serie	parallell	WBC flowcytometer	sluttvolum (ul)	WBC/rør etter vask
1	1	40458	380	256234
	2	40968	360	245808
2	1	38281	340	216926
	2	39743	310	205339
3	1	36553	410	249779
	2	35414	410	241996
4	1	32582	400	217213
	2	33691	380	213376
5	1	28979	410	153018
	2	26082	410	137721
6	1	28129	430	167993
	2	26530	430	158443
7	1	26108	410	148671
	2	27260	420	159017
8	1	26874	400	149300
	2	27580	410	157053

Tabell 21: Resultat fra LWA-2. Ulike farger under "WBC/rør etter vask" representerer ulike fortynninger med Transfix. Rosa er målepunkter som er uforynnet, grønn (fortynningsfaktor 0.77) og oransje (fortynningsfaktor 0.83) er fortynt med 200uL TransFix. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2.

serie	parallell	WBC flowcytometer	sluttvolum (ul)	WBC/rør etter vask
1	1	40740	410	278390
	2	42234	410	288599
2	1	43502	350	253762
	2	28240	390	183560
3	1	40051	410	273682
	2	36052	410	246355
4	1	37033	390	240715
	2	34634	400	230893
5	1	29672	410	156677
	2	29128	410	153805
6	1	29281	430	174873
	2	31054	430	185461
7	1	32945	400	183028
	2	28446	420	165935
8	1	34704	400	192800
	2	27717	410	157833

Tabell 22: Resultat fra LWA-3. Ulike farger under "WBC/rør etter vask" representerer ulike fortynninger med Transfix. Rosa er målepunkter som er uforynnet, grønn (fortynningsfaktor 0.77) og oransje (fortynningsfaktor 0.83) er fortynt med 200uL TransFix. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2.

serie	parallell	WBC flowcytometer	sluttvolum (ul)	WBC/rør etter vask
1	1	40098	420	280686
	2	37634	410	257166
2	1	37269	410	254672
	2	40728	380	257944
3	1	42258	410	288763
	2	34265	410	234144
4	1	37072	380	234789
	2	33657	380	213161
5	1	30570	410	161419
	2	33477	410	176769
6	1	41144	410	234292
	2	30686	410	174740
7	1	29433	410	167605
	2	32159	380	169728
8	1	35457	400	196983
	2	34971	410	199140

Resultat fra LWA-4. Tabell 23: Resultat fra LWA-4. Ulike farger under "WBC/rør etter vask" representerer ulike fortynninger med Transfix. Rosa er målepunkter som er uforynnet, grønn (fortynningsfaktor 0.77) og oransje (fortynningsfaktor 0.83) er fortynt med 200uL TransFix. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2.

serie	parallell	WBC flowcytometer	sluttvolum (ul)	WBC/rør etter vask
1	1	37154	410	253886
	2	32894	410	224776
2	1	37085	370	228691
	2	40819	380	258520
3	1	40315	400	268767
	2	33071	400	220473
4	1	33341	410	227830
	2	39103	380	247652
5	1	29426	400	151588
	2	26416	390	132680
6	1	31602	410	179956
	2	27522	390	149078
7	1	31262	400	173678
	2	28668	400	159267
8	1	37020	400	205667
	2	34462	400	191456

Tabell 24: Resultat fra Manuell metode. Ulike farger under «WBC/rør etter vask» representerer ulike fortyngninger med Transfix. Rosa er målepunkter som er uforynnet, grønn (fortynningsfaktor 0.77) og oransje (fortynningsfaktor 0.83) er fortynnet med 200uL TransFix. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2.

serie	parallell	WBC flowcytometer	sluttvolum (ul)	WBC/rør etter vask
1	1	30365	440	222677
	2	33357	450	250178
2	1	38218	440	280265
	2	38630	440	283287
3	1	37532	410	256469
	2	37667	410	257391
4	1	34352	410	234739
	2	32938	410	225076
5	1	31842	410	168135
	2	25738	410	135904
6	1	33093	450	206831
	2	30015	450	187594
7	1	31833	410	181271
	2	33192	400	184400
8	1	24320	540	182400
	2	32607	420	190208

Tabell 25: Beregning av CV%. CV% ble beregnet med formel 1.

Instrument	WBC(etter vask) u/Transfix	WBC(etter vask). Fortynningsfaktor 0.77	WBC(etter vask). Fortynningsfaktor 0.83
LWA-1			
Standardavvik	19591	10817	7145
Gjennomsnitt	230834	145369	156746
%CV	8 %	7 %	5 %
LWA-2			
Standardavvik	33268,71569	2031,153515	13047,5426
Gjennomsnitt	249494	155241	176655
%CV	13 %	1 %	7 %
LWA-3			
Standardavvik	24967	25450	10854
Gjennomsnitt	252666	190415	169094
%CV	10 %	13 %	6 %
LWA-4			
Standardavvik	18114	20704	13370
Gjennomsnitt	241324	176517	142134
%CV	8 %	12 %	9 %
Manuell			
Standardavvik	23017	22791	9440
Gjennomsnitt	251260	152020	188784
%CV	9 %	15 %	5 %

7.3 KONFIDENSINTERVALL FRA RIKTIGHETSSTUDIE

Tabell 26: 95% Konfidensintervall for %celletapet for hver metode. Tabellene ble laget ved hjelp av excel funksjon kalt «deskriptiv statistikk» og ble brukt til å regne ut nedregrense og øvre grense. Konfidensintervall ble beregnet med formel 5. Intervall bredde også beregnet for å sjekke av vi har et intervall mindre enn 10%.

LWA1		LWA2		LWA3		LWA 4		Manuell	
Gjennomsnitt	0,252993255	Gjennomsnitt	0,173674811	Gjennomsnitt	0,194119542	Gjennomsnitt	0,23179	Gjennomsnitt	0,25383652
Standardfeil	0,015405153	Standardfeil	0,018923325	Standardfeil	0,021452407	Standardfeil	0,02055	Standardfeil	0,017217864
Median	0,251329625	Median	0,142894168	Median	0,17061681	Median	0,20304	Median	0,228255361
Modus	#I/T	Modus	#I/T	Modus	#I/T	Modus	#I/T	Modus	#I/T
Standardavvik	0,077025764	Standardavvik	0,094616627	Standardavvik	0,107282035	Standardavvik	0,10274	Standardavvik	0,08608932
Utvagsvarians	0,005932968	Utvagsvarians	0,008952306	Utvagsvarians	0,011505144	Utvagsvarians	0,01056	Utvagsvarians	0,007411371
Kurtosis	1,064745761	Kurtosis	1,400391982	Kurtosis	1,261331777	Kurtosis	1,85863	Kurtosis	1,129962352
Skjevhet	0,816965225	Skjevhet	1,199436858	Skjevhet	1,155890757	Skjevhet	1,34055	Skjevhet	1,159593785
Område	0,320402898	Område	0,400701728	Område	0,440254085	Område	0,42728	Område	0,325438964
Minimum	0,134556041	Minimum	0,019698022	Minimum	0,033252618	Minimum	0,10319	Minimum	0,144521294
Maksimum	0,454958939	Maksimum	0,420399749	Maksimum	0,473506703	Maksimum	0,53047	Maksimum	0,469960258
Sum	6,324831369	Sum	4,341870273	Sum	4,852968545	Sum	5,79478	Sum	6,345912999
Antall	25	Antall	25	Antall	25	Antall	25	Antall	25
Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,031794673	Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,039055824	Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,044275592	Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,04241	Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,035353525
Nedre grense	22 %	13 %	15 %	19 %	22 %	Øvre grense	28 %	21 %	29 %
Øvre grense	28 %	21 %	24 %	27 %	29 %	Intervallbredde	6 %	8 %	7 %
Intervallbredde	6 %	8 %	9 %	8 %	7 %				

Tabell 27: 95% Konfidensintervall av differanse mellom hver LWA og manuell metode. Konfidensintervallet ble beregnet med formel 5.

Differanse mellom LWA1 og manuell metode		Differanse mellom LWA2 og manuell metode		Differanse mellom LWA3 og manuell metode		Differanse mellom LWA4 og manuell metode		
Mean	-0,000843265	Mean	-0,080161709	Mean	-0,059716978	Mean	-0,022045393	
Standard Error	0,011873306	Standard Error	0,011608633	Standard Error	0,012475548	Standard Error	0,015999966	
Median	-0,005374816	Median	-0,068676071	Median	-0,072961039	Median	-0,016648567	
Mode	#I/T	Mode	#I/T	Mode	#I/T	Mode	#I/T	
Standard Deviation	0,059366531	Standard Deviation	0,058043167	Standard Deviation	0,062377742	Standard Deviation	0,079999832	
Sample Variance	0,003524385	Sample Variance	0,003369009	Sample Variance	0,003890983	Sample Variance	0,006399973	
Kurtosis	-0,377241737	Kurtosis	-0,024083342	Kurtosis	-1,036870376	Kurtosis	-0,104646908	
Skewness	0,071957546	Skewness	-0,328778098	Skewness	0,087899595	Skewness	0,001123934	
Range	0,234240431	Range	0,246798761	Range	0,218030226	Range	0,308238974	
Minimum	-0,12974163	Minimum	-0,215633973	Minimum	-0,158065009	Minimum	-0,176556122	
Maximum	0,104498801	Maximum	0,031164788	Maximum	0,059965217	Maximum	0,131682851	
Sum	-0,02108163	Sum	-2,004042727	Sum	-1,492924454	Sum	-0,551134815	
Count	25	Count	25	Count	25	Count	25	
Confidence Level(95,0%)	0,0245053	Confidence Level(95,0%)	0,023959042	Confidence Level(95,0%)	0,025748266	Confidence Level(95,0%)	0,033022307	
Nedre grense	-3 %	-10 %	-9 %	-6 %	Øvre grense	2 %	-3 %	1 %
Øvre grense	2 %	-6 %	-3 %	1 %				

7.4 RESULTAT FRA RIKTIGHETSSTUDIE

Tabell 28: Rådatatabell fra LWA-1 og LWA-2 i riktighetsstudiet. Differensial-tellingen er hentet fra hematologen, og ble brukt til å regne ut WBC/rør før vask med formel 3. Sluttvolum er prøvevolumet etter prøveoppbeidelse. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2. Celletap (absolutt celletap) ble beregnet å ta differansen mellom WBC/ rør før og etter vask. %celletap ble beregnet med formel 4.

Prøve ID	Differtelling Hematolog	WBC/rør før vask	LWA1	WBC flowcytometer	WBC/rør etter vask	Celletap	%celletap	LWA2	WBC flowcytometer	WBC/rør etter vask	Celletap	%celletap
	WBC (10 ⁹ /L)		Sluttvolum (µl)					Sluttvolum (µl)				
BG5 lav	6,84	136800	390	16617	105241	31559	23 %	370	18958	116908	19892	15 %
BG6 lav	7,64	152800	410	16741	114397	38403	25 %	390	20198	131287	21513	14 %
BG7 lav	4,58	160300	400	18383	122553	37747	24 %	390	21313	138535	21766	14 %
BG9 lav	4,42	154700	390	15323	99600	55101	36 %	390	19602	127413	27287	18 %
BG-10 Lav	6,14	122800	410	13577	92776	30024	24 %	410	15525	106088	16713	14 %
BG-11 lav	7,7	154000	420	15505	108535	45465	30 %	420	17696	123872	30128	20 %
Bg-12 lav	6,21	124200	390	14087	91566	32635	26 %	410	14712	100532	23668	19 %
BG-13 lav	7,13	142600	410	17017	110611	31990	22 %	400	17503	116687	25913	18 %
BG-14 lav	7,84	156800	400	16646	110973	45827	29 %	420	15966	111762	45038	29 %
BG-15 lav	5,75	115000	390	12156	79014	35986	31 %	440	11916	87384	27616	24 %
BG2 mid	4,17	417000	360	51428	308568	108432	26 %	410	55009	375895	41105	10 %
BG3 mid	5,33	533000	410	64060	437743	95257	18 %	410	68653	469129	63871	12 %
BG5 mid	6,84	684000	400	85375	569167	114833	17 %	400	94680	631200	52800	8 %
BG6 mid	7,64	764000	410	88372	603875	160125	21 %	410	103757	709006	54994	7 %
BG7 mid	4,58	458000	400	59456	396373	61627	13 %	400	61827	412180	45820	10 %
BG8 mid	4,63	463000	390	52279	339814	123187	27 %	400	59526	396840	66160	14 %
BG9 mid	4,42	442000	420	46490	325430	116570	26 %	380	57501	364173	77827	18 %
PAS1	26,6	931000	400	82405	549367	381633	41 %	410	78967	539608	391392	42 %
PAS2	31,8	954000	400	100943	672953	281047	29 %	410	94557	646140	307861	32 %
PAS3	15,83	949800	400	77652	517680	432120	45 %	410	85538	584510	365290	38 %
PAS4	14,18	921700	400	114154	761027	160673	17 %	410	132226	903544	18156	2 %
PAS5	12,1	968000	400	106832	712213	255787	26 %	410	115085	786414	181586	19 %
PAS7	10,43	1043000	420	124123	868861	174139	17 %	420	128418	898926	144074	14 %
PAS8	10,41	1041000	410	131027	895351	145649	14 %	420	131298	919086	121914	12 %
PAS9	9,57	957000	410	107322	733367	223633	23 %	410	121103	827537	129463	14 %

Tabell 29: Rådatatabell fra LWA-3 og LWA-4 i riktighetsstudiet. Differensial-tellingen er hentet fra hematologen, og ble brukt til å regne ut WBC/rør før vask med formel 3. Sluttvolum er prøvevolumet etter prøveopparbeidelse. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2. Celletap (absolutt celletap) ble beregnet å ta differansen mellom WBC/ rør før og etter vask. %celletap ble beregnet med formel 4.

Prøve ID	Diftelling Her WBC (10 ⁹ /L)	WBC/rør før vask	LWA3				LWA4					
			Sluttvolum (µl)	WBC flowcytometer	WBC/rør etter	Celletap	%celletap	Sluttvolum (µl)	WBC flowcyt	WBC/rør etter	Celletap	%celletap
BG5 lav	6,84	136800	360	19091	114546	22254	16 %	330	19493	107212	29589	22 %
BG6 lav	7,64	152800	390	22726	147719	5081	3 %	380	19869	125837	26963	18 %
BG7 lav	4,58	160300	380	21037	133234	27066	17 %	360	19664	117984	42316	26 %
BG9 lav	4,42	154700	390	19732	128258	26442	17 %	380	18218	115381	39319	25 %
BG-10 Lav	6,14	122800	410	14313	97806	24995	20 %	370	17070	105265	17535	14 %
BG-11 lav	7,7	154000	410	16906	115524	38476	25 %	350	18677	108949	45051	29 %
Bg-12 lav	6,21	124200	400	15587	103913	20287	16 %	380	15703	99452	24748	20 %
BG-13 lav	7,13	142600	400	17687	117913	24687	17 %	400	16861	112407	30193	21 %
BG-14 lav	7,84	156800	390	18586	120809	35991	23 %	400	20009	133393	23407	15 %
BG-15 lav	5,75	115000	390	11799	76694	38307	33 %	390	13270	86255	28745	25 %
BG2 mid	4,17	417000	390	54952	357188	59812	14 %	390	47598	309387	107613	26 %
BG3 mid	5,33	533000	410	68999	457827	75173	14 %	390	54564	354666	178334	33 %
BG5 mid	6,84	684000	410	92883	634701	49299	7 %	400	89149	594327	88673	13 %
BG6 mid	7,64	764000	410	105312	719632	44368	6 %	410	90260	616777	147223	19 %
BG7 mid	4,58	458000	400	58230	388200	69800	15 %	400	61611	410740	47280	10 %
BG8 mid	4,63	463000	400	62935	419567	43433	9 %	400	59356	395707	67293	15 %
BG9 mid	4,42	442000	390	59780	388570	53430	12 %	390	54193	352255	89746	20 %
PAS1	26,6	931000	410	78764	538221	392779	42 %	360	72856	437136	493864	53 %
PAS2	31,8	954000	400	89919	599460	354540	37 %	400	89725	598167	355833	37 %
PAS3	15,83	949800	410	73180	500063	449737	47 %	410	78510	536485	413315	44 %
PAS4	14,18	921700	410	105437	720486	201214	22 %	400	120734	804893	116807	13 %
PAS5	12,1	968000	410	112505	768784	199216	21 %	410	98506	673124	294876	30 %
PAS7	10,43	1043000	400	129757	865047	177953	17 %	400	126898	845987	197013	19 %
PAS8	10,41	1041000	380	143172	906756	134244	13 %	380	136915	867128	173872	17 %
PAS9	9,57	957000	400	115932	772880	164120	19 %	400	122819	818793	136207	14 %

Tabell 30: Rådatatabell fra manuell metode i riktighetsstudiet. Differensial-tellingen er hentet fra hematologen, og ble brukt til å regne ut WBC/rør før vask med formel 3. Sluttvolum er prøvevolumet etter prøveopparbeidelse. WBC/rør etter vask ble beregnet med formel 2. Celletap (absolutt celletap) ble beregnet å ta differansen mellom WBC/ rør før og etter vask. %celletap ble beregnet med formel 4.

Prøve ID	Diftelling Hematolog WBC (10 ⁹ /L)	WBC/rør før vask	Manuell				
			Sluttvolum	WBC flow	WBC/rør e	Celletap	%celletap
BG5 lav	6,84	136800	430	14782	105938	30862	23 %
BG6 lav	7,64	152800	440	16850	123567	29233	19 %
BG7 lav	4,58	160300	410	17503	119604	40696	25 %
BG9 lav	4,42	154700	390	16263	105710	48991	32 %
BG-10 Lav	6,14	122800	430	12254	87820	34980	28 %
BG-11 lav	7,7	154000	490	12770	104288	49712	32 %
Bg-12 lav	6,21	124200	470	13328	104403	19797	16 %
BG-13 lav	7,13	142600	480	12806	102448	40152	28 %
BG-14 lav	7,84	156800	490	12944	105709	51091	33 %
BG-15 lav	5,75	115000	470	10671	83590	31411	27 %
BG2 mid	4,17	417000	520	40632	352144	64856	16 %
BG3 mid	5,33	533000	520	48337	418921	114079	21 %
BG5 mid	6,84	684000	400	79181	527873	156127	23 %
BG6 mid	7,64	764000	410	89645	612574	151426	20 %
BG7 mid	4,58	458000	410	49310	336952	121048	26 %
BG8 mid	4,63	463000	540	40873	367857	95143	21 %
BG9 mid	4,42	442000	430	48125	344896	97104	22 %
PAS1	26,6	931000	390	75918	493467	437533	47 %
PAS2	31,8	954000	390	93150	605475	348525	37 %
PAS3	15,83	949800	500	61509	512575	437225	46 %
PAS4	14,18	921700	510	82917	704795	216906	24 %
PAS5	12,1	968000	400	120089	800593	167407	17 %
PAS7	10,43	1043000	410	126233	862592	180408	17 %
PAS8	10,41	1041000	400	133583	890553	150447	14 %
PAS9	9,57	957000	410	111485	761814	195186	20 %

7.5 DIFFERANSEPLOT RIKTIGHETSSTUDIE

Tabell 31: Verdier brukt for å utarbeide et differanseplot. Differansen av %celletap er beregnet mellom hver LWA og manuell referansemetode. WBC/rør for hver prøve er beregnet ut fra celledtelling fra hematologi.

Prøve ID	LWA-1 mot manuell metode		LWA-3 mot manuell metode		LWA-2 mot manuell metode		LWA-4 mot manuell metode	
	Differanse	WBC	Differanse	WBC	Differanse	WBC	Differanse	WBC
BG5 lav	1%	136 800	-6%	136 800	-8%	136 800	-1%	136 800
BG6 lav	6%	152 800	-16%	152 800	-5%	152 800	-1%	152 800
BG7 lav	-2%	160 300	-9%	160 300	-12%	160 300	1%	160 300
BG9 lav	4%	154 700	-15%	154 700	-14%	154 700	-6%	154 700
BG-10 Lav	-4%	122 800	-8%	122 800	-15%	122 800	-14%	122 800
BG-11 lav	-3%	154 000	-7%	154 000	-13%	154 000	-3%	154 000
Bg-12 lav	10%	124 200	0%	124 200	3%	124 200	4%	124 200
BG-13 lav	-6%	142 600	-11%	142 600	-10%	142 600	-7%	142 600
BG-14 lav	-3%	156 800	-10%	156 800	-4%	156 800	-18%	156 800
BG-15 lav	4%	115 000	6%	115 000	-3%	115 000	-2%	115 000
BG2 mid	10%	417 000	-1%	417 000	-6%	417 000	10%	417 000
BG3 mid	-4%	533 000	-7%	533 000	-9%	533 000	12%	533 000
BG5 mid	-6%	684 000	-16%	684 000	-15%	684 000	-10%	684 000
BG6 mid	1%	764 000	-14%	764 000	-13%	764 000	-1%	764 000
BG7 mid	-13%	458 000	-11%	458 000	-16%	458 000	-16%	458 000
BG8 mid	6%	463 000	-11%	463 000	-6%	463 000	-6%	463 000
BG9 mid	4%	442 000	-10%	442 000	-4%	442 000	-2%	442 000
PAS1	-6%	931 000	-5%	931 000	-5%	931 000	6%	931 000
PAS2	-7%	954 000	1%	954 000	-4%	954 000	1%	954 000
PAS3	-1%	949 800	1%	949 800	-8%	949 800	-3%	949 800
PAS4	-6%	921 700	-2%	921 700	-22%	921 700	-11%	921 700
PAS5	9%	968 000	3%	968 000	1%	968 000	13%	968 000
PAS7	-1%	1 043 000	0%	1 043 000	-3%	1 043 000	2%	1 043 000
PAS8	0%	1 041 000	-2%	1 041 000	-3%	1 041 000	2%	1 041 000
PAS9	3%	957 000	-1%	957 000	-7%	957 000	-6%	957 000

7.6 REGRESJONSANALYSE RIKTIGHETSSTUDIE

Tabell 32: Regresjonsanalyse av LWA-1 og LWA-2 mot manuell metode. Regresjonsanalysen er utarbeidet fra rådata fra riktighetsstudien.

%celletap på LWA-1 og Manuell metode								
<i>Regresjonsstatistikk</i>								
Multipel R	0,740447344							
R-kvadrat	0,548262269							
Justert R-kvadrat	0,528621498							
Standardfeil	0,052883587							
Observasjoner	25							
<i>Variansanalyse</i>								
	<i>lg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>			
Regresjon	1	0,078067745	0,078	27,31449846	2,31575E-05			
Residualer	23	0,064323496	0,003					
Totalt	24	0,142391241						
	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>F-verdi</i>	<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	0,084828482	0,033540106	2,529	0,018745704	0,015445486	0,154211478	0,01544549	0,154211478
X-variabel 1	0,662492429	0,125390896	5,283	2,31575E-05	0,403101598	0,92188326	0,4031016	0,92188326
%Celletap LWA-2 og Manuell metode								
<i>Regresjonsstatistikk</i>								
Multipel R	0,797661162							
R-kvadrat	0,63626333							
Justert R-kvadrat	0,620448692							
Standardfeil	0,058291161							
Observasjoner	25							
<i>Variansanalyse</i>								
	<i>lg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>			
Regresjon	1	0,136704578	0,137	40,23255779	1,79528E-06			
Residualer	23	0,078150768	0,003					
Totalt	24	0,214855345						
	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>F-verdi</i>	<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	-0,0488563	0,036969727	-1,32	0,199323014	-0,125334007	0,027621406	-0,125334	0,027621406
X-variabel 1	0,876670982	0,138212655	6,343	1,79528E-06	0,590756321	1,162585643	0,59075632	1,162585643

Tabell 33: Regresjonsanalyse av LWA-3 og LWA-4 mot manuell metode. Regresjonsanalysen er utarbeidet fra rådata fra riktighetsstudien.

%Cellelapp mellom LWA-3 og manuell metode								
Regresjonsstatistikk								
Multipel R	0,813588059							
R-kvadrat	0,661925529							
Justert R-kvadrat	0,647226639							
Standardfeil	0,063707993							
Observasjoner	25							
Variansanalyse								
	<i>lg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>			
Regresjon	1	0,182773168	0,183	45,03234792	7,60507E-07			
Residualer	23	0,093350293	0,004					
Totalt	24	0,276123461						
	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>F-verdi</i>	<i>Nedste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedste 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	-0,063189725	0,040405218	-1,56	0,131496994	-0,146774288	0,020394837	-0,1467743	0,020394837
X-variabel 1	1,013681038	0,151056364	6,711	7,60507E-07	0,701197141	1,326164935	0,70119714	1,326164935
%cellelapp på LWA4 og manuell								
Regresjonsstatistikk								
Multipel R	0,653873799							
R-kvadrat	0,427550945							
Justert R-kvadrat	0,402661855							
Standardfeil	0,079404356							
Observasjoner	25							
Variansanalyse								
	<i>lg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>			
Regresjon	1	0,108309742	0,108	17,17824779	0,000392575			
Residualer	23	0,145016192	0,006					
Totalt	24	0,253325934						
	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>F-verdi</i>	<i>Nedste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedste 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	0,03371462	0,050360248	0,669	0,50986176	-0,070463491	0,137892731	-0,0704635	0,137892731
X-variabel 1	0,780331007	0,188273602	4,145	0,000392575	0,390857386	1,169804627	0,39085739	1,169804627

7.7 KONFIDENSINTERVALL BUFFER- OG METODEDESAMMENLIGNINGSSTUDIE

Tabell 34: 95% Konfidensintervall for %cellelapp av blodprøver for de ulike metodene og bufferene. Tabellene ble laget ved hjelp av Excel-funksjon kalt «deskriptiv statistikk» og ble brukt til å regne ut nedregrense og øvre grense. Øvre og nedre grense i konfidensintervallet ble beregnet med formel 5. Intervallbredden ble også beregnet for å sjekke av vi har et intervall mindre enn 10.

MANCV		MANVE	
Mean	0,274632319	Mean	0,24688421
Standard Error	0,022102023	Standard Error	0,01756877
Median	0,234824868	Median	0,2316092
Mode	#N/A	Mode	#N/A
Standard Deviation	0,101284195	Standard Deviation	0,08051024
Sample Variance	0,010258488	Sample Variance	0,0064819
Kurtosis	-0,524087372	Kurtosis	-0,0514311
Skewness	0,541892648	Skewness	0,77169496
Range	0,368234053	Range	0,2992447
Minimum	0,104400844	Minimum	0,13229744
Maximum	0,472634897	Maximum	0,43154213
Sum	5,767278701	Sum	5,18456832
Count	21	Count	21
Confidence Level(95,0%)	0,046104013	Confidence Level(95,0%)	0,03864782
Nedre grense	23%		21%
Øvre grense	32%		28%
Intervallbredden	9%		7%
LWA-3CW		LWA-4VB	
Gjennomsnitt	0,244330475	Gjennomsnitt	0,32672656
Standardfeil	0,023834133	Standardfeil	0,02338641
Median	0,236283209	Median	0,29748576
Modus	#N/A	Modus	#N/A
Standardavvik	0,103221719	Standardavvik	0,10716998
Utvagsvarians	0,011923384	Utvagsvarians	0,01148541
Kurtosis	-0,286637517	Kurtosis	-0,369187
Skjevhet	0,146809442	Skjevhet	0,81959745
Område	0,40954972	Område	0,35759105
Minimum	0,017855713	Minimum	0,1724817
Maksimum	0,427405433	Maksimum	0,53007275
Sum	5,130939971	Sum	6,86125772
Antall	21	Antall	21
Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,04971713	Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,04878319
Nedre grense	19%	Nedre grense	28%
Øvre grense	29%	Øvre grense	38%
Intervallbredden	10%	Intervallbredden	10%

Tabell 35: 95% Konfidensintervall for %celletapet av beinmargsprøver for de ulike metodene og bufferene. Tabellene ble laget ved hjelp av Excel-funksjon kalt «deskriptiv statistikk» og ble brukt til å regne ut nedregrense og øvre grense. Øvre og nedre grense i konfidensintervallet ble beregnet med formel 5. Intervallbredden ble også beregnet for å sjekke av vi har et intervall mindre enn 10.

LWA4VER		MAAV4VER	
Mean	0,425475593	Mean	0,439003799
Standard Error	0,022273264	Standard Error	0,022635312
Median	0,430588025	Median	0,453976038
Mode	#N/A	Mode	#N/A
Standard Deviation	0,094497454	Standard Deviation	0,096033494
Sample Variance	0,008929769	Sample Variance	0,009222432
Kurtosis	0,249925454	Kurtosis	-1,060322797
Skewness	0,592519784	Skewness	-0,037909815
Range	0,344763926	Range	0,331403912
Minimum	0,303885954	Minimum	0,278053822
Maximum	0,64864988	Maximum	0,609457734
Sum	7,658560671	Sum	7,902068383
Count	18	Count	18
Confidence Level(95,0%)	0,046992478	Confidence Level(95,0%)	0,047756333
Nedre grense	38 %	Nedre grense	39 %
Øvre grense	47 %	Øvre grense	49 %
Intervallbredde	9 %	Intervallbredde	10 %

LWA3CW		MAAV3CW	
Mean	0,397293107	Mean	0,850694451
Standard Error	0,02220532	Standard Error	0,010770439
Median	0,391413347	Median	0,841642667
Mode	#N/A	Mode	#N/A
Standard Deviation	0,094209193	Standard Deviation	0,045695104
Sample Variance	0,008875372	Sample Variance	0,002088042
Kurtosis	-0,796444123	Kurtosis	2,972382443
Skewness	-0,087706949	Skewness	1,377663769
Range	0,31280352	Range	0,194308941
Minimum	0,233894958	Minimum	0,788542199
Maximum	0,546698478	Maximum	0,98285114
Sum	7,151275919	Sum	15,31250011
Count	18	Count	18
Confidence Level(95,0%)	0,04684913	Confidence Level(95,0%)	0,02272364
Nedre grense	35 %	Nedre grense	83 %
Øvre grense	44 %	Øvre grense	87 %
Intervallbredde	9 %	Intervallbredde	5 %

Tabell 36: 95% Konfidensintervall for %celletapet av lymfeknutep prøver for de ulike metodene og bufferene. Tabellene ble laget ved hjelp av Excel-funksjon kalt «deskriptiv statistikk» og ble brukt til å regne ut nedregrense og øvre grense. Øvre og nedre grense i konfidensintervallet ble beregnet med formel 5. Intervallbredden ble også beregnet for å sjekke av vi har et intervall mindre enn 10.

LWA4VER		MAAV4VER	
Gjennomsnitt	0,511743	Mean	0,50259974
Standardfeil	0,079029	Standard Error	0,053059376
Median	0,484372	Median	0,543889269
Modus	#I/T	Mode	#I/T
Standardavvik	0,193581	Standard Deviation	0,129968397
Utvagsvarians	0,037474	Sample Variance	0,016891784
Kurtosis	0,332854	Kurtosis	-1,874788061
Skjevhet	0,808309	Skewness	-0,521087839
Område	0,534065	Range	0,307078639
Minimum	0,296169	Minimum	0,339476
Maksimum	0,830234	Maximum	0,646654639
Sum	3,070459	Sum	3,015698442
Antall	6	Count	6
Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,203151	Confidence Level(95,0%)	0,136393468
Nedre grense	31 %	Nedre grense	37 %
Øvre grense	71 %	Øvre grense	64 %
Intervallbredde	41 %	Intervallbredde	27 %

LWA3CW		MAAV3CW	
Gjennomsnitt	0,640052	Mean	0,934975181
Standardfeil	0,057842	Standard Error	0,02394736
Median	0,623103	Median	0,96263719
Modus	#I/T	Mode	#I/T
Standardavvik	0,141684	Standard Deviation	0,058658813
Utvagsvarians	0,020074	Sample Variance	0,003440856
Kurtosis	-1,964297	Kurtosis	-1,419116906
Skjevhet	0,274426	Skewness	-0,910104985
Område	0,337348	Range	0,136844114
Minimum	0,486244	Minimum	0,84815619
Maksimum	0,823593	Maximum	0,985000304
Sum	3,840312	Sum	5,609851088
Antall	6	Count	6
Konfidenskoeffisient(95,0%)	0,148689	Confidence Level(95,0%)	0,061558649
Nedre grense	49 %	Nedre grense	87 %
Øvre grense	79 %	Øvre grense	100 %
Intervallbredde	30 %	Intervallbredde	12 %

Tabell 37: 95% konfidensintervall av resultater fra lymfocytelling av blodprøver. Tabellene ble laget ved hjelp av Excel-funksjon kalt «deskriptiv statistikk» og ble brukt til å regne ut nedregrense og øvre grense. Øvre og nedre grense i konfidensintervallet ble beregnet med formel 5. Intervallbredden ble også beregnet for å sjekke av vi har et intervall mindre enn 10.

LWA4 VB		MAN VB	
Mean	0,315826885	Mean	0,21767241
Standard Error	0,021242409	Standard Error	0,02695707
Median	0,295100209	Median	0,23616437
Mode	#N/A	Mode	#N/A
Standard Deviation	0,067174396	Standard Deviation	0,08524573
Sample Variance	0,004512399	Sample Variance	0,00726684
Kurtosis	-1,352720983	Kurtosis	0,03850687
Skewness	0,582756078	Skewness	-0,3142484
Flange	0,173690703	Flange	0,2900038
Minimum	0,239045578	Minimum	0,0605135
Maximum	0,412736681	Maximum	0,3905173
Sum	3,15826885	Sum	2,17672411
Count	10	Count	10
Confidence Level(95,0%)	0,048053668	Confidence Level(95,0%)	0,06098112
Øvre grense	36 %	Øvre grense	28 %
Nedre grense	27 %	Nedre grense	16 %
Intervallbredden	10 %	Intervallbredden	12 %

LWA3 CW		MAN CW	
Mean	0,270199627	Mean	0,26867136
Standard Error	0,022724998	Standard Error	0,0323553
Median	0,238458064	Median	0,23512365
Mode	#N/A	Mode	#N/A
Standard Deviation	0,071862752	Standard Deviation	0,10231644
Sample Variance	0,005164255	Sample Variance	0,01046865
Kurtosis	1,39873466	Kurtosis	1,93532874
Skewness	1,535290669	Skewness	1,48054101
Flange	0,218570015	Flange	0,34722855
Minimum	0,205090247	Minimum	0,14791569
Maximum	0,423660262	Maximum	0,49514424
Sum	2,701996266	Sum	2,68671357
Count	10	Count	10
Confidence Level(95,0%)	0,051407516	Confidence Level(95,0%)	0,07319277
Øvre grense	32 %	Øvre grense	34 %
Nedre grense	22 %	Nedre grense	20 %
Intervallbredden	10 %	Intervallbredden	15 %

7.8 RESULTATER FRA BUFFER- OG METODESAMMENLIGNING

Tabell 38: Resultater fra blodprøver opparbeidet med vaskebuffer på LWA-4 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien. Det ble brukt blod fra både blodgivere og pasienter.

Prøve-ID	WBCrør	LWA4-VB					MAN-VB				
		Sluttvolum (ul)	WBCrør etter vask	WBC flowcytometer	Cellletap	%cellletap	Sluttvolum (ul)	WBCrør etter vask	WBC Fra flowcytometer	Cellletap	%cellletap
BG-1	331000	370	253749	82297	137251	35 %	410	319479	93506	71521	18 %
BG-2	316000	390	221995	68306	94006	30 %	410	257760	75442	58240	18 %
BG-3	536000	390	415415	127820	120585	22 %	420	373538	106725	162463	30 %
BG-4	390000	400	303320	90996	86680	22 %	440	338404	92292	51596	13 %
BG-6	501000	400	414587	124376	86413	17 %	430	422178	117817	78822	16 %
BG-7	530000	390	405080	124640	124920	24 %	440	394717	107650	135283	26 %
BG-8	389000	390	293326	90254	95675	25 %	430	301344	84096	87656	23 %
BG-9	486000	400	354617	106385	131383	27 %	430	365117	101893	120883	25 %
BG-10	484000	390	316189	97289	167811	35 %	430	392547	109548	91453	19 %
PAS-16F	679000	390	504702	155293	174298	26 %	400	482217	144665	196783	29 %
PAS-2 6F	754000	410	499653	146240	254347	34 %	400	579367	173810	174633	23 %
PAS-3 6F	741000	399	539508	162258	201492	27 %	410	584257	171002	156743	21 %
PAS-4 CD45	408000	410	284205	83182	123795	30 %	430	341954	95429	66046	16 %
PAS-5 CD45	963600	390	728159	229945	235441	24 %	430	805057	224667	159543	16 %
PAS-6 CD45	720000	400	527710	158313	192290	27 %	430	538819	150368	181181	25 %
PAS-7 CD45	630000	410	296054	86550	333946	53 %	430	492038	137313	137962	22 %
PAS-8 CD45	690000	410	441420	129196	248580	36 %	420	445491	127283	244510	35 %
PAS-9 CD45	1008000	390	544733	167610	463268	46 %	430	623228	173924	384772	38 %
PAS-11 CD45	920000	410	537520	157323	382480	42 %	420	685297	195799	234704	26 %
PAS-12 CD45	1246000	410	599755	175538	646245	52 %	420	708299	202371	537702	43 %
PAS-13 CD45	860000	410	404848	118492	455152	53 %	430	555886	155131	304114	35 %

Tabell 39: Resultater fra blodprøver opparbeidet med CellWash på LWA-3 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien. Det ble brukt blod fra både blodgivere og pasienter.

Prøve-ID	LWA3-CW							MAN-CW				
	WBCrør	Sluttvolum (ul)	WBCrør etter vask	WBC Fra flowcytometer	Cell etap	%cell etap	sluttvolum	WBCrør etter	WBC (Fra flowcytometer)	Cell etap	%Cell etap	
BG-1	391000	390	323534	99549	67466	17 %	410	327101	95737	63899	16 %	
BG-2	316000	390	260267	80082	55734	18 %	410	283009	82832	32991	10 %	
BG-3	536000	390	458341	141028	77659	14 %	410	456166	133512	79834	15 %	
BG-4	390000	310	304593	117907	85407	22 %	440	304920	83160	85080	22 %	
BG-6	501000	320	437000	163875	64000	13 %	430	264210	73733	236790	47 %	
BG-7	530000	300	394718	157887	135283	26 %	440	414245	112976	115755	22 %	
BG-8	389000	320	261957	98234	127043	33 %	440	238322	64997	150678	39 %	
BG-9	486000	300	349253	139701	136748	28 %	440	387405	105656	98595	20 %	
BG-10	484000	330	357187	129886	126914	26 %	430	376436	105052	107564	22 %	
PAS-1 6F	679000	320	541280	202980	137720	20 %	410	478614	140082	200387	30 %	
PAS-2 6F	754000	310	533197	206399	228003	29 %	420	435197	124342	318803	42 %	
PAS-3 6F	741000	310	727769	281717	13231	2 %	410	570290	166914	170711	23 %	
PAS-4 CD45	408000	310	233619	90433	174381	43 %	410	319441	93495	88559	22 %	
PAS-5 CD45	963600	300	735918	294367	227683	24 %	400	711520	213456	252080	26 %	
PAS-6 CD45	720000	420	577973	165135	142028	20 %	430	561390	156667	158610	22 %	
PAS-7 CD45	630000	420	459841	131383	170160	27 %	440	482060	131471	147940	23 %	
PAS-8 CD45	690000	450	607628	162034	82373	12 %	450	471589	125757	218411	32 %	
PAS-9 CD45	1008000	390	589362	181342	418639	42 %	430	590766	164865	417234	41 %	
PAS-11 CD45	920000	430	763289	213011	166711	17 %	430	667045	186152	252955	27 %	
PAS-12 CD45	1246000	420	717500	205000	528500	42 %	420	696455	198987	549546	44 %	
PAS-13 CD45	860000	410	523382	153185	336618	39 %	420	601731	171923	258270	30 %	

Tabell 40: Resultater fra beinmargsprøver opparbeidet med vaskebuffer på LWA-4 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien.

Prøve-ID	WBCrør	LWA4-VB					MAN-VB				
		Sluttvolum (ul)	WBCrør etter vask	WBC flowcytometer	Cell etap	%cell etap	Sluttvolum (ul)	WBCrør etter vask	WBC flowcytometer	Cell etap	%cell etap
BM-1 6F	970600	370	517312	167777	453288	47 %	410	467513	136833	503087	52 %
BM-2 6F	952000	370	528527	171414	423474	44 %	410	413892	121139	538108	57 %
BM-7 6F	977500	380	674491	212997	303010	31 %	440	636761	173662	340739	35 %
BM-3 CD45	988000	410	538576	157632	449424	45 %	420	478475	136707	509526	52 %
BM-4 CD45	1000000	410	495000	144878	505000	51 %	420	538829	153951	461172	46 %
BM-5 CD45	990000	410	656010	192003	333990	34 %	410	625465	183063	364535	37 %
BM-6 CD45	985000	410	561977	164481	423023	43 %	410	594357	173958	390644	40 %
BM-9 CD45	342000	410	207723	60797	134277	39 %	410	229197	67082	112803	33 %
BM-10 CD45	833000	410	579863	169716	253137	30 %	410	601381	176014	231619	28 %
BM-11 CD45	917300	370	622294	201825	295006	32 %	420	637018	182005	280283	31 %
BM-12 CD45	804000	410	463877	135769	340123	42 %	430	444788	124127	359212	45 %
BM-13 CD45	804000	390	456905	140586	347096	43 %	490	377590	92471	426410	53 %
BM-15 CD45	1390000	400	488377	146513	901623	65 %	450	542854	144761	847146	61 %
BM-16 CD45	1020000	380	510017	161058	509983	50 %	450	501424	133773	518576	51 %
BM-17 CD45	740000	400	325060	97518	414940	56 %	430	364382	101688	375618	51 %
BM-18 CD45	1075000	390	740051	227708	334949	31 %	400	642450	192735	432550	40 %
BM-19 CD45	983500	380	642248	202815	341253	35 %	410	634085	188220	340415	35 %
BM-20 CD45	909000	400	482460	144738	426540	47 %	410	487507	142685	421493	46 %

Tabell 41: Resultater fra beinmargsprøver opparbeidet med CellWash på LWA-3 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien.

Prøve-ID	WBCrør	LWA3-CW					MAN-CW				
		Sluttvolum (ul)	WBCrør etter vask	WBC flowcytometer	Cell etap	%cell etap	sluttvolum (ul)	WBCrør etter	WBC flowcytometer	Cell etap	%cell etap
BM-1 6F	970600	400	602393	180718	368207	38 %	390	549663	169127	801473	83 %
BM-2 6F	952000	390	540924	166438	410777	43 %	410	511150	149605	802395	84 %
BM-7 6F	977500	400	715633	214690	261867	27 %	400	689000	206700	770800	79 %
BM-3 CD45	988000	410	468722	137187	519278	53 %	420	456799	130514	857486	87 %
BM-4 CD45	1000000	420	642523	183578	357477	36 %	390	580395	178583	821417	82 %
BM-5 CD45	990000	410	611399	178946	378601	38 %	410	655884	191966	798034	81 %
BM-6 CD45	985000	410	618721	181089	366279	37 %	410	578455	169304	815696	83 %
BM-9 CD45	342000	410	205485	60142	136516	40 %	410	221462	64818	277182	81 %
BM-10 CD45	833000	420	638166	182333	194835	23 %	410	488077	14285	818715	98 %
BM-11 CD45	917300	360	648525	216175	268775	29 %	430	437493	122091	795209	87 %
BM-12 CD45	804000	410	478702	140108	325298	40 %	430	410414	114534	689466	86 %
BM-13 CD45	804000	390	396162	121896	407838	51 %	480	357384	89346	714654	89 %
BM-15 CD45	1390000	440	694335	189364	695665	50 %	440	555273	151438	1238562	89 %
BM-16 CD45	1020000	410	624150	182678	395850	39 %	440	383896	104699	915301	90 %
BM-17 CD45	740000	430	364780	101799	375220	51 %	420	366314	104661	635339	86 %
BM-18 CD45	1075000	410	650656	190436	424344	39 %	400	595157	178547	896453	83 %
BM-19 CD45	983500	400	727900	218370	255600	26 %	410	659069	192898	790602	80 %
BM-20 CD45	909000	430	412051,0833	114991	496949	55 %	420	507661	145046	763954	84 %

Tabell 42: Resultater fra lymfeknuter opparbeidet med vaskebuffer på LWA-4 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien.

Prøve-ID	WBC/rør	LWA4-VB					MAN-VB				
		Sluttvolum (ul)	WBC/rør etter vas	WBC flowcytometer	Cell etap	%Cell etap	Sluttvolum	WBC/rør etts	WBC flowcytometer	Cell etap	%Cell etap
LK-1 6F	685176	410	334796	97989	350381	51 %	400	335267	100580	349910	51 %
LK-2 6F	821400	390	442793	136244	378607	46 %	410	347376	101671	474024	58 %
LK-3 6F	875000	400	564620	169386	310380	35 %	420	577959	165131	297042	34 %
LK-4 CD45	994000	370	168748	54729	825252	83 %	390	405207	124679	588793	59 %
LK-5 CD45	884000	390	622187	191442	261814	30 %	410	575093	168320	308907	35 %
LK-6 CD45	970000	410	368026	107715	601974	62 %	410	342842	100344	627158	65 %

Tabell 43: Resultater fra lymfeknuter opparbeidet med CellWash på LWA-3 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien.

Prøve-ID	WBC/rør	LWA3-CW						MAN-CW					
		sluttvolum (ut)	WBC/rør etter vask	WBC flowcyt	Cellletap	% Cellletap	sluttvolum (ut)	WBC/rør etter vask	WBC flowcyt	Cellletap	% Cellletap		
LK-1 6F	685176	400	286773	86032	398403	58 %	410	85871	25133	599305	87 %		
LK-2 6F	821400	390	179283	55164	642117	78 %	390	12321	3791	809079	99 %		
LK-3 6F	875000	400	435283	130585	439717	50 %	400	132863	39859	742137	85 %		
LK-4 CD45	994000	310	333242	128997	660758	66 %	390	25968	7990	968033	97 %		
LK-5 CD45	884000	400	454160	136248	429840	49 %	420	20556	5873	863445	98 %		
LK-6 CD45	970000	420	171115	48890	798885	82 %	400	47143	14143	922857	95 %		

7.9 RESULTATER LYMFOCYTT

Tabell 44: Resultater fra lymfocytter opparbeidet med vaskebuffer på LWA-4 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien.

Prøve-ID	WBC/rør	LWA-4 VB						MAN VB					
		sluttvolum	Lymfocytt flowcytometer	Lymfo/rør etter vask	Cellletap	%cellletap	sluttvolum	Lymfocytt flowcytometer	Lymfo/rør etter vask	Cellletap	%cellletap		
PAS 3	741000	102999	400	18195	60650	42 %	410	20783	71009	31990	31 %		
PAS 4	408000	55080	410	12159	41543	25 %	430	14441	51747	3333	6 %		
BG 1	391000	122774	370	23384	72101	41 %	410	29410	100484	22290	18 %		
BG 2	316000	127980	390	26690	86743	32 %	410	28706	98079	29901	23 %		
BG 3	536000	176880	390	38621	125518	29 %	420	32823	114881	62000	35 %		
BG 4	390000	98670	400	22525	75083	24 %	440	23296	85419	13251	13 %		
BG 7	530000	134620	390	30417	98855	27 %	440	27064	99235	35385	26 %		
BG 8	389000	154044	390	34304	111488	28 %	430	32728	117275	36769	24 %		
BG 9	486000	175932	400	36955	123183	30 %	430	37296	133644	42288	24 %		
BG 10	484000	173756	390	32334	105086	40 %	430	40552	145311	28445	16 %		

Tabell 45: Resultater fra lymfocytter opparbeidet med Cellwash på LWA-3 og manuell metode i buffer- og metodesammenligningsstudien.

Prøve-ID	WBC/rør	LWA3 CW						MAN CW					
		sluttvolum	Lymfocytt flowcytometer	Lymfo/rør etter vask	Cellletap	%cellletap	sluttvolum	Lymfocytt flowcytometer	Lymfo/rør etter vask	Cellletap	%cellletap		
PAS 3	741000	102999	310	22979	59362	42 %	410	18161	62050	40949	40 %		
PAS 4	408000	55080	310	16275	42044	24 %	410	12822	43809	11272	20 %		
BG 1	391000	122774	390	30029	97594	21 %	410	27722	94717	28057	23 %		
BG 2	316000	127980	390	30751	99941	22 %	410	31917	109050	18930	15 %		
BG 3	536000	176880	390	42203	137160	22 %	410	39071	133493	43387	25 %		
BG 4	390000	98670	310	29019	74966	24 %	440	20464	75035	23635	24 %		
BG 7	530000	134620	300	38937	97343	28 %	440	26316	96492	38128	28 %		
BG 8	389000	154044	320	36192	96512	37 %	440	21210	77770	76274	50 %		
BG 9	486000	175932	300	51548	128870	27 %	440	37706	138255	37677	21 %		
BG 10	484000	173756	330	48349	132960	23 %	430	37303	133669	40087	23 %		

7.10 CELLETAP AV LYMFOCYTT-SUBPOPULASJONER

Tabell 46: Resultater for de ulike lymfocytt-subpopulasjonene. Resultatene er hentet fra flowcytometeret og viser den relative fordelingen av de ulike lymfocytt-subpopulasjoner for tre blodgivere som er merket med 6 farge antistoff.

Prøve-ID	LWA4 VB				MAN VB			
	CD3+	CD19+	CD16+CD56+	CD4+/CD8+ ratio	CD3+	CD19+	CD16+CD56+	CD4+/CD8+ ratio
BG-1	78 %	12 %	10 %	3,1	78 %	12 %	10 %	2,9
BG-2	70 %	13 %	17 %	2,0	68 %	13 %	18 %	2,0
BG-3	85 %	6 %	9 %	2,4	84 %	6 %	9 %	2,3
	77 %	10 %	12 %	2,5	77 %	11 %	12 %	2,4

Prøve-ID	LWA3 CW				MAN CW			
	CD3+	CD19+	CD16+CD56+	CD4+/CD8+ ratio	CD3+	CD19+	CD16+CD56+	CD4+/CD8+ ratio
BG-1	78 %	12 %	10 %	2,8	78 %	12 %	9 %	3,0
BG-2	69 %	13 %	18 %	2,0	68 %	13 %	18 %	2,0
BG-3	84 %	7 %	9 %	2,4	84 %	6 %	9 %	2,2
	77 %	11 %	12 %	2,4	77 %	11 %	12 %	2,4

Tabell 47: Referanseverdi og referanseområde for lymfocytt subpopulasjoner i blod. (Comans-Bitter et al., 1997)

Table I. Relative size of lymphocyte subpopulations in blood

Lymphocyte subpopulations	Age groups									
	Neonatal (n = 20)	1 wk-2 mo (n = 13)	2-5 mo (n = 46)	5-9 mo (n = 105)	9-15 mo (n = 70)	15-24 mo (n = 33)	2-5 yr (n = 33)	5-10 yr (n = 35)	10-16 yr (n = 23)	Adults (n = 51)
CD19 ⁺ B lymphocytes	12% (5-22)	15% (4-26)	24% (14-39)	21% (13-35)	25% (15-39)	28% (17-41)	24% (14-44)	18% (10-31)	16% (8-24)	12% (6-19)
CD3 ⁺ T lymphocytes	62% (28-76)	72% (60-85)	63% (48-75)	66% (50-77)	65% (54-76)	64% (39-73)	64% (43-76)	69% (55-78)	67% (52-78)	72% (55-83)
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ T lymphocytes	41% (17-52)	55% (41-68)	45% (33-58)	45% (33-58)	44% (31-54)	41% (25-50)	37% (23-48)	35% (27-53)	39% (25-48)	44% (28-57)
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ T lymphocytes	24% (10-41)	16% (9-23)	17% (11-25)	18% (13-26)	18% (12-28)	20% (11-32)	24% (14-33)	28% (19-34)	23% (9-35)	24% (10-39)
CD4/CD8 ratio per CD3 ⁺	1.8 (1.0-2.6)	3.8 (1.3-6.3)	2.7 (1.7-3.9)	2.5 (1.6-3.8)	2.4 (1.3-3.9)	1.9 (0.9-3.7)	1.6 (0.9-2.9)	1.2 (0.9-2.6)	1.7 (0.9-3.4)	1.9 (1.0-3.6)
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺ T lymphocytes	2% (1-6)	5% (1-38)	3% (1-9)	3% (1-7)	4% (2-8)	6% (3-12)	6% (3-13)	7% (3-14)	4% (1-8)	5% (2-12)
CD3 ⁻ /CD16-56 ⁺ NK cells	20% (6-58)	8% (3-23)	6% (2-14)	5% (2-13)	7% (3-17)	8% (3-16)	10% (4-23)	12% (4-26)	15% (6-27)	13% (7-31)

The relative frequencies are expressed within the lymphocyte population: median and percentiles (5th to 95th percentiles).

7.11 LWA-ER

Tabell 48: Registreringsnummer og leveringsdato for ulike LWA-er

	LWA-1	LWA-2	LWA-3	LWA-4
Reg.nr	75570	46046	72838	73012
Levert	26/08-2019	23/11-2010	31/08-2018	17/01-2019

