

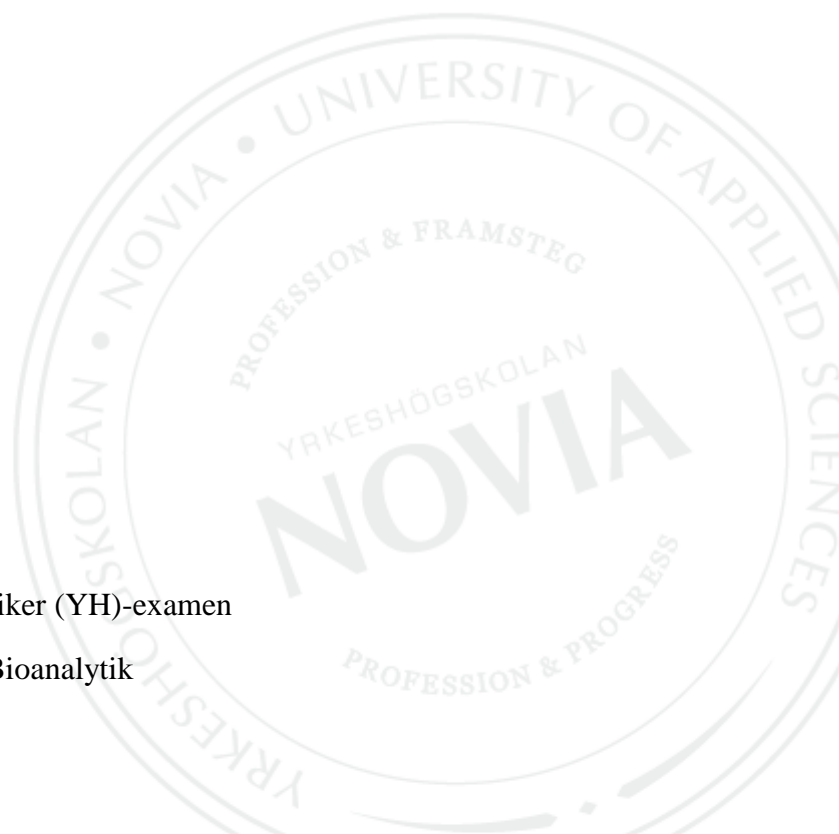
Validering av likvorbilirubinanalys för undersökning av subaraknoidalblödning på Roche Cobas 6000

Hannah Åbacka

Examensarbete för Bioanalytiker (YH)-examen

Utbildningsprogrammet för Bioanalytiker

Vasa 2013



EXAMENSARBETE

Författare: Hannah Åbacka

Utbildningsprogram och ort: Bioanalytik, Vasa

Handledare: Camilla Ribacka, Jukka Salminen & Diana Kujala

Titel: Validering av likvorbilirubinanalys för undersökning av subaraknoidalblödning på Roche Cobas 6000

Datum: 6.11.2013

Sidantal: 35

Bilagor: 2

Abstrakt

Bilirubin uppkommer i cerebrospinalvätska som en nedbrytningsprodukt av hemoglobin när erythrocyter i det subaraknoidala rummet lyserar. Bestämning av bilirubinkoncentration i cerebrospinalvätska kan påvisa eller utesluta subaraknoidalblödning. För analysering av bilirubin i cerebrospinalvätska räknas den spektrofotometriska metoden som referensmetod. Den är dock tidskrävande och fordrar att provresultaten tolkas av en specialist.

Syftet med detta examensarbete var att validera en metod för mätning av bilirubinkoncentration i cerebrospinalvätska på Roche Cobas 6000. Som undersökningsmetod användes Roches plasma- och serumbilirubinmetod. Undersökningsmetoden modifierades för att den skulle fungera vid bilirubinanalys i cerebrospinalvätska genom sänkning av mätområde och höjning av provvolym. Metodens precision jämfördes med en spektrofotometrisk analysmetod. Även metodens känslighet och påverkan av hemoglobininterferens undersöktes.

En god korrelation fanns mellan Roche Cobas 6000 och den spektrofotometriska metoden. Metoden gav bättre resultat vid högre bilirubinkoncentrationer, men värdena varierade inte signifikant vid lägre koncentrationer. En liten höjning av bilirubinkoncentration syntes vid ett högt hemoglobinvärde när nivåerna av bilirubin var hög. Ingen bestämning av referensintervall eller gränsvärde för undersökningen har gjorts i denna studie.

Språk: Svenska Nyckelord: bilirubin, cerebrospinalvätska, likvor,
subaraknoidalblödning, Roche Cobas 6000

BACHELOR'S THESIS

Author: Hannah Åbacka

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science, Vaasa

Supervisors: Camilla Ribacka, Jukka Salminen & Diana Kujala

Title: Validation of an analysis on cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage on Roche Cobas 6000

Date: 6.11.2013

Number of pages: 35

Appendices: 2

Summary

Bilirubin appears in cerebrospinal fluid as a haemoglobin breakdown product when erythrocytes lyse in the subarachnoid space. The determination of bilirubin concentration in cerebrospinal fluid can prove or exclude subarachnoid haemorrhage. A spectrophotometric examination is considered to be of golden standard regarding the analysis of bilirubin in subarachnoid fluid. It is, however, time-consuming and requires specialist interpretation.

The purpose of this thesis was to validate a method for the measurement of bilirubin concentration in cerebrospinal fluid on Roche Cobas 6000. Roche routine serum and plasma bilirubin assay was used as examination method. The method was modified to suit a bilirubin analysis of cerebrospinal fluid by lowering the measurement range and increasing the sample volume. The precision of the method was compared to a spectrophotometric assay. The sensitivity and influence of haemoglobin interference was also investigated.

A good correlation was found between Roche Cobas 6000 and the spectrophotometric method. The method gave better results at higher bilirubin concentrations, but the values did not vary significantly at lower concentrations. A small increase in bilirubin concentration was seen at a high haemoglobin value when the levels of bilirubin were high. No determination of the reference range or cut-off value for the analysis has been done in this study.

Language: Swedish Key words: bilirubin, cerebrospinal fluid,
subarachnoid haemorrhage, Roche Cobas 6000

Innehållsförteckning

1 Inledning.....	1
2 Syfte och frågeställningar.....	2
3 Teoretisk bakgrund.....	3
3.1 Hjärnan.....	3
3.1.1 Blodflödet till hjärnan.....	3
3.1.2 Hjärn- och ryggmärgshinnorna.....	4
3.1.3 Cerebrospinalvätska.....	4
3.2 Erytrocyten och dess pigment.....	5
3.2.1 Erytrocyten.....	5
3.2.2 Hemoglobin.....	6
3.2.3 Bilirubin.....	7
3.3 Subaraknoidalblödning.....	8
3.3.1 Analyser vid misstänkt subaraknoidalblödning.....	9
3.3.2 Lumbalpunktion.....	10
3.4 Cobas 6000.....	11
3.4.1 Fotometrisk metod på Cobas 6000.....	12
3.4.2 BILT3.....	13
4 Tidigare forskning.....	15
5 Undersökningens genomförande.....	16
5.1 Material.....	17
5.1.1 Biologiskt material.....	17
5.1.2 Reagenser.....	17
5.1.3 Analysatorer.....	18
5.2 Metoder.....	18
5.2.1 Korrelations- och regressionanalys.....	18
5.2.2 Kontroll av Shimadzus tillförlitlighet.....	19
5.2.3 Validering av likvorbilirubinmetoden på Cobas 6000.....	20
6 Resultat och tolkning.....	23
6.1 Shimadzus tillförlitlighet.....	24
6.2 Likvorbilirubinmetoden på Cobas 6000.....	24
6.2.1 Metodens tillförlitlighet.....	25
6.2.2 Metodens känslighet.....	26
6.2.3 Hemoglobininterferens.....	28
7 Kritisk granskning och diskussion.....	29
Litteraturförteckning.....	33
Bilagor	

1 Inledning

Finland ligger på delad förstaplats tillsammans med Japan över de länder där befolkningen procentuellt drabbas av flest subaraknoidalblödningar (Koivisto, m.fl. 2008, s. 383). För att snabbt kunna ge patienter rätt vård och för att förhindra återblödningar med hög mortalitet bör rätt diagnos ställas så fort som möjligt (Beetham 2009, s. 2).

Vid subaraknoidalblödning görs inledningsvis en datortomografi av huvudet men i de fall den inte påvisar blödning krävs ytterligare analyser som underlag för diagnostisering. Den undersökningsmetod för subaraknoidalblödning som idag anses vara mest fördelaktig är spektrofotometermetoden där man undersöker om hemoglobinet nedbrytningsprodukt bilirubin har orsakat xantokromi av likvor. (Beetham 2009, s. 2-3).

Till undersökningen av subaraknoidalblödning på Vasa Centralsjukhus kliniska laboratorium används en spektrofotometrisk metod med analysatorn Shimadzu UV-1700. Nackdelen med den spektrofotometriska metoden är att den tar lång tid att utföra samt att den kräver att testresultaten kontrolleras manuellt av en specialist eftersom analyseringen av resultaten är komplicerad (Beetham 2009, s. 3).

I detta arbete visas en metod för analysen av bilirubinkoncentration i cerebrospinalvätska på en kemianalysator. Metoden gjordes på Roche Cobas 6000. Som undersökningsmetod används en modifierad version av plasma- och serumbilirubinundersökningen. Studiens uppgift var att finna en metod som motsvarar spektrofotometrianalysatorns pålitlighet men som kan utföras dygnet runt utan att en specialist är på plats.

Analysen är gjord på kvantitativa statistiska undersökningar. I den första delen av undersökningens genomförande kontrolleras spektrofotometerns riktighet. Därefter utvecklas den nya metoden på Cobas 6000 och jämförs mot spektrofotometern för att motsvara dess värden. Metodens precision och känslighet kontrolleras samt om testresultaten påverkas av hemoglobin.

Arbetet är ett beställningsarbete av kemist Jukka Salminen vid Vasa Centralsjukhus. Den praktiska undersökningen utfördes på Vasa Centralsjukhus kliniska laboratorium. Som handledare på plats var kemist Diana Kujala.

2 Syfte och frågeställningar

Syftet med studien är att validera en undersökningsmetod på Roche Cobas 6000 för mätning av bilirubinhalten i cerebrospinalvätska. Likvorbilirubinanalysen kunde bestämma eller avfärda diagnosen subaraknoidalblödning hos patienter med negativ datortomografi. Metoden skall motsvara den spektrofotometriska metod som använts hittills men inte vara lika omfattande.

Analysmetoden på Cobas 6000 skall anordnas så att dess testresultat överensstämmer med värden från spektrofotometern Shimadzu UV-1700. Därför skall en delundersökning göras av spektrofotometerns tillförlitlighet innan undersökningsvalideringen på Cobas 6000 påbörjas.

Till uppgiften hör att hitta reagenser som kan användas vid likvorbilirubinundersökningen samt att finna en lämplig kalibrationsmetod. Därefter skall metodens riktighet och sensitivitet undersökas så att provresultaten blir korrekta. Ett passande gränsvärde för när en patient drabbats av subaraknoidalblödning skall ställas så att största möjliga patientmängd med blödning kan diagnosticeras och minsta mängd får ett falskt positivt eller falskt negativt testsvar.

Den nya metoden skall gärna vara mindre tids- och arbetskrävande och inte fordra specialistbedömning så att laboratoriepersonal lättare skall kunna utföra analysen dygnet runt. Avsikten är att hitta och kontrollera en metod som i framtiden kunde ersätta den spektrofotometriska metoden.

Frågeställningar för examensarbetet är: Hur skall likvorbilirubinanalysen utföras på Roche Cobas 6000 för att testresultatet skall bli så tillförlitligt som möjligt? Vad är ett passande gränsvärde för när ett prov är positivt eller negativt?

3 Teoretisk bakgrund

För att ge en bättre förståelse för subaraknoidalblödning och analysen av bilirubin i cerebrospinalvätska presenteras i detta avsnitt en koncentrerad teoretisk bakgrund. Innehållet förklarar var och hur blödningen uppstår samt ger information om analysmetoder och substanser som ingår i analyserna. Slutligen följer en beskrivning av analysatorn Cobas 6000 och den undersökningsmetod som användes i studien.

3.1 Hjärnan

I detta kapitel redogörs för de delar av hjärnans anatomi som är väsentliga vid subaraknoidalblödning. Dessa är hjärnans artärer, hjärn- och ryggmärgshinnorna samt cerebrospinalvätskan.

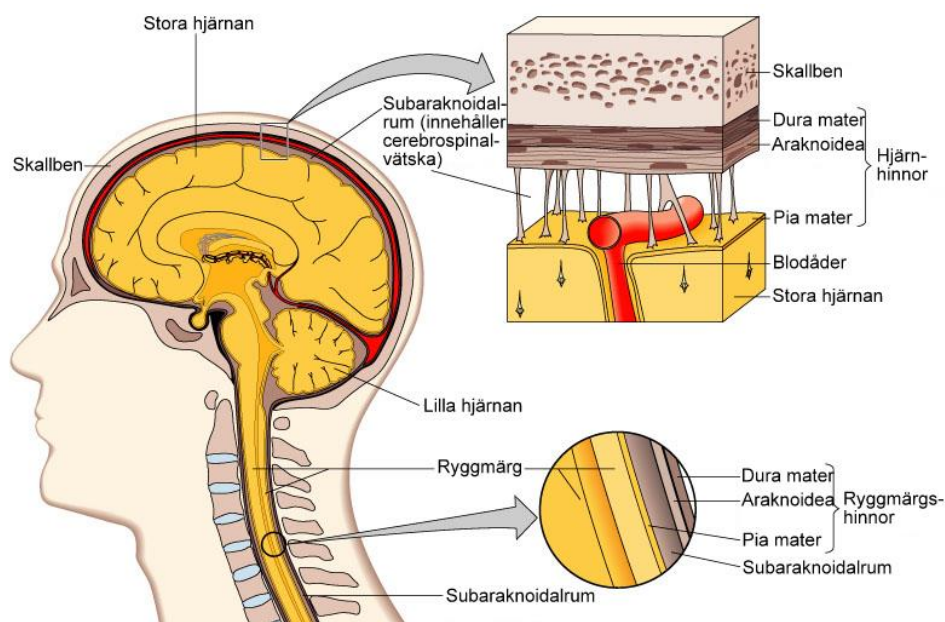
3.1.1 Blodflödet till hjärnan

Hjärnan står för 25 % av kroppens glukosanvändning och 20 % av dess syrekonsumtion. Blodflödet till hjärnan är knappt en liter per minut. Om flödet sjunker med mera än hälften uppkommer störningar i kalium- och kalciumflödena samt underskott på fosfatföreningar. Om blodflödet sjunker ytterligare blir hjärncellerna nekrotiska. (Terént 2009, s. 270). Redan efter tio minuter uppstår oreparerbara skador (Carter, Aldridge, Page & Parker 2009, s. 45).

Blodflödet till hjärnhemisfärerna i stora hjärnan sker främst via tre par artärgrenar som förgrenar sig över hjärnytan. Dessa är arteria cerebri anterior, media och posterior. Andra grundläggande delar av stora hjärnan har syretillförsel från förgreningar med ursprung i arteria carotis interna. Från vertebralartärerna bildas arteria basilaris vars utbredning ger blodtillflöde åt lilla hjärnan och hjärnstammen. De yttersta delarna av hemisfärerna har ett tätt nät av kollateralkärl. Längre in i stora hjärnan och hjärnstammen finns tunna ändartärer. (Terént 2009, s. 269).

3.1.2 Hjärn- och ryggmärgshinnorna

Hjärnan och ryggmärgen omges av tre bindvävshinnor (fig. 1). Dessa är hårda hjärnhinnan (dura mater), spindelvävshinnan (araknoidea) och kärlhinnan (pia mater). Dura mater är skarp och ligger ytterst. Den följer hjärnhemisfärerna, hjärnytans största fåror och ligger mot skallbenets insida. Mellan dura mater och ryggradskanalen finns ett hålrum som kallas epiduralrummet. Innanför den hårda hjärnhinnan är araknoidea belägen. Mellan den och pia mater, som täcker hjärnans och ryggmärgens yta, finns subaraknoidalrummet. I subaraknoidalrummet ligger araknoideas bindvävsfibrer i ett fint mönster. Det är fyllt med cerebrospinalvätska som skyddar centrala nervsystemet mot stötar. (Sand, Sjaastad, Haug & Bjålie 2007, s. 115-116).



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figur 1. Schematisk bild av hjärn- och ryggmärgshinnornas placering. (Editerad från: FitzGordon 2012).

3.1.3 Cerebrospinalvätska

Cerebrospinalvätska, som även kallas likvor, finns i hjärnventriklarna och subaraknoidalrummet. Vätskan har till uppgift att omge och skydda hjärnan samt ryggmärgen från stötar. Den avlägsnar även restprodukter från hjärnans metabolism som

till exempel laktat och koldioxid. När hjärnan omsluts av likvor väger den mycket mindre än vad den skulle göra i luft. (Blennow & Zetterberg 2012, s. 555).

Det bildas 500-600 mL likvor per dag. Den produceras mestadels i plexus choroideus medan 30 % härstammar från hjärnparenkymet. Plexus choroideus är ett kärlnystan som filtrerar blodplasma. Vätskan flödar från sidoventriklarna till tredje och fjärde ventrikeln och utmynnar slutligen i subaraknoidalrummet. Från subaraknoidalrummet rinner en del av cerebrospinalvätskan till ryggmärgskanalen medan största delen strömmar genom stora hjärnhemisfärerna mot araknoidalvilli. I araknoidalvilli återabsorberas cerebrospinalvätskan till blodflödet. (Blennow & Zetterberg 2012, s. 555).

3.2 Erythrocyten och dess pigment

Erythrocyter finns normalt inte i likvor. Förekomsten av erythrocyter kan bero på intrakraniell blödning, vanligen subaraknoidalblödning. (Blennow & Zetterberg 2012, s. 558). I detta arbete har bilirubin en stor betydelse vid analysen av subaraknoidalblödning. Bilirubin bildas från hemgruppen som finns i erythrocyternas hemoglobin (Higgins, Beutler & Doumas 2008, s. 520-521).

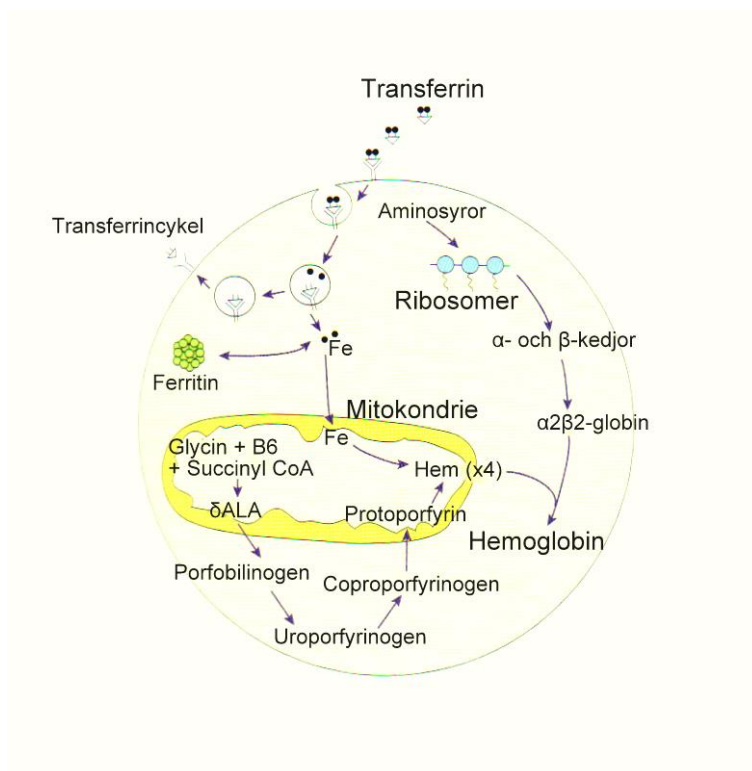
3.2.1 Erythrocyten

Av de röda blodcellerna, erythrocyterna, bildas ungefär 10^{12} dagligen genom en process som kallas erythropoes. Det första urskiljbara erythrocytstadiet är pronormoblasten i benmärgen. Från pronormoblasten bildas serier med normoblaster i gradvis sjunkande storlek vilkas hemoglobinnehåll successivt ökar. Normoblastens cellkärna stöts slutligen bort och cellen kallas då retikulocyt. Efter ett par dagar lämnar retikulocyt benmärgen och förflyttar sig ut i blodet där den efter ytterligare några dagar bildar en mogen erythrocyt. (Hoffbrand & Moss 2011, s. 16).

3.2.2 Hemoglobin

För att erythrocyterna skall kunna transportera syre och koldioxid runt i kroppen behöver de proteinet hemoglobin. Erythrocyten innehåller ungefär 640 miljoner hemoglobinmolekyler. Den mest framträdande hemoglobintypen hos vuxna är hemoglobin A som består av fyra polypeptidkedjor, två stycken α -kedjor och två β -kedjor. De fyra polypeptidkedjorna binds till varsin hemgrupp. (Hoffbrand & Moss 2011, s. 19).

Hem syntetiseras huvudsakligen i mognande erythrocyters mitokondrier (fig. 2). Bildningen sker genom biokemiska reaktioner där glycin och succinyl-koenzym A kondenseras för att slutligen bilda protoporfyrin. Protoporfyrin förenas med tvåvärdiga järnjoner, som levererats till erythrocyten av transferrin, så att fyra hemgrupper bildas som produkt. Varje hemgrupp anknys därefter med varsin av de fyra polypeptidkedjorna som formats på ribosomerna vilket ger den slutliga hemoglobinmolekylen. Hemoglobinet består således av fyra polypeptidkedjor innehållandes varsin hemgrupp. (Hoffbrand & Moss 2011, s. 20).



Figur 2. Schematisk bild av hemoglobinsyntes i den mognande erythrocyten. (Editerad från: Hoffbrand & Moss 2011, s. 20).

Järnatomen i varje hemgrupp hjälper till att binda en syremolekyl. När alla fyra hemgrupper bundit varsin molekyl syre kallas hemoglobinet för oxyhemoglobin. Methemoglobin är en onormal hemoglobintyp där järnet har oxiderats från tvåvärt till trevärt. Detta gör att molekylen inte kan binda och transportera syre. (Linné & Ringsrud 1992, s. 211-213).

3.2.3 Bilirubin

Bilirubin är ett gult till orangefärgat pigment. Ungefär 85 % av den dagliga bilirubinproduktionen uppkommer av hemoglobinet hem från föråldrande erythrocyter som blivit förstörda av leverns, mjältens och benmärgens retikuloendoteliala celler. För varje mol hem som kataboliserats bildas en mol vardera av bilirubin, kolmonoxid och järnjoner. (Higgins, m.fl. 2008, s. 520-521). Erythrocyterna fångas upp och bryts ner av makrofager. Proteindelen och järnet spjälks bort varefter det resterande av hemgruppen ombildas till bilirubin. Hepatocyterna tar upp bilirubinet för att utsöndra det med gallan. När bilirubinet når tarmen omformar bakterierna där det till färgämnen vilket gör avföringen brun. En del av bilirubinet utsöndras med urinen vilket färgar den gul. (Sand, m.fl. 2007, s. 321).

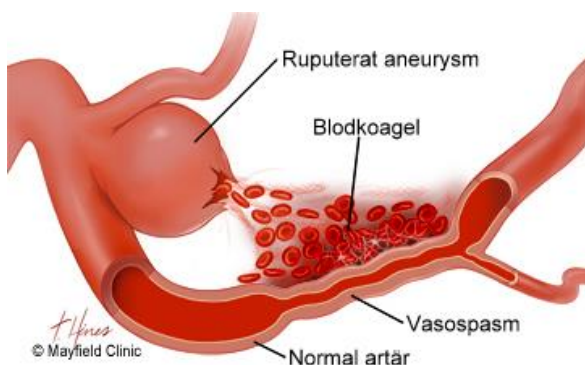
Bilirubin är olösligt i vatten. Exponeras det för ljus kommer dess transisomerer att omvandlas till cis-format vilket gör bilirubinet mera vattenlösligt. (Higgins, m.fl. 2008, s. 520). Normalt finns en låg halt av bilirubin i cerebrospinalvätska som bundet till albumin transporterats över blod-likvorbarriären. Är likvorproteinhalten eller serumbilirubinhalten förhöjd kommer således bilirubinhalten i cerebrospinalvätskan att höjas. (Beetham 2009, s. 5).

Neonataler har vid födseln högre erythrocyt- och hemoglobinvärden än vuxna men eftersom babyn har bättre syretillförsel utanför livmodern kommer erythrocyterna att brytas ned. Detta leder till att nyfödda tre till fem dagar efter förlossningen har höga bilirubinvärden. (Young, Bermes & Haverstick 2008, s. 57). Till skillnad från vuxna och äldre barn innehåller neonatalers serum inga andra pigment än bilirubin, t.ex. karoten, som kan störa bilirubinanalyser (Apperloo, van der Graaf, Dellelijn & Vader 2006, s. 940).

3.3 Subaraknoidalblödning

Subaraknoidalblödning (SAB) hör till gruppen stroke och är den allvarligaste av dessa. Blödningen uppstår ofta på grund av att ett aneurysm (artärbråck) går sönder i en artär belägen nära skallbasen (fig. 3). Aneurysm kan bildas på grund av medfödda missbildningar eller svagheter i kärlväggen. När blodtrycket stiger, vid exempelvis ansträngning, kan aneurysmet ruputera vilket leder till att blod flödar ut i subaraknoidalrummet där det beblandas med cerebrospinalvätskan. (Ericson & Ericson 2012, s. 269). När erythrocyterna kommer i kontakt med likvor börjar de lysa så att hempigment frigges. Inom ett par timmar bildas oxyhemoglobin i cerebrospinalvätskan. Även om inga grundliga bevis finns är det allmänt accepterat att bilirubin formas i likvor ungefär tolv timmar efter blödningen. (Beetham 2009, s. 4).

Subaraknoidalblödning gör att trycket inne i kraniet blir högre än systemblodtrycket så att cirkulationen till hjärnan kan stängas av. En annan fara är att hjärnans artärer kan drabbas av kramper, så kallade vasospasmer. Dessa två orsaker gör att hjärnvävnaden inte får tillräckligt med syretillförsel vilket kan göra patienten medvetslös med en stor risk för att avlida. (Ericson & Ericson 2012, s. 269).



Figur 3. Schematisk bild av ett ruputerat aneurysm. (Editerad från: Zuccarello & Ringer 2013).

Subaraknoidalblödning har hög morbiditet och mortalitet. Hälften av patienterna är under 55 år gamla. Finlands och Japans befolkning har en högre belägenhet att få SAB till följd av aneurysm. (Nilsson 2007, s. 253-254). Enligt Koivisto m.fl. (2008, s. 383) drabbas ungefär 1000 personer av subaraknoidalblödning i Finland varje år vilket, bortsett från Japan, är tre gånger mera vanligt än i resten av världen. Riskfaktorer med anknytning till

subaraknoidalblödning är högt blodtryck, rökning och förhöjd alkoholkonsumtion. Risken att få blödning ökar med åldern och kvinnor bedöms ha två till tre gånger större belägenhet att drabbas än män. (Nilsson 2007, s. 254).

Innan den stora blödningen uppkommer kan patienten ha haft huvudvärk i upp till en månad före på grund av en mindre aneurysmblödning. Detta kallas varningsblödning. Vid den sanna subaraknoidalblödningen drabbas patienten först vanligtvis av en plötslig, stark huvudvärk. Därefter följer symptom som illamående, kräkningar och nackstelhet. Mindre vanliga symptom är halvsidig förlamning, talsvårigheter, epilepsi och påverkan av kranialnerver. Ungefär 10 % avlider genast av blödningen och ytterligare 10 % inom det första dygnet, vanligen till följd av reblödningar. (Nilsson 2007, s. 254). Hos cirka 70 % av de som drabbats av SAB sker en reblödning inom det första dygnet. Denna är ofta svår att hämma och kroppens försvarssystem mot blödningar kan vara reducerat efter den första blödningen. Detta gör att mortaliteten vid reblödningar är större än vid primärblödningar. (Ericson & Ericson 2012, s. 269). Enligt Uotila (2008, s. 105) stiger mortalitetsprocenten till närmare 50 % inom ett halvår på grund av komplikationer till följd av blödningen och många av de som överlever får neurologiska skador.

3.3.1 Analyser vid misstänkt subaraknoidalblödning

Undersökningar har visat att ett bra behandlingsresultat fås hos 90 % av de som från första början får subaraknoidalblödning som rätt diagnos. Detta sjunker till 50 % om diagnosen inledningsvis missas eller förbises. Rätt diagnos bör ställas redan vid primärblödningen för att förhindra att diagnosen ställs först genom en efterföljande stor återblödning. (Beetham 2009, s. 2).

Vid misstänkt blödning görs i första hand datortomografi (CT) av huvudet för att blödning i det subaraknoidala rummet skall kunna påvisas. Fördelen med CT är att den bland annat kan visa hur omfattande blödningen är och vart den spridits. (Nilsson 2007, s. 255-256). Cruickshank m.fl. (2008, s. 238) uppger att 98 % av subaraknoidalblödningarna detekteras om CT utförs under de tolv första timmarna men endast 50 % om den görs efter en vecka.

Angiografi är den mest sensitiva undersökningen men den kräver många resurser och det finns en liten risk att patienten drabbas av stroke. Antalet patienter med endast misstänkt SAB som får angiografi borde därför minskas. (Beetham 2009, s. 2). Om man inte kan se någon blödning på CT utförs därför en lumbalpunktion. I upp till två veckor efter subaraknoidalblödning kan man finna erythrocyter, xantokromi, oxyhemoglobin och bilirubin i cerebrospinalvätskan. (Nilsson 2007, s. 256).

Undersökning som visar om erythrocyter finns i cerebrospinalvätska kan göras direkt men eftersom upp till 20 % av lumbalpunktionerna är traumatiska kan en sådan analys ge ett falskt positivt resultat. Man kan istället detektera oxyhemoglobin och bilirubin i likvor genom tre olika metoder. Att visuellt undersöka om cerebrospinalvätskan fått en utmärkande gul-orange färg (xantokromi) har inte visat sig vara tillräckligt pålitligt. Den andra metoden, som undersöker pigmenten med en spektrofotometer, är sensitiv och objektiv. Dock är den inte automatisk, har ansetts vara för sensitiv samt kräver specialutrustning och erfaren personal vid tolkningen. (Beetham 2009, s. 2-3).

Vid analys med spektrofotometer måste personalen förstå detekteringen av bilirubin, oxyhemoglobin och methemoglobin. Man måste veta om det är SAB vid vissa absorbansnivåer och kombinationer av dessa. (Cruickshank, m.fl. 2008). Vid användning av spektrofotometer som analysmetod krävs provsvar av patientens likvor- och serumproteinhalt samt serumbilirubinkoncentration för att cerebrospinalvätskans egentliga bilirubinhalt skall kunna beräknas. Om den egentliga nettobilirubinhalten är över 0,007 absorbansenheter, vilket motsvarar 166 nmol/L, tyder detta på att patienten har subaraknoidalblödning. (Uotila 2008, s. 107-108).

Den tredje metoden är användning av kemisk bilirubinanalys (Beetham 2009, s. 2). Denna metod har fått kritik eftersom varje laboratorium ännu måste validera sin egen metod och bestämma sina egna gräns- och referensvärden (Beetham 2007).

3.3.2 Lumbalpunktion

När en lumbalpunktion utförs ligger patienten på sidan eller sitter upp med böjd rygg. En tunn nål förs in mellan fjärde och femte eller tredje och fjärde lumbalkotorna in i ryggradens subaraknoidalrum. Den standardiserade provvolymen likvor som tas är 12 mL

hos vuxna respektive 3 mL hos barn. Cerebrospinalvätskans utseende granskas noggrant. Normal likvor är ofärgad och utan grumligheter. Grumlig likvor kan tyda på ökat antal leukocyter medan rosarödfärgad likvor ses vid akuta blödningar. Vid en stickblödning får cerebrospinalvätskan ett ojämnt blodigt utseende. Eftersom blodblandad likvor påverkar analysen vid misstanke om blödning skall den första blodiga likvorn kasseras. (Blennow & Zetterberg 2012, s. 556-557).

Prov för bilirubinanalys skall vara den sista andelen cerebrospinalvätska eller från åtminstone fjärde provröret för att förhindra att erythrocyter från lumbalpunktionens stick eller trauma kommer med i provet och börjar lysa in vitro. Man skall vänta med att ta provet i minst tolv timmar efter blödningens början. Provet skall skyddas från ljus eftersom man märkt att bilirubinhalten annars minskar med åtminstone 0,005 absorbansenheter per timme. Man bör inte späda ut likvorn eftersom man då kan missa små men viktiga höjningar över referensvärdet. Likvorn centrifugeras inom en timme i mera än 2000 rpm i fem minuter varefter supernatanten förvaras i mörker i 4 °C tills analysen utförs. I samband med lumbalpunktionen tas prover för mätning av serumbilirubin och totalprotein. (Cruickshank, m.fl. 2008, s. 239-243).

3.4 Cobas 6000

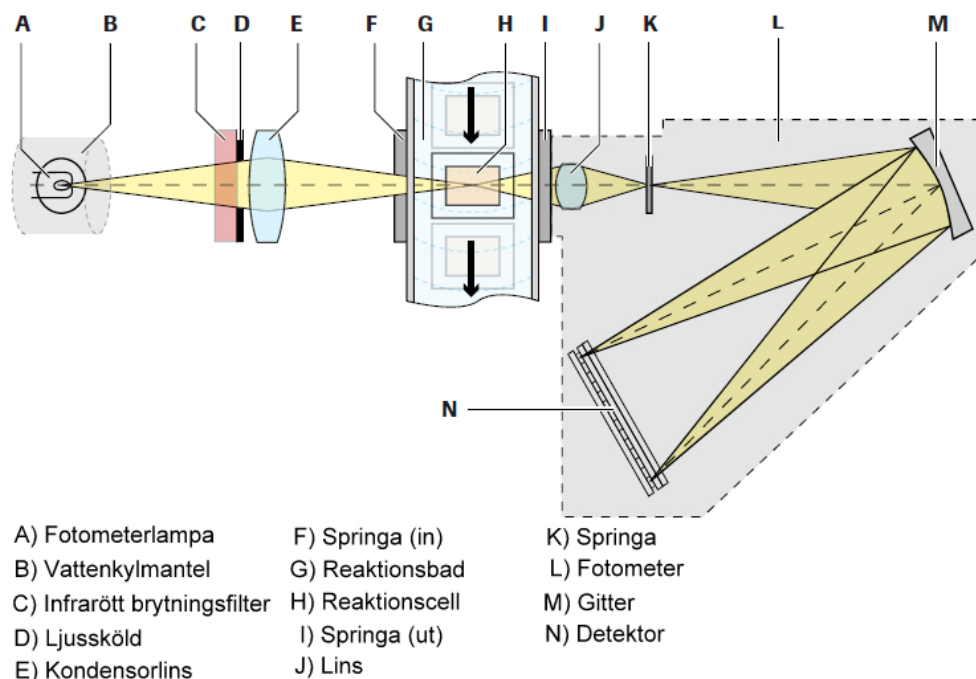
Cobas 6000 (fig. 4) tillhör produktserien Cobas® av Roche för screening, diagnostik och övervakningsprogram i laboratorier. Den är en del av Cobas modular och består av tre baskomponenter. I den första komponenten sätts proverna in. De andra delarna är c501 och e601. (Roche Diagnostics 2008). Modulen c501 utför kemiska analyser. Den använder sig av fotometrisk mätning och jonselektiva elektroder. Modulen e601 genomför immunanalyser med elektrokemiluminiscens. Bilirubinundersökningar görs på c501-modulen. (Roche Diagnostics, North America 2013).



Figur 4. Cobas 6000. (Roche Diagnostics 2008).

3.4.1 Fotometrisk metod på Cobas 6000

I c501-modulens fotometriska undersökningar sänds en ljusstråle in i fotometern mot ett diffraktionsgitter (fig. 5). Gittret separerar ljuset i alla våglängder och reflekterar dem på tolv fotodioder. Vardera dioden är positionerad att detektera en viss våglängd. Varje gång en reaktionscell roterar förbi fotometerns ljusbana mäts absorbansen för de tolv våglängderna. Oftast mäts två våglängders absorbans för att beräkna resultatet. Slutprodukten av den kemiska reaktionen absorberar mest ljus hos en viss våglängd men genom att beräkna skillnaden mellan absorbansen vid två olika våglängder elimineras interferens och störningar. Detta kallas biokromatisk analys och går ut på att absorbans mäts vid eller nära absorbansspiken och en andra våglängd som har så lite absorbans som möjligt av det slutliga kromogenet man mäter. (Roche Diagnostics 2005, A-5).



Figur 5. Fotometerljusets väg i Cobas 6000 c501-modul. (Editerad från: Roche Diagnostics 2005, A-5).

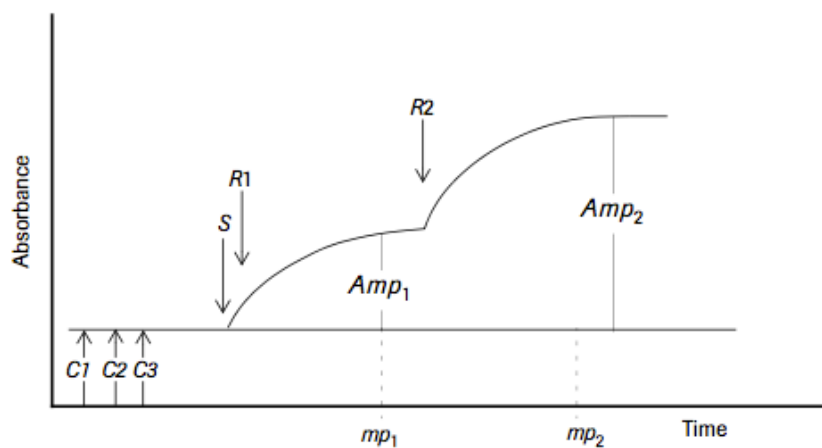
3.4.2 BILT3

BILT3 (Bilirubin Total Gen.3) är en undersökning utvecklad för Roche diagnostics Cobas-system c311, c501 och c502. Metoden är avsedd att användas till kvantitativa in vitro undersökningar av den totala bilirubinhalten i serum och plasma hos vuxna och nyfödda. BILT3 är utvecklad för ett mätområde på 2500-650000 nmol/L bilirubin. De rekommenderade bruksvolymerna är 120 μL respektive 24 μL av dess två reagenser och 2 μL som provvolym. Ingen signifikant interferens av hemolys har observerats upp till en hemoglobinkoncentration på 497 $\mu\text{mol/L}$. (Roche Diagnostics 2012).

Testprincipen som BILT3-undersökningen använder är en kolorimetrisk analys där totalbilirubin löses upp och sammanlänkas med diazoniumjoner i en syra. Slutprodukten är azobilirubin. Den röda färgintensiteten som azofärgen bildar är direkt proportionell mot den totala bilirubinhalten i provet. Cobas kan därmed beräkna bilirubinkoncentrationen genom att bestämma azofärgens styrka med en fotometer. (Roche Diagnostics 2012).

Till BILT3 används analysprincipen tvåpunkts ändanalys (fig. 6). Ändpunktsanalys betyder att fotometern mäter vid specifika mätpunkter efter att reaktionen skett färdigt.

Den färgade produkten fungerar som en indikator av det undersökta ämnets koncentration i provet. Fotometern mäter absorbansen i intervall av 7 till 15 sekunder beroende på inställningarna. Tvåpunktsanalys innebär att absorbansmätningarna undersöks vid två olika mätpunkter, mp_1 och mp_2 . Den första mätpunkten är provets blank och den avläses innan eller just efter det att det sista reagenset har blivit tillagt. Den andra mätpunkten mäts efter att det sista reagenset adderats när reaktionen är klar. Vid denna punkt mäts reaktionsproduktens absorbans. (Roche Diagnostics 2005, B-9-12).



Figur 6. Schematisk bild av analysprincipen för BILT3 enligt; C_1 , C_2 , C_3 : blankvärden, S : provet tillsätts, R_1 , R_2 : reagenser tillsetts, mp_1 , mp_2 : fotometriska mätpunkterna, Amp_1 , Amp_2 : absorbansen vid mätpunkterna. (Roche Diagnostics 2005, B-12).

BILT3 använder sig av kalibrationsstypen linjär tvåpunktskalibrering. Linjär kalibrering används när absorbansmätningarna som är markerade mot kalibrators koncentrationer bildar en rak linje. Tvåpunktskalibrering innebär att kalibreringen bygger på två kalibreringsmätningar. (Roche Diagnostics 2005, C-14). För denna kalibreringstyp mäts absorptionen för vatten som en punkt och absorptionen för kalibratoren som en andra punkt. Punkterna bildar en linje vars sluttning används för uträkningen av kontroller och patientresultat. (Roche Diagnostics 2005, C-21).

En K-faktor används för att beräkna provresultaten vid undersökningar som använder kalibratorer utöver blank-kalibratoren. Den beräknas utifrån blank-kalibrators och de övriga kalibratorernas absorbanser. Vid vissa undersökningar används en fixerad K-faktor. (Roche Diagnostics 2005, C-14).

4 Tidigare forskning

En metod för mätning av bilirubinkoncentration i cerebrospinalvätska har gjorts med det automatiska instrumentet Aeroset analyser från Abbot laboratories. Till detta användes en metod med diazoreagens. Metoden modifierades för att kunna mäta lägre bilirubinkoncentrationer genom att förhållandet mellan provvolym och reagensvolym höjdes. Som kvalitetskontroll användes en spädning av Aeroset analyzers serumbilirubinkontroll. Oxyhemoglobin- och hemoglobininterferens undersöktes, vilket gav att en högre hemoglobinkoncentration än 100 mg/L påverkade provresultatet. (Ungerer, Southby, Florkowski & George 2004, s. 1854).

Referensintervall bestämdes genom att studera standarddeviationen för prover från patienter utan misstänkt SAB och med klar cerebrospinalvätska där proteinhalten var normal. Därtill undersöktes olika gränsvärden för när prov är positivt. Vid ett lägre likvorbilirubinvärde än 359 nmol/L på Aeroset analyser kunde SAB med säkerhet uteslutas. (Ungerer, m.fl. 2004, s. 1854-1855).

Ungerer m.fl. (2004, s. 1856) anser att en automatisk metod för likvorbilirubinmätning är stabil och lätt att använda och att man enkelt kan tillämpa den på automatiska kemianalysatorer genom att använda serumbilirubinreagenser. De poängterar dock att andra laboratorier bör validera och justera sin egen metod, referensintervall och beslutsgränser.

Det har även gjorts en modifiering av diazoreagensbaserade plasmabilirubinmetoden på Architect C8000, även den från Abbot laboratories. Som referensapparat användes UV-1601C Shimadzu. För att göra metoden mera sensitiv för låghaltiga bilirubinkoncentrationer höjdes provvolymen till 35 μ L. En pool av cerebrospinalvätska med tillsatt högbilirubinhaltigt plasma späddes med natriumklorid till en serie med olika koncentrationer. Spädningsserien mättes på Architect och Shimadzu varefter resultaten jämfördes mellan analysatorerna och med uträknade värden. Därtill undersöktes hemoglobininterferens. Som kontroller använde man vanliga serumbilirubinkontroller. Man fick en god korrelation mellan beräknade och uppmätta svar med en lutningskoefficient nära 1. Även en god korrelation mellan Architect och Shimadzu uppnåddes. Låga hemoglobinkoncentrationer hade små effekter på bilirubinanalysen,

speciellt när bilirubinhalten var hög. (Ahmed, Larsson, Hillered, Wande & Ryden 2009, s. 283-287).

Ahmed m.fl. (2009, s. 283-288) tycker att deras automatiska likvorbilirubinanalys med diazoreagens är en bra och ekonomisk metod som ger snabbare analysresultat, är lättare att tolka och kräver mindre arbete än spektrofotometri. De menar att den nya metoden kan komma att ersätta spektrofotometermetoden.

Inget fullständigt forskningsresultat hittades gällande likvorbilirubinundersökningar på Cobas 6000. Däremot finns material från en muntlig presentation av Jones och Roser (2006a, 2006b) som handlar om hur de testat en metod på Roche modular. De använde sig av undersökningen TBILI från Roche. Samma tillvägagångssätt användes som vid serumundersökningar med den skillnaden att provvolymen höjdes till 35 µL. Som kvalitetskontroll användes de vanliga kvalitetskontrollerna i utspädd form.

Metoden ansågs som stabil och enkel att använda. Ett serumtest som samtidigt ger mätning av hemoglobinmängden används med resultatet att metoden inte verkar affekteras av hemolys, vilket gör den mera sensitiv än spektrofotometerundersökningar. En god korrelation har märkts med ett gränsvärde av 150 nmol/L. Metoden skall i fortsättningen användas som ett rutintest för att utesluta subaraknoidalblödning. (Jones & Roser 2006a, 2006b).

5 Undersökningens genomförande

Den praktiska delen av undersökningen utfördes på Vasa Centralsjukhus kliniska laboratorium under tiden 15.4-31.5.2013. Syftet var att validera en metod för undersökning av bilirubin i cerebrospinalvätska till Cobas 6000. Metoden skulle jämföras mot den spektrofotometriska rutinmetoden. Undersökningen gjordes genom delanalyser där upprepade modifieringar, kontroller och tester användes så att passande inställningar för likvorbilirubinmetoden kunde hittas. I detta kapitel ses tillvägagångssätt och resultat från analyser som gjorts med de slutliga inställningarna.

5.1 Material

I detta kapitel fås mera information om material som användes vid undersökningen. Här följer även en kort beskrivning av de analysatorer som användes.

5.1.1 Biologiskt material

Under arbetets praktiska genomförande anlände endast ett fåtal likvorprover från patienter med misstänkt subaraknoidalblödning. Detta gjorde att undersökningarna måste ske med artificiella prover som liknade bilirubinhaltig cerebrospinalvätska. Till de olika delanalyserna användes material från patientprover. Allt biologiskt material som användes var restprodukter som lämnat över från andra provanalyser.

Från neonataler användes uS-TSH-prover. De tas från navelsträngen på alla nyfödda för att undersöka tyreotropinhalten (Väisänen 2012). Dessa serumblodprov hade ofta en naturligt hög bilirubinhalt. Från tyreotropin-screeningen kom det kontinuerligt nytt material men restserummängden från varje prov var mycket liten. För att undvika att övriga pigment än bilirubin skulle störa analyserna användes även plasmablodprov från nyfödda. Likvorprover som användes vid undersökningarna togs från både spädbarn och vuxna. Enhetligt för allt biologiskt material som användes var att proverna, förutom till hemoglobininterferenstestet, var utan synbar hemolys.

5.1.2 Reagenser

För att undersökningsmaterialet mera skulle likna riktig cerebrospinalvätska med bilirubin gjordes en buffert som efterliknade riktig likvor till vilken bilirubin senare kunde tillsättas. Bufferten var en isoton fosfatbuffert med tillsatt albumin i koncentrationen 500 mg/L. Dess pH-värde justerades till 7,3. Koncentrationen av natrium- och kloridjoner mättes med radiometern ABL800 FLEX till 175,6 mmol/L respektive 141 mmol/L.

Till bilirubinanalyserna på Cobas användes två reagenser gjorda för BILT3-undersökningar. Det ena innehöll detergent, buffert och stabiliseringsmedel. Det andra innehöll 3,5-diklorofenyl diazoniumsalt.

5.1.3 Analysatorer

Till undersökningen användes Roche Diagnostics Cobas 6000. Förutom Cobas 6000 användes en bilirubinometer och en spektrofotometer. Leica Unistat bilirubinometer användes för att mäta provers ursprungliga bilirubinhalt och för att kontrollera att spektrofotometern var godkänt kalibrerad. Spektrofotometern som användes var Shimadzu UV-1700. Med den gjordes jämförelser med Cobas. För att underlätta framförandet kommer analysatorerna i metod- och resultatdelarna kallas för Cobas, Shimadzu och bilirubinometern.

5.2 Metoder

Innan valideringen av den nya bilirubinmätningmetoden påbörjades gjordes en kontroll av spektrofotometerns riktighet. Därefter gjordes flera analyser för att hitta rätt inställningar så att Cobas gav korrekta analysvar. Även metodens påverkan av förhöjda hemoglobinvärden undersöktes. Analysvärdena som erhöles från undersökningarna sattes in i ett koordinatsystem med hjälp av Excel som ett spridningsdiagram. I Excel gjordes därefter kvantitativa analyser statistiskt genom korrelations- och regressionsanalyser.

5.2.1 Korrelations- och regressionsanalys

Till undersökningen användes linjära korrelations- och regressionsanalyser. Med korrelations- och regressionsanalyser kan man påvisa eller avkasta samband mellan två kvantitativa variabler. Korrelationsanalysen visar hur starkt variablernas samband är medan man med regressionsanalysen kan förutse en variabels värde beroende på den andra variabeln. När två variabler korrelerar linjärt lägger sig deras värden på en linje i ett

spridningsdiagram. Linjen kan vara uppåtgående (positiv korrelation) eller nedåtgående (negativ korrelation). (Ejlertsson 2012, s. 221-223).

Vid regressionsanalysen används en regressionslinje som är en rak linje som går genom punktmängden där den bäst kongruerar. Den linjära regressionslinjen får samma ekvation som en linje: $y = a + b \cdot x$ där a , som kallas interceptet, ger var linjen skär y-axeln och b anger hur mycket linjen lutar, vilket kallas regressionskoefficient. Är regressionslinjen uppåtgående visar dess ekvation att y ökar med b enheter om x ökar med en enhet. Vid en regressionslinjes ekvation vars regressionskoefficient är negativ kan man utläsa att y minskar med b enheter om x ökar med en enhet. (Ejlertsson 2012, s. 225).

Korrelationskoefficienten (r) anger hur mycket variablerna korrelerar linjärt. Koefficienten kan ligga mellan -1 och $+1$. Ett r -värde nära $+1$ betyder att variablerna har ett starkt positivt samband medan en koefficient nära -1 tyder på ett starkt negativt samband. Ligger korrelationskoefficienten nära 0 innebär detta att de valda variablerna inte har något signifikant linjärt samband. Korrelationskoefficienten i kvadrat bildar en determinationskoefficient (R^2). Denna anger hur mycket variationen i den ena variabeln beror på den andra variabeln. Determinationskoefficienten kan senare omvandlas till procent. (Ejlertsson 2012, s. 227-232).

5.2.2 Kontroll av Shimadzus tillförlitlighet

Eftersom Cobas-metoden skulle verkställas med hjälp av spektrofotometern och senare även jämföras mot denna måste spektrofotometerens analysvärden med säkerhet vara korrekta. Innan testningen av metoden för bestämning av bilirubinhalt i likvor kunde påbörjas på Cobas måste därför Shimadzu kontrolleras mot bilirubinometern.

För jämförelsen användes inledningsvis serum från uS-TSH-prover som enligt bilirubinometern hade en hög bilirubinhalt. Senare gjordes en övergång till att använda vanliga plasmaprover från neonataler. Prover togs från högst två veckor gamla spädbarn vars plasmabilirubinhalt visat sig vara hög medan prover med låg bilirubinhalt sållades bort. Även prover med synlig hemolys uteslöts. Eftersom provvolymen som togs på nyfödda var liten gjordes en plasmapool där plasmaprover med hög bilirubinhalt sattes samman. Poolens bilirubinhalt mättes på bilirubinometern och dess bilirubinkoncentration

blev 101,2 $\mu\text{mol/L}$. Flera spädningar med olika hög bilirubinhalt gjordes. Det framkom under undersökningens gång att det bästa sättet var att späda proverna för hand med pipett.

Efter en 1:5 spädning av poolen med buffert som innehöll tillsatt albumin för att efterlikna egentlig cerebrospinalvätska var bilirubinkoncentrationen 20,24 $\mu\text{mol/L}$. Därifrån gjordes sex spädningar med buffert för att få prover med olika bilirubinhalt. Spädningsserien analyserades med Shimadzu och dess absorbansvärden sattes in i en Exceltabell. I tabellen placerades även spädningsseriens uträknade värden enligt hur mycket proven späddes. Från tabellen gjordes en linjär regression för att undersöka sambandet mellan Shimadzu och uträknade värden. Spädningsserien samt värden kan ses nedan i tabell 1.

Tabell 1. Spädningsserie vid kalibrering av Shimadzu samt uträknad bilirubinkoncentration och Shimadzus nettobilirubinabsorbans.

Prov	Plasma (μL)	Buffert (μL)	Uträknad bilirubinkoncentration (nmol/L)	Shimadzu bilirubin- nettoabsorbans
1	0	700	0	0
2	5	700	144	40
3	10	700	285	90
4	15	700	425	130
5	20	700	562	170
6	25	700	698	210

5.2.3 Validering av likvorbilirubinmetoden på Cobas 6000

Efter att Shimadzu blivit godkänd som referensanalysator påbörjades valideringen av Cobas-metoden. Inledningsvis var uppgiften att hitta ett tillvägagångssätt för att Cobas skulle ge jämförbara resultat med Shimadzu vid mätningen av bilirubin i likvor.

Reagenser till serum- och plasmabilirubinundersökningen installerades. Efter flera analysgenomgångar bestämdes det att inget fixerat K-faktorvärde skulle användas. Vid kalibreringen användes destillerat vatten vid position ett samt en egentillverkad kalibrator

av 40 µL plasmapool och 578 µL 0,9 % natriumklorid vid position två. Undersökningen fick ett mätområde på 0-9000 nmol/L. Provvolymer som Cobas 6000 skulle använda till analysen höjdes från 2 µL till 35 µL.

En likvorpool med normal proteinkoncentration gjordes från ickehemolyserade, bilirubinnegativa cerebrospinalprover. För att få likvorprover med varierande bilirubinkoncentration tillsattes material av en plasmasammansättning från spädbarn med bilirubinhalt 129,8 µmol/L enligt informationen i tabell 2.

Tabell 2. Tillvägagångssätt vid framställning av likvorprover med tillsatt bilirubin samt uträknad bilirubinkoncentration.

Prov	Uträknad bilirubinkoncentration (µmol/L)	Tillsatt från plasmabilirubinpool (µL)	Tillsatt från likvorpool (µL)
1	8	31	469
2	6	23	477
3	4	15,5	484,5
4	2	7,5	492,5
5	1	4	496
6	0,5	2	498
7	0	0	500

Då tidigare tester visat att metoden är mindre känslig vid lägre bilirubinkoncentrationer gjordes ett nytt test där provernas bilirubinkoncentrationer var lägre. Till detta gjordes en ny likvorpool med prover av cerebrospinalvätska utan hemolys som fick ett slutligt normalt proteinvärde. Plasmapoolens bilirubinhalt låg nu på 128,2 µmol/L och denna späddes 1:5 till 25,64 µmol/L med buffert. Senare tillsattes material från plasmapoolen till den nya likvorpoolen enligt det som visas i tabell 3.

Tabell 3. Tillvägagångssätt vid framställning av likvorprover med lägre bilirubinhalt samt uträknad bilirubinkoncentration.

Prov	Uträknad bilirubinkoncentration (µmol/L)	Tillsatt från utspädd plasmabilirubinpool (µL)	Tillsatt från likvorpool (µL)
1	0	0	500
2	0,1	2	498
3	0,2	4	496
4	0,3	6	494
5	0,4	7,5	492,5
6	0,5	9,5	490,5
7	0,6	11,5	488,5
8	0,7	13,5	486,5
9	0,8	15,5	484,5
10	0,9	17,5	482,5
11	1,0	19	481

För att undersöka hur känslig metoden var gjordes upprepningar av körningarna på Cobas både för höga och låga bilirubinkoncentrationer. Mellan alla analyseringar blandades och centrifugerades proverna noggrant.

Slutligen gjordes en undersökning för att kontrollera om den nya metoden påverkades av hemolys. Undersökningen gjordes med riktiga likvorprover för att ge ett så naturligt resultat som möjligt. Likvorproverna var elva till antalet varav tio hade synligt blod på rörets botten och det elfte provet var visuellt utan hemolys. Proverna blandades, centrifugerades och avskiljdes eftersom endast hemoglobin från supernatanten skulle undersökas då likvorpatientprover normalt avskiljs innan analys. Hemindex mättes på Cobas på alla proverna varefter en bilirubinmätning gjordes så att provernas naturliga bilirubinhalt kunde uteslutas från testet.

Därefter höjdes bilirubinkoncentrationen i proverna succesivt genom att material från en plasmapool med bilirubinkoncentrationen 133,4 µmol/L tillsattes varefter bilirubinhalten

mättes på Cobas. En cerebrospinalvätskevolym på 250 μL hölls i proverna hela tiden genom att 35 μL likvor tillsattes till vardera prov efter varje körning eftersom man modifierat metoden så att Cobas använder 35 μL prov vid varje bilirubinanalys. Eftersom metoden var omgjord att passa likvorbilirubinmätningar kunde undersökningen göras endast tre gånger för vardera prov eftersom bilirubinhalten därefter blev högre än vad metoden var kalibrerad att kunna mäta. I tabell 4 ses en översikt av hur de olika proverna gjordes.

Tabell 4. Tillvägagångssätt vid framställning av likvorprover med tillsatt bilirubin för hemolysinterferensundersökning.

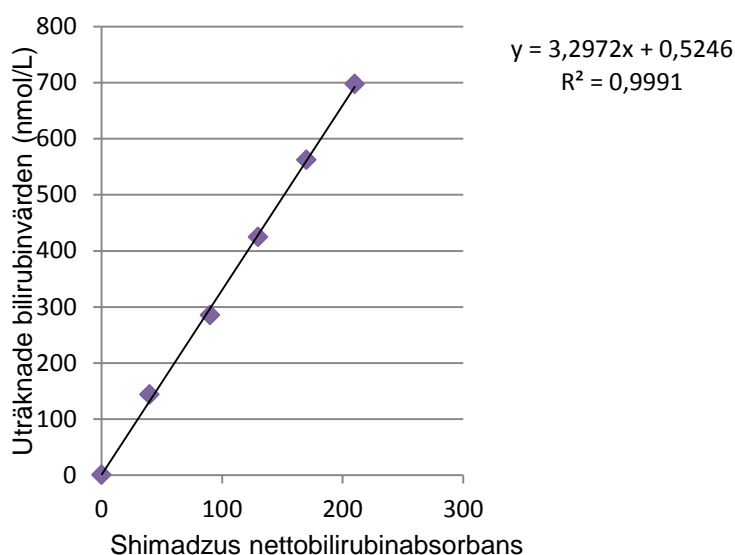
Spädning	Tillsatt från likvorprov (μL)	Tillsatt från plasmabilirubinpool (μL)
1	250	1
2	250	5
3	250	10

6 Resultat och tolkning

Innan valideringen av den nya metoden gjordes en kontroll av om Shimadzu var pålitlig som referensmetod. Likvorbilirubinanalysen utfördes på Cobas med en modifierad version av bilirubinmätningssmetoden BILT3 för serum och plasma. Kalibreringsnivåerna sänktes från 2500-650000 nmol/L till 0-9000 nmol/L bilirubin för att metoden skulle klara av att mäta bilirubinhalt i cerebrospinalvätska. Provvolymer höjdes från 2 μL till 35 μL för att göra metoden mindre sensitiv. Inget fixerat K-värde användes. Genom regressions- och korrelationsstatistik gjordes analyser av metodens precision, sensitivitet och hemoglobininterferens.

6.1 Shimadzus tillförlitlighet

För att spektrofotometern Shimadzu skulle vara en bra jämförelseanalysator gjordes en undersökning med neonatalplasma utspätt med buffert. En regressionsanalys gjordes av Shimadzus absorbansvärden i jämförelse med uträknade värden från spädningarna där bilirubinometern gav ursprungsvärdet. Regressionen, som kan ses i figur 7, visar en fin korrelation med en determinationskoefficient nära 1 och ett litet intercept. Shimadzu var således godtagbar som referensanalysator.



Figur 7. Regressionsanalys av Shimadzus nettobilirubinabsorbanser i jämförelse med uträknade bilirubinkoncentrationer.

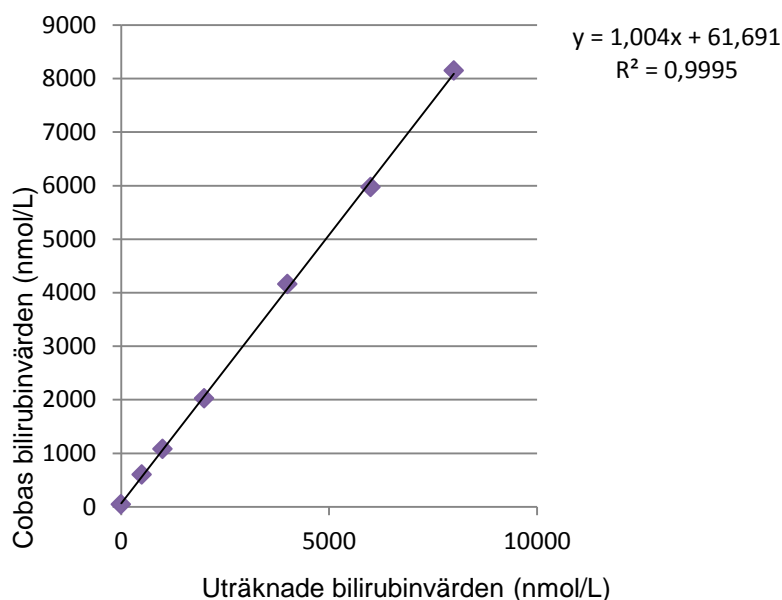
6.2 Likvorbilirubinmetoden på Cobas 6000

Nedan följer resultaten av statistiska, kvantitativa analyser som gjorts av likvorbilirubinmetodens tillförlitlighet, känslighet och hemoglobinpåverkan. Dessa gjordes för att kontrollera om samband finns mellan Cobas och Shimadzu, mellan Cobas och uträknade värden enligt ursprungligt bilirubinvärde från bilirubinometern samt mellan olika mätningssyklusar på Cobas.

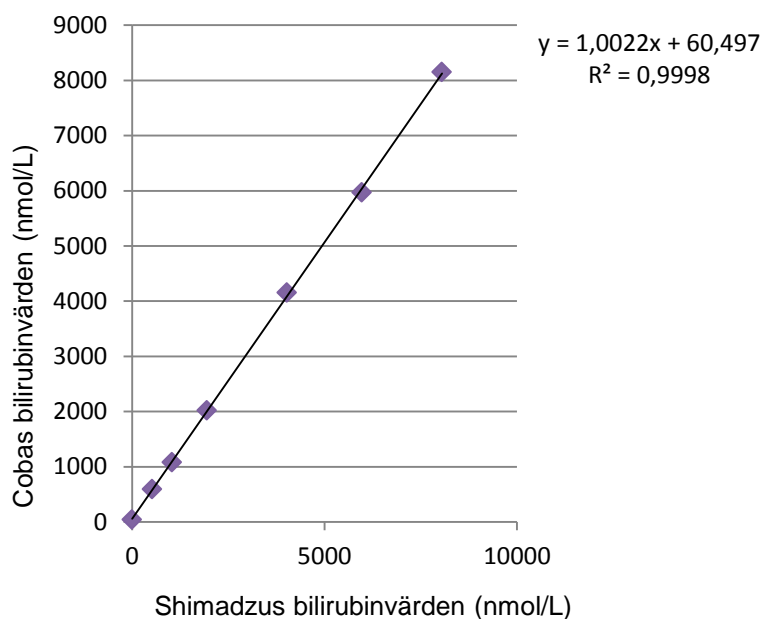
6.2.1 Metodens tillförlitlighet

Med de nya inställningarna kunde plasma- och serumbilirubinmetoden användas för likvorbilirubinmätning. När Cobas-analyserna av likvor med tillsatt bilirubin jämfördes med spektrofotometern Shimadzus värden överensstämde de. Även Cobas-värdena och de uträknade värdena korrelerade. Med en förhöjd provvolym på 35 μL förbättrades även likheterna mellan apparaterna vid lägre bilirubinkoncentrationer.

När undersökningresultaten (bilaga 1^{a-b}) från Cobas, Shimadzu och uträknade värden sattes in i linjära regressionsanalyser gavs linjer med en lutningskoefficient strax över 1 och en skärningspunkt nära origo. En determinationskoefficient nära 1 tyder på att samband finns mellan de olika metodernas mätsvar. Cobasmetodens analysvärden är endast ungefär 60 nmol/L högre än Shimadzus och uträknade värden. Den statistiska analysen av Cobas bilirubinvärden i jämförelse med uträknade bilirubinvärden ses i figur 8 och jämförelsen mellan Cobas-värden och Shimadzus uppskattade bilirubinkoncentrationer i figur 9.



Figur 8. Regressionsanalys av Cobas bilirubinkoncentrationer i jämförelse med uträknade bilirubinkoncentrationer.

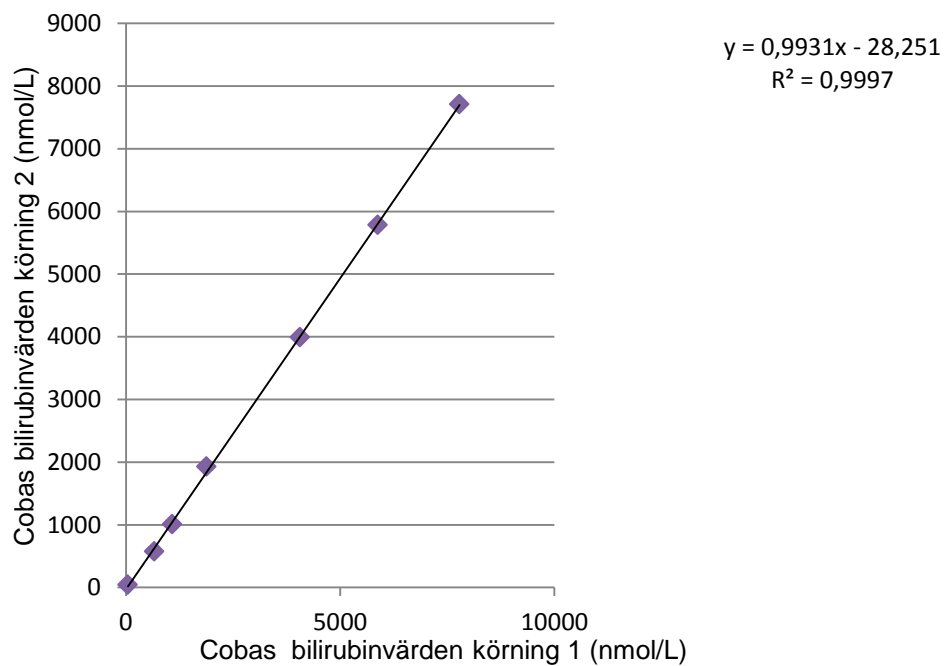


Figur 9. Regressionsanalys av Cobas bilirubinkoncentrationer i jämförelse med Shimadzus bilirubinkoncentrationer.

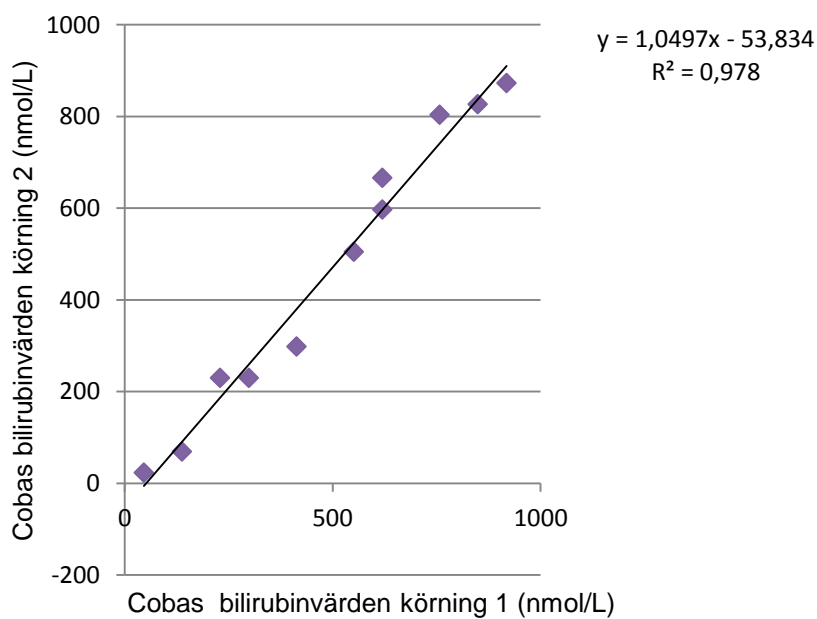
6.2.2 Metodens känslighet

När provvolymen höjdes till 35 μL gav Cobas mera jämförbara resultat mellan analyskörningar. Metoden är fortfarande mycket känslig och man måste komma ihåg att provet skall blandas ordentligt, centrifugeras och avskiljas innan och mellan körningar. Om detta negligeras ger Cobas stora variationer i resultatvärden.

Analysvärdena som användes för testerna av variation mellan körningar finns i bilaga 1^{c-d}. Metoden fungerar bättre på höga bilirubinkoncentrationer. Vid regressionsanalys av Cobas-mätningar där samma prover med hög bilirubinhalt körts två gånger med blandning, centrifugering och avskiljning emellan fås ett starkt samband med en determinationskoefficient nära 1. Bilirubinhalten som Cobas ger sjunker i medeltal med 28 nmol/L vid den andra körningen. Likheten mellan körningar när bilirubinhalten är hög kan ses i figur 10. Vid lägre koncentrationer är Cobas-resultaten mera varierande men ändå godtagbara. Skillnaden mellan körningar är då 54 nmol/L. Resultaten från upprepade analyser av prover med lägre bilirubinhalt visas i figur 11.



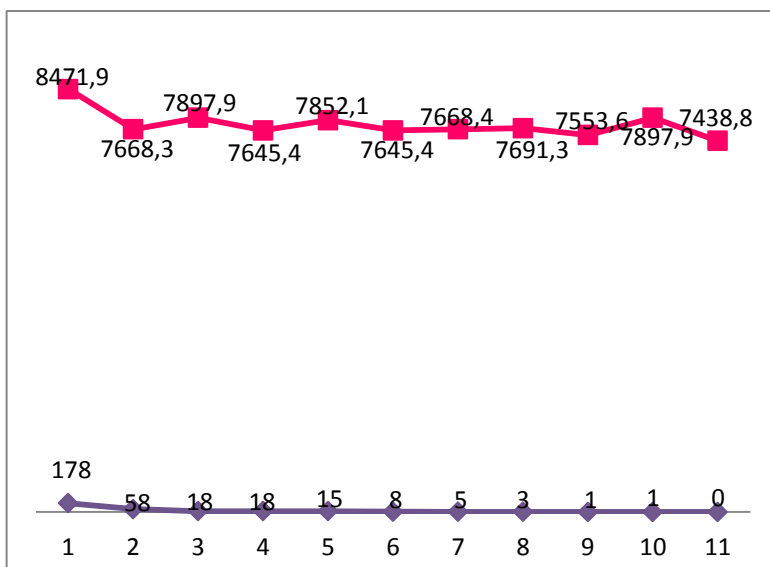
Figur 10. Jämförelse av bilirubinkoncentration från två mätningar på Cobas när bilirubinhalten är hög.



Figur 11. Jämförelse av bilirubinkoncentration från två mätningar på Cobas när bilirubinhalten är låg.

6.2.3 Hemoglobininterferens

I bilaga 2^a ses analysvärden som användes för statistisk analys av hemoglobininterferens. Regressionsanalyser som gjordes för att undersöka om bilirubinkoncentrationer påverkas av ett högre hemindex finns i bilaga 2^{b-d}. Ingen signifikant linjär korrelation anas och intercepten är höga. Determinationskoefficienterna har ett lågt värde i de två första regressionerna där bilirubinhalten är lägre. Analyserna påvisar att en högre hemoglobinhalt inte påverkar bilirubinundersökningarna. I den tredje körningen är bilirubinhalten högst och därför även metoden mest säker och jämn. Regressionsanalys från denna körning visar ett högre samband mellan hemindex och bilirubinhalten än körningarna med lägre bilirubinhalten men värdena är inte i närheten av regressionslinjen och tyder inte på samband. I figur 12 kan man se en höjning av bilirubinhalten när hemoglobinindex har ett värde av 178 (prov 1), vilket är det högsta inom denna undersökning.



Figur 12. När hemindex (lila) är högt vid prov 1 stiger bilirubinhalten (rosa) något enligt Cobas 6000.

7 Kritisk granskning och diskussion

Vid genomförandet av undersökningen har alla prover behandlats enligt rådande preanalytiska riktlinjer. Detta menar att man gjort sitt yttersta för att förhindra att brister i provhantering och apparathantering leder till ett felaktigt resultat. För att försäkra sig om att bilirubinhalten bevarats har alla berörda prover förvarats mörkt i kylrum. Prover som förvarats en längre tid har skyddats från bilirubinreduktion genom frysning varefter de centrifugerats och avskiljts. Vid undersökningens genomförande användes bilirubinometern Leica Unistat för att detektera ursprunglig bilirubinoncentration inför spädnings. För att få en riktig koncentration mättes alla bilirubinometers resultat tio gånger varefter medelvärdet användes. Mellan alla Cobaskörningar blandades proverna väl med en vortex för att bilirubinhalten skulle vara så jämn som möjligt i hela provet och i vissa undersökningar användes även upprepande centrifugering och avskiljning mellan mätningar.

För att resultatet av undersökningen skulle vara så pålitligt som möjligt försökte man reducera analysatorernas felkällor genom att följa deras manualer och provhänvisningar. Bilirubinometers bilirubinresultat kontrollerades alltid innan mätning med en kontrollkyvett. Kontrollen av Shimadzu UV-1700 var omfattande eftersom man ville vara säker på att den var en god referensanalysator. Shimadzukontrollen fick därmed en egen del i arbetet (kap. 5.2.2 och kap. 6.1). Det var viktigt att analysatorers och provhanteringens felkällor förminskades för att förhindra en dominoeffekt eftersom Cobas kontrollerades av Shimadzu som i sin tur kontrollerades av bilirubinometern. Man måste dock komma ihåg att alla felkällor inte kan uteslutas vilket gör att provresultat mellan Cobas, Shimadzus och uträknade värden kan variera mera eller mindre än det som anges i resultatdelen.

Som undersökningsmetod valdes en modifierad version av Cobas serumbilirubinmetod. Mätområdet höjdes genom kalibrering till 0-9000 nmol/L för att metoden skulle klara av att mäta cerebrospinalvätskans låga bilirubinhalter. Eftersom man vid tidigare liknande forskning (kap. 4) höjt provvolymen höjdes den även i denna studie till 35 μ L vilket gjorde metoden mindre känslig. Den nya metoden jämfördes mot spektrofotometern och korrelations- och regressionsanalyser visade att den nya metodens provresultat motsvarade Shimadzus.

Enligt informationsbladet om BILT3 (Roche Diagnostics 2012) borde ingen märkbar interferens av hemolys ske vid en hemoglobinkoncentration under 497 $\mu\text{mol/L}$. Eftersom metodens kalibreringsvärden justerats och provmaterialet bytts ut från plasma och serum till likvor kan detta ha påverkats och bör därmed undersökas. Undersökningen om hemoglobinhalt påverkar metoden gjordes eftersom man ville veta om mätningar kan göras utan att denna måste tas i beaktande. Det var synd att hemoglobininterferenstestet endast kunde utföras tre gånger eftersom bilirubinhalt därefter blev för hög för metodens mätområde. Analysen gav att ett förhöjt hemindex inte påverkar bilirubinhalt i cerebrospinalvätskan avsevärt. Vid det högsta hemindexet som testades (178) höjdes bilirubinhalt något i prov med hög bilirubinhalt och sambandet mellan hemoglobin och bilirubinhalt var större. Det var till största del provet med högt hemindex som gjorde att regressionslinjen visade mera korrelation och man måste ta i beaktande att bilirubinvärdet i detta prov (8471,9 nmol/L) låg nära den övre gränsen för metodens mätområde där precisionen kan vara sämre. Även om tidigare forskning (kap. 4) inte funnit någon signifikant interferens vid lägre hemoglobininnehåll kunde man göra följdundersökningar till om hemolys påverkar metoden.

Ett betydelsefullt problem var att mängden prover som kunde användas var låg. Detta gjorde att insamlingen av prover tog upp en stor del av undersökningsprocessen. Det kom heller aldrig några likvorprover från patienter med säker subaraknoidal blödning till laboratoriet så man kunde aldrig jämföra dessa mellan Cobas 6000 och spektrofotometern och man kunde därmed inte heller se vad ett positivt prov hade för värde. Man använde sig därför i många fall av artificiellt framtagna blandningar av prover som till stor grad skulle efterlikna riktiga prover t.ex. likvorpooler med tillsatt material från plasmapooler med hög bilirubinhalt.

Metoden är ännu under utveckling. För att den skall kunna tas i bruk fullständigt och överta den spektrofotometriska metoden krävs ännu referensvärden och ett gränsvärde för när ett prov är positivt eller negativt. Ungerer, m.fl. (2004, s. 1854-1855) påpekar att varje laboratorium bör bestämma sitt eget referensintervall samt gränsvärde för när ett prov kan räknas som positivt. Referensintervall fås genom att beräkna standardavvikelsen på många prover och därefter utesluta de 2,5 % högsta och 2,5 % lägsta värdena. De provresultat som ligger utanför referensgränserna räknas som onormala. (Ejlertsson 2012, s. 101). På grund av brist på provmaterial och tid kunde inga referensvärden ges under denna studie. Därför kan inget gränsvärde för när diagnosen subaraknoidalblödning är sann heller ges. Nästa

steg för utvecklandet av den nya metoden på Cobas 6000 kunde därmed vara att fastställa dessa värden.

För att uppskatta ett referensintervall kan man mäta likvorbilirubinhalten på ohemolyserade prover med normal proteinhalt hos patienter utan misstänkt subaraknoialblödning. Därefter kan standarddeviation och medelvärde fås hos normala prover. Genom att undersöka prover hos patienter med misstänkt subaraknoidal blödning i en roc-kurva och testa olika gränsvärden kan man få ett passande gränsvärde för när ett prov kan anses verkligt positivt eller negativt. (Ungerer, m.fl. 2004, s. 1854-1855).

Vid framställningen av gränsvärde kunde tidigare studiers resultat tas i beaktande för att ge en grund för vilka gränsvärden som kunde vara passande att testa. Spektrofotometermetoden påvisar subaraknoidalblödning vid en korrigerad nettbilirubinkoncentration på 0,007 vilket motsvarar ett värde på 166 nmol/L (Uotila 2008, s. 107-108). Ungerer, m.fl. (2004, s. 1855) kom i sin undersökning fram till att likvorprover med en bilirubinhalt under 359 nmol/L enligt Aerozet analyser kunde uteslutas från blödningsmisstanke. Jones & Roser (2006a) anser att 150 nmol/L kunde vara ett passande gränsvärde för TBILI-metoden på Cobas Modular. Man bör dock komma ihåg att ett eget gränsvärde måste bedömas eftersom de andra studierna använder andra analysatorer och metodreagenser.

Nästa steg i processen kunde vara att sammankoppla likvorbilirubinkörning med likvorproteinkörning på Cobas vilket skulle leda till att man får veta bilirubinkoncentrationerna på alla likvorprover som anländer till laboratoriet. Detta skulle ge många likvorbilirubinresultat som man kunde kontrollera standarddeviationen på för att få referensvärden och ett gränsvärde.

Likvorbilirubinundersökningen har installerats på Cobas 6000 så att man efter centrifugering av ett likvorprov kan sätta det i analysatorn och välja likvorbilirubinmetoden. Inget kontrollreagens har valts eftersom tanken är att metoden skall kunna kontrolleras med spektrofotometern t.ex. efter kalibrering. Man kommer att fortsätta utveckla och testa metoden genom t.ex. parallellkörning med Shimadzu så att man kan vara säker på att den ger fullständigt pålitliga resultat innan den möjligtvis kan tas i bruk till fullo. I framtiden kunde metoden för mätning av bilirubin i cerebrospinalvätska på

Cobas 6000 användas som standardmetod medan spektrofotometern Shimadzu UV-1700 kunde fungera som kontroll.

Litteraturförteckning

Ahmed, D.S., Larsson, A., Hillered, L., Wande, B. & Ryden, I. (2009). Quantitative Determination of Cerebrospinal Fluid Bilirubin on a High Throughput Chemistry Analyzer. *Clinical Laboratory*, 55 (7-8), 283-288.

Apperloo, J.J., van der Graaf, F., Dellelijn, L.I. & Vader, H.L. (2006). An improved laboratory protocol to assess subarachnoid haemorrhage in patients with negative cranial CT scan. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44 (8), 938-948.

Beetham, R. (2007). CSF bilirubin - spectrophotometry or direct measurement? *Annals of Clinical Biochemistry*, 44 (2) 99-100.

Beetham, R. (2009). CSF spectrophotometry for bilirubin - why and how? *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 69 (1) 1-7.

Blennow, K. & Zetterberg, H. (2012). Sjukdomar i centrala nervsystemet. Ingår i: P. Nilsson-Ehle, M. Berggren Söderlund & E. Theodorsson (red.), *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. (9. uppl.) Lund: Studentlitteratur AB.

Carter, R., Aldridge, S., Page, M. & Parker, S. (2009). *Aivot*. Helsinki: Readme.

Cruickshank, A., Auld, P., Beetham, R., Burrows, G., Egner, W., Holbrook, I., Keir, G., Lewis, E., Patel, D., Watson, I. & White, P. (2008). Revised national guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage. *Annals of Clinical Biochemistry*, 45 (3), 238-244.

Ejlertsson, G. (2012) *Statistik för hälsovetenskaperna*. (2. uppl.) Lund: Studentlitteratur.

Ericson, E. & Ericson, T. (2012). *Medicinska sjukdomar*. (4. uppl.) Lund: Studentlitteratur AB.

FitzGordon, J. (2012). *More on the Spinal Column: The Meninges*.

<http://blog.corewalking.com/more-on-the-spinal-column-the-meninges/> (hämtat: 10.10.2013).

Higgins, T., Beutler, E. & Dumas, B.T. (2008). Hemoglobin, Iron and Bilirubin. In: C.A. Burtis, E.R. Ashwood & D.E. Bruns (eds.), *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. (6th ed.) St. Louis: Elsevier Saunders.

Hoffbrand, A.V. & Moss, P.A.H. (2011). *Essential haematology*. (6th ed.) Chichester: Wiley-Blackwell.

Jones, G. & Roser, M. (2006a). Proceedings of the Australasian Association of Clinical Biochemists' 44th Annual Scientific Conference. O2 CSF BILIRUBIN MEASUREMENT ON THE ROCHE MODULAR: BETTER THAN SPECTROPHOTOMETRY? *The Clinical Biochemist Reviews*, 27 (4) S20.

Jones, G. & Roser, M. (2006b). *CSF Bilirubin Measurements on the Roche Modular: Better than Spectrophotometry?* Material for oral presentation at the Australasian Association of Clinical Biochemists' Annual Scientific Conference.
<http://www.sydney.stvincents.com.au/other/AACB2003.htm> (hämtat: 14.6.2013).

Koivisto, T., Frösen, J., Niemelä, M., Kangasniemi, M., Rinne, J., Ronkainen, A. & Hernesniemi, J. (2008). Aivoaltimoaneurysman hoito - onko koolla väliä? *Duodecim*, 124 (4), 383-391.

Linné, J-J. & Ringsrud, K-M. (1992). *Basic Techniques in Clinical Laboratory Science*. (3d ed.) St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.

Nilsson, O. (2007). Neurokirurgiska aspekter på cerebrala blödningar och infarkter. Ingår i: T. Mätzsch & A. Gottsäter (red.), *Stroke och cerebrovaskulär sjukdom*. Lund: Studentlitteratur AB.

Roche Diagnostics (2005). *cobas 6000. COBI-CD*. Document with background information for a better understanding of cobas 6000. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.

Roche Diagnostics (2008). *cobas® 6000 analyzer series. Flexibility you can build on*. Information sheet about the cobas 6000 series. Rotkreuz: Roche Diagnostics Ltd.

Roche Diagnostics (2012). *BILT3. Bilirubin Total Gen.3*. Information sheet about the BILT3 method. Mannheim: Roche diagnostics GmbH.

Roche Diagnostics, North America (2013). *cobas® 6000 analyzer series*.
<https://www.mylabonline.com/products/cobas6000/c6000.php> (hämtat: 9.10.2013).

Sand, O., Sjaastad, Ø.V., Haug, E. & Bjålie, J.G. (2007). *Människokroppen. Fysiologi och anatomi*. (2. uppl.) Stockholm: Liber AB.

Terént, A. (2009). Cerebrovaskulär sjukdom. Ingår i: F. Lindgärde, T. Thulin & J. Östergren (red.), *Kärleksjukdom. Vaskulär medicin*. (3. uppl.) Lund: Studentlitteratur AB.

Ungerer, P.J., Southby, S.J, Florkowski, C.M. & George, P.M. (2004). Automated Measurement of Cerebrospinal Fluid Bilirubin in Suspected Subarachnoid Hemorrhage. *Clinical Chemistry*, 50 (10), 1854-1856.

Uotila, L. (2008). Likvorin spektri - tutkimuksen merkitys subaraknoidaalivuodon diagnostiikassa. *Kliinlab*, 2008 (6), 105-110.

Väisänen, M. (2012). *uS-Tyreotropiini*. <http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/se/default.htm> (hämtat: 4.11.2013).

Young, D.S., Bermes, E. W. & Haverstick, D.M. (2008). Specimen Collection and Other Preanalytical Variables. In: C.A. Burtis, E.R. Ashwood & D.E. Bruns (eds.), *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. (6th ed.) St. Louis: Elsevier Saunders.

Zuccarello, M. & Ringer, A. (2013). *Subarachnoid hemorrhage (SAH)*.
<http://www.mayfieldclinic.com/PE-SAH.HTM#.UlaH4CpXuIA> (hämtat: 10.10.2013)

Cobas bilirubinhalt (nmol/L)	Uträknade bilirubinvärden (nmol/L)
8150,5	8000
5969,4	6000
4155,6	4000
2020,4	2000
1079,1	1000
596,9	500
45,9	0

a) Analysresultat för jämförelse mellan Cobas 6000 och uträknade värden.

Cobas bilirubinhalt (nmol/L)	Shimadzu bilirubinvärden (nmol/L)
8150,5	8048
5969,4	5971
4155,6	4024
2020,4	1947
1079,1	1038
596,9	519
45,9	0

b) Analysresultat för jämförelse mellan Cobas 6000 och Shimadzu.

Cobas bilirubinhalt körning 1 (nmol/L)	Cobas bilirubinhalt körning 2 (nmol/L)
7783,2	7714,3
5877,6	5785,7
4063,8	3994,9
1882,7	1928,6
1079,1	1010,2
665,8	574
45,9	45,9

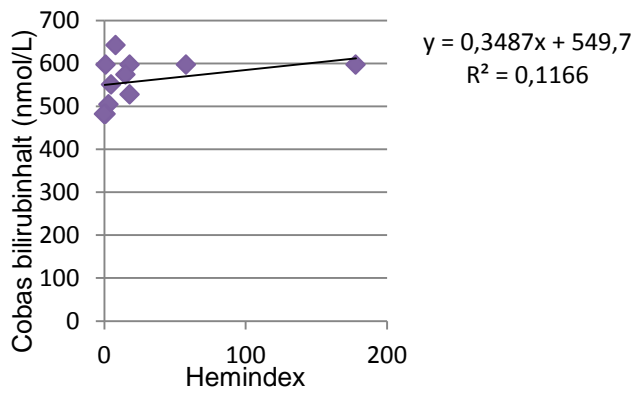
c) Analysresultat för jämförelse mellan två mätningar på Cobas 6000 vid höga bilirubinvärden.

Cobas bilirubinhalt körning 1 (nmol/L)	Cobas bilirubinhalt körning 2 (nmol/L)
45,9	23
137,8	68,9
229,6	229,6
298,5	229,6
413,3	298,5
551	505,1
619,9	596,9
619,9	665,8
757,7	803,6
849,5	826,5
918,4	872,4

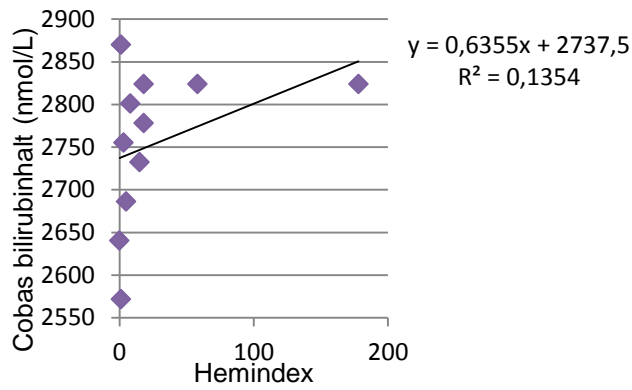
d) Analysresultat för jämförelse mellan två mätningar på Cobas 6000 vid låga bilirubinvärden.

Prov	Hemindex	Likvorprovers ursprungliga bilirubinhalt (nmol/L)	Mätning 1 utan ursprunglig bilirubinhalt (nmol/L)	Mätning 2 utan ursprunglig bilirubinhalt (nmol/L)	Mätning 3 utan ursprunglig bilirubinhalt (nmol/L)
1	178	114,8	596,9	2824	8471,9
2	58	23	596,9	2823,9	7668,3
3	18	23	528	2778	7897,9
4	18	160,7	597	2824	7645,4
5	15	45,9	574	2732,2	7852,1
6	8	114,8	642,9	2801	7645,4
7	5	160,7	551	2686,2	7668,4
8	3	68,9	505,1	2755,1	7691,3
9	1	91,8	482,2	2571,5	7553,6
10	1	23	596,9	2869,9	7897,9
11	0	160,7	482,2	2640,3	7438,8

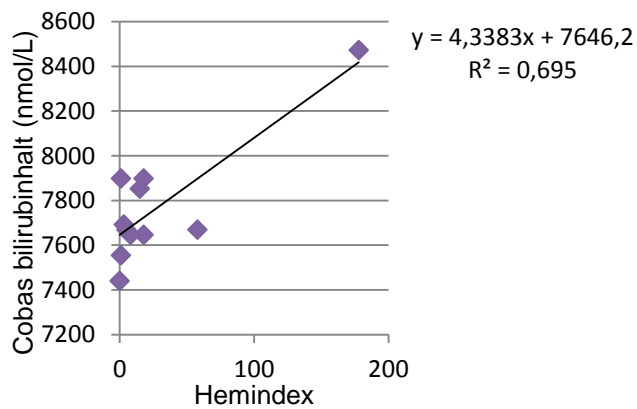
a) Analysresultat från Cobas för undersökning av hemoglobininterferens.



b) Regressionsanalys från hemoglobininterferenstest mätning 1.



c) Regressionsanalys från hemoglobininterferenstest mätning 2.



d) Regressionsanalys från hemoglobininterferenstest mätning 3.