

Oznaczanie leukocytów w ubogoleukocytarnych składnikach krwi w systemie ADAM r-WBC

ADAM r-WBC system used for leukocyte measurement in leukoreduced blood components

Agata Płodzich¹, Elżbieta Lachert¹, Jolanta Kubis¹, Jolanta Antoniewicz-Papis¹,
 Ewa Rudowska², Maria Bukowy², Bożena Drybańska², Stanisław Dyląg²,
 Magdalena Łętowska¹

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach

Streszczenie

Jedyną skuteczną metodą otrzymania ubogoleukocytarnych składników krwi jest poddanie ich filtracji przy użyciu filtrów antyleukocytarnych. W pracach na temat usuwania leukocytów ze składników krwi stwierdzono, że leukoredukcja nie tylko zapobiega przeniesieniu czynników zakaźnych, niehemolitycznym reakcjom gorączkowym oraz zmniejsza ryzyko alloimmunizacji HLA, ale także zapobiega wystąpieniu oporności na przetaczanie krwinek płytkowych. W centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa (CKiK) na terenie Polski od wielu lat stosuje się procedury usuwania leukocytów ze składników krwi przeznaczonych dla pacjentów wymagających stosowania tylko składników ubogoleukocytarnych. Kryteria akceptacji dla zawartości leukocytów pozwalające zakwalifikować składnik krwi jako ubogoleukocytarny (tzw. zakresy normy) są różne w Europie i w Ameryce Północnej. Według standardów Rady Europy oraz zaleceń Dyrektywy 2002/98/EC składniki krwi przeznaczone do przetoczenia uznaje się za ubogoleukocytarne, jeżeli zawierają poniżej 1×10^6 leukocytów/jednostkę. Norma ta obowiązuje również w Polsce. Wdrażanie europejskich wytycznych w zakresie zmniejszania zawartości leukocytów w krwi i jej składnikach wymaga stosowania szybkich i wiarygodnych metod kontroli jakości. Ostatnio coraz większym zainteresowaniem cieszy się urządzenie ADAM r-WBC (Advanced Detection Accurate Measurement, Nano Entek, Seul, Korea Płd.), stosowane do oznaczania liczby leukocytów w ubogoleukocytarnych koncentratkach krwinek czerwonych (UKKCz) i ubogoleukocytarnych koncentratkach krwinek płytkowych (UKKP). Urządzenie to jest alternatywą dla dotychczasowych metod liczenia leukocytów w ubogoleukocytarnych składnikach krwi. Celem niniejszej pracy było porównanie wyników oznaczania liczby leukocytów w ubogoleukocytarnych składnikach krwi przy zastosowaniu 3 metod: mikroskopowej, cytometrii przepływowej i automatycznej z wykorzystaniem systemu ADAM r-WBC. Badania prowadzono w dwóch ośrodkach — w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) w Warszawie (etap I) oraz w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Katowicach (etap II, po weryfikacji producenta i ponownej walidacji). W etapie I wykorzystano 94 próbki pobrane z UKKP i 34 próbki z UKKCz, zaś w etapie II użyto 29 próbek UKKP i 26 UKKCz. Wyniki etapu I wykazały, że liczba leukocytów oznaczona za pomocą systemu ADAM r-WBC

Adres do korespondencji: mgr Agata Płodzich, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 87, e-mail: aplodzich@ihit.waw.pl

była znacznie wyższa („falszywie” zawyżona) niż uzyskana przy użyciu metody mikroskopowej. Pomimo zawyżonych wyników uzyskanych w I etapie badań, w RCKiK w Katowicach urządzenie ADAM r-WBC jest rutynowo stosowane do oznaczania liczby leukocytów w preparatach ubogoleukocytarnych, ponieważ zostało poddane weryfikacji zgodnie z uwagami IHiT i RCKiK, jak również ponownej walidacji.

Słowa kluczowe: leukoredukcja, ubogoleukocytarne składniki krwi, system ADAM r-WBC
J. Transf. Med. 2015; 8: 97–108

Summary

The only effective method of obtaining leukoreduced blood components is filtration. Literature on leukoreduction reports that implementation of leukocyte reduction in blood components minimizes the risk of transmission of bacterial or viral infections, non-hemolytic febrile reactions, alloimmunization with HLA antigens as well as platelet transfusion refractoriness. In the Polish Blood Transfusion Centers leukoreduction has been used for many years now for the preparation of blood components dedicated to patients who can be administered only leukoreduced blood components. Standards set for residual leukocyte count (a component to be marked as leukoreduced) are different for Europe and the United States. European standards set the residual leukocyte count below 1×10^6 leukocytes per unit of blood component. The criterium is also obligatory in Poland. European recommendations for leukoreduction require the implementation of effective and reliable methods of quality control. Much attention has lately been paid to the ADAM r-WBC system (Advanced Detection Accurate Measurement, Nano Entek, Seoul, South Korea) based on counting WBCs in leukoreduced red blood cell concentrates (RBCCs) and leukoreduced platelet concentrates (PCs). The method was developed as an alternative to the hitherto used methods of residual leukocyte measurements in leukodepleted blood components. The aim of the study was to compare the leukocyte count measurements in leukoreduced RBCCs and leukoreduced PCs performed with 3 methods: microscopic, flow cytometry and automatic with ADAM r-WBC system. The study was conducted in two centers; the Institute of Hematology and Transfusion Medicine (IHTM — stage I) and in the Regional Blood Transfusion Center in Katowice (RBTC — stage II, following manufacturer's verification and repeated validation). In stage I we used 94 samples of leukoreduced PCs and 34 samples of RBCC while in stage II — 29 samples of PCs and 26 samples of RBCC. The results of study stage I revealed that the residual leukocyte count measured with ADAM r-WBC system was much higher than the measurement with the microscopic method. Despite the higher values obtained in study stage I, the ADAM r-WBC system is in routine use for the measurement of residual leukocyte count in leukoreduced blood components at RBTC in Katowice as the system/equipment was verified and re-validated by the manufacturer according to the recommendations of IHTM and RBTC in Katowice.

Key words: leukoreduction, leukoreduced blood components, ADAM r-WBC system
J. Transf. Med. 2015; 8: 97–108

Wstęp

Procedura usuwania leukocytów z komórkowych składników krwi stosowana jest w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa oraz w podmiotach leczniczych od wielu lat. Początkowo procedurę tę stosowano przede wszystkim w celu zapobiegania alloimmunizacji biorców antygenami układu zgodności tkankowej (HLA, *human leucocyte*

antigen system) oraz niehemolitycznym reakcją gorączkową [1]. Postęp w tej dziedzinie wiedzy wykazał, że zastosowanie filtrów w celu usunięcia leukocytów z komórkowych składników krwi (leukoredukcja) zmniejsza ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych przez drobnoustroje zawarte w leukocytach. Do drobnoustrojów tych zalicza się na przykład wirusa cytomegalii (CMV, *cytomegalovirus*), wirusa białaczki/chłoniaka (HTLV, *human*

Tabela 1. Reakcje poprzetoczeniowe

Table 1. Post transfusion reactions

Reakcje poprzetoczeniowe	Czynnik wywołujący
TA-GvHD	Limfocyty T dawcy
Mikrochimerizm	Leukocyty dawcy (limfocyty)
Alloimmunizacja HLA	Leukocyty dawcy (przeważnie komórki prezentujące antygen)
TRALI	Przeciwciała dawcy (anty-HLA klasy I lub klasy II i przeciwciała antyneutrofilowe)
FNHTR	Cytokiny z leukocytów dawcy podczas przechowywania
TRIM	Immunomodulacja limfocytami T i/lub osoczem
Przeniesienie czynników zakaźnych	Czynniki zakaźne związane z komórkami

HLA (*human leucocyte antigen*) — układ zgodności tkankowej; FNHTR (*febrile nonhaemolytic transfusion reaction*) — niehemolityczny gorączkowy odczyn poprzetoczeniowy; TA-GvHD (*transfusion-associated graft versus host disease*) — poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciwko biocy; TRALI (*transfusion-related acute lung injury*) — poprzetoczeniowa ostra niewydolność oddechowa; TRIM (*transfusion related immunomodulation*) — immunomodulacja

T-lymphotropic virus) i wirusa Epsteina-Barr (EBV, *Epstein-Barr virus*). Pojawienie się doniesień na temat możliwości przeniesienia wariantu choroby Creutzfeldta-Jakoba (vCJD, *variant form of Creutzfeldt-Jakob disease*) drogą transfuzji, brak możliwości detekcji prionów we krwi oraz przypuszczenia, że stosowanie ubogoleukocytarnych składników może zapobiegać potransfuzyjnemu vCJD spowodowały wprowadzenie w 1998 roku powszechnej 100-procentowej leukoredukcji w niektórych krajach europejskich (Austria, Szwajcaria, Niemcy, Finlandia, Francja, Wielka Brytania, Irlandia, Luksemburg, Holandia, Norwegia, Portugalia). Pozostałe kraje Europy stosują leukoredukcję w ograniczonym zakresie [2]. Stwierdzono ponadto, że stosowanie ubogoleukocytarnych składników krwi zmniejsza ryzyko przeniesienia riketsji, na przykład *Orientia tsutsugamushi* odpowiedzialnej za występowanie choroby tsutsugamusi¹ [3, 4].

Jedyną skuteczną metodą otrzymania ubogoleukocytarnych składników krwi jest poddanie ich filtracji przy użyciu filtrów antyleukocytarnych (przyłózków i laboratoryjnych). Dobrą praktyką jest stosowanie filtrów antyleukocytarnych po wcześniejszym pozostawieniu świeżo pobranej krwi na kilka godzin w temperaturze pokojowej (następuje wówczas fagocytoza bakterii, które mogły dostać się do pojemnika). Taki tryb postępowania umożliwia usunięcie, wraz z leukocytami, bakterii znajdujących się w ich wnętrzu. W licznych pracach na temat usuwania leukocytów ze składników krwi stwierdzono, że leukoredukcja nie tylko zapobiega przeniesieniu czynników zakaźnych, niehemolitycznym reakcjom gorączkowym oraz zmniejsza ryzyko wystąpienia alloimmunizacji HLA, ale także

zapobiega wystąpieniu oporności na przetaczanie krwinek płytkowych. W tabeli 1 przedstawiono inne reakcje poprzetoczeniowe, których przyczyną mogą być leukocyty.

W centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa (CKiK) na terenie Polski od wielu lat stosuje się procedury usuwania leukocytów z krwi i składników krwi, które przeznaczone są dla szczególnej grupy pacjentów wymagających stosowania tylko składników ubogoleukocytarnych. W tabeli 2 przedstawiono zawartość leukocytów w składnikach krwi niepoddanych procesowi filtracji (od 50×10^6 do $0,1 \times 10^9$ komórek w jednostce składnika) [5].

Zasadniczym ograniczeniem wprowadzania leukoredukcji w celu otrzymania ubogoleukocytarnych składników krwi są wysokie koszty stosowanych w tym celu procedur.

Wprowadzie w wyniku stosowania niektórych metod preparatyki, takich jak przemywanie komórkowych składników krwi solą fizjologiczną lub oddzielanie kożuszka leukocytarno-płytkowego po odwirowaniu krwi pełnej, otrzymuje się składniki krwi o zmniejszonej zawartości leukocytów, ale nadal jedynym skutecznym rozwiązaniem umożliwiającym otrzymanie ubogoleukocytarnych składników krwi jest zastosowanie specjalnych filtrów lub nowoczesnych separatorów komórkowych wyposażonych w komorę leukoredukcyjną (LRS, *leukocyte reduction system*), na przykład *Trima Accel (Terumo BCT)*, *Amicus LRS v. 2.37 (Fenwal)* czy *Cobe-Spectra LRS Turbo v. 7.0* [6].

W państwach Europy i w Ameryce Północnej obowiązują różne kryteria akceptacji (tzw. zakresy normy) dla zawartości leukocytów, pozwalające

¹Ostra choroba zakaźna o przebiegu podobnym do duru plamistego, występująca w Japonii i Indonezji

Tabela 2. Zawartość leukocytów w krwi i jej składnikach [wg 5]**Table 2.** Leukocyte count in blood and blood components

Rodzaj składnika krwi	Liczba leukocytów
UKP	$< 1 \times 10^6$ /jednostkę składnika
KKCz bez koż. I.–pł.	$< 1,2 \times 10^9$ /jednostkę składnika
UKKCz	$< 1 \times 10^6$ /jednostkę składnika
KKP z osocza bogatopłytkowego	$< 200 \times 10^6$ /jednostkę składnika
KKP z koż. I.–pł.	$< 50 \times 10^6$ /jednostkę składnika
KKP–Af	$< 300 \times 10^6$ /jednostkę składnika
UKKP	$< 1,0 \times 10^6$ /jednostkę składnika
FFP	$< 0,1 \times 10^9/l$

FFP (*fresh frozen plasma*) — osocze świeżo mrożone; KKCz — koncentrat krwinek czerwonych; KKCz bez koż. I.–pł. — koncentrat krwinek czerwonych bez kożuska leukocyтарно-pltkowego; KKP — koncentrat krwinek płytkowych; KKP–Af — koncentrat krwinek płytkowych otrzymany metodą automatycznej aferezy; KKP z koż. I.–pł. — koncentrat krwinek płytkowych bez kożuska leukocyтарно-pltkowego; UKKCz — ubogoleukocyтарny koncentrat krwinek czerwonych; UKKP — ubogoleukocyтарny koncentrat krwinek płytkowych; UKP — ubogoleukocyтарna krew pełna

sklasyfikować składnik krwi jako ubogoleukocyтарny. Według zaleceń Departamentu Kontroli Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) składniki krwi uznaje się za ubogoleukocyтарne, jeśli zawierają mniej niż 5×10^6 leukocytów/jednostkę składnika [7]. Według standardów Rady Europy (*Council of Europe*) oraz zaleceń Dyrektywy 2002/98/EC Unii Europejskiej składniki krwi przeznaczone do przetoczenia uznaje się za ubogoleukocyтарne, jeżeli zawierają mniej niż 1×10^6 leukocytów/jednostkę. Norma ta obowiązuje również w Polsce.

Systematyczne wdrażanie europejskich wytycznych w zakresie zmniejszenia zawartości leukocytów w krwi i jej składnikach wymaga stosowania szybkich i wiarygodnych metod kontroli jakości [8]. Tylko niektóre parametry kontroli jakości składników krwi (np. hemoglobina, hematokryt) można oznaczać przy użyciu najnowszej generacji analizatorów hematologicznych; ze względu na zbyt niską czułość większości z nich nie można stosować do oznaczania liczby leukocytów w ubogoleukocyтарnych składnikach krwi [9]. Z tego względu od wielu lat zanieczyszczenia leukocyтарne w składnikach krwi oznaczane są za pomocą metody mikroskopowej z wykorzystaniem komory Nageotte lub metody cytometrii przepływowej (FC, *flow cytometry*).

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem cieszy się urządzenie *Advanced Detection Accurate Measurement r-white blood cells* (ADAM r-WBC [Nano Entek, Seul, Korea Płd.]), stosowane do oznaczania liczby leukocytów w ubogoleukocyтарnych koncentratach krwinek czerwonych (UKKCz) i ubogoleukocyтарnych

koncentratach krwinek płytkowych (UKKP), stanowiące alternatywę dla dotychczasowych metod liczenia leukocytów w ubogoleukocyтарnych składnikach krwi.

Celem niniejszej pracy było porównanie wyników oznaczania liczby leukocytów w ubogoleukocyтарnych składnikach krwi przy zastosowaniu trzech metod:

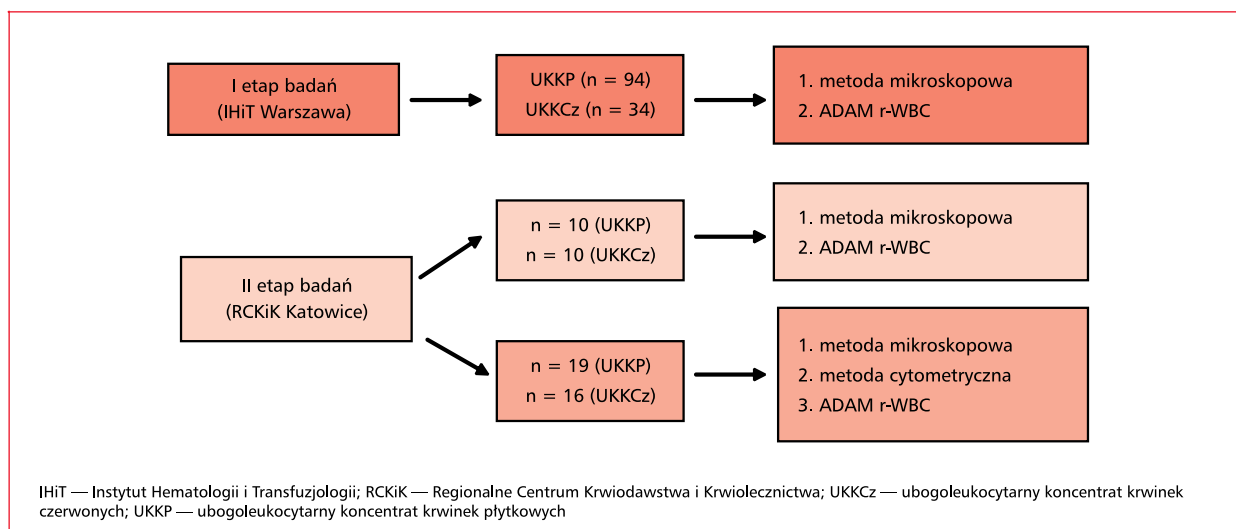
- mikroskopowej z wykorzystaniem komory Nageotte;
- FC;
- automatycznej z wykorzystaniem systemu ADAM r-WBC.

Material i metody

Badania prowadzono w dwóch etapach. Pierwszy etap badań wykonano w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) w Warszawie. Oznaczając leukocyty za pomocą urządzenia ADAM r-WBC, uzyskano znaczny odsetek wyników fałszywie zawyżonych/dodatnich ($> 25\%$) w porównaniu z metodą mikroskopową, dlatego zwrócono się do dostawcy urządzenia z prośbą o zweryfikowanie poprawności jego pracy i ponowną walidację. Drugi etap badań (po weryfikacji producenta i ponownej walidacji) przeprowadzono w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Katowicach (ryc. 1). Wszystkie obliczenia przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane przy użyciu programu MS Excel.

Material

Do badań prowadzonych w IHiT w Warszawie wykorzystano 94 próbki pobrane z UKKP i 34 próbki



Rycina 1. Schemat przeprowadzonych badań

Figure 1. Study diagram

z UKKCz, a do badań przeprowadzonych w RCKiK w Katowicach użyto 29 próbek UKKP i 26 UKKCz. Próbkę do badań pobierano w postaci zamkniętych odcinków drenów o długości około 10 cm.

Metody oznaczania liczby leukocytów

Metoda mikroskopowa

Do oznaczania leukocytów w ubogoleukocytarnych składnikach krwi wykorzystano komorę Nageotte z podwójną podziałką sieciową o głębokości 0,5 mm, powierzchni podstawy odpowiadającej 100 mm², z siatką podzieloną na 40 prostokątów o powierzchni wynoszącej 2,5 mm² (ryc. 2).

Przygotowanie próbek ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek czerwonych

W próbówce sporządzano 10-krotne rozcieńczenie badanej próbki (0,9 ml płynu Türka + 0,1 ml UKKCz). Następnie próbówkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, mieszano i наносono pipetą pasteurowską na siatkę komory Nageotte. Komorę Nageotte inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Leukocyty liczono na całej powierzchni siatki komory Nageotte (wszystkie paski). Zawartość leukocytów w 1 μl UKKCz obliczano według następującego wzoru:

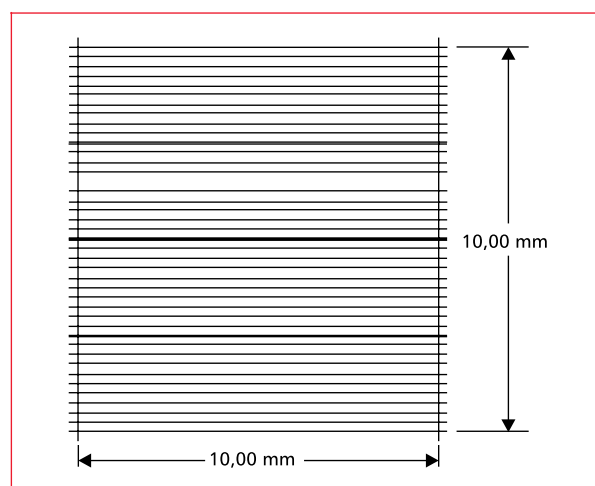
$$X = n \times 0,2$$

gdzie:

X — liczba leukocytów/μl UKKCz

n — liczba leukocytów na całej powierzchni siatki

0,2 — współczynnik uwzględniający rozcieńczenie i objętość komory Nageotte.



Rycina 2. Siatka komory Nageotte

Figure 2. Nageotte chamber grid

Przygotowanie próbek ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek płytkowych

W próbówce sporządzano 5-krotne rozcieńczenie badanej próbki (0,8 ml płynu Türka + 0,2 ml UKKP). Następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, mieszano i наносono pipetą pasteurowską na siatkę komory Nageotte. Komorę Nageotte inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Leukocyty liczono na całej powierzchni siatki komory Nageotte (wszystkie paski). Zawartość leukocytów w 1 μl UKKP obliczano według następującego wzoru:

$$X = n \times 0,1$$

gdzie:

X — liczba leukocytów/ μ l UKKP

n — liczba leukocytów na całej powierzchni siatki

0,1 — współczynnik uwzględniający rozcieńczenie i objętość komory Nageotte.

Metoda cytometryczna

Oznaczanie leukocytów wykonano przy użyciu cytometru przepływowego *FACS Calibur firmy Becton Dickinson* (Stany Zjednoczone). Zastosowano przeciwciała monoklonalne sprzężone z jodkiem propidyny (PI, *propidium iodide*), który wybarwia kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, *deoxyribonucleic acid*) w jądrach komórkowych krwinek białych. Pomiar polega na analizie światła rozproszonego przez komórki oraz fluorescencji emitowanej na skutek wzbudzenia barwnika. Otrzymane wyniki prezentowano w postaci graficznej i liczbowej. Kontrolę jakości cytometru przeprowadzano w programie *BD FACS Comp* (Stany Zjednoczone), służącym do monitorowania pracy urządzenia oraz automatycznego ustawiania cytometru.

Przygotowanie próbek

Liczbę leukocytów w próbkach pobranych z ubogoleukocytarnych składników krwi oznaczano do 48 godzin po przeprowadzeniu procesu usuwania leukocytów (leukoredukcji). Do tego czasu próbki przechowywano w takich samych warunkach jak składniki krwi, z których zostały pobrane.

Test do oznaczania krwinek białych w ubogoleukocytarnych składnikach krwi (UKKP, UKKCz) — *Leucocount BD Kit*

Przed otwarciem zestawu, odczynniki i próbki *BD Trucount (BD Biosciences, USA)* doprowadzono do temperatury pokojowej. Przygotowywano próbki *BD Trucount* i odpowiednio je oznaczano. Do opisanych próbek dodawano po 100 μ l dobrze wymieszanej próbki UKKCz i odpowiednich kontroli, stosując odwrotne pipetowanie. Następnie do każdej próbki dodawano 400 μ l odczynnika *BD Leucocount (BD Biosciences, USA)* i delikatnie mieszano. Probówki inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, w ciemnym miejscu, gdzie także przechowywano próbki do czasu wykonania analizy. Przed wykonaniem właściwego oznaczenia przeprowadzano badanie próbek kontrolnych. Po pozytywnym zatwierdzeniu wyniku próbek kontrolnych przystępowano do wykonania oznaczenia leukocytów w badanych próbkach.

Metoda automatyczna z wykorzystaniem urządzenia ADAM r-WBC

W urządzeniu ADAM r-WBC zastosowano metodę mikroskopii fluorescencyjnej. Polega ona na wykorzystaniu PI, który barwi wyłącznie komórki zawierające DNA, zatem w próbkach składników krwi barwi tylko leukocyty, ponieważ tylko one zawierają DNA (w odróżnieniu od krwinek czerwonych i krwinek płytkowych).

Skład zestawu

W skład zestawu wchodzi urządzenie, za którego pomocą wykonywane są oznaczenia, jak również mały monitor umożliwiający śledzenie wyników pomiaru (ryc. 3). Do urządzenia dołączono czytnik kodów kreskowych umożliwiający odczytywanie numeru donacji bez konieczności ręcznego wprowadzania danych do systemu. Dodatkowo istnieje możliwość podłączenia komputera ze specjalnym oprogramowaniem, co znacznie podnosi funkcjonalność systemu.

Zestaw do wykonywania oznaczeń obejmuje:

- roztwór standardowy do wykonywania kalibracji urządzenia (ryc. 4);
- roztwór r-Solution zawierający PI (ryc. 5);
- płytki jednorazowego użytku (r-Slide), na które nanoszone są badane próbki (ryc. 6).

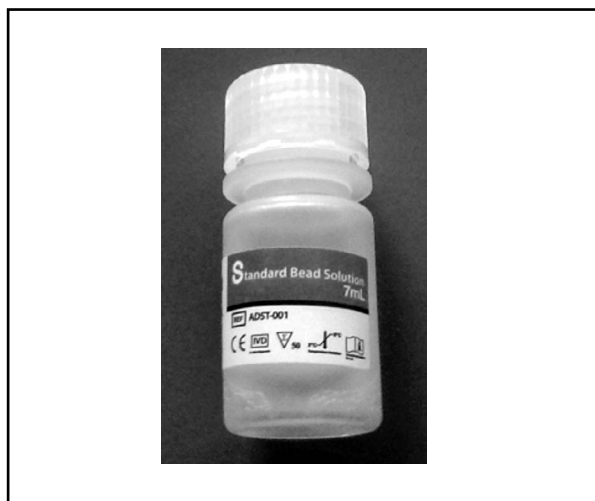
Kalibracja systemu

Przed przystąpieniem do wykonywania badań za każdym razem przeprowadzano kalibrację urządzenia za pomocą roztworu standardowego (Standard). Na płytkę r-Slide nanoszono 100 μ l roztworu standardowego, inkubowano przez 30 sekund, następnie umieszczano płytkę w systemie i rozpoczynano pomiar. Oczekiwany wynik pomiaru



Rycina 3. Urządzenie ADAM r-WBC

Figure 3. ADAM r-WBC system



Rycina 4. Roztwór standardowy

Figure 4. Standard solution



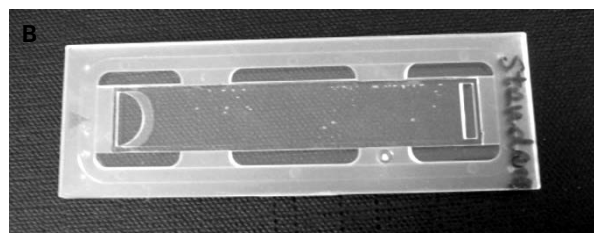
Rycina 5. Roztwór r-Solution

Figure 5. r-Solution

powinien mieścić się w zakresie $\pm 10\%$ wartości umieszczonej na etykiecie odczynnika, to jest $109/\mu\text{l}$ (zakres od $98,1/\mu\text{l}$ do $119,9/\mu\text{l}$). Po uzyskaniu pozytywnego wyniku kalibracji przystępowano do pobierania i przygotowania próbek do badań.

Procedura oznaczania leukocytów w systemie ADAM r-WBC

Mieszaninę badanej próbki i roztworu r-Solution przygotowano w stosunku 1:4 ($100 \mu\text{l}$ badanej próbki + $400 \mu\text{l}$ roztworu r-Solution). Po dokładnym wymieszaniu $100 \mu\text{l}$ mieszaniny nanoszono na płytkę r-Slide w sposób uniemożliwiający powstawanie pęcherzyków powietrza,



Rycina 6. Płytkę r-Slide

Figure 6. r-Slide



Rycina 7. Nanoszenie badanej próbki na płytkę r-Slide

Figure 7. Sample preparation

które mogłyby wpływać na wiarygodność wyników (ryc. 7).

Przed przystąpieniem do wykonywania oznaczeń do systemu komputerowego wprowadzono następujące dane: data i godzina, numer donacji oraz objętość badanego składnika. Wprowadzanie informacji o objętości badanego składnika krwi umożliwiło uzyskanie informacji dotyczącej zawartości leukocytów w badanym preparacie. Po uzupełnieniu wszystkich niezbędnych danych płytkę r-Slide inkubowano w temperaturze pokojowej przez 4 minuty, następnie umieszczano w komorze



Rycina 8. Umieszczanie płytki r-Slide w komorze urządzenia

Figure 8. Sample loading

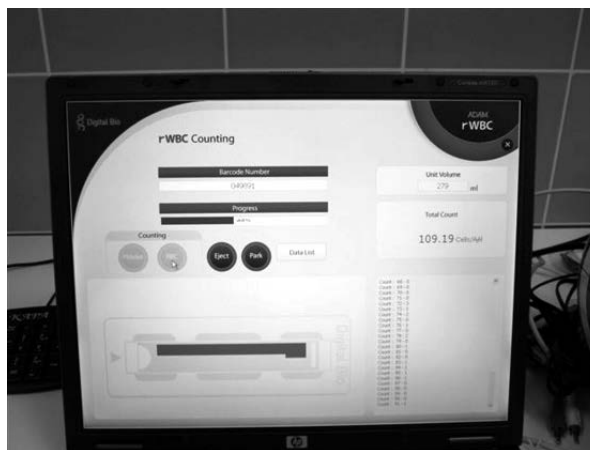
urządzenia (ryc. 8) i w zależności od rodzaju badanego składnika krwi wybierano przycisk „Platelet” (dla UKKP) lub „RBC” (dla UKKCz). Po około 3 minutach odczytywano wynik końcowy, informujący o całkowitej zawartości leukocytów w UKKCz lub UKKP. Dzięki zastosowaniu specjalistycznego oprogramowania komputerowego można było śledzić proces oznaczania na monitorze komputera (ryc. 9).

Wyniki

Wyniki badań przeprowadzonych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

W badaniach prowadzonych w IHiT w Warszawie liczbę leukocytów w UKKCz i w UKKP oznaczano przy użyciu metody mikroskopowej oraz urządzenia ADAM r-WBC. Na podstawie przeprowadzonych badań 23/34 (68%) preparaty UKKCz zakwalifikowano jako ubogoleukocytarne. Pozostałych 11 preparatów (32%) badanych za pomocą urządzenia ADAM r-WBC nie zakwalifikowano jako ubogoleukocytarne, ponieważ zawierały więcej niż 1×10^6 leukocytów/jednostkę (ryc. 10). Wyniki badania za pomocą metody mikroskopowej wykazały, że wszystkie 34 jednostki koncentratów krwinek czerwonych można zakwalifikować jako ubogoleukocytarne ($< 1 \times 10^6$ leukocytów/jednostkę) (ryc. 11).

W przypadku UKKP 81/94 preparatów (86%) zakwalifikowano jako składniki ubogoleukocytarne, a w 13 (14%) stwierdzono liczbę leukocytów wyższą niż 1×10^6 (ryc. 10). W badaniu przeprowadzonym za pomocą metody mikroskopowej wykazano, że wszystkie jednostki UKKP można



Rycina 9. Monitorowanie postępów badania na ekranie komputera

Figure 9. Computer monitoring

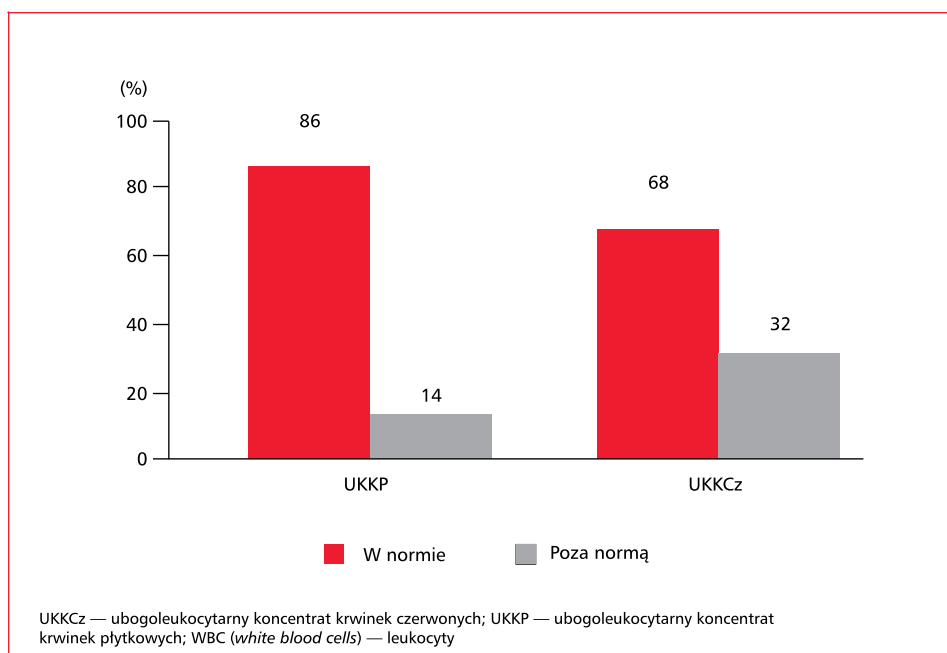
zakwalifikować jako ubogoleukocytarne (ryc. 11). Dodatkowo w 13 preparatach wykazano znacznie wyższą zawartość leukocytów oznaczonych za pomocą urządzenia ADAM r-WBC w porównaniu z metodą mikroskopową (ryc. 10).

W tabeli 3 przedstawiono wyniki średniej liczby leukocytów oznaczanych w UKKP i UKKCz przy użyciu metody mikroskopowej i urządzenia ADAM r-WBC. Badaniom poddano 94 jednostki UKKP i stwierdzono, że średnia liczba leukocytów w jednostce wynosi $0,62 \times 10^6$ przy zastosowaniu urządzenia ADAM r-WBC i $0,03 \times 10^6$ przy użyciu metody mikroskopowej. Badaniom poddano 34 jednostki UKKCz i stwierdzono, że średnia zawartość leukocytów w jednostce wynosi $1,17 \times 10^6$ przy zastosowaniu systemu ADAM r-WBC i $0,02 \times 10^6$ przy użyciu metody mikroskopowej. Porównując wyniki uzyskane przy zastosowaniu obu metod, stwierdzono znaczne różnice zarówno w przypadku UKKP (do $1,39 \times 10^6$), jak i UKKCz (do $3,9 \times 10^6$).

Wyniki badań wykonanych w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach

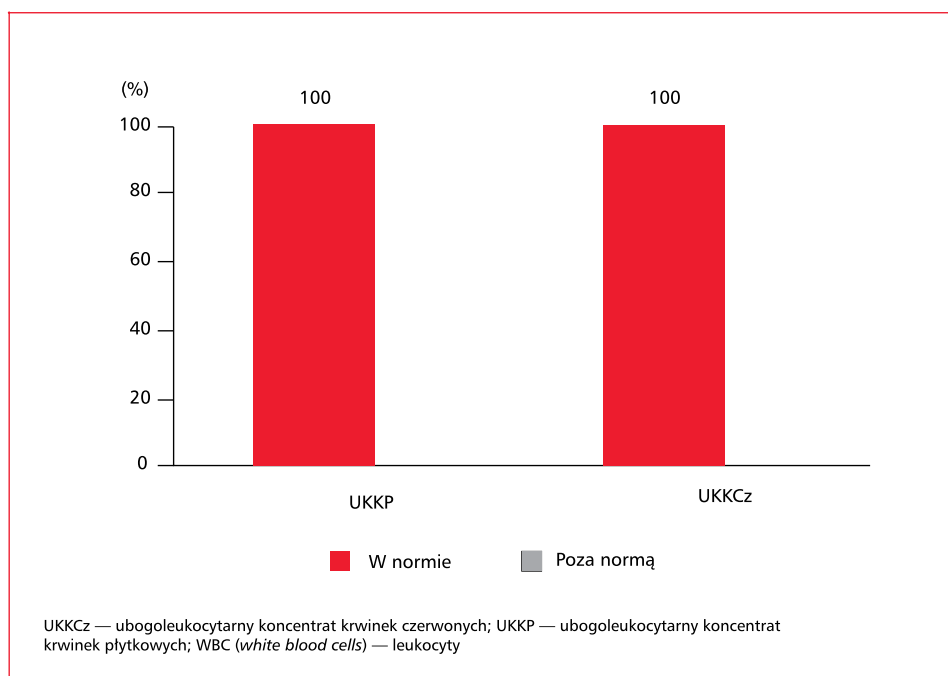
W RCKIK w Katowicach badania w 20 próbkach (10 UKKCz i 10 UKKP) wykonano za pomocą metody mikroskopowej, FC oraz urządzenia ADAM r-WBC. W kolejnych 35 próbkach (16 UKKCz i 19 UKKP) zastosowano metodę mikroskopową oraz urządzenie ADAM r-WBC.

W tabeli 4 przedstawiono średnią zawartość leukocytów w 10 próbkach badanych trzema metodami, a w tabeli 5 średnią liczbę leukocytów we wszystkich preparatach badanych za pomocą



Rycina 10. Odsetek preparatów spełniających zakres normy — wyniki uzyskane w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie przy zastosowaniu systemu ADAM r-WBC

Figure 10. Blood components within normal range (%); IHTM study results with ADAM r-WBC system



Rycina 11. Odsetek preparatów spełniających zakres normy — wyniki uzyskane w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie przy zastosowaniu metody mikroskopowej

Figure 11. Blood components within normal range (%); IHTM study results with microscopic method

Tabela 3. Średnia liczba leukocytów w próbkach badanych 2 technikami (IHIT Warszawa)**Table 3.** Mean leukocyte count in IHTM samples; measurement with 2 methods

Rodzaj składnika	Średnia liczba WBC/ μ l			Średnia liczba WBC $\times 10^6$ /jednostkę	
	n	ADAM r-WBC	Metoda mikroskopowa	ADAM r-WBC	Metoda mikroskopowa
UKKP	94	2,28	0,10	0,62	0,03
UKKCz	34	4,39	0,07	1,17	0,02

UKKCz — ubogoleukocytny koncentrat krwinek czerwonych; UKKP — ubogoleukocytny koncentrat krwinek płytkowych; WBC (*white blood cells*) — leukocyty

Tabela 4. Średnia liczba leukocytów w 10 próbkach badanych trzema technikami (RCKiK Katowice)**Table 4.** Mean leukocyte count in 10 RBTC Katowice samples; 3 methods of measurement

Rodzaj składnika	Średnia liczba WBC/ μ l				Średnia liczba WBC $\times 10^6$ /jednostkę		
	n	ADAM r-WBC	Metoda mikroskopowa	FC	ADAM r-WBC	Metoda mikroskopowa	FC
UKKP	10	0,36	0,09	0,36	0,12	0,03	0,12
UKKCz	10	0,61	0,05	0,94	0,19	0,01	0,29

FC (*flow cytometry*) — cytometria przepływowa; UKKCz — ubogoleukocytny koncentrat krwinek czerwonych; UKKP — ubogoleukocytny koncentrat krwinek płytkowych; WBC (*white blood cells*) — leukocyty

Tabela 5. Średnia liczba leukocytów w próbkach badanych dwoma technikami (RCKiK Katowice)**Table 5.** Mean leukocyte count in RBTC Katowice samples; 2 methods of measurement

Rodzaj składnika	Średnia liczba WBC/ μ l			Średnia liczba WBC $\times 10^6$ /jednostkę	
	n	ADAM r-WBC	Metoda mikroskopowa	ADAM r-WBC	Metoda mikroskopowa
UKKP	29	0,66	0,10	0,21	0,03
UKKCz	26	0,95	0,10	0,26	0,03

UKKCz — ubogoleukocytny koncentrat krwinek czerwonych; UKKP — ubogoleukocytny koncentrat krwinek płytkowych; WBC (*white blood cells*) — leukocyty

urządzenia ADAM r-WBC i metodą mikroskopową. Po przeanalizowaniu wyników badań wykonanych trzema technikami stwierdzono, że średnia zawartość leukocytów w UKKP wynosiła $0,12 \times 10^6$ /jednostkę (ADAM r-WBC), $0,03 \times 10^6$ /jednostkę (metoda mikroskopowa) i $0,12 \times 10^6$ /jednostkę (FC), a średnia zawartość leukocytów w UKKCz wynosiła $0,19 \times 10^6$ /jednostkę (ADAM r-WBC), $0,01 \times 10^6$ /jednostkę (metoda mikroskopowa) i $0,29 \times 10^6$ /jednostkę (FC).

Po przeanalizowaniu wyników badań wykonanych 2 technikami stwierdzono, że średnia zawartość leukocytów w UKKP wynosiła $0,21 \times 10^6$ /jednostkę (ADAM r-WBC) i $0,03 \times 10^6$ /jednostkę (metoda mikroskopowa), a średnia zawartość leukocytów w UKKCz wynosiła $0,26 \times 10^6$ /jednostkę (ADAM r-WBC) i $0,03 \times 10^6$ /jednostkę (metoda mikroskopowa).

Porównanie wyników otrzymanych przy użyciu urządzenia ADAM r-WBC z wynikami uzyskanymi metodą mikroskopową i metodą FC polegało na obliczeniu współczynnika korelacji. W tabeli 6 przedstawiono współczynniki korelacji dla wyników uzyskanych metodami ADAM r-WBC — metoda mikroskopowa oraz ADAM r-WBC — FC.

Dyskusja

W procesie otrzymywania składników krwi etapem końcowym jest kontrola jakości, która ma na celu potwierdzenie, że składniki te zostały otrzymane zgodnie z wytycznymi Systemu Zapewnienia Jakości (SZJ). W związku z powyższym, podstawowym obowiązkiem każdej jednostki organizacyjnej publicznej służby krwi jest powołanie Działu Zapewnienia Jakości (DZJ), do którego zadań

Tabela 6. Współczynniki korelacji dla wyników uzyskanych w RCKiK w Katowicach

Table 6. Correlation coefficients for leukocyte measurements at RBTC Katowice

Badanie	Współczynnik korelacji
ADAM r-WBC — metoda mikroskopowa	
UKKz (n = 10), 3 metody	0,74
UKKP (n = 10), 3 techniki	0,86
UKKz wszystkie badane próbki (n = 26), 2 metody	0,17
UKKP wszystkie badane próbki (n = 29), 2 metody	0,62
ADAM r-WBC — FC	
UKKz (n = 10), 3 metody	0,97
UKKP (n = 10), 3 metody	0,86

FC (*flow cytometry*) — cytometria przepływowa; UKKz — ubogoleukocytarny koncentrat krwinek czerwonych; UKKP — ubogoleukocytarny koncentrat krwinek płytkowych

należy nie tylko monitorowanie poszczególnych etapów procesu otrzymywania składników krwi, ale także ocena, czy otrzymane składniki krwi spełniają zakres normy dla poszczególnych parametrów charakterystycznych dla danego składnika. Jak podkreślono we wstępie niniejszej pracy, w niektórych krajach europejskich leukoredukcji poddawane są wszystkie komórkowe składniki krwi przeznaczone do użytku klinicznego. Wprowadzenie metody leukoredukcji do rutynowego stosowania pociąga za sobą wysokie koszty, dlatego na przykład w Polsce ubogoleukocytarne składniki krwi przeznaczone są przede wszystkim dla biorców z bezwzględными wskazaniami do przetoczenia takiego składnika krwi. Należą do nich:

- pacjenci z grupy ryzyka, u których podejrzewa się obecność przeciwciał anti-HLA lub u których obecność tych przeciwciał stwierdzono;
- potencjalni wielokrotni biorcy (zwłaszcza wielokrotni biorcy KKP) w celu zabezpieczenia ich przed alloimmunizacją antygenami HLA;
- płody (transfuzje dopłodowe) i noworodki w celu zabezpieczenia przed przeniesieniem CMV — jako alternatywa dla składników krwi otrzymanych od CMV-ujemnego dawcy;
- wielokrotni biorcy KKP, u których wystąpiły co najmniej dwie poprzetoczeniowe niehemolityczne reakcje gorączkowe — jako zabezpieczenie przed powtórными odczynami;
- potencjalni biorcy przeszczepów krwiotwórczych komórek macierzystych oraz potencjalni biorcy przeszczepów innych narządów, którzy powinni otrzymywać wyłącznie UKKP;
- pacjenci z upośledzeniem układu immunologicznego [5].

Pacjenci, którym składniki krwi przetacza się sporadycznie (np. pacjenci poddawani zabiegom chirurgicznym) zazwyczaj nie wymagają przetoczenia składników ubogoleukocytarnych.

W celu zapewnienia odpowiedniej jakości i bezpieczeństwa ubogoleukocytarnych składników krwi należy dołożyć wszelkich starań, aby badania kontroli jakości wykonywane były przy użyciu czułej metody pozwalającej oznaczyć nawet śladowe liczby leukocytów. W piśmiennictwie szeroko opisywana jest metoda cytometryczna, która znajduje zastosowanie w kontroli jakości krwi i jej składników. Jest to metoda czuła, jednak ze względu na wysokie koszty eksploatacji aparatury i wykonania badania stosowana przede wszystkim w dużych centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa, w których wykonuje się dużą liczbę donacji [10–16].

W 2012 roku rejestrację FDA uzyskało urządzenie ADAM r-WBC, które może być alternatywą dla:

- metody mikroskopowej z zastosowaniem komory Nageotte, ponieważ oznaczenie wykonywane jest automatycznie, dzięki czemu jest bardziej czułe;
- metody FC, ponieważ badanie jest mniej kosztowne, a urządzenie znacznie łatwiejsze w obsłudze.

Niniejsza praca jest jedną z pierwszych porównujących zastosowanie urządzenia ADAM r-WBC z innymi metodami (metoda mikroskopowa i FC) stosowanymi do liczenia leukocytów w ubogoleukocytarnych składnikach krwi.

Wyniki badań przeprowadzonych w IHiT w Warszawie wykazały, że liczba leukocytów oznaczona za pomocą ADAM r-WBC była znacznie wyższa niż oznaczona przy użyciu metody mikroskopowej. Podobne wyniki uzyskali Strobel i wsp. [17], którzy

dotąd dodatkowo stwierdzili, że w niektórych przypadkach „fałszywie” zawyżenie liczby leukocytów mogło prowadzić do nieprawidłowego zakwalifikowania preparatu ubogoleukocytarnego jako nieubogoleukocytarnego (zwłaszcza w przypadkach, gdy oznaczona liczba leukocytów była bliska granicy normy).

Prawdopodobną przyczyną tych fałszywie zawyżonych liczb leukocytów mogło być zliczanie przez urządzenie nie tylko leukocytów, lecz także innych fragmentów komórek barwiących się PI i zanieczyszczających preparat.

Powyzszy problem został odnotowany podczas badań w IHiT w Warszawie i zgłoszony twórcy systemu. Zgodnie z pisemną deklaracją producenta, uwagi IHiT w Warszawie zostały poddane analizie i problem ten rozwiązano. Znalazło to potwierdzenie w wynikach badań walidacyjnych, przeprowadzonych w RCKiK w Katowicach, podczas których uzyskano wysoki stopień korelacji między grupami wyników badań liczby leukocytów w ubogoleukocytarnych KKP i KKCz otrzymanych trzema metodami (metoda mikroskopowa, FC i ADAM r-WBC).

Występowanie zjawiska liczenia większej liczby leukocytów przez urządzenie ADAM r-WBC w porównaniu do metody mikroskopowej i FC zauważono także w badaniach prowadzonych przez Strobla i wsp. [17], którzy sugerowali, że przyczyną zawyżenia wyniku może być obecność w preparacie niedojrzałych erytrocytów posiadających jądro komórkowe (erytoblastów). Zapewne może to częściowo tłumaczyć wyższe wartości leukocytów uzyskane za pomocą urządzenia ADAM r-WBC i FC. Hipoteza ta została podważona w nieopublikowanych badaniach Hauk-Dlimi i wsp., z których wynika, że nawet w kożuszkach leukocytarno-płytkowych uzyskanych z krwi pępowinowej znajduje się tylko 2–3% erytoblastów.

Mimo zawyżonych wyników uzyskanych w pierwszym etapie badań przeprowadzonych w IHiT w Warszawie i w RCKiK w Katowicach urządzenie ADAM r-WBC jest rutynowo stosowane do oznaczania liczby leukocytów w preparatach ubogoleukocytarnych, ponieważ zostało ono poddane weryfikacji zgodnie z uwagami IHiT i RCKiK, a także ponownej walidacji.

Piśmiennictwo

1. Seftel M.D., Growe G.H., Petraszko T. i wsp. Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood* 2004; 103: 333–339.

2. Coste J., Prowse C., Grabmer C. i wsp. Prion reduction of red blood-cells. *Vox Sang.* 2012; 103: 260–272.
3. Antoniewicz-Papis J., Lachert E. Metody ograniczania przenoszenia czynników zakaźnych przez krew — leukoredukcja. W: Brojer E., Grabarczyk P. (red.). Czynniki zakaźne istotne w transfuzjologii. Fundacja Pro Pharmacia Futura. Warszawa 2015: 199–205.
4. Mettelle F.C., Salata K.F., Belanger K.J., Casleton B.G., Kelly D.J. Reducing the risk of transfusion transmitted rickettsial diseases by WBC filtration, using Orientia tsutsugamusi in a model system. *Transfusion* 2000; 40: 290–296.
5. Antoniewicz-Papis J., Dąbrowska A. Preparatyka krwi i jej składników. W: Łętowska M. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi: praca zbiorowa. Wyd. III. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2014: 17–320.
6. Vasconcelos E., Sousa A.P., Seghatchian J. i wsp. The content of the LRS chamber provides a new quality tool for the characterization of the donor platelet profile. *Transfus. Apher. Sci.* 2005; 32: 221–225.
7. McDonald C.E. Universal prestorage leukocyte reduction. *Laboratory Medicine* 2001; 32: 756–757.
8. Andreu G., Masse M., Royer S.D., Tardivel R. Leukodepleted blood components: definition of a standard. *Transfus. Sci.* 1998; 19: 381–383.
9. Buttarelo M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. *Clin. Chim. Acta* 2004; 346: 45–54.
10. Masse M. Universal leukoreduction of cellular and plasma components: process control and performance of the leukoreduction process. *Transfus. Clin. Biol.* 2001; 8: 297–302.
11. Barnett D., Goodfellow K., Ginnever J., Granger V., Whitby L., Trilly J.T. Low level leukocyte counting: a critical variable in the validation of leukodepleted blood transfusion components as highlighted by an external quality assessment study. *Clin. Lab. Haematol.* 2001; 23: 43–51.
12. Fischer J.C., Moog R., Giers G. Quality control of leucocyte-reduced blood components: overestimation of WBC content due to nucleated red blood cells. *Vox Sang.* 2012; 102: 79–81.
13. Müller T.H., Döscher A., Schunter F., Scott C.S. Manual and automated methods for the determination of leukocyte counts at extreme low levels: comparative evaluation of the Nageotte chamber and the Abbott Cell Dyn 3500 analyser. *Transfus. Sci.* 1997; 18: 505–515.
14. Gilbert R.L., Rider J.R., Turton J.R., Pamphilon D.H. Detection of residual donor leukocytes in leucoreduced red blood cell components using a fluorescence microplate assay. *J. Immunol. Methods* 2003; 274: 17–25.
15. Heaton A. Quality of leukodepleted blood products. *Transfus. Sci.* 1995; 16: 189–192.
16. Cassens U., Greve B., Tapernon K. i wsp. A novel true volumetric method for the determination of residual leucocytes in blood components. *Vox Sang.* 2002; 82: 198–206.
17. Strobel J., Antos U., Zimmermann R., Eckstein R., Zingsem J. Comparison of a new microscopic system for the measurement of residual leukocytes in apheresis platelets with flow cytometry and manual counting. *Vox Sang.* 2014; 107: 233–238.