



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2023
Institutt for sport- og familiedyrmedisin

Samsvarsanalyse for hematologieresultater fra IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzer og ADVIA® 2021i Hematology System

Comparative Analysis of Hematology Results From
the IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzer
and the ADVIA® 2120i Hematology System

Trude Nemeth, Mariam Shehzad og Marianne Tuen
Yndestad

Innhold

Sammendrag.....	5
Definisjoner og forkortelser	7
Innledning.....	9
Idexx ProCyte Dx™ Hematology Analyzer	13
ADVIA 2120i® Hematology System	15
Kvalitetskontroll.....	20
Idexx ProCyte Dx™ Hematology Analyzer	20
Sentrallaboratoriet – ADVIA 2120i Hematology System.....	21
Formål	23
Materiale og metoder	24
Studiepopulasjon	24
Prøveinnsamling.....	24
Prosedyrer på laboratoriet	25
Inspeksjon av cytogram og manuell differensiering	25
Manuell telling av antall trombocytter	26
Statistisk analyse	26
Bland Altman-plott.....	26
Spearman's rang korrelasjonskoeffisient.....	27
Definisjon av uakseptable avvik	28
Resultater.....	29
Sammenligning av alle variabler på begge maskiner.....	30
PLT.....	30
RBC.....	32
HCT.....	33
HGB	33

MCV	34
MCHC	35
RDW.....	36
Retikulocytter	37
Analyse av WBC og leukocytt differensiering	38
Diskusjon.....	50
PLT.....	50
HCT.....	53
RBC.....	54
Retikulocytter	55
HGB, MCHC og MCV.....	56
Tidsbegrensninger	58
RDW.....	59
Leukocytter.....	60
Cytogram og blodutstryk.....	65
Begrensninger.....	67
Leukocytt differensiering	68
Internkontroller.....	69
Statistisk styrke	70
Referansepopulasjoner	70
Konklusjon	72
Takk til bidragsytere.....	74
Summary	75
Referanser.....	77
Vedlegg	80

Vedlegg 1: Mail som ble sendt til alle ansatte og studenter ved NMBU	80
Vedlegg 2: Samtykkeskjema fra eier	81

Sammendrag

Tittel: Samsvarsanalyse for hematologireultatater fra IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzer og ADVIA® 2120i Hematology System

Forfattere: Trude Nemeth, Mariam Shehzad og Marianne Tuen Yndestad

Veileder: Hege Brun-Hansen og Hanne Larsen Moberg, Institutt for sport- og familiedyrmedisin ved NMBU

Mange klinikker benytter resultater fra egne hematologi-maskiner for å diagnostisere og behandle pasienter, og vi ønsket å undersøke om resultatene man får samsvarer med resultater fra et referanselaboratorium. Tidligere studier har indikert at inspeksjon av cytogram og stjernemarkeringer er viktig for å avvise blodprøver som kan gi ukorrekte resultater. I denne studien ble 99 blodprøver fra hunder analysert med IDEXX- ProCyte Dx™ Hematology Analyzer og ADVIA 2120i Hematologi System ved Veterinærhøgskolen NMBU. ProCyte WBC-cytogram og stjernemarkeringer ble vurdert for alle prøver, og en manuell differensialtelling av leukocytter ble utført på 17 prøver. Statistisk analyse ble utført før og etter inspeksjon av cytogrammer. Resultatene viste at differensialtelling av leukocytter samsvarte bedre dersom prøver med uakseptable leukocyttopulasjoner og/eller stjernemarkeringer fra ProCyte ble eliminert. Blodutstryk kan brukes for å bekrefte automatiserte resultater og vurdere cellemorfologi. Det ble sett en trend der ProCyte feilklassifiserte nøytrofile som lymfocytter og/eller monocytter hos pasienter med systemisk inflammasjon.

Både ProCyte og ADVIA anga en falsk trombocytopeni i flere blodprøver på grunn av plateagregater. Et lavt platetall må verifiseres ved å vurdere et blodutstryk. Bias var minimal

til moderat ved analyse av RBC, HGB og HCT, som indikerer at klinikerer kan stole på disse verdiene.

Definisjoner og forkortelser

ADVIA	ADVIA® 2120i Hematology System
ProCyte	IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzer
Bias	Gjennomsnitt av differanse av verdier fra ProCyte-ADVIA. Positiv bias betyr at verdien fra ProCyte er høyere, negativ bias betyr at verdien fra ADVIA er høyere
WBC	«White Blood Cells» – antall leukocytter oppgitt i $\times 10^9/L$
RBC	«Red Blood Cells» – antall erytrocytter oppgitt i $\times 10^{12}/L$
HGB	Hemoglobin – mengde hemoglobin i blodet oppgitt i g/L
HCT	Hematokrit – Andel erytrocytter i prøven oppgitt i %
MCV	«Mean Corpuscular Volume»/«Mean Cell Volume» – Gjennomsnittlig volum på erytrocytter oppgitt i femtoliter (fL)
MCHC	«Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration» – gjennomsnittlig konsentrasjon av hemoglobin i RBC oppgitt i g/L
RDW	«Red Cell Distribution Width» – forskjellen i størrelse av RBC oppgitt i %
NEU eller NEU%	Nøytrofile granulocytter – antall i blodet oppgitt i $\times 10^9/L$ eller andel av WBC som er nøytrofile oppgitt i %
LYM eller LYM%	Lymfocytter – antall i blodet oppgitt i $\times 10^9/L$ eller andel av WBC som er lymfocytter oppgitt i %
MONO eller MONO%	Monocytter – antall i blodet oppgitt i $\times 10^9/L$ eller andel av WBC som er monocytter oppgitt i %

EOS eller EOS%	Eosinofile granulocytter – antall i blodet oppgitt i $\times 10^9/L$ eller andel av WBC som er eosinofile oppgitt i %
BASO eller BASO%	Basofile granulocytter – antall i blodet oppgitt i $\times 10^9/L$ eller andel WBC som er basofile oppgitt i %
PLT	Trombocytter – antall i blodet oppgitt i $\times 10^9/L$
CRP	«C-reactive protein» – mengde i blodet oppgitt i mg/L. Ikke en del av analysen, men brukt for klassifisering av inflammasjon
CHCM	«Corpuscular Hemoglobin Concentration Mean» – Tilsvarende MCHC, men denne verdien er målt og ikke beregnet.
PCV	«Packed Cell Volume» – Mikrohematokrit
Stjernemarkering eller *	Verdier markert eller «flagget» av IDEXX ProCyte Dx™ der ytterligere handling kreves. Det er ment å minne klinikerer på å undersøke blodutstryket for å validere blodprøvesvaret.
Prism	GraphPad Prism 9.5.1 – et statistisk analyse-program
Korrigert datasett	Datasettet etter at blodprøver med stjernemarkeringer eller uakseptable cytogram er fjernet

Innledning

Ved NMBU Dyresykehuset – smådyr analyseres hematologiprøver fra pasienter hele døgnet. Prøver tatt innenfor normal arbeidstid sendes helst til Sentrallaboratoriet (SL) der de analyseres ved bruk av ADVIA® 2120i Hematology System, men når klinikerer behøver raskt svar eller Sentrallaboratoriet ikke er åpent, analyseres de med IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyser i dyresykehusets eget laboratorium. Resultatene som overføres automatisk til journalen blir benyttet i diagnostikken og kan påvirke videre behandling. Akuttvaktene kan være hektiske med kort tid fra pasienten kommer inn til det må stilles en diagnose for å starte behandling. Ikke alle tar seg tid til å inspisere cytogrammer, og blodutstryk blir ikke laget for alle prøver. Dersom blodprøven inneholder alvorlige feilmålinger, og cytogram og stjernemarkeringer ikke undersøkes nærmere av klinikerer, er det fare for at det forekommer feilaktig grunnlag for en diagnose og igangsetting av feil behandling.

Mange norske smådyrklirikker benytter egne ProCyte-maskiner for analyse av hematologiprøver, mens andre klinikker sender hematologiprøver til analyse ved eksterne referanselaboratorier. Det er mange fordeler med å benytte egne ProCyte-maskiner: det er en enkel måte å analysere blodprøver på hvor man slipper ekstra tidsbruk til pakking og forsendelse, og klinikerer får svar på blodprøven i løpet av to minutter. Ulempen er at klinikere ikke alltid er bevisste på mulige feil som kan oppstå, og tiltak som bør settes i gang for å rette opp i eventuelle feil. Når man sender blodprøver til et referanselaboratorium kan man anta at de sikrer god kvalitet på blodprøvesvarene gjennom grundige rutiner for vedlikehold, kalibrering og kvalitetssikring av maskinene som analyserer prøvene. Hos private smådyrklirikker er derimot rutinene for dette varierende, og risikoen for at det oppstår feilmålinger øker betraktelig.

Hematologi er et viktig hjelpemiddel i utredningen av en rekke ulike sykdomsprosesser inkludert anemi, infeksjonssykdommer, inflammasjonssykdommer og neoplasier. Mange stoler på og benytter hematologisvaret fra ProCyte som et viktig diagnostisk verktøy til å sette opp behandlingsplan for pasientene sine. Hos pasienter med anemi kan vi gjennom hematologiske resultater klassifisere anemien som enten regenerativ eller ikke-regenerativ. Klassifikasjon er viktig for å kunne utrede underliggende årsak til anemien. Siden hematologi spiller en veldig viktig rolle i både diagnostisering og planlegging av behandlingen, er det nyttig å vite hvilke typer feil som oppstår, og i hvilke situasjoner de oppstår.

En annen fordel med å sende blodprøver til et referanselaboratorium er at de vurderer blodutstryk for alle blodprøver der man har sendt med et fersklaget blodutstryk, i motsetning til private klinikker som ofte har varierende praksis for dette. Ved å vurdere blodcellenes morfologi får klinikerer muligheten til å se på blant annet størrelse, form og distribusjon av celler, og kan oppdage hemoparasitter, inklusjonslegemer, toksiske forandringer og neoplastiske celler. Enkelte studier beskriver at en morfologisk vurdering av blodutstryk er nødvendig for å verifisere at maskintellingen er korrekt, i tillegg til at det gir klinisk relevant informasjon som ikke kan gjenkjennes av hematologimaskiner. Klinikerer får dermed et mer helhetlig bilde av pasientens sykdomstilstand. (Zitzer, 2023)

I flere tilfeller vil det være viktig å vurdere blodutstryk for diagnostisering av en sykdom, for eksempel for pasienter der blodprøveresultatene viser trombocytopeni. Det er viktig å bekrefte dette ved manuell telling på blodutstryk fordi det kan dannes plateaggregater som kan gjøre at maskinen registrerer en falsk trombocytopeni. Det er ikke mulig for maskinen å telle de individuelle trombocytene når de ligger i plateaggregater. (Norman et al., 2001) Aggregater

kan dannes av forskjellige årsaker, inkludert utilstrekkelig blanding av prøven. Et annet eksempel er for hunder med kongenital makrotrombocytopeni, vanligst å finne hos Cavalier King Charles Spaniel. Hunder med denne tilstanden har et lavere antall trombocytter, men trombocytterne er store. Disse hundene har ifølge maskinen en trombocytopeni, men de store trombocytterne gir normal funksjon. Analysering av blodutstryket kan gi mistanke om en slik tilstand. (Schmidt, 2012)

En studie utført i Sverige i 2022 viste viktigheten av å inspisere WBC-cytogrammet fra ProCyte. I studien framkom det at antallet nøytrofile granulocytter funnet av ProCyte, ofte er mye lavere enn i samme blodprøve analysert med ADVIA hos systemisk påkjente hunder. Det ble vist at rundt 15% av ProCyte-resultatene i hundepopulasjonen registrerte et falskt lavt antall nøytrofile. Dette skyldtes at nøytrofile ble klassifisert som monocytter og/eller lymfocytter. Det ble videre fremhevet at denne feilkilden kunne vært unngått ved å studere cytogrammet som fremstilles automatisk av ProCyte. Dersom leukocyttopopulasjonene ikke er tydelig adskilte, ble det anbefalt å utføre en manuell differensialtelling av leukocytterne i et blodutstryk. (Bergstrand et al., 2022)

Feildiagnostisering av pasienter med nøytropeni kan ha store kliniske konsekvenser. Antall nøytrofile benyttes ofte hos systemisk påkjente individer for å vurdere om pasienten kan være i fare for å utvikle en sepsistilstand. Ved en akutt systemisk infeksjon kan pasienten utvikle en nøytrofili, men ved videre progresjon av sykdommen vil reservoaret av nøytrofile granulocytter brukes opp raskere enn nye produseres, slik at pasienten står i fare for å utvikle en nøytropeni. Nøytropeni er også en vanlig bivirkning hos pasienter som står på kjemoterapi, og alvorlighetsgraden kan variere i stor grad. Internasjonal litteratur anbefaler at antall nøytrofile burde være minst $1,5 \times 10^9/L$ for å starte kjemoterapi. Pasienter som utvikler en

vedvarende nøytropeni har økt risiko for å utvikle en infeksjon. Dersom antall nøytrofile er $<0,75 \times 10^9/L$ er det indikasjon for å starte profylaktisk bredspektret antibiotikabehandling for å hindre at pasienten utvikler sepsis. (Bisson et al., 2018) For å unngå unødvendig bruk av antibiotika og øke faren for antibiotika resistens, bør cytogram og blodutstryk undersøkes for å bekrefte at pasienten har en reell nøytropeni.

Tidligere studier har sammenlignet resultater fra ProCyte og ADVIA. Blant annet finnes det to studier som har sett på hvor nøyaktig resultatene fra ProCyte er. I den første studien, som var publisert i Journal of Veterinary Medical Science, ble 59 prøver analysert med ProCyte, og resultatene ble bekreftet ved manuell telling. Resultatene ble analysert ved bruk av Pearsons korrelasjonskoeffisient, som viste at det var god korrelasjon mellom maskinene. Studien konkluderte med at ProCyte-resultatene var av akseptabel kvalitet, og kunne anvendes i klinisk sammenheng. (Fujino et al., 2013)

Den andre studien sammenlignet ProCyte og ADVIA for hunder og katter. I denne studien, ble resultater fra 270 hunder og 176 katter analysert to ganger. Ved første statistiske analyse ble alle blodprøver med unntak av de med stjernemarkeringer undersøkt, deretter ble resultatene analysert på nytt etter at blodprøver ble ekskludert ut fra definerte kriterier. Blodprøver ble utelukket fra den andre statistiske analysen dersom cytogrammet viste uakseptable cellepopulasjoner eller det var et unormalt høyt antall monocytter, som kan tyde på økt antall umodne celler. Spearmans rang korrelasjonskoeffisient viste god til utmerket korrelasjon mellom de to maskinene ved den andre statistiske analysen. Ved den første statistiske analysen var det imidlertid dårlig korrelasjon mellom maskinene når det gjaldt MCHC og differensiering av leukocytter. Studien konkluderte med at det er viktig å inspisere cytogrammer, og at det er nødvendig å foreta en manuell differensialtelling ved uakseptable

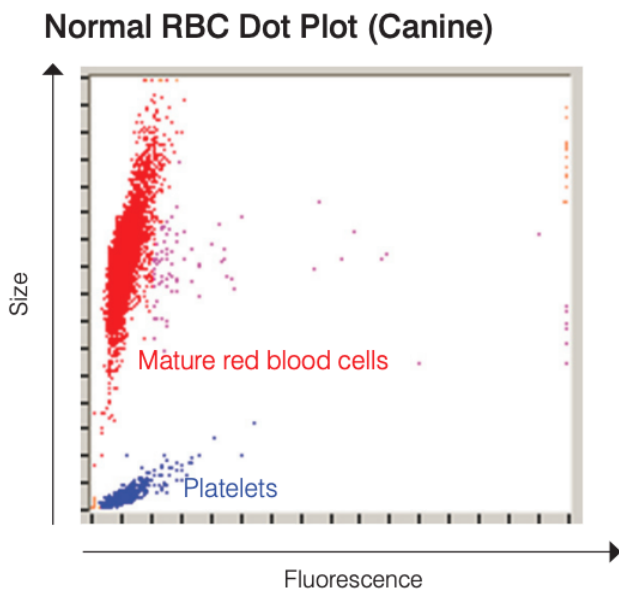
cellepopulasjoner. I studien, ble det også påvist stor bias i analysen av hemoglobin (HGB), og verdier som ble beregnet fra HGB, som MCHC. Dette ble forklart med at ADVIA 2120i anvender en «cyanidfri kolorimetrisk metode» for å analysere HGB. (Goldmann et al., 2014)

Med bakgrunn i disse studiene som sier at det er viktig å vurdere cytogrammet for å vite om det er nødvendig å differensialtelle leukocytter, og kunnskapen om at eksterne referanselaboratorier generelt har grundigere og høyere frekvens av rutiner som sikrer god kvalitet på blodprøvesvarene, skal vi sammenligne hematologiresultater fra samme pasient analysert med ProCyte og ADVIA. Deretter skal vi utføre en manuell telling av antall leukocytter ved blodprøver med uakseptabelt cytogram og/eller med stjernemarkeringer fra ProCyte.

Idexx ProCyte Dx™ Hematology Analyzer

Idexx ProCyte Dx™ Hematology Analyzer benytter laserbasert flow-cytometri for å klassifisere leukocytter i fem ulike populasjoner, og for å identifisere modne erytrocytter, retikulocytter, RBC-fragmenter og trombocytter.

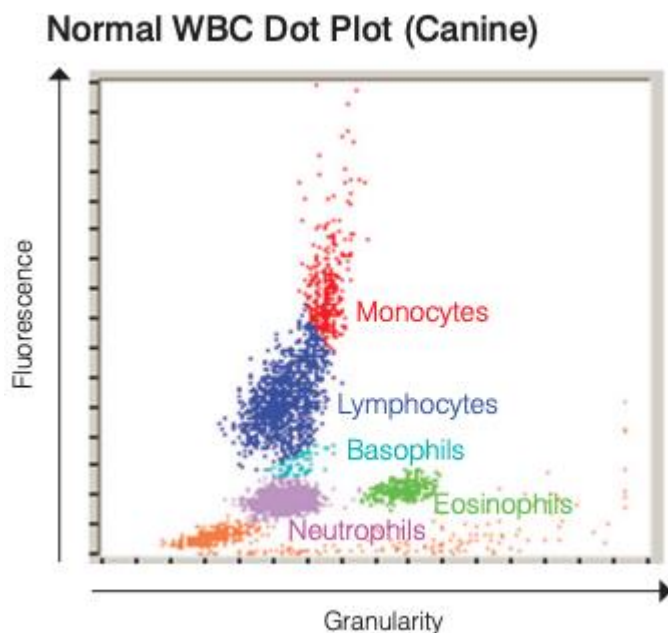
ProCyte benytter «Laminar Flow Impedance»-teknologi for å klassifisere erytrocytter og trombocytter basert på cellestørrelse og antall. «Optical Fluorescence»-metoden benyttes for å identifisere retikulocytter. Cellene farges med et fluorescerende polymethine-fargestoff, som binder til nukleinsyrer, for så å aktiveres av en laser. Det dannes et cytogram (figur 1), som viser modne erytrocytter, trombocytter og retikulocytter. På X-aksen vises fluorescens, på Y-aksen vises cellestørrelse. (Laboratories, 2021)



Figur 1: Cytogram som viser erytrocytter (rød), trombocytter (blå), retikulocytter (lilla) og RBC- fragmenter (lys rosa). Retikulocytter inneholder ribosomalt RNA, som gjør at de absorberer mer fargestoff og har høyere fluorescens. I motsetning, er erytrocytter hos hunder uten kjerner, og har dermed lavere fluorescens. Idexx Laboratories, Inc. (2011) *Interpreting IDEXX ProCyte Dx* Hematology Analyser Dot Plots*.

<https://www.idexx.com/files/procyte-dx-dot-plots-en.pdf> (23.02.2023)

Maskinen analyserer leukocytter basert på fluorescens og granularitet og anvender informasjonen til å danne et cytogram (figur 2). Cellene farges med et fluorescerende polymethine-fargestoff som binder til nukleinsyrer og organeller i cytoplasma. De differensieres basert på kompleksitet (granularitet) og fluorescens (avhengig av RNA-innhold). Hvert punkt på et cytogram representerer en celle. Hver cellepopulasjon på cytogrammet vises i ulike farger, og skal være tydelig adskilt fra andre populasjoner. Hvis avgrensingen av en populasjon er utydelig, kan det tyde på økt variasjon innad i populasjonen og signalisere feil resultat. (Laboratories, 2021)



Figur 2: Figuren viser et cytogram med tydelig adskilte populasjoner. Celler med mye granula ender opp langt mot høyre på X-aksen, som eosinofile granulocytter. Celler som inneholder mye fluorescens, ender opp høyt langs Y-aksen, f.eks. monocytter. Monocytter – rød. Lymfocytter – blå. Basofile granulocytter – lyseblå. Eosinofile granulocytter – grønn. Nøytrofile granulocytter – lilla. URBC – oransje. Idexx Laboratories, Inc. (2011) *Interpreting IDEXX ProCyte Dx* Hematology Analyser Dot Plots*. <https://www.idexx.com/files/procyte-dx-dot-plots-en.pdf> (23.02.2023)

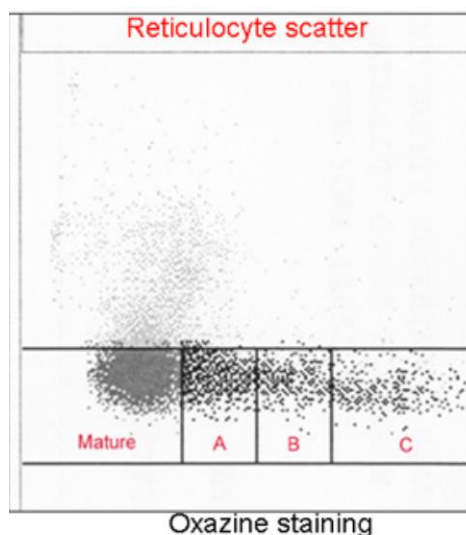
ADVIA 2120i® Hematology System

ADVIA® 2120i Hematology System er en analysemaskin som benyttes av Sentrallaboratoriet. I flere studier er denne ansett som gullstandard når den brukes for sammenligning med andre maskiner. Denne maskinen benyttes også i humanmedisin. ADVIA 2120i benytter laserbasert flow-cytometri. Maskinen har fem ulike programmer, kalt kanaler, for å analysere blodprøver: i) hemoglobinkanalen ii) RBC/platekanalen, iii) peroksidasekanalen, iv) lobularitet/baso-kanalen, v) retikulocyttkanalen. Maskinen lyserer leukocytter og analyserer disse i to ulike kanaler: peroksidase- og baso/lobularitetskanalen (Harris et al., 2005). Dette gir to forskjellige tall på antall leukocytter, WBC-B fra baso/lobularitetskanalen og WBC-P fra

peroksidasekanalen. Totalt antall leukocytter som oppgis i analysesvaret er oftest basert på resultatet fra WBC-B. Differensialtellingen, unntatt basofile granulocytter, baserer seg på peroksidasekanalen og gir oss %-tall for de forskjellige leukocytterne, mens absoluttverdiene beregnes av maskinen basert på prosentandelen fra WBC-P og totalt antall leukocytter fra WBC-B. (Laboratories, 2021)

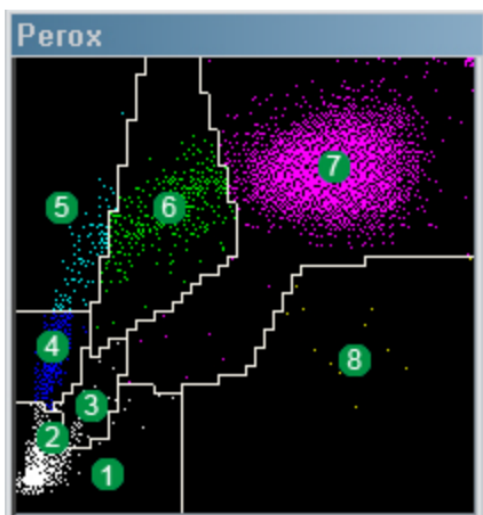
Siden maskinen analyserer leukocytter ved bruk av to ulike metoder, fungerer dette som en internkontroll og signaliserer dersom det er dårlig samsvar mellom metodene. «White blood cell comparison error (WBC-CE)» betyr at det ikke er samsvar mellom antall leukocytter i de to kanalene. Hemoglobin måles ved en cyanidfri kolorimetrisk metode, og også her har ADVIA en form for internkontroll. Resultatet sammenlignes med «Corpuscular hemoglobin concentration mean» (CHCM) som måles ved bruk av lysspredning. Erytrocytter og trombocytter analyseres i en egen kanal, RBC/platekanalen. (SIEMENS, 2010)

Antall retikulocytter analyseres ved hjelp av Oksazin 750. Dette stoffet farger nukleinsyrer i retikulocytter, som skiller dem fra modne erytrocytter. Retikulocytterne analyseres basert på volum og hemoglobinkonsentrasjon. Cytogrammet (figur 3) som produseres kan benyttes for å klassifisere anemi som enten regenerativ eller ikke-regenerativ. (Medicine, u.å.-a)



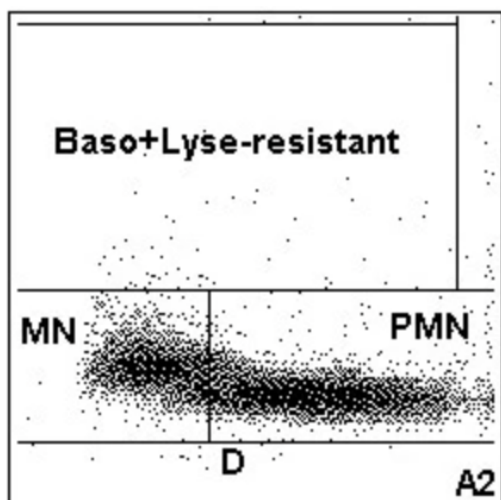
Figur 3: På cytogrammet vil retikulocytter ha et varierende opptak av Oksazin, dermed kan de ligge i felt A, B eller C på figuren. Modne erythrocytter har ikke kjernestoff og farges dårlig av oksazin. De vil ligge lengst til venstre langs X-aksen. Cornell University College of Veterinary Medicine (2013-2020). *Advia hematology analyzer*. <https://eclinpath.com/hematology/tests/reticulocyte-percentage/advia-hematology-analyzer/> (23.02.2023)

Leukocytter analyseres ved hjelp av en peroksidasekanal som produserer et peroksidasecytogram. I denne metoden lyses erythrocytter og peroksidasereagens anvendes for å skille peroksidasepositive celler, som nøytrofile, eosinofile og monocytter, fra peroksidasenegative celler. Celler som er positive vil ligge lengre til høyre langs X-aksen (figur 4). Langs Y-aksen på cytogrammet finnes celledørrelse. Peroksidasenegative celler, som «Large Unstained Cells» (LUC) og lymfocytter, ligger til venstre på X-aksen. Eksempler på celler som kan klassifiseres som LUC er atypiske store lymfocytter, monocytter og blastære celler. (Harris et al., 2005)



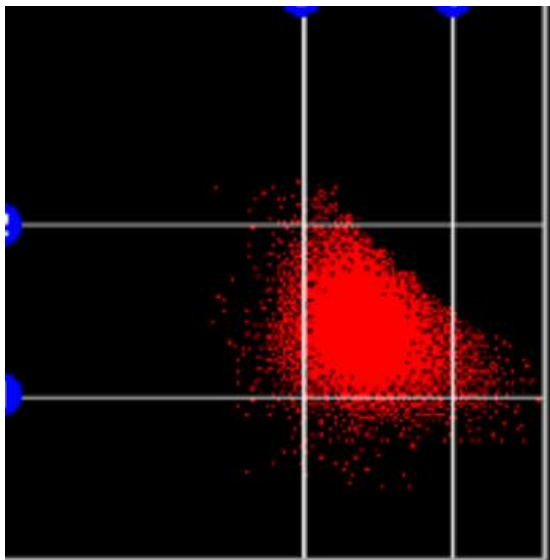
Figur 4: Peroksidasecytogram. Celler som er peroksidasepositive vises lenger til høyre på X-aksen. Større celler kommer lengre opp på Y-aksen. Grafen viser at granulocytter som er lobulære, f.eks. nøytrofile granulocytter og eosinofile granulocytter har mer peroksidaseaktivitet. 1: «Noise» (trombocytter, erytrocyttmasse og debris som ekskluderes fra totalantall leukocytter (WBC-B) og differensierte WBC. 2: kjerneholdige erytrocytter, 3: plateaggregater, 4: lymfocytter og basofile granulocytter, 5: «Large Unstained Cells», 6: monocytter, 7: nøytrofile granulocytter, 8: eosinofile granulocytter. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (2010). *ADVIA 2120/2120i Hematology System Operator's Guide*. <http://startrinity3.com/01/Advia%20Ops%20Guide.pdf> (18.04.2023)

Baso/lobularitetskanalen benyttes primært til telling av totalt antall leukocytter. Erytrocyttene, trombocytene og leukocytene, bortsett fra de basofile granulocytene, lyseres for å fjerne cytoplasma. Cellene telles og klassifiseres basert på volum og hvor lobulær kjernen er. Basofile granulocytter registreres som de største cellene fordi de ikke er lysert, og havner øverst sammen med andre lyseringsresistente celler. Cytogrammet (figur 5) kan benyttes for å si noe om hvor modne cellene er.



Figur 5: Baso: basofile granulocytter, Lyse-resistant: Lyseringsresistente celler, PMN: Polymorf-nukleære celler, MN: Mononukleære celler. På X-aksen vises lobularitet. På Y-aksen vises cellestørrelse. Martina Stirn (2014). *Rate of manual leukocyte differentials in dog, cat and horse blood samples using ADVIA 120 cytograms.* <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-10-125>(23.02.2023)

I en RBC/platekanal konverteres erythrocytter til sfærer ved bruk av natriumdodecylsulfat og glutaraldehyd. Dette gjør det mulig å analysere dem med lav- og høygradig lysspredning. Disse signalene blir amplifisert og fordelt på fire signaler. De fire signalene konverteres til digitale signaler og analyseres av maskinen. Disse signalene leses av som volum og refraktære indeks-verdier (hvor mye lys som blir refraktert når det går gjennom et materiale). På bakgrunn av denne informasjonen bestemmes totalt antall erythrocytter. Analysen benyttes videre til å skille mellom modne erythrocytter, trombocytter, store trombocytter, RBC-fragmenter, «RBC-ghosts» og debris. Informasjonen benyttes til å danne et cytogram som fremstiller erythrocyttvolum i femtoliter (fL) og hemoglobinkonsentrasjon i g/L. Dette cytogrammet (figur 6) gir en visuell fremstilling av regenerative og ikke-regenerative anemier. (Harris et al., 2005)



Figur 6: På x-aksen vises hemoglobin konsentrasjonen, mens på Y-aksen ses celle volum. Ved en regenerativ respons vil cellene flyttes lengre opp langs Y-aksen og mot venstre langs X-aksen. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (2010). *ADVIA 2120/ 2120i Hematology System Operator's Guide* <http://starttrinity3.com/01/Advia%20Ops%20Guide.pdf> (18.04.2023)

Kvalitetskontroll

Idexx ProCyte Dx™ Hematology Analyzer

Ansatte ved laboratoriet på NMBU Dyresykehuset – smådyr utfører en månedlig rens av maskinen etterfulgt av en kontroll: «Idexx ProCyte Dx quality control» (e-check). Kontrollen utføres med blod fra produsent som analyseres for å undersøke om parameterne ligger innenfor de forhåndsbestemte verdiene. Maskinen sender ut en automatisk påminnelse om den månedlige rensen. Kontroll-blodprøven skiftes ut ved utgått dato. Reagensene skiftes ut når de er tomme eller ved utgått dato. «Stain pack» skiftes ut ved utgått dato. Viftefilteret renses manuelt en gang i måneden. Maskinen utfører en automatisk rens en gang daglig.

Maskinen varsler om feil ved bruk av feilmeldinger og gir instruksjoner for hvilke tiltak som skal gjøres. Dersom dette ikke løser problemet, ringer operatøren Idexx kundeservice og får råd

om tiltak som bør settes i gang. Cytogrammet og stjernemarkeringer som dannes ved analysing av blodprøver bør undersøkes av klinikerne. Enkelte ganger kommer det anbefaling fra maskinen på blodprøvesvaret om å vurdere blodutstryk (muntlig kommunikasjon med Tora Jelle, ingeniør ved NMBU Dyresykehuset – smådyr, 16.03.2023).

Sentrallaboratoriet – ADVIA 2120i Hematology System

Ansatte ved Sentrallaboratoriet analyserer tre nivåer av kontrollblodprøver som heter «Test point 3 in 1» en gang daglig. De tre blodprøvene består av én blodprøve med verdier under referanseområdet, én blodprøve med verdier innenfor referanseområdet og én blodprøve med verdier over referanseområdet. Prøvesvarene sammenlignes med de forhåndsbestemte verdiene gitt av produsenten. En gang i uken vasker en ansatt «flowceller», oppsugingsnåler og nålekamrene. Reagens skiftes ut når det blir tomt eller er utgått på dato. Filter for reagensene skiftes en gang hvert halvår. Dersom det kommer opp beskjed om koagel i maskinen, skiftes det «clot-filter». Maskinen utfører flere rens gjennom døgnet, renser mellom hver prøve og utfører en hovedvask fem ganger i løpet av et døgn.

En bioingeniør vurderer de ulike cytogrammene fra prøven. Stor endring i utseende av cytogrammet kan bety at det er feil i leveransen av reagens. Da undersøkes den tilhørende reagens nærmere. For hver prøve lages det blodutstryk som undersøkes. Dersom det anses som nødvendig, utføres en manuell differensialtelling av leukocytter. Stjernemarkeringer indikerer feil på morfologi eller «sample system». Dersom det oppstår stjernemarkeringer på samplesystem, analyseres prøven på nytt. Dersom det oppstår stjernemarkeringer på samplesystem på flere prøver utføres det systemvask, og reagenser og koagelfilteret undersøkes. Blodprøvesvaret leveres uten stjernemarkeringer, slik at klinikerne ikke behøver å vurdere disse.

Sentrallaboratoriet er med på et eksternt kvalitetskontroll-program (EKV) i regi av NOKLUS fire ganger i året. Alle laboratorier som er med i programmet får en bestemt blodprøve som analyseres. Resultatene rapporteres inn og sammenlignes med de forhåndsbestemte verdiene. Fordelen med en slik kontroll er at resultatene kan sammenlignes med samme maskin på andre laboratorier og andre maskiner benyttet av referanselaboratorier (muntlig kommunikasjon med Hanne Elisabeth Lunde, laboratorieleder ved Sentrallaboratoriet, 16.03.2023).

Formål

Det overordnede målet med denne studien var å undersøke hvilke forskjeller som oppstår og hvor klinisk relevante forskjellene er ved analyse av blodprøver med ProCyte, sammenlignet med analyseresultatene fra ADVIA. Dersom vi fant klinisk relevante forskjeller ville vi se om det var mulig å komme med tiltak som kan utføres av brukere av ProCyte for å oppdage og korrigere feil prøvesvar.

Hypotesen for studien er at det forekommer feil av ulik frekvens som kan være av klinisk relevans ved måling av PLT, RBC, HCT, HGB, MCV, MCHC, WBC og differensialtelling av leukocytter på blodprøver fra hund analysert med ProCyte sammenlignet med analysesvar fra ADVIA.

H0: det er ingen forskjell mellom resultatene av PLT, RBC, HCT, HGB, MCV, MCHC, WBC og leukocytt-differensialtelling analysert med ProCyte og ADVIA.

Dersom denne studien viser at det foregår en høy frekvens av feil på 99 blodprøver fra hunder, vil dette være viktig informasjon som bør nå ut til klinikere som benytter ProCyte slik de kan være klar over hyppigheten av feilene, og sette i gang tiltak for å oppdage feil og få et mer korrekt prøvesvar i fremtiden.

Materiale og metoder

Studiepopulasjon

Studieenheten er en hund. Studiepopulasjonen er hunder som var pasienter ved NMBU Dyresykehuset – smådyr. Studieutvalget var syke eller friske hunder som veide 7 kg eller mer, og som skulle ta blodprøve for hematologi som en del av utredningen ved NMBU Dyresykehuset – smådyr i perioden 29. august 2022 til 23. desember 2022. Prøven skulle analyseres med ProCyte ved klinikkens laboratorium, og ADVIA 2120i ved Sentrallaboratoriet. Det skulle lages minimum ett blodutstryk for hver blodprøve. Eksklusjonskriteriene var hunder som veide under 7 kg. Vi hadde også et etisk eksklusjonskriterium som innebar at dersom en ikke fikk nok blod ved første blodprøveuttak, skulle pasienten ikke stikkes på nytt.

Variablene i studien var: PLT, RBC, HCT, HBG, MCV, MCHC, RDW, WBC, %Nøytrofile granulocytter, %Lymfocytter, %Monocytter, %Eosinofile granulocytter, %Basofile granulocytter, antall nøytrofile granulocytter, antall lymfocytter, antall monocytter, antall eosinofile granulocytter, antall basofile granulocytter, rase, fødselsdato, kjønn (hann/hunn), Intakt/kastrert, diagnoser og diagnosekoder. CRP ble målt ved Sentrallaboratoriet for 79 av prøvene.

Prøveinnsamling

For hunder som møtte kriteriene ble det tatt ut et ekstra glass 2 ml EDTA ved prøvetakning. Ett av glassene ble sendt til sentrallaboratoriet for å analyseres på ADVIA, og det andre glasset ble analysert med ProCyte ved klinikklaboratoriet i Dyresykehuset – smådyr. Det ble

laget minst ett blodutstryk fra blodprøven innen 30 minutter fra blodprøvetaking. Det ble samlet informasjon fra pasientjournal om signalement (rase, fødselsdato, kjønn, intakt/kastrert), primære og sekundære diagnoser og diagnosekoder. Eiere som leverer dyr til NMBU Dyresykehuset – smådyr signerer et samtykkeskjema som tillater at prosedyrer som inngår som en del av pasientens undersøkelse og behandling kan bli brukt i forskning.

Prosedyrer på laboratoriet

Etter prøvetakning ble EDTA-glassene vendt gjentatte ganger slik at blod og antikoagulant blandet seg. Blodprøven ble analysert med ProCyte i hovedsak innen 1–2 timer og maksimalt innen 5 timer. Det ble laget blodutstryk innen 30 minutter, og utstryk av diagnostisk kvalitet ble farget med Hemocolor som angitt i pakningsvedlegget.

Tilsvarende laboratoriearbeid ble utført ved Sentrallaboratoriet hvor blodprøven ble analysert med ADVIA. Blodprøvene ble oppbevart i romtemperatur og analysert innen 2 timer. Dersom prøven ble tatt av akuttpasienter på vakt utenfor Sentrallaboratoriets åpningstider ble prøven lagret i kjøleskap, og analysert neste hverdag. Når det var tilfellet ble ProCyte prøven analysert med en gang, og ADVIA prøven ved første anledning, men ikke senere enn etter tre døgn. Av prøvene i denne studien ble ingen resultater fra ADVIA registrert senere enn 29 timer etter prøvetakning.

Inspeksjon av cytogram og manuell differensiering

Etter hematologianalysen ble alle cytogrammene fra ProCyte inspisert av minst to av forfatterne. Dersom et cytogram ikke hadde tydelig adskilte leukocyttopulasjoner, eller det

var tilstedeværelse av stjernemarkering på en eller flere leukocytter, skulle det utføres en manuell differensiering av leukocytterne for denne blodprøven. Den manuelle differensieringen av prøvene ble utført med Nikon MODEL ECLIPSE Ci-L med 40 x objektiv på Smådyrlaboratoriet av minst to av forfatterne. Det ble telt 100 leukocytter i det monocellulære laget. Siden ProCyte og ADVIA kun viser total antall nøytrofile granulocytter i sine resultater, ble ikke antall båndnøytrofile, toksiske nøytrofile, metamyelocytter og myelocytter ved differensialtellingen notert, men det ble kommentert dersom det ble funnet et stort antall av noen av disse. Forekomst av kjerneholdige erythrocytter ble også notert.

Manuell telling av antall trombocytter

Tellingen av trombocytter ble utført med Nikon MODEL ECLIPSE Ci-L av minst to av forfatterne. Først ble tungen gjennomgått systematisk med 20x objektiv for å registrere forekomst av plageaggregater. Deretter ble antall trombocytter telt med 100x objektiv m/ olje i 10 ulike felt i monocellelaget. Gjennomsnittet ble multiplisert med 20 for å gi et estimat på totalt antall trombocytter ($\times 10^9/L$). Det ble notert forekomst av makrotrombocytter.

Trombocytter ble kun telt på blodprøver der ProCyte registrerte en trombocytopeni og det ikke ble funnet plateaggregater i tungen.

Statistisk analyse

Bland Altman-plott

For alle variabler ble det regnet ut bias: gjennomsnitt av differansen for hver variabel, et 95% konfidensintervall og Spearmans rang korrelasjonskoeffisient. Bias og konfidensintervall ble brukt til å lage Bland Altman-plott for alle variablene. For ulike typer leukocytter (nøytrofile, lymfocytter, monocytter og eosinofile) ble dette gjort igjen med et korrigert datasett. Det

korrigerede datasettet ble laget etter fjerning av blodprøver med uakseptable cytogrammer og/eller stjernemarkeringer. Bland Altman-plottene ble laget i Microsoft Office Excel. Disse ble inspisert, og det ble notert hvor mange blodprøver som lå utenfor konfidensintervallet for hver variabel. Spearmans rang korrelasjonskoeffisienter ble regnet ut i GraphPad Prism. Det ble bestemt å anvende disse metodene fordi de kan benyttes ved data som er ikke normalt fordelt.

Spearmans rang korrelasjonskoeffisient

Spearmans rang korrelasjonskoeffisient (r_s) ble benyttet for å se på korrelasjonen mellom alle variablene analysert på både ProCyte og ADVIA. Denne testen gir en verdi mellom 1 og -1 . En koeffisient nærmere 1 betyr at det er høy korrelasjon, der de to verdiene øker eller synker i samme retning. Dersom verdien er nærmere -1 , betyr det at relasjonen går i to ulike retninger, dvs. at når en variabel øker på den ene maskinen, reduseres den på den andre. Det ble funnet en skala i en lignende studie som ble brukt (tabell 1). En r_s mellom 0,93–0,99 ble klassifisert som utmerket korrelasjon. En r_s mellom 0,80–0,92 ble klassifisert som god korrelasjon. En r_s mellom 0,59 – 0,79 ble klassifisert som akseptabel korrelasjon. En r_s under 0,59 ble klassifisert som dårlig. Nøyaktigheten mellom begge maskinene ble vurdert basert på korrelasjonen og bias. En minimal bias, sammen med god til utmerket korrelasjon vil si at nøyaktigheten oftest er bra nok. (Goldmann et al., 2014)

Tabell 1: Spearmans rang korrelasjonskoeffisient(rs) etter skala.(Goldmann et al., 2014)

rs	Korrelasjon
0,93–0,99	Utmerket
0,80–0,92	God
0,59–0,79	Akseptabel
<0,59	Dårlig

Definisjon av uakseptable avvik

Det var behov for å definere hva som var uakseptable avvik for nøytrofile mellom IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzer og ADVIA® 2120i Hematology System. Grensen som ble valgt var >15% avvik for nøytrofile. Det ble regnet ut relativ prosentdifferanse (RPD) for variablene mellom ProCyte og ADVIA, for å finne spesifikke blodprøver som hadde uakseptable avvik. Dette ble gjort for å avgjøre om det var en trend for blodprøver med avvikende resultat for å vurdere mulige årsaker. Verdien er opprinnelig brukt på metoder som benytter automatiske tellinger, men kan også benyttes ved manuell differensiering. (Nabity et al., 2018)

Resultater

Det ble samlet 116 blodprøver fra pasienter ved NMBU Dyresykehuset – Smådyr i perioden 29. August til 23. Desember 2022. Av disse ble 12 blodprøver ekskludert fordi de kun ble analysert på én av maskinene. Det ble oppdaget at prøve #69 var duplisert, og denne ble fjernet ved gjennomgang av datasettet. Ved inspeksjon av cytogrammene ble det oppdaget at to blodprøver analysert med ProCyte hadde avvik, men fordi det manglet blodutstryk kunne ikke resultatene bekreftes ved manuell differensiering. Disse to blodprøvene ble derfor også ekskludert. To blodprøver måtte ekskluderes fordi hundene veide mindre enn 7 kg. Etter ekskludering av blodprøver, ble 99 blodprøver brukt til statistikk og videre dataanalyse. Av disse var 48 hannhunder, og 51 tisper. Ni blodprøver var fra kasterte dyr, mens 90 prøver var fra intakte hunder. 95 blodprøver var fra syke hunder, mens fire blodprøver var fra friske hunder. Av disse ble to blodprøver tatt fra friske bloddonorer. Blodprøvene ble tatt fra mange ulike hunderaser. Pasientene varierte i alder fra 4 måneder til 13 år ved prøvetakning.

Videre ble pasientene kategorisert i fire ulike kategorier: Neoplasi, Kjemoterapibehandling, Anemi og Inflammasjon. Kategorisering av pasienter til neoplasi- og kjemoterapigruppene var basert på diagnose og data fra pasientjournal. Pasienter ble plassert i anemigruppen basert på antall erytrocytter, hematokrit og hemoglobin fra ADVIA. Pasienter ble plassert inn i inflammasjonsgruppen basert på ett eller flere av følgende kriterier: nøytrofil, venstreforskyvning observert på blodutstryk, CRP >15mg/L. Den 13.12.2022, under arbeidet med prosjektet, tok sentrallaboratoriet i bruk en ny metode for å måle CRP, og verdier under 20 mg/L ble rapportert som ≤ 20 mg/L. CRP ble målt i 79 av 99 blodprøver.

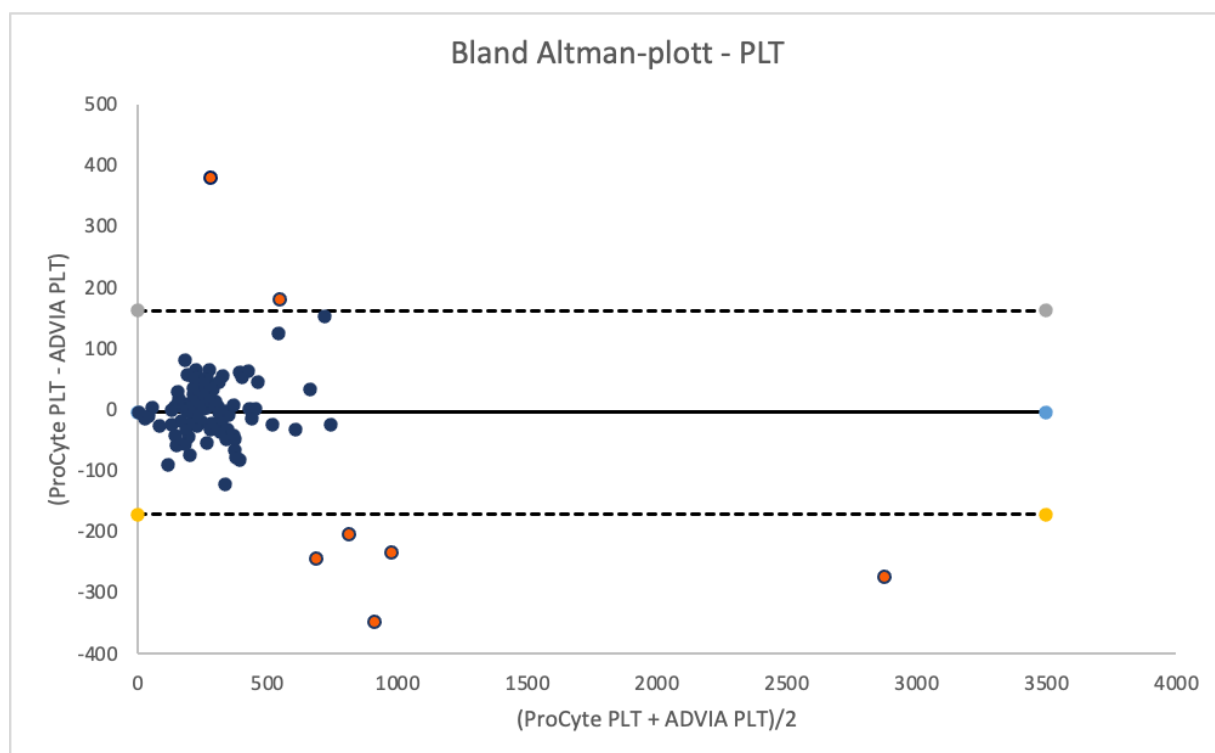
Prøvene ble plassert i mer enn én av de fire gruppene dersom kriteriene var oppfylt. Det var 32 blodprøver fra pasienter med neoplasi, og av disse var 13 prøver fra pasienter som fikk

kjemoterapibehandling. 17 blodprøver ble tatt fra anemiske pasienter. Det var 28 blodprøver fra pasienter med systemisk inflammasjon. Av disse 28 ble 24 pasienter plassert i denne kategorien basert på CRP, og tre pasienter basert på hematologieresultatene. Én pasient (prøve #72) ble klassifisert i inflammasjonsgruppen basert på funn av mange båndnøytrofile i blodutstryket.

Sammenligning av alle variabler på begge maskiner

PLT

Det ble funnet en moderat negativ bias på $-4,80$ for PLT fra ProCyte sammenlignet med PLT fra ADVIA. 95% konfidensintervallet gikk fra $-171,38$ til $161,79$ (figur 7). Det ble påvist god korrelasjon ved bruk av Spearmans rang korrelasjonskoeffisient (tabell 2).



Figur 7: Figuren viser et Bland Altman-plott som illustrerer differansene mellom ProCyte og ADVIA ved telling av antall trombocytter. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve.

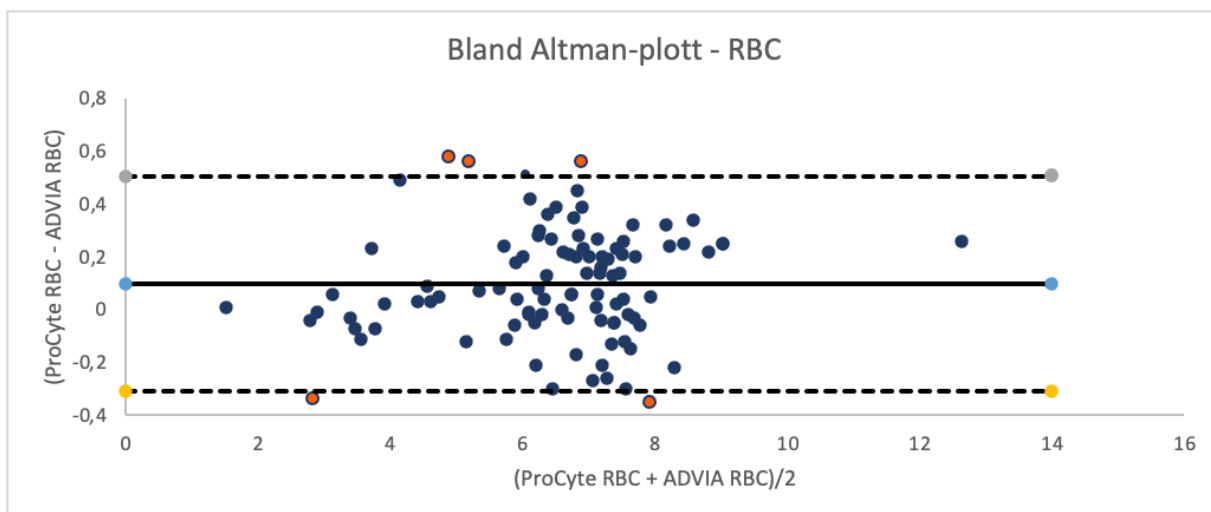
På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias (gjennomsnitt av differansene). Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje. Figuren viser at det er 7 prøver som ligger utenfor konfidensintervallet.

Det var totalt 10 blodprøver med trombocytopeni ifølge referanseverdiene som ble brukt av ProCyte, men det var kun fem blodprøver (#2, #65, #73, #79, #109) der ProCyte varslet om lavt antall trombocytter. Det ble utført en manuell sjekk av trombocytter på alle 10 blodprøvene, og det ble funnet plateaggregater i fem av dem (#2, #4, #65 #50, #73). Det ble observert en trend der ProCyte oftest registrerte lavere antall trombocytter enn ADVIA. Blodprøvesvaret fra ADVIA for de samme prøvene anga at 9 av 10 pasienter hadde en trombocytopeni. Det ble bekreftet et lavt antall trombocytter, $<180 \times 10^9/L$, på seks av blodprøvene ved vurdering av blodutstryk. For en av blodprøvene der ProCyte varslet om lavt antall trombocytter registrerte maskinen $0 \times 10^9/L$ trombocytter. På samme blodprøve registrerte ADVIA $5 \times 10^9/L$ trombocytter. En manuell telling av trombocytter ble utført og estimert til $2 \times 10^9/L$ trombocytter.

Det ble funnet seks blodprøver (#18, #36, #37, #49, #109 og #116) der ADVIA registrerte en trombocytopeni, mens ProCyte anga et normalt antall trombocytter i henhold til deres respektive referanseområder. Av disse blodprøvene var det fire blodprøver med funn av mange plateaggregater. For to av blodprøvene, var det ingen funn av plateaggregater ved vurdering av blodutstryket på Sentrallaboratoriet eller ved forfatterens vurdering av blodutstrykene. (#109, #116)

RBC

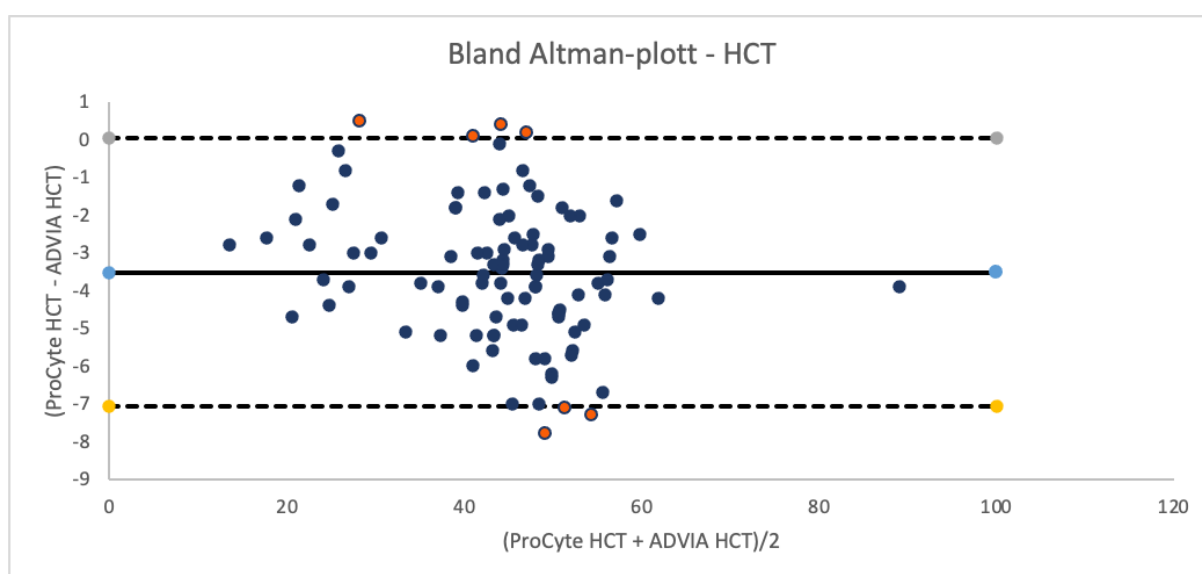
Etter analyse av erytrocytter på begge maskiner ble det funnet en minimal positiv bias på 0,10. 95% konfidensintervallet var mellom $-0,31$ og $0,51$. Spearmans rang korrelasjonskoeffisient viste en utmerket korrelasjon (tabell 2). For én blodprøve, #109, registrerte ProCyte en stjernemarkering for antall erytrocytter. Maskinen anga at blodprøven hadde et høyt antall erytrocytter på $12,76 \times 10^{12}/L$. Dette samsvarte godt med blodprøvesvaret fra ADVIA.



Figur 8: Bland Altman-plott for differansen mellom erytrocytter målt med ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje. Nesten alle punktene er sentrert rundt 0. Det tyder på at det er minimal differanse mellom begge maskiner ved måling av erytrocytter.

HCT

Det ble funnet en negativ bias på $-3,51$ ved sammenligning av hematokrit på ProCyte og ADVIA. 95% konfidensintervallet var mellom $-7,06$ og $0,03$. Spearmans rang korrelasjonskoeffisient viste utmerket korrelasjon mellom maskinenes resultater (tabell 2). Det ble funnet syv blodprøver utenfor konfidensintervallet. Tre av disse registrerte lavere HCT med ProCyte enn med ADVIA.

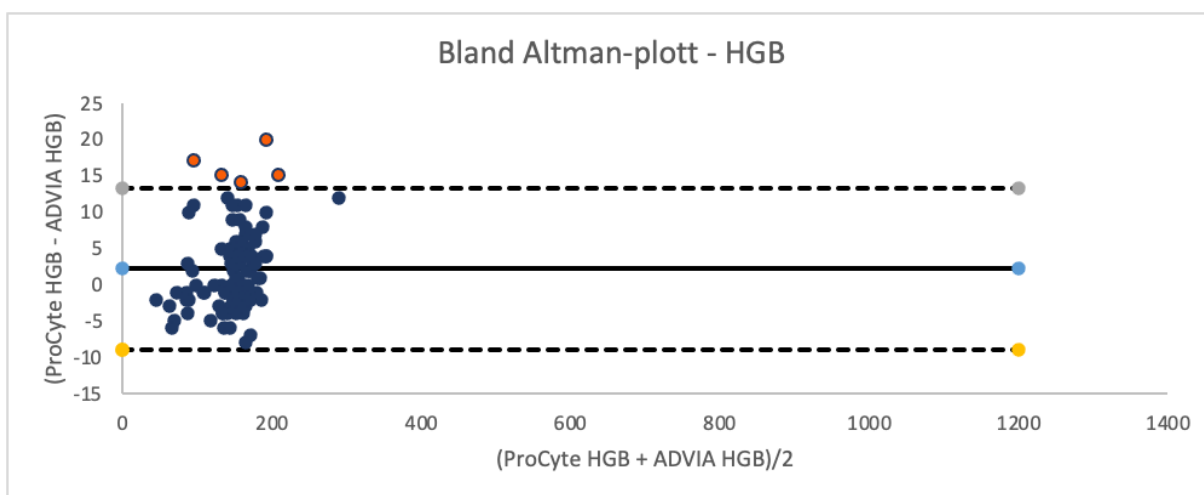


Figur 9: Bland Altman-plott for differansen mellom HCT målt på henholdsvis ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje. Mesteparten av differansene er <0 . Det betyr at i denne studien måler ProCyte konsekvent noe lavere HCT enn det ADVIA gjør.

HGB

Det ble funnet en positiv bias på $2,21$ for HGB ved sammenligning av ProCyte og ADVIA. 95% konfidensintervallet var fra $-8,95$ til $13,37$. Spearmans rang korrelasjonskoeffisient viste

utmerket korrelasjon mellom de to maskinene (tabell 2). Fem blodprøver lå utenfor konfidensintervallet (#8, #29, #33, #39 og #63) med høyere verdier med ProCyte enn ADVIA. For prøve #33 registrerte både ProCyte og ADVIA en HGB-verdi høyere enn referanseområdet. ProCyte genererte stjernemarkering på én blodprøve, #109, som også hadde stjernemarkeringer på erythrocytter og HCT.

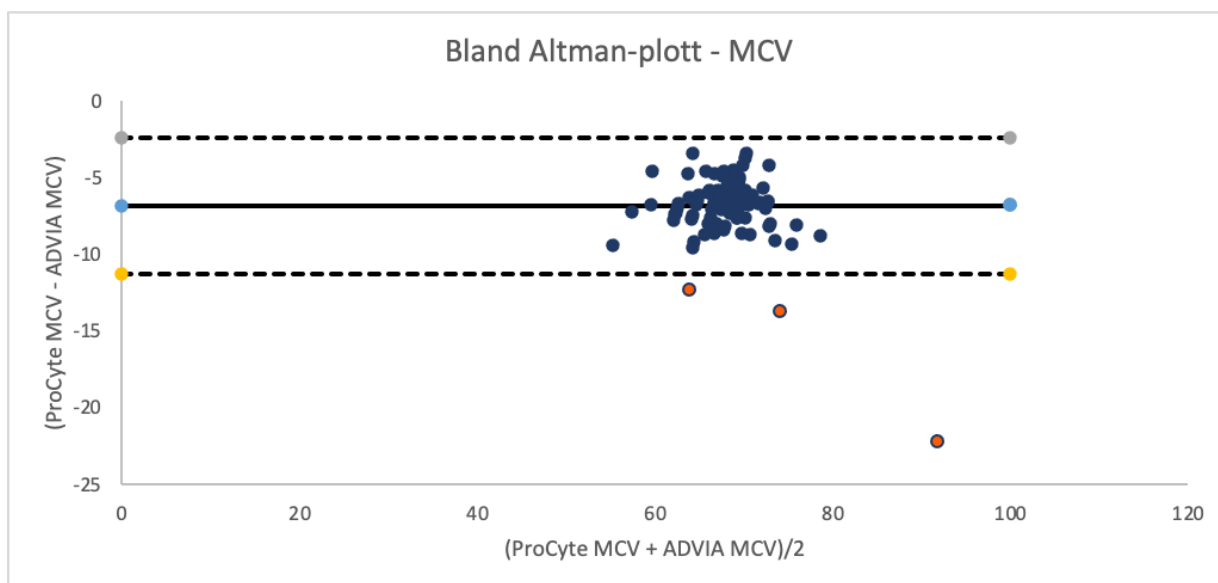


Figur 10: Figuren viser et Bland Altman-plott for differansen mellom HGB målt med ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stippledde linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stippledde linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje.

MCV

Etter analyse av MCV målt med ProCyte og ADVIA ble det funnet en negativ bias på $-6,84$. 95% konfidensintervallet var mellom $-11,28$ og $-2,40$. Det ble påvist god korrelasjon ved bruk av Spearmans rang korrelasjonskoeffisient (tabell 2). Det var tre blodprøver som lå utenfor konfidensintervallet, #4, #84 og #103. For prøve #4 registrerte både ProCyte og ADVIA en forhøyet MCV ifølge gitte referanseområder. For prøve #84 anga ADVIA en

forhøyet MCV, mens verdien fra ProCyte lå innenfor referanseområdet. For prøve #103 registrerte ADVIA MCV-verdi innenfor referanseområdet, mens ProCyte hadde målt en verdi som lå under nedre referanseområde. Alle tre prøver var fra pasienter med anemi og én av dem fra en pasient med immunmediert hemolytisk anemi.

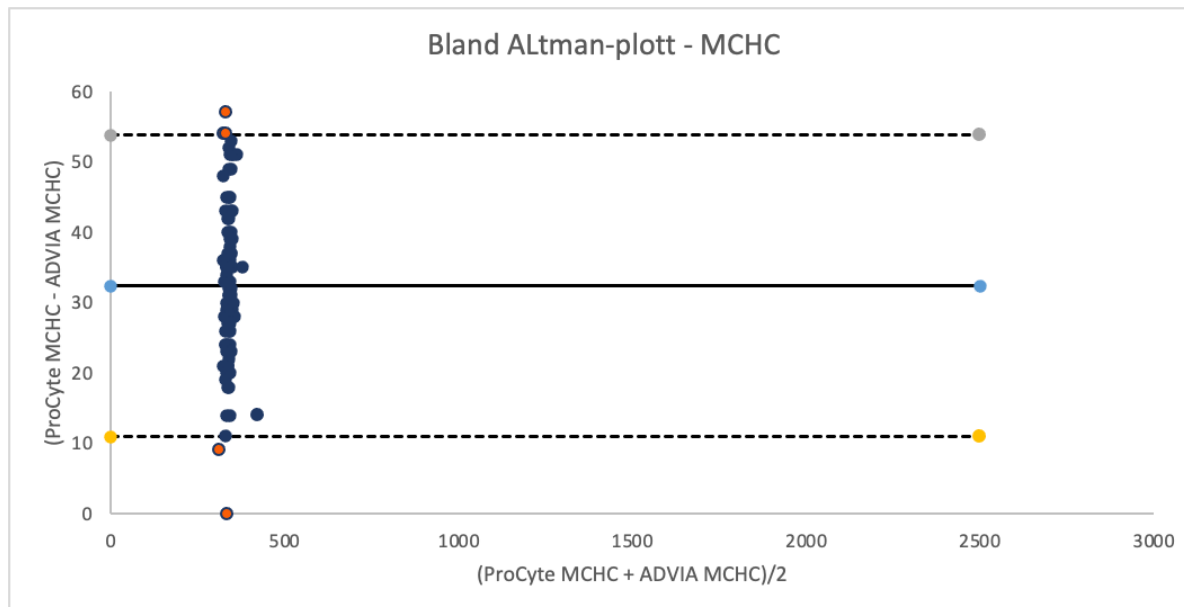


Figur 11: I figuren vises et Bland Altman-plott for MCV. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje. Alle differansene ligger under 0, som betyr at i denne studien, beregner ProCyte konsekvent lavere MCV enn det ADVIA gjør.

MCHC

Det ble funnet en positiv bias på 32,38 for MCHC ved sammenligning av ProCyte og ADVIA. 95% konfidensintervallet var fra 10,97 til 53,80. Ved bruk av Spearmans korrelasjonskoeffisient ble det funnet en dårlig korrelasjon mellom ProCyte og ADVIA

(tabell 2). Det ble funnet fem blodprøver utenfor konfidensintervallet (#4, #53, #76, #93, #98).

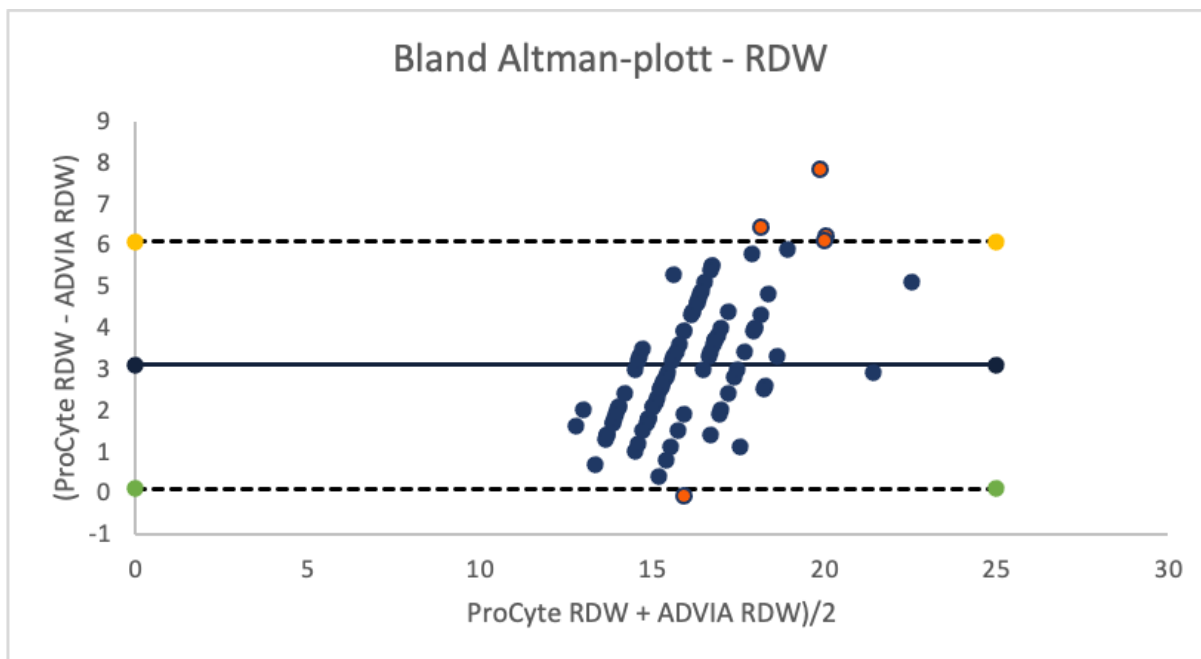


Figur 12: Figuren viser et Bland Altman-plott for differansen mellom MCHC målt med ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplete linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplete linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje. Nesten alle differansene ligger over null, som betyr at i denne studien beregner ProCyte konsekvent høyere MCHC enn det ADVIA gjør.

RDW

Det ble funnet en positiv bias på 3,09 ved måling av RDW med ProCyte og ADVIA. 95% konfidensintervallet lå mellom 0,10 og 6,08. Prøve #4 og #76 ble fjernet for denne statistiske analysen ettersom ProCyte ikke klarte å måle RDW på disse. Figur 13 viser derfor resultatet fra 97 prøver. Spearmans rang korrelasjonskoeffisient viste akseptabel korrelasjon (tabell 2). Fem blodprøver hadde differanser utenfor konfidensintervallet, og av disse var det kun én

blodprøve der verdien havnet utenfor referanseområdet for ProCyte og innenfor referanseområdet for ADVIA.



Figur 13: Viser et Bland Altman-plott for differansen av RDW målt med ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje

Retikulocytter

Det ble ikke utført statistikk for analyse av retikulocytter etter som det kun ble utført for 17 av prøvene med ADVIA. Sentrallaboratoriet analyserer kun antall retikulocytter hos anemiske pasienter. Hos de anemiske pasientene ble det observert en trend der ProCyte telte lavere antall retikulocytter enn ADVIA.

Tabell 2: Bias, Spearmans rang korrelasjonskoeffisient og 95% konfidensintervall for alle parametere unntatt leukocytt. Graden av korrelasjon er hentet fra tabell 1.

Variabel	Enhet	Spearmans rang korrelasjonskoeffisient	Korrelasjon	Bias	95% konfidensintervall
PLT	x10e9/L	0,90	God	-4,80	-171,38 til 161,79
RBC	x10e12/L	0,98	Utmerket	0,10	-0,31 til 0,51
HCT	%	0,97	Utmerket	-3,51	-7,06 til 0,03
HGB	g/L	0,98	Utmerket	2,21	-8,95 til 13,37
MCV	fL	0,90	God	-6,84	-11,28 til -2,40
MCHC	g/L	0,35	Dårlig	32,38	10,97 til 53,80
RDW	%	0,75	Akseptabel	3,09	0,10 til 6,08

Analyse av WBC og leukocytt differensiering

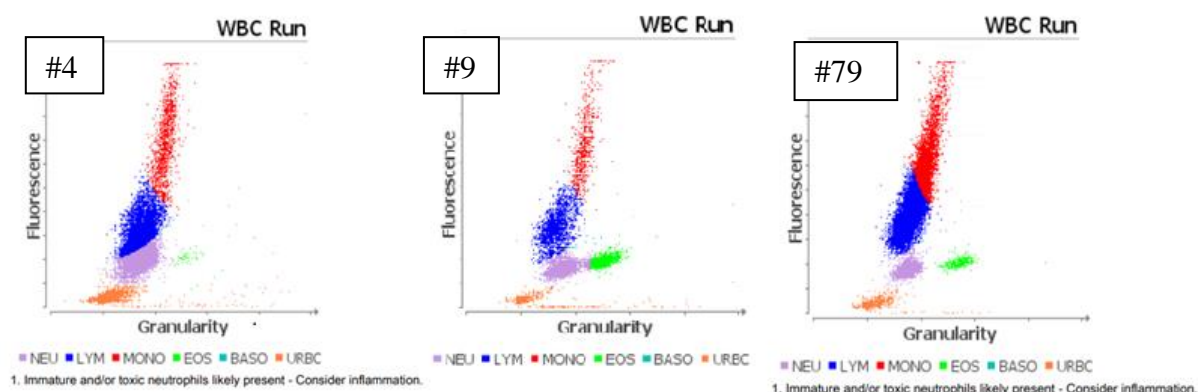
Cytogram

Før det ble utført statistikk ble alle cytogrammene fra ProCyte inspisert. Tabell 3 viser at det ble funnet 17 (av totalt 99) blodprøver med enten uakseptabelt cytogram, stjernemarkering eller begge deler. For disse prøvene det ble bestemt å foreta en manuell differensialtelling av leukocytene. Figur 14 viser eksempler på cytogrammer som er uakseptable. Cytogrammet fra blodprøve #4 viser en veldig tydelig strek mellom de nøytrofile granulocytene (lilla) og lymfocytene (blå). Ved vurdering av cellemorfologien i blodutstryket ble det oppdaget en moderat venstreforskyvning. Cytogrammet fra blodprøve #9 viser en noe mer subtil forandring der de nøytrofile granulocytene (lilla) overlapper med de eosinofile granulocytene (grønn). Pasienten hadde en eosinofili. Cytogrammet fra blodprøve #79 viser en veldig tydelig strek der cellene overlapper mellom lymfocytene (blå) og monocytene

(rød). Denne pasienten ble diagnostisert med leukemi, og ProCyte registrerte en svært markert lymfocytose og monocytose. Ved mikroskopering av blodutstryket ble det observert mange morfologisk atypiske neoplastiske lymfocytter.

Tabell 3: Tabellen viser årsaker til at det ble utført en manuell differensialtelling

Grunnen til at det ble utført en manuell differensialtelling av leukocytter	ProCyte – antall blodprøver
Uakseptabelt cytogram	3
Stjernemarkering/Feilmelding	5
Uakseptabelt cytogram og stjernemarkering	9

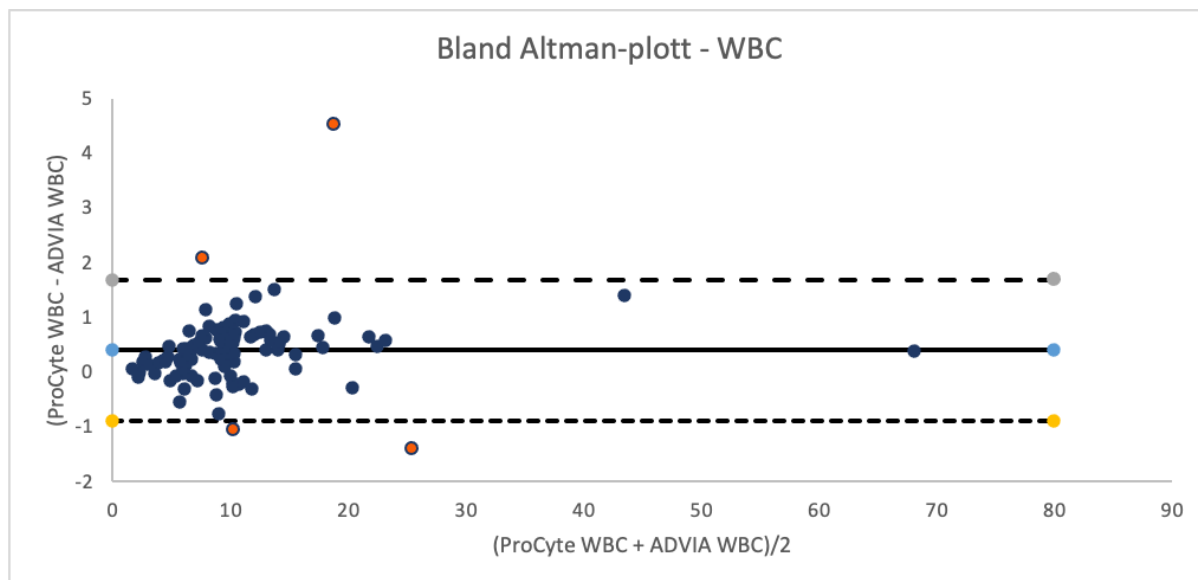


Figur 14: Cytogram for prøve #4, #9 og #79 automatisk framstilt av ProCyte.

Totalt antall WBC

Det ble funnet en minimal bias på 0,40 og et 95% konfidensintervall mellom -0,89 og 1,68 for totalt antall WBC (figur 15). Det ble påvist utmerket korrelasjon ved måling av WBC på begge maskiner (tabell 4). Det ble påvist større forskjeller ved dataanalyse av de spesifikke leukocytene (nøytrofile granulocytter, lymfocytter og monocytter). Etter korrigering av

datasettet ble bias 0,33 og 95% konfidensintervallet gikk fra $-0,56$ til $1,23$. Figur 15 er fra det opprinnelige datasettet.



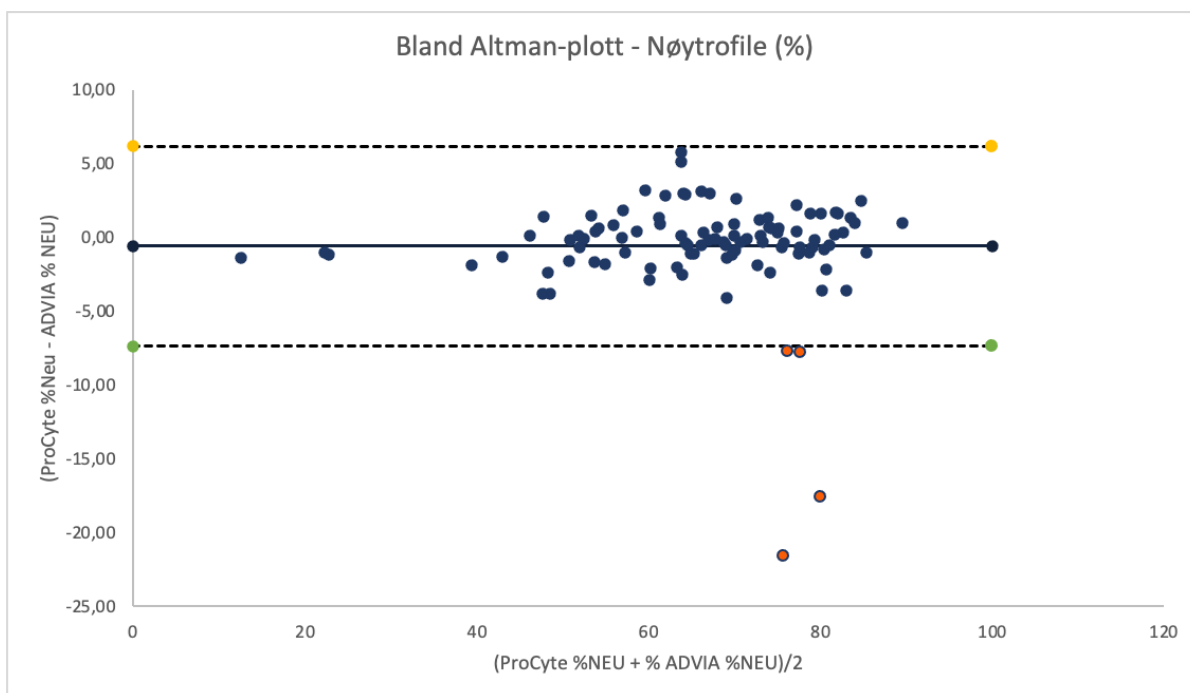
Figur 15: Bland Altman-plott for differansen mellom WBC målt med ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje.

Nøytrofile granulocytter

Det ble laget et Bland Altman-plott for %-nøytrofile granulocytter to ganger, først med det opprinnelige datasettet og deretter med et korrigert datasett. I det første datasettet fremkom det en negativ bias på $-0,59$ og et 95% konfidensintervall fra $-7,38$ til $6,19$. Spearmans rang korrelasjonskoeffisient viste en utmerket korrelasjon ved differensiering av nøytrofile mellom ProCyte og ADVIA (tabell 4). Bias og konfidensintervallet ble beregnet på nytt etter fjerning av blodprøver med uakseptable cytogrammer og/eller stjernemarkeringer. Dette ga en bias på

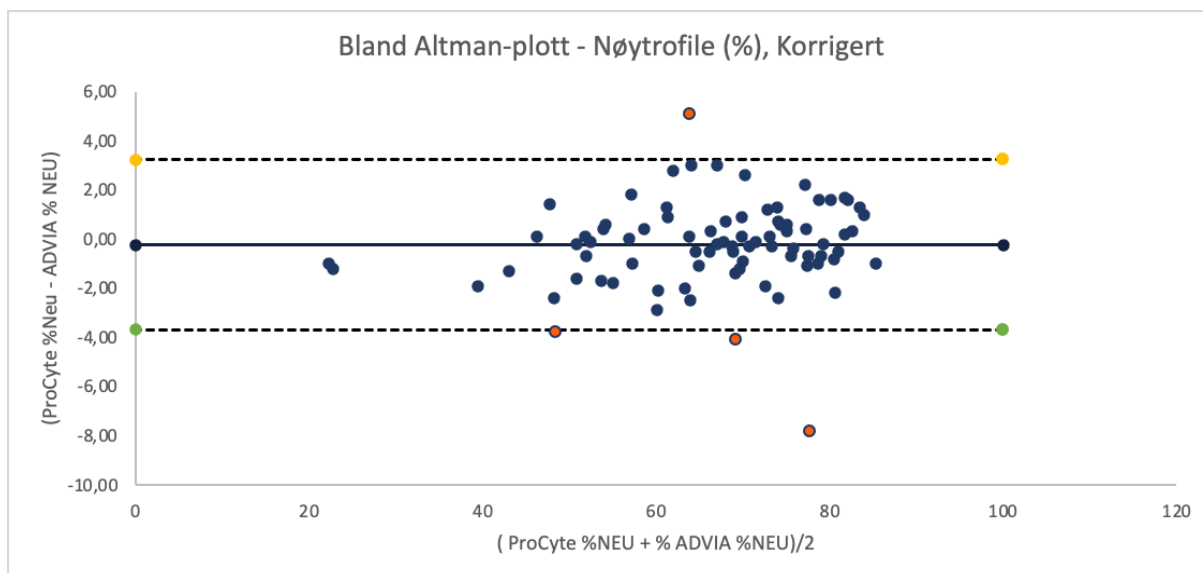
-0,23, og et 95% konfidensintervall mellom -3,69 og 3,23. Figur 17 viser et smalere konfidensintervall etter korrigering sammenlignet med figur 16.

Det ble funnet 4 blodprøver utenfor konfidensintervallet (#17, #77, #89, #109). Ved alle disse prøvene telte ProCyte lavere antall nøytrofile enn ADVIA. Prøve #77 kom fra en pasient i inflammasjonskategorien. ProCyte varslet om mistanke om toksiske nøytrofile og cytogrammet ble vurdert som uakseptabelt med utydelig avgrensning mellom nøytrofil- og lymfocyttopulasjonene. Ved denne prøven hadde ProCyte telt 72,3% nøytrofile, mens ADVIA ga 80% nøytrofile. Det ble notert at ProCyte hadde telt en større andel monocytter (11,9%) enn ADVIA (4,7%). En manuell differensialtelling bekreftet mistanken om at ProCyte hadde underestimert % nøytrofile og overestimert % monocytter.



Figur 16: Bland Altman-plott for Nøytrofile granulocytter for alle 99 prøver. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser

øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje.

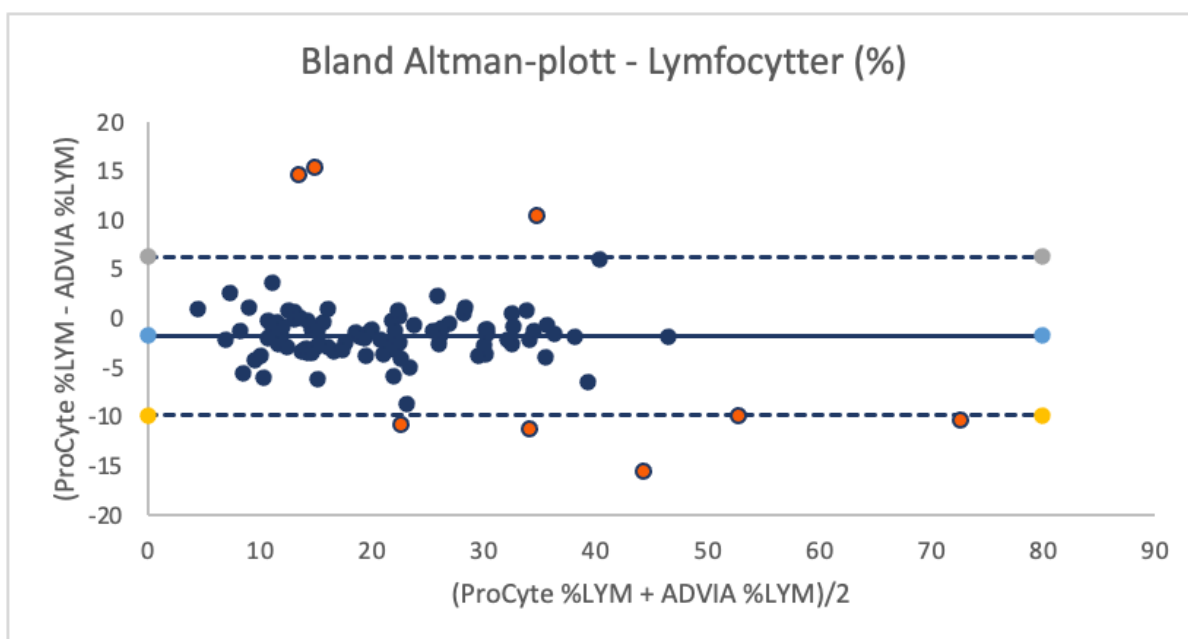


Figur 17: Bland Altman-plott for Nøytrofile granulocytter, korrigert for stjernemarkeringer og uakseptable cytogrammer. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje.

Lymfocytter

Det ble laget et Bland Altman-plott for differansen ved måling av %-lymfocytter med ProCyte sammenlignet med ADVIA. Det ble funnet en liten negativ bias på $-1,75$, og et 95% konfidensintervall på $-9,80$ til $6,31$. Det ble påvist god korrelasjon mellom begge maskinene med Spearmans rang korrelasjonskoeffisient (tabell 4). Etter korrigering av datasettet ble det regnet bias på $-2,69$ og øvre og nedre grensene for 95% konfidensintervallet var $-9,45$ og $4,07$.

Figur 18 er laget med det opprinnelige datasettet på 99 prøver. Det var åtte prøver som lå utenfor konfidensintervallet (#17, #50, #67, #76, #79, #89, #90 og #99). For prøve #17 og #89 registrerte ProCyte lavere antall nøytrofile granulocytter og et høyere antall lymfocytter og/eller monocytter enn ADVIA. Prøve #50, #67, #90 og #99 var fra samme pasient med diagnosen lymfom. For alle fire blodprøver hadde ADVIA telt flere lymfocytter enn ProCyte. Prøve #79 kom fra en pasient en leukemi.



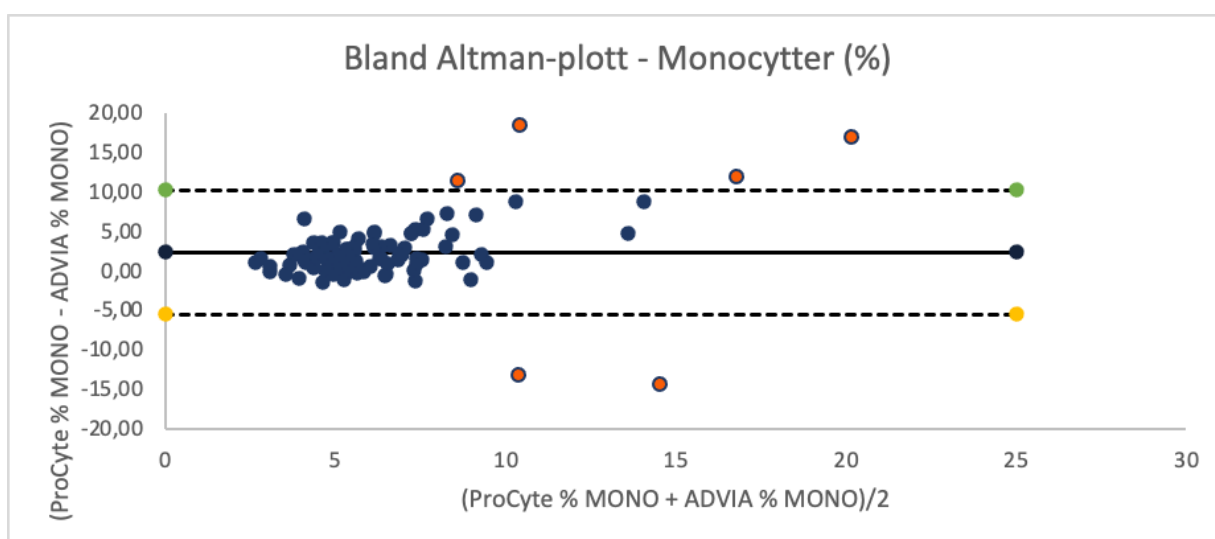
Figur 18: Bland Altman-plott av differansen av lymfocytter målt med ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje.

Monocytter

Det ble laget et Bland Altman-plott for måling av %-monocytter med ProCyte og ADVIA. Det ble regnet ut en positiv bias på 2,32, og et 95% konfidensintervall på –5,56 til 10,20. Det ble påvist en dårlig korrelasjon med Spearmans rang korrelasjonskoeffisient ved telling av

monocytter på begge maskinene (tabell 4). Etter korrigering av datasettet ble det regnet bias på 3,43, og øvre og nedre grensene for 95% konfidensintervallet var -4,39 og 9,06. Figur 19 er laget med det opprinnelige datasettet med totalt 99 prøver.

Det ble funnet fire blodprøver utenfor konfidensintervallet (prøve #9, #18, #50, #67, #79 og #99). Prøve #79 kom fra en pasient med lymfocytær leukemi og fikk påvist markert lymfocytose og markert monocytose med ProCyte, som telte lavere antall lymfocytter og flere monocytter enn ADVIA. Ved inspeksjon av blodutstryket var majoriteten av cellene neoplastiske lymfocytter. I cytogrammet var det var dårlig avgrensning mellom lymfocytt- og monocyttopopulasjonene og hemogrammet hadde stjernemarkering ved nøytrofile, lymfocytter og monocytter. På prøve #50, #67 og #99 registrerte ProCyte flere monocytter og noe færre lymfocytter sammenlignet med ADVIA. De tre prøvene kom fra samme pasient med diagnosen lymfom. Prøve #9 og prøve #18 kom fra pasienter med eosinofili. For prøve #9, var det en utydelig avgrensning mellom nøytrofil- og eosinofil-populasjonen i cytogrammet fra ProCyte (figur 14).



Figur 19: Bland Altman-plott for differansen av monocytter målt med ProCyte og ADVIA. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene

målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje.

Eosinofile granulocytter

Det ble laget et Bland Altman-plott for måling av %-eosinofile granulocytter med ProCyte og ADVIA. Det ble funnet en liten positiv bias på 0,38. 95% konfidensintervallet lå mellom – 4,72 og 5,49. Det ble påvist en akseptabel korrelasjon ved måling av begge maskinene ved hjelp av Spearmans rang korrelasjonskoeffisient (tabell 4). Etter korrigering av datasettet var bias 0,54 og øvre og nedre grensene for 95% konfidensintervallet var –2,89 og 3,98. Figur 20 er laget med det opprinnelige datasettet. Fem prøver havnet utenfor konfidensintervallet (prøve #9, #18, #76, #98, #109). For to prøver (#76, #98) hadde ADVIA telt flere eosinofile granulocytter enn ProCyte. For tre andre prøver (#9, #18, #109) hadde ProCyte telt flere eosinofile granulocytter enn ADVIA.

For prøve #9 registrerte ProCyte en eosinofili med 14,9% eosinofile ($1,41 \times 10^9/L$), mens ADVIA anga 0,1% eosinofile ($0,009 \times 10^9/L$) som var innenfor referanseområdet til ADVIA. Ved inspeksjon av cytogrammet fra ProCyte, ble det funnet en dårlig avgrensning mellom nøytrofil- og eosinofilpopulasjonene på cytogrammet (figur 14). Ved en manuell differensialtelling utført av forfatterne ble det registrert 13% eosinofile. Det ble også utført en manuell differensialtelling ved Sentrallaboratoriet som registrerte 23% eosinofile.

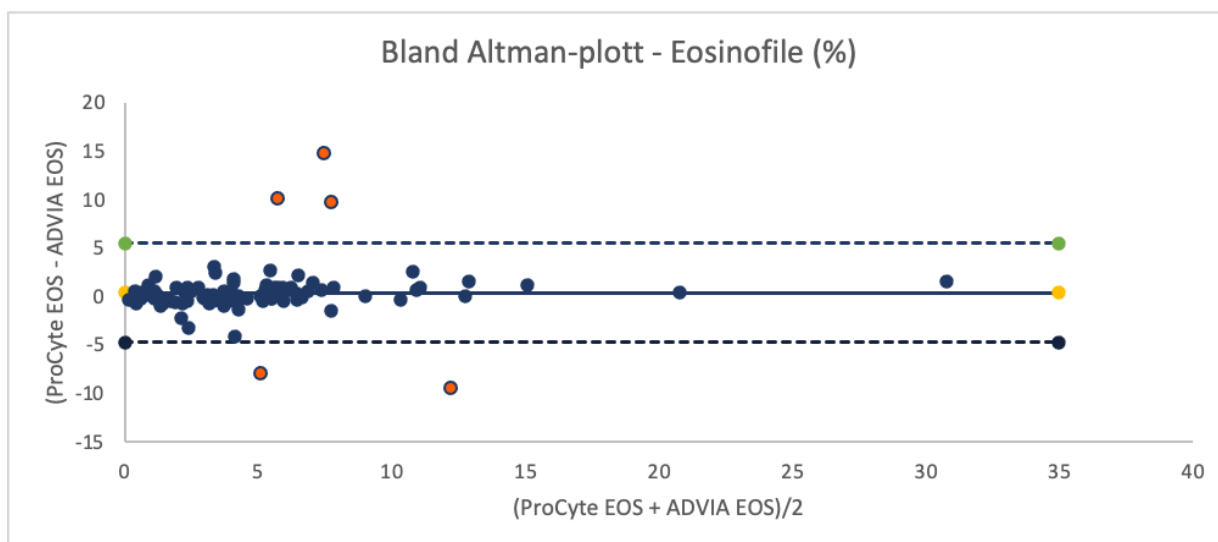
For prøve #18 registrerte ProCyte en eosinofili med 10,8% eosinofile ($1,54 \times 10^9/L$), mens ADVIA ga 0,7% eosinofile ($0,097 \times 10^9/L$) som var innenfor referanseområdet til ADVIA. En manuell differensialtelling utført av ansatte på Sentrallaboratoriet viste 14% eosinofile.

Cytogrammet fra ProCyte ble vurdert som akseptabelt og prøven hadde ingen stjernemarkeringer.

Prøve #76 hadde stjernemarkeringer på alle leukocytter unntatt basofile. Cytogrammet fra ProCyte hadde dårlig avgrensning mellom URBC og eosinofile. Blodprøvesvaret fra ADVIA registrerte 17% eosinofile ($0,78 \times 10^9/L$), mens blodprøvesvaret fra ProCyte registrerte 7,5 % eosinofile ($0,38 \times 10^9/L$). Ved vår manuelle differensialtelling ble det registrert 4% eosinofile. Sentrallaboratoriet hadde også utført en manuell differensialtelling på denne prøven, og registrerte 1% eosinofile.

For prøve #98 registrerte ProCyte 1,1% eosinofile ($0,04 \times 10^9/L$) mens ADVIA registrerte 9,1 % eosinofile ($0,33 \times 10^9/L$) Cytogrammet ble vurdert som akseptabelt, men ProCyte varslet med stjernemarkeringer på nøytrofile, lymfocytter og monocytter. Ved en manuell differensialtelling ble det registrert 9% eosinofile.

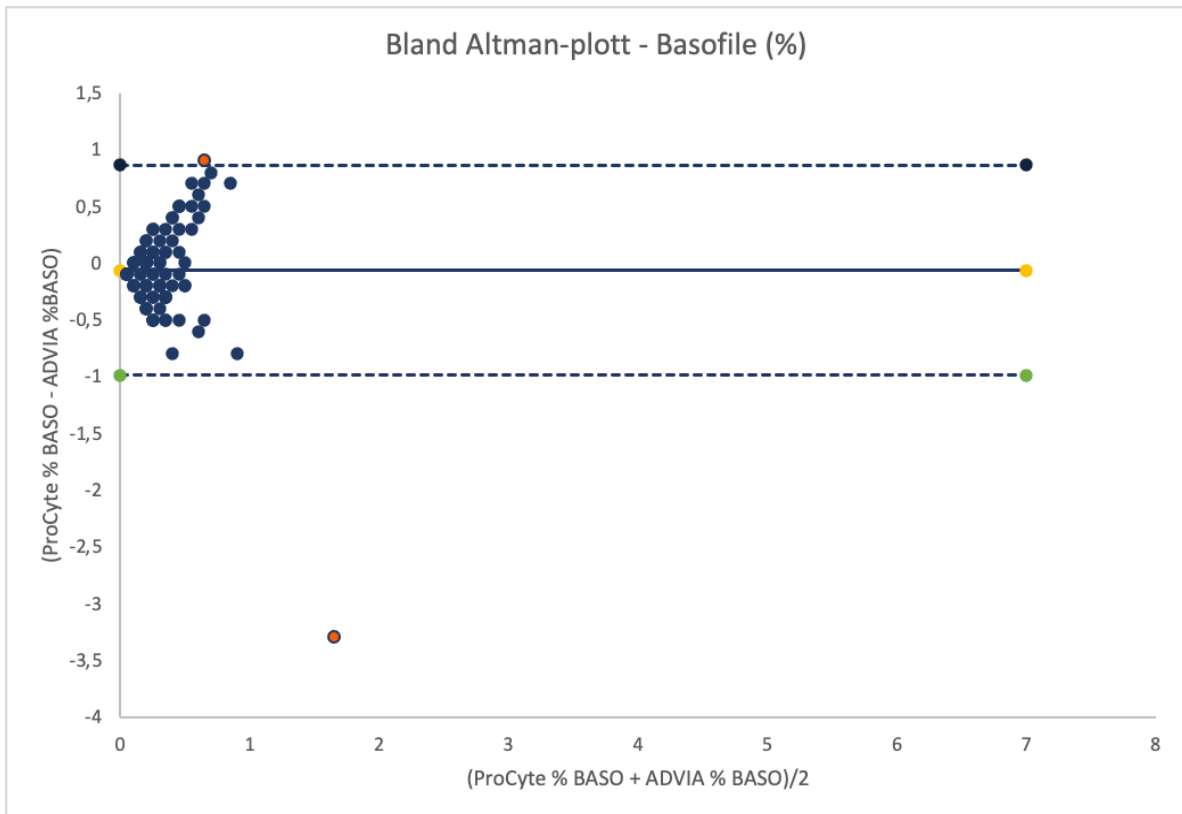
For prøve #109 registrerte ProCyte en eosinofili på 12,6% eosinofile ($1,61 \times 10^9/L$), sammenlignet med ADVIA som anga 2,9% eosinofile ($0,33 \times 10^9/L$), som var innenfor referanseområdet til ADVIA. Cytogrammet fra ProCyte ble vurdert som akseptabelt. Sentrallaboratoriet hadde ikke utført en manuell differensialtelling av denne prøven. En differensialtelling utført av klinisk patolog ved NMBU Dyresykehuset – smådyr resulterte i 8% eosinofile.



Figur 20: Bland Altman-plott for eosinofile granulocytter. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplete linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplete linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje.

Basofile granulocytter

Det ble laget et Bland Altman-plott for måling av %-basofile granulocytter med ProCyte og ADVIA. Det ble regnet ut en minimal negativ bias på $-0,06$. 95% konfidensintervall gikk fra $-0,99$ til $0,86$. Det ble påvist en dårlig korrelasjon ved måling av basofile på begge maskinene med Spearmans rang korrelasjonskoeffisient (tabell 4). Det ble funnet to blodprøver, #52 og #79, utenfor konfidensintervallet. For prøve #52 hadde ProCyte telt flere basofile granulocytter enn det ADVIA gjorde. For prøve #79 hadde ADVIA telt flere basofile granulocytter enn det ProCyte gjorde. Ved manuell differensialtelling utført av forfatterne ble det ikke funnet basofile granulocytter i noen av blodutstrykene. Figur 21 er laget med det opprinnelige datasettet.



Figur 21: Bland Altman-plott for basofile granulocytter. På X-aksen ligger gjennomsnittet av verdiene for de to maskinene for hver prøve. På Y-aksen står differansen mellom verdiene målt med ProCyte – ADVIA. Den heltrukkede svarte linjen viser bias. Det er ønskelig med en bias nær 0. De stiplede linjene viser øvre og nedre grenser for 95% konfidensintervallet. Verdier som ligger utenfor de stiplede linjene viser differanser som er utenfor 95% konfidensintervallet og er markert med oransje. 17 av prøvene hadde differanse lik 0.

Tabell 4: WBC – Oversikt over bias, 95% konfidens intervaller og korrelasjonskoeffisienter med det opprinnelige datasettet, og korrigerte datasett. 1 – Første statistiske analyse med det opprinnelige datasettet. 2 – Korrigeret datasett hvor det er fjernet blodprøver med uakseptabelt cytogram eller stjernemarkeringer fra systemet.

Variabel	Enhet	Spearman's rang korrelasjons- koeffisient (r)	Korrelasjon	Bias (gjennomsnitt av differansen)	Nedre og øvre grense for 95% konfidens- intervall
WBC – 1	x10e9/L	0,99	Utmerket	0,40	-0,89 til 1,68
WBC – 2	x10e9/L	0,98	Utmerket	0,33	-0,56 til 1,23
NEU – 1	%	0,95	Utmerket	-0,59	-7,38 til 6,19
NEU – 2	%	0,99	Utmerket	-0,23	-3,69 til 3,23
LYM – 1	%	0,92	God	-1,75	-9,80 til 6,31
LYM – 2	%	0,95	Utmerket	-2,69	-9,45 til 4,07
MONO – 1	%	0,43	Dårlig	2,32	-5,56 til 10,20
MONO – 2	%	0,54	Dårlig	3,43	-4,39 til 9,06
EOS – 1	%	0,77	Akseptabel	0,38	-4,72 til 5,49
EOS – 2	%	0,86	God	0,54	-2,89 til 3,98
BASO – 1	%	0,06	Dårlig	-0,06	-0,99 til 0,86

Diskusjon

PLT

I denne studien viste statistisk analyse av trombocytter godt samsvar mellom ProCyte og ADVIA, dermed er resultatene presise nok til å stole på, med mindre det er tilstedeværelse av plateaggregater. ProCyte registrerte i gjennomsnitt $5 \times 10^9/L$ færre trombocytter enn ADVIA. For fem av ti blodprøver der ProCyte registrerte en trombocytopeni kunne det forklares av plateaggregater.

Det var enkelte prøver der ADVIA anga en trombocytopeni og ProCyte registrerte verdier innenfor referanseområdet. Dette kunne forklares med funn av plateaggregater hos sentrallaboratoriet på flertallet av de aktuelle prøvene. På en av blodprøvene registrerte ProCyte og ADVIA en trombocytopeni og antall trombocytter ble estimert til $2 \times 10^9/L$ ved manuell telling utført av Sentrallaboratoriet. Det var likevel usikkert om pasienten hadde en klinisk relevant trombocytopeni ettersom det ble notert at blodprøveglasset hadde et koagel. En studie som undersøkte hvordan trombocytter endrer seg over tid i blodprøver fant ut at antall plateaggregater i blodprøver kan øke med tid. I denne studien hadde 7,5% av prøvene plateaggregater 6 timer etter prøvetakning, mens 32,5% av prøvene hadde plateaggregater 24 timer etter prøvetakning. Konklusjonen ble at de automatiserte resultatene kunne vise en falsk trombocytopeni grunnet dannelse av plateaggregater hvis prøven ble analysert mer enn 4–6 timer etter prøvetakning. (Jaguezeski et al., 2020). Dette kan være en mulig forklaring for prøvene uten samsvar i vår studie. De ble analysert innen 20 min med ProCyte og måtte vente mellom 2 og 18 timer før de ble analysert på ADVIA. Det kan ikke utelukkes at en forsinkelse i prøveanalyse ved ADVIA kan ha ført til en reduksjon i antall trombocytter (Goldmann et al., 2014) grunnet dannelse av flere plateaggregater.

ProCyte differensierer erythrocytter og trombocytter ved bruk av Impedance-teknologi basert på cellestørrelse, og dette kan føre til at plateaggregater telles som én stor celle og ikke som flere trombocytter. Også ved manuell telling er det umulig å estimere dersom trombocytterne ligger i aggregater. Det er ikke mulig å telle de individuelle trombocytterne når de ligger i klumper og ikke er jevnt fordelt i feltene man teller i. (Norman et al., 2001) Det er viktig å vurdere «tungen» i blodutstryket der plateaggregatene akkumuleres. Ved tilstedeværelse av mange plateaggregater, burde det vurderes om dette kan være årsaken til trombocytopenien. Ved funn av enkelte små plateaggregater der det kan være usikkert om pasienten har en reell trombocytopeni, kan det være hensiktsmessig å utføre en manuell telling av trombocytterne i monocellelaget.

Resultatene i denne studien indikerer at både ProCyte og ADVIA kan angi et falskt lavt antall trombocytter dersom det dannes plateaggregater. Basert på dette skal man bekrefte et lavt antall trombocytter på blodutstryk for å vurdere om pasienten har en reell trombocytopeni. Dette gjøres rutinemessig av Sentrallaboratoriet på alle prøver analysert på ADVIA. Normalt skal det være 8–10 trombocytter per felt med 100x objektiv i monocellelaget. Det er spesielt viktig å bekrefte eller avkrefte en markert trombocytopeni før det skal utføres prosedyrer der et lavt antall trombocytter kan medføre blødningsrisiko, for eksempel ved uttak av finnålsaspirat fra milt og lever.

Morfologisk vurdering av cellene i blodutstryk gir ytterligere informasjon. I tre blodprøver, ble det observert store trombocytter. For prøve #2, tatt fra en Cavalier King Charles Spaniel, ble det påvist trombocytopeni med begge maskiner. Ved vurdering av blodutstryk ble det registrert at platene som var til stede var store som indikerte at hunden hadde

makrotrombocytopeni, en arvelig tilstand som tilsier at hunden har en normal funksjonell trombocyttemasse til tross for et lavt antall trombocytter.

I en av prøvene med trombocytopeni, prøve #17, var det funn av store trombocytter ved vurdering av blodutstryket. Det ble ikke funnet noen plateaggregater i blodutstryket, dermed ble trombocytopenien ansett som reell. I tillegg var det kliniske funn som støttet diagnosen, inkludert økt blødningstendens under operasjon og petekkier i bukorganer. Denne pasienten hadde en systemisk inflammasjon forårsaket av pyometra med en sekundær generalisert peritonitt. Forekomst av store trombocytter kan forklares av den inflammatoriske prosessen. Ved inflammatoriske tilstander kan det forekomme et økt antall sirkulerende store trombocytter i blodet. Det er to mulige årsaker til dette – Ved inflammatoriske prosesser øker produksjonen av cytokiner, som fører til slipp av flere umodne trombocytter fra beinmargen. En annen forklaring er at ved inflammasjon aktiveres flere trombocytter, som fører til en endring av cellemorfologien, noe som gjør at trombocytterne får økt volum. (Engelbrecht et al., 2021)

I prøve #76, fra en pasient med myelodysplastisk syndrom, registrerte begge maskiner trombocytose, og ved undersøkelse av blodutstryk fant man store trombocytter. Ved myelodysplastisk syndrom ses dysplastiske forandringer i en eller flere hematopoietiske cellelinjer (erytroide, myeloide og megakaryocytære). En studie som så på flere kasus med primær myelodysplastisk syndrom beskrev en pasient med primær refraktær anemi med store hypergranulerte trombocytter observert i blodutstryk. De store trombocytterne hos pasienten i vår studie kan være forbundet med den neoplastiske prosessen. (Weiss & Smith, 2000)

HCT

Ved statistisk analyse av HCT ble det funnet en moderat negativ bias (tabell 2). En bias av denne størrelsen vil sannsynligvis ikke ha noen klinisk relevans hos friske pasienter. Når det kommer til alvorlig anemiske pasienter med HCT på grensen til en transfusjonstrigger på <12% samtidig med kliniske parametere som peker i samme retning, kan en falskt lav verdi fra ProCyte være med og påvirke avgjørelsen om å sette i gang en blodtransfusjon. Prøve #4 er et eksempel hvor et falskt avvik i HCT på 10% med ProCyte vil gjøre at hematokritverdien bikker grensen og går fra 12.2% til 10.98%. (Swann et al., 2019) Prøven var fra en hund med immunmediert hemolytisk anemi tatt inn på akuttvakt på kveldstid, og de hadde derfor ikke ADVIA sin HCT-verdi på 15% tilgjengelig. Hematokriten ble i dette tilfellet dobbeltsjekket med mikrohematokrit, heretter kalt PCV, og pasienten fikk blodtransfusjon til tross for PCV på 16% basert på andre parametere og kliniske vurderinger.

Det er spesielt viktig å være kritisk til å benytte HCT fra ProCyte som en avgjørende faktor for å ta kliniske beslutninger fordi det er en risiko forbundet med blodtransfusjon. Selv om det er sjeldent, kan livstruende transfusjonsreaksjoner oppstå. Eksempler på slike reaksjoner er immunmediert hemolyse og transfusjonsrelatert akutt lungeskade (TRALI). (Tocci, 2010)

Anemi er en av de vanligste paraneoplastiske syndromene. Det kan være flere mulige årsaker til dette inkludert anemi forårsaket av kronisk sykdom (ACD), immunmediert hemolytisk anemi og anemi forårsaket av blodtap. Kjemoterapi-indusert anemi kan forekomme hos dyr, og HCT monitoreres regelmessig hos pasienter som behandles med kjemoterapi. HCT-verdien kan være med å påvirke videre behandlingsforløp hos disse pasientene. (Withrow & Vail, 2007) Prøve #76 fra pasienten med myelodysplastisk syndrom/tidlig akutt myeloid leukemi, viste moderat forverring av HCT på ProCyte. Dette førte til at medikamentet Doxorubicin ble

byttet ut med Cytarabin. Da svaret fra ADVIA kom noen timer senere viste det seg at HCT var stabil og medikamentbyttet ikke var nødvendig.

PCV er gullstandarden for analyse av HCT, og kan benyttes som en kontroll av maskinens HCT. PCV og HCT målt med ProCyte bør ikke ha en forskjell på mer enn 3%. (Stern, 2023) Å måle PCV kunne altså vært en rask og enkel måte å verifisere om resultatet fra ProCyte på prøve #76 stemte, og bør utføres dersom lav HCT fra ProCyte er med på å endre kliniske beslutninger. En annen fordel med å sjekke PCV er at vi også kan se på plasmaforandringer som lipemi, hemolyse og ikterus. Som en forlengelse av denne studien hadde det vært interessant å sammenligne HCT fra ProCyte med PCV.

RBC

Ved statistisk analyse av erythrocytter ble det funnet minimal bias og utmerket korrelasjon. Forskjellene mellom maskinene anses som minimale, dermed vurderes verdiene fra ProCyte som presise nok til å stole på.

ProCyte genererte stjernemarkering for RBC, HCT og HGB på prøve #109. HCT-verdien på denne prøven var 87,1 % hos ProCyte og 91% hos ADVIA. RBC-verdien var $12,76 \times 10^{12}/L$ hos ProCyte og $12,5 \times 10^{12}/L$ hos ADVIA. Verdiene var forøket og lå utenfor referanseområdet hos begge maskinene. De forøkede verdiene ble vurdert som reelle for begge maskinene etter inspeksjon av blodutstryket der erythrocyttene hadde normal morfologi, men var tettpakket i monocellulærlaget. Pasienten hadde diagnosen polycytemia vera.

Retikulocytter

Ved statistisk analyse av retikulocytter ble det funnet at det oftest var samsvar mellom resultater fra ProCyte og ADVIA. Ut ifra de 17 prøvene som ble analysert fremkom det at ProCyte i majoriteten av tilfellene viser lavere antall retikulocytter enn ADVIA. Ved to tilfeller (prøve #76 og #98) ble anemien klassifisert som regenerativ av Sentrallaboratoriet basert på antall retikulocytter over referanseområdet ($> 90 \times 10^9/L$) og vurdering av blodutstryk, mens ProCyte genererte kommentar om anemi uten retikulocytose som sannsynligvis ikke var regenerativ. Disse prøvene var fra en pasient vi fulgte over en lengre periode. Prøve #57 fra denne pasienten viste en HCT på 22% målt på ADVIA. ProCyte registrerte $11,1 \times 10^9/L$ og ADVIA registrerte $14 \times 10^9/L$ retikulocytter på denne prøven. Begge prøvesvar antydte en anemi uten respons. Det ble tatt en ny blodprøve (#76) to uker senere som viste HCT på 23% der ProCyte registrerte $58 \times 10^9/L$ retikulocytter og ADVIA registrerte $106 \times 10^9/L$ retikulocytter. Etter enda to uker (#98) var HCT på 22%. ProCyte registrerte da $76 \times 10^9/L$ antall retikulocytter, og ADVIA registrerte $114 \times 10^9/L$ retikulocytter. Dette viser at selv om antall retikulocytter registrert av ProCyte var lavere enn referanseområdet ($110 \times 10^9/L$), viste tre blodprøver tatt med to ukers mellomrom at pasienten hadde en svak regenerativ respons. Dette understreker viktigheten av å se på trender i endringer i HCT- og retikulocytttall for å klassifisere anemi som enten regenerativ eller ikke-regenerativ. Klassifikasjon av anemi kan påvirke grunnlaget for videre diagnostikk.

Basert på de 17 prøvene vurderes retikulocyttallet fra ProCyte i de fleste tilfeller som presist nok til å kunne bestemme om det er en regenerativ anemi eller ikke. For å kunne vurdere om responsen er adekvat, burde mengden retikulocytter vurderes opp mot graden av anemien. En svakhet med denne studien er at det var kun 17 blodprøvesvar der retikulocytter var inkludert i resultatet fra ADVIA. For å kunne si med større sikkerhet om ProCyte viser lavere antall

retikulocytter, burde retikulocytallet fra ADVIA og ProCyte sammenlignes med et større antall prøver.

HGB, MCHC og MCV

Enkelte studier har forklart store differanser i HGB-verdi og variabler regnet ut fra HGB mellom maskinene med at de tidligere analyserte HGB med ulike metoder. (Goldmann et al., 2014). Både ADVIA og ProCyte benytter nå en cyanidfri kolorimetrisk metode for å måle HGB, og MCHC beregnes basert på denne verdien. Cyanidfrie metoder benyttes av hensyn til miljøet. (Bauer & Moritz, 2008). Det er vist at en cyanidfri metode, overestimerer HGB sammenlignet med maskiner som benytter cyanidbasert metode. I denne studien, ble det funnet en liten bias ved måling av HGB på begge maskiner, som kan forklares av at samme metode nå benyttes i begge maskiner.

Hemoglobin er målt basert på lysabsorpsjon. Heinz-legemer, lipemi og intravaskulær hemolyse kan føre til en falsk forhøyet verdi. MCHC beregnes ut fra HGB og HCT. (Stern, 2023) Det ble funnet én prøve (prøve #8), der både ProCyte og ADVIA registrerte høyere MCHC verdi enn referanseområdet. Sentrallaboratoriet hadde kommentert at prøven var lipemisk. På prøvesvaret som ble tilsendt klinikerer hadde sentrallaboratoriet korrigert MCHC-verdien, slik at den var innenfor referanseområdet. ADVIA hadde varslet om “comparison error MCHC/CHCM” ved denne prøven, fordi det ble registrert større forskjell enn 1,9 g/dL mellom CHCM (målt verdi) og MCHC (verdi beregnet ut fra HGB). Dermed korrigerer sentrallaboratoriet MCHC verdien. Et slikt varsel kan oppstå ved både systemfeil og noen forandringer i prøven som for eksempel lipemi og hemolytisk anemi. CHCM blir

ikke påvirket av lipemi, dermed ble denne verdien brukt istedenfor den beregnede verdien MCHC. (SIEMENS, 2010)

Det vil være hensiktsmessig å benytte HGB sammen med totalt antall erytrocytter og HCT til diagnostisering av pasienter med anemi. Da får man også et bedre bilde på alvorlighetsgraden, og det er en fordel når man ønsker å følge utviklingen av en anemi. Måling av HGB kan kontrolleres ved å sammenligne verdien med HCT. HCT som måles av ProCyte bør være tre ganger HGB konsentrasjonen, gitt at MCHC er omtrent 33g/dL eller innenfor referanseområdet (Flatland et al., 2013). Disse verdiene kan sammenlignes for å kontrollere HCT- og HGB-mengden, siden det benyttes to forskjellige metoder for å måle verdiene. (Stern, 2023)

MCV og MCHC kan benyttes sammen for å si noe om erytrocyttstørrelse og hemoglobinkonsentrasjon. Tidligere var det vanlig å klassifisere anemi som makrocytisk, normocytisk eller mikrocytisk basert på MCV, og som enten hypokrom, normokrom eller hyperkrom basert på MCHC. Det er beskrevet at MCV og MCHC ikke er en veldig sensitiv indikator på regenerasjon, og kan være innenfor normalen dersom pasienten har en mild respons. (Barger, 2003) MCV er en gjennomsnittsverdi, og det kreves mange makrocytter eller mikrocytter for å påvirke gjennomsnittet. Det betyr at pasienter fortsatt kan ha anisocytose med en MCV innenfor referanseområde. (Zitzer, 2023) Bare ved en markant regenerativ respons kan vi forvente å se en makrocytær, hypokrom anemi. (Barger, 2003) Basert på dette, og på en dårlig korrelasjon for MCHC mellom de to maskinene, vil det være mer hensiktsmessig å bruke antall retikulocytter fra ProCyte og forekomst av polykromatiske celler på blodutstryk for å kunne fastslå den regenerative responsen. MCV kan også være falsk forhøyet ved automatiserte tellinger hvis erytrocyttene agglutinerer eller blir oppsvulmet

sekundært til hypernatremi. Dette er enda et argument for å bekrefte en makrocytose på blodutstryk fremfor å stole på MCV fra ProCyte. (Zitzer, 2023)

I noen tilfeller kan bruk av MCV og MCHC være nyttig for å kutte ned på differensialdiagnoselisten. En mikrocytær hypokrom anemi vil ofte være forbundet med lavt jernlager. (Barger, 2003) I vår studie ble det observert at ProCyte konsekvent måler lavere MCV og høyere MCHC enn ADVIA. For pasientene i denne studien med anemi (n=17) påvirket dette det kliniske resultatet i flere tilfeller. Ved bruk av ProCyte-resultatene kunne kun én av 17 pasienter klassifiseres med makrocytose på grunnlag av høy MCV, mens ADVIA registrerte fem prøver med makrocytær anemi. Fordi ProCyte konsekvent kalkulerer høyere MCHC registrerte den kun én pasient med lavere MCHC (hypokrom) enn referanseområdet, mens ADVIA anga syv pasienter med hypokrom anemi. For prøve #103 kunne høyere MCV- og lavere MCHC-verdi registrert av ADVIA forklares av at det ble en forsinkelse i prøveanalyse. (Gilor, 2011) Ut fra resultatene i denne studien ser vi at MCV og MCHC fra ProCyte kan være upålitelig, og det er dermed knyttet en usikkerhetsfaktor til å benytte parameterne ved klassifisering av anemi.

Tidsbegrensninger

Det er kjent at forsinkelse på prøveanalyse på mer enn 24 timer etter bloduttak kan føre til at erythrocytter sveller. Det påvirker resultatet ved analyse av MCV, MCHC og HCT. Når erythrocytter sveller, fører det til en falskt forhøyet MCV. Dette øker HCT, som er beregnet ved å multiplisere antall erythrocytter med MCV. MCHC blir falskt lav fordi den er beregnet ved hjelp av følgende formel: $(HGB \times 100)/HCT$. Dermed kan blodprøvesvaret vise en falsk makrocytær og hypokrom anemi ved forsinkelse i prøveanalyse. (Gilor, 2011) I vår studie skulle prøvene analyseres så fort som mulig etter bloduttak på begge maskiner. I praksis

betydde det at ProCyte ble analysert først, ettersom maskinen var lett tilgjengelig til alle døgnets tider. Prøven til ADVIA ble analysert med minimal forsinkelse, og innenfor 29 timer. I prosjektet vårt ble det kun analysert én blodprøve med en forsinkelse på mer enn 24 timer, #103, og dette ser ut til å ha kunnet påvirke resultatet. ADVIA registrerte høyere verdier for MCV og HCT, og lavere MCHC sammenlignet med ProCyte. Klinikere burde ha kjennskap til slike artefakter som kan oppstå dersom blodprøver skal sendes til eksterne referanselaboratorier for analyse.

RDW

Ved små mengder makrocytter eller mikrocytter kan det forekomme en økning i RDW før det vises en endring i MCV utenfor referanseområdet. RDW er en objektiv og mer sensitiv indikator for anisocytose. I denne studien registrerte ProCyte verdier høyere enn referanseområdet for seks prøver (#11, #22, #82, #98, #108 og #109), og av disse viste fire blodprøver bra samsvar med funn på blodutstryket. Det ble funnet en liten positiv bias ved sammenligning av maskinene som kunne ha påvirket den kliniske beslutningen i to tilfeller. Der registrerte ProCyte en økt RDW, mens ADVIA anga en RDW innenfor referanseområdet. På begge blodprøvene ble morfologien av erytrocyttene vurdert som normal. I majoriteten av tilfellene vurderes analyse av RDW med ProCyte likevel som presist nok. Klinikeren kan ikke vite om det er store umodne erytrocytter forårsaket av en respons på anemi, eller et økt antall små celler som for eksempel oppstår ved jernmangelanemi, som gir en økning i RDW. For å bekrefte årsaken til en økning i RDW burde klinikeren vurdere blodutstryket. (Medicine, u.å.-c)

Leukocytter

Hos pasienter med neoplasi vil antallet nøytrofile granulocytter være avgjørende for beslutningen om å starte kjemoterapibehandling. Under monitorering av kjemoterapibehandling tas hematologiprøver regelmessig for å vurdere om pasienter har utviklet en nøytropeni som behøver bredspektret antibiotika behandling. I prøvematerialet vårt fant vi én prøve hvor et falskt lavt antall nøytrofile granulocytter på 15% kunne endret klinikerens avgjørelse om å starte kjemoterapibehandling ut ifra tidligere nevnte grenser for antall nøytrofile før oppstart av kjemoterapi. Det var ingen prøver i studien vår hvor et falskt lavt antall nøytrofile på 15% ville endret klinikerens avgjørelse om å sette i gang bredspektret antibiotikabehandling dersom retningslinjene nevnt i innledningen ble fulgt. Det kunne likevel potensielt endret klinikerens avgjørelse dersom antall nøytrofile granulocytter grenset mot $0,75 \times 10^9/L$ slik at prøven ved et falskt avvik på 15% ville havnet $<0,75 \times 10^9/L$. På bakgrunn av dette vil det være hensiktsmessig at klinikere som bruker ProCyte for dette formålet sender blodprøver med en nøytropeni nære grensen for oppstart av kjemoterapi eller antibiotikabehandling til et eksternt referanselaboratorium, eller kontrollerer resultatet på blodutstryk for å være sikre på graden av nøytropeni.

For to blodprøver (#17 og #89) i prosjektet vårt registrerte ProCyte et uakseptabelt lavt antall nøytrofile granulocytter basert på tidligere definerte uakseptable avvik (15%), og samtidig et høyere antall lymfocytter og/eller monocytter enn ADVIA. For prøve #17, telte ProCyte 64,9% nøytrofile, 22,7% lymfocytter og 11% monocytter, mens ADVIA telte 86,5% nøytrofile, 7,3% lymfocytter og 4,4% monocytter. For prøve #89, telte ProCyte 71,2% nøytrofile, 20,9% lymfocytter og 6,6% monocytter, mens ADVIA anga 88,8% nøytrofile, 6,3% lymfocytter og 3,2% monocytter. Ved manuell differensialtelling av prøvene utført av forfatterne, var resultatene nærmere ADVIA sin differensiering. Siden ProCyte registrerte

høyere antall lymfocytter og/eller monocytter i disse prøvene, viste blodprøvesvaret fra prøve #17 en falsk monocytose og lymfocytose, mens blodprøvesvaret fra prøve #89 viste en falsk lymfocytose.

To av prøvene (#17 og #89) med færre nøytrofile granulocytter på ProCyte kom fra pasienter med systemisk inflammasjon der det enten ble funnet moderat til markert venstreforskyvning i blodutstryket, og/eller forøket CRP. Umodne- og toksiske nøytrofile celler har høyere RNA-innhold i kjernen, som gjør at de inneholder mer fluorescens. Den økte mengden fluorescens gjør at cellene flytter seg lengre oppover langs Y-aksen på et cytogram (figur 2) og ProCyte vil kunne feilaktig klassifisere disse som enten lymfocytter eller monocytter. (Bergstrand et al., 2022) Slike forandringer er vanligst å se hos systemisk syke individer. I vår studie ble det ikke inkludert mange hunder med systemisk inflammasjon. En mulig forklaring kan være at de fleste blodprøvene ble samlet fra den indremedisinske avdelingen ved Dyresykehuset. Det kan tenkes at en slik trend ville ha blitt tydeligere dersom det ble samlet flere blodprøver fra akuttavdelingen. CRP ble ikke målt hos alle individer, noe som kan ha gitt oss et lavere antall pasienter i inflammasjonskategorien. Det ble også observert at mange pasienter med pågående kjemoterapibehandling ikke fikk utført CRP-måling. På de to overnevnte blodprøvene, viste leukocyt-cytogrammet fra ProCyte en utydelig avgrensning mellom nøytrofil- og lymfocyttopulasjonene, og mellom monocytt- og lymfocyttopulasjonene, i tillegg til at ProCyte hadde varslet om mistanke om båndnøytrofile og/eller toksiske nøytrofile. Dette viser viktigheten av å inspisere cytogrammet, i tillegg til å registrere stjernemarkeringer fra maskinen. Dersom cytogrammet ikke viser tydelige cellepopulasjoner, eller maskinen har signalisert at det kan være feiltellinger i den automatiske differensieringen av leukocytter, er det hensiktsmessig å vurdere blodutstryk og foreta en manuell differensiering.

Det ble funnet to blodprøver (prøve #4 og #80) hvor blodutstryket avslørte mild til moderat venstreforskyvning, der en manuell differensialtelling viste en større andel nøytrofile enn det både ProCyte og ADVIA gjorde. For blodprøve #4, hadde ProCyte varslet mistanke om båndnøytrofile, og cytogrammet ble vurdert som uakseptabelt (figur 14). For denne prøven hadde ProCyte telt 61,2% nøytrofile og ADVIA 58% nøytrofile. En manuell differensialtelling utført av forfatterne ga et estimat på 73% nøytrofile. Ved vurdering av blodutstryket på sentrallaboratoriet ble det oppdaget 17/100 nRBC som utløste en manuell differensialtelling av leukocytene som registrerte 85% nøytrofile. Differensialtellingen utført på sentrallaboratoriet avslørte en lavere andel lymfocytter på 10%, sammenlignet med ADVIA som telte 33,1% lymfocytter og ProCyte som telte 32,3% lymfocytter. Ved vurdering av blodutstryket ble det notert en mild nøytrofili med moderat venstreforskyvning. For prøve #80 varslet ProCyte mistanke om båndnøytrofile og toksiske nøytrofile. Cytogrammet ble også vurdert som uakseptabelt grunnet utydelig deling av nøytrofil- og lymfocyttopulasjonene. ProCyte telte 78,4% nøytrofile og 13% lymfocytter, mens ADVIA telte 82% nøytrofile og 9,3% lymfocytter. Ved manuell differensialtelling utført av en klinisk patolog ble det registrert 82% nøytrofile og 7% lymfocytter. Ved vurdering av blodutstryket ble det funnet en mild venstreforskyvning og forekomst av toksiske nøytrofile. Disse to eksemplene viser viktigheten av at operatøren kjenner begrensningene til hematologimaskinen, og hvordan feilaktig resultat kan plukkes opp og kvalitetssikres. Dette er et viktig prinsipp ved alle maskiner som gir automatiserte resultater, inkludert maskiner benyttet av referanselaboratorier.

Resultatene i denne studien med flere blodprøver fra hunder hvor ProCyte registrerte et lavere antall nøytrofile der alle prøvene hadde venstreforskyvning, viser at kliniske beslutninger kan bli påvirket basert på maskinens metode for telling. Det var også flere blodprøver i studien

som viste at når maskinen teller et falskt lavere antall nøytrofile, vil man få et falskt høyt antall lymfocytter og/ eller monocytter. Ved mange klinikker benyttes tilstedeværelse av markert nøytropeni som en indikator for igangsetting av antibiotikabehandling ved akutt hemorragisk gastroenteritt hos hunder fordi utvikling av alvorlig nøytropeni kan være et tegn på bakteriell translokasjon og utvikling av sepsis. (Unterer, 2021) Basert på resultatene i denne studien vurderes ProCyte til å analysere antall nøytrofile, lymfocytter og monocytter presist i de fleste tilfeller. Etter korrigerings av datasettet, ble den gjennomsnittlige differansen (bias) for nøytrofile forbedret. Dersom klinikerer inspiserer cytogrammer og registrerer stjernemarkeringer, mikroskoperer blodutstryk og teller leukocytter manuelt ved unormal fordeling av leukocyttopulasjoner på cytogrammet vil de fleste feiltellinger fanges opp. For alvorlig systemisk syke pasienter hvor det skal tas viktige kliniske beslutninger bør man vurdere blodutstryk fra pasienten og bekrefte om nøytropenien er reell uavhengig av om cytogrammet er akseptabelt eller ikke, eller sende blodprøven inn til analyse ved et eksternt referanselaboratorium. Dette er viktig for å unngå unødig bruk av antibiotika som kan bidra til resistensutvikling. (Bisson et al., 2018)

Ansatte ved Sentrallaboratoriet utførte en manuell differensialtelling for tre blodprøver (#9, #18, #76) grunnet dårlig samsvar mellom antall eosinofile angitt av maskinen og vurdering av blodutstryket og/eller at peroksidasecytogrammet ble vurdert som uakseptabelt. Det ble oppdaget at i disse tre tilfellene stemte antall eosinofile fra ProCyte bedre med den manuelle differensialtellingen, mens ADVIA hadde enten overestimert (prøve #76) eller underestimert (prøve #9 og #18) antall eosinofile. Peroksidasecytogrammet til prøve #76 viste en utydelig avgrensning mellom nøytrofil- og eosinofilpopulasjonen. Dermed ble det utført en manuell differensialtelling ved sentrallaboratoriet, som avslørte at ADVIA hadde registrert et falskt lavt antall nøytrofile på 49,6% og falskt høyt antall eosinofile på 17%. Manuell

differensialtelling viste 66% nøytrofile og 1% eosinofile. Blodutstryket avslørte at ProCyte hadde underestimert % nøytrofile og overestimert % lymfocytter. For denne prøven kunne inspeksjon av cytogrammet og stjernemarkeringer fra ProCyte tyde på unøyaktig resultat. Det ble ikke funnet en forklaring på hvorfor resultatet var unøyaktig ved begge maskinene.

Ansatte ved Sentrallaboratoriet har rutiner vurdering av alle blodutstryk, og de oppdaget dårlig samsvar mellom de automatiserte resultatene angitt av ADVIA og blodutstryket for prøve #9, #18 og #76. En manuell differensialtelling utføres om nødvendig for å kunne verifisere resultatene fra maskinen. På prøver som differensialtelles er det dette resultatet som blir sendt som prøvesvar til klinikerer. Dette viser hvordan blodutstryk benyttes i praksis for å kvalitetssikre resultater. Dette understreker også noe av forskjellen ved å sende blodprøver inn til et referanselaboratorium sammenlignet med å analysere blodprøver på egne maskiner.

Ved statistisk analyse av eosinofile i denne studien ble det funnet en minimal bias. Ved én av to blodprøver der resultatet fra ProCyte var avvikende sammenlignet med den manuelle differensialtellingen (prøve #98), hadde ProCyte varslet med stjernemarkeringer, mens den andre prøven (#109) hadde et akseptabelt cytogram og manglet stjernemarkeringer. Både ADVIA og ProCyte hadde altså en tendens til å over- eller underestimere andel eosinofile i henholdsvis tre og to prøver hver. På bakgrunn av disse resultatene kan det være hensiktsmessig å inspisere blodutstryket dersom blodprøvesvaret tilsier at antall eosinofile faller utenom referanseområdet, eller det er viktig å utelukke en eosinofili. En eosinofili kan brukes klinisk for å kunne forkorte differensialdiagnose listen, for eksempel kan en eosinofili ses ved hypersensitivitetsreaksjoner og noen parasittære infeksjoner. Eosinopeni kan for eksempel ses ved et stressleukogram. (Medicine, u.å.-b)

Cytogram og blodutstryk

Tolkning av cytogram krever erfaring, og er noe klinikere bør lære seg. Dette ble understreket gjennom arbeidet i denne studien hvor flere normale cytogrammer ble antatt å være unormale av forfatterne. De ble inspisert på nytt og deretter dobbeltsjekket av en klinisk patolog. Ved å gjøre tolkning av cytogram til en vane når blodprøvesvar vurderes, vil klinikerer forbedre sine ferdigheter innen dette. Dersom man har lite erfaring med inspeksjon av cytogram er det hensiktsmessig å bekrefte resultatene ved vurdering av blodutstryket. Én studie anbefaler å alltid «screene» blodutstryket, og dersom det er tydelig dårlig samsvar mellom de automatiske resultatene fra ProCyte og blodutstryket, bør en manuell differensialtelling utføres.

(Goldmann et al., 2014)

En manuell differensialtelling fungerer som en kontrollmetode for ProCyte. Studier har imidlertid vist at manuell telling er mindre presis fordi man teller få celler og vil være avhengig av klinikerens sin erfaring. Ved manuell telling telles kun 100 celler, sammenlignet med ADVIA som teller 10.000 celler. (Bergstrand et al., 2022) Ved arbeidet med denne studien var det ved enkelte tilfeller spesielt utfordrende å identifisere monocytter, fordi de kan variere mye i størrelse og utseende. Etter noe trening merket forfatterne at resultatene ved den manuelle differensialtellingen oftere hadde et godt samsvar med ADVIA i de tilfellene der ProCyte varslet om feil resultat enten ved cytogrammet eller ved stjernemarkeringer.

Det er flere fordeler med å vurdere blodutstryket enn å få et estimat på leukocytt-differensieringen. Den største fordel er å kunne se på cellemorfologi, som er viktig både for erytrocytter, leukocytter og trombocyter. Cellemorfologi kan være en sentral del av diagnostikken. For eksempel hos pasienter med regenerativ anemi kan forekomst av sferocytter gjøre at klinikerer utfører diagnostiske tester for å kunne bekrefte eller utelukke en

immunmediert hemolytisk anemi. Noen diagnoser kan også enkelt bekreftes ved vurdering av blodutstryk, for eksempel ved funn av hemoparasitter eller inklusjonslegemer. I noen tilfeller har blodprøvesvaret ingen avvik mens blodutstryket avslører patologiske funn. Eksempelvis ble det i to av blodutstrykene (prøve #71 og #72) som ble vurdert, funnet en mild venstreforskyvning, mens blodprøvesvaret ikke viste tegn på inflammasjon. En av pasientene hadde en mildt forøket CRP, mens den andre hadde CRP innenfor referanseområdet.

Selv om vurdering av blodutstryk kan virke tidskrevende og tungvint i praksis, bør klinikerens inspisere cytogrammene og screene blodutstryket for å bekrefte resultatene og for å se på cellemorfologien. Dette er helt nødvendig der ProCyte varsler med stjernemarkeringer og/eller et uakseptabelt cytogram for å kvalitetssikre resultatene fra maskinen. Til tross for at resultatene i denne studien tilsier at leukocytt differensieringen oftest er pålitelig dersom cytogrammet er akseptabelt og blodprøvesvaret ikke har stjernemarkeringer, oppfordres klinikere til å lage blodutstryk og vurdere disse hver gang de analyserer blodprøver slik at de oppnår et nivå som gjør at de kan utføre en manuell differensialtelling når det anses som nødvendig. Å inspisere cytogram fungerer som en internkontroll som gir ekstra kvalitetssikring ved bruk av ProCyte. Mikroskopering av blodutstryket gjør at klinikere fortsatt kan benytte egne ProCyte-maskiner for å få et raskt svar, men at resultatene blir kvalitetssikret. Klinikerens oppdager feil og får evaluert morfologi som maskinen ikke er i stand til å beskrive, og dette gir et mer helhetlig bilde av pasientens sykdomstilstand. (Zitzer, 2023) Dersom det registreres svært unormale funn som er vanskelig å tolke, bør man sende blodutstryket sammen med EDTA antikoagulert blod til et eksternt referanselaboratorium eller klinisk patolog for vurdering.

Begrensninger

I prosjektet vårt hadde vi en forutsetning om at ADVIA er «gullstandard». Det er imidlertid viktig å være bevisst på at ADVIA har begrensninger ved analyse av blodprøver fra hund, siden metodene brukt ved maskinen er beregnet på humant bruk. I brukermanualen, står det at ADVIA fremstiller basofile granulocytter øverst i baso-cytogrammet sammen med lyseringsresistente celler. (SIEMENS, 2010) Det er imidlertid vist i en studie at ADVIA 2120i ikke registrerer basofile granulocytter i blodprøver fra verken hunder eller katter, så selv om blodprøvesvaret fra ADVIA pleier å vise noen få basofile granulocytter, kan man i de fleste tilfeller anta at disse er andre typer celler. I samme studie ble det funnet to blodprøver med et falskt økt antall basofile granulocytter. Ved vurdering av blodutstrykene ble det notert at cellene var lymfoblaster, som ofte er lyseringsresistente celler. Det har blitt vist at basofile granulocytter fra hund ikke blir farget med peroksidasereagens. Dermed kan en reell basofili presenteres på prøvesvaret til ADVIA som et økt antall «Large Unstained Cells» (LUC). Dersom ADVIA viser en basofili, må man mikroskopere blodutstryket for å vurdere andre mulige forklaringer, som for eksempel neoplastiske celler. Ved et økt antall LUC bør blodutstryket undersøkes for å se om det kan skyldes en basofili. (Lilliehöök & Tvedten, 2011). Basert på at ADVIA ikke registrerer antall basofile for veterinære blodprøver, var det utfordrende å bekrefte om ProCyte er nøyaktig nok ved analyse av basofile. En annen måte å bekrefte dette på kunne ha vært å undersøke blodutstryk, men grunnet få prøver med basofili, var dette ikke mulig.

Et annet eksempel på en feilkilde ved ADVIA er at erfaringsmessig, har ansatte ved sentrallaboratoriet oppdaget at maskinen ikke klarer å telle kjerneholdige erythrocytter (nRBC) presist, men i stedet teller dem som lymfocytter. På peroksidase-cytogrammet (figur 4) ligger nRBC og lymfocytter rett ovenfor hverandre. Det betyr at jo større og mer umodne

erytrocyttene er, desto flere vil kunne havne i lymfocytregionen og dermed bli telt som lymfocytter (L, 2023) I denne studien, hadde vi én slik prøve (#4), der ansatte ved sentrallaboratoriet oppdaget et økt antall nRBC i blodutstryket. Forfatterne av prosjektet telte 24 nRBC per 100 WBC på blodutstryk fra denne prøven. ADVIA hadde registrert 58% nøytrofile og 33,1% lymfocytter. Det ble utført en manuell differensialtelling på Sentrallaboratoriet, som viste 85% nøytrofile og 10% lymfocytter.

Det er alltid en fare for at preanalytiske feil oppstår i et prosjekt, spesielt når oppgavene utføres av mange ulike studenter, dyrepleiere og veterinærer med ulik erfaring og opplæring. Preanalytiske feil er beskrevet til å utgjøre den største delen (46-68%) av alle feil som oppstår gjennom hele testprosessen. (Söderberg, 2009) Vi hadde hatt mer kontroll over feil dersom vi hadde samlet og analysert alle prøver selv, men det ble prioritert å få analysert mange. Prøver kan ha blitt tatt på andre tidspunkter enn det som er registrert i systemet, eventuelt ikke blitt tatt samtidig. Ved vending av glass kan ett eller begge glass ikke ha blitt blandet nok. Det kan ha vært feil med EDTA-glass eller prøver kan ha vært oppbevart ved for høy temperatur over for lang tid. Som tidligere nevnt var det alltid en forskjell i tid mellom analysene på de to maskinene, og prøven til ADVIA ble alltid liggende lenger. Vi vet at noen glass var feilmerket fordi det ble oppdaget, men det kan være andre feilmerkede glass eller blodutstryk vi ikke vet om.

Leukocytt differensiering

En viktig metodeforskjell mellom ProCyte og ADVIA er at ADVIA viser en seks-delt leukocytt differensialtelling, som teller fargede celler som antall nøytrofile granulocytter, lymfocytter, monocytter, eosinofile granulocytter og basofile granulocytter. Andre celler som ikke farges med peroksidase reagens kategoriseres som LUC. ProCyte benytter en fem-delt

differensialtelling uten telling av LUC. Dette betyr at ProCyte potensielt kan feilkategorisere celler som atypiske store lymfocytter og blaster. I denne studien var det én prøve (#79) hvor ProCyte registrerte en lymfocytose og en falsk monocytose. ADVIA registrerte ingen monocytose, men anga en lymfocytose, et økt antall LUC og basofili. Da blodutstryket ble vurdert, ble det funnet et stort antall neoplastiske lymfocytter som hadde større kjerner enn vanlig. Basofile granulocytter ble ikke observert. I dette tilfellet, hadde ProCyte feilklassifisert de neoplastiske lymfocyttene som monocytter (Stern, 2023), mens ADVIA hadde klassifisert disse cellene som LUC, i tillegg til at noen celler ble feilklassifisert som basofile granulocytter. (Lilliehöök & Tvedten, 2011). Cytogrammet fra ProCyte (figur 14) ble vurdert som uakseptabelt, som igjen understreker viktigheten av å inspisere cytogram og deretter mikroskopere blodutstryk. Pasienten ble diagnostisert med lymfocytær leukemi.

Internkontroller

En betingelse for at resultatene fra ProCyte vurderes som presise nok i de overnevnte tilfellene er at produsentens anbefaling for internkontroll følges. Hensikten med internkontroll er å kunne oppdage både tilfeldige og systematiske feil som kan påvirke resultatene. Slike analytiske feil er beskrevet å utgjøre 7–13% av feilene som oppstår gjennom hele testprosessen. (Söderberg, 2009) I en studie fra humanmedisin hvor kravene for internkontroll er svært strenge, fremkom det at 19% av operatørene ikke hadde fått opplæring i analysemaskinen, 25% ikke hadde klart å følge prosedyrene fra produsenten og 32% ikke hadde klart å utføre kvalitetskontrollen. Disse resultatene vil sannsynligvis være lignende eller verre om dette ble forsket på i veterinærpraksis. (Meier & Jones, 2005) Anbefalingene for internkontroll er ofte lignende for maskiner brukt i klinikker som for maskiner benyttet av eksterne referanselaboratorier, men med lavere hyppighet. (Michael et al., 2022)

Eksterne referanselaboratorier har, som tidligere beskrevet med eksempel fra Sentrallaboratoriet, eget personell som utfører kvalitetskontroll daglig. Her analyseres det tre nivåer av kontrollblodprøvene «Test point 3 in 1» en gang daglig, sammenlignet med anbefalingen fra IDEXX Laboratories om å analysere kontrollblodprøven «Idexx ProCyte Dx quality control» én gang i måneden. En svakhet med prosjektet vårt er at resultatene generaliseres for å kunne anvendes av smådyrpraktikere som benytter egne ProCyte-maskiner i ulike klinikker, uten at vi vet om rutiner for interkontroll følges. Det hadde imidlertid vært interessant å utføre samme studie ved bruk av ulike ProCyte maskiner i ulike klinikker for å finne ut i hvor stor grad internkontroll-rutiner påvirker resultatene.

Statistisk styrke

Statistisk styrke for studien med 80% power ble beregnet for differansen mellom ProCyte og ADVIA for de ulike variablene på bakgrunn av differansen fra fire prøver. For PLT ble det estimert til 9 blodprøver, for RBC 9, for HGB 10, for HCT 1, for MCV 1, for MCHC 1 og for RDW 6. For WBC ble det estimert 9 blodprøver, for nøytrofile 14, for lymfocytter 10, for monocytter 7, for eosinofile 15 og for basofile 11. Prøvematerialet i denne studien med 99 blodprøver tilsier en statistisk styrke på over 80% for differansen mellom maskinene for alle variabler.

Referansepopulasjoner

En viktig forskjell mellom de to maskinene som klinikere bør være bevisst på, er at forskjellige referansepopulasjoner benyttes for å lage et egnet referanseintervall for alle variablene. Referanseintervallet er laget for å omfatte 95% av friske hunder i en populasjon. Sentrallaboratoriets referansepopulasjon består hovedsakelig av norske hunder i tillegg til

noen innslag fra Sverige. (Thoresen, 2023) Tolkning av blodprøvesvaret gjøres ofte ved å sammenligne blodprøvesvaret med gjeldende referanseintervall. Dersom ikke referansepopulasjonen tilsvarer individet det analyseres blodprøver fra i stor nok grad, kan det endre den kliniske tolkningen og beslutningen, selv om maskinene viser samme resultat. (L, 1999) Dette er et eksempel på en postanalytisk feil. Postanalytiske feil er beskrevet å utgjøre 18,5–47% av alle feilene som oppstår gjennom hele testprosessen (Söderberg, 2009) Prøve #48 viser at antall trombocytter for ADVIA er $166 \times 10^9/L$. Basert på ADVIA sitt eget referanseområde for trombocytter ($180\text{--}500 \times 10^9/L$) ble pasienten klassifisert med mild trombocytopeni, mens dersom referanseområdet fra ProCyte ble benyttet ($148\text{--}484 \times 10^9/L$), ville klinikerens tro at pasienten hadde et tilstrekkelig antall trombocytter. Dette understreker viktigheten av å være kritisk ved tolkning av blodprøvesvar og ta hele det kliniske bildet med i betraktningen. Det er også viktig å ta hensyn til rase- og aldersforskjeller ved tolkning av blodprøvesvar. Det er for eksempel påvist at myndehunder har en tendens til å ha et høyere antall erytrocytter, HGB og HCT, og et lavere antall leukocytter og trombocytter. (Campora et al., 2011)

Konklusjon

Forskjellene mellom de to maskinene varierer for de ulike variablene. PLT-resultatet fra ProCyte vurderes som presist nok til å stole på dersom det er ingen eller få plateaggregater. RBC, HCT og HGB hadde en minimal til moderat bias slik at disse verdiene kan benyttes sammen med kliniske parametere for å klassifisere anemi og foreta kliniske beslutninger. ProCyte registrerte konsekvent litt lavere HCT i prosjektet, og anbefalingen er å benytte PCV for å kvalitetssikre resultatet. Antall retikulocytter angitt av ProCyte kan benyttes for å klassifisere anemi som enten regenerativ eller ikke-regenerativ, og resultatet kan kvalitetssikres ved å undersøke blodutstryk for polykromatiske celler. MCV og MCHC var ikke sensitive nok til å klassifisere anemi som enten makro- eller mikrocytisk, og hypo- eller hyperkrom basert på prøvesvar fra pasienter med anemi. RDW ble vurdert som en sensitiv indikator for anisocytose.

Ved statistisk analyse av leukocytter ble det funnet en minimal bias ved analyse av total WBC, slik at klinikere i de fleste tilfeller kan stole på tallet. Ved statistisk analyse av leukocytt-differensiering ble det oppdaget at klinikere oftest kunne stole på resultatet fra ProCyte dersom cytogrammet ble vurdert som akseptabelt og analysesvaret ikke hadde stjernemarkeringer. Dersom cytogrammet er uakseptabelt og/eller det forekommer stjernemarkeringer, bør blodprøvesvaret kontrolleres ved vurdering av cellemorfologi på blodutstryk og en manuell differensialtelling. ProCyte viste et falskt lavt antall nøytrofile samtidig med et høyere antall lymfocytter/og eller monocytter ved flere prøver hos pasienter med systemisk inflammasjon. Dersom ProCyte viser alvorlig nøytropeni, er anbefalingen å utføre en manuell differensialtelling på blodutstryk for å bekrefte nøytropenien. Ved statistisk analyse av eosinofile granulocytter, ble det registrert at både ADVIA og ProCyte kunne under- eller overestimere antall eosinofile. En måte å verifisere resultatet dersom

blodprøvesvaret fra ProCyte viser en verdi utenom referanseområde, er å vurdere blodutstryk.

Vi har ikke nok grunnlag til å bekrefte nøyaktigheten av antall basofile registrert av ProCyte.

Takk til bidragsytere

Vi vil takke våre veiledere, Hege Brun Hansen og Hanne Moberg for gode tilbakemeldinger og hjelp til vurdering av blodutstrykene. Vi vil takke alle ansatte ved NMBU Dyresykehuset – smådyr, for god hjelp til prøveinnsamling. En spesiell takk rettes til Tora Jelle, ingeniør ved NMBU Dyresykehuset – smådyrs laboratorium, for hjelp til å lage blodutstryk og nyttig informasjon om kvalitetssikring av ProCyte resultatene. Vi vil også takke Hanne Elisabeth Lunde, ledende bioingeniør ved Sentrallaboratoriet, for nyttig informasjon om feilkilder ved ADVIA og innsikt i hvordan Sentrallaboratoriet kvalitetssikrer resultater. Til slutt vil vi også takke Stein Istre Thoresen, tidligere laboratoriesjef ved Sentrallaboratoriet, for bidrag til ideer å reflektere over i diskusjonen.

Summary

Title: Comparative Analysis of Hematology Results From the IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzer and the ADVIA® 2120i Hematology System

Authors: Trude Nemeth, Mariam Shehzad, Marianne Tuen Yndestad

Supervisor: Hege Brun-Hansen and Hanne Larsen Moberg, Department of Companion Animal Clinical Sciences

Several clinics use results from rapid in-house IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzers to diagnose and treat patients, and we wanted to find out if the in-house results coincided with results from a reference laboratory. Previous studies have indicated that inspection of dot plots and instrument flags is important to reject blood samples that may have erroneous results. In this study, ninety-nine canine blood samples from patients admitted to the small animal hospital at NMBU were analysed using the IDEXX ProCyte Dx™ Hematology Analyzer and the ADVIA® 2120i Hematology System. ProCyte WBC dot plots and instrument flags were evaluated for all samples, and a manual differential leukocyte count was performed on seventeen samples. Statistical analysis was performed prior to and after dot plot inspection. Results revealed that the leukocyte differential count could be more accurate if samples with unacceptable dot plots and/or instrument flags were eliminated. Blood smear evaluation should be performed to confirm automated results and evaluate cellular morphology. A trend was seen wherein ProCyte misclassified toxic and/or immature neutrophils as lymphocytes and/or monocytes in patients with systemic inflammation.

ProCyte and ADVIA showed a false thrombocytopenia in several blood samples due to platelet aggregates. Thrombocytopenia must be verified on a blood smear. There were minimal to moderate biases in the analysis of RBC, HGB, and HCT, therefore these

haematological parameters can be used in combination with clinical findings to diagnose anaemia.

Referanser

- Barger, A. M. (2003). The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33 (6): 1207-1222. doi: 10.1016.
- Bauer, N. & Moritz, A. (2008). Evaluation of three methods for measurement of hemoglobin and calculated hemoglobin parameters with the ADVIA 2120 and ADVIA 120 in dogs, cats, and horses. *Veterinary Clinical Pathology*, 37 (2): 173-179. doi: 10.1111/j.1939-165x.2008.00039.x.
- Bergstrand, E., Tvedten, H. W. & Lilliehook, I. (2022). Detection of frequent neutrophil misclassification by the ProCyte Dx in sick dogs and how to avoid it. *J Small Anim Pract*, 63 (8): 603-608. doi: 10.1111/jsap.13499.
- Bisson, J. L., Argyle, D. J. & Argyle, S. A. (2018). Antibiotic prophylaxis in veterinary cancer chemotherapy: A review and recommendations. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16 (3): 301-310. doi: 10.1111/vco.12406.
- Campora, C., Freeman, K. P., Serra, M. & Sacchini, F. (2011). Reference intervals for Greyhounds and Lurchers using the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Veterinary Clinical Pathology*, 40 (4): 467-474. doi: 10.1111/j.1939-165x.2011.00356.x.
- Engelbrecht, M., Atkinson, B., Goddard, A., Pazzi, P. & McClure, V. (2021). Mean Platelet Volume and Platelet Volume Distribution Width in Canine Parvoviral Enteritis. *Front Vet Sci*, 8: 722280. doi: 10.3389/fvets.2021.722280.
- Flatland, B., Freeman, K. P., Vap, L. M. & Harr, K. E. (2013). ASVCP guidelines: quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, 42 (4): 405-423. doi: 10.1111/vcp.12099.
- Fujino, Y., Nakamura, Y., Matsumoto, H., Fukushima, K., Takahashi, M., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2013). Development and Evaluation of a Novel In-Clinic Automated Hematology Analyzer, ProCyte Dx, for Canine Erythrocyte Indices, Leukogram, Platelet Counts and Reticulocyte Counts. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75 (11): 1519-1524. doi: 10.1292/jvms.13-0264.
- Gilor, S. (2011). Common Laboratory Artifacts Caused by Inappropriate Sample Collection and Transport: How to Get the Most out of a Sample,. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26 (2): 109-118. doi: 10.1053.
- Goldmann, F., Bauer, N. & Moritz, A. (2014). Evaluation of the IDEXX ProCyte Dx analyzer for dogs and cats compared to the Siemens ADVIA 2120 and manual differential. *Comparative Clinical Pathology*, 23 (2): 283-296. doi: 10.1007/s00580-012-1608-1.
- Harris, N., Kunicka, J. & Kratz, A. (2005). The ADVIA 2120 hematology system: flow cytometry-based analysis of blood and body fluids in the routine hematology laboratory. *Lab Hematol*, 11 (1): 47-61. doi: 10.1532/LH96.04075.
- Jaguezeski, A. M., Volpato, J., De Lorenzi Cancelier, C. D., Lovatel, M., Costa, Á., Weinert, N. C., Beier, S. L., Mattoso, C. R. S. & Saito, M. E. (2020). Evaluation of time and temperature storage in platelet counts in blood samples of dogs. *Comparative Clinical Pathology*, 29 (1): 155-160. doi: 10.1007/s00580-019-03046-2.
- L, E. H. (2023). *Protokoll for internkontroll* (e-post til Marianne Tuen Yndestad, Trude Nemeth og Mariam Shehzad 14.04.2023).
- L, Z. (1999). Reference intervals: are interlaboratory differences appropriate? *Clin Chem Lab Med*. doi: 10.1515.

- Laboratories, I. (2021). *ProCyte Dx* Hematology Analyzer: Operator's Guide*. Tilgjengelig fra: https://www.idexx.com/media/filer_public/af/fe/affeb74-4e2f-416e-ac6e-be2d657a7479/procyte-dx-operators-guide-en.pdf (lest 26.04.2023).
- Lilliehöök, I. & Tvedten, H. W. (2011). Errors in basophil enumeration with 3 veterinary hematology systems and observations on occurrence of basophils in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 40 (4): 450-458. doi: 10.1111/j.1939-165x.2011.00353.x.
- Medicine, C. U. C. o. V. (u.å.-a). *ADVIA hematology analyzer*. Tilgjengelig fra: <https://eclinpath.com/hematology/tests/reticulocyte-percentage/advia-hematology-analyzer/> (lest 15.02.2023).
- Medicine, C. U. C. o. V. (u.å.-b). *Individual WBC*. Tilgjengelig fra: <https://eclinpath.com/hematology/leukogram-changes/leukocytes/> (lest 01.05.2023).
- Medicine, C. U. C. o. V. (u.å.-c). *RDW*. Tilgjengelig fra: <https://eclinpath.com/hematology/tests/red-blood-cell-distribution-width/> (lest 19.04.2023).
- Meier, F. A. & Jones, B. A. (2005). Point-of-Care Testing Error: Sources and Amplifiers, Taxonomy, Prevention Strategies, and Detection Monitors. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 129 (10): 1262-1267. doi: 10.5858/2005-129-1262-ptesaa.
- Michael, H. T., Nabity, M. B., Couto, C. G., Moritz, A., Harvey, J. W., Denicola, D. B. & Hammond, J. M. (2022). Improving quality control for in-clinic hematology analyzers: Common myths and opportunities. *Veterinary Clinical Pathology*, 51 (3): 302-310. doi: 10.1111/vcp.13154.
- Nabity, M. B., Harr, K. E., Camus, M. S., Flatland, B. & Linda. (2018). ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. *Veterinary Clinical Pathology*, 47 (1): 9-21. doi: 10.1111/vcp.12583.
- Norman, E. J., Barron, R. C. J., Nash, A. S. & Clampitt, R. B. (2001). Prevalence of Low Automated Platelet Counts in Cats: Comparison with Prevalence of Thrombocytopenia Based on Blood Smear Estimation. *Veterinary Clinical Pathology*, 30 (3): 137-140. doi: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00422.x.
- Schmidt, S., Knoll S. Joyce. (2012). *Macrothrombocytopenia in a Cavalier King Charles Spaniel*. Tilgjengelig fra: <https://www.laboklin.co.uk/pdf/Macrothrombocytopenia.pdf> (lest 24.04.2023).
- SIEMENS. (2010). *ADVIA 2120/2120i Hematology Systems: Operator's Guide*. Tilgjengelig fra: <http://starttrinity3.com/01/Advia%20Ops%20Guide.pdf> (lest 17.04.2023).
- Stern, J. K. (2023). Point-of-Care Instruments. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 53 (1): 17-28. doi: 10.1016.
- Swann, J. W., Garden, O. A., Fellman, C. L., Glanemann, B., Goggs, R., Levine, D. N., Mackin, A. J. & Whitley, N. T. (2019). ACVIM consensus statement on the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33 (3): 1141-1172. doi: 10.1111/jvim.15463.
- Söderberg, J. (2009). *Sources of preanalytical error in primary health care: implications for patient safety*. Umeå: Umeå University Medical Dissertations. Tilgjengelig fra: <https://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:211202/FULLTEXT02.pdf>.
- Thoresen, I. S. (2023). *Protokoll for internkontroll* (e-post til Marianne Tuen Yndestad, Trude Nemeth og Mariam Shehzad 19.04.2023).
- Tocci, L. J. (2010). Transfusion Medicine in Small Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40 (3): 486-494. doi: 10.1016.
- Unterer, S. (2021). Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 51 (1): 79-92. doi: 10.1016.

- Weiss, D. J. & Smith, S. A. (2000). Primary Myelodysplastic Syndromes of Dogs: A Report of 12 Cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14 (5): 491-494. doi: 10.1111/j.1939-1676.2000.tb02264.x.
- Withrow, S. J. & Vail, D. M. (2007). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Fjerde utg. St Louis, Missouri.
- Zitzer, N. C. (2023). The Greatness of Glass: Importance of Blood Smear Evaluation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 53 (1): 29-52. doi: 10.1016/j.cvsm.2022.07.005.

Vedlegg

Vedlegg 1: Mail som ble sendt til alle ansatte og studenter ved NMBU



Marianne Tuen Yndestad

To: Liste manuell :: Alle studenter ved Veterinærhøgskolen; Liste :: VET :: SPORTFAMED :: SMÅDYR :: Ansatte



Sun 28/08/2022 22:32

Hei alle sammen!

Vi er tre differensieringsstudenter på smådyr, og vårt fordypningsprosjekt går ut på å sammenligne hematologi resultater kjørt på inhouse- Idexx Procyte dx 2021 med resultater fra Sentrallaboratoriets hematologimaskin. Vi ønsker å samle inn blodprøver fra alle hunder som veier over eller lik 7 kg, som skal ha hematologi som en del av utredningen sin.

I denne forbindelse trenger vi hjelp av dere ansatte og studenter til å ta et ekstra EDTA- glass, lage blodutstryk og kjøre blodprøvene på smådyrslaboratoriet. Dette trenger vi hjelp til i **perioden 29/08-22 til og med 20/12-22**.

Inklusjonskriteriene for hundene er følgende:

- Hund
- Over eller lik 7 kg
- Syke eller friske (friske er feks. pre an BP fra ukompliserte tannpasienter, blodgivere o.l.)
- Skal ha en hematologi/blodprøve som del av sin utredning

Dette skal utføres:

1. Alle hunder over 7 kg som skal tas hematologi av som en del av sin utredning, skal det tas et ekstra 1 ml EDTA glass fra.
2. Print ut **etikett** med pasientinformasjon og klistre denne i **bok med etiketter**. Etikettboken er merket "studentoppgave hematologi" og ligger i høyre skap på TEG.
3. Det ekstra EDTA-glasset skal kjøres på **Idexx Procyte dx-maskinen** på laboratoriet på smådyrsklinikken.
4. Det ekstra EDTA-glasset skal det tas blod fra og lages blodutstryk. Blodutstryket skal merkes med **pasientnavn, pasientnummer og dato**. Blodutstryket skal ikke farges, men settes til tørk i en boks på benken på laben ved mikroskopene. Boksen er merket med "Studentoppgave hematologi".
5. **Det er viktig** at eier ikke belastes med kostnader for en ekstra blodprøve. Hanne Moberg informerer veterinærer om eventuell bruk av egen kode ved bestilling/ prising av blodprøven.

Ta kontakt med oss dersom dere har spørsmål ang. innsamling av prøver.

Vi takker på forhånd for hjelpen med fordypningsprosjektet!

Med vennlig hilsen,
Mariam, Trude og Marianne, kull 17

Vedlegg 2: Samtykkeskjema fra eier



Samtykkeskjema - Personopplysninger, undervisning, forskning, mediafiler

Kunde: Dato:

..... Tid:

Telefonnummer: E-postadresse:

Pasient: Microchip:

BRUK AV PERSONOPPLYSNINGER – BEHANDLING

NMBU Veterinærhøgskolen har vurdert at behandling av personopplysninger om dyreeier, eller andre som er ansvarlig for dyret i forbindelse med behandling, har behandlingsgrunnlag i henhold til GDPR art. 6 nr. 1 b (avtale) og c (rettslig forpliktelse), jf. forskrift om journal for dyrehelsepersonell § 4.

BRUK AV PERSONOPPLYSNINGER – UNDERVISNING OG FORSKNING

NMBU Veterinærhøgskolen driver undervisning og forskning i tillegg til behandling av pasienter. All informasjon om dyret og behandlingen lagres i et journalsystem, og informasjon og opplysninger fra dette kan bli brukt i både undervisning og forskning. Blod, urin, vevsprøver, osv. som tas fra pasienten vil kunne bli brukt i undervisningen og oppbevares for senere å kunne benyttes anonymisert i forskningen. Dyresykehuset kan ta bilder av pasienten som kan brukes anonymisert til samme formål. Du vil i den forbindelse kunne bli kontaktet for innhenting av ytterligere informasjon via den kontaktinformasjon du oppgir ved innskriving av dyret.

NMBU Veterinærhøgskolen har vurdert at bruk av informasjon fra dyrets journal, inklusive personopplysninger om eier, har behandlingsgrunnlag i GDPR art. 6 nr. 1 a (samtykke). Samtykket kan trekkes tilbake. Tilbaketrekning av samtykket må skje skriftlig til NMBU Veterinærhøgskolen. Opplysninger om ditt dyr og dets behandling, samt din kontaktinformasjon, kan anvendes i undervisning og forskning ved NMBU Veterinærhøgskolen.

NMBU Veterinærhøgskolen kan ta kontakt for innhenting av informasjon om ditt dyr i forbindelse med forskningsprosjekt ved NMBU Veterinærhøgskolen.☺

Signatur:



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no