

Trombocyträkning hos katt – en ny metod

Therese Nygren

**Handledare: Harold Tvedten
Inst. för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Lena Pelander
Inst. för kliniska vetenskaper**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Abstract	1
Inledning	2
Trombocytopeni	2
Trombocyttaggregering	3
Impedansmätning av trombocytantal	3
Optisk mätning av trombocytantal	4
Manuell räkning av trombocytantal	4
CTAD antikoagulantia som hämmare av trombocyttaggregering	5
Prostaglandin E1 som hämmare av trombocyttaggregering	5
Material och metod	7
Resultat	10
Referensvärden	13
Reanalyserade trombocytvärden	14
Precision	15
Stabilitet över tid	15
Diskussion	17
Litteraturförteckning	19
Bilaga 1: Prostaglandin E1 första försöksomgången	20
Bilaga 2: prostaglandin E1 andra försöksomgången	21

SAMMANFATTNING

Trombocyttaggregering vid blodprovstagning på katt är ett stort problem vid trombocyträkning. Svårigheterna vid analys av trombocytantal hos katter har medfört att inga tillförlitliga referensvärden för trombocytantal finns i dagsläget. Vi har i denna studie tagit fram en ny metod för att förhindra trombocyttaggregeringen. Blodprov togs på nio stycken friska katter i åldrarna 1-10 år i CTAD-rör. Till blodproven tillsattes prostaglandin E1 i samband med blodprovstagningen. Blodproven analyserades inom 1-4 timmar på laboratoriet för klinisk kemi och trombocyterna räknades både manuellt och med automatiserade analysatorer. Analysatorerna som användes var Sysmex XT 2000Vi som räknade trombocyterna både optiskt och med impedansmätning, Siemens Advia 2120 som är en optisk cellräknare och Cell-Dyn 3500 som är en impedanscellräknare. Vid den manuella räkningen kontrollerades även förekomsten av trombocyttaggregat i blodproven. Resultaten visar att trombocyttaggregering förhindras vid tillsats av prostaglandin E1 till blodprover tagna i CTAD-rör. Eftersom inga eller endast enstaka små trombocyttaggregat sågs när prostaglandin E1 tillsattes till CTAD-rör kan trombocytvärdena från de nio katterna användas som referensvärden för de metoder och de instrument som användes i den här studien. Referensvärdena blev $180-493 \times 10^9/L$ för Sysmex XT 2000Vi optisk analys, $182-525 \times 10^9/L$ för Siemens Advia 2120 och $161-380 \times 10^9/L$ för den manuella räkningen. CTAD-rör med prostaglandin E1 tillsatt kan användas för att få mer exakta trombocytvärden hos katter och förbättra diagnostiken.

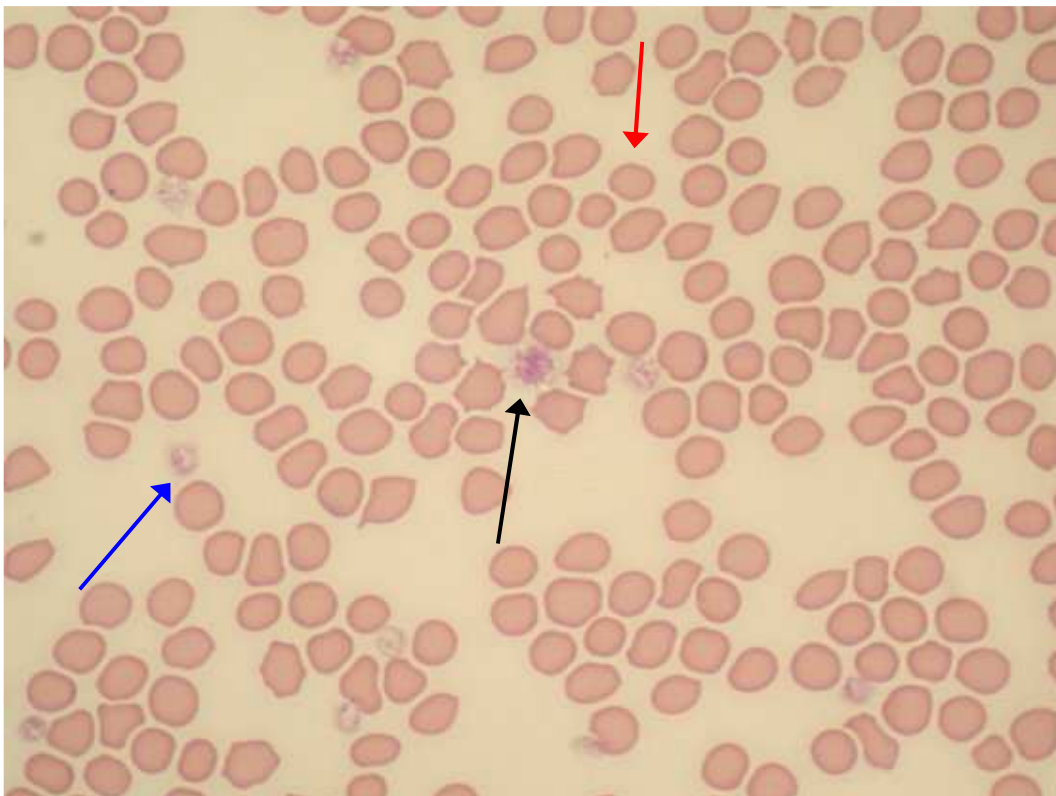
ABSTRACT

Platelet aggregation is a major and common problem in blood samples from cats. This greatly affects the accuracy of counting of the platelets. Because of the difficulties in counting feline platelets, results for patients and reliable reference values for cat platelets are currently so inaccurate as to be almost useless in diagnosis of thrombocytopenia. In this study we used an effective method to prevent platelet aggregation. Blood was collected in CTAD test tubes and prostaglandin E1 was added to the blood sample. Blood samples were collected from nine healthy cats 1-10 years of age. The blood was analysed within 1-4 hours at the laboratory of clinical chemistry. The platelets were counted both manually and in automated cell counters. Three cell counters were used. A Sysmex XT 2000Vi counted platelets both optically with a laser system and by using impedance analysis. The Siemens Advia 2120 used an optical laser system to count platelets. The Cell-Dyn 3500 counted platelets by impedance. The blood samples were checked for platelet aggregation in the hemocytometer (glass chamber) and on the blood smears. Platelet aggregation was prevented when adding prostaglandin E1 to blood samples directly after they were collected in CTAD test tubes. Since no or only a few small platelet aggregates were present in the blood samples after addition of prostaglandin E1 to the CTAD test tubes, the platelet counts acquired from the nine cats can be used as reference values for the instruments and manual method used in this study. The reference values in this study were $180-493 \times 10^9/L$ for Sysmex XT 2000Vi optical analysis, $182-525 \times 10^9/L$ for Siemens Advia 2120 and $161-380 \times 10^9/L$ for the manual platelet counts. Moreover the CTAD-prostaglandin E1 method may be used with feline patients to obtain accurate platelet counts and allow better diagnosis.

INLEDNING

Trombocyterna är en del av den primära hemostasen och de bildas i benmärgen genom avknoppning från megakaryocyter. Trombocyter saknar liksom erythrocyter cellkärna, men har en mängd cytoplasmatiska organeller som har betydelse för hemostasen. Trombocyternas normala livslängd är ungefär sju dagar.

Trombocyterna är de minsta blodcellerna och har hos katt en genomsnittstorlek, mean platelet volume (MPV), på 12-17 femtoliter (fl). Detta är tydligt mindre än genomsnittstorleken för erythrocyter, mean corpuscular volume (MCV), som är 39-55 fl. På blodutstryk däremot kan man se att några trombocyter kan vara större i diameter än erythrocyter. Figur 1 visar ett blodutstryk med trombocyter och erythrocyter från en frisk katt. Man tror att katter normalt har en del trombocyter som är större i volym än erythrocyter. Ingen information finns tillgänglig i litteraturen om volymen hos de största trombocyterna hos katt. Detta beror troligtvis på att trombocyterna är så svåra att räkna i de analysinstrument som används mest idag. Man har sett att de större trombocyterna, särskilt vid analys i impedans hematologiinstrument, inte räknas av instrumentet (Knoll, 2000).



Figur 1. Blodutstryk som visar erythrocyter (röd pil) och trombocyter (blå pil) från en frisk katt. En trombocyt är av ungefär samma storlek som erythrocyterna (svart pil).

Trombocytopeni

Trombocytopeni kan bero av minskad produktion, ökad destruktion eller ökad perifer förbrukning av trombocyterna (Kohn et al, 2006). Förbrukningen av trombocyter ökar bl.a. vid vissa infektionssjukdomar, hemolytisk anemi och vid disseminerad intravaskulär koagulation, DIC. De vanligaste orsakerna till trombocytopeni hos katt är infektionssjukdomar, blödningar och neoplasier

(Jordan et al, 1993; Kohn et al, 2006; Norman et al, 2001a). Vid misstanke om något av dessa tillstånd är det värdefullt att ta ett blodprov för att få reda på trombocytfunktion och trombocytantal.

Sann trombocytopeni är ovanligt hos katt, men lågt antal trombocyter vid räkning i automatiserade blodprovssapparater är ett vanligt problem (Kohn et al, 2006; Norman et al, 2001a). Idag tas blodprover för analys av trombocyter vanligen i EDTA-rör och analyseras bland annat med hjälp av en impedansanalysator.

Trombocyttaggregering

Trombocyter är reaktiva celler som kan stimuleras att aggregera med hjälp av flera faktorer. Dessa faktorer kan vara substanser som utsöndras från de aktiverade trombocyterna, t.ex. ADP och serotonin eller cirkulerande substanser i blodet, t.ex. adrenalin och vasopressin. Även substanser utanför blodbanan påverkar trombocyter att aggregera, t.ex. kollagen, trombin, fysiska faktorer och främmande substanser (Norman et al, 2001a). Flera faktorer gör att katters trombocyter är mer reaktiva än andra arters trombocyter, bl.a. deras stora storlek, deras högre innehåll av serotonin och deras svar på serotonin som innebär irreversibel aggregering. Detta är unikt bland domesticerade arter (Norman et al, 2001a). Katters trombocyter aktiveras väldigt lätt vid blodprovstagning (Welles et al, 1994) och aggregeras då i blodprovsröret. Aggregaten kan bli mycket stora och bestå av flera hundra trombocyter. I en impedansanalysator som bara särskiljer blodkroppar på deras storlek, räknas aggregaten som en annan större cellsort istället för som trombocyter (Norman et al, 2001a). Resultatet blir att man får pseudotrombocytopeni som beror av svagheter i analysmetoden. Trombocyttaggregering är en vanlig orsak till felaktig trombocyträkning hos katt (Kohn et al, 2006; Tvedten och Korcal, 2001).

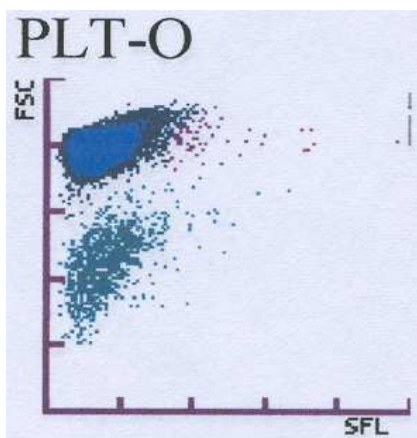
Impedansmätning av trombocytantal

Impedansanalysatorn mäter endast storleken på blodkroppar för att skilja dem åt. Många av kattens normala trombocyter är lika stora som erytrocyterna (Norman et al, 2001a,b; Zelmanovic och Hetherington, 1998) och räknas därmed till dessa istället. Detta gör att antalet trombocyter blir falskt lågt och antalet erytrocyter blir falskt högt. Eftersom andelen erytrocyter i blodet är mycket större än andelen trombocyter, blir påverkan på analysresultatet mindre i procent hos erytrocyter jämfört med trombocyter (Norman et al, 2001a).

Norman et al gjorde 2001 (a) en undersökning av hur ofta man såg pseudotrombocytopeni hos katt. De tittade på blodutstryk från katter vars blod analyserats med en impedansmätare. Enligt impedansmätningen hade 71 % av katterna trombocytantal $< 200 \times 10^9$ celler/L blod och enligt blodutstryket hade endast 3,1 % av katterna trombocytantal $< 200 \times 10^9$ celler/L blod. Den höga andelen trombocytopeni vid impedansmätningen beror på en kombination av förekomst av trombocyttaggregat (i 50% av proverna) och att man vid impedansmätning endast särskiljer blodkroppar från varandra genom att titta på storlek (Norman et al, 2001a).

Optisk mätning av trombocytantal

För att komma ifrån problemet med att stora trombocyter räknas som erythrocyter har en metod för optisk mätning av trombocytantal tagits fram. Den optiska analysatorn mäter både storlek på blodkropparna och deras komplexitet (RNA innehåll). Storleken mäts längs y-axeln (forward scatter) genom att en laserstråle träffar cellen. Cellens komplexitet, d.v.s. mängden RNA (nukleinsyra) i cellen, mäts längs x-axeln (side scatter) med fluorescerande ljus som registreras från celler färgade med nukleinsyrafärgning. Alla celler av en viss storlek och komplexitet blir en prick i ett diagram. Detta kan ses i figur 2. Man kan då skilja de stora trombocyterna från erythrocyter genom att de skiljer sig åt i komplexitet. Man har dock kvar problematiken med trombocyttaggregat som ger ett annat scattermönster och då inte räknas som trombocyter (Norman et al, 2001a).



Figur 2. Optiskt trombocytogram (PLT-O cytogram) som visar trombocyter av normal storlek (nedre cellklustret). Cellstorleken ökar längs y-axeln och cellens komplexitet ökar längs x-axeln. Det övre cellklustret är erythrocyter.

Manuell räkning av trombocytantal

Den mest tillförlitliga analysmetoden av trombocyter i dagsläget anses vara manuell räkning av trombocyterna i bürkerkammare och kontroll av trombocyttaggregat på blodutstryk (Séverine et al, 1999; Tasker et al, 2001). När analysresultaten angående trombocyter blir onormalt eller inte stämmer överens med kliniska fynd, rekommenderar man i litteratur och artiklar att man ska räkna trombocyterna manuellt (Kohn et al, 2006; Tasker et al, 2001). Det manuellt räknade värdet påverkas dock också av trombocyttaggregat då det kan vara svårt att se hur många trombocyter som ingår i ett aggregat om aggregaten är stora. Aggregaten gör även att distributionen av trombocyter i utstryket blir ojämn, då aggregaten ansamlas i fransen på utstryket och i kanten i räknekammaren. Detta betyder att korrekta mätresultat av trombocyter är beroende av frånvaron av trombocyttaggregat (Norman et al, 2001a). Det kan finnas stora aggregat och koagel i blodprovvröret, som man ser inte i blodutstryket eller bürkerkammaren, som kan ge felaktiga resultat vid manuell räkning av trombocyter.

Det finns hittills ingen forskning med katttrombocyter som visar att manuell trombocyträkning är bättre än automatisk räkning i ett instrument.

CTAD antikoagulantia som hämmare av trombocyttaggregering

Det finns många sätt att hämma trombocyttaggregering in vivo. Farmaka av typen icke steroida antiinflammatoriska läkemedel hämmar trombocyttaggregering genom att hämma enzymet cyklooxygenas som finns i trombocyterna. Adenosin och β -adrenerga agonister stimulerar adenylcyklas som hämmar trombocyternas funktion och dipyridamol och aminofyllin hämmar trombocyterna genom hämning av enzymet fosfodiesteras.

Många studier både på humansidan och på veterinärsidan har ägnats åt att försöka lösa problemet med trombocyttaggregering in vitro. På humansidan har man tagit fram ett blodprovsrör med citratbaserad antikoagulantia som även innehåller trombocytinhibitorerna teofyllin, adenosin och dipyridamol (CTAD) (Norman et al, 2001b).

I en studie av Norman et al, 2001 (b), sågs att blodprover från katt tagna i CTAD-rör hade signifikant högre trombocytantal vid manuell räkning än prover tagna med EDTA-rör. Man tittade även på hur CTAD påverkade de andra blodkropparna i blodprovet. Totalantalet vita blodkroppar i CTAD-rör var signifikant lägre än antalet i prover tagna med EDTA-rör räknade med blodprovsapparat, men antalet i CTAD-rör stämde bra överens med antalet i EDTA-prover som var manuellt räknade. Ingen skillnad mellan CTAD och EDTA sågs gällande cellmorfologi eller färgningskaraktistika. Dessa resultat visar att prover tagna med CTAD-rör reducerar antalet trombocyttaggregat hos katt jämfört med blodprover tagna i EDTA-rör, men man hittar fortfarande aggregat i dessa blodprover. En enkel metod att undvika trombocyttaggregering vore därmed värdefullt. (Norman et al, 2001b).

Prostaglandin E1 som hämmare av trombocyttaggregering

Man har sett att tillsats av prostaglandin E1 till blodprovsrör resulterat i en signifikant minskning av trombocyternas spontana aggregering (Norman et al, 2001b; Weiss, 2002; Welles et al, 1994; Zhang et al, 1999). Prostaglandin E1 är en stabil metabolit av arachidonsyra och har trombocythämmande egenskaper (Welles et al, 1994). Trombocyter exponerade för PGE1 blir okänsliga för aktivering, vilket förbättrar noggrannheten vid trombocyträkning, men försämrar analys av trombocytfunktion då man vill se på trombocyternas förmåga att aggregera (Welles et al, 1994).

Syftet med denna studie är använda prostaglandin E1 och även CTAD rör att få bra blodprov utan trombocyttaggregat som vi sedan kan använda till att etablera bra referensvärden för katttrombocyter med olika analysmetoder. Det finns inga bra referensvärden för katters trombocytantal eftersom trombocyterna är så svåra att analysera. Vi vill även utvärdera om de nya optiska metoderna för mätning av trombocyter (Sysmex XT 2000 Vi och Advia 2120) fungerar bättre hos katt än tidigare metoder (Cell-Dyn impedans hematologiinstrument och manuell trombocyträkning). När en bra metod för blodprovstagning har hittats och bra referensvärden erhållits kan man gå över till att testa metoden i den kliniska verksamheten på universitetsdjursjukhuset. Detta finns det dock inte tid till inom detta projekt.

Även trombocyternas stabilitet i blodprovsröret och de olika analysmetodernas precision kommer att undersökas. D.v.s. hur länge analysmetoden ger tillförlitliga resultat över tid och om analysinstrumentet ger lika värden varje gång man analyserar ett prov. Stabiliteten är bra att veta då många blodprover som analyseras på laboratoriet för klinisk kemi är inskickade via post och kan då vara någon dag gamla när de analyseras.

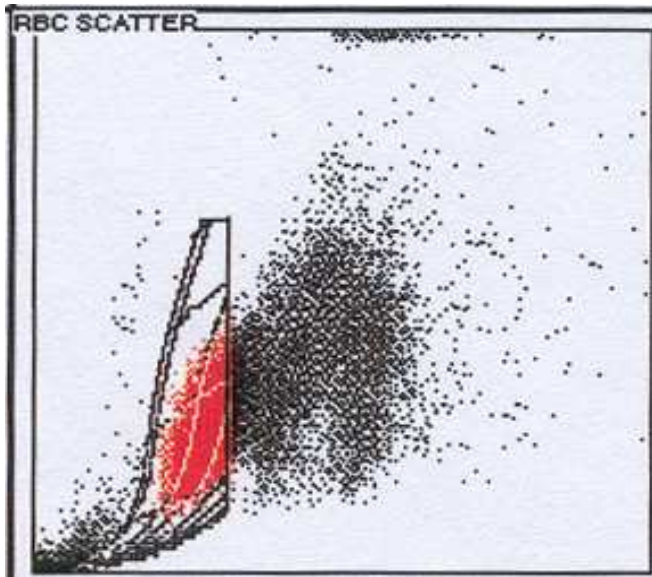
MATERIAL OCH METOD

I försöket användes i första omgången 15 stycken friska katter i åldrarna 1-10 år. Vi fick etiskt tillstånd att ta blod från friska sällskapskatter. Blodprov togs i vena cephalica med öppen kanyl 0,8 x 16 mm. Vid första blodprovstillfället samlades blodet upp i 2 stycken EDTA-rör. Till det ena röret tillsattes 2 droppar av prostaglandin E1 enligt bilaga 1. Blodprov-röret vändes därefter 10 gånger för att blodet skulle blandas med PGE1. Båda blodprov-rören analyserades inom 1-4 timmar på laboratoriet för klinisk kemi.

De båda EDTA-rören, med och utan PGE1 tillsatt, analyserades både med impedansanalysator (Cell-Dyn 3500) och med optisk analysator (Sysmex XT 2000Vi, PLT-O). Sysmex XT 2000Vi räknade även trombocyterna med impedansanalys (PLT-I). Manuell trombocyträkning utfördes som referens för den automatiserade trombocyträkningen. Förekomst av trombocyttaggregat kontrollerades i bürkerkammaren under den manuella räkningen och på blodutstryken. Förutom trombocyter analyserades även röda och vita blodkroppar som en ytterligare koll av att katten verkade frisk.

På 9 av katterna upprepades blodprovstagningen några månader senare på grund av att den första tillsatsen av PGE1 inte fungerade för att hämma trombocyttaggregationen. Blodet samlades då upp i ett EDTA-rör och ett CTAD-rör. Till CTAD-röret tillsattes 20 µl PGE1 (1 µmol/l) enligt bilaga 2, varefter blodprov-röret vändes 10 gånger för att blodet skulle blandas med PGE1. Båda blodprov-rören analyserades inom 1-4 timmar på laboratoriet för klinisk kemi med hjälp av optiska cellräknare. Denna gång analyserades blodprovet både med Sysmex XT 2000Vi och även med Siemens Advia 2120 som fanns tillgänglig under andra delen av försöket. Även manuell trombocyträkning utfördes och blodutstryk kontrollerades för förekomst av trombocyttaggregat.

I figur 3 ses ett "Mie" cytogram från Advia 2120. Erythrocyter ses som röda punkter inom rutmönstret och de svarta punkterna till vänster om rutmönstret är trombocyter. De stora trombocyterna hos katter separeras tydligt från erythrocyterna eftersom Advia 2120 är en optisk analysator som skiljer celler åt både på storlek och på cellens komplexitet som Sysmex XT 2000Vi. Ökande storlek ses längs y-axeln och ökande komplexitet ses längs x-axeln.



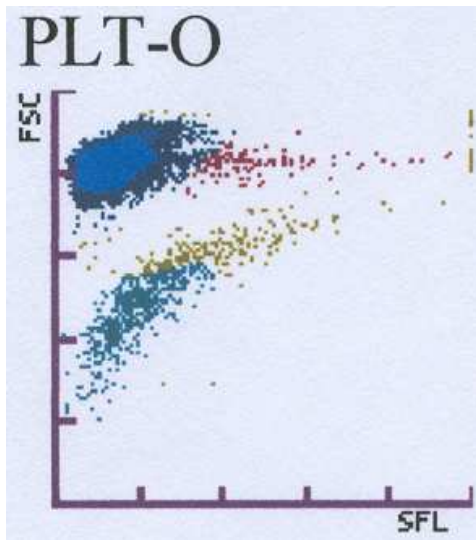
Figur 3. Cytogram från Advia 2120. De röda punkterna inom rutmönstret är erythrocyter och de svarta punkterna till vänster om rutmönstret är trombocyter.

Advia 2120 skiljer även trombocyttaggregat från leukocyter (se figur 8a). Ofta är trombocyttaggregaten av den storleken att de felaktigt räknas som leukocyter i analysinstrumentet.

För att jämföra de olika instrumentens precision med EDTA-rör och CTAD-rör, analyserades en del blodprover 10 ggr efter varandra med Sysmex optisk analys och Sysmex impedansanalys. Variationskoefficienten (CV) räknades ut för varje analysmetod. CV är standardavvikelsen (sd) för analysmetoden dividerat med medelantalet (\bar{X}) trombocyter för metoden multiplicerat med 100, $CV = (sd / \bar{X}) \times 100$. Svaret blir då i procent och en variationskoefficient under fem procent är bra. Det betyder att då varierar inte mätresultaten mer än fem procent från gång till gång.

Blodprovets stabilitet över tid, med och utan PGE1 tillsatt, mättes genom att fyra EDTA-rör analyserades fyra timmar, ett dygn och tre dygn efter provtagningsstillfället för att se om blodprovet höll sig längre om PGE1 (blandning enligt bilaga 1) var tillsatt. Blodproverna förvarades i kylskåp under tiden.

För att undersöka om den optiska cellräknaren Sysmex XT 2000Vi räknade de stora trombocyterna togs dessa bort från analysresultatet och värdena jämfördes sedan med värdena som erhöles genom impedansräkning av trombocyterna. Detta illustreras i figur 4. Om den optiska räknaren räknar de stora trombocyterna som trombocyter ska de reanalyserade värdena från den optiska räknaren stämma överens med värdena från impedansräkningen.



Figur 4. Reanalyserat PLT-O cytogram. De gula prickarna ovanför det nedre cellklustret är de stora trombocyterna som exkluderades från den optiska trombocyträkningen.

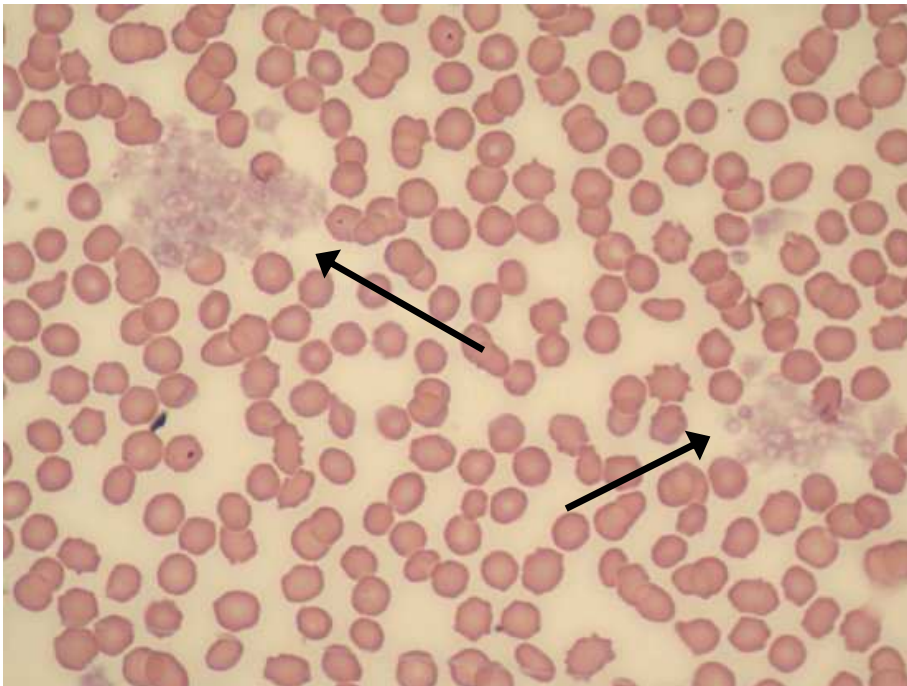
RESULTAT

I den första försöksomgången då prostaglandin E1 användes enligt bilaga 1 och tillsattes till EDTA-rör, förhindrades inte trombocyttaggregation. På blodutstryken sågs trombocyttaggregat i ungefär samma utsträckning med och utan tillsatt PGE1. Medelantalet trombocyter från de 15 katterna var inte signifikant högre i blodproven med prostaglandin E1 (PGE1) jämfört med de utan prostaglandin E1 (EDTA). Detta illustreras i tabell 1. De optiska mätvärdena (PLT-O) varierade från 42-479x10⁹/L. I blodprovsröret som gav trombocytantalet 42x10⁹/L sågs tydliga aggregat. Som vi hade förväntat oss var medelvärdena från Sysmex impedansanalys lägre än medelvärdena från Sysmex optiska analys.

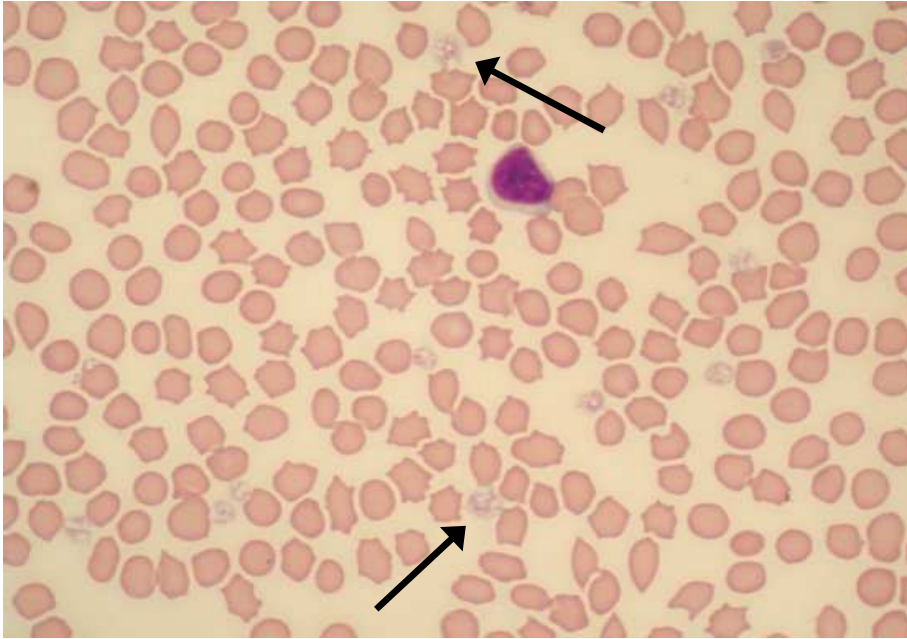
Tabell 1. Medelantal trombocyter för EDTA-rör med och utan prostaglandin E1 tillsatt, räknat med Sysmex optisk analys (PLT-O), Sysmex impedansanalys (PLT-I) och manuellt, x10⁹/L

Analysmetod	PGE1	EDTA
PLT-O	233	231
PLT-I	184	189
Manuell	268	292
Cell-Dyn	229	257

I den andra försöksomgången då prostaglandin E1 användes enligt bilaga 2 och tillsattes till CTAD-rör, såg man på blodutstryken att trombocyttaggregationen verkade ha förhindrats. Detta kan ses i figur 5a och 5b.

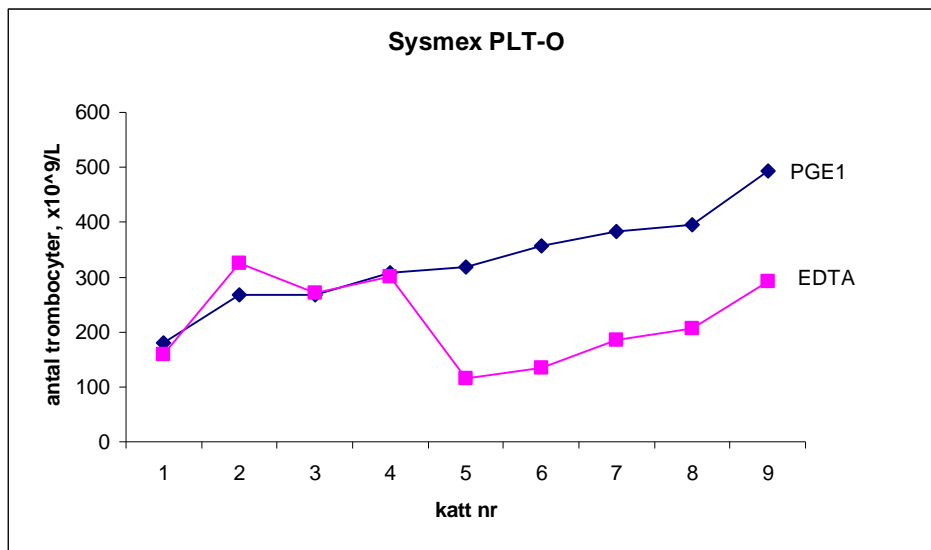


Figur 5a. Blodutstryk från katt med stora trombocyttaggregat (pilar). Blodprovet är taget i EDTA-rör utan PGE1 tillsatt. Jämför detta med figur 5b där blodet är taget från samma katt vid samma tillfälle.



Figur 5b. Blodutstryk från samma katt som i figur 3. Blodet är taget vid samma tillfälle, men i CTAD-rör med PGE1 tillsatt enligt bilaga 2. I detta blodutstryk finns inga trombocyttaggregat. Man kan se att en del av trombocyterna är nästan jämnstora med erythrocyterna (pilar).

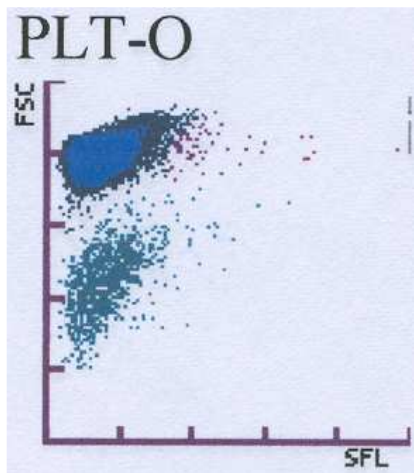
I figur 6 ses analysvärdena från andra försöksomgången då de nio katternas trombocyter analyserades med den optiska cellräknaren Sysmex XT 2000Vi. Både värden för CTAD-rör med PGE1 tillsatt och värden för EDTA-rör utan PGE1 tillsatt visas.



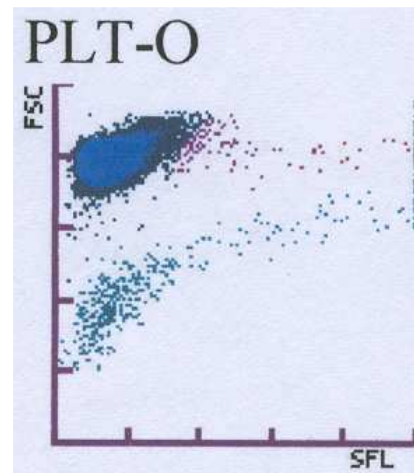
Figur 6. Trombocytantal analyserat med den optiska cellräknaren Sysmex XT 2000Vi. Blodproverna är tagna från nio friska katter i andra försöksomgången. Katterna 5-9 hade mycket lägre trombocytantal i EDTA-rören utan PGE1 än i CTAD-rören med PGE1. Detta beror troligtvis på att trombocyttaggregationen har förhindrats av PGE1, men inte av EDTA.

Figur 7a visar ett Sysmex PLT-O (optisk analys) cytogram på blod taget från en frisk katt i CTAD-rör med PGE1 tillsatt. Det nedre cellklustret är trombocyter av normal storlek och det övre cellklustret är erythrocyter.

Figur 7b visar ett Sysmex PLT-O cytogram på blod taget från samma katt vid samma tillfälle i ett EDTA-rör utan PGE1 tillsatt. Det nedre cellklustret med normalstora trombocyter är inte lika tätt som i figur 7a. Detta visar förlust av trombocyter. Cellkurvan breder också ut sig längre åt höger där celler med mer RNA ritas in. Detta är trombocyttaggregat som ser större ut än individuella trombocyter.

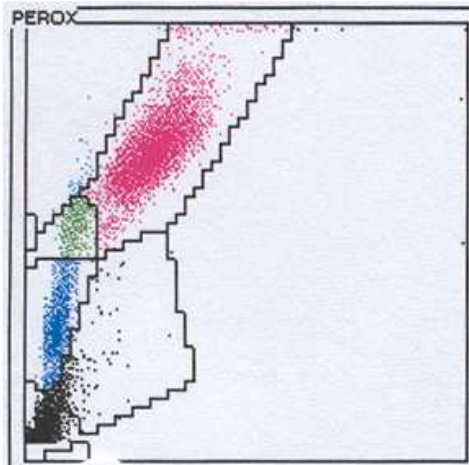


Figur 7a. PLT-O cytogram på blod från frisk katt taget med CTAD-rör med PGE1 tillsatt.

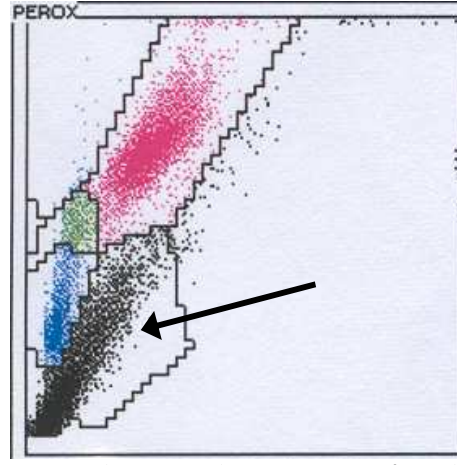


Figur 7b. PLT-O cytogram på blod från samma katt taget vid samma tillfälle som i figur 7a. Detta blod togs i EDTA-rör utan PGE1 tillsatt.

Figur 8a visar ett peroxidascytogram från Advia 2120. Blodet som är analyserat är taget från en frisk katt i CTAD-rör med PGE1 tillsatt. Trombocyterna och övriga partiklar som är mindre än leukocyter visas som svarta punkter. Neutrofiler visas som röda punkter, monocyter som gröna punkter och lymfocyter som blåa punkter. Små trombocyttaggregat kan ha samma storlek som leukocyter, men som ses i figuren skiljer Advia 2120 trombocyttaggregat från leukocyter. I detta prov finns endast få trombocyttaggregat. Jämför utseendet på cytogrammet med det i figur 8b där blodet är taget från samma katt vid samma tillfälle i EDTA-rör utan PGE1 tillsatt. I det provet finns många trombocyttaggregat. De svarta punkter som går uppåt och åt höger i 45° vinkel är trombocyttaggregat som inte räknas som leukocyter.

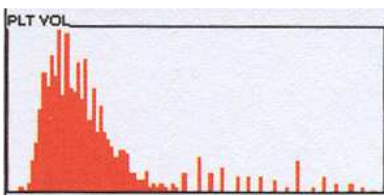


Figur 8a. Peroxidascytogram från Advia 2120. Blodet som är analyserat är taget från en frisk katt i CTAD-rör med PGE1 tillsatt. I provet finns endast ett fåtal trombocyttagregat.

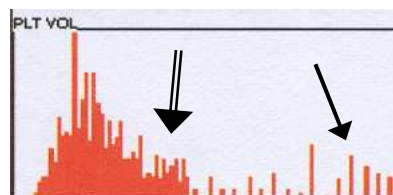


Figur 8b. Peroxidascytogram från Advia 2120. Blodet är taget från samma katt som i figur 8a, men i EDTA-rör utan PGE1 tillsatt. I detta prov finns flera trombocyttagregat (pil).

Figur 9a visar ett volymhistogram över trombocyter räknade i Advia 2120. Histogrammet visar antalet trombocyter (y-axeln) av en viss volym (x-axeln). Staplar långt till höger motsvarar större celler som är trombocyttagregat och stora trombocyter. Blodet är taget från en frisk katt i CTAD-rör med PGE1 tillsatt. Jämför denna figur med figur 9b som visar ett volymhistogram över trombocyter i blodprov taget från samma katt vid samma tillfälle som figur 9a, men detta blod är taget med EDTA-rör utan PGE1 tillsatt. Histogrammet i figur 9b har lite fler större staplar åt höger än vad figur 9a har (enkel pil) och i figur 9a ligger huvuddelen av staplarna längre åt vänster än vad de gör i figur 9b (dubbel pil). Detta betyder att blodet i figur 9a innehåller trombocyter som är mindre till storlek än trombocyterna i blodet i figur 9b. Mönstret är dock inte lika tydligt som i figur 8a och b.



Figur 9a. Volymhistogram över trombocyter räknade i Advia 2120. Blodet är taget från en frisk katt i CTAD-rör med PGE1 tillsatt.



Figur 9b. Volymhistogram över trombocyter i blod från samma katt som i figur 9a taget vid samma tillfälle. Detta blod är taget i EDTA-rör utan PGE1 tillsatt.

Referensvärden

Eftersom inga eller endast enstaka små trombocyttagregat sågs i andra försöksomgången när CTAD-rör med PGE1 tillsatt användes, är dessa mätvärden mer trovärdiga än de från första försöksomgången. Trombocytvärdena från dessa nio katter kan därmed användas som referensvärden för de metoder och den

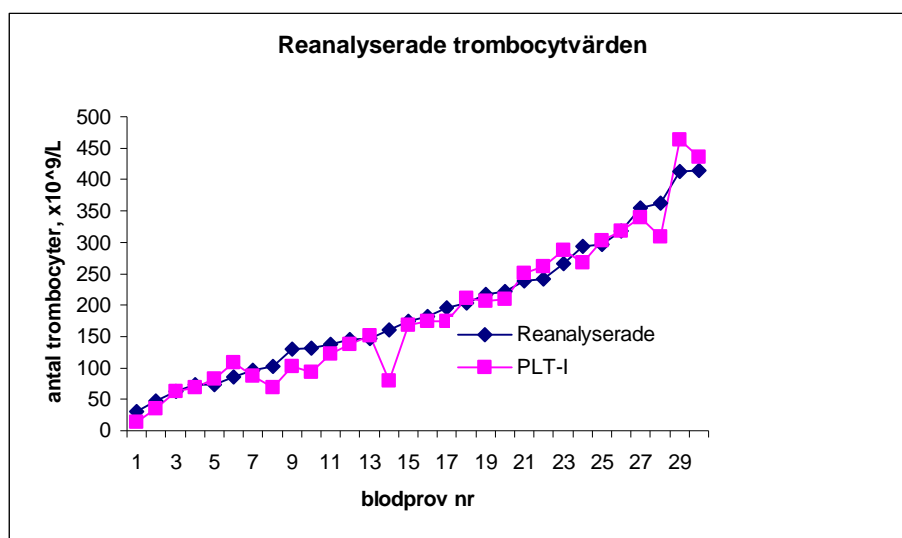
antikoagulantia som användes. De referensvärden vi fått fram för trombocyter analyserade optiskt med Sysmex XT 2000Vi och Advia 2120 och referensvärden för manuell trombocyträkning när trombocytaggregation förhindrats redovisas i tabell 2. Resultaten från de båda optiska metoderna stämmer väl överens med varandra, medan resultaten för den manuella räkningen ligger lite lägre.

Tabell 2. Referensvärden för katttrombocyter, $\times 10^9/L$

Analysmetod	Referensvärden	
	Minimum	Maximum
Sysmex PLT-O	180	493
Advia 2120	182	525
Manuell räkning	161	380

Reanalyserade trombocytvärden

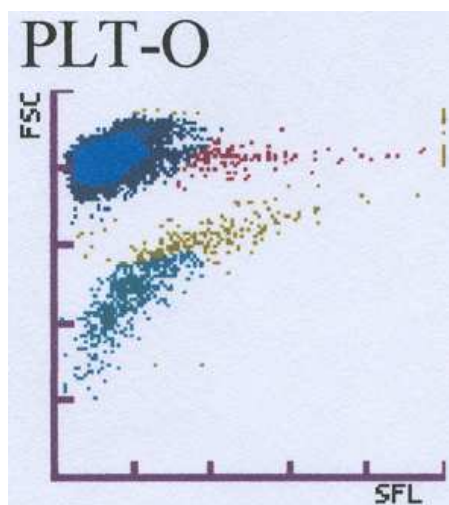
När trombocyterna analyserades i Sysmex XT 2000Vi var de optiska mätvärdena alltid högre än impedansmätvärdena. I figur 10 ses att när de stora trombocyterna togs bort från de optiska mätvärdena på det sätt som beskrivs i figur 4, sågs ingen signifikant skillnad mellan de nya reanalyserade värdena och värdena som erhöles vid impedansanalys av trombocytantalet. Detta talar för att skillnaden mellan PLT-O och PLT-I huvudsakligen är att PLT-O kan mäta stora trombocyter.



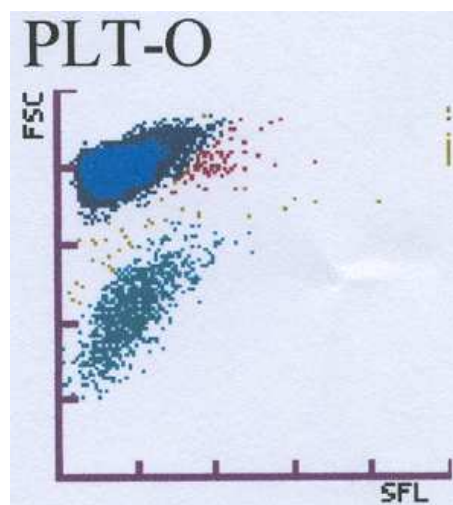
Figur 10. De stora trombocyterna togs bort från de optiska mätvärdena (reanalyserade värden) och jämfördes med impedansmätvärden (PLT-I). De reanalyserade värdena skilde sig inte signifikant från impedansvärdena ($p > 0,1$).

Figur 11a visar ett reanalyserat PLT-O cytogram från en av de friska katterna. Blodet var taget i EDTA-rör med PGE1 (enligt bilaga 1) tillsatt. De gula prickarna ovanför det nedre cellklustret är de stora trombocyterna som har tagits bort från det ursprungliga optiska mätvärdet. Detta reducerade trombocytantalet från $221 \times 10^9/L$ till $161 \times 10^9/L$. Figur 11b visar ett reanalyserat PLT-O cytogram från en annan av de friska katterna. Även detta blod var taget i EDTA-rör med PGE1 tillsatt. När de stora trombocyterna räknades bort från det ursprungliga optiska mätvärdet, reducerades detta bara från $315 \times 10^9/L$ till $310 \times 10^9/L$. Cytogrammet

i figur 11b visar mer normalstora trombocyter som cytogrammet i figur 7a. Figur 11a hade en tydlig del stora trombocyter (gula prickar).



Figur 11a. Reanalyserat PLT-O cytogram från en av de friska katterna (katt nr 13). Blodet var taget i EDTA-rör med PGE1 tillsatt.



Figur 11b. Reanalyserat PLT-O cytogram från en annan av de friska katterna (katt nr 11). Blodet var taget i EDTA-rör med PGE1.

Precision

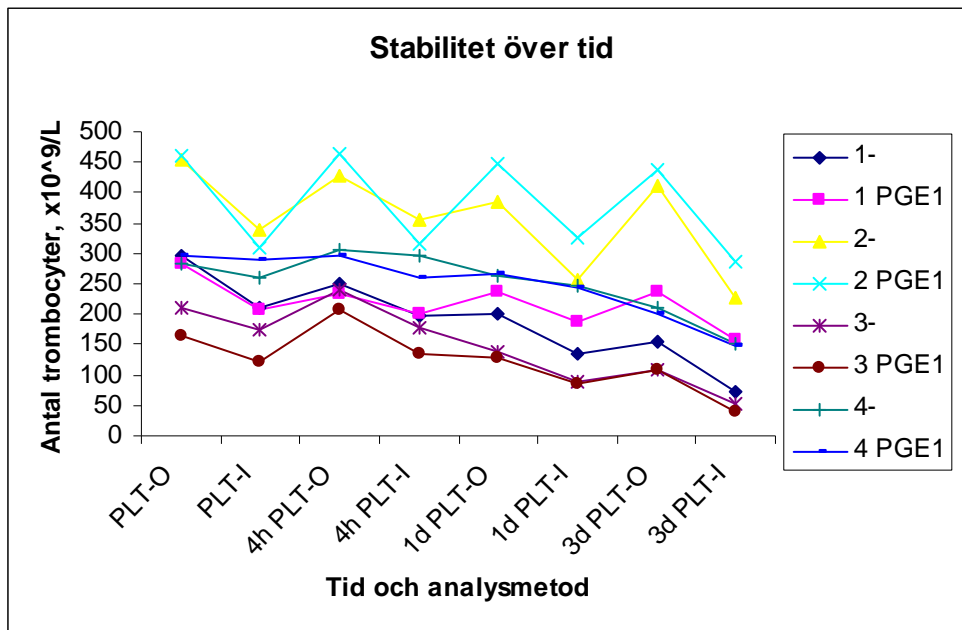
I tabell 3 kan man se att variationskoefficienten (CV) ligger under 5 % för CTAD antikoagulantia och för både optisk mätning av trombocytantal och impedansmätning. För EDTA-rör ligger CV på 5 % eller mer för båda analysmetoderna. EDTA-rören analyserade med impedansanalys har betydligt sämre precision än de andra kombinationerna.

Tabell 3. Analys av precision vid användning av optisk mätning (PLT-O) av trombocytantal och impedansmätning (PLT-I) med EDTA- och CTAD som antikoagulantia

	PLT-O		PLT-I	
	CTAD	EDTA	CTAD	EDTA
Medelvärde	353	140	356	102
Standardavvikelse	14,2	7,3	9,7	14,4
Variationskoefficient, %	4	5	3	14

Stabilitet över tid

I figur 12 ses stabiliteten i mätresultatet över tid analyserat med optisk mätning och impedansmätning i Sysmex XT 2000Vi. Alla blodprover är tagna i EDTA-rör och hälften av dem har PGE1 tillsatt. Ingen signifikant skillnad ses mellan blodprovsrören med och utan (-) PGE1 tillsatt. En minskning av trombocytvärdet ses över tiden, men minskningen sker gradvis och skillnaden i trombocytvärdet mellan optisk analys och impedansanalys är mer framträdande än skillnaden över tid.



Figur 12. Stabiliteten i mätresultatet över tid analyserat med optisk mätning (PLT-O) och impedansmätning (PLT-I) i Sysmex XT 2000Vi. Blodproven är tagna i EDTA rör med och utan (-) prostaglandin E1 tillsatt.

DISKUSSION

Syftet med denna studie var att använda prostaglandin E1 som tillsats till blodprover för att förhindra trombocyttaggregering i provet. Mätvärdena för trombocytantal ville vi sedan använda till att etablera bra referensvärden för trombocytantal hos katt med olika analysmetoder. När PGE1 tillsattes till provet enligt bilaga 2 fick vi signifikant högre trombocytantal än när PGE1 inte tillsattes till blodprovet hos 5 av 9 katter (figur 6). Vi såg inga eller endast ett fåtal små trombocyttaggregat på blodutstryken när PGE1 var tillsatt till blodprovet. Vår slutsats är att vi har hittat en metod för att använda prostaglandin E1 för att förhindra trombocyttaggregation om det tillsätts till blodprovsröret enligt bilaga 2. Praktiskt kliniskt innebär detta att om man ser trombocyttaggregat på blodutstryk eller i bürkerkammaren när man gör sin manuella trombocyträkning eller om man har klinisk misstanke om trombocytopeni, bör man ta om blodprovet och tillsätta PGE1.

I första försöksomgången verkar blandningen av prostaglandin E1 (bilaga1) inte ha fungerat. Anledningen var troligtvis att koncentrationen PGE1 i blodprovsröret blev för låg eller att blodprovet vid tillsats av PGE1 innehöll för mycket etanol och att detta påverkade instrumentens förmåga att räkna trombocytorna. På blodutstryken sågs trombocyttaggregat i ungefär samma utsträckning med och utan tillsatt PGE1. I tabell 1 ses att medelvärdet för trombocytantal som erhållits med hjälp av impedanscellräknaren Cell-Dyn 3500 är mycket högre än medelvärdet som erhållits med Sysmex impedansanalys. Normalt ger dessa instrument jämförbara värden hos hund och vi hittar ingen förklaring till varför Cell-Dyn 3500 ger högre värden än Sysmex. Laboratoriet för klinisk kemi brukar dock inte lita på trombocytantal hos katt erhållna med Cell-Dyn 3500.

I den första försöksomgången var det lägsta trombocytantalet med optisk analys endast $42 \times 10^9/L$, vilket är ett mycket lågt värde för en normal katt. I detta blodprovsrör sågs många trombocyttaggregat. De 15 första katternas blodprovresultat är därför inte tillförlitliga och går ej att använda för att bestämma nya referensvärden. Referensvärdena från andra försöksomgången är däremot tillförlitliga eftersom vi i den omgången inte såg några aggregat eller endast ett fåtal små trombocyttaggregat på blodutstryken. Referensvärdena för de båda optiska metoderna stämmer väl överens med varandra, medan referensvärdena för den manuella räkningen ligger något lägre. Detta kan innebära att manuell räkning av trombocyter inte är den bästa metoden att utvärdera trombocytantal.

Precisionsanalysen visar att när man tillsatt PGE1 till blodprovet och förhindrat trombocyttaggregering blir precisionen i analysmetoden bättre. CTAD-rör med PGE1 tillsatt har bättre precision än EDTA-rör utan PGE1 tillsatt vid optisk analys av trombocytantalet, men särskilt vid impedansanalys. Av precisionsanalysen kan man se att CTAD-rör med PGE1 tillsatt ger ungefär samma precision vid båda analysmetoderna, men att EDTA-rör utan PGE1 tillsatt har betydligt bättre precision vid optisk analys än vid impedansanalys. Detta betyder att impedansanalys påverkas mer av trombocyttaggregat än vad den optiska analysen gör. Optisk trombocyträkning är därför bättre än vad impedansanalys av trombocytantal är. Detta kan man även se på resultaten av de reanalyserade trombocytvärdena som visar att den stora skillnaden mellan optiska

cellräknare och impedanscellräknare är att de optiska cellräknarna inkluderar de flesta stora trombocyterna hos katter.

Stabiliteten hos blodprover över tid analyserat med Sysmex optisk- och impedansräkning visade ingen stor klinisk skillnad mellan blodprovsrör med och utan PGE1. Detta kan bero på att det var blandningen av PGE1 från första försöksomgången som användes och den lyckades inte förhindra trombocyttaggregering. Figur 12 visar att trombocytvärdena minskade lite över tiden, men skillnaden mellan optisk analys och impedansanalys var större än skillnaden i trombocytantal över tid. Detta betyder att även trombocytantal analyserade i blodprover som skickats in via post till laboratoriet är kliniskt användbara för diagnos.

Effekten av PGE1 vid bestämning av trombocytantal hos katt har tidigare studerats av Zhang et al, 1999. De har vid sitt laboratorium använt prostaglandin E1 som tillsats i citratrör vid blodprovstagning för att förhindra trombocyttaggregering. Blodproverna har sedan analyserats med instrumenten Cell-Dyn 4000 och SE-9000. Skillnaden mellan vår studie och Zhang et al är att vi har använt CTAD-rör och analyserat blodproven även med optisk cellräknare. I jämförelse mellan citratrör och CTAD-rör har Norman et al, 2001b, funnit att analys av blod i CTAD-rör gav signifikant högre trombocytantal än analys av blod i citratrör. Vår kombination av CTAD-rör och PGE1 borde vara bättre på att förhindra trombocyttaggregering än de metoder som använts av Zhang et al och Norman et al var för sig.

Resultaten av den här studien, d.v.s. referensvärden som är tillförlitliga för de analysmetoder och den PGE1 tillsats vi använt, vore intressant att använda för studier på trombocytantal hos sjuka katter för att se hur ofta de lider av sann trombocytopeni. Det vore också intressant att göra en större studie på friska katter eftersom dessa nya referensvärden är baserade på resultat från endast nio katter.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Jordan et al. 1993. Thrombocytopenia in cats: a retrospective study of 41 cases. *J Vet Intern Med*, 7(5), 261-265.
- Knoll, J. 2000. Clinical automated hematology systems. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th edition. 1-11. Philadelphia: Lipincott Wiliams& Wilkens.
- Kohn et al. 2006. Platelet-bound antibodies detected by a flow cytometric assay in cats with trombocytopenia. *J Feline Med Surg*, 8, 254-260.
- Norman et al (a). 2001. Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Vet Clin Pathol*, 30(3), 137-140.
- Norman et al (b). 2001. Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell counts. *Vet Clin Pathol*, 30(3), 124-132.
- Séverine et al. 1999. Estimation of platelet counts on feline blood smears. *Vet Clin Pathol*, 28(2), 42-45.
- Tasker et al. 2001. Evaluation of methods of platelet counting in the cat. *J Small Anim Pract*, 42(7), 326-332.
- Tvedten, H & Korcal, D. 2001. Vortex mixing of feline blood to disaggregate platelet clumps. *Vet Clin Pathol*, 30(3), 104-106.
- Weiss, D.J. 2002. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol*, 31(2), 72-82.
- Welles et al. 1994. Detection of activated feline platelets in platelet-rich plasma by use of fluorescein-labeled antibodies and flow cytometry. *Vet Pathol*, 31(5), 553-560.
- Zelmanovic, D & Hetherington, E.J. 1998. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol*, 27(1), 2-9.
- Zhang et al. 1999. Long-term preservation of platelet count in blood för external quality control surveillance using prostaglandin E1. *Clin Lab Haem*, 21, 71-74.

BILAGA 1: PROSTAGLANDIN E1 FÖRSTA FÖRSÖKSOMGÅNGEN

Prostaglandin E (C₂₀H₃₄O₄)

1-5 µmol PGE₁/L i blodprovet

FW 338.5

1 molar = 338,5 g/l, 338 500 mg/l, 338,5 mg/ml

1 µmolar = 0.338 mg/l, 0.338 µg/ml

1 droppe = 65 µl

Om man vill ha 5 µmolar PGE₁ i 3 ml EDTA rör behöver man:

$5 \times 0.338 \text{ mg/l} = 1.7 \text{ mg/l} = 1.7 \text{ µg/ml} \rightarrow 5 \text{ µg/3 ml}$

Våra 5 mg PGE₁ är 1000 gånger mer än man behöver per rör.

Om vi löser upp 5 mg i 1 ml ger det $65/1000 \text{ µl} \times 5000 \text{ µg} = 325 \text{ µg/dropp}$

$5000 \text{ µg}/1000 \text{ µl} = 50 \text{ rör med } 20 \text{ µl/rör eller } 100 \text{ µg/rör}$

$100 \text{ µg}/20 \text{ µl ETOH} + 0.5 \text{ ml (500 µl)} = 100 \text{ µg}/120 \text{ µl eller } 54 \text{ µg/dropp (65 µl)}$

Därför kan man tillsätta 0,5 ml NaCl till ett rör med 20 µl ETOH och 100 µg PGE₁ och sedan 1 droppe av detta till ett EDTA rör för ca 3 ml blod.

BILAGA 2: PROSTAGLANDIN E1 ANDRA FÖRSÖKSOMGÅNGEN

Prostaglandin E (C₂₀H₃₄O₄)

1-5 µmol PGE1/L i blodprovet

FW 338.5

1 molar = 338,5 g/l, 338 500 mg/l, 338,5 mg/ml

1 µmolar = 0.338 mg/l, 0.338 µg/ml

1 droppe = 65 µl

Om man vill ha 5 µmolar PGE1 i 3 ml blodprovsröret behöver man:

$5 \times 0.338 \text{ mg/l} = 1.7 \text{ mg/l} = 1.7 \text{ µg/ml} \rightarrow 5 \text{ µg/3 ml}$

Våra 5 mg PGE1 är 1000 gånger mer än man behöver per rör.

Om vi löser upp 5 mg i 1 ml etanol blir det:

$5000 \text{ µg/1000 µl} = 50 \text{ µg/rör med } 20 \text{ µl/rör eller } 100 \text{ µg/rör eller } 20 \text{ X mer än man minimalt behöver.}$

Därför man kan bara ta CTAD blod från provröret och skölja ur all PGE1 som finns i eppendorfröret från frysen precis efter blodtagning. Volymen 20 µl etanol är för liten för att ha en negativ effekt på blodprovet.