

**Hematologiska analysinstrument för mindre djurkliniker**  
**En utvärdering av QBC-V och Scil Vet abc för analys av prover  
från hund och katt**

**Kristina Andersson**

Inger Lilliehöök  
Institutionen för klinisk kemi

Gunilla Trowald-Wigh  
Institutionen för kirurgi och medicin smådjur

Examensarbete 2002:3  
Veterinärprogrammet  
Veterinärmedicinska fakulteten  
SLU  
ISSN 1650-7045  
Uppsala 2003

# Innehållsförteckning

<b>Inledning</b>	3
<b>Hematologiska analysmetoder</b>	4
<b>Syfte</b>	5
<b>Material och metoder</b>	5
Beskrivning av instrumenten	5
<i>QBC-V</i>	5
<i>Scil Vet abc</i>	6
<i>Cell-Dyn 3500</i>	8
Studiens uppläggnig	8
Statistik	8
<b>Resultat</b>	9
Erytrocyter	9
Leukocyter	10
<i>Prover från hund analyserade på QBC-V</i>	10
<i>Prover från katt analyserade på QBC-V</i>	10
<i>Prover från hund analyserade på Vet abc</i>	11
<i>Prover från katt analyserade på Vet abc</i>	11
Differentialräkning	15
<i>Prover från hund analyserade på QBC-V</i>	15
<i>Prover från katt analyserade på QBC-V</i>	16
<i>Prover från hund analyserade på Vet abc</i>	19
<i>Prover från katt analyserade på Vet abc</i>	19
Trombocyter	23
<i>Prover från hund analyserade på QBC-V</i>	23
<i>Prover från hund analyserade på Vet abc</i>	23
<i>Analys av trombocyter från prover från katt</i>	23
Flaggor och larm	26
<i>QBC-V</i>	26
<i>Vet abc</i>	27
Praktiskt analysarbete	27
<b>Diskussion</b>	28
QBC-V	28
Vet abc	31
Begränsningar hos hematologiska instrument	36
<b>Slutsatser</b>	37
<b>Summary</b>	39
<b>Tack till...</b>	40
<b>Referenser</b>	40
<b>Bilaga 1</b> , Tolkning av de histogram som erhålls från QBC-V	42
<b>Bilaga 2</b> , Distributionskurvor och larm från Vet abc	43

## Inledning

Inom den veterinärmedicinska klinikverksamheten finns möjlighet att använda sig av ett stort antal diagnostiska hjälpmedel och det har under de senaste åren kommit allt fler automatiska cellräknare anpassade för veterinärt bruk. Om man har kunskap om och förståelse för dessa metoders användningsområden, möjligheter och begränsningar, samt korrekt kan tolka resultaten kan man öka sin behållning av sådana hjälpmedel. Analys av blodprover, bland annat hematologiska prover, är numera en självklar del av den veterinärmedicinska diagnostiken. Tillsammans med den kliniska undersökningen är dessa analyser ofta inledningen på en diagnostisk utredning och det blir allt mer vanligt att man på kliniken använder sig av hematologiska analysinstrument för att snabbt få provsvar. Rätt utnyttjat kan detta underlätta den dagliga verksamheten framför allt vad det gäller det polikliniska arbetet där man snabbt vill ställa rätt diagnos och sätta in adekvat behandling. Man har dessutom alltid färsk prov till sina analyser vilket är en stor fördel jämfört med att skicka prover till ett externt laboratorium.

För att arbetet med analyserna på en klinik ska fungera på bästa sätt finns det en del faktorer att ta hänsyn till. Analyserna som utförs måste vara enkla och kostnadseffektiva samt ha en hög tillförlitlighet. Tester som kräver mer avancerad utrustning och som är tidskrävande lämpar sig bättre för ett referenslaboratorium där man dagligen analyserar ett stort antal prover och där personalen har tid, intresse och kunskaper att på ett adekvat sätt utföra analyserna och utvärdera resultaten. Vad man också bör tänka på är att veterinären själv ansvarar för tillförlitligheten hos provsvaren vid eget laboratoriearbete (Tvedten, 1999). Hematologiinstrument kräver någon slags kvalitetskontroll för att man ska kunna garantera korrekta analysresultat (Knoll, 2000). Denna kan till exempel utgöras av att man regelbundet analyserar en kontrollvätska för vilken man vet de sanna resultaten på olika parametrar. Det är också viktigt att ha som rutin att skicka prover, där man är tveksam till om resultaten är korrekta, till ett referenslaboratorium. När man överväger att börja med att analysera prover på kliniken bör man också tänka på att detta medför kostnader utöver inköp av utrustningen. Utgifter för utbildning och personal som ska utföra analyserna, samt för kvalitetskontroll och service av apparaturen kan bli betydande. Det är viktigt att personalen är kunnig och har relevant utbildning även då det gäller användande av enklare instrument (Tvedten, 1999).

Då hematologiska instrument används ska man vara medveten om att dessa aldrig kan ersätta en manuell differentialräkning. Det är därför viktigt att man har möjlighet att göra blodutstryk och att man antingen har personal som är kompetent att bedöma dessa eller att man har som rutin att låta sitt referenslaboratorie utföra bedömningarna. Morfologisk bedömning av erythrocyter och leukocyter är endast möjlig genom manuell granskning och likaså detektion av stavkärniga neutrofiler, basofiler, intracellulära parasiter med mera (Lilliehöök & Larsson, 1998).

Många instrument analyserar ett flertal hematologiska parametrar. Resultaten på dessa bör utvärderas efter ett bestämt mönster där man identifierar avvikande

resultat, definierar dem i termer som beskriver sättet de avviker på samt graderar fyndet i mild, måttlig eller kraftig avvikelse. Oftast definierar man avvikande resultat såsom resultat som faller utanför referensvärdena för djurslaget i fråga (Tvedten & Weiss, 1999a). Det är då viktigt att hålla i minnet att referensvärden kan variera med ålder, kön och ras samt att de ofta bygger på ett 95% konfidensintervall (Tvedten, 1999). Detta betyder att 5% av den friska populationen ligger utanför referensvärdena utan att för den skull ha någon sjukdom.

## Hematologiska analysmetoder

De automatiska cellräknare som används inom veterinärmedicinen bygger på olika tekniker, till exempel impedans, spektrofotometri, buffy coat analys, flödescytometri eller en kombination av dessa. Eftersom tusentals celler analyseras från varje prov har de automatiska cellräknarna oftast bättre precision än manuella metoder (Knoll, 2000). I dag är de flesta instrument helautomatiska vilket betyder att instrumentet späder provet, tillsätter lyseringsvätska, räknar cellerna och skriver ut resultatet. Det finns också halvautomatiska instrument där man själv måste förbereda prover inför en analys, till exempel späda det.

Vid *impedansmetoden* späds provet med en elektrolytlösning och får sedan passera mellan två elektroder. Celler är dåliga elektriska ledare och varje gång en cell passerar mellan elektroderna registreras en förändring i den elektriska impedansen. Förändringens storlek är proportionell till cellens storlek. På detta sätt kan antal celler och dess storlek bestämmas (Knoll, 2000). Sådana system analyserar vanligen mer än 10 000 celler per prov och har därför en mycket hög precision (Tvedten, 1993). Det är viktigt att man på dessa instrument kan anpassa inställningarna för olika djurslag eftersom de olika cellernas storlek skiljer sig mellan arterna.

*Flödescytometri* innebär att laser används för att räkna antalet celler och bestämma dess innehåll. Cellerna passerar genom en laserstråle och kommer då att absorbera och reflektera ljus. Brott i strålen används som mått på antal celler medan förändringar i reflektionen av ljuset speglar cellernas storlek och utseende (Knoll, 2000).

*Analys av buffy coat* bygger på att olika blodceller lägger sig i olika lager, utifrån sin densitet, efter centrifugering i ett mikrohematokritrör. Buffy coat kallas det skikt av leukocyter och trombocyter som bildas i ett centrifugerat blodprov. De olika lagrens storlek mäts och för att bättre kunna skilja mellan olika celltyper färgas också cellulära komponenter in med ett färgämne som fluorescerar vid belysning med blå-violett ljus (Knoll, 2000).

*Spektrofotometri* används framför allt för att analysera hemoglobin-innehållet.

## Syfte

Att utföra en utvärdering av två hematologiska analysinstrument avsedda för bruk på djurkliniker, och studera deras funktion, resultat, användarvänlighet med mera vid analys av blodprover från hund och katt. De utvärderade instrumenterna är QBC-V (IDEXX, Westbrook, USA) och scil Vet abc (ABX HEMATOLOGIE, Montfeller, Frankrike).

En motsvarande utvärdering vad gäller prover från häst genomfördes av veterinär Eva Eriksson, år 2001. De båda projekten har till viss del skett i samarbete.

## Material och metoder

### Beskrivning av instrumenten

Huvuddelen av informationen i instrumentbeskrivningen nedan är hämtad från de båda instrumentens manualer.

#### *QBC-V*

QBC-V (Quantifying Buffy Coat) använder principen att olika blodceller har olika densitet och därmed bildar olika lager vid centrifugering. Man kan efter centrifugering i ett kapillärrör urskilja tre lager vilka utgörs av röda blodceller, som har högst densitet, buffy coat med de vita blodcellerna, samt plasma.

Till QBC-V används ett speciellt kapillärrör i vilket man med den tillhörande pipetten suger upp 111 µl väl blandat helblod med EDTA-tillsats (Knoll, 2000). I röret placeras sedan en cylindrisk flottör vars vikt gör att den placeras sig i den övre delen av det röda blodkroppslagret. Därmed trängs cellerna i buffy coat ut mot kapillärrörets vägg och buffy coatlagret expanderar ungefär tio gånger (Holst & Edqvist, 1991) vilket möjliggör analys av cellerna i lagret. Närmast erythrocytlagret finns granulocyterna vilka har en relativt hög densitet. Ovanpå dessa återfinns lymfocyter och monocyter medan trombocyterna placeras sig överst i lagret (Owner's Manual). Insidan av kapillärröret är klädd med acridinorange som färgar nukleoprotein (DNA och RNA), lipoprotein, glukosamin och andra cellulära substanser. När dessa belyses med blåviolett ljus fluorescerar cellerna i olika färg beroende på färgning. Lymfocyter och monocyter som tar upp mycket färg i sin stora kärna får en grön färg. Trombocyter får en blekgul färg medan normala erythrocyter inte färgas och därmed behåller sin röda färg (Owner's Manual). Dessutom innehåller röret kaliumoxalat (Owner's Manual) som ger en svag osmotisk gradient mellan de röda blodkropparna och granulocyterna vilket förbättrar separationen av dem (Holst & Edqvist, 1991). Under avläsningen, vilken sker i ett speciellt avläsningsinstrument, roterar kapillärröret och avläses åtta gånger under ett varv (Fornander, 2000). Det belyses med ljus av specifik våglängd och längden på zonerna registreras. För att få resultatet i talvärden sker en omräkning baserad på en genomsnittlig storlek för de olika celltyperna (Holst & Edqvist, 1991). Dessutom fås resultatet i form av ett histogram, se bilaga 1.

De parametrar som svaras ut är hematokrit (EVF), hemoglobin (Hb), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), totalantal leukocyter (LPK), granulocyter i procent av LPK och i absoluttal, mononukleära leukocyter, det vill säga lymfocyter och monocyter sammanslaget, i procent och absoluttal samt trombocyter i absoluttal.

Hemoglobin-innehållet i erythrocyterna analyseras indirekt genom mätning av hur djupt flottören sjunker i erythrocytlagret. Eosinofiler kan hos hund upptäckas och kvantifieras om de finns i tillräckligt stort antal ( $>0.5 \times 10^9$ ). Då anges både antalet eosinofiler och neutrofiler, neutrofilantalet fås genom subtraktion. Om retikulocyter detekteras anges de i procent av hematokriten och om kärnförande erythrocyter upptäcks anges "NRSCs likely" (Owner's Manual).

Resultatet från analysen presenteras dels på displayen men skrivs också ut av en skrivare sammankopplad med QBC-V. Både display och utskrift är tydliga och lättlästa. Varningar i form av flaggor och buffy coat-meddelanden skrivs ut då apparaten har problem med analysen. Dessa värden anges också blinkande på displayen. Den vanligast förekommande flaggan (#) betyder att provsvaret måste kontrolleras, till exempel genom kontroll av histogrammet eller manuell granskning av ett blodutstryk innan man bestämmer sig för om resultatet ska användas eller ej.

Histogrammet utgörs av två grafer där den ena illustrerar mängden DNA och den andra mängden RNA/lipoprotein. Graferna visar intensiteten av fluorescensen i buffy coat och markerar övergången mellan de olika lagren. Se bilaga 1.

Histogrammet ger information om blodprovets sammansättning (Wegmann, Hofmann-Lehmann & Lutz, 1997) och möjliggör en bedömning av provsvarens rimlighet.

### *Scil Vet abc*

Scil Vet abc (Veterinary Animal Blood Counter) är ett automatiskt hematologiinstrument som finns i två olika modeller, Vet abc 8p (analyserar åtta parametrar) respektive Vet abc 16p (analyserar 16 parametrar). I denna studie har den senare modellen använts.

De röda parametrar Vet abc 16p analyserar och lämnar resultat på är hemoglobin (Hb), hematokrit (EVF), totalantal erythrocyter (EPK), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), antal trombocyter (PLT) och mean platelet volume (MPV). Vita parametrar är totalantal leukocyter (LPK) samt en tre parts differentialräkning med lymfocyter, monocyter och granulocyter. Dessa tre parametrar anges både som ett totalantal och uträknat i procent.

Dessutom erhålls distributionskurvor över erythrocyter, trombocyter och leukocyter, se bilaga 2. Instrumentet anger även andelen eosinofiler om den överstiger en viss förutbestämd nivå som kan justeras av användaren från 0,01% till 25,5%.

Hemoglobinkoncentrationen mäts spektrofotometriskt efter att erythrocyterna har lyserats med hjälp av en lyseringsvätska (ABC Vet User Manual).

För att räkna antalet leukocyter, erythrocyter och trombocyter använder sig Vet abc av impedansmetodik. Blodet späds först i en elektriskt ledande spädningsvätska och får därefter passera genom en liten öppning mellan två elektroder, mellan vilka en elektrisk ström är kopplad. Då celler är dåliga elektriska ledare kommer varje cell som passerar öppningen mellan de två elektroderna att orsaka en ökning av ledningsmotståndet och en mätbar elektrisk impuls erhålls vilken är proportionell mot cellens storlek. Två stycken mätkammare och strömkretsar analyserar var för sig leukocyterna respektive erythrocyterna och trombocyterna.

Den impuls som varje cell ger upphov till när de passerar mellan de två elektroderna är direkt proportionell mot cellens storlek och på detta sätt kan MCV och MPV analyseras. Hematokriten räknas ut av instrumentets dator med hjälp av MCV och EPK medan MCH och MCHC beräknas utifrån uppmätt Hb, MCV och EPK. Instrumentet använder sig av 256 cellanalyser när det ritar kurvor över erythrocyternas och leukocyternas storleksfördelning och 128 cellanalyser används för trombocyterna. Mätområdet för leukocyterna är 30-460 fl. Erythrocyternas storleksfördelning ses i erythrocythistogrammet (mätområde 25-300 fl). Parametern red cell distribution with (RDW) anger spridningsmått på erythrocyternas storlek. Trombocyterna räknas mellan ett lågt gränsvärde som är placerat på 2 fl och ett varierande högt gränsvärde (ABC Vet User Manual).

För att räkna antalet leukocyter blandas 12 µl blod först med spädningsvätska och därefter med en lyseringsvätska (ABC Vet User Manual). Lyseringsvätskan förstör cellmembranen och eliminerar därigenom erythrocyterna och trombocyterna från lösningen (HESKA™). Spädningsvätskan skyddar och förbereder cellmembranen för differentialräkningen medan lyseringsvätskan verkar på cellernas cytoplasmamembran och har olika effekt på de olika celltyperna. Genom lymfocyternas cytoplasmamembran avges vattenlöslig cytoplasma och cellmembranet krymper ihop kring kärnan. Monocyterna genomgår en intermediär reaktion medan granulocyterna nästan inte påverkas alls av lyseringsvätskan. 256 celler analyseras och beroende på hur stor impuls de ger upphov till delas de in i lymfocyter (30-100 fl), monocyter (100-150 fl) respektive granulocyter (>150 fl) (ABC Vet User Manual). Eosinofilerna påverkas inte av lyseringsvätskan och är följdaktligen de celler som befinner sig längst till höger i leukocyternas distributionskurva. Det exakta storleksintervallet för eosinofilerna uppges ej.

Blodprover som analyseras skall vara färska, tagna från venöst blod och EDTA skall användas som antikoagulantia. Analysresultatet erhålles dels på instrumentets display, men även utskrivet av en skrivare. De prov eller parametrar som instrumentet har haft svårighet att analysera flaggas ut med hjälp av små symboler både på utskriften och displayen (ABC Vet User Manual). Se bilaga 2.

### *Cell-Dyn 3500*

Cell-Dyn 3500, som användes som referensinstrument i denna studie, är ursprungligen utvecklad för att analysera blodprover från människa men har även utrustats med programvara för att kunna analysera prover från djur. För att analysera ett blodprov används tre olika metoder, hemoglobin mäts

spektrofotometriskt, leukocyter, erythrocyter och trombocyter räknas med impedans medan flödescytometri med laser används vid differentialräkning (Knoll, 2000).

## Studiens uppläggning

Patientprover från hund och katt från smådjurskliniken, Ultuna analyserades på de ovan beskrivna instrumenten och resultaten jämfördes med resultat från Cell-Dyn 3500 (Abbott, St Clara, USA) som används i rutindiagnostiken vid laboratoriet på institutionen för klinisk kemi. Analyserna utfördes under perioden februari till mars år 2001. De prover som analyserades var tagna samma dag och var maximalt åtta timmar gamla. De analyserades först på Cell-Dyn 3500, av ordinarie personal på laboratoriet vid institutionen för klinisk kemi, SLU, Ultuna. Alla prover har sedan granskats manuellt (blodutstryk). Endast de parametrar där resultatet från Cell-Dyn, vid den manuella granskningen, ansågs rimligt användes i utvärderingen. Resultaten för MCH och MCHC redovisas inte eftersom man på grund av tekniska problem med Hb-kanalen på Cell-Dyn under tiden för projektet gjorde två smärre justeringar. Detta ger inte några märkbara förändringar i resultaten av hemoglobinmätningarna men då man räknar fram MCH och MCHC utifrån Hb potentiernas skillnaderna och resultaten blir missvisande.

På QBC-V analyserades 111 prover från hund och 23 från katt. Analyserna på Vet abc kom igång något senare och på detta instrumentet analyserades 78 hundprover och 23 kattprover.

## Statistik

I den statistiska bearbetningen av resultaten har Microsoft Excel använts. Differensen mellan resultaten erhållna från QBC-V och Cell-Dyn 3500 respektive Vet abc och Cell-Dyn 3500 har för varje prov räknats fram för de olika parametrarna. Differensen presenteras även som procent av resultatet erhållet från Cell-Dyn och är då ett medelvärde av alla de framräknade differenserna för varje prov. Även instrumentens medelvärde för de olika analyserna har räknats ut liksom standardavvikelsen. Korrelation mellan instrumentens resultat har räknats fram för alla parametrar och presenteras även med distributionsplottar. Utvärdering av korrelationen för varje parameter har baserats på följande klassificering, vilken också har använts i en studie genomförd av Papasouliotis *et al* (1999), där korrelationen har bedömts som mycket bra ( $r=0,93-0,99$ ), bra ( $r=0,80-0,92$ ), tveksam ( $r=0,59-0,79$ ) eller dålig ( $r<0,59$ ).

Vid bearbetandet av resultaten från Vet abc har dessa bedömts ha acceptabla eller icke acceptabla distributionskurvor. Denna definition är till viss del subjektiv men de kriterier som har använts för att definiera acceptabla kurvor är bland annat att kurvan i princip ska nå baslinjen inom storleksintervallet för parametern, att en tydlig dal ska finnas mellan olika cellpopulationer samt att kurvan inte ska vara alltför ojämn.



## Resultat

### Erythrocyter

De röda parametrarna visade en mycket god överensstämmelse vad gäller båda instrumenten, se tabell 1 och 2. Korrelationen för QBC-V var 0,97 eller högre för de utvärderade parametrarna och även Vet abc visade korrelationer över 0,97, med undantag för parametern red cell distribution width (RDW) där korrelationen var 0,81 för hund och 0,59 för katt.

Tre prover från hund hade resultat som endast kunde användas i utvärderingen av hemoglobin. Två av dessa tre kom från en patient med immunmedierad hemolytisk anemi (tagna vid olika tillfällen) och övriga röda parametrar kunde då inte analyseras på grund av spontanagglutination. Det tredje provet kom från en hund med järnbristanemi där erythrocyt- och trombocytpopulationerna inte kunde separeras på grund av mikrocytos.

Vid analys av prover från katt kunde Vet abc inte lämna ut resultat på EPK från två katter utan larmade att proverna var tvungna att spädas för analysen. Detta gjordes dock inte utan resultaten har i stället uteslutits ur beräkningarna.

Tabell 1. Resultat vid analys av EVF och Hb (g/L) på QBC-V och Cell-Dyn 3500.

Parameter	Djurslag	n	QBC-V (medel)	Cell-Dyn (medel)	Differens från Cell-Dyn (%)	r	Korrelation
EVF	Hund	108	0,41	0,39	4,9	0,98	Mycket bra
	Katt	23	0,37	0,38	-1,7	0,99	Mycket bra
Hb	Hund	111	134,5	142,3	-5,0	0,97	Mycket bra
	Katt	23	116,6	127,7	-9,0	0,98	Mycket bra

Tabell 2. Resultat vid analys av EPK ( $\times 10^{12}/L$ ), Hb (g/L), EVF, MCV (fl) och RDW på Vet abc och Cell-Dyn 3500.

Parameter	Djurslag	n	Vet abc (medel)	Cell-Dyn (medel)	Differens från Cell-Dyn (%)	r	Korrelation
EPK	Hund	75	6,0	6,0	0,4	0,99	Mycket bra
	Katt	21	8,5	8,1	4,4	0,99	Mycket bra
Hb	Hund	78	146,1	139,8	5,2	0,99	Mycket bra
	Katt	23	138,0	127,0	9,1	0,98	Mycket bra
EVF	Hund	75	0,42	0,39	8,8	0,99	Mycket bra
	Katt	23	0,41	0,37	9,0	0,99	Mycket bra
MCV	Hund	75	69,7	64,2	8,5	0,96	Mycket bra
	Katt	23	46,1	44,1	4,7	0,97	Mycket bra
RDW	Hund	75	15,4	17,3	-8,3	0,91	Bra
	Katt	23	17,2	20,7	-16,8	0,59	Tveksam

## Leukocyter

### *Prover från hund analyserade på QBC-V*

Vid analys av totalantalet vita blodkroppar (LPK) hos hund, på QBC-V erhöles resultat utan flaggor från 91 av 111 analyserade prover. Om man i beräkningarna endast inkluderade dessa resultat var den procentuella avvikelser från Cell-Dyn 24,6% och korrelationen 0,62. Om man i stället inkluderade även de flaggade resultaten blev korrelationen 0,63. Det fanns fyra prover utan larm som markant avvek från regressionslinjen, se figur 1. Då dessa fyra hundar med regenerativ anemi togs ur beräkningarna blev överensstämmelsen bättre, 0,89, och avvikelser från Cell-Dyns resultat minskade till 8,1%.

QBC-V svarade ut resultat med flaggor på 18 av de 111 proverna (16%) och från ytterliggare två erhöles inga resultat alls, trots att proverna kördes om. Instrumentet rekommenderade också omkörning av 13 prover med osäkra värden som alla även efter ett nytt prov flaggades. Fyra prover centrifugerades ytterligare en gång, efter rekommendation från instrumentet, men inte heller då erhöles några värden utan flaggor. Se även sidan 26.

### *Prover från katt analyserade på QBC-V*

Vid samma analys av proverna från katt var differensen från Cell-Dyn 21,2% då endast resultaten utan flaggor räknades med och 24,2% då även de flaggade värdena ingick i beräkningarna. Korrelationen var 0,75 respektive 0,86. Korrelationen var alltså högre då även de flaggade resultaten räknades med, se figur 2.

Åtta resultat (23%) på LPK flaggades och tre av dessa svarades ut utan flaggor efter ny analys av provet. Man kunde också se att två prover, där QBC-V inte har larmat, skilde sig uppenbart från regressionslinjen (figur 2).

#### *Prover från hund analyserade på Vet abc*

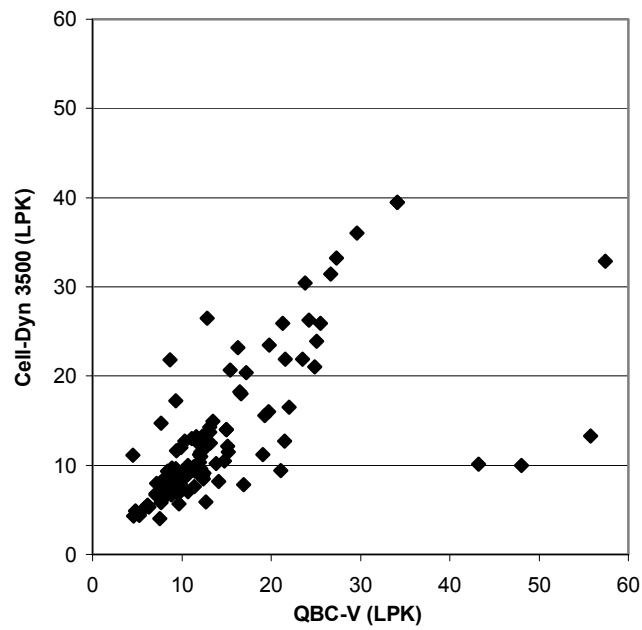
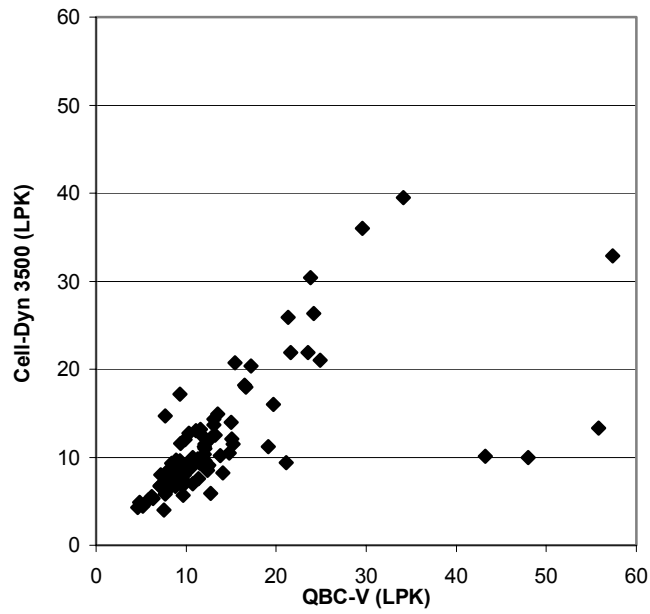
Då totalantalet leukocyter analyserades på Vet abc och jämfördes med resultaten från Cell-Dyn uppnåddes en tveksam överensstämmelse ( $r=0,78$ ) då alla erhållna resultat räknades med.

Tre prover hade distributionskurvor som för leukocyterna bedömdes som oacceptabla, utan att något larm hade givits. Då dessa tre provsvar togs ur beräkningarna ökade korrelationen till 0,95 och den procentuella avvikelsen minskade från 10% till 8,6%. Från två prover erhöles inga resultat eftersom dessa behövde spädas för analys på instrumentet. (Larmades med D för parametern.)

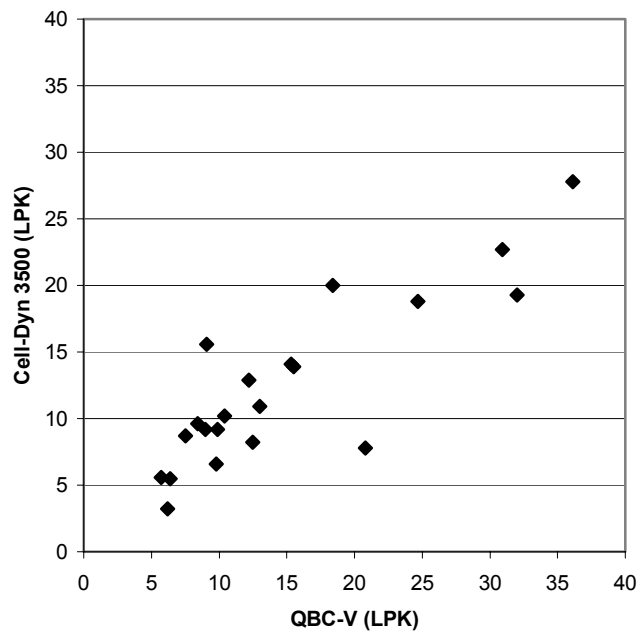
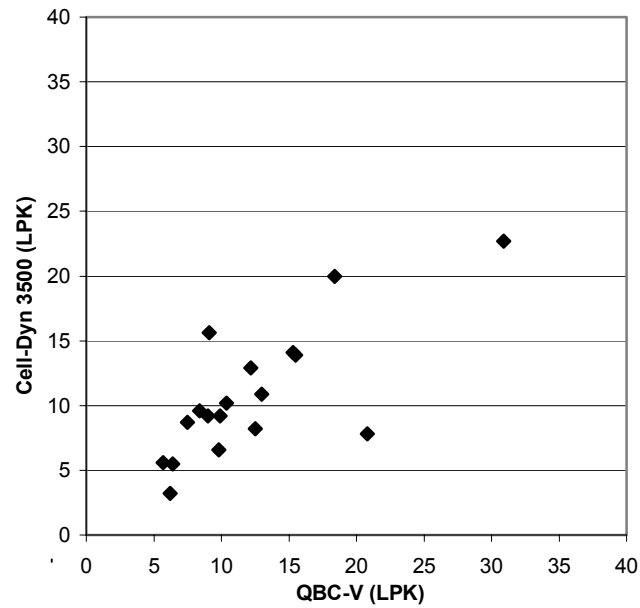
#### *Prover från katt analyserade på Vet abc*

Av de 23 blodprover från katt som analyserades på Vet abc var det ett prov där inget värde på LPK erhöles. Detta larmades då och instrumentet föreslog att man skulle späda provet och analysera det igen. Inga spädningar gjordes i detta projekt. Tolv resultat var larmade med AG 2 vilket betyder att LPK är falskt för lågt på grund av aggregerade vita blodkroppar. Dessa resultat ska man enligt tillverkaren ej använda. Eftersom larmet inte anges i anslutning till resultatet på LPK är det dock lätt att missförstå detta larm. Om man exkluderade dessa tolv prover från beräkningarna blev korrelationen i stället 0,97 men resultat erhöles då endast från tio prover (43%). När alla provsvar räknades med var den procentuella differensen från Cell-Dyn 27,6% och korrelationen var 0,87.

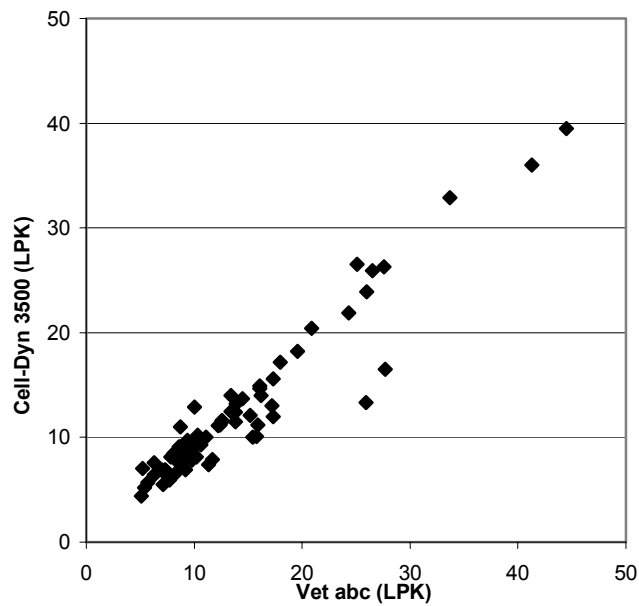
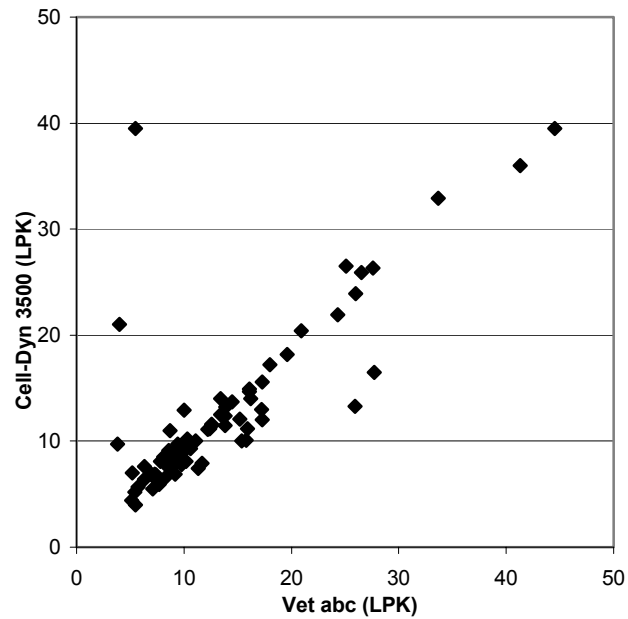
I figur 4 visas alla erhållna resultat.



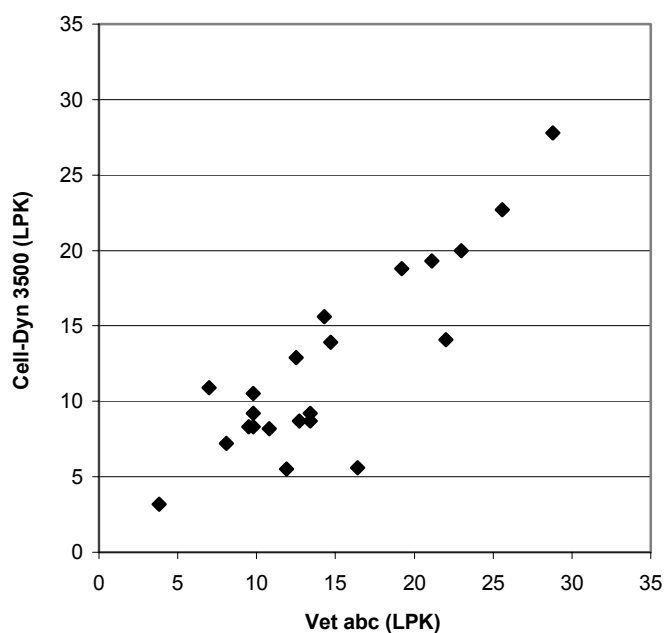
Figur 1. Jämförelse mellan resultat för totalantalet leukocyter ( $\times 10^9/L$ ) vid analys av prover från hund på QBC-V och Cell-Dyn 3500. I den övre figuren är endast resultat utan flaggor inkluderade medan den undre figuren visar alla erhållna resultat.



Figur 2. Jämförelse mellan resultat för totalantalet leukocyter ( $\times 10^9/L$ ) vid analys av prover från katt på QBC-V och Cell-Dyn 3500. I den övre figuren är endast resultat utan flaggor inkluderade medan den undre innehåller alla erhållna resultat.



Figur 3. Jämförelse mellan resultat för totalantalet leukocyter ( $\times 10^9/L$ ) vid analys av prover från hund på Vet abc och Cell-Dyn 3500. I den övre figuren är alla resultat inkluderade medan den undre figuren endast innehåller de resultat där distributionskurvorna från Vet abc vid granskning bedömdes vara acceptabla.



Figur 4. Jämförelse mellan resultaten från prover från katt analyserade på Vet abc och Cell-Dyn 3500, med avseende på totalantalet leukocyter ( $\times 10^9/L$ ). Alla erhållna resultat är inkluderade i figuren.

## Differentialräkning

### Prover från hund analyserade på QBC-V

Vid jämförelse av antalet granulocyter utvarade från QBC-V med antalet utvarade från Cell-Dyn var korrelationen mellan resultaten 0,63. Den procentuella avvikelsen var i medeltal 29,3%. Överensstämmelsen förbättrades inte även om man tog hänsyn till de resultat där QBC-V har flaggat. (Samma prover för vilka det också flaggades på LPK.)

Även vid differentialräkningen framträdde de fyra proverna från hundar med regenerativa anemier som i LPK-resultatet avvek från regressionslinjen. Om dessa fyra resultat togs ur beräkningarna blev korrelationen 0,91, och avvikelsen från Cell-Dyns resultat minskade till 11,0%.

Vid analysen av den andra stora gruppen i differentialräkningen, de mononukleära leukocyterna (lymfocyter och monocyter sammanräknade) flaggade QBC-V vid resultaten för 11 av 111 analyserade prover. Korrelationen var dålig både om de flaggade resultaten uteslöts ur beräkningarna (0,39) och om de ingick i beräkningarna (0,20).

I figur 5 ses jämförelser mellan resultat erhållna från QBC-V och Cell-Dyn för granulocyter och mononukleära leukocyter. Här har de flaggade resultaten exkluderats.

I 50 prover skilde QBC-V neutrofiler från eosinofiler. Överensstämmelsen vad gäller neutrofilerna var 0,92 och för eosinofilerna 0,66. QBC-V gav genomgående högre svar på antalet eosinofiler än vad Cell-Dyn gjorde och den procentuella avvikelser från Cell-Dyns resultat var stor, se tabell 3.

Tabell 3. Resultat vid analys av neutrofiler ( $\times 10^9/L$ ) och eosinofiler ( $\times 10^9/L$ ) på QBC-V i jämförelse med Cell-Dyn 3500.

Parameter	Djurslag	n	QBC-V (medel)	Cell-Dyn (medel)	Differens från Cell-Dyn (%)	r	Korrelation
Neutrofiler	Hund	50	9,1	10,1	-4,3	0,92	Bra
Eosinofiler	Hund	50	1,5	0,6	405,7	0,66	Tveksam

#### *Prover från katt analyserade på QBC-V*

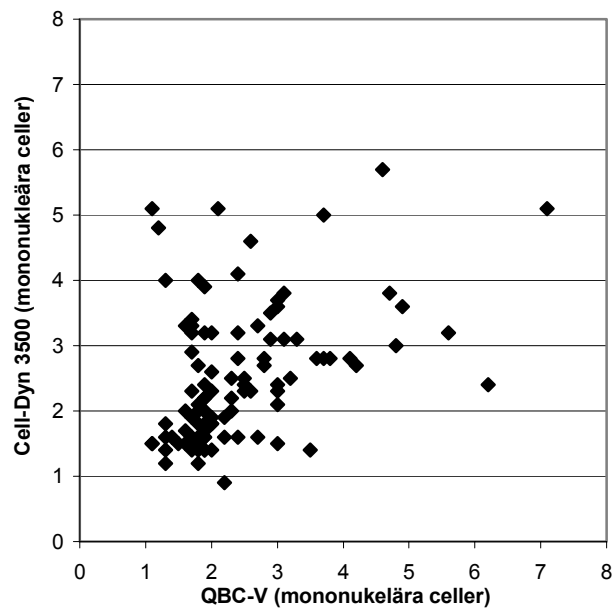
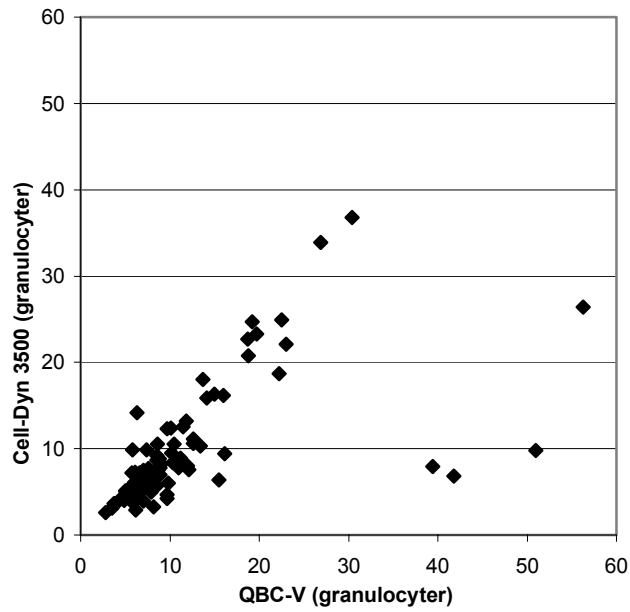
Vid differentialräkningen av leukocyterna hos katt sker endast en uppdelning i granulocyter respektive mononukleära celler.

Vid analys av granulocyterna flaggades tre resultat, detta på grund av att de olika lagren i buffy coat inte separerat ordentligt. Dessa tre prover hade granulocytos med resultat över  $20 \times 10^9/L$ . Korrelationen påverkades inte nämnvärt när dessa flaggade resultat togs ur beräkningarna,  $r=0,96$  respektive  $r=0,94$ . I figur 6 presenteras alla resultat.

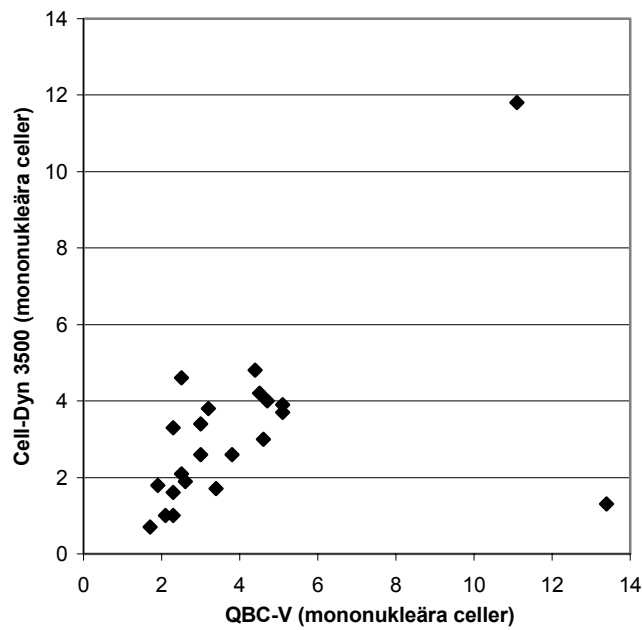
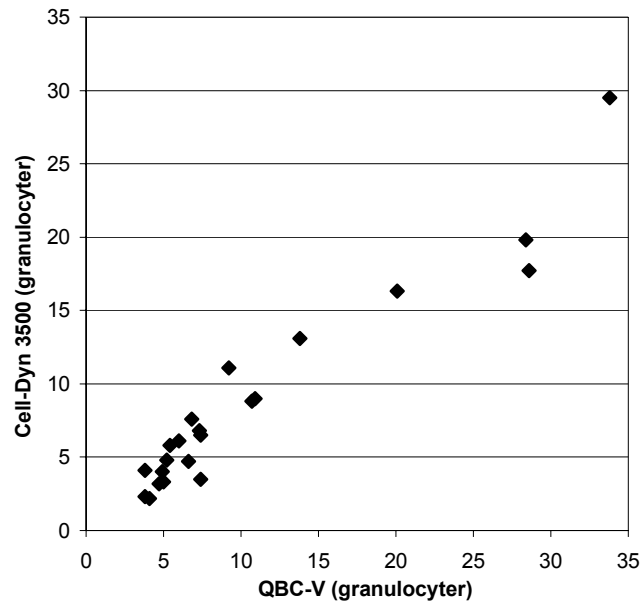
Vid analys av de mononukleära cellerna (lymfocyter och monocyter) redovisar QBC-V dessa tillsammans (liksom hos hund). Den genomsnittliga procentuella avvikelser då resultaten från QBC-V jämfördes med Cell-Dyns resultat var 73,1% och korrelationen var 0,49. Endast ett resultat flaggades på grund av dålig separation av lymfocyt- och monocytlagret från övriga lager. Detta resultat har räknats med i ovan redovisade beräkningar. När resultatet exkluderades skedde ingen förändring i överensstämmelse eller procentuell avvikelse.

Ett prov fick ett mycket högre resultat vid analys på QBC-V än på Cell-Dyn, se figur 6.





Figur 5. I den övre figuren jämförs resultaten vid analys av granulocyter ( $\times 10^9/L$ ) på QBC-V och Cell-Dyn 3500. Den nedre figuren visar resultaten av de mononukleära leukocyterna ( $\times 10^9/L$ , lymfocyter och monocyter) från QBC-V och Cell-Dyn 3500. Resultaten i båda figurerna är från prover från hund och inga resultat med flaggor är inkluderade.



Figur 6. Jämförelse mellan resultat från prover från katt analyserade på QBC-V och Cell-Dyn 3500. I den övre figuren visas resultaten från analyserna av granulocyterna ( $\times 10^9/L$ ) och i den nedre de mononukleära leukocyterna ( $\times 10^9/L$ ). Alla erhållna resultat är inkluderade i figurena.

### *Prover från hund analyserade på Vet abc*

Vid differentialräkningen på Vet abc sker en uppdelning i lymfocyter, monocyter och granulocyter. Differentialräkning erhöles från 76 av 78 prover. Andelen eosinofiler angavs som mer än 2,1% (det hos instrumentet inställda gränsvärdet) hos 45 av dessa och denna andel har sedan manuellt räknats om till absoluta tal för att kunna jämföras med resultatet från Cell-Dyn.

Ingen differentialräkning erhöles från de två prover där inget resultat på totalantalet leukocyter svarades ut. Inga larm förekom i differentialräkningarna trots att ett flertal distributionskurvor bedömdes ha ett oacceptabelt eller tveksamt utseende.

Bland lymfocyt-resultaten fanns det två som kraftigt avvek från regressionslinjen, se figur 7.

Generellt sågs en dålig överensstämmelse för differentialräkningen med korrelationer mellan 0,01 och 0,75. Men för resultatet på granulocyträkningen var korrelationen mycket god ( $r=0,98$ ) om man från beräkningarna uteslöt de resultat som bedömdes ha oacceptabla distributionskurvor. Se tabell 4 där resultaten av differentialräkningen på Vet abc och Cell-Dyn redovisas.

### *Prover från katt analyserade på Vet abc*

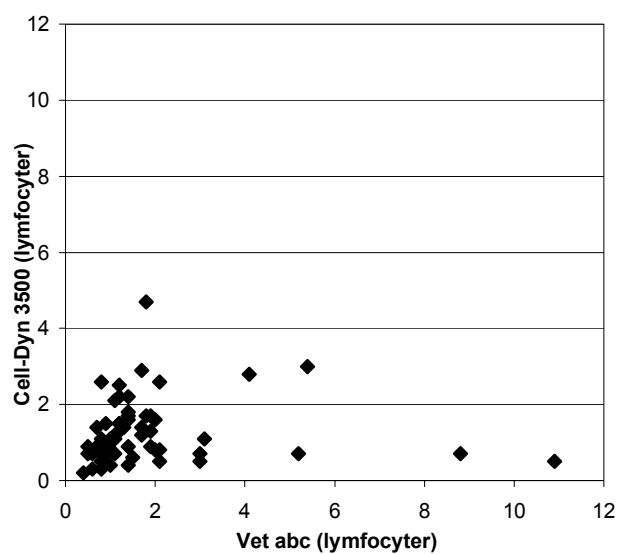
Vid differentialräkningen använder Vet abc olika larm då de vita blodkropparna har bildat aggregat för att uppmärksamma användaren på att man inte kan lita på differentialräkningen och att även totalantalet leukocyter kan vara falskt för lågt (Wedel, 2002).

23 prover från katt analyserades och instrumentet larmade att ett av dessa behövde spådas. Ingen differentialräkning erhöles från detta prov. Tre svar (13%) hade larmet AG 1 (klumpade vita blodkroppar men man ska kunna använda utvarade värden) och hela tolv prover (52%) hade larmet AG 2 (klumpade vita blodkroppar, man ska ej använda utvarade resultat). Endast sju prover (30%) svarades ut utan larm. Av 23 analyserade prover erhöles alltså, enligt tillverkaren tillförlitliga, resultat från tio stycken, vilket motsvarar 43%.

Eftersom det är troligt att användaren av instrumentet antar att larmen endast rör eosinofilerna (se bilaga 2 och diskussion) används sannolikt även de resultat som flaggats med AG 2. Därför har beräkningar av korrelation och procentuell avvikelse för även dessa resultat gjorts, se tabell 5. Överensstämmelsen var god för granulocyterna men dålig eller tveksam för övriga parametrar. Korrelationen förbättrades dock om man endast räknade med resultaten utan larmet AG 2.

Tabell 4. I tabellen redovisas resultat vid differentialräkningen av prover från hund på Vet abc i jämförelse med resultat erhållna från Cell-Dyn 3500.

<b>Parameter</b>	<b>Djurslag</b>	<b>n</b>	<b>Vet abc (medel)</b>	<b>Cell-Dyn (medel)</b>	<b>Differens från Cell-Dyn (%)</b>	<b>r</b>	<b>Korrelation</b>
<u>Lymfocyter</u>							
Alla utvarade resultat	Hund	76	1,8	1,5	99,0	0,54	Dålig
Resultat med godkända distributionskurvor	Hund	55	7,8	1,3	111,5	0,01	Ingen
Två kraftigt avvikande resultat exkluderade	Hund	53	1,5	1,3	56,7	0,27	Dålig
<u>Monocyter</u>							
Alla utvarade resultat	Hund	76	0,3	1,3	-31,1	0,04	Ingen
Resultat med godkända distributionskurvor	Hund	55	0,3	1,4	-73,4	0,35	Dålig
<u>Granulocyter</u>							
Alla utvarade resultat	Hund	76	11,1	10,0	22,9	0,75	Tveksam
Resultat med godkända distributionskurvor	Hund	55	12,2	10,2	25,2	0,98	Mycket bra
<u>Eosinofiler</u>							
Alla utvarade resultat	Hund	45	0,5	0,4	4,8	0,14	Dålig
Resultat med godkända distributionskurvor	Hund	35	0,5	0,4	20,0	0,21	Dålig



*Figur 7.* Jämförelse mellan resultaten för lymfocyter ( $\times 10^9/L$ ) i prover från hund, analyserade på Vet abc och Cell-Dyn 3500. Endast resultat med distributionskurvor som bedömdes som acceptabla på Vet abc är inkluderade.

Tabell 5. Resultat vid differentialräkning av prover från katt på Vet abc i jämförelse med resultat från Cell-Dyn 3500.

<b>Parameter</b>	<b>Djurslag</b>	<b>n</b>	<b>Vet abc (medel)</b>	<b>Cell-Dyn (medel)</b>	<b>Differens från Cell-Dyn (%)</b>	<b>r</b>	<b>Korrelation</b>
<u>Lymfocyter</u>							
Alla utsvarede resultat	Katt	22	3,5	2,4	85,5	0,72	Tveksam
Resultat utan larmet AG2	Katt	10	2,9	2,9	24,7	0,95	Mycket bra
<u>Monocyter</u>							
Alla utsvarede resultat	Katt	22	0,9	0,8	52,5	0,08	Ingen
Resultat utan larmet AG2	Katt	10	0,7	0,6	24,1	0,63	Tveksam
<u>Granulocyter</u>							
Alla utsvarede resultat	Katt	22	10,2	8,9	33,8	0,93	Mycket bra
Resultat utan larmet AG2	Katt	10	8,8	7,7	17,9	0,95	Mycket bra
<u>Eosinofiler</u>							
Alla utsvarede resultat	Katt	22	1,1	0,4	603,9	0,18	Ingen
Resultat utan larmet AG2	Katt	10	0,5	0,4	21,2	0,71	Tveksam

## Trombocyter

### *Prover från hund analyserade på QBC-V*

Om det förekommer trombocyttaggregat i provet anger QBC-V att det finns fler än ett visst antal trombocyter. Man kan också se att det finns aggregat genom att studera histogrammet där linjen som motsvarar cellernas innehåll av RNA och lipoprotein då är ojämn eller har en tydlig topp utanför området för trombocyterna. När man utslöt de resultat som angivits med ”fler än” ökade korrelationen från 0,88 till 0,91 och värdena stämde bättre överens, se figur 8.

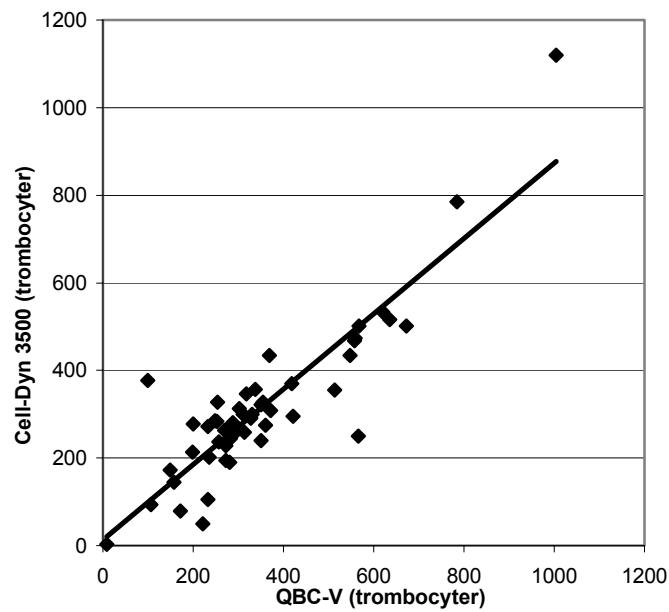
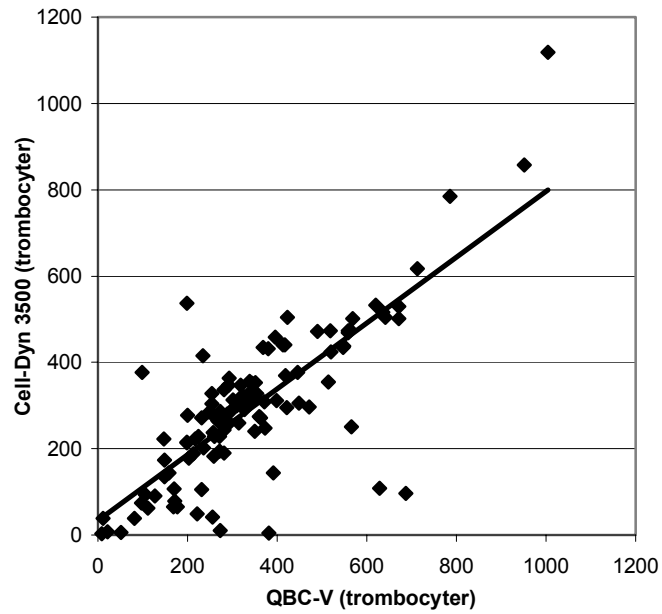
Vid analyserna av trombocyter på Cell-Dyn hade 5 av de 122 proverna en icke godkänd distributionskurva för trombocyterna, det vill säga att ingen tydlig storleksskillnad mellan trombocyter och erythrocyter kunde ses på kurvan. QBC-V svarade ut resultat på dessa men med anmärkningen ”fler än” för fyra av de fem. Dessa resultat har inte ingått i beräkningarna.

### *Prover från hund analyserade på Vet abc*

Vid analys av trombocyter på Vet abc flaggades 9 av 76 utsvarede resultat (12%) med en flagga som betyder att cellräkningarna på samma prov skiljer sig från varandra men att man ändå kan använda resultatet. Från 2 av de 78 analyserade proverna (3%) erhöles inget resultat. Endast 50 prov (66% av utsvarede resultat) bedömdes ha acceptabla distributionskurvor för trombocyterna. Av dessa var det bara tre resultat som låg utanför referensvärdena, som på Vet abc är  $150-500 \times 10^9/L$ . Övriga resultat utanför referensvärdena hade alltså icke godkända kurvor, främst på grund av mycket ojämn kurvor eller kurvor som ej gick ner till baslinjen inom intervallet för trombocyter. Av de fem prov där distributionskurvan från Cell-Dyn var oacceptabel var det ett som hade godkänd distributionskurva på Vet abc, övriga fyra bedömdes vara oacceptabla. Vet abc har inget larm som uppmärksammar användaren på eventuella trombocyttaggregat eller problem med att trombocyter och erythrocyter storleksmässigt överlappar varandra.

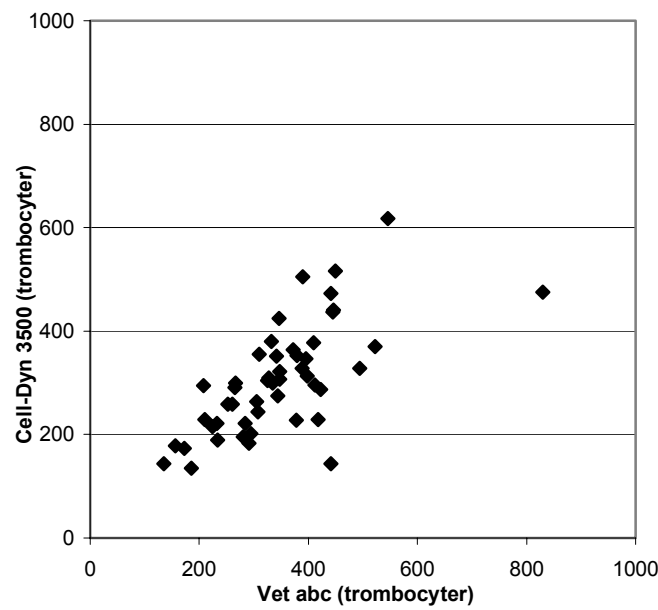
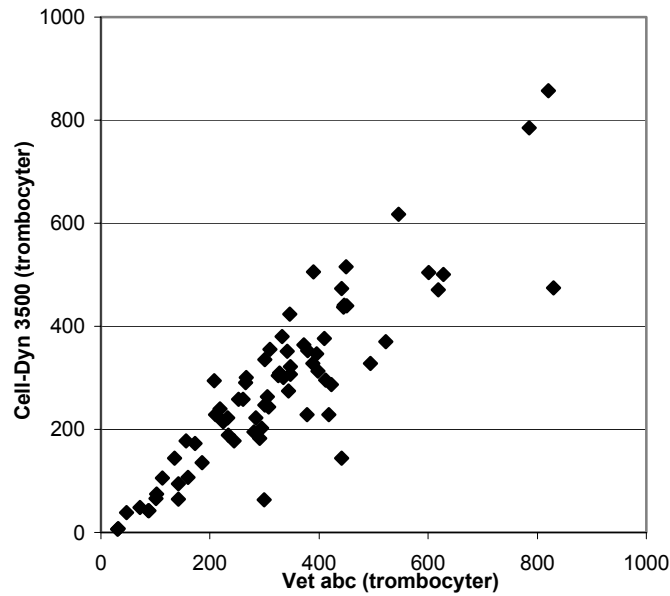
### *Analys av trombocyter från prover från katt*

Från Cell-Dyn erhöles vid analys av trombocyter endast fyra resultat med godkänd distributionskurva medan tolv resultat hade distributionskurvor som bedömdes som tveksamma. Det betyder att ingen tydlig dal, som representerar övergången mellan erythrocyter och trombocyter, kunde definieras. Eftersom endast fyra tillförlitliga resultat fanns gjordes inga beräkningar eller jämförelser mellan resultaten från de olika instrumenten. QBC-V svarade ut resultat på alla prover men 11 av 23 har aggregat som syns i histogrammen och som också markeras med ”fler än” och således troligen falskt för låga resultat. Även Vet abc svarade ut resultat på alla prover men har inte larmat på något resultat. Liksom för hund saknas hos Vet abc något larm som uppmärksammar användaren på eventuella trombocyttaggregat eller problem med överlappning mellan trombocyt- och erythrocytpopulationerna. Dock hade elva av proverna resultat under det lägre referensvärdet, vilket kan bero på trombocyttaggregat och falskt låga värden. Tre prover hade resultat under  $50 \times 10^9/L$ .



Figur 8. I den övre figuren visas resultaten från analys av trombocyter ( $\times 10^9/L$ ) på QBC-V och Cell-Dyn 3500 från prover från hund. Här har alla erhållna resultat från QBC-V använts, även de som anges som ”fler än”. Korrelationen blir då 0,88. I den nedre figuren har dessa exkluderats och korrelationen blir då i stället 0,91.





Figur 9. Resultat på trombocyter ( $\times 10^9/L$ ) i prover från hund, analyserade på Vet abc och Cell-Dyn 3500. I den övre figuren är alla erhållna resultat inkluderade, korrelationen är då 0,88. I den nedre figuren visas endast de med, på Vet abc, distributionskurvor som bedömts som godkända. Här är korrelationen i stället 0,72.

## Flaggor och larm

### QBC-V

QBC-V flaggar mer frekvent än Vet abc och använder då framför allt tecknet #. Detta betyder, enligt manualen, att man måste vara extra uppmärksam och studera histogrammet för att bedöma om resultatet ska användas eller förkastas. I anslutning till denna flagga anges oftast en tänkbar förklaring till problemet (så kallade ”buffy coat meddelande”). Alla prover med flaggor analyserades ytterligare en gång, vilket resulterade i att 25% av proverna från hund (28 av 111) kördes om och 30% (7 av 23) från katt. Åtta respektive tre av dessa svarades då ut utan flaggor. I tabell 6 visas en sammanställning av antalet flaggade resultat och de buffy coat meddelanden som angavs.

Av de 28 resultaten med flaggor (hund) var det fyra som hade godkända histogram, övriga bedömdes vid granskning av dessa ha ett oacceptabelt utseende. Åtta prover svarades ut utan några flaggor vid ny analys (29% av de extra analyserna). Övriga 20 prover erhöll i stort sett samma resultat och samma flaggor vid den andra analysen.

Vid analys av ett prov från katt flaggade QBC-V vid en analys för att celler på toppen av flottören störde hemoglobinanalysen. Detta larm sågs inte på något annat provsvar, varken för hund eller katt. Ungefär hälften av de prover från katt som vid första analysen hade flaggor svarades ut utan några flaggor efter ny analys (tre av sju). Övriga fyra hade vid ny analys i princip oförändrade värden och histogram.

Tabell 6. En sammanställning av antalet flaggade resultat på QBC-V och de ”buffy coat-meddelanden” som erhöles. I tabellen ses också resultatet av omkörningarna.

Buffy coat meddelande	Prover från hund		Prover från katt	
	Antal	Resultat vid ny analys (flaggor / utan)	Antal	Resultat vid ny analys (flaggor / utan)
Anger ej orsak till osäkra värden	3	2 / 1	2	0 / 2
Otydliga buffy coat lager	6	4 / 2	1	0 / 1
Erytrocyterna har ej separerat från granulocyterna	8	7 / 1	2	2 / 0
Lymfo-/monocyter har ej separerat från övriga celler	8	7 / 1	1	1 / 0
Trombocyt-aggregat på flottörens topp	3	0 / 3	1	1 / 0
<b>Totalt</b>	<b>28</b>	<b>20 / 8</b>	<b>7</b>	<b>4 / 3</b>

### *Vet abc*

Vet abc använder ett flertal olika flaggor och larm, se bilaga 2. Man kan förenklat dela upp dessa i tre typer, antingen erhålls inget svar eftersom provet måste spädas eller så kan resultatet antingen användas trots larm eller inte användas.

Vid analys av 78 prover från hund behövde fyra prover spädas (två gånger för LPK och två gånger för trombocyter). Cell-Dyn har på dessa parametrar fått mycket höga resultat. Fem prover hade på LPK resultat med flaggor som betyder att man trots dessa kan använda provsvaren. Dessa provsvar användes i både beräkningar och plottar. Prov med denna flagga analyserades ytterligare en gång och flaggan försvann då från två av provsvaren. Ett sådant larm förekom också på åtta trombocytanalyser och vid nio svar på mean platelet volyme (MPV) och alla fanns kvar vid ny analys. Larm som betyder att man inte ska använda resultaten erhöles på två resultat, båda på totalantalet leukocyter (LPK). Vid ny analys svarades det ena resultatet ut med flagga som betyder att man kan lita på värdet. Resultatet förändrades endast marginellt. Vid ny analys av det andra provet erhöles ett svar utan flagga men med en distributionskurva som bedömdes som oacceptabel. Resultatet vid den nya analysen var mycket lägre än vid den första och också mycket lägre än Cell-Dyns resultat. Många prover bedömdes ha oacceptabla distributionskurvor även om de saknade flaggor och detta indikerar att instrumentet inte alltid flaggar, även om något problem föreligger vid analysen.

Alla prover med flaggor analyserades ytterligare en gång, även om detta enligt manualen ej skulle eller behövdes göras. Det resulterade i att 20 prover från hund (26%) analyserades två gånger. Enligt manualen skulle endast två stycken (3%) analyseras ytterligare en gång medan fyra prover (5%) skulle spädas. Tre av 23 prover (13%) från katt larmades och skulle enligt manualen spädas innan ny analys. Två av larmen gällde erytrocyterna (EPK) och Cell-Dyn fick på dessa prover resultat precis över referensvärdena. Det tredje larmet var för LPK och där hade Cell-Dyn fått ett kraftigt förhöjt resultat. Dessa prover analyserades ytterligare en gång, utan att spädas, med samma resultat. Larm som anger att leukocyterna har aggregerat erhöles på 15 av de 23 analyserade proverna från katt (65%). Tre av dessa (13%) hade den typen av larm som betyder att man ska kunna använda resultatet, medan hela tolv prover (52%) hade värden som man inte kunde lita på. Endast sju prover svarades alltså ut utan larm.

### **Praktiskt analysarbete**

Varje gång QBC-V startas upp ska man kontrollköra avläsningsenheten, vilket görs genom att i den placera den medföljande teststickan och proceduren tar en till två minuter. Instrumentet kräver en viss manuell förberedelse av provet innan analys. Hantering och analys av ett prov tar i genomsnitt nio minuter och av denna tid utgör centrifugeringen fem minuter. Om man samtidigt kör flera prov och därmed endast centrifugerar en gång kan tiden per prov minska till ungefär fem minuter om fem prov körs. För analys behövs 111 µl helblod.

För att minimera det antal prov QBC-V har svårighet att analysera och därmed undvika att behöva köra om proverna bör man sträva efter att färga in varje prov

något längre än de 30 sekunder som rekommenderas från tillverkaren. Vid endast 30 sekunders infärgning tycks antalet buffy coat-meddelanden som rör otillräcklig infärgning öka. En nackdel med QBC-V är att man inte, utan att koppla in Kruuses instrument för kemiska analyser, kan få patientnummer eller annan information utskrivna på provsvaret då instrumentet saknar tangentterminal. Något man också måste ta i beaktande är att centrifugen är mycket högljudd och att det är svårt att arbeta i närheten av den då den är igång.

Tillhörande manual är på engelska och är mycket tydlig och lätt att förstå. Den beskriver till största delen behandlingen av proverna och tolkning av resultatet och saknar nästan helt tekniska data och ingående beskrivning hur apparaten arbetar och fungerar.

Vet abc är ett helt automatiskt instrument och ingen förberedelse av provet, förutom blandning av blodet, krävs inför analys. Vid analys används 12 µl helblod och analys av ett prov tar mellan två och tre minuter. Tiden är då räknad från att provet sätts in i apparaten tills resultatet är utskrivet.

En uppstartningsprocedur, som tar ungefär sex minuter, görs varje gång instrumentet startas och försäkrar att det inte finns några partiklar i systemet som kan påverka resultatet. Därefter ska kontrollprover analyseras för att verifiera att instrumentet ger rättvisande resultat, innan prov körs. Dessa kontrollprover utgörs av vätskor som beställs av tillverkaren och det är viktigt att dessa är färska eftersom de har en begränsad hållbarhet. Varje vecka skall man öppna instrumentet och leta efter läckage samt torka av de olika kamrarna. En gång i månaden skall man köra igenom Vet abc med en tvättvätska och en gång årligen skall instrumentet ha service (ABC Vet User Manual). Både display och utskrift är tydliga och lättlästa. På utskriften erhålles datum och tid för analysen, provets nummer (anges av användaren), det valda djurslaget, analysresultat med tillhörande larm om det finns några, histogrammen och sekvensnumret. Sekvensnumret nollställs varje gång instrumentet slås på och kan inte påverkas av användaren.

## **Diskussion**

### **QBC-V**

Vid jämförelse mellan resultat erhållna från QBC-V och från Cell-Dyn var överensstämmelsen för de röda parametrarna mycket god, både för prover från hund och från katt. Man har även i andra, liknande studier sett mycket goda korrelationer för dessa parametrar (Brown & Barsanti, 1988; Wegmann, Hofmann-Lehmann & Lutz, 1997). Instrumentet uppvisade dock uppenbara problem vid analys av vissa prover från patienter med regenerativ anemi. I prov med kraftigt regenerativ anemi och stor förekomst av retikulocyter och kärnförande erythrocyter har QBC-V tolkat dessa celler som granulocyter, vilket får till följd att totalantalet leukocyter blir falskt för högt. Detta kan ske eftersom retikulocyterna är större och har lägre densitet än vanliga erythrocyter och de har också ribosomer för hemoglobinsyntes kvar i cytoplasman. Därmed får linjen som i histogrammet illustrerar RNA en högre nivå för retikulocyter än för normala

erythrocyter. Särskilt tydligt var detta hos en patient med regenerativ anemi med en hematokrit på 0,10 och med 25% retikulyter. QBC-V angav att antalet leukocyter var  $48 \times 10^9/L$  medan resultatet från Cell-Dyn endast var  $9,3 \times 10^9/L$ . Ett sådant provsvar från QBC-V ger då en bild av en kraftig anemi och dessutom en kraftig inflammation med leukocytos och granulocytos. Inga flaggor förekom men vid kontroll av histogrammet såg man att inga tydliga skillnader på kurvorna fanns där instrumentet dragit gränsen mellan erythrocyter och granulocyter.

Från en patient med järnbristanemi kunde endast Hb-värdet lämnas ut från Cell-Dyn, eftersom erythrocyt- och trombocytpopulationerna inte kunde separeras på grund av mikrocytos. QBC-V svarade ut resultat på alla parametrar utan flaggor men hade ett histogram som indikerade att resultaten inte var pålitliga. Histogrammets utseende beror på att anemin även var regenerativ och att retikulyter och kärnförande erythrocyter har tolkats som granulocyter.

Ett annat problem uppstod vid analys av två blodprov tagna vid olika tillfällen från en hund med immunmedierad hemolytisk anemi. Från Cell-Dyn lämnades svar ut endast för Hb, eftersom spontanagglutination resulterade i felaktiga svar för övriga erythrocytparametrar. Autoagglutination kan ge upphov till felaktiga analysresultat men kan oftast detekteras vid kontroll av distributionskurvorna (Tvedten & Weiss, 1999b). QBC-V svarade däremot ut resultat utan några flaggor på Hb, EVF och MCHC. I histogrammet var dock de flesta cellerna klassificerade som leukocyter och ingen tydlig gräns sågs mellan granulocyter och erythrocyter. Inga svar erhöles på övriga parametrar vilket tillsammans med histogrammets utseende indikerar att man manuellt måste bedöma ett blodutstryk.

I detta projekt kunde inte parametern MCHC utvärderas på grund av att man justerade Hb-inställningarna på Cell-Dyn. I andra, liknande studier, har man dock fått dålig korrelation för MCHC vid analys av både hund- och kattprover då resultaten har jämförts mellan QBC-V och olika referensmetoder (Wegmann, Hofmann-Lehmann & Lutz, 1997; Papasouliotis *et al*, 1999).

Vid jämförelse mellan resultaten för totalantalet leukocyter (LPK) kan överensstämmelsen mellan QBC-V och Cell-Dyn anses vara tveksam för både hund och katt ( $r=0,62$  respektive  $r=0,75$ ). Dessutom hade en relativt stor del, 18% av proverna från hund och 35% av proverna från katt, resultat med flaggor. Samma flaggor fanns till stor del kvar även vid upprepad analys av dessa prover, se sidan 26. Det fanns fyra prover från hund vars resultat för LPK skilde sig kraftigt mellan QBC-V och Cell-Dyn och som i plotten i figur 1 tydligt avviker från de övriga resultaten. Dessa fyra prover hade alla förhöjd andel retikulyter och ett hade även kärnförande röda blodkroppar och dessa celler har i stället räknats som granulocyter. Även vid analys av prover från katt fanns det två resultat som klart skilde sig från de övriga, se figur 2. Det är inte känt vad orsaken till dessa avvikande resultat är men i det ena provet fanns mycket debri som kan ha placerat sig bland de mononukleära cellerna vid centrifugeringen inför analysen på QBC-V. Det andra provet hade ett histogram som gör att man misstänker att gränsen mellan trombocyter och mononukleära celler samt mellan mononukleära celler och granulocyter kan vara fel placerad. I så fall är antalet leukocyter falskt för högt och så också andelen granulocyter, medan andelen mononukleära celler är falskt för låg.

Vid analys av granulocyter från hund var överensstämmelsen god mellan resultat från QBC-V och Cell-Dyn, om man utslöt de fyra prover med regenerativ anemi som har diskuterats ovan. QBC-V delade hos knappt hälften av proverna upp granulocyterna i neutrofiler och eosinofiler och hade då för neutrofilerna en god korrelation medan den för eosinofilerna var mer tveksam. QBC-V lämnade konsekvent ut högre resultat på eosinofilerna än vad Cell-Dyn gjorde. Man har även i en annan studie sett att QBC-V får högre resultat, än bland annat Cell-Dyn, vid analys av eosinofiler hos hund. En jämförelse gjordes mellan QBC-V, Cell-Dyn 3500 och ytterligare ett instrument, Technicion H-1. QBC-V hade vid analys av 48 prover från hund ett medelvärde på  $1,95 \times 10^9/L$  medan det på Cell-Dyn var  $0,90 \times 10^9/L$  och på Technicion  $1,01 \times 10^9/L$  (Lilliehöök, 2001b).

Överensstämmelsen för granulocyter från prover från katt var mycket god ( $r=0,94$ ) och liknande resultat har setts i en studie utförd av Wegmann *et al* (1997). Däremot uppvisades en sämre korrelation ( $r=0,78$ ) av Papasouliotis *et al* (1999).

Korrelationen mellan resultaten för de mononukleära leukocyterna, var vid analys av prover från hund på QBC-V och Cell-Dyn dålig. Då de flaggade resultaten utslöts ur beräkningarna var den endast 0,39. Denna korrelation är något lägre än i liknande studier beskrivna (Wegmann, Hofmann-Lehmann & Lutz, 1997; Papasouliotis *et al*, 1999). Korrelationen för samma parameter hos katt var i denna studie 0,49 vilket är något bättre än vad som har redovisats av Papasouliotis *et al* (1999). Wegmann *et al* (1997) fick en något bättre överensstämmelse för parametern.

Vid analys av prover från två hundar med immunmedierad hemolytisk anemi fick Cell-Dyn resultat på totalantalet leukocyter på över  $100 \times 10^9/L$ . QBC-V gav inte något svar på dessa prover vilket beror på att resultaten var högre än instruments mätområde (Owner's Manual). När inget resultat på LPK anges erhålls heller ingen differentialräkning.

Trombocyter har en stor förmåga att bilda aggregat och detta är ett stort problem vid trombocyträkningen. I en studie gjord av Koplitz *et al* (2001) bildades trombocytklumpar i 54% av blodproverna från hund även då man var mycket noga med provtagningsförfarandet. Vid analys av blodprover från hund på QBC-V fanns aggregat hos en stor del av proverna, 49%, och enligt tillverkaren betyder detta att resultatet av analysen blir falskt för lågt. Koplitz *et al* hävdar dock att resultatet från QBC-V kan bli både falskt för högt och för lågt (Koplitz, Scott & Cohn, 2001). I jämförelsen mellan QBC-V och Cell-Dyn hade QBC-V, trots att instrumentet anger ”fler än”, generellt högre värden på trombocyterna än vad Cell-Dyn hade. Man ska dock tänka på att QBC-V har högre referensvärden för trombocyter ( $175-500$  för hund) än motsvarande på Cell-Dyn ( $150-450$  för hund).

En stor fördel med QBC-V är att den vid trombocytaggregat anger ett resultat med tillägget ”fler än”. Detta gör att man med resultatet tillsammans med histogrammet lätt kan skaffa sig en uppfattning om det ungefärliga trombocytantalet. Detta är relevant vid kliniskt arbete där man sällan behöver veta det exakta antalet trombocyter utan just är intresserad av om det är normalt, högt

eller lågt. Man ska dock ha i åtanke att QBC-V egentligen mäter volymen av trombocyterna och sedan räknar ut antalet baserat på en antagen storlek för trombocyter. Detta gör att man vid förekomst av stora trombocyter kan få ett falskt för högt antal.

Hos katt är falskt för låga trombocytantal mycket vanligt och den främsta anledningen till detta är aggregerade trombocyter (Twedten, 1993). Det är därför svårt att analysera trombocyter i hematologiska instrument. Detta sågs också då blodprover från katt analyserades på Cell-Dyn där endast 4 av 23 resultat (17%) bedömdes ha acceptabla distributionskurvor. Med en referensmetod som inte är optimal för analys av denna parameter var det naturligtvis svårt att utvärdera de övriga två instrumenten i studien. QBC-V lämnade resultat på alla prover från katt och angav resultatet som ”fler än” på nästan hälften av proverna.

QBC-V flaggade ofta vid de resultat som instrumentet lämnade ut. Flaggor förekom för 25% av proverna från hund och för 30% från katt. De provsvar som svarades ut med flaggor hade till stor del även histogram som borde uppmärksamma användaren på att resultaten inte var tillförlitliga. Av 28 prover (från hund) med flaggor var det fyra som hade histogram med kurvor som gjorde att man kunde överväga att tro på resultaten. Övriga kunde inte godkännas. I manualen anges att man själv ska avgöra om flaggade värden ska användas eller om provet måste köras om, men om man är ovan att tolka histogrammen kan detta vara mycket svårt att avgöra. Det kan också vara svårt att på förhand säga om resultaten kan komma att svaras ut utan flaggor vid ny analys, och en stor del av alla prover med flaggade svar kommer därför troligtvis att analyseras ytterligare en gång. Detta är mycket tidskrävande då man återigen måste genomföra hela analysförfarandet med bland annat infärgning och centrifugering. Efter ny analys förekom fortfarande flaggor på 20 av provsvaren, vilket betyder att man vid ny analys erhöll svar utan flaggor från 29% av de omkörda proverna. Vid ny analys av sju prover från katt, med flaggor, försvann dessa för tre av proverna. Det finns inget som tyder på att instrumentet skulle flagga oftare för någon viss typ av hematologiska problem än för någon annan. I vår studie kom en tredjedel av proverna med flaggade resultat från hundar med anemi men så utgjorde också andelen patienter med anemi 28% av alla analyserade prover.

## **Vet abc**

Även för Vet abc var överensstämmelsen för resultaten på de röda parametrarna mycket god, med undantag för red cell distribution width (RDW). Mycket goda korrelationer för dessa parametrar har även visats i liknande studier (Perkins *et al*, 1999; van Leeuwen & Teske, 1999; Schwendenwein & Jölly, 2001). Vet abc hade dock svårigheter att korrekt analysera prover från patienter med mikrocytära anemier där de små erytrocyterna gav en överlappning mellan erytrocyt- och trombocytpopulationerna. På trombocyternas distributionskurva sågs ingen tydlig gräns mellan trombocyter och erytrocyter vilket beror på en otillräcklig storleksskillnad mellan cellpopulationerna. Detta gör att trombocytantalet blev falskt för högt medan antalet erytrocyter i stället blev falskt för lågt.

Vid analys av de två proverna från en hund med immunmedierad hemolytisk anemi och autoagglutination lämnade Vet abc ut resultat på alla röda parametrar

men inte på de vita. Inga larm förekom men distributionskurvorna för erytrocyterna och för trombocyterna bedömdes ha ett oacceptabelt utseende. Kurvan för erytrocyterna var mycket ojämn och för trombocyterna hade den en lång, jämn svans som sträckte sig in i intervallet för erytrocyter. Ingen kurva för leukocyterna erhöles.

I denna studie har inte MCH eller MCHC utvärderats men då resultat på dessa parametrar har jämförts mellan Vet abc och referensmetoder har man i liknande studier sett bra eller mycket bra korrelation för MCV och MCH men tveksam eller dålig korrelation för MCHC (van Leeuwen & Teske, 1999; Schwendenwein & Jölly, 2001).

Överensstämmelsen mellan resultat från Vet abc och Cell-Dyn var för totalantal leukocyter från hundprover ganska god ( $r=0,78$ ). Korrelationen ökade till 0,95 när man från beräkningarna uteslöt tre resultat som hade distributionskurvor som bedömdes som oacceptabla. Detta visar på att resultaten blir mer tillförlitliga om man noga kontrollerar kurvorna innan man avgör om man ska använda de utsvarade resultaten. Instrumentet kunde inte analysera LPK från två prover där antalet leukocyter översteg testgränserna och lämnade därmed inget resultat på någon av de vita parametrarna. Dessutom larmades två resultat för LPK med en flagga som betyder att resultatet inte kan användas. Ett av proverna som flaggades fick efter ny analys ett resultat utan flaggor men distributionskurvan för leukocyterna kunde inte godkännas. Av 23 prover från katt hade tolv resultat (52%) flaggan AG 2 som anger att det finns cellklumpar i provet och att LPK kan vara falskt för lågt. Detta gör att en stor del av provsvaren inte kan användas, vilket givetvis minskar användbarheten av Vet abc för analys av kattprover. Ett prov hade ett totalantal leukocyter som var högre än instrumentets testgränser och inget resultat erhöles. Överensstämmelsen för de tio provsvar som inte flaggades var dock mycket god,  $r=0,97$ .

Överensstämmelsen mellan resultaten från differentialräkningen på Vet abc och Cell-Dyn var vid analys av prover från hund överlag dålig och ingen korrelation fanns för varken monocyter eller lymfocyter. Den enda parametern med god korrelation, och som man därmed kan använda, är granulocyter och detta endast om man först kontrollerar resultatet med hjälp av distributionskurvan. Denna slutsats kan dras eftersom överensstämmelsen förbättrades så markant då de resultat där kurvorna bedömdes som oacceptabla (28%) uteslöts ur beräkningarna. Även vid analys av prover från katt var korrelationen god för granulocyterna och det fanns också en bra överensstämmelse mellan resultaten på lymfocyterna hos de tio prover utan larmet AG 2. Det är dock tveksamt om differentialräkningen är användbar för klinisk diagnostik eftersom mer än hälften av resultaten larmas med AG 2 och därmed inte ska användas. Man måste dessutom noga granska distributionskurvorna innan resultaten accepteras.

Liknande resultat har, både för prover från hund och katt, publicerats av Schwendenwein *et al* (2001). Författarna anser att resultaten från differentialräkningen på Vet abc är oanvändbara.

Vid analys av totalantal leukocyter och antalet lymfocyter fanns det två prover från hundar med regenerativ anemi vars resultat tydligt avvek från övriga. Vet abc



fick mycket högre resultat på både LPK och antalet och andelen lymfocyter vilket troligtvis berodde på att instrumentet tolkade retikulocyter som lymfocyter. Detta problem kan bero på att retikulocyterna inte påverkas på samma sätt som vanliga erythrocyter av den lyseringsvätska som Vet abc använder vid differentialräkningen. Erythrocyter ska lyseras totalt och därmed inte finnas kvar i provet vid differentialräkningen. Om detta inte lyckas är det möjligt att instrumentet uppfattar de icke lyserade retikulocyterna som cellkärnor från lymfocyter eftersom lyseringsvätskan påverkar lymfocyterna så att cellmembranet krymper ihop kring kärnan. Ett sådant provsvar kan då tolkas som en anemi och en kraftig lymfocytstimulering, alternativt lymfocytär leukemi, när de vita blodkropparna egentligen ligger inom normalvärdena.

Det är ovanligt att katter har förhöjt antal eosinofiler (Tvedten & Weiss, 1999b) och det var ingen av de 23 katterna i denna studie som vid analys på Cell-Dyn hade eosinofili ( $>1,5 \times 10^9/L$ ). Vet abc gav däremot resultat med förhöjt antal eosinofiler för fem av katterna men alla dessa resultat larmades med flaggan AG 2. På kurvan ses eosinofilerna som en kvarstående svans i leukocythistogrammet och kurvan går ej ner till baslinjen. Det är här man kan tänka sig att eventuella cellklumpar bildade av ihopklumpade leukocyter skulle placera sig, på grund av sin stora storlek. Därför är det rimligt att tro att det som Vet abc räknar som eosinofiler egentligen är cellklumpar, vilket den också varnar för med AG-flaggorna. Resultat flaggade med AG 2 ska ej användas och därmed blir parametern olämplig att använda vid analys av prover från katt på instrumentet. Andelen eosinofiler hos hund angavs för 45 av de 78 analyserade proverna. För dessa resultat var överensstämmelsen dålig ( $r=0,14$ ) och den förbättrades endast lite då resultat med kurvor, som bedömdes vara oacceptabla, togs bort ur beräkningarna ( $r=0,21$ ). I en studie genomförd av Guelfi *et al* jämfördes distributionskurvas utseende med andelen eosinofiler från en manuell differentialräkning på 468 hundar. De flesta resultat i den studien hade god överensstämmelse mellan manuell eosinofilträkning och kurvans utseende. Detta betyder att prov som hade kurvor med en höjning i den högra delen, som motsvarar större celler, också hade en ökad andel eosinofiler (Guelfi & Espie, 2002). Schwenwein *et al* (2001) har däremot visat på en dålig överensstämmelse för parametern. Påpekas bör att Cell-Dyn ibland inte kan identifiera alla eosinofiler i prover från hund eller katt, men detta är av mindre betydelse då resultatet alltid kontrolleras av kunnig laboratoriepersonal.

Då Vet abc analyserar monocyter räknas alla celler inom ett fast storleksintervall som monocyter. Ingen hänsyn tas till variationer i cellstorlek vilket gör mätmetoden mycket oflexibel. Ofta kan ingen gräns alls ses mellan lymfocyter och monocyter respektive monocyter och granulocyter, se bilaga 2. Ingen korrelation fanns heller vid jämförelse mellan resultaten vid analys på Vet abc och på Cell-Dyn. Detta medför att monocyträkningen på Vet abc är oanvändbar, instrumentet hade troligen gett mer kliniskt relevanta resultat om antalet monocyter och lymfocyter tillsammans angavs som mononukleära leukocyter.

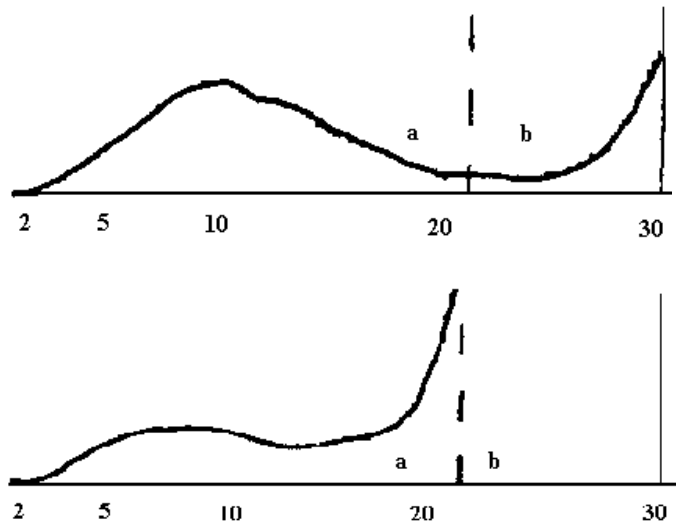
Vid trombocyträknningen på Vet abc hade de allra flesta proverna från hund med resultat utanför referensvärdena oacceptabla eller tveksamma distributionskurvor. Detta berodde troligen på svårigheter att skilja mellan erythrocyter och trombocyter vid tillfällena då dessa hade liknande storlek. Man får vid trombocytopeni ofta större trombocyter än normalt (Weiss, 2000) vilket påverkar distributionskurvans utseende då trombocyterna kommer in i erythrocyternas storleksintervall. Orsaken till att prover med höga trombocytantal hade avvikande kurvor kan vara en mikrocytär anemi med så pass små erythrocyter att de då gav en överlappning mellan cellpopulationerna. Detta sågs framför allt på en hund med järnbristanemi och mikrocytära erythrocyter.

Eftersom resultaten för prover med godkända kurvor låg inom ett snävare intervall blev också korrelationen sämre då resultat med icke godkända kurvor exkluderades ur beräkningarna. Vet abc har inget larm som uppmärksammar användaren på trombocyttaggregat eller problem då trombocyter och erythrocyter storleksmässigt överlappar varandra och detta är en klar nackdel. Överlappningar i storlek ger relativt tydliga förändringar i distributionskurvorna och kan således upptäckas genom att studera dessa, medan det är svårare att uppmärksamma trombocyttaggregat.

Enligt Koplitz *et al* blir resultat från ett impedansinstrument falskt för låga om aggregat finns. Detta på grund av att instrumentet kan misstolka klumparna för att vara större celler, till exempel leukocyter (Koplitz, Scott, & Cohn, 2001).

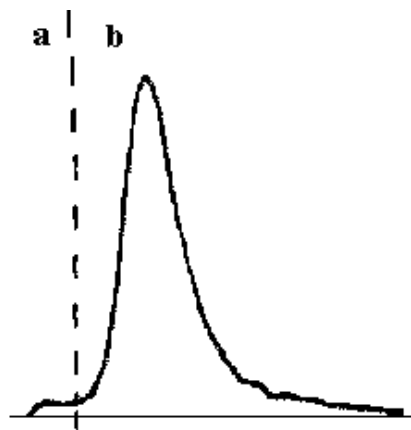
Instrumentet lämnade resultat för trombocyterna på alla prover från katt. Då QBC-V angav resultatet som ”fler än” på grund av trombocyttaggregat på nästan hälften av proverna medan Vet abc inte hade ett enda larm framstår Vet abc som mindre tillförlitlig när det gäller analys av trombocyter. De distributionskurvor för trombocyter som erhöles från Vet abc skiljer på trombocyter och erythrocyter genom att dela upp dem i två helt skilda populationer, baserat på cellernas storlek. I en del fall går kurvan ner till noll innan den återigen stiger. Detta skulle betyda att trombocyter och erythrocyter har så pass stor storleksskillnad att de hamnar i två helt skilda grupper. Detta stämmer ej överrens med verkligheten där en överlappning ofta ses mellan de båda cellpopulationerna eftersom storleksskillnaden mellan cellerna hos katter är så pass liten (Papasouliotis *et al*, 1999; van Leeuwen & Teske, 1999).

Enligt manualen räknas celler med en storlek mellan  $2 \mu\text{m}^3$  och ”en varierande hög gräns” som trombocyter. Den varierande gränsen beror på det antal små erythrocyter som finns, eftersom de små erythrocyterna då kommer att finnas i gränssonen mellan erythrocyter och trombocyter (ABC Vet User Manual). För alla prov analyserade i detta projekt tycktes den höga gränsen vara ungefär  $22 \mu\text{m}^3$ . Troligt är att instrumentet har räknat en del erythrocyter som trombocyter eftersom även erythrocyter kan vara av den storleken. Detta kunde också misstänkas när man studerade distributionskurvorna för trombocyterna där gränsen mellan trombocyter och erythrocyter ofta var placerad inom det intervall där erythrocyterna kan antas finnas. Se figur 10 och 11. Det är alltså på Vet abc svårt att med hjälp av distributionskurvan utvärdera om resultaten är rimliga eftersom gränsen mellan erythrocyter och trombocyter tycks dras på samma ställe, oavsett kurvans utseende. Man kan inte heller använda kurvan till att upptäcka trombocyttaggregat.



Modifierad efter van Leeuwen & Teske, 1999

Figur 10. Distributionskurvor över trombocyterna, erhållna från Vet abc vid analys av prover från katt. I den övre figuren ses en tydlig dal mellan trombocyter (a) och erythrocyter (b) och man kan anta att gränsen mellan de båda cellpopulationerna är korrekt. I den undre figuren ses däremot en överlappning mellan populationerna och små erythrocyter har räknats som trombocyter. Detta utseende på kurvan, som indikerar att trombocyträkningen är felaktig, förekom hos ungefär hälften av provsvaren för katt i denna studie.



Figur 11. En distributionskurva över trombocyter (a) och erythrocyter (b) från ett prov från katt analyserat på Cell-Dyn 3500. Här illustreras övergången mellan cellpopulationerna vilken ofta är något flytande på grund av att endast en mycket liten storleksskillnad finns mellan kattens erythrocyter och trombocyter.

De flaggor och larm som ett instrument använder syftar till att uppmärksamma användaren på att ett resultat bör kontrolleras eller att provet måste behandlas på ett annat sätt, till exempel spädas. Detta är tänkt att vara en hjälp vid utvärdering av analys svar men fungerar dåligt på Vet abc. Instrumentet använder ett flertal olika flaggor (se bilaga 2) men det är svårt att utläsa i manualen vad dessa betyder, vilket försvårar tolkningen av resultat med flaggor. Dessutom förekommer inte flaggor särskilt frekvent, även om man tydligt kan se på distributionskurvorna att det är tveksamt om resultatet är riktigt. Vissa flaggor, till exempel AG 1 och AG 2, återfinns inte alls i den upplaga av manualen som följde med instrumentet, vilket givetvis är oacceptabelt.

AG-flaggorna anges dessutom i anslutning till att andelen eosinofiler utsvaras och har i detta projekt också endast förekommit på provsvar där resultatet för andelen eosinofiler är över den på instrumentet inställda gränsen för att svara ut eosinofiler. Detta leder till att man kan missförstå larmen och anta att de endast gäller eosinofilerna och inte alla vita parametrar.

Anmärkningsvärt är att tre prover från hund som hade helt förkastliga distributionskurvor för leukocyterna och som också hade resultat som var kraftigt avvikande från Cell-Dyn, inte hade några larm eller flaggor. Dessa tre prover analyserades direkt efter varandra och de felaktiga resultaten beror troligtvis på ett analysfel, till exempel cellrester i den kapillära genom vilken cellerna vid analys passerar.

## **Begränsningar hos hematologiska instrument**

Båda de utvärderade instrumenten har brister som gör att man måste ha möjlighet att kontrollera avvikande resultat och distributionskurvor och detta görs bäst genom att man studerar ett blodutstryk. Förutom kontroll av resultat är det också viktigt att man från till exempel patienter med anemi manuellt studerar cellernas morfologi för att få mer information om vilken typ av anemi som föreligger och om regeneration sker. Analys av MCV och MCHC ger ett mått på erytrocyternas genomsnittliga storlek och hemoglobinnehåll men är inte tillförlitligt vid till exempel järnbristanemi då patienten har en blandning av små och stora erytrocyter. De större erytrocyterna kan då maskera de mikrocytära cellerna och MCV kan till och med vara förhöjt trots föreliggande mikrocytos (Tvedten 1993). En cellräknare ger alltså inte tillräcklig information om cellernas storlek, form och variationer i färgning, vilket annars ger värdefull information om sjukdomsförloppet. Inte heller intracellulära parasiter, såsom *Ehrlichia canis* eller *Hemobartonella felis*, kan detekteras. Detta gör att en cellräknare aldrig kan ersätta en morfologisk bedömning av erytrocyterna.

Automatiska cellräknare lämnar inte någon information om neutrofilernas mognadsgrad och ej heller om de är toxiskt påverkade. Detta måste bedömas manuellt. I denna studie upptäcktes stavkärniga neutrofiler i 25 av 111 prover från hund (23%) och 4 av 24 från katt (17%). En förhöjd andel stavkärniga neutrofiler tyder på ett ökat behov av neutrofiler, till exempel vid en infektion. Det är alltid av värde att veta andelen omogna neutrofiler eftersom graden av vänsterförskjutning antyder infektionens svårighetsgrad. Det kan också finnas en stor andel stavkärniga neutrofiler även om totalantalet är normalt eller till och

med lågt. Detta beror på att benmärgen är oförmögen att tillgodose behovet av mogna neutrofiler vilket är ett prognostiskt ogynnsamt tecken (Lilliehöök, 2001a). Vid tillstånd med toxinemi kan förändringar, ofta orsakade av bakterietoxiner, uppträda i neutrofilerna. Vetskapen om att toxiskt förändrade neutrofiler finns kan indikera att en bakteriell infektion pågår och är därför av klinisk betydelse. I denna studie fanns inga toxiskt påverkade neutrofiler i proverna från hund men däremot i tre av proverna från katt (13%).

## Slutsatser

Båda instrumenten är enkla att använda och ger relativt snabbt svar på önskade analyser. QBC-V kräver något mer arbete av användaren vilket gör att analysförfarandet också tar längre tid på detta instrument. En stor fördel är dock att inga spolnings- eller spädningsvätskor används vilket förenklar underhållet av QBC-V. Vet abc har i stället fördelen att det är ett helt automatiskt instrument som kräver lite förarbete av användaren. Detta är tidsbesparande i anslutning till analyserna men i gengäld krävs mer arbete vad gäller kontrollkörningar och byte av diverse vätskor.

Av analysresultaten finns dock mer att önska. En slutsats man kan dra av denna utvärdering är att man kan använda resultaten på de flesta röda parametrarna, från båda instrumenten, i sitt kliniska arbete.

Totalantalet leukocyter förefaller vara en relativt tillförlitlig parameter på både QBC-V och Vet abc. Det är dock på QBC-V viktigt att man tar hänsyn till flaggorna, som förekommer relativt frekvent. Vid analys på Vet abc ökar givetvis tillförlitligheten om man noga kontrollerar distributionskurvorna. Analys av prover från katt flaggas ofta med AG 2 (52%) och man ska då inte använda resultatet på LPK vilket gör att antalet resultat minskar markant.

Vad gäller differentialräkningen så är tillförlitligheten mer tveksam. Rimligt verkar att på QBC-V endast lita på antalet granulocyter och neutrofiler och detta först efter att man har studerat histogrammet och kontrollerat resultatens rimlighet. Vid analys på Vet abc är det dock tveksamt om man ska använda sig av differentialräkningen över huvud taget men antalet granulocyter bör kunna användas om man noggrant kontrollerar distributionskurvan.

Trombocyträkningen på QBC-V kan mycket väl användas för att få en fingervisning om antalet är normalt eller om det ligger under eller över det normala. För att få ett mer exakt mått krävs dock alltid en manuell trombocyträkning. Det är mycket enkelt att i histogrammet se om det finns trombocytaggregat och därför är parametern användbar även för prover från katt där detta är viktigt att veta för korrekt utvärdering av provsvaret. Vid analys av trombocyter på Vet abc kan resultatet på prover från hund, efter kontroll av kurvan, användas framför allt för att se om antalet ligger inom de normala gränserna. Då resultatet ligger utanför referensvärdena uppvisar distributionskurvan ofta ett tveksamt utseende vilket gör att det är svårt att avgöra om resultatet är tillförlitligt eller ej. Trombocytantalet bör troligen inte användas vid analys av prover från katt eftersom larm för trombocytaggregat och

överlappning mellan erythrocyter och trombocyter saknas och dessutom är distributionskurvorna svårbedömda.

Både QBC-V och Vet abc har stora problem att korrekt analysera vissa prover från patienter med regenerativa eller mikrocytära anemier. QBC-V tolkar ibland retikulocyter och kärnförande erythrocyter som granulocyter medan Vet abc inte klarar att på ett riktigt sätt skilja mikrocytära erythrocyter från trombocyter. Det förefaller också som om Vet abc ibland uppfattar retikulocyter och kärnförande erythrocyter som lymfocyter. Detta gör att varken totalantalet leukocyter eller differentialräkningen är helt tillförlitlig i vissa fall där EVF och EPK är lågt.

De flaggor och larm som används av instrumenten ska fungera som en hjälp till användaren och det är givetvis viktigt att de ger relevant information och används vid rätt tillfälle. Då QBC-V flaggar är problemet ofta även synligt i histogrammet och instrumentet verkar inte flagga i "onödan". Däremot är det en stor andel av resultaten som svaras ut med flaggor och om dessa analyseras ytterligare en gång fås ofta samma flaggor som vid den första analysen. Att en stor del av resultaten (25% från hund och 30% från katt) inte kan användas är givetvis en stor nackdel. Vet abc flaggar däremot mycket sparsamt. Att detta skulle bero på att inga problem har förelegat vid analysen verkar i många fall otänkbart eftersom man ofta på distributionskurvorna upptäcker att resultatet kan vara felaktigt. De flaggor som förekommer utgör heller knappast någon hjälp till användaren. Det är viktigt att tänka på att flaggor, histogram och distributionskurvor måste tolkas av någon som van vid detta och som är väl insatt i metodiken (Lumsden, 2000).

Slutligen bör man alltid vid analys av hematologiska prover ha möjlighet att manuellt granska dessa och hålla i minnet att inga instrument kan ersätta en manuell bedömning. Detta eftersom instrumenten inte kan ge upplysningar om erythrocytmorfologi, leukocyternas mognadsgrad eller toxisk påverkan. Inte heller intra- eller extracellulära parasiter kan detekteras av dessa instrument.

## Summary

Two haematological instruments intended for small animal clinic use were evaluated at the Department of Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden. The QBC-V and Vet abc were compared to a reference instrument, the Cell-Dyn 3500. Fresh blood samples were obtained from canine and feline patients from the University Veterinary Hospital, SLU. The QBC-V was used for 111 canine samples and 78 canine blood samples were analysed with Vet abc. From cats, 23 samples were analysed with both instruments.

For most of the erythrocyte parameters, correlation was excellent for both instruments ( $r=0.97-0.99$ ). However, some samples from animals with regenerative anaemia had inconsistent results for both the erythrocyte and leukocyte parameters.

The QBC-V had only a fair correlation ( $r=0.62$ ) for total canine leukocyte count and granulocyte count (0.63). When neutrophils and eosinophils were separated, correlation was good for the neutrophils (0.92) but only fair for the eosinophils (0.66). Canine mononuclear cell counts (lymphocytes plus monocytes) had poor correlation (0.39). For feline samples, the QBC-V had fair correlation (0.75) for the total leukocyte count, good correlation for the granulocytes (0.94) but poor for the mononuclear cells (0.49).

The Vet abc had fair correlation (0.78) for total canine leukocyte counts, no to poor correlation (0.01-0.54) for the differential leukocyte count, except for fair correlation (0.78) for the granulocyte count. Only ten results had no flags for potential errors in samples from the twenty-three cats but there was excellent correlation (0.97) for the leukocyte count and fair to excellent for the parameters in the differential count (0.63-0.95) for the samples without flags.

Both instruments had good correlation for canine thrombocyte counts. The Vet abc seemed less accurate because it lacked a flag warning for thrombocyte clumps or problems with differentiation of large thrombocytes from small erythrocytes. Feline thrombocyte counts were not possible to evaluate because of their tendency to form clumps.

In conclusion, both instruments determined most erythrocyte parameters well and reasonably well for the total leukocyte count. Both instruments had problems with the differential count in many patient samples. Granulocyte counts may be accepted after careful evaluation of histograms and flags. Both instruments are easy to operate but it is important that the operator is experienced with the instrument and correctly can evaluate the flags, given results, and histograms. In addition, manual review of patient's blood smears is recommended for diagnostic information not provided by haematology instruments, such as erythrocyte morphology, leukocyte morphology and the presence of platelet clumping.

## Tack till...

Jag vill tacka Kruise och Scandivet som har lånat ut instrumenten och som även har bekostat material och analyser till denna studie. Jag vill också rikta ett varmt tack till Inger Lilliehöök, som med stort engagemang och entusiasm har varit handledare för mitt examensarbete och som har kommit med ovärderliga råd och synpunkter såväl under projektets gång som under det skriftliga arbetet. Tack också till personalen vid institutionen för klinisk kemi för merarbetet med de prover som användes i studien.

## Referenser

*ABC Vet User Manual*, ABX Hematologie. Manual till Vet abc.

Brown, S.A. & Barsanti, J.A. 1988. Quantitative buffy coat analysis for hematologic measurement of canine, feline, and equine blood samples and for detection of microfilaremia in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 3, 321-324.

Fornander, Erik. 2000. Kruise, Stockholm, Sverige. *Personligt meddelande*.

Guelfi, JF. & Espie, C. 2002. Semi-quantitative evaluation of blood eosinophils with the Vet abc analyser in the dog. In: *Congress proceedings*, 12th ECVIM-CA/ESVIM Congress, Munich, Germany, 2002.

HESKA™. 2001. *Vet ABC-Diff Hematology Analyser*, Heska Corporation. [www.heska.com/heskateam/learn\\_more/lm\\_abc.asp](http://www.heska.com/heskateam/learn_more/lm_abc.asp).

Holst, H. & Edqvist, L-E. 1991. Kvantifiering av buffy coat; ett veterinärmedicinskt diagnostiskt hjälpmedel. *Svensk Veterinärtidning* 6, 269-273.

Knoll, J.S. 2000. Clinical automated hematology systems. In: *Schalm's veterinary haematology*. 5 ed. Editors: Feldman, B.V., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp 3-11.

Kopplitz, S.L., Scott, M.A. & Cohn, L.A. 2001. Effects of platelet clumping on platelet concentrations measured by use of impedance or buffy coat analysis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 11, 1552-1556.

Lilliehöök, I. 2001a. Hematologi. In: *Kompendium i klinisk kemi 2001*. Institutionen för klinisk kemi, SLU. Uppsala, Sverige. A1-A31.

Lilliehöök, I. 2001b. Institutionen för klinisk kemi, SLU, Uppsala, Sverige. *Personligt meddelande*.

Lilliehöök, I. & Larsson, B. 1998. Utvärdering av Cell-Dyn 3500, Hematologiinstrument anpassat till prover från djur. *Svensk Veterinärtidning* 14, 643-648.

Lumsden, J.H. 2000. Quality control. In: *Schalm's veterinary haematology*. 5 ed. Editors: Feldman, B.V., Zinkl, J.G., Jain, N.C. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp 16-19.

*Owner's Manual*, IDEXX Laboratories. Manual till QBC-V.



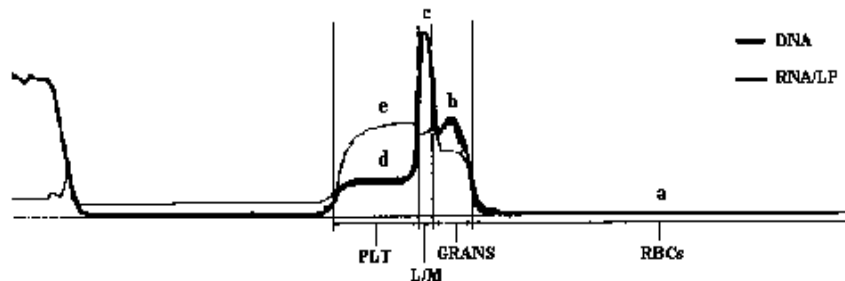
- Papasouliotis, K., Cue, S., Graham, M., Sparkes, A.H. & Gruffydd-Jones, T. 1999. Analysis of feline, canine and equine hemograms using the QBC VetAutoread. *Veterinary Clinical Pathology* 3, 109-115.
- Perkins, P., Reagan, W., Marweg, L. & Weiser, G. 1999. Evaluation of the Vet abc-diff haematology analyser for performing hemograms on dog and cat blood. *Veterinary Pathology* 5, 484.
- Schwendenwein, I. & Jölly, M. 2001. Automated differentials by an impedance on site haematology system. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> ESVCP Meeting*, Edinburgh, Scotland, 2001.
- Tvedten, H. 1993. Advanced hematology analysers interpretation of results. *Veterinary Clinical Pathology* 3, 72-80.
- Tvedten, H. 1999. General laboratory concepts. In: *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 3 ed. Editors: Willard, M.D., Tvedten, H. & Turnwald, G.H. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp 1-10.
- Tvedten, H. & Weiss, D. 1999a. Erythrocyte disorders. In: *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 3 ed. Editors: Willard, M.D., Tvedten, H. & Turnwald, G.H. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp 31-51.
- Tvedten, H. & Weiss, D. 1999b. The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques. In: *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 3 ed. Editors: Willard, M.D., Tvedten, H. & Turnwald, G.H. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp 11-30.
- Van Leeuwen, M.W. & Teske, E. 1999. De hematologische analyser Vet abc: evaluatie voor gebruik bij hond en kat. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 10, 306-309.
- Wedel, Holger, 2002. Scil animal care company, Viernheim, Tyskland. *Personligt meddelande*.
- Wegmann, D., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. 1997. Kurzevaluation des QBC-Vet Autoread-system. *Tierärztliche Praxis* 25, 185-191.
- Weiss, D.J. 2000. Platelet production defects. In: Feldman, B.V., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. *Schalm's veterinary haematology*. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp 469.

## Bilaga 1

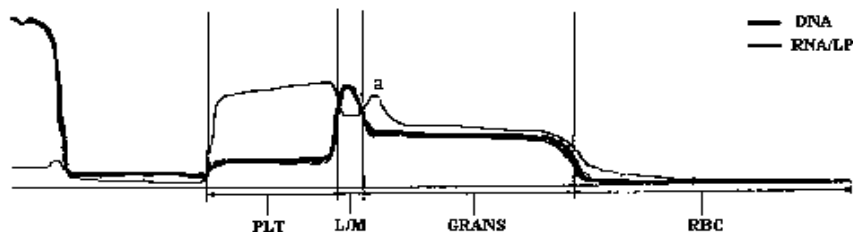
### Tolkning av de histogram som erhålls från QBC-V

Histogrammet utgörs av två grafer där den tjockare linjen illustrerar mängden DNA och den tunnare mängden RNA/lipoprotein. Graferna visar intensiteten av fluorescensen i buffy coat och markerar övergången mellan de olika lagren.

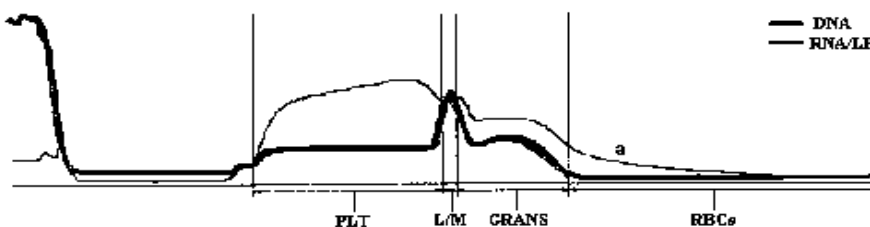
- Erythrocyter har varken DNA eller RNA.
- Retikulocyter ansamlas i toppen av erythrocytlagret, tar upp färg och får en något högre kurva för RNA/LP än erythrocyterna.
- Granulocyter har mycket DNA men även glukosamin i sina granula.
- Eosinofiler har granula som binder färg och ger fluorescens. De får då en högre RNA/LP-linje än neutrofilerna.
- Lymfocyter och monocyter har mycket DNA i sin stora kärna.
- Trombocyter innehåller både DNA och RNA/LP men oftast mest DNA.



Figur 1. Histogram från en frisk hund. a: erythrocyter, b: granulocyter, c: mononukleära celler (lymfocyter och monocyter), d, e: trombocyter.



Figur 2. Histogram från en hund med leukocytos och eosinofili (a).

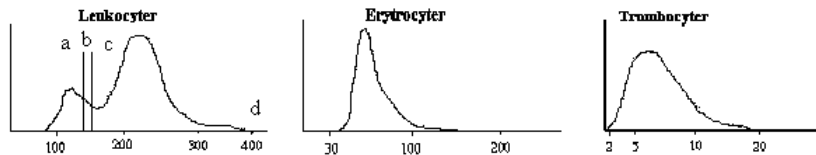


Figur 3. Histogram från en hund med retikulocytos (a).

## Bilaga 2

### Distributionskurvor och larm från Vet abc

Nedan ses exempel på de distributionskurvor som erhålls från Vet abc.



Figur 12. Distributionskurvor över leukocyter, erythrocyter och trombocyter, från Vet abc. I den vänstra figuren ses uppdelningen mellan lymfocyter (a), monocyter (b) och granulocyter (c). Eventuella eosinofiler skulle finnas längst till höger i intervallet för granulocyterna (d). Dessa kurvor kommer från en hund med värden inom referensvärdena och kurvorna bedöms vara utan anmärkning.

### Larm som under studien förekom på Vet abc

- \* Kan anges efter LPK, EPK, EVF eller trombocyter och betyder att provet har analyserats 3 gånger men att alla analyser visat på olika resultat, vilka också var utanför systemets precisionsgränser. Resultatet bör verifieras med ett nytt prov.
- \$ Indikerar att 2 av 3 cellräkningar var inom följande gränser:
  - 7% för LPK
  - 5% för EPK
  - 15% för trombocyterOm en av de två första cellräkningarna är under:
  - 3000 för LPK blir gränsen 9%
  - 16000 för EPK blir gränsen 8%
  - 400 för trombocyter blir gränsen 20%Detta betyder att instrumentet larmar om cellräkningarna skiljer sig för mycket från varandra, om 1 av 3 ligger utanför det bestämda intervallet. Man tolererar dock större inomkörningsvariation och det finns få celler. Enligt manualen kan man lämna ut resultatet vid denna typ av larm.
- D Inget resultat lämnas ut då det förmodade resultatet ligger utanför intervallet där linearitet finns, det vill säga instrumentets testgränser. Man bör manuellt späda och köra om provet.
- AG1 Anges efter differentialräkningen och betyder att mellan 1,5 och 2,5% av de vita blodkropparna har bildat aggregat. Resultatet skall enligt instrumentets tillverkare kunna användas men man ska tänka på att antalet leukocyter kan vara falskt för lågt och antalet trombocyter falskt för högt. Vad som orsakar de falskt höga respektive låga värdena uppges inte.
- AG2 Mer än 2,5% av leukocyterna har aggregerat, resultatet ska inte användas. I denna studie förekom AG 1 och AG 2 endast vid analys av prover från katt. Det är oklart om dessa larm även kan förekomma för andra djurslag.