



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

ProCyte Dx – risk för allvarliga fel vid differentialräkning av hundleukocyter

ProCyte Dx – risk of severely erroneous canine differential leukocyte counts

Eric Bergstrand

*Uppsala
2019*

ProCyte Dx – risk för allvarliga fel vid differentialräkning av hundleukocyter

ProCyte Dx – risk of severely erroneous canine differential leukocyte counts

Eric Bergstrand

Handledare: Inger Lilliehöök, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Harold Tvedten, klinisk kemiska laboratoriet, UDS

Examinator: Emma Strage, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: hematologiinstrument, automatiserad, neutrofil, lymfocyt, monocyt, vänsterförskjutning, cytoqram

Key words: hematology analyzer, automated, neutrophil, lymphocyte, monocyte, left shift, dot plot

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Differentialräkning av leukocyter är en viktig del i den medicinska utredningen av sjuka hundar. Det finns både manuella och automatiserade metoder för differentialräkning av hundleukocyter. ProCyte Dx (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) är ett relativt nytt automatiserat hematologiinstrument. I en nyligen publicerad studie upptäcktes det att instrumentet genererade oacceptabelt felaktiga resultat vid differentialräkning av leukocyter i 13 % av blodproverna från sjuka katter.

Målet med denna studie var att undersöka förekomst och allvarlighetsgrad av felaktiga resultat vid differentialräkning av leukocyter i prover från sjuka hundar. Ytterligare ett mål med studien var att undersöka hur användare av instrumentet kan upptäcka och avvisa dessa resultat innan de överförs till djurens kliniska journaler och påverkar den veterinära bedömningen. Blodprover från 86 hundar analyserades med ProCyte Dx och två referensmetoder för differentialräkning av leukocyter. Resultaten jämfördes och antalet oacceptabelt felaktiga resultat från ProCyte Dx kvantifierades enligt förbestämda gränser och kriterier.

Studien visade en generellt god överensstämmelse mellan ProCyte Dx och de båda referensmetoderna vid differentialräkning av leukocyter, men att instrumentet genererade oacceptabla fel i elva av totalt 86 prover. Samtliga av dessa avvikande analysresultat kunde påvisas genom inspektion av instrumentets cytogram. Instrumentets inbyggda larm om otillräcklig separation av leukocyter aktiverades i åtta av de elva fallen med felaktiga resultat.

Resultaten var oftast tillförlitliga vid differentialräkning av hundleukocyter med ProCyte Dx, men vid tillstånd med vänsterförskjutning och toxiska neutrofiler riskerar instrumentet att underskatta mängden neutrofiler och överskatta mängden lymfocyter/monocyter vilket kan upptäckas genom att konsekvent studera både cytogram och inbyggda larm.

SUMMARY

The differential leukocyte count is an important tool in the clinical investigations of canine patients. There are both manual and automated methods for canine differential leukocyte counts. One of the more recently developed hematology analyzers is ProCyte Dx (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). In one study, ProCyte Dx reported results from differential leukocyte counts with unacceptable errors in 13 % of the feline patients.

The purpose of this study was to investigate the frequency and severity of unacceptable errors in canine differential leukocyte counts with ProCyte Dx and how users can detect these errors. Blood samples were collected from 86 dogs and the results from the canine differential leukocyte counts with ProCyte Dx and two reference methods were compared to quantify the number of unacceptable errors.

Canine differential leukocyte counts with ProCyte Dx agreed well with the reference methods in the majority of the samples. However, eleven of 86 samples had unacceptable errors with ProCyte Dx and all of these errors could be detected by inspection of the dot plot. The instrument alarm "WBC Abnormal distribution" indicating insufficient separation of the leukocytes was activated in eight of the eleven samples with unacceptable errors.

Results from canine automated differential leukocyte counts with ProCyte Dx were reliable for most canine samples, but in cases with changes such as left shifts or toxic neutrophils, ProCyte Dx might report falsely low neutrophil counts and falsely high lymphocyte/monocyte counts. By the inspection of dot plots and instrument alarms, these results could be rejected.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Hematologi	2
Leukocyter	2
Neutrofiler	2
Lymfocyter	4
Monocyter	5
Eosinofiler	5
Basofiler	6
Differentialräkning av leukocyter	7
Manuell differentialräkning	7
Automatiserad differentialräkning	8
<i>Differentialräkning av leukocyter med ProCyte Dx</i>	8
<i>Differentialräkning av leukocyter med Advia 2120</i>	11
MATERIAL OCH METOD	14
Provmaterial	14
Provflöde	14
Exlusionskriterier	14
Hematologiinstrument	15
Manuell differentialräkning	15
Jämförelse	16
RESULTAT	17
Överensstämmelse och antal oacceptabelt felaktiga resultat	17
Cytogram	21
Larm, vänsterförskjutning och toxiska förändringar	22
DISKUSSION	23
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	27
REFERENSER	30

INLEDNING

Blodprovsanalys är en grundläggande del av det diagnostiska arbetet vid utredning av sjuka hundar och katter. En av de mest basala analyserna är hematologi där klinikern kan få viktig information om bland annat blodbrist, inflammation eller förekomst av leukemi hos sin patient. Vid en hematologisk analys undersöks bland annat vita blodkroppar (leukocyter). Genom en differentialräkning erhålles information om fördelningen av de olika typerna av leukocyter i blodet (Barger, 2003). Förr gjordes denna differentialräkning enbart manuellt genom att de olika celltyperna studerades i mikroskop. I takt med teknikens utveckling samt ökade krav på snabbhet och precision i det dagliga kliniska arbetet har flera automatiserade metoder utvecklats. Vissa kliniker och laboratorium använder därför idag den manuella differentialräkningen mest som ett komplement (Stirn *et al.*, 2014).

Det finns idag flera olika tekniker för automatiserad differentialräkning. Ett utav de nyare instrumenten för analys av djurblood är ProCyte Dx (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). Detta instrument räknar celler utifrån laserbaserad flödescytometri där cellerna färgas in med fluorescensmärkt reagens och utsätts för laserstrålning för att respektive cells komplexitet och fluorescens ska kunna bestämmas (IDEXX Laboratories, 2014). I två olika studier har man visat att ProCyte Dx utför en acceptabel differentialräkning av leukocyter vid analys av hund- och kattblod vid jämförelse med andra automatiserade hematologiinstrument (Fujino *et al.*, 2013; Goldmann *et al.*, 2014). Det har dock uppmärksammats att ProCyte Dx tycks ha svårt att särskilja neutrofiler från lymfocyter vid inflammatoriska förändringar som exempelvis vänsterförskjutning eftersom de omogna neutrofilernas ökade RNA-innehåll gör dem mer lika lymfocyter. Detta har givit upphov till felaktiga värden som direkt överförts till djurens kliniska journaler. I en studie där EDTA-blod från katt analyserades med ProCyte Dx såg man att 13 % av alla prover hade oacceptabelt felaktiga resultat när det kom till differentialräkning av leukocyter. Vissa, men inte alla, av dessa felaktiga resultat presenterades med aktiverade inbyggda larm där instrumentet talade om för användaren att den automatiserade differentialräkningen inte varit fullt tillförlitlig (Tvedten *et al.*, 2017). Det är därför mycket viktigt att användare av ProCyte Dx är medvetna om riskerna för felaktiga resultat och allvarlighetsgraden av dessa. Denna studie syftar till att utreda hur ofta och hur allvarligt ProCyte Dx räknar hundleukocyter felaktigt vid jämförelse med två olika referensmetoder - manuell differentialräkning och automatiserad differentialräkning med Advia 2120 (Siemens Medical Solution Diagnostics, Eschborn, Tyskland). Studien handlar också om att ta reda på hur man som användare kan upptäcka och avvisa felaktiga resultat. Hypotesen inför denna studie är att ProCyte Dx ger upphov till oacceptabelt felaktiga resultat även vid differentialräkning av hundleukocyter och att dessa felaktiga resultat bör kunna upptäckas genom att bedöma instrumentets larm och cytoqram.

LITTERATURÖVERSIKT

Hematologi

Ett viktigt verktyg för den praktiserande smådjursveterinären är analys av blodprover. En av de mest basala analyserna är hematologin. Vid en hematologisk undersökning erhålles information om erythrocyter, leukocyter och trombocyter. Användningsområdet är brett då hematologi kan användas som monitorering av sjuka patienter, som bedömning av allvarlighetsgrad vid en sjukdom eller för att tidigt generera differentialdiagnoser vid utredningar (Barger, 2003). Många gånger efterfrågas en hematologisk undersökning för att se de sekundära effekterna på ovan nämnda celler vid andra primära sjukdomar, t. ex leukocyternas svar vid en infektion. I vissa fall är det dock dessa celler som är primära i sjukdomen, t. ex vid lymfatisk leukemi (Prasse & Duncan, 1976).

Leukocyter

Leukocyter, eller vita blodkroppar, utgör en del av kroppens immunförsvar och är således livsviktiga för att en individ ska kunna bekämpa exempelvis infektioner eller cancerceller (Zinkl, 1981). Vissa typer av leukocyter kan dock vara inblandade i negativa processer så som överkänslighetsreaktioner (Shmuel & Cortes, 2013). En grupp av leukocyter kallas granulocyter tack vare sin granula i cytoplasma. Dessa celler är neutrofiler, eosinofiler och basofiler. Övriga leukocyter som undersöks vid hematologiska analyser är lymfocyter och monocyter (Zinkl, 1981). Vid en hematologisk undersökning bestäms det totala antalet vita blodkroppar i blodet. En ökning eller minskning av totalantalet vita blodkroppar benämns som leukocytos respektive leukopeni. Därefter undersöks proportionen av respektive typ av leukocyt och därmed erhålles även totala antalet av respektive leukocyt i blodet. Det morfologiska utseendet hos de olika leukocyterna bedöms också vid en hematologisk undersökning (Barger, 2003).

Neutrofiler

Neutrofila granulocyter ingår i det medfödda immunförsvaret och är således kroppens första försvar mot mikroorganismer (Hostetter, 2012). Det är den klart dominerande leukocyten i blodet hos en frisk hund och har således störst påverkan på det totala antalet leukocyter i blodet (Rizzi *et al.*, 2010). Neutrofiler produceras i benmärgen via den myeloida cellinjen och tar sig därefter ut till blodbanan. Väl i blodet kommer en del av neutrofilerna cirkulera runt medan en annan del lägger sig i viloläge i marginalpoolen vilket innebär att de håller sig till kärlväggen i blodet, redo att släppas ut i cirkulationen vid behov. En del av de nyproducerade neutrofilerna stannar kvar i benmärgen och finns som reservkapacitet att snabbt kasta ut i blodet om antalet neutrofiler hastigt skulle minska i blodet. När neutrofiler väl tagit sig ut i vävnader återvänder de aldrig till blodet (Zinkl, 1981). Neutrofilernas roll vid en inflammation är framför allt att ta sig från blodet till platsen för exempelvis en infektion där de kan skada inkräktande mikroorganismer som bakterier. Neutrofiler kan avdöda mikroorganismer genom fagocytos vilket förenklat innebär att de äter upp mikroorganismer för att intracellulärt avdöda dem (Hostetter, 2012). Neutrofiler kan även producera så kallade ”neutrophil extracellular traps” (NETs) vilket innebär att nät kastas ut innehållande substanser som skadar mikroorganismer (Brinkmann *et al.*, 2004). Genom produktion av cytokiner och

andra mediatorer har neutrofilerna även en viss funktion i moduleringen av det immunologiska svaret vid en inflammation (Hostetter, 2012).

Mogna neutrofiler, även kallade segmenterade neutrofiler, har en lång och utdragen cellkärna som delas upp i flera segment med en avsmalning mellan de olika loberna av kärnan. Omogna, stavkärniga, neutrofiler har en lång och utdragen cellkärna som är mindre segmenterad än hos de mogna neutrofilerna. Dessutom är kromatinet i cellkärnan mindre tätt packat hos stavkärniga neutrofiler jämfört med mogna neutrofiler (Rizzi *et al.*, 2010). Figur 1 visar ett exempel på hur en segmentkärnig neutrofil kan se ut. I neutrofilernas cytoplasma finns olika typer av granula som innehåller bland annat myeloperoxidas och andra skadliga substanser (Hostetter, 2012). Vid inflammatoriska tillstånd kan neutrofilernas utseende förändras. De kan få ett toxiskt utseende vilket innebär att de får en blåaktig, skummig eller vakuoliserad cytoplasma med Döhlekroppar (små basofila ansamlingar med endoplasmiskt retikulum) (Zinkl, 1981). Vid en hematologisk undersökning bestäms mängden neutrofiler i blodet och då räknas både antalet segmentkärniga och stavkärniga neutrofiler (Prasse & Duncan, 1976). Även deras morfologiska utseende bedöms med avseende på bland annat toxiska förändringar eller intracellulära mikroorganismer (Zinkl, 1981).

Neutrofil

Neutrofil innebär att det finns fler neutrofiler än vad som är normalt i blodet. Detta kan ske vid fysiologisk ansträngning, vid glukokortikoidpåverkan (exempelvis vid stress eller hyperadrenokorticism) och vid inflammatoriska tillstånd. Vid fysiologisk ansträngning och vid glukokortikoidpåverkan ökar mängden neutrofiler genom att neutrofiler från marginalpoolen släpps ut i cirkulationen. Vid inflammatoriska tillstånd ökar behovet av neutrofiler vilket kan leda till att en ökad mängd stavkärniga neutrofiler släpps ut från benmärgen, ett fenomen som kallas vänsterförskjutning. Dessa förändringar kan ses vid både infektiösa och icke-infektiösa inflammatoriska tillstånd som till exempel pyometra, pyodermi eller vid vävnadsnekros (Prasse & Duncan, 1976).

Neutropeni

Neutropeni innebär att det i blodet finns färre neutrofiler än vad som är normalt. Detta kan uppkomma vid ökad åtgång, minskad produktion, destruktion eller omfördelning i kroppen av neutrofiler. Ökad åtgång av neutrofiler kan ske vid omfattande inflammatoriska tillstånd som peritonit, pneumoni eller sepsis. Neutropeni på grund av omfördelning av neutrofiler i kroppen kan ses vid anafylaktiska reaktioner eller vid endotoxinemi. Minskad produktion av neutrofiler kan ses vid olika tillstånd som påverkar benmärgen. Läkemedelsintag, östrogenpåverkan eller genetiska sjukdomar är exempel på sådana tillstånd. Destruktion av neutrofiler kan bero på immunmedierade sjukdomar (Schnelle & Barger, 2012). Neutropeni är ett oönskat fynd eftersom det indikerar en hög allvarlighetsgrad i den pågående sjukdomen men också en ökad risk för infektioner (Prasse & Duncan, 1976). Neutropeni kan ses med eller utan vänsterförskjutning. Vid en vänsterförskjutning finns det en indikation på att benmärgen försöker kompensera genom att släppa ut omogna neutrofiler i cirkulationen. Om antalet omogna neutrofiler överstiger antalet mogna neutrofiler benämns tillståndet ofta som degenerativ vänsterförskjutning och detta har visat sig vara en prognostiskt negativ indikator (Burton *et al.*, 2013).

Lymfocyter

Till skillnad från neutrofiler är lymfocyter framförallt involverade i det adaptiva immunförsvaret. Det finns olika typer av lymfocyter som alla härstammar från den lymfoida cellinjen. Dessa är B-celler, T-celler och NK-celler (Day, 2010). T-celler utvecklas i thymus och delas i sin tur in i flera olika celltyper, bland annat cytotoxiska T-lymfocyter och T-hjälpar-celler. Cytotoxiska T-lymfocyter fyller sin funktion framförallt genom att eliminera främmande celler som exempelvis cancerceller. De är alltså en del av det cell-medierade immunförsvaret (Zinkl, 1981). T-hjälpar-celler däremot verkar genom att visa upp antigen för andra celler och genom att producera cytokiner. De är därmed en del av både det cell-medierade och det humoral immunförsvaret (Day, 2010). B-celler utvecklas i benmärgen och deras uppgift är att känna igen specifika antigen och bilda specifika antikroppar mot dessa. Varje B-cell känner igen en viss typ av antigen och det kan finnas några få till flera stycken av varje B-cell. När B-celler finns i vävnaden och producerar antikroppar kallas de plasmaceller. Om kroppen utsätts för en viss patogen prolifererar just de celler som bildar antikroppar mot den specifika patogenen. Till skillnad från neutrofiler kan lymfocyter som tagit sig ut i vävnaden senare återvända till blodet (Zinkl, 1981).

Figur 1 visar hur en lymfocyt kan se ut i ett blodutstryk. Hundlymfocyter är relativt små celler med en rund till oval, tät kärna. De har oftast endast en liten mängd cytoplasma som sällan sträcker sig runt hela kärnan. Lymfocyterna kan dock variera i storlek och det kan finnas lymfocyter lika stora som neutrofiler med cytoplasma som ligger runt om hela kärnan. Lymfocyter som reagerat på antigen benämns som reaktiva lymfocyter och dessa har ett förändrat utseende vilket kännetecknas av en ökad cellstorlek med basofil cytoplasma. Plasmaceller har en eccentric kärna med en perinukleär uppkläring (Rizzi *et al.*, 2010).

Lymfocytos

En ökad mängd lymfocyter kan ses vid tillstånd som lymfatisk leukemi, binjurebarksinsufficiens, kronisk antigenstimulering samt vid adrenalinpåslag (främst katt). Kronisk antigenstimulering kan uppstå vid bland annat överkänslighetsreaktioner, kroniska infektioner eller autoimmuna sjukdomar (Prasse & Duncan, 1976).

Lymfopeni

En minskad mängd lymfocyter i blodet kan vara en följd av kortikosteroidpåverkan vid stressiga situationer eller sjukdomstillstånd. Detta kallas stressleukogram och i samband med det ses ofta även neutrofili och eosinopeni, samt hos hund ibland också monocytos. Andra tillstånd som kan ge upphov till lymfopeni är kronisk tarmsjukdom med proteinförluster eller ruptur av ductus thoracicus (Prasse & Duncan, 1976).

Monocyter

Monocyter är ett förstadie till vävnadsmakrofager (Zinkl, 1981). Morfologisk är monocyter större än neutrofiler och deras cellkärna är väldigt varierande i sitt utseende. Oftast är kromatinet mindre kondenserat än hos mogna neutrofiler. Cytoplasman kan vara gråblå eller djupt basofil (Rizzi *et al.*, 2010). Figur 1 visar ett exempel på hur en monocytt kan se ut i ett blodutstryk.

Monocytos innebär en ökad mängd monocyter i blodet vilket kan ses vid bland annat kortikosteroidpåverkan hos hund och kan som tidigare nämnts vara en del av ett stressleukogram. Monocytos kan även ses vid kronisk inflammation och i sällsynta fall vid monocytisk leukemi. Reaktiva monocyter har ofta en rikligt vakuoliserad cytoplasma. Monocytopeni har oftast liten klinisk betydelse eftersom antalet monocyter normalt är lågt, men det kan ses vid exempelvis aplastisk anemi av olika grundorsaker (Weiss & Souza, 2010).

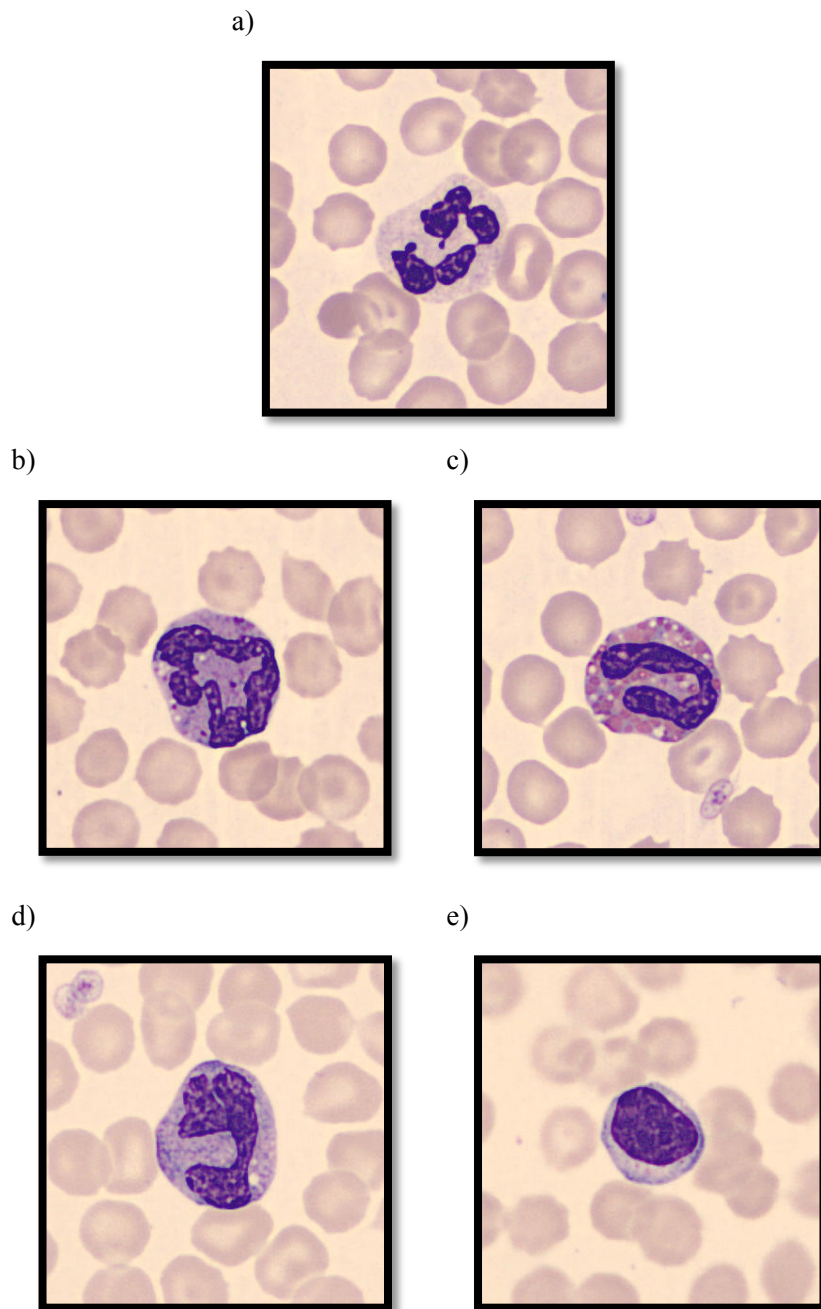
Eosinofiler

Likt neutrofiler kan eosinofiler fagocytera material och producera syremetaboliter. De är dock mycket mindre effektiva när det kommer till fagocytos. Eosinofiler är betydligt ovanligare i blodet hos friska individer, istället återfinns de framförallt ute i vävnader. Deras funktion är framförallt att döda parasiter samt att reglera inflammationsreaktioner. Bland annat kan eosinofiler producera histaminasom inaktiverar mastcellernas histamin. Eosinofiler räknas till granulocyter och kommer ur samma myeloida utvecklingslinje som neutrofiler (Zinkl, 1981). Morfologiskt har eosinofiler en polymorf segmenterad kärna, dock inte lika lobulerad som neutrofilernas. Eosinofiler är något större än vad neutrofiler är. De har också olika typer av granula i sin cytoplasma och vid infärgning får dess granula den karaktäristiska eosinofila färgen. Cytoplasman mellan granula är ofta lätt basofil till färgen och kan innehålla några vakuoler (Rizzi *et al.*, 2010). Figur 1 visar hur en eosinofil kan se ut i ett blodutstryk.

Eosinofili (en ökad mängd eosinofiler) kan bero på parasitära sjukdomar men kan också ses vid flera andra tillstånd som exempelvis lungsjukdom med eosinofila infiltrat (Lilliehöök *et al.*, 2000). Ibland kan man även se en paraneoplastisk eosinofili vid exempelvis mastcellstumörer, men primär eosinofil leukemi kan också vara en orsak till eosinofili. Eosinopeni är ett vanligt fenomen vid en hematologisk undersökning. Vissa friska individer har helt enkelt inga eosinofiler alls vid provtagning, men det kan också vara en del av ett stressleukogram då antalet eosinofiler blir lågt vid kortikosteroidpåverkan. Sammantaget är eosinopeni ett tillstånd med relativt liten klinisk betydelse (Young & Meadows, 2010).

Basofiler

Basofilen är den mest ovanliga leukocyten vid differentialräkning. Dessa celler har främst sin funktion i överkänslighetsreaktioner. De har även viss effekt i försvaret mot parasiter. Morfologiskt är basofiler ungefär lika stora som eosinofiler och har en segmenterad cellkärna, dock ej lika segmenterad som den hos neutrofiler. Basofilerna innehåller olika typer av granula som har olika storlek men som ofta färgas in med en blå färg. Basofili (en ökad mängd basofiler) är ovanligt men kan uppstå vid till exempel parasitära sjukdomar, läkemedelsintag, allergiska reaktioner eller vissa myeloproliferativa sjukdomar. Basopeni är ett svårtolkat tillstånd eftersom referensvärden för basofiler i blodet ofta inkluderar noll (Pohlman, 2010).



Figur 1. Bilder på de olika leukocyterna i ett blodutstryk. a) neutrofil, b) basofil, c) eosinofil, d) monocytt och e) lymfocyt. (Foto: Inger Lilliehöök, 2018).

Differentialräkning av leukocyter

Syftet med differentialräkning av leukocyter är att erhålla information om hur fördelningen av de olika vita blodkropparna ser ut i blodet. Som tidigare nämnts är neutrofilen den klart dominerande leukocyten i hundblod under normala omständigheter. Referensvärden för differentialräkning av hundleukocyter skiljer sig beroende på metod som används för differentialräkningen. Fördelningen av de olika leukocyterna kan anges i antingen absoluta antal eller i procentuell fördelning. Referensvärden i absoluta antal ($10^9/L$) från en studie med hematologiinstrumentet Advia 120 låg kring 4,3-9,1 för neutrofiler, 2,0-4,7 för lymfocyter, 0,2-2,0 för monocyter, 0,1-1,2 för eosinofiler och 0,0-0,1 för basofiler (Moritz *et al.*, 2004). Vid olika sjukdomstillstånd kan fördelningen av de olika celltyperna i blodet förändras enligt tidigare beskrivningar för respektive celltyp.

Differentialräkning av leukocyter kan ske på flera olika sätt och man kan grovt dela in det i manuell differentialräkning och automatiserad differentialräkning. Den manuella differentialräkningen sker genom att en person tittar på ett blodutstryk i mikroskop och räknar antalet av respektive celltyp. Automatiserad differentialräkning utförs istället av hematologiinstrument och det finns flera olika tekniker för hur dessa räknar leukocyter. Det finns olika för- och nackdelar med både manuell och automatiserad differentialräkning (Morse *et al.*, 1989; DeNicola, 2011).

Manuell differentialräkning

Manuell differentialräkning innebär att fördelningen av de olika leukocyterna i blodet bestäms genom att leukocyter i ett blodutstryk räknas i mikroskop. Oftast görs en initial bedömning av hela blodutstryket på en låg förstoring för att få en helhetsbild (Santoro, 2018). Därefter räknas oftast 100 leukocyter på en hög förstoring i det så kallade monolagret. Antalet av respektive leukocyt anger därmed den procentuella fördelningen och ska således spegla fördelningen i hela blodet (Knoll & Rowell, 1996). Det pågår ständiga diskussioner om den manuella differentialräkningens roll i diagnostiken. Ett uppenbart problem med den manuella differentialräkningen är den dåliga precisionen som är en följd av att relativt få celler räknas jämfört med de automatiserade metoderna (Kjelgaard-Hansen & Jensen, 2006). Dessutom är den manuella differentialräkningen betydligt mycket mer tidskrävande än de automatiserade metoderna (Stirn *et al.*, 2014). En viktig fördel med den manuella differentialräkningen är möjligheten till en morfologisk bedömning av de olika celltyperna. Utöver att räkna antalet celler får personen som tittar i mikroskopet möjlighet att upptäcka stavkärniga neutrofiler, toxiska förändringar hos neutrofiler, cancerceller eller andra förändringar som exempelvis inklusionskroppar vilket de automatiserade metoderna inte kan upptäcka (Tvedten & Haines, 1994). Man har i flera studier kommit fram till att den manuella differentialräkningen bör genomföras som komplement till automatiserade metoder hos sjuka djur, men att den inte är absolut nödvändig vid screening av friska patienter (Morse *et al.*, 1989; Tvedten & Haines, 1994; Stirn *et al.*, 2014).

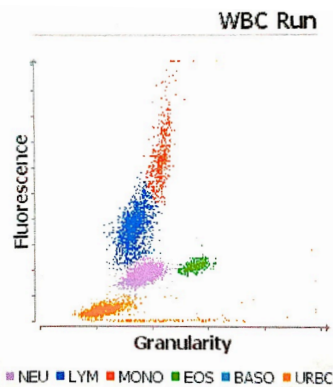
Automatiserad differentialräkning

De flesta hematologiska prover analyseras idag med hematologiinstrument. Dessa genererar vanligtvis tillförlitliga provresultat för hemoglobinkoncentration och räkning av erythrocyter, retikulocyter och totalantalet leukocyter. Tillförlitligheten när det kommer till differentialräkning av leukocyter i blodprover från djur är betydligt mycket mer varierande (Rishniw & Pion, 2016). Fördelen med differentialräkning av leukocyter med hematologiinstrument är att det besparar klinikern mycket tid jämfört med att själv titta i mikroskop. Dessutom ger de automatiserade metoderna generellt en bättre precision än manuell differentialräkning eftersom betydligt många fler celler räknas per prov jämfört med den manuella differentialräkningen (Knoll & Rowell, 1996). Dessa fördelar kräver att instrumentet klassificerar leukocyterna korrekt, vilket inte alltid är fallet. Det finns uppenbara brister med de automatiserade hematologiinstrumenten när det kommer till differentialräkning av leukocyter (Tvedten & Haines, 1994; Lilliehöök & Tvedten, 2011; Goldmann *et al.*, 2014; Tvedten *et al.*, 2017). Nedan följer beskrivningar av de två automatiserade hematologiinstrument som används i denna studie.

Differentialräkning av leukocyter med ProCyte Dx

ProCyte Dx (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) är ett relativt nytt hematologiinstrument som är utvecklat för analys av prover från djur. Instrumentet är anpassat för att kunna användas snabbt och enkelt även på mindre kliniker. ProCyte Dx ger en fullständig hematologisk analys med information om erythrocyter, retikulocyter, trombocyter och leukocyter. Tekniken som utnyttjas för differentialräkning av leukocyter är laserbaserad flödescytometri (Fujino *et al.*, 2013). Detta är samma teknik som används i det något äldre hematologiinstrumentet Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) (Bauer *et al.*, 2012).

Vid analys med ProCyte Dx färgas leukocyter in med fluorescensmärkt reagens, polymetin, vilket fäster till nukleinsyra i cellernas kärna och cytoplasma. En laserstråle riktas mot cellerna och instrumentet registrerar i vilken grad dessa absorberar och sprider ljus. Baserat på detta klassificerar instrumentet de olika leukocyterna. Side fluorescent light (SFL) är måttet av fluorescerande ljus och därmed mängden nukleinsyra i cellerna. Side scatter (SSC) är måttet på ljusspridning och ger information om cellernas komplexitet. De båda värdena för varje cell presenteras i ett cytogram där y-axeln representerar fluorescens (SFL) och x-axeln representerar komplexitet (SSC). Celler med mycket DNA/RNA i cytoplasma, t. ex monocyter, hamnar högt upp längs y-axeln. Ju mer komplexa cellerna är desto längre till höger längs x-axeln hamnar de. Eosinofilen är ett exempel på en komplex leukocyt. Varje cell genererar en punkt på cytogrammet och under normala omständigheter hamnar respektive kluster av en viss cellpopulation väl separerade från andra cellpopulationer. Genom att identifiera dessa ansamlingar av celler klassificerar instrumentet respektive cell som en viss typ av leukocyt baserat på vart på detta cytogram cellpopulationerna hamnar. Varje celltyp presenteras med en färgkod för att användaren enkelt ska kunna tolka cytogrammet (IDEXX Laboratories, 2014). Figur 2 visar fördelningen av de olika celltyperna i ett normalt cytogram vid analys av hundblod med ProCyte Dx.

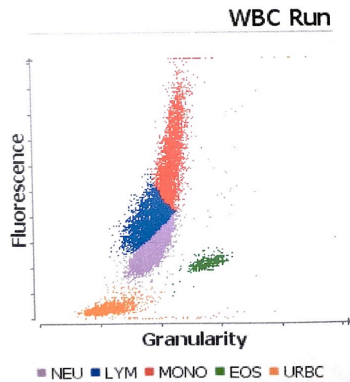


Figur 2. Cytogram från ProCyte Dx vid analys av hundblod. De olika cellpopulationerna är väl avgränsade från varandra. Cytogrammet kan således anses vara godtagbart och resultaten från den automatiserade differentialräkningen av leukocyter bedöms som trovärdiga.

ProCyte Dx ger en automatiserad differentialräkning av fem leukocyter (neutrofiler, lymfocyter, eosinofiler, basofiler och monocyter). Instrumentet kan inte upptäcka morfologiska förändringar eller avgöra mognadsgrad hos dessa celler (Fujino *et al.*, 2013). Instrumentet har tidigare jämförts mot manuell differentialräkning och andra automatiserade instrument för att utvärdera dess resultat för både hund och katt (Fujino *et al.*, 2013; Goldmann *et al.*, 2014). Sammantaget har ProCyte Dx uppnått de minimikrav som ställs på hematologiinstrument. Instrumentet har visat sig stämma väl överens med referensmetoderna när det kommer till att räkna totalantalet vita blodkroppar samt differentialräkning av neutrofiler, lymfocyter och eosinofiler. Man såg dock en sämre korrelation vid monocyträkning. Man har också sett att ProCyte Dx felaktigt rapporterar in resultat för basofiler (Goldmann *et al.*, 2014). Tidigare studier har visat att automatiserade instrument har problem med att identifiera just basofiler. Vid analys med Sysmex XT-2000iV tycks basofilerna hamna i området strax ovanför neutrofilerna i cytogrammet vilket gör att de oftast feltolkas som antingen neutrofiler eller lymfocyter (Lilliehöök & Tvedten, 2011). ProCyte Dx kan dock ibland korrekt identifiera och räkna basofiler i prover från katt (Tvedten *et al.*, 2017).

Det finns inbyggda larm i ProCyte Dx som varnar användaren för eventuella felaktigheter i differentialräkningen. I de fall resultaten presenteras med ett aktiverat larm bör användaren göra ett utstryk för en manuell differentialräkning och morfologisk bedömning. ”WBC Abnormal distribution” indikerar en otydlig separation av de olika leukocyterna i cytogrammet. Detta innebär att de olika cellpopulationerna överlappar varandra i cytogrammet vilket kan innebära att många celler riskerar att klassificeras som fel celltyp. Ytterligare ett larm, ”Band neutrophils suspected”, finns för att varna användaren om att stavkärniga neutrofiler misstänks finnas i provet. Instrumentet skiljer inte mellan stavkärniga och segmentkärniga neutrofiler i differentialräkningen utan räknar enbart det totala antalet neutrofiler (IDEXX Laboratories, 2014). Omogna och toxiska neutrofiler innehåller mer RNA än mogna neutrofiler. Vid ett ökat antal stavkärniga neutrofiler kommer flera neutrofiler därmed hamna högre upp längs y-axeln och på så sätt närmre området för lymfocyter. Detta kan leda till att dessa neutrofiler felaktigt tolkas som lymfocyter eller till och med monocyter (Goldmann *et al.*, 2014; Tvedten *et al.*, 2017). Figur 3 visar ett cytogram från ProCyte Dx där separationen av de olika cellpopulationerna är otillräcklig. Utöver kontroll av inbyggda larm

bör användare av ProCyte Dx inspektera det cytogram som kommer med resultatet. Instrumentet fungerar tydligt bättre i de fall det finns ett tydligt avstånd mellan de olika cellpopulationerna i cytogrammet. Om cytogrammet visar en otydlig separation av cellpopulationerna bör en manuell differentialräkning utföras (IDEXX Laboratories, 2014; Goldman *et al.*, 2014).



Figur 3. Cytogram från ProCyte Dx vid analys av hundblod. Separationen av neutrofiler, lymfocyter och monocyter är otillräcklig. Cellpopulationerna överlappar varandra i området som liknar ett avlångt ovalt moln med tre olika färger (lila, blå och röd) och det är därför stor risk att flera celler räknas som fel celltyp. I detta fall har troligtvis en stor del av neutrofilerna en ökad mängd RNA (omogna och toxiska neutrofiler) vilket placerar dem högre upp längs y-axeln och på så sätt i områdena för lymfocyter och monocyter.

I en studie uppmärksammades det att ProCyte Dx levererade oacceptabelt felaktiga resultat i 13 % av fallen vid differentialräkning av leukocyter i prover från katt. Vissa av dessa felaktiga leukocyträkningar skedde dessutom utan aktivering av något inbyggt larm. Dessa allvarliga felräkningar berodde framförallt på en otillräcklig separation av neutrofiler och lymfocyter. De morfologiska förändringarna hos neutrofiler i samband med toxiska förändringar eller en ökad mängd omogna neutrofiler gjorde att neutrofilerna tenderade att klättra högre upp längs y-axeln och misstolkas av instrumentet som framförallt lymfocyter men även i vissa fall som monocyter. Genom att studera det cytogram som presenteras med resultatet hade dessa felaktiga resultat kunnat avfärdas (Tvedten *et al.*, 2017).

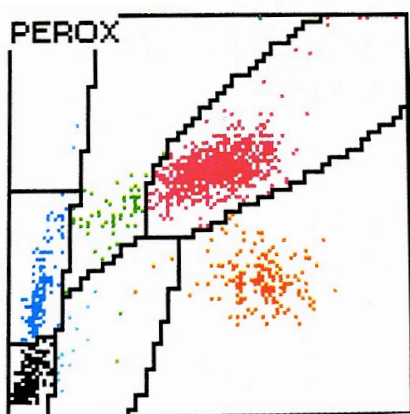
Problematiken kring att separera omogna eller toxiska neutrofiler från lymfocyter uppmärksammades redan vid valideringen av Sysmex XT-2000iV, ett något äldre hematologiinstrument inom Sysmex-serien, vars teknik är densamma som hos ProCyte Dx. Även där sågs att neutrofilerna vid ovan nämnda tillstånd får en ökad mängd cytoplasmiskt RNA vilket placerar dem högre upp längs y-axeln i cytogrammet. En viktig skillnad mellan Sysmex XT-2000iV och ProCyte Dx är att det förstnämnda instrumentet inte lämnar ut några resultat som riskerar att vara felaktiga, alltså när något alarm aktiverats. Med denna funktion tvingas användaren att göra en manuell differentialräkning vid fall då instrumentet haft problem att separera de olika cellpopulationerna (Lilliehöök & Tvedten, 2009). Sysmex XT-2000iV är validerat för flera djurslag och precis som för ProCyte Dx såg man i en studie att detta instrument inte klarar av att räkna monocyter på ett optimalt sätt (Bauer *et al.*, 2012). Sysmex XT-2000iV kan inte identifiera basofiler i prover från hund (Lilliehöök & Tvedten, 2009).

Det finns flera fördelar med ProCyte Dx. Instrumentets storlek och pris möjliggör användandet på mindre kliniker. Dessutom är det enkelt att använda utan frekventa tekniska problem (Goldmann *et al.*, 2014). Resultaten presenteras inom två minuter från analysstart (Fujino *et al.*, 2013).

Differentialräkning av leukocyter med Advia 2120

Advia 2120 (Siemens Medical Solution Diagnostics, Eschborn, Tyskland) är ett automatiserat hematologiinstrument av större modell som främst används på större referenslaboratorium. Instrumentet är utvecklat för analys av prover från människa men har anpassats till prover från många olika djurslag (Harris *et al.*, 2005). Detta instrument bygger på samma teknik som föregångaren Technicon H-1 (Technicon Corp, Tarrytown, USA) (Tvedten & Haines, 1994). Likt ProCyte Dx och Sysmex XT-2000iV används laserbaserad flödescytometrisk teknik för att utföra den automatiserade differentialräkningen av leukocyter (Siemens, 2006).

Advia 2120 utför sin differentialräkning av leukocyter i två separata kanaler, peroxidaskanalen och basokanalen. Peroxidaskanalen bygger på att cellerna färgas in utifrån sin peroxidaktivitet och därefter mäts intensiteten på infärgning och ljusspridning. Resultatet presenteras i ett cytogram där y-axeln representerar cellernas storlek och x-axeln representerar cellernas peroxidaktivitet. Stora celler som monocyter sprider mycket ljus och hamnar således högt upp längs y-axeln medan peroxidaspositiva celler som neutrofiler och eosinofiler hamnar åt höger längs x-axeln. På liknande sätt som ProCyte Dx använder instrumentet en klusteranalys för att identifiera ansamlingar av celler. Baserat på vart i cytogrammet respektive cellpopulation lokaliseras klassificerar instrumentet cellpopulationen som en viss typ av leukocyt. Precis som ProCyte Dx och andra hematologiinstrument skiljer inte Advia 2120 mellan mogna och omogna neutrofiler utan förser endast användaren med ett totalt antal neutrofiler (Siemens, 2006). Ett exempel på ett normalt cytogram från peroxidaskanalen ses i Figur 4.



Figur 4. Cytogram från peroxidaskanalen efter analys av hundblod med Advia 2120. Med hjälp av svarta linjer illustreras gränserna som instrumentet skapat för att definiera respektive punkt som en viss celltyp. Neutrofiler (röd) och eosinofiler (orange) innehåller mycket myeloperoxidas vilket placerar dem långt åt höger längs x-axeln. Lymfocyter (blå) är små och färgas inte in med myeloperoxidas-reagens vilket placerar dem närmare origo. De gröna punkterna representerar monocyter. Området med två ljusblå prickar högst upp (stora celler) till vänster (ingen infärgning för myeloperoxidas) motsvarar området för LUC (large unstained cells).

Basokanalen utvecklades framförallt för att kunna identifiera humana basofiler eftersom dessa är resistent mot lysering. I prover från hund och katt är basofilerna dock inte lika resistent mot lysering varför Advia 2120 inte kan räkna basofiler i prover från hund och katt. Advia 2120 rapporterar såkallade LUC (large unstained cells) som i peroxidaskanalen är stora celler som inte färgas in med myeloperoxidasreagenset. Vid analys av hundblod hamnar basofiler just i området för LUC i peroxidaskanalen varför användare av Advia 2120 bör leta efter basofiler i den manuella differentialräkningen vid högt antal LUC. Även andra celler än basofiler kan dock hamna i området för LUC (Lilliehöök & Tvedten, 2011).

Advia 2120 används ofta som en av referensmetoderna vid validering av andra hematologiinstrument för hund (Tvedten & Lilliehöök, 2011; Bauer *et al.*, 2012; Goldmann *et al.*, 2014; Tvedten *et al.*, 2017). Advia 2120 använder exakt samma teknik som dess föregångare Techichon H-1 som i sin tur är validerad för hund. En studie visade att detta instrument hade god överensstämmelse med manuell differentialräkning för de flesta leukocyter förutom monocyter och basofiler (Tvedten & Haines, 1994). Problematiken med att räkna monocyter har även uppmärksammats med Advia 2120. En teori om varför monocytorna räknas felaktigt med denna teknik bygger på att en stor del av den cellpopulation som representerar monocyter i cytogrammet från peroxidaskanalen hamnar i området där instrumentet klassificerar celler som lymfocyter eller LUC. Därför tolkas monocytantalet ofta som falskt lågt medan lymfocyter eller LUC kan bli falskt höga (Tvedten & Lilliehöök, 2011). Enstaka fall har även observerats där neutrofilernas cellpopulation tycks ha legat delvis i monocytornas område vilket kan leda till att antalet neutrofiler blir falskt lågt och antalet monocyter blir falskt högt (Tvedten *et al.*, 2017). Även enstaka fall där eosinofilernas peroxidasantensitet varierat och därmed placerat dem i området för neutrofiler har observerats (Tvedten & Lilliehöök, 2011).

Ett problem som uppmärksammades redan med Technicon H-1 är att fettdroppar kan tolkas som trombocyter och även vita blodkroppar. Dessutom kan kärnförande erythrocyter (nRBC) hamna mellan området för debris och området för lymfocyter i cytogrammet och därmed påverka cellräkningen (Tvedten & Haines, 1994). Den problematik som uppstår med ProCyte Dx vid vänsterförskjutning tycks ej vara ett problem för Advia 2120 eftersom det grundar sig i att omogna neutrofiler har en ökad mängd RNA snarare än att peroxidasantensiteten förändras (Goldmann *et al.*, 2014). Däremot såg man i en studie att hundar som drabbas av sjukdomstillstånd där neutrofilernas myeloperoxidas-nivåer förändras leder till att Advia 2120 får svårigheter att korrekt identifiera dessa celler som neutrofiler (Klenner *et al.*, 2010). Detta har även beskrivits vid analys av blodprover från hästar efter injektion med endotoxin. Neutrofilernas infärgning för myeloperoxidas har då minskat vilket placerat dem i området för monocyter i cytogrammet vid analys med Advia 2120 (Lilliehöök *et al.*, 2016).

Advia 2120 har flera inbyggda larm. Ett utav larmen är ”WBC-CE” som indikerar att totala leukocytantalet skiljer sig mellan peroxidaskanalen och basokanalen. Ett annat larm är ”PX-NV” som indikerar att instrumentet i sin peroxidaskanal inte har en tydlig uppdelning mellan debris och lymfocyter. Debris hamnar närmast origo i cytogrammet och lymfocytorna är den celltyp som hamnar närmast detta område (Siemens, 2006).

I en studie av Stirn *et al.* (2014) undersökte man hur ofta differentialräkning av leukocyter med Advia 120 krävde manuell differentialräkning som komplettering vid analys av prover från hund. I 21 % av fallen efterfrågades en manuell bedömning av blodutstryk och det berodde då oftast på en otillräcklig separation av de olika celltyperna vid inspektion av cytogram.

MATERIAL OCH METODER

Provmaterial

Blodprover togs i EDTA-rör (Vacuette[®] 2 ml K₃ EDTA (Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, Österrrike) eller Multivette[®] 600 µl K₃ EDTA (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Tyskland)) från 86 hundar för hematologisk analys vid Klinisk kemiska laboratoriet vid Universitetsdjursjukhuset (UDS) i Uppsala. Dessa prover togs som en del av den kliniska utredningen av sjuka patienter vid UDS där hematologianalys efterfrågats. Analysresultaten och det överblivna EDTA-blodet från det dagliga kliniska arbetet användes till denna studie. Det var således inga prover som togs enbart för studiens skull. Majoriteten av patienterna var vid tidpunkten för provtagning stationärvårdsregistrerade på djursjukhuset. I samband med inskrivning har djurägarna samtyckt till att blodet från deras hund används i studier. Några av proverna som användes i denna studie kom dock från patienter som haft bokade besök via polikliniken och därmed inte varit stationärvårdsregistrerade. I dessa fall fick djurägarna muntligt godkänna användandet av överblivet EDTA-blod till denna studie. Samtliga tillfrågade djurägare godkände detta. Provinsamlingen pågick från mars till september under 2018.

Provflöde

De insamlade proverna analyserades först med Advia 2120 (Siemens Medical Solution Diagnostics, Eschborn, Tyskland). I samband med att blodproverna analyserades med Advia 2120 utfördes ett blodutstryk eftersom samtliga prover vid Klinisk kemiska laboratoriet rutinmässigt kontrolleras genom manuell differentialräkning och morfologisk bedömning i mikroskop av biomedicinska analytiker och ibland veterinärer (specialister eller aspiranter inom klinisk patologi) innan provsvaret går över till hundens journal. Analys med Advia 2120 och utförandet av det första blodutstryket utfördes därmed av personalen på Klinisk kemiska laboratoriet som en del av det kliniska arbetet. Därefter analyserades provet med ProCyte Dx (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) och ett extra utstryk gjordes för att en fullständig manuell differentialräkning av leukocyter skulle kunna utföras i ett senare skede. Analys med ProCyte Dx och det extra blodutstryket utfördes av antingen en veterinärstudent eller en BMA-student och detta gjordes oftast efter analys med Advia 2120, men av praktiska skäl analyserades vissa prover med ProCyte Dx först. Utstryken färgades samma dag med en modifierad May-Grünwald Giemsa-färg (Merck, Darmstadt, Tyskland).

Exklusionskriterier

Exklusionskriterier var ifall det vid provtagning fanns en misstanke om att hunden var smittad av någon zoonotisk sjukdom som exempelvis leptospiros. Ett annat krav för att blodet skulle kunna användas i studien var att analyser och utstryk skulle kunna utföras inom fyra timmar från provtagning. Blodprovsrören förvarades i rumstemperatur under dessa fyra timmar. Eftersom det inte alltid fanns tid för att en person skulle kunna genomföra detta inom fyra timmar från provtagning var det många blodprov från hundar vid UDS under insamlingsperioden som inte användes till denna studie. Det fanns ett minimikrav på att EDTA-rören skulle vara fyllda med minst 0,8 ml eller 0,3 ml för Vacuette[®] 2 ml K₃ EDTA-rör respektive Multivette[®] 600 µl K₃ EDTA-rör inför analys med ProCyte Dx (efter analys med Advia 2120 och det första blodutstryket).

Hematologiinstrument

De blodprover från hund som inkommer för hematologisk analys till Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS analyseras som tidigare nämnts rutinmässigt med det automatiserade hematologiinstrumentet Advia 2120. Instrumentet utför en fullständig hematologisk analys av erythrocyter, retikulocyter, leukocyter och trombocyter. Advia 2120 räknar totala antalet leukocyter och lämnar ut resultat för en differentialräkning med fyra leukocytpopulationer (neutrofiler, lymfocyter, eosinofiler och monocyter) och LUC. LUC representerar stora celler som ej färgats in med instrumentets infärgning för myeloperoxidase och därmed ej kunnat identifieras. I prover från hund kan dessa vara exempelvis basofiler, monocyter, omogna lymfocytoida celler eller reaktiva lymfocyter. Totala antalet leukocyter och resultatet i procentenheter från differentialräkningen med Advia 2120 har använts i denna studie. De instrumentlarm som användes i studien var "WBC-CE" och "PX-NV". "WBC-CE" indikerar att instrumentet fått två olika värden för totalantalet vita blodkroppar som inte överensstämmer med varandra (totalantalet vita blodkroppar uträknat med peroxidaskanalen stämmer inte gentemot basokanalen). "PX-NV" innebär att maskinen haft svårt att separera små lymfocyter från icke-leukocyter som t. ex icke-lyserade erythrocyter, kärnförande erythrocyter och stora trombocyter.

Specifikt för denna studie analyserades samtliga blodprover även med ytterligare ett automatiserat hematologiinstrument, ProCyt Dx, som på UDS normalt framförallt används jourtid när ordinarie laboratorium har stängt. Även detta instrument utför en fullständig hematologisk analys av erythrocyter, retikulocyter, leukocyter och trombocyter. ProCyt Dx bygger på laserbaserad flödescytometri och lämnar ut resultat för en differentialräkning med fem leukocytpopulationer (neutrofiler, lymfocyter, eosinofiler, basofiler och monocyter) och räknar totala antalet leukocyter. Totala antalet leukocyter och resultaten i procentenheter från differentialräkningen användes i denna studie. Instrumentet har flera inbyggda larm och de som användes i denna studie var "WBC Abnormal distribution" och "Band neutrophils suspected". Det förstnämnda larmet indikerar att instrumentet haft svårigheter att separera de olika leukocytpopulationerna från varandra. "Band neutrophils suspected" indikerar att instrumentet misstänker en ökad mängd stavkärniga neutrofiler.

Kontrollprover kördes dagligen före analys av patientprover för Advia 2120 och en gång per vecka för ProCyt Dx. Mjukvaruinställningar för analys av hundblod användes för både ProCyt Dx (mjukvaruversion 00-33_51) och Advia 2120 (mjukvaruversion 5.9.0-MS).

Manuell differentialräkning

Som en del av denna studie utfördes ett extra blodutstryk av antingen en BMA-student eller en veterinärstudent i samband med att samma person analyserade provet med ProCyt Dx. Dessa extra utstryk användes senare för manuell differentialräkning och morfologisk bedömning av en och samma veterinär (HT). I den manuella differentialräkningen räknades 100 leukocyter. Även antalet stavkärniga neutrofiler räknades. Morfologiska förändringar som exempelvis toxiska neutrofiler eller reaktiva lymfocyter noterades också.

Jämförelse

Resultaten från differentialräkning av leukocyter med ProCyte Dx, Advia 2120 och den manuella differentialräkningen (HT) jämfördes för att undersöka förekomst av felaktiga resultat och felens omfattning vid differentialräkning med ProCyte Dx. Instrumentens numeriska resultat, cytogram och larm granskades och sammanställdes för både ProCyte Dx och Advia 2120. Ett graderingssystem från ett till fem användes för att bedöma cytogram från ProCyte Dx som godtagbara eller ej godtagbara baserat på hur väl de olika cellpopulationerna var separerade från varandra. Cytogram med gradering ett till två bedömdes som godtagbara där gradering ett innebar en optimal separation av samtliga cellpopulationer och gradering två innebar att en liten andel av cellpopulationerna hade en indistinkt separation. Cytogram med gradering från tre till fem bedömdes som ej godtagbara där gradering tre innebar en indistinkt separation av cellpopulationer som misstänktes ha betydande påverkan på resultatet från differentialräkningen. Gradering fem innebar misstanke om att den indistinkta separationen av cellpopulationerna hade kraftig påverkan på resultatet i differentialräkningen. För Advia 2120 noterades endast huruvida en otillräcklig separation av cellpopulationer i cytogrammet förekom eller ej.

Kriterier och gränsvärden antogs för att definiera vilka resultat som skulle klassificeras som oacceptabelt felaktiga vid differentialräkning av leukocyter med ProCyte Dx jämfört med referensmetoderna i denna studie. På detta sätt kunde förekomsten av oacceptabelt felaktiga resultat med ProCyte Dx kvantifieras och dess allvarlighetsgrad mätas. För att ett felaktigt resultat skulle klassificeras som oacceptabelt krävdes det att differensen mellan resultatet i procent från ProCyte Dx och båda referensmetoderna översteg 15 procentenheter för neutrofiler och lymfocyter och/eller monocyter. Ett avvikande resultat i neutrofilräkning krävdes alltså i samtliga fall medan samma prov även skulle ha ett felaktigt resultat i antingen lymfocyt- eller monocytträkningen, alternativt i båda dessa räkningar, för att klassificeras som oacceptabelt. Gränsvärdet 15 procentenheter sattes i absolut procentenhet och inte relativ procentuell skillnad för att med stor säkerhet kunna uttala sig om oacceptabla fel samt för att på ett enklare sätt kunna jämföra resultaten från hematologiinstrumenten med manuell differentialräkning. En avvikelse på 15 procentenheter med ProCyte Dx vid differentialräkning av lymfocyter skulle i relativ procent innebära ett fel på 100 % (en fördubbling) om referensmetodens resultat var 15 % medan ProCyte Dx gav resultatet 30 %. För att klassificeras som oacceptabelt felaktigt resultat krävdes det att ProCyte Dx skiljde sig mot båda referensmetoderna vid analys av ett prov, det räckte alltså inte att differensen var större än 15 procentenheter för neutrofiler gentemot Advia 2120 om differensen mellan ProCyte Dx och manuell differentialräkning var mindre än 15 procentenheter för neutrofiler. Gränserna ovan är subjektivt satta av författaren utifrån målsättningen att med tillräcklig säkerhet kunna uttala sig om vilka fel som klassificeras som oacceptabla.

Bland-Altman-plottar skapades för att utvärdera och illustrera graden av överenskommelse mellan de olika analysmetoderna.

RESULTAT

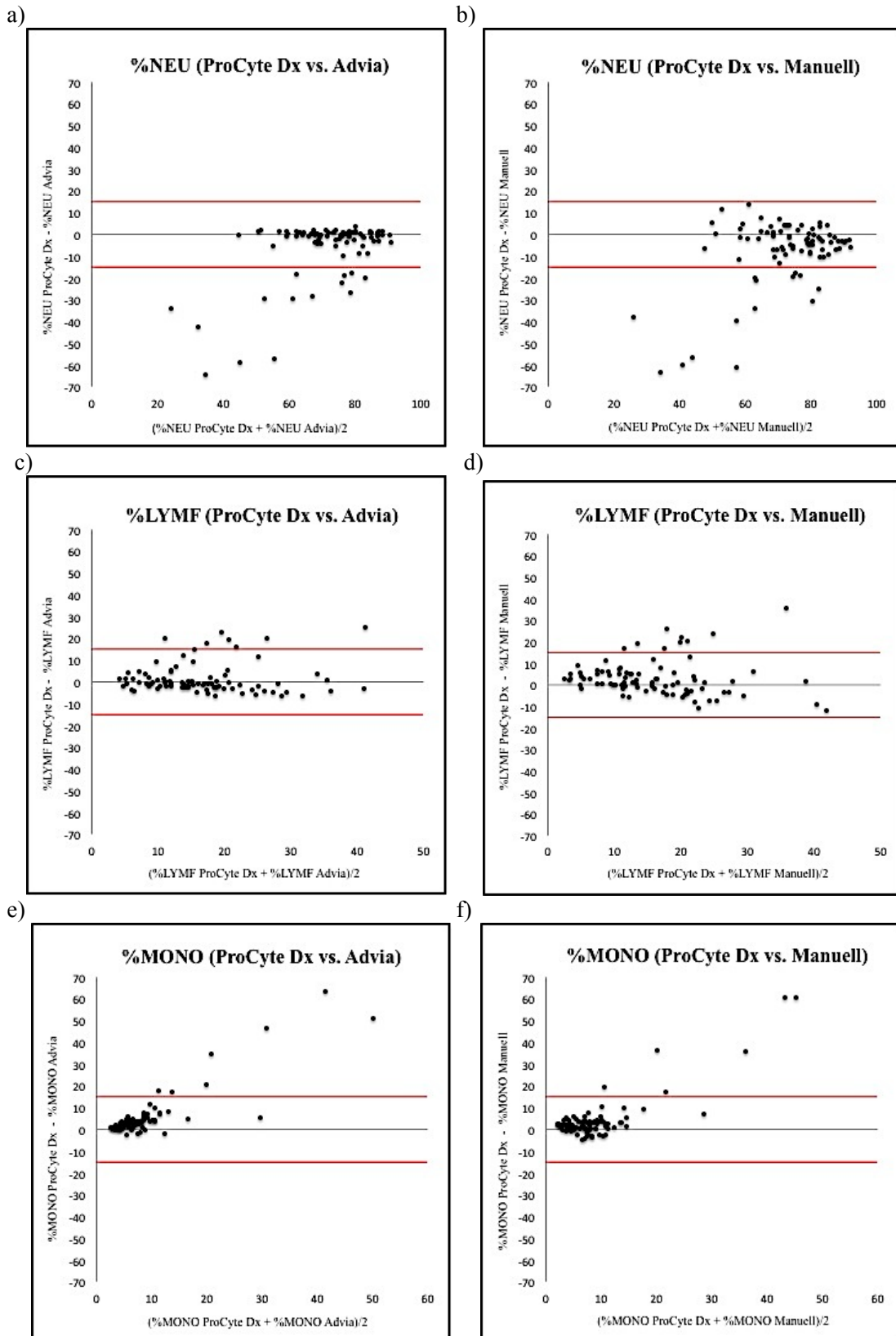
Överensstämmelse och antal oacceptabelt felaktiga resultat

Differentialräkning av leukocyter utfördes för 86 prover från sjuka hundar med ProCyte Dx (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA), Advia 2120 (Siemens Medical Solution Diagnostics, Eschborn, Tyskland) och manuell differentialräkning. Resultat från differentialräkningar samt cytogram och aktiverade larm från hematologiinstrumenten kunde sammanställas för samtliga prover.

Figur 5 illustrerar överensstämmelsen mellan ProCyte Dx och de båda referensmetoderna vid differentialräkning av neutrofiler, lymfocyter och monocyter i prover från hund. Överensstämmelsen för de tre celltyperna var generellt god då majoriteten av proverna hade en differens ganska nära noll vid jämförelse mellan differentialräkningar med ProCyte Dx och referensmetoderna. En särskilt god överensstämmelse sågs vid differentialräkning av neutrofiler vid jämförelse mellan ProCyte Dx och Advia 2120 (Fig. 5a).

De kriterier och gränsvärden som antogs enligt tidigare användes för att kvantifiera mängden oacceptabelt felaktiga resultat och allvarlighetsgraden av dessa vid analys med ProCyte Dx. Elva av totalt 86 prover (13 %) hade oacceptabla fel vid differentialräkning med ProCyte Dx vid jämförelse mot både Advia 2120 och manuell differentialräkning. Tabell 1 visar antalet oacceptabla resultat från ProCyte Dx vid jämförelse mot båda referensmetoderna samt hur dessa elva oacceptabla fel fördelades mellan de olika leukocyträkningarna. Avvikelse i neutrofil- och lymfocyträkningen var den vanligaste orsaken till felaktiga resultat men även prover med fel i differentialräkningen av samtliga tre celltyper (neutrofiler, lymfocyter och monocyter) upptäcktes. Två prover hade avvikelser som översteg 15 procentenheter vid jämförelse mot båda referensmetoderna vid neutrofilräkning men inte vid lymfocyt- eller monocytträkning varför dessa två prover inte klassificerades som oacceptabelt felaktiga.

De analysresultat från ProCyte Dx som skiljde sig mest gentemot referensmetoderna hade avvikelser i absoluta procentenheter som sträckte sig upp till 65 procentenheter för neutrofiler, 64 procentenheter för monocyter och 36 procentenheter för lymfocyter. Tabell 2 visar resultaten från differentialräkning av de tre celltyperna med ProCyte Dx och Advia 2120 för de elva proverna med oacceptabla fel.



Figur 5. Bland-Altman-plottar som visar differensen i absolut procentenhet mellan analysresultat från ProCyte Dx och de båda referensmetoderna (Advia 2120 respektive manuell differentialräkning) vid differentialräkning av neutrofiler (a och b), lymfocyter (c och d) och monocyter (e och f) i prover från hund. De röda linjerna indikerar det förutbestämde gränsvärdet för vad som klassificeras som oacceptabelt fel (15 procentenheter för neutrofiler, lymfocyter och monocyter).

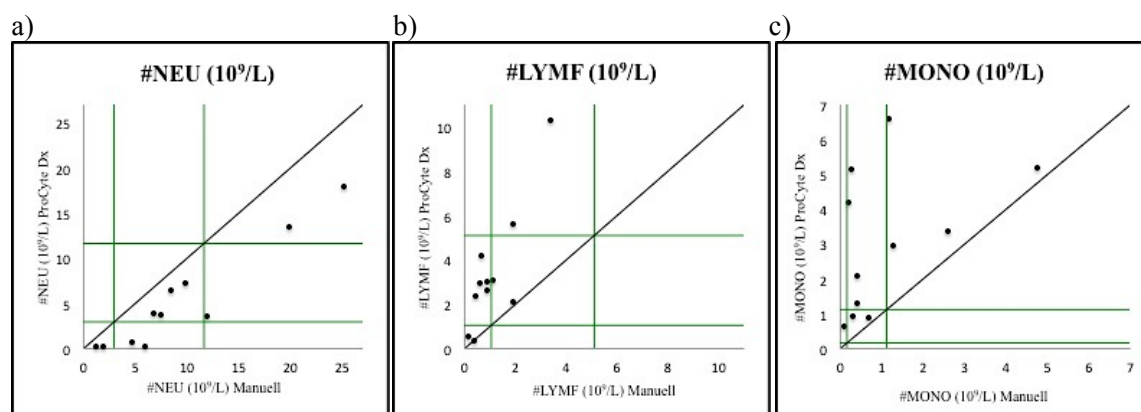
Tabell 1. Antal prover med oacceptabelt felaktiga resultat vid differentialräkning med ProCyte Dx enligt studiens kriterier (fel i neutrofilräkning och minst en av lymfocyt- och monocytträkningarna)

	Avvikelse > 15 procentenheter vid jämförelse ProCyte Dx och båda referensmetoderna
Neutrofil- och lymfocyträkning	5 st
Neutrofil- och monocytträkning	4 st
Neutrofil-, lymfocyt- och monocytträkning	2 st
Totalt antal oacceptabelt felaktiga resultat	11 st

Tabell 2. Resultat i procentenhet från differentialräkning av neutrofiler, lymfocyter och monocytter med ProCyte Dx och Advia 2120 i de elva proverna med oacceptabla resultat (avvikelser som överstiger 15 procentenheter är markerade med röd text)

	%NEU			%LYMF			%MONO		
	ProCyte Dx	Advia	Differens	ProCyte Dx	Advia	Differens	ProCyte Dx	Advia	Differens
Hund 1	2,5	67	-64,5	23,2	17,7	5,5	73,3	9,7	63,6
Hund 2	65,3	91,9	-26,6	14,3	5,1	9,2	20,2	2,2	18,0
Hund 3	27,0	84,1	-57,1	30,9	8,1	22,8	38,2	3,4	34,8
Hund 4	46,1	75,9	-29,8	36,5	16,3	20,2	15,3	4,0	11,3
Hund 5	15,5	74,5	-59,0	29,9	13,7	16,2	54,0	7,4	46,6
Hund 6	6,9	41,1	-34,2	53,6	28,8	24,8	32,3	27,0	5,3
Hund 7	11,0	53,5	-42,5	12,8	15,2	-2,4	75,5	24,6	50,9
Hund 8	70,1	87,6	-17,5	23,1	7,9	15,2	6,2	2,7	3,5
Hund 9	52,8	81,1	-28,3	30,3	11,1	19,2	15,3	5,7	9,6
Hund 10	64,8	87,0	-22,2	26,1	8,6	17,5	8,8	2,7	6,1
Hund 11	37,5	67,3	-29,8	31,0	19,3	11,7	30,2	9,6	20,6

I Figur 6 har resultaten från ProCyte Dx för de elva proverna räknats om till absolutantal ($10^9/L$) och jämförts med manuell differentialräkning. Tabell 3 visar resultat i absolutantal vid differentialräkning av neutrofiler med ProCyte Dx och manuell differentialräkning i de elva fallen med oacceptabla resultat. I tabellen visas även differensen och den relativa skillnaden mellan de båda neutrofilräkningarna för respektive hund. I dessa elva prover var den relativa skillnaden mellan resultat från ProCyte Dx och manuell differentialräkning för lymfocyter 181-518 % och för monocyter 132-1924 %.



Figur 6. Diagrammen visar resultat i absolutantal ($10^9/L$) vid differentialräkning av neutrofiler (a), lymfocyter (b) och monocyter (c) med ProCyte Dx och manuell differentialräkning i de elva fall som klassificerats som oacceptabla fel. De gröna linjerna indikerar referensvärden för respektive celltyp vid analys med ProCyte Dx. Svart linje indikerar $x=y$. Totala antalet leukocyter uträknat med ProCyte Dx användes för att generera resultat i absolutantal från den manuella differentialräkningen.

Tabell 3. Resultat i absolutantal ($10^9/L$) vid differentialräkning av neutrofiler med ProCyte Dx och manuell differentialräkning i de elva fallen med oacceptabelt felaktiga resultat

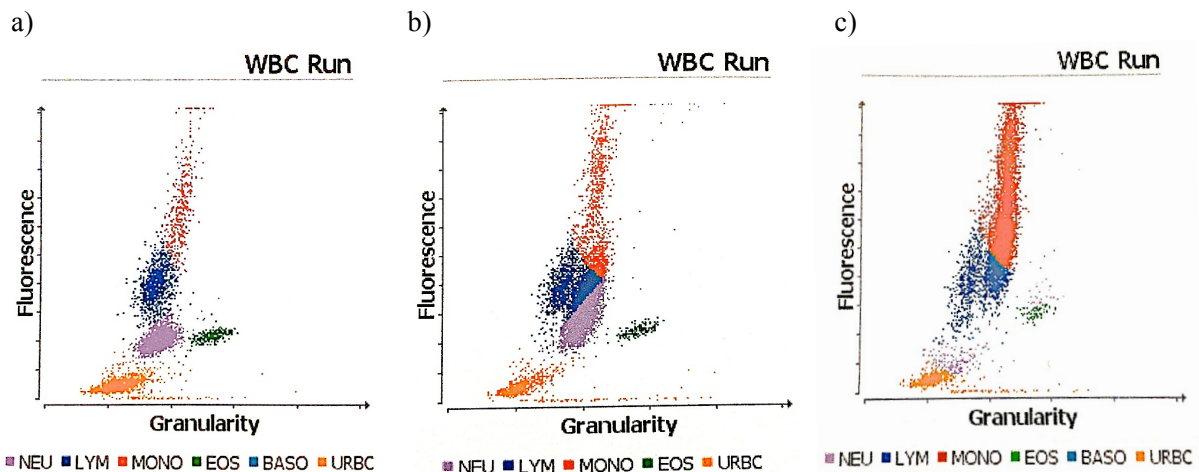
	#NEU ($10^9/L$)		Differens	Relativ skillnad (%)
	ProCyte Dx	Manuell		
Hund 1	0,22	5,93	-5,71	-96 %
Hund 2	13,48	19,82	-6,34	-32 %
Hund 3	3,64	11,87	-8,23	-69 %
Hund 4	3,89	6,75	-2,86	-42 %
Hund 5	0,27	1,25	-0,98	-78 %
Hund 6	0,72	4,70	-3,98	-85 %
Hund 7	0,30	1,95	-1,65	-85 %
Hund 8	7,21	9,77	-2,56	-26 %
Hund 9	17,91	25,09	-7,18	-29 %
Hund 10	6,46	8,37	-1,91	-23 %
Hund 11	3,67	7,53	-3,86	-51 %

Cytogram

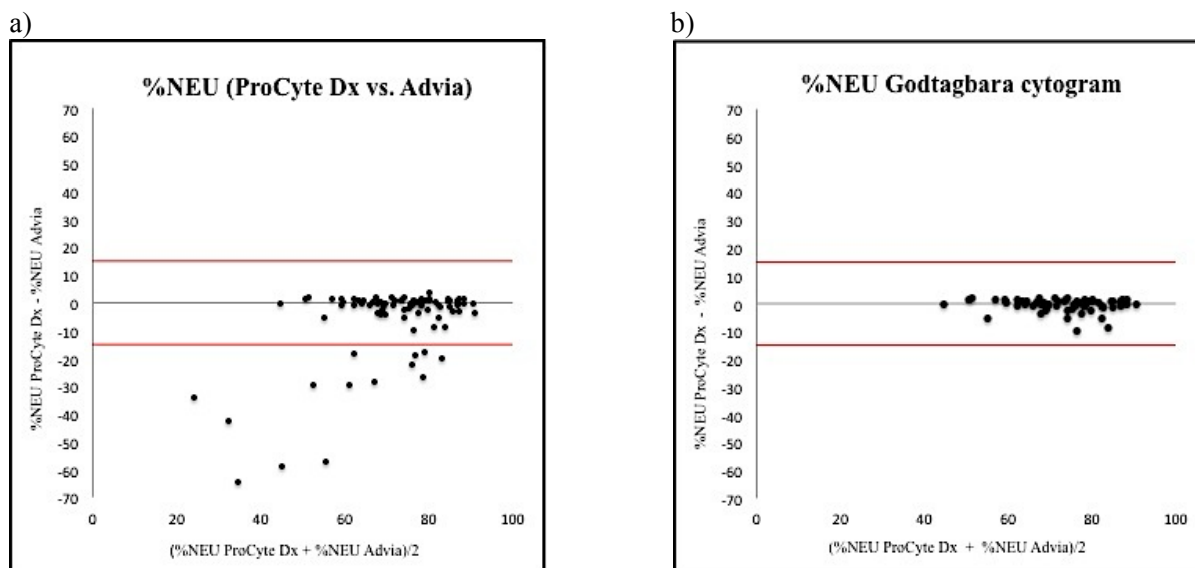
Av samtliga 86 cytogram bedömdes 62 (72 %) som godtagbara (grad ett och två) medan 24 (28 %) bedömdes som ej godtagbara (grad tre till fem). Samtliga cytogram från de elva proverna med oacceptabelt felaktiga resultat enligt studiens kriterier bedömdes som ej godtagbara. Tabell 4 visar graderingen av cytogram för dessa prover med inkorrekta resultat samt för totala antalet prover. Figur 7 visar exempel på cytogram med olika graderingar. Figur 8 visar en tydligt bättre överensstämmelse mellan ProCye Dx och Advia 2120 vid differentialräkning av neutrofiler då samtliga 24 prover med ej godtagbara cytogram exkluderats.

Tabell 4. *Fördelningen av de olika graderingarna vid bedömning av cytogram från ProCye Dx*

Gradering av cytogram	Prover med oacceptabelt felaktiga resultat (n=11)	Samtliga prover (n=86)
Godtagbart		
1	0 st	51 st
2	0 st	11 st
Ej godtagbart		
3	2 st	10 st
4	7 st	11 st
5	2 st	3 st



Figur 7. *Exempel på cytogram med olika graderingar. a) Cytogram med gradering ett. De olika cellpopulationerna bedöms som väl separerade från varandra. b) Cytogram med gradering tre. Separationen av neutrofiler (lila), lymfocyter (blå) och monocyter (röd) bedöms som otillräcklig då de tre cellpopulationerna överlappar varandra och instrumentets indelning sker med raka linjer mellan cellpopulationerna. c) Cytogram med den högsta graderingen (fem). I detta exempel har ProCye Dx inte klarat av att identifiera neutrofilerna som finns uppe i området för lymfocyter och framförallt monocyter där det är en indistinkt separation mellan dessa celltyper. ProCye Dx har därför givit upphov till falskt låga värden för neutrofiler och falskt höga värden för lymfocyter och monocyter.*



Figur 8. Bland-Altman-plottar som visar differensen mellan analysresultaten vid differentialräkning av neutrofiler med ProCyt Dx och Advia 2120 före (a) respektive efter (b) att de 24 proverna med ej godtagbara cytogram exkluderats. Röda linjer representerar gränsvärdet 15 procentenheter som antogs för att klassificera resultat som oacceptabelt felaktiga. En tydligt bättre överensstämmelse ses mellan ProCyt Dx och Advia 2120 efter att prover med ej godtagbara cytogram exkluderats.

Larm, vänsterförskjutning och toxiska förändringar

Instrumentlarmet ”Band neutrophils suspected” från ProCyt Dx var aktiverat vid analys av samtliga elva prov med oacceptabla fel i leukocyträkningen. I åtta av dessa elva prover var även larmet ”WBC Abnormal distribution” aktiverat vid analys med ProCyt Dx. Vid tre av de elva avvikande proverna var därmed endast ”Band neutrophils suspected” aktiverat. Av samtliga 86 prover aktiverades ”Band neutrophils suspected” i 28 prover (32,5 % av fallen). ”WBC Abnormal distribution” aktiverades i totalt 13 av de 86 proverna (15 %). I alla dessa 13 fall var ”Band neutrophils suspected” samtidigt aktiverad.

Samtliga elva prover med oacceptabla fel hade vänsterförskjutning vid manuell differentialräkning varav fyra av dessa med degenerativ vänsterförskjutning. Medianvärdet för andelen stavkärniga neutrofiler vid manuell differentialräkning var 38 % med en spridning mellan 16 % och 68 % för dessa elva prover där ProCyt Dx givit upphov till avvikande resultat. Medianvärdet för stavkärniga neutrofiler i samtliga 86 prover från hund var 6 %. I de 28 fall där larmet ”Band neutrophils suspected” aktiverats var medianen för stavkärniga neutrofiler 29 % med en spridning mellan 5 % och 68 %.

Samtliga elva prover med allvarliga avvikelser vid analys med ProCyt Dx hade påvisade toxiska förändringar vid manuell differentialräkning. Av samtliga 86 prover i studien hade 26 av dessa (30 %) toxiska förändringar vid manuell differentialräkning.

DISKUSSION

ProCyte Dx (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) är ett relativt nytt hematologiinstrument på den veterinära marknaden och instrumentet har vid tidigare valideringar visat sig överensstämma väl med referensmetoder vid analys av prover från hund och katt (Fujino *et al.*, 2013; Goldmann *et al.*, 2014). Det har dock uppmärksammats att instrumentet får problem med att separera neutrofiler från lymfocyter och ibland monocyter vid tillstånd som vänsterförskjutning och toxiska förändringar hos neutrofiler (Goldmann *et al.*, 2014; Tvedten *et al.*, 2017). I studien av Tvedten *et al.* (2017) kvantifierades mängden oacceptabelt felaktiga resultat vid differentialräkning av kattleukocyter med ProCyte Dx utifrån satta gränsvärden. I den studien såg man att ProCyte Dx genererade oacceptabla felräkningar i 13 % av fallen.

Målet med denna studie var att kvantifiera mängden oacceptabelt felaktiga resultat vid differentialräkning av hundleukocyter med ProCyte Dx. I studien sågs generellt en god överensstämmelse mellan analysresultat från ProCyte Dx och de båda referensmetoderna vid differentialräkning av neutrofiler, lymfocyter och monocyter. Tretton procent av provresultaten som genererades med ProCyte Dx bedömdes emellertid ha oacceptabla fel vid jämförelse mot både Advia 2120 (Siemens Medical Solution Diagnostics, Eschborn, Tyskland) och manuell differentialräkning. Majoriteten av dessa inkorrekta resultat berodde på en otillräcklig separation av neutrofiler och lymfocyter men i några fall sågs också att den otillräckliga separationen involverade alla tre celltyperna (neutrofiler, lymfocyter och monocyter). Det faktum att stavkärniga neutrofiler tenderar att vandra uppåt längs y-axeln och i första hand påverka lymfocytantalet men även i vissa fall monocytantalet är känt sedan tidigare (Goldmann *et al.*, 2014; Tvedten *et al.*, 2017). I denna studie upptäcktes det dock att fyra av de elva oacceptabla resultaten berodde på att neutrofilerna framförallt tenderade att vandra upp i området för monocyter utan att i någon större grad påverka lymfocytantalet. Antalet neutrofiler var i de elva avvikande resultaten tydligt lägre vid differentialräkning med ProCyte Dx jämfört med både Advia 2120 (Tabell 2) och manuell differentialräkning (Tabell 3) och istället var antalet lymfocyter och monocyter tydligt högre med ProCyte Dx jämfört med referensmetoderna vilket styrker misstanken om att neutrofilerna vandrar upp längs y-axeln i cytogrammet och därmed blir falskt låga i antal.

Denna studie styrker även misstanken om att tillstånd med vänsterförskjutning eller toxiska förändringar hos neutrofiler är den huvudsakliga bakomliggande orsaken till problematiken att separera hundleukocyter med ProCyte Dx. Samtliga hundprover med oacceptabelt felaktiga resultat vid analys med ProCyte Dx hade i den manuella differentialräkningen både vänsterförskjutning och toxiska förändringar. Som tidigare beskrivits är det den ökade RNA-mängden i cytoplasma hos stavkärniga neutrofiler och toxiska neutrofiler som ger upphov till en ökad fluorescens och därmed en placering högre upp längs y-axeln i cytogrammet (Goldmann *et al.*, 2014; Tvedten *et al.*, 2017). Det är av stor vikt för den praktiserande smådjursveterinären att upptäcka dessa förändringar då man tidigare visat att både toxiska neutrofiler och tillstånd med degenerativ vänsterförskjutning är tydliga indikatorer för allvarlighetsgrad och prognos i den pågående sjukdomen (Aroch *et al.*, 2005; Burton *et al.*, 2013).

De elva inkorrekt resultat från ProCyte Dx bedömdes i huvudsak som oacceptabla med avseende på instrumentets prestation snarare än ur klinisk synvinkel. Flera av de avvikande resultaten hade exempelvis en neutrofilmängd inom referensintervallet vid analys med både ProCyte Dx och referensmetoderna vilket troligtvis inte skulle påverka veterinärens kliniska bedömning av patienten. Vissa av de oacceptabelt felaktiga resultaten var dock mer kliniskt allvarliga än andra. I två av de elva proverna med avvikande resultat indikerade ProCyte Dx neutropeni medan manuell differentialräkning indikerade en normal mängd neutrofiler (Fig. 6a). Detta skulle kunna ha en stor påverkan på veterinärens kliniska bedömning. En patient med en normal mängd neutrofiler har bättre motståndskraft mot infektion jämfört med en patient med en neutrofilmängd nära noll (Prasse & Duncan, 1976). I dessa fall skulle resultatet från ProCyte Dx hypotetiskt kunna leda till förlängda vårdtider och ökade kostnader för djurägare på grund av en falskt sämre prognos. Beslut om antibiotikaterapi skulle också kunna påverkas då en individ med mycket få neutrofiler troligtvis skulle behandlas med antibiotika tidigare vid misstanke om infektion jämfört med en individ med normal mängd neutrofiler. Att ProCyte Dx felaktigt indikerar neutropeni tycks dock vara ett större problem vid analys av blodprover från katt jämfört med hund. I studien av Tvedten *et al.* (2017) indikerade ProCyte Dx felaktigt neutropeni hos sju av de 14 katterna med oacceptabla resultat vid jämförelse med Advia 2120.

Samtliga prover med oacceptabelt felaktiga resultat i denna studie bedömdes ha cytogram som ej var godtagbara. Efter att samtliga prover med ej godtagbara cytogram exkluderats sågs en tydligt bättre överensstämmelse mellan ProCyte Dx och Advia 2120 (Fig. 8). Genom att konsekvent studera de cytogram som genereras vid användandet av ProCyte Dx kan därmed resultat som riskerar att vara felaktiga avfärdas innan de överförs till djurens kliniska journaler och i värsta fall påverkar behandlingsval och resonemang kring prognos. I dessa fall bör användaren kontrollera resultaten genom en manuell differentialräkning och då kan även omogna eller toxiska neutrofiler upptäckas. Det var dock flera cytogram som bedömdes som ej godtagbara i denna studie där resultaten inte klassificerades som oacceptabelt felaktiga. Flera av dessa prover hade ändå stora avvikelser i differentialräkningen med ProCyte Dx men utan att nå upp till de kriterier som användes i denna studie för att klassificera ett resultat som oacceptabelt. Några av de prover med ej godtagbara cytogram hade dock en god överensstämmelse mellan ProCyte Dx och de båda referensmetoderna vilket skulle kunna innebära att några faktiskt korrekta provresultat avfärdas i onödan om man bedömer cytogram enligt de kriterier som användes i denna studie. Det bedöms dock vara mer värdefullt att kontrollera ett resultat för mycket snarare än ett för lite med manuell differentialräkning vid osäkerhet kring cytogram och resultat.

Larmet ”WBC Abnormal distribution” aktiveras då ProCyte Dx inte kunnat separera de olika cellpopulationerna tillräckligt. I tre av de elva oacceptabelt felaktiga resultaten aktiverades inte detta larm vilket innebär att man som användare av instrumentet inte helt kan förlita sig på aktiverade larm som grund för huruvida ett resultat kan accepteras eller ej. Även i studien av Tvedten *et al.* (2017) genererades felaktiga resultat vid differentialräkning av kattleukocyter med ProCyte Dx utan att larmet aktiverades. En noggrann bedömning av cytogrammet är därför ett säkrare sätt att upptäcka avvikande analysresultat. Larmet ”Band neutrophils suspected” var aktiverat i samtliga elva fall med oacceptabla fel. Detta larm

aktiverades dock i flera fall där resultaten inte klassificerats som oacceptabelt felaktiga varför man som användare inte kan förkasta samtliga resultat med detta larm aktiverat. Medianvärdet för stavkärniga neutrofiler vid de fall "Band neutrophils suspected" aktiverats var 29 % med en spridning från 5-68 % stavkärniga neutrofiler. Detta tyder på att larmet är en bra indikator för närvaro av stavkärniga neutrofiler. Att misstänka eller upptäcka vänsterförskjutning via larm eller inspektion av cytogram kan vara av stor vikt då exempelvis degenerativ vänsterförskjutning visat sig vara en klart negativ prognostisk indikator (Burton *et al.*, 2013).

De Bland-Altman-plottar (Fig. 5) som skapades för att illustrera differensen mellan resultat från ProCyte Dx och resultat från referensmetoderna visar en relativt liten skillnad för majoriteten av proverna vilket indikerar en god generell överensstämmelse. Man har tidigare diskuterat att automatiserade hematologiinstrument fungerar bra som screening av friska patienter eller vid fall av sjuka djur där rubbningar i hematologiska parametrar inte förväntas (Tvedten & Haines, 1994). Inflammatoriska tillstånd som pyometra eller vävnadsnekrosor kan ge upphov till vänsterförskjutning (Prasse & Duncan, 1976) och det är vid dessa tillstånd man främst bör vara uppmärksam på felaktiga resultat vid differentialräkning med ProCyte Dx. De elva patienter med oacceptabelt felaktiga resultat i denna studie led av olika tillstånd som exempelvis pyometra, gastroenterit, peritonit, endotoxemi och sepsis. Det är därför viktigt att komplettera den automatiserade differentialräkningen med en manuell differentialräkning vid allvarligt sjuka patienter.

En vanligt förekommande avvikelser som sågs i denna studie var att ProCyte Dx i flera prover indikerade monocytos trots att Advia 2120 indikerade en normal mängd monocyter. Detta sågs inte bara i de fall med oacceptabla resultat enligt studiens kriterier utan även i prover där resultaten i övrigt överensstämde väl. Detta skulle kunna vara en följd av att studien baseras på prover från sjuka hundar där stressleukogram är vanligt förekommande vilket kan vara en orsak till monocytos hos hund. Att Advia 2120 i dessa prover istället indikerat en normal mängd monocyter skulle kunna bero på att Advia 2120 tenderar att underskatta mängden monocyter vilket beskrivits tidigare (Tvedten & Lilliehöök, 2011).

I denna studie antogs gränsvärdet 15 procentenheter för differens i neutrofil-, lymfocyt- respektive monocyträkningen vid jämförelse mellan ProCyte Dx och de båda referensmetoderna. Gränsvärdet 15 procentenheter sattes utifrån skillnad i absolut procentenhet eftersom alla tre metoderna i studien baserar sina differentialräkningar på procentuell fördelning av de olika leukocytpopulationerna. Det publicerades nyligen rekommendationer från American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) kring gränsvärdena för acceptabla felräkningar vid differentialräkning av leukocyter. I dessa rekommendationer sattes gränsvärdena utifrån relativ procentuell skillnad gällande absoluta cellantalet ($10^9/L$). Gränsvärdena var 15 % för neutrofiler och lymfocyter samt 50-60 % för monocyter beroende på om monocytantalet är inom eller över referensintervallet (Nabity *et al.*, 2018). De elva proverna med oacceptabelt felaktiga resultat enligt gränsvärdena i denna studie hade en relativ procentuell skillnad i absolutantal mellan 23-96 % vid neutrofilräkning (Tabell 3), 181-518 % vid lymfocyträkning och 132-1924 % vid monocyträkning vid jämförelse mellan ProCyte Dx och manuell differentialräkning vilket är betydligt högre än de

nyligen rekommenderade gränsvärdena enligt ASVCP. Detta stärker resonemanget om att studiens gränsvärden är rimliga. Eftersom varje differens skulle överstiga 15 procentenheter gentemot båda referensmetoderna minskade risken för att ett provresultat skulle tolkas som felaktigt om det i själva verket var en av referensmetoderna som givit upphov till ett felaktigt resultat. Det är sedan tidigare känt att Advia 2120 ibland kan ha problem vid differentialräkning av monocyter och lymfocyter (Tvedten & Lilliehöök, 2011) vilket kan vara ett skäl till att ifrågasätta dess roll som referensmetod i denna studie. För att förhindra att eventuellt felaktiga resultat från Advia 2120 skulle kunna bidra till att resultat från ProCyte Dx tolkas som orättvist felaktiga användes därför även manuell differentialräkning som referensmetod. Därtill krävdes det dessutom att ProCyte Dx gav upphov till ett felaktigt resultat för både neutrofiler och minst en av celltyperna lymfocyter och monocyter. Det bedöms därför som osannolikt att något av de elva oacceptabla resultaten i denna studie skulle bero på något annat än felräkning av ProCyte Dx.

I denna studie sågs oacceptabelt felaktiga resultat från ProCyte Dx i 13 % av fallen vid differentialräkning av leukocyter i prover från hund vilket kan jämföras med resultatet i studien av Tvedten *et al.* (2017) där 13 % av fallen hade avvikande resultat med ProCyte Dx vid differentialräkning av leukocyter i prover från katt. I den studien sattes dock högre gränsvärden (23 procentenheter för neutrofiler och 18 procentenheter för lymfocyter, monocyter inkluderades ej i kriterierna). Trots att gränsvärdena sattes lägre i denna studie blev förekomsten av oacceptabelt felaktiga resultat densamma (13 %) vilket kan tyda på att ProCyte Dx är bättre på att separera leukocyter i blodprover från hund jämfört med katt.

Begränsningar i denna studie är som ovan nämnts att Advia 2120 inte är en optimal referensmetod när det kommer till differentialräkning av lymfocyter och monocyter hos hund. Även manuell differentialräkning som användes som referensmetod i denna studie har sina brister som exempelvis det faktum att endast 100 celler räknas vilket ger en relativt hög imprecision i resultaten (Kjelgaard-Hansen & Jensen, 2006). Ytterligare en begränsning i denna studie är antalet hundar som inkluderades. Precis som i alla studier ökar trovärdigheten med en större studiepopulation, men 86 hundar bedöms ändå vara en tillräckligt stor studiepopulation för att kunna dra slutsatser enligt ovan.

Sammanfattningsvis är ProCyte Dx oftast ett tillförlitligt hematologiinstrument vid differentialräkning av hundleukocyter. Instrumentet tillgodoser användaren med ett resultat inom några få minuter och vid samtliga 86 analyser i denna studie förlöpte analysen utan tekniskt strul. Som användare måste man dock veta att ProCyte Dx kan ge upphov till allvarligt felaktiga resultat vid framförallt inflammatoriska tillstånd hos hund och att man genom att studera cytogram och larm kan förhindra att felaktiga provresultat överförs till djurens kliniska journaler och påverkar den kliniska bedömningen.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Inledning och bakgrund

Vid medicinska utredningar av sjuka hundar och katter tas ofta ett blodprov som en del av det diagnostiska arbetet. En av de mest grundläggande blodprovsanalyserna är den hematologiska undersökningen som innebär att veterinären får information om röda och vita blodkroppar samt blodplättar. Vita blodkroppar är celler som är en viktig del av kroppens immunförsvar och genom att analysera dessa erhålls bland annat information om det inflammatoriska svaret vid exempelvis en infektion med bakterier, virus eller parasiter. Genom att studera vita blodkroppar kan även vissa former av cancer upptäckas. Det finns fem olika typer av vita blodkroppar som analyseras i blodet. Dessa är neutrofiler, eosinofiler, basofiler, lymfocyter och monocyter. Dessa celler skiljer sig åt både i utseende och funktion. Veterinären vill oftast veta hur många vita blodkroppar det finns totalt i blodet samt hur fördelningen av de olika celltyperna ser ut. Differentialräkning av vita blodkroppar innebär just att man räknar antalet av respektive typ av vit blodkropp. Detta kan ske antingen manuellt genom att titta i mikroskop (manuell differentialräkning) eller med ett hematologiinstrument (automatiserad differentialräkning). Det finns både för- och nackdelar med respektive metod. En fördel med den manuella differentialräkningen är att vissa specifika cellförändringar kan upptäckas vilket de automatiserade instrumenten inte klarar av. Fördelar med den automatiserade differentialräkningen är bland annat att analysen sker mycket snabbare och att betydligt många fler celler per prov räknas vilket ger ett mer exakt resultat.

Det finns idag flera olika automatiserade hematologiinstrument på marknaden. Ett utav de nyare instrumenten för analys av blodprover från hund och katt är ProCyte Dx (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). Detta instrument räknar vita blodkroppar genom en laserbaserad flödescytometrisk teknik vilket kortfattat innebär att varje cell färgas in och utsätts för laserstrålning för att instrumentet ska kunna mäta två olika parametrar (mängden nukleinsyra och cellernas komplexitet) för respektive cell. Utifrån dessa mått klassificerar ProCyte Dx respektive cell som en viss typ av vit blodkropp. Man har i två tidigare studier visat att ProCyte Dx utför hematologiska analyser av hund- och kattblod på ett acceptabelt sätt när instrumentet jämförts med både manuell differentialräkning och ett annat beprövat hematologiinstrument. Man har dock upptäckt att ProCyte Dx kan få svårt att skilja framförallt två typer av vita blodkroppar från varandra (neutrofiler och lymfocyter) vid vissa sjukdomstillstånd. I en studie av Tvedten *et al.* (2017) undersökte man hur ofta ProCyte Dx gav upphov till oacceptabelt felaktiga resultat för dessa celltyper vid analys av blodprover från katt. Man såg då att 13 % av kattens blodprovssvar var oacceptabelt felaktiga vid analys av vita blodkroppar med ProCyte Dx.

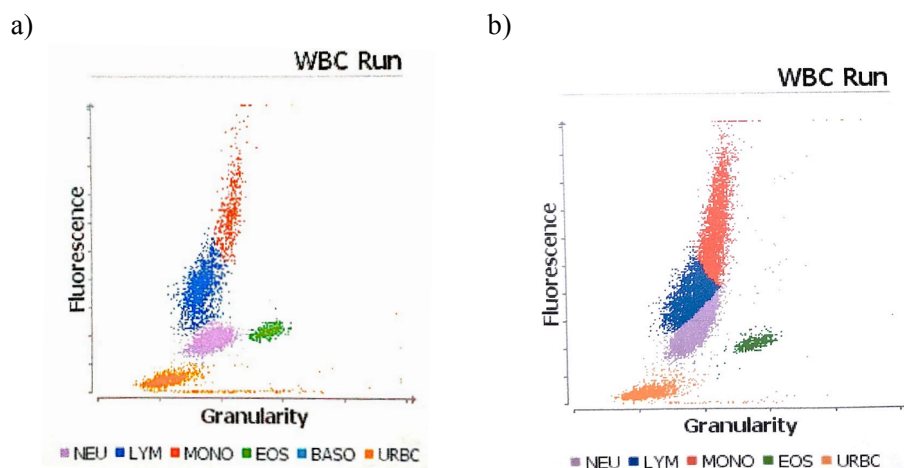
Målet med denna studie var att undersöka hur ofta dessa oacceptabla fel förekommer vid analys av vita blodkroppar i blodprover från sjuka hundar med ProCyte Dx. Målet var också att undersöka hur man som användare kan upptäcka att instrumentet givit upphov till felaktiga resultat.

Studiens upplägg

I denna studie räknades antalet vita blodkroppar i blodprover från 86 sjuka hundar med ProCyte Dx, manuell differentialräkning och ett annat automatiserat hematologinstrument, Advia 2120 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Escborn, Tyskland). Avvikelsen mellan resultaten från ProCyte Dx och de två andra metoderna noterades för varje typ av vit blodkropp. Gränsvärden och kriterier sattes för att bestämma hur stora avvikelser som krävdes för att klassificeras som oacceptabelt felaktiga resultat.

För varje analys svar skapar ProCyte Dx en typ av diagram (även kallat cytogram) som visar varje cells mått på de två parametrar som nämndes tidigare. Celler med mycket nukleinsyra hamnar högt upp längs cytogrammets vertikala axel medan celler med hög komplexitet hamnar långt åt höger i cytogrammet längs den horisontella axeln. Utifrån placeringen på detta cytogram så klassificerar instrumentet respektive cell som en viss typ av vit blodkropp. Vid optimala förutsättningar ligger cellansamlingarna för respektive celltyp väl separerade från övriga celltyper (exempelvis att neutrofilerna ligger väl separerade från lymfocyterna). Om cellansamlingarna istället överlappar varandra på cytogrammet kan det innebära att ProCyte Dx haft svårt att särskilja de olika typerna av vita blodkroppar. Som en del av denna studie bedömdes varje cytogram som antingen godtagbart eller ej godtagbart med avseende på hur väl separerade de olika celltyperna var ifrån varandra. Figur 9 visar ett exempel på ett cytogram med en godtagbar separation av vita blodkroppar respektive ett cytogram med en ej godtagbar separation av vita blodkroppar.

Utöver att ProCyte Dx skapar ett cytogram för varje analys svar så kan instrumentet även larma användaren om det var svårt att skilja vissa vita blodkroppar från varandra. I denna studie noterades därför också hur ofta instrumenten aktiverade larm vid analys av proverna från hund.



Figur 9. Exempel på cytogram skapade vid analys av vita blodkroppar i hundblod med ProCyte Dx. a) visar ett exempel på ett godtagbart cytogram där de olika ansamlingarna av respektive celltyp bedöms som väl separerade från varandra. b) visar ett exempel på ett ej godtagbart cytogram där tre ansamlingar av tre olika celltyper ligger dikt an varandra vilket indikerar att instrumentet haft problem att särskilja dessa celltyper från varandra. I detta fall har neutrofiler (lila) räknats som falskt låga medan lymfocyter (blå) och monocyter (röda) räknats som falskt höga.

Resultat och diskussion

Generellt var överensstämmelsen god vid jämförelse av analysresultat från ProCyte Dx och de två andra metoderna vid differentialräkning av vita blodkroppar i prover från hund. I elva av 86 fall (13 %) gav dock ProCyte Dx upphov till oacceptabelt felaktiga resultat enligt de kriterier och gränsvärden som antagits till denna studie. Dessa avvikande resultat berodde på att ProCyte Dx hade svårt att särskilja neutrofiler från lymfocyter och/eller monocyter vilket gjorde att instrumentet gav upphov till falskt låga värden för neutrofiler och falsk höga värden för lymfocyter och monocyter. I samtliga elva fall där ProCyte Dx hade oacceptabelt avvikande resultat bedömdes cytogrammet som ej godtagbart. Totalt bedömdes 24 av 86 (28 %) cytogram som ej godtagbara och efter att alla dessa 24 provresultat tagits bort sågs en tydligt bättre överensstämmelse mellan ProCyte Dx och de två andra metoderna. Genom att inspektera varje cytogram som skapas av ProCyte Dx kan därmed resultat som riskerar att vara felaktiga avfärdas och användaren kan istället utföra en manuell differentialräkning. I tre av de elva proverna med avvikande resultat aktiverades inte det larm som informerar om att ProCyte Dx haft problem att skilja mellan de olika celltyperna. Användare av ProCyte Dx kan därför inte helt förlita sig på att instrumentet larmar vid felaktiga resultat.

Både i denna studie som baserades på blodprover från sjuka hundar och i studien av Tvedten *et al.* (2017) som baserades på prover från sjuka katter sågs oacceptabelt felaktiga resultat i 13 % av fallen vid differentialräkning av vita blodkroppar. I studien med kattprover sattes dock högre gränsvärden vilket krävde ännu större avvikelser för att ett resultat från ProCyte Dx skulle klassificeras som oacceptabelt. Trots detta var förekomsten av oacceptabla fel densamma i blodprover från både hund och katt vilket kan tyda på att ProCyte Dx är bättre på att särskilja vita blodkroppar i blodprover från hund jämfört med katt.

Samtliga hundar som i vår studie fick oacceptabelt felaktiga resultat vid analys med ProCyte Dx hade tillstånd som kallas vänsterförskjutning och toxiska neutrofiler. Vänsterförskjutning innebär att det i blodet finns en ökad mängd omogna neutrofiler efter att benmärgen släppt ut nyproducerade neutrofiler trots att dessa inte varit färdigutvecklade. Toxiska neutrofiler innebär att vissa specifika förändringar i neutrofilernas utseende ses i mikroskop. Vänsterförskjutning och toxiska neutrofiler kan ses i samband med olika inflammatoriska tillstånd som exempelvis livmoderinfektion eller bukhinneinflammation. Både omogna och toxiska neutrofiler innehåller mer nukleinsyra än vanliga neutrofiler vilket gör att de hamnar högre upp i cytogrammet och närmre lymfocyter och monocyter (Fig. 9b). ProCyte Dx får därför problem att skilja mellan dessa celltyper. Att ProCyte Dx ibland ger upphov till falskt låga neutrofiler och falskt höga lymfocyter och/eller monocyter skulle kunna påverka veterinärens beslut kring behandling och prognos för patienten. Rent hypotetiskt skulle analysresultaten kunna leda till förlängda vårdtider, ökade kostnader för djurägare eller att behandling med antibiotika sätts in på felaktiga grunder på grund av en falskt dålig prognos.

Sammanfattningsvis visade denna studie att ProCyte Dx oftast överensstämmer väl med andra metoder för differentialräkning av vita blodkroppar hos hund. Vid inflammatoriska tillstånd hos hund kan dock instrumentet ge upphov till oacceptabelt felaktiga resultat. Dessa kan upptäckas genom att konsekvent inspektera de cytogram som skapas av ProCyte Dx för att på så sätt undvika att felaktiga resultat påverkar veterinärens bedömning av den sjuka hunden.

REFERENSER

- Aroch, I., Klement, E. & Segev, G. (2005). Clinical, biochemical, and hematological characteristics, disease prevalence, and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 19, ss. 64–73.
- Barger, A. M. (2003). The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 33, ss. 1207–1222. DOI:10.1016/S0195-5616(03)00100-1
- Bauer, N., Nakagawa, J., Dunker, C., Failing, K. & Moritz, A. (2012). Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000 i VTM compared to the ADVIA® 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 24 (1), ss. 74–89. DOI: 10.1177/1040638711436243
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, vol. 303 (5663), ss. 1532–1535. DOI: 10.1177/1040638711436243
- Burton, A. G., Harris, L. A., Owens, S. D. & Jandrey, K. E. (2013). The prognostic utility of degenerative left shifts in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 27, ss. 1517–1522. DOI: 10.1111/jvim.12208
- Day, M. J. (2010). Biology of lymphocytes and plasma cells. I: Douglas J. Weiss & K. Jane Wardrop (red). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. uppl. Ames, IA: Wiley-Blackwell
- DeNicola, D. B. (2011). Advances in hematology analyzers. *Topics in Companion Animal Medicine*, vol. 26 (2), ss. 52–61. DOI: 10.1053/j.tcam.2011.02.001
- Fujino, Y., Nakamura, Y., Matsumoto, H., Fukushima, K., Takahashi, M., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2013). Development and evaluation of a novel in-clinic automated hematology analyzer, ProCyte Dx, for canine erythrocyte indices, leukogram, platelet counts and reticulocyte counts. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 75 (11), ss. 1519–1524. DOI: 10.1292/jvms.13-0264
- Goldmann, F., Bauer, N. & Moritz, A. (2014). Evaluation of the IDEXX ProCyte Dx analyzer for dogs and cats compared to the Siemens ADVIA 2120 and manual differential. *Comparative Clinical Pathology*, vol. 23, ss. 283–296. DOI:10.1007/s00580-012-1608-1
- Harris, N., Kunicka, J. & Kratz, A. (2005). The ADVIA 2120 hematology system: Flow cytometry-based analysis of blood and body fluids in the routine hematology laboratory. *Laboratory Hematology*, vol. 11, ss. 47–61. DOI: 10.1532/LH96.04075
- Hostetter, S. J. (2012). Neutrophil function in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 42, ss. 157–171. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.09.010
- IDEXX Laboratories. (2014). *IDEXX ProCyte Dx* Hematology Analyzer Operator's Guide*. Westbrook, Maine, USA. Tillgänglig: <https://www.idexx.com/files/procyte-dx-operators-guide-en.pdf> [2018-11-03]
- Kjelgaard-Hansen, M. & Jensen, A. L. (2006). Is the inherent imprecision of manual leukocyte differential counts acceptable for quantitative purposes? *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 35 (3), ss. 268–270.
- Klenner, S., Richartz, J., Bauer, N. & Moritz, A. (2010). Myeloperoxidase deficiency in dogs observed with the ADVIA120. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, vol. 3, ss. 139–146.
- Knoll, J. S. & Rowell, S. L. (1996). Clinical hematology: in-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, vol. 26 (5), ss. 981–1002.
- Lilliehöök, I., Gunnarsson, L., Zakrisson, G. & Tvedten, H. (2000). Diseases associated with pronounced eosinophilia: a study of 105 dogs in Sweden. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 41, ss. 248–253.

- Lilliehöök, I. & Tvedten, H. (2009). Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 38 (2), ss. 175–182. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2009.00126.x
- Lilliehöök, I. & Tvedten, H. W. (2011). Errors in basophil enumeration with 3 veterinary hematology systems and observations on occurrence of basophils in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 40 (4), ss. 450–458. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00353.x
- Lilliehöök, I., Tvedten, H. W., Bröjer, J., Edner, A. & Nostell, K. (2016). Time-related changes in equine neutrophils after experimental endotoxemia: myeloperoxidase staining, size, and numbers. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 45 (1), ss. 66–72. DOI: 10.1111/vcp.12334
- Moritz, A., Fickenscher, Y., Meyer, K., Failing, K. & Weiss, D. J. (2004). Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 33 (1), ss. 32–38.
- Morse, E. E., Nashed, A. & Spilove, L. (1989). Automated differential leukocyte counts. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, vol. 19 (3), ss. 155-160.
- Nabity, M. B., Harr, K. E., Camus, M. S., Flatland, B. & Vap, L. M. (2018). ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 47, ss. 9-21. DOI: 10.1111/vcp.12583
- Pohlman, L. M. (2010). Basophils, mast cells, and their disorders. I: Douglas J. Weiss & K. Jane Wardrop (red). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. uppl. Ames, IA: Wiley-Blackwell
- Prasse, K. W. & Duncan, J. R. (1976). Clinical Interpretation of Leukocyte Abnormalities. *Veterinary Clinics of North America*, vol. 6 (4), ss. 581-595.
- Rishniw, M. & Pion, P. D. (2016). Evaluation of performance of veterinary in-clinic hematology analyzers. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 45 (4), ss. 604–614. DOI: 10.1111/vcp.12398
- Rizzi, T. E., Meinkoth, J. H. & Clinkenbeard, K. D. (2010). Normal hematology of the dog. I: Douglas J. Weiss & K. Jane Wardrop (red). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. uppl. Ames, IA: Wiley-Blackwell
- Santoro, P. (2018). Manual methods vs automated hematology analyzers in veterinary hematology. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 47, s. 178. DOI: 10.1111/vcp.12611
- Schnelle, A. N. & Barger, A. M. (2012). Neutropenia in dogs and cats: causes and consequences. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 42, ss. 111–122. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.09.008
- Shmuel, D. L. & Cortes, Y. (2013). Anaphylaxis in dogs and cats: Anaphylaxis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, vol. 23 (4), ss. 377–394. DOI: 10.1111/vec.12066
- Siemens. (2006). Operatörshandbok, ADVIA 2120 *Hematology System*, REF 067D0147-01, V. 2.00.00, 2006-12. Eschborn, Tyskland: Siemens Medical Solution Diagnostics
- Stirn, M., Moritz, A. & Bauer, N. (2014). Rate of manual leukocyte differentials in dog, cat and horse blood samples using ADVIA 120 cytograms. *BMC Veterinary Research*, vol. 10, s. 125. DOI: 10.1186/1746-6148-10-125
- Tvedten, H. & Haines, C. (1994). Canine automated differential leukocyte count: study using a hematology analyzer system. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 23 (3), ss. 90–96.
- Tvedten, H. W., Andersson, V. & Lilliehöök, I. E. (2017). Feline differential leukocyte count with ProCyte Dx: frequency and severity of a neutrophil-lymphocyte error and how to avoid it. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 31 (6), ss. 1708–1716. DOI: 10.1111/jvim.14815
- Tvedten, H. W. & Lilliehöök, I. E. (2011). Canine differential leukocyte counting with the CellaVision DM96Vision, Sysmex XT-2000iV, and Advia 2120 hematology analyzers and a manual method: Canine differential leukocyte counting. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 40 (3), ss. 324–339. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00347.x

- Weiss, D. J & Souza, C. D. (2010). Monocytes and macrophages and their disorders. I: Douglas J. Weiss & K. Jane Wardrop (red). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. uppl. Ames, IA: Wiley-Blackwell
- Young, K. M. & Meadows, R. L. (2010). Eosinophils and their disorders. I: Douglas J. Weiss & K. Jane Wardrop (red). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. uppl. Ames, IA: Wiley-Blackwell
- Zinkl, J.G., (1981). The leukocytes. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 11 (2), ss. 237–263.