

EXAMENSARBETE

Våren 2015

Sektionen för Lärande och Miljö
Biomedicinsk laboratorievetenskap

Hur påverkas CellaVision DM1200:s förklassificering av leukocyternas infärgning?

Författare

Lina Andersson

Handledare

Lina Axelsson

Camilla Streimer

Examinator

Ann-Sofi Rehnstam-Holm

Sammanfattning

Sammansättningen av leukocyter i perifert blod varierar med olika sjukdomstillstånd och analys av cellerna är avgörande vid diagnostisering och uppföljning av olika leukemier. Manuell mikroskopering och utvärdering av leukocyterna är tidskrävande och inte alltid självklar eftersom det krävs personal med hög kompetens och erfarenhet för bedömning av cellerna. En tillförlitlig förklassificering av den manuella differentialräknaren CellaVision DM1200 är därför av stort intresse för att underlätta kvantifiering och klassificering av cellerna. För att se om instrumentets förklassificering påverkades av infärgningen undersöktes färglösningens inverkan genom ändringar i fosfatbuffertens pH. Blodutstryk som härstammade från 10 patientprov färgades in med buffertar med pH 6.0, 6.8 och 7.5. Studien visade på en god positiv korrelation i samtliga pH-justerade buffertar, men med bäst resultat för pH 6.0 och 6.8. CellaVision DM1200:s förklassificering av eosinofila granulocyter påverkades mest av pH ändringar, vilket kan förklaras av deras starkt acidofila granula.

Nyckelord

Leukocyter, Neutrofila granulocyter, Eosinofila granulocyter, Basofila granulocyter, Monocyter, Lymfocyter, Omogna celler, Automatiserade cellräknare, May Grünwald-Giema, Romanowsky, fosfatbuffert, Differentialräkning, CellaVision DM1200.

Abstract

In peripheral blood the composition of leukocytes vary due to diseases and therefore analysis of the cells is critical in diagnosing and monitoring various leukemias. Manual microscopy and evaluation of the leukocytes is time consuming and not always clear, and it requires educated staff with long experience to assess the cells. A reliable automatic pre-classification of the cells with the system CellaVision DM12000 is therefor of great interest to facilitate quantification and classification of leukocytes. To evaluate if the instrument's pre-classification were affected by staining, changes of the current staining solution used in clinical assessment where made by adjustment of the phosphate buffer pH. Examined blood smears that were descendent from 10 different samples were stained in buffers with pH 6.0, 6.8 and 7.5. This study showed a high positive correlation in all of the pH-adjusted buffers with the best results in pH 6.0 and 6.8. CellaVision DM1200's pre-classification of eosinophilic granulocytes were most affected by changes in pH, which can be explained by their strongly acidophilic granules.

Keywords

Leukocytes, Neutrophilic granulocytes, Eosinophilic granulocytes, Basophilic granulocytes, Monocytes, Lymphocytes, Immature cells, Automated cell counters, May Grünwald-Giema, Romanowsky, Phosphate buffer, Differential counts, CellaVision DM1200.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1. Inledning	4
1.1. Leukocyternas funktion i kroppen	4
1.1.1. Neutrofila granulocyter	4
1.1.2. Eosinofila granulocyter	5
1.1.3. Basofila granulocyter	5
1.1.4. Monocyter	5
1.1.5. Lymfocyter	6
1.2. Omogna celler	6
1.3. Automatiserade blodcellsräknare	7
1.4. Differentialräkningens betydelse	7
1.5. CellaVision® DM1200	8
1.6. Leukocyternas morfologi i May Grünwald-Giemsa färgning	8
1.7. Syfte	10
2. Metod	10
2.1. Beredning av bruksbuffert	10
2.2. Insamling och beredning av blodutstryk	10
2.3. Manuell differentialräkning i CellaVision® DM1200	11
Statistisk bearbetning	11
Etiska aspekter	12
3. Resultat	12
3.1. Samtliga leukocyter	12
3.2. DM1200 klassificering av enskilda celltyper	13
3.3. Övriga objekt	14
4. Diskussion	15
5. Slutsats	17
6. Tackord	17
7. Referenser	18
Populärvetenskaplig artikel	21
Bilagor	22

1. Inledning

1.1. Leukocyternas funktion i kroppen

Leukocyterna utgör en av kroppens främsta skyddsbarriärer mot infektioner. Mängden leukocyter är individuell och sammansättningen av cellerna kan snabbt förändras vid olika sjukdomsförlopp, infektioner eller cytostatikabehandlingar (Dale *et al.* 2008). Kvantifiering och bedömning av leukocyternas morfologi är avgörande vid upptäckter av olika blodsjukdomar (Guo *et al.* 2013; Sehgal *et al.* 2013). CellaVision DM1200 är ett automatiskt cellokaliseringsinstrument som underlättar manuell bedömning av leukocyterna genom att presentera en förklassificering i överskådliga bilder (Bengtsson, 2015).

Leukopeni definieras som ett leukocytantal som hamnar under referensintervallen (Dale *et al.* 2008). Vid infektioner och leukemier kan det förekomma både leukopeni eller ett förhöjt antal, leukocytos. (Guo *et al.* 2013). Förändringarna i antal kan vara både relativa och absoluta. En relativ ökning definieras som en intern ökning inom ett visst cellslag men att det totala leukocytantalet ligger inom referensintervallen. Leukocyterna delas in i neutrofila, eosinofila och basofila granulocyter samt de mononukleära cellerna, lymfocyter och monocyter. De neutrofila granulocyterna och lymfocyterna är de dominerande celltyperna i blodet. Trots detta integrerar de knappt med varandra då de har en separat aktivering och reglering vid olika sjukdomstillstånd (Adewoyin & Nwogon, 2014). Förhållandet mellan lymfocyter och neutrofiler har däremot visat sig ha ett stort fördiagnostiskt värde vid olika cancertyper.

Monocyterna och de neutrofila granulocyterna härstammar från samma stamcell. Denna stamcell har i sin tur bildats från en myeloid stamcell som även formar två andra stamceller. Den myeloida stamcellens föregångare är en annan multipotent stamcell som även bildar en lymfoid stamcell (Ohshima *et al.* 2014). Samtliga differentierade stamceller mognar sedan till olika typer av blaster. Granulocyterna genomgår flest mognadsstadie. Samtliga myeloblaster mognar till promyelocyter. Därefter differentierar cellerna till sina specifika cellinjer i form av myelocyter. Först när cellerna når metamyelocytstadiet slutar de att delas och mognar vidare till stavkärniga granulocyter och slutligen till färdiga segmenterade granulocyter (Adewoyin & Nwogon, 2014).

1.1.1. Neutrofila granulocyter

De neutrofila granulocyterna har mycket cytoplasma i förhållande till den segmenterade kärnan. Kärnans utseende är karakteristiskt för samtliga granulocyter och det är framförallt deras granulering som morfologiskt skiljer dem åt (Palmer *et al.* 2014). De består av tre sorters granula, azurofila (primära), specifika (sekundära) och gelatinasinnehållande (tertiära) (Munafó *et al.* 2007). I blodet delas de neutrofila granulocyterna upp till en cirkulerande pool (som mäts vid analys) och till en marginalpool. Distribueringen av de neutrofila till blodbanan kan variera vid olika tillfällen då cellerna kan lagras temporärt i marginalpoolen längs venolernas kärlväggar och på så sätt hålla sig utanför cirkulationen, samtidigt som de snabbt kan rekryteras vid behov. Vid exempelvis fysisk eller psykisk ansträngning kan detta ge upphov till pseudoneutrofili, vilket har påvisats i möss som utsatts för kronisk stress (Jin *et al.* 2013). Övriga granulocyter finns i en reservpool av mogna granulocyter i benmärgen (Dale *et al.* 2008). De cirkulerande cellerna har en viktig roll vid akuta inflammatoriska tillstånd och ingår i den första försvarslinjen, de kan vid cellskada och bakterieangrepp migrera ut i vävnaderna och eliminera hot genom fagocytos (McFarlin *et al.* 2014). Det har i studier visats att frisättning av de neutrofilas azurofila granula sätter igång digestionen av mikroberna (Shafer *et al.* 1986; Greenwald och Ganz, 1987). Avdödandet av mikroorganismerna sker även genom frisättning av granula ut i den extracellulära matrixen (Munafó *et al.* 2007). Neutrofili är alltså en ospecifik indikation på att kroppen genomgår någon typ av inflammatorisk reaktion och visar sig främst

vid bakterieangrepp och andra akuta inflammationer, som exempelvis brännskador (Adewoyin & Nwogon, 2014). En kraftig ökning av neutrofila granulocyter med en möjlig förekomst av omogna celler kan ses vid svåra infektioner och sepsis. Det sker då en rekrytering av de lagrade cellerna till den cirkulerande poolen (Gregory *et al.* 2007). En sådan kraftig ökning liknar cellbildningen vid kronisk myeloisk leukemi (KML) och kallas därför leukomoid reaktion (Granrot *et al.* 2003).

1.1.2. Eosinofila granulocyter

Eosinofila granulocyter har tydliga karakteristiska granula som framhävs vid infärgning. De utgör en liten fraktion av leukocyterna och ökar i antal vid infektioner orsakade av parasiter eller kronisk allergi (Adewoyin & Nwogon, 2014). De eosinofila cellerna verkar direkt cytotoxiskt på parasiter och deras ägg (Cadman *et al.* 2014). I senare studier har de även visat sig vara involverade i patologiska processer beroende på deras lokalisering, exempelvis i immunologiska reaktioner i magtarmkanalen (Kita, 2010). Cytokiner styr bildandet och mognaden av eosinofila granulocyter och triggar igång dess aktivering i vävnader vid allergiska processer, som allergisk astma. Denna aktivering kan medföra potentiella vävnadsskador på grund av att granulans innehåll av basiska proteiner ger en toxisk effekt på vävnaden (Lavinskiene *et al.* 2015).

1.1.3. Basofila granulocyter

Basofila granulocyter som är relaterade till allergiska reaktioner utgör den minsta andelen av leukocyterna (Adewoyin & Nwogon, 2014). Deras grova framträdande cytoplasmiska granula har en stark metakromisk färgbarhet på grund av deras innehåll av högsulfaterade proteoglykaner (Granrot *et al.* 2003). De innehåller histamin som utlöser de allergiska reaktionerna. Mastceller, som är en annan större leukocyt, är också involverade i överkänslighetsreaktioner. De båda cellerna utvecklas i benmärgen och innehåller histamin men övrigt innehåll skiljer dem åt (Cromheecke *et al.* 2015). Det har till exempel visats att responsen av basofila granulocyter ökar med allvarlighetsgraden av den allergiska reaktion som fås hos patienter med nötallergi (Santos *et al.* (2015). Basofilin i patienterna som fick mildare reaktioner såsom svullen hals var inte lika omfattad som hos de som gick in i anafylaktisk chock. Basofili kan förutom vid allergiska reaktioner även förekomma vid exempelvis akut myeloid leukemi (AML) och KML (Cromheecke *et al.* 2015).

1.1.4. Monocyter

Monocyterna är stora celler och har en stor variation av formen på kärnan (Palmer *et al.* 2014). Den utflytande cytoplasman har fina granula som ger ett småkornigt utseende, vanligtvis med förekomst av vakuoler. Precis som hos de neutrofila har monocyterna liknande azurofila granula. Ju längre monocyterna kommit i differentieringen desto färre granula finns i cellerna (Miwa, 1998). Monocyterna bildas i benmärgen och cirkulerar sedan i en omogen form i blodet. Därefter migrerar de till vävnaderna där de mognar och blir färdiga, potenta celler, så kallade vävnadsmakrofager. (Dale *et al.* 2008). Makrofagerna är väldigt anpassningsbara och är olika med avseende på funktion, morfologi och metabolism beroende på vilken vävnad de befinner sig i (Granrot *et al.* 2003). De fagocyterar större främmande mikroorganismer och tar även hand om apoptotiska neutrofiler och andra endogena celler såsom gamla erythrocyter och död vävnad. De bidrar på så sätt till kroppens läkning. Vid vävnadsskada är ofta makrofagerna först på plats då dessa redan befinner sig i vävnaden. Makrofagerna sätter igång den inflammatoriska processen genom utsöndring av cytokiner som reglerar hematopoesen (Dale *et al.* 2008). De sänder även signaler som stimulerar migrationen av neutrofiler till en skada (Singh *et al.* 2014).

Vid maligna sjukdomar som kronisk myeloisk leukemi (KML) samt långdragna inflammatoriska tillstånd som till exempel tuberkulos kan monocytos observeras (Adewoyin & Nwogon, 2014).

1.1.5. Lymfocyter

Lymfocyterna har en stor kärna i förhållande till cytoplasman och är ofta små, runda med en kromatintät rund kärna (Palmer *et al.* 2014). Deras centrala roll inom immunsystemet är att de står för kroppens immunologiska minne och är på så sätt ansvariga för hela försvaret mot virus, bakterier och andra antigen (Balagopalan *et al.* 2011). Lymfocyterna migrerar kontinuerligt från kärlbanan till vävnaderna för att senare återföras. Lymfopeni eller lymfocytos kan förekomma på grund av rubbningar i själva distributionen av recirkulerande lymfocyter (Granrot *et al.* 2003). Lymfocyterna delas främst in i benmärgsderiverade B-lymfocyter och tymusderiverade T-lymfocyter (figur 1) (Henderson & Adams 2012). Cellerna bildar separata minnesceller som känner igen den substans eller organism som tidigare utlöst kroppens försvarsreaktion (Balagopalan *et al.* 2011). Vid samma reaktion omvandlas B-lymfocyterna till plasmaceller och bildar då antikroppar mot de främmande mikroorganismerna (Matsuda *et al.* 2015). Plasmaceller hittas ytterst sällan i blodet. Vad som istället kan förekomma i lite större utsträckning vid exempelvis virusinfektioner är plasmaliknande celler, så kallade plasmacytoida lymfocyter (Theml *et al.* 2002). Det är morfologiskt svårt att skilja på B- och T-lymfocyterna genom manuell mikroskopering, de kan istället klassificeras med hjälp av riktade monoklonala antikroppar (Vithayasai *et al.* 1997). Denna metod benämns som flödescytometrisk immunofenotypning och används för en tidig bedömning av en möjlig kronisk lymfatisk leukemi (KLL) (Craig & Foon, 2008). Vid KLL ses ett förhöjt antal lymfocyter med en homogen mogen cellbild som involverar B-lymfocyterna (Ansari *et al.* 2014). Dessa lymfocyter är mycket ömtåligare än normalt och går lätt sönder vid preparation (Palmer *et al.* 2014). Absolut lymfocytos ses vid akuta virusinfektioner som exempelvis mononukleos. Vid mononukleos förekommer dessutom aktiverade lymfocyter som avviker i avseende på färg och form. De är något större än vanligt med en riklig vakuoliserad cytoplasma med ett blåtonat utseende. Kärnan är ofta oregelbunden och uppluckrad, vanligen med förekomst av nukleoler (Adewoyin & Nwogon, 2014).

Natural killer (NK)-celler, som också är lymfocyter identifierar infekterade celler eller cancerceller. NK-celler skiljer sig morfologiskt åt då de är lite större och har få större, framträdande granula. Vid infektioner till följd av stroke har en ökning av NK-celler påvisats i cirkulationen. (De Raedt *et al.* 2015).

1.2. Omogna celler

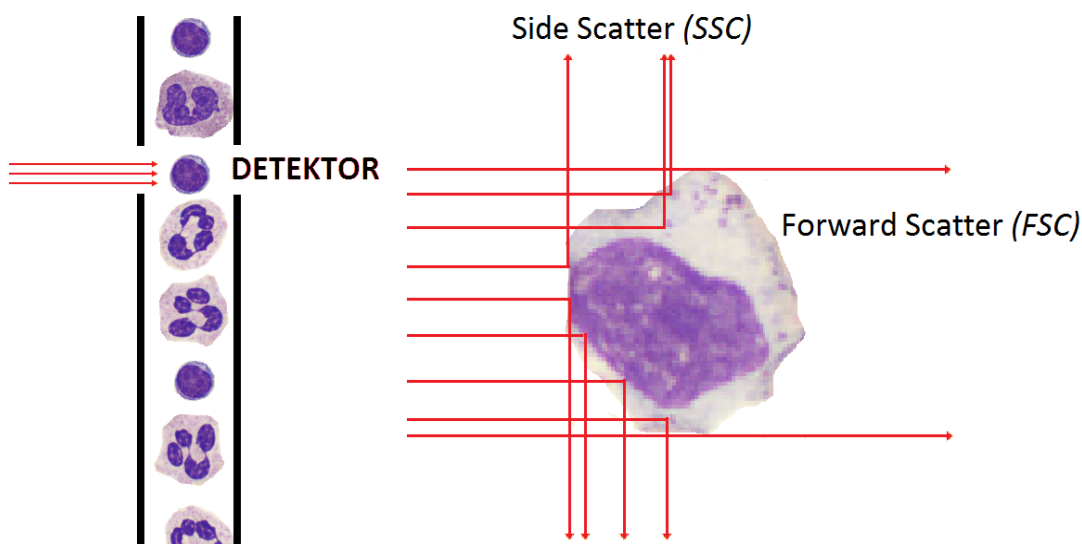
Vid akuta immunreaktioner krävs en snabb rekrytering av leukocyter vilket medför en ökad risk för omogna celler i blodet (Gabrolovich & Nagaraj, 2009). Sannolikheten att de omogna cellerna, särskilt myelocyter, metamyelocyter och stavformiga granulocyter, skulle påträffas i blodbanan ökar parallellt med en leukocytos (Gregory *et al.* 2007). Ju omognare cellerna är desto mer sällan återfinns de i blodet. Förskjutning av den perifera mognadsgraden i blodet benämns som left shift (Dale *et al.* 2008). De omogna cellerna har en undertryckt effekt på immunreaktioner och ger ett ökat uttryck av bland annat reaktiva syrgasföreningar, ROS, som har visats karakteristiskt hos cancerpatienter (Gabrolovich & Nagaraj, 2009). En omogen cellbild med förekomst av exempelvis blaster tyder på patogenicitet. Det är i praktiken möjligt att finna i princip alla leukocytmognadsstadier i det perifera blodet (Invernizzi *et al.* 2015). Upptäckten av omogna celler är avgörande för diagnostisering av leukemier och det är därför

viktigt att kunna särskilja dessa från övriga celltyper. Förekomst av dessa celler i blodet speglar oftast ett akut tillstånd hos patienten (Björnsson *et al.* 2008).

1.3. Automatiserade blodcellsräknare

Det finns flera metoder som utvecklats de senaste årtiondena som utför automatiskt differentialräkning av leukocyter. Majoriteten av dessa analysinstrument har svårt att skilja och klassificera abnormala, atypiska och omogna celler då de inte ger någon större morfologisk information (Kim *et al.* 2014). Istället varnar instrumentet vid närvaro av dessa och kräver en manuell differentialräkning. Därför anses den manuella metoden fortfarande som standardmetoden (Rollins-Raval *et al.* 2012).

Sysmex XN2000 (Sysmex AB, Kobe, Japan) är en automatisk differentialräknare som använder sig av flödescytometri för att kvantifiera och storleksbestämma leukocyter. Det görs även en panel av screeningar för erytrocyt- och trombocyt-abnormaliteter (Ceelie *et al.* 2006). Blodproven tas venöst eller kapillärt i provrör med antikoagulans, Ethylene diamine tetra-acetic Acid (EDTA) (Adewoyin & Nwogon, 2014). Inför mätningarna späds en del av provet med olika buffertar för att särskilja cellerna. Buffertarna innehåller en tensid som lyserar erythrocyter samtidigt som de gör leukocyternas cellmembran permeabelt, vilket möjliggör infärgning av nukleinsyror. Därefter injiceras provet i flödescellen där vätskestrålen fokuseras i ett sheat fluid och endast en cell passerar i taget. För varje cell görs tre mätningar med en röd halvledarlaser. Ljusspridningen mäts i framåtgående riktning, forward scatter (FSC) och åt sidan, side scatter (SSC), se figur 1. FSC ger en bild av cellens skugga och används för att storleksbestämning medan SSC ger ett mått på organellernas reflektion och ger information om granulering samt kärnstrukturen. Det görs även en flourosensmätning vinkelrätt mot laserstrålen, sideflourosens (SFL) som ger information om leukocyternas nukleinsyror. Genom skillnader i flourosensintensitet och ljusspridning delas cellerna sedan upp i olika klasser och presenteras i två-dimensionella scattergram (Matsushita *et al.* 2011).



Figur 1. Schematisk bild över flödescytometrins sheat fluid och ljusspridning.

1.4. Differentialräkningens betydelse

Då automatiserade cellräknare ger väldigt begränsad morfologisk information och är oförmögna att klassificera omogna och abnormala celler, görs ett blodutstryk i ordning för

mikroskopisk undersökning av de patologiska cellerna när en kvantifiering krävs (Ceelie *et al.* 2006). Det bör även ske en komplettering i form av manuell differentialräkning om patienten har leukocytos eller leukopeni, för att försäkra sig om var rubbningen finns (Kim *et al.* 2014). Även vid normalt leukocytantal sker en differentialräkning om någon form av klinisk misstanke föreligger som till exempel leukemi eller om det finns ett förändrat antal inom ett visst cellslag (Björnsson *et al.* 2008). Det finns olika interna kriterier och regler på laboratorier publicerade av aktuell instrumenttillverkare för hur de olika systemen hanterar onormala värden (Hang Lee *et al.* 2013). Allvarlig leukopeni försvårar differentialräkningen av celler då det krävs att minst 200 celler klassificeras. Då patienter med leukopeni ofta lider av leukemi påverkar sjukdomens behandlingar även cellernas morfologi och de blir därför mycket svårare att klassificera (Kim *et al.* 2014). Automatiserade cell-lokaliseringsinstrument har utvecklats, som tar digitala bilder av cellerna i blodutstryken i syfte att underlätta bedömningen (Hang Lee *et al.* 2013).

1.5. CellaVision DM1200

CellaVision DM1200 (CellaVision AB, Lund, Sweden) är ett automatiserat cell-lokaliseringsinstrument avsedd för att underlätta differentialräkning av leukocyterna. Trombocytuppskattning och erytrocyternas morfologi kan samtidigt bedömas (CellaVision, 2014). Instrumentet lokaliserar ett monolager av erytrocyter och varje potentiell leukocyt på en låg upplösning. Därefter tas digitala bilder av varje enskild cell eller objekt med hög upplösning (Hang Lee *et al.* 2013). Utifrån en lagrad databas över de vanliga cellernas morfologi görs en förklassificering som sedan presenteras i datorn. Detta möjliggör en visuell bedömning och jämförelse av hela cellpopulationer istället för att granska varje cell för sig (Ceelie *et al.* 2006). Systemet listar även en andra- och tredjeklassificering (CellaVision, 2014). Kännetecken såsom storlek, form och infärgning är parametrar som vägs in och bidrar till utvärderingen av cellerna. En legitimerad biomedicinsk analytiker (BMA) identifierar och verifierar förklassificeringen av varje cell och korrigerar resultatet om så behövs (Ceelie *et al.* 2006). Cellerna klassificeras som stavkärniga neutrofiler, segmenterade neutrofiler, eosinofila, basofila, lymfocyter, monocyter, promyelocyter, myelocyter, metamyelocyter, blastceller, variantlymfocyter, jättetrombocyter, trombocyttaggregat, söndriga celler, artefakter eller erytroblaster (Bengtsson, 2015).

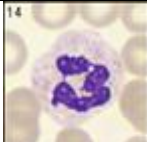
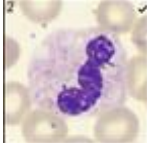
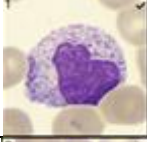
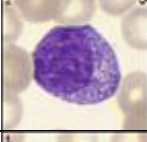
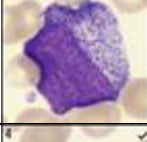
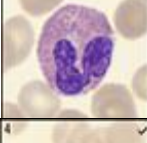
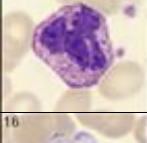
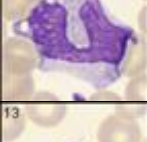
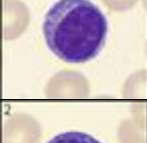
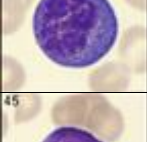
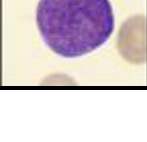
1.6. Leukocyternas morfologi i May Grünwald-Giemsa färgning

Inför manuell differentialräkning kan blodutstryken färgas in med May Grünwald-Giemsa (MGG) för att framhäva cellstrukturerna och möjliggöra en korrekt klassificering (Bengtsson, 2015). Leukocyterna är helt färglösa i sitt naturliga tillstånd (Theml *et al.* 2002). Då manuell differentialräkning är aktuell ska blodet helst beredas inom 2 timmar efter provtagningen (Adewoyin & Nwogon, 2014).

Morfologin och infärgningen av de olika cellerna och cellkomponenterna redovisas förkortat i tabell 1. Cellkärnorna består av olika kromatinmönster beroende på celltyp och färgas mörkare än resterande kärnan. Ju omognare cellen är ju slätare och finare framstår kärnan (Invernizzi *et al.* 2015). I vissa cellkärnor kan även RNA-innehållande nukleoler urskiljas. Denna struktur framträder som en rund ljusblå eller mörkblå cirkel beroende på celltyp och är som tydligast i omogna celler (Rodak & Carr, 2013). Cytoplasman innehåller matrix och cellorganeller som Golgie-apparaten och ribosomer. En välutvecklad Golgie-apparat kan ses i plasmaceller som ett upplyst område intill den mörka kärnan (Miwa, 1998). I cytoplasman kan oftast leukocyternas granula urskiljas. De primära granula som börjar framträda i promyelocytstadiet är lite grövre och färgas brunlila (Adewoyin & Nwogon, 2014). De neutrofilas sekundära

granulering har ett neutralt pH och erhåller därför färg från både eosin och metylenblått vilket ger ett ljuslila utseende, deras primära granula kan inte visuellt urskiljas (Rodak & Carr, 2013).

Tabell 1. Sammanställning av de olika celltypernas morfologi och infärgning i MGG (Rodak & Carr, 2013).

Celltyp	Utseende	Storlek (μm)	Kärnstruktur	Kromatin	Cytoplasma	Granulering
Segmenterad neutrofil		10-15	Består av 2-5 lober förbundna av tunna filament utan visuell kromatin	Oregelbunden klumpad	Ljusrosa, beigeaktig eller färglös	Primär: Sällsynta Sekundär: Riktigt
Stavkärnig neutrofil		10-15	Ihopdragen >50 %, tydliga lober med tjockare filament	Måttligt oregelbunden klumpad	Ljusblå till rosa	Primär: Få Sekundär: Riktigt
Metamyelocyt (Neutrofil)		10-15	Bönformad inbuktning mindre än 50 % av diametern	Lite oregelbunden. Måttligt klumpad	Ljusrosa till beige till färglös	Primär: Få Sekundär: Många
Myelocyt (Neutrofil)		12-18	Rund till oval. Ofta en tillplattad sida	Lätt kondenserad. Lite oregelbunden. Kompaktare än promyelocyten	Basofilisk till beige. Kan ibland se golgia-apparaten	Primär: Få till måttlig Sekundär: Varierad. Lila-rosa
Promyelocyt		14-24	Rund till oval. 1-3 nukleoler	Knappt oregelbunden. Slät men inte lika som blasten	Basofilisk	Primär: Riklig granulering >20. Röd-lila till brun-lila
Eosinofil		12-17	Består av 2-3 lober förbundna av tunna filament	Oregelbunden klumpad	Beige till rosa, kan vara oregelbunden	Sekundära: Fåtal till rikligt. Runda rosa till orangea
Basofil		10-14	Ofta två lober förbundna av tunna filament	Oregelbunden klumpad	Lila till färglös	Sekundära: Fåtal till många. Mörka, grova, ojämnt fördelade
Monocyt		12-20	Stor variation, kondenserad ofta lite veckad struktur. Kan ha nukleol	Måttligt klumpad, luckrad	Blå-grå. Kan ha pseudopoider och vakuoler	Primära: Många fina rosa granula
Lymfocyt		7-18	Rund/oval kan vara tillbucklad. Nukleoler kan förekomma	Kondenserad/ mycket kondenserad	Knapp till ljusblå	Primär: Fåtal rosa
Plasmacell		8-20	Rund/oval	Oregelbunden	Kraftigt basofilisk. Ofta med en ljusare zon runt kärnan	Inga
Blastcell		15-20	Rund till oval Nukleoler	Slät och jämn	Basofilisk, blå	Frånvarande eller upp till 20

Kärnans infärgning och intensitet i förhållande till cytoplasman framhävs i MGG-färgningen enligt Romanowsky-effekten (Marshall *et al.* 1978). Första steget i färgningen är May Grünwald lösningen som är en snabb infärgning som innehåller metylenblått, eosin Y och metanol. Metanolen har som uppgift att dehydrera cellerna och fixera cellerna till objektglaset. (Rodak & Carr, 2013). Infärgningen är beroende av ett specifikt pH för att de olika cellkomponenterna ska framträda. Blodutstryken genomgår tvättar i en pH-optimerad fosfatbuffert (Horobin, 2011). CellaVisions rekommendationer är en bruksbuffert vars pH är 6,8 (CellaVision, 2014). Nästa steg är Giemsa-brukslösning, där Giemsa är löst i bruksbufferten. Giemsa är en polykrom färg då den innehåller både eosin Y samt metylenblått och Azur B (Barcia, 2007). Eosin Y som är en sur anjonfärg binder in till basiska komponenter i cellerna som exempelvis hemoglobin och de eosinofila acidofila granula. De basiska färgerna metylenblått och Azur B färgar istället in sura, negativa cellkomponenter som exempelvis DNA, RNA och vissa granula. Katjonen azur B är degradationsprodukten till metylenblått och bidrar till att leukocyternas kärnor färgas starkt lila (Horobin, 2011). Enbart methyleneblått ger inte denna färg på kärnorna men bidrar till effekten genom att färga basofilisk cytoplasma ljusblå. Marshall *et al.* (1975 b) gjorde en studie där inverkan av azure B undersöktes, färglösningar utan azure B färgade kromatinet blått istället för lila. Romanowsky-effekten som framträder i Giemsa uppstår då natriumsaltet av eosin Y och kloriden av azure B konverterar och bildar ett komplex (Barcia, 2007). Basiska och sura färger möjliggör jonbytarprocessen. Protonupptaget attraherar de negativt laddade färgerna som i detta fall är eosin Y för att neutralisera de positiva jonerna. Azure B som är en katjonfärg neutraliserar de negativa jonerna på exempelvis DNA genom jonutbyte vid inbindning (Horobin, 2011).

1.7. Syftet med studien

Syftet med studien var att undersöka om någon förändring kunde uppnås gällande instrumentets förklassificering av celler genom ändringar i pH vid infärgningen av blodutstryken. Cellavision AB har nyligen bytt plattform från DM96 till DM1200 och ville undersöka hur pH ändrade förklassificeringen för att försäkra att det rekommenderade pH:t på 6.8 var optimalt.

2. Metod

2.1. Beredning av bruksbuffert

Två olika stambuffertar bereddes. Till stambuffert A vägdes 45,39 g 0,067M (mol/dm³) Kaliumdivätefosfat upp med en och löstes i milliporevatten tills dess att slutvolymen av 5000 mL nåddes. Lösningen erhöll ett pH på 4,55. Till stambuffert B vägdes 59,38 g 0,067M di-Natriumvätefosfat dihydrat upp och späddes på samma sätt, här erhöles ett pH på 9,20. Utifrån de två stambuffertarna bereddes sedan tre olika bruksbuffertar med pH 6,0, 6,8 och 7,5. När pH i lösningarna var stabilt överfördes 310 mL från varje bruksbuffert till en 5000 mL E-kolv. Milliporevatten tillsattes tills dess att slutvolymen nåtts för att sedan hållas över i dunkar. Lösningarna blandades igen och pH kontrollerades. Inför varje färgning och byte av buffert blandades buffertarna noga.

2.2. Insamling och beredning av blodutstryk

90 perifera blodutstryck som härstammade från 10 separata patientprov ingick i studien. Både normala och abnorma prover inkluderades för att undersöka hur väl CellaVision DM1200 förklassificerade olika celltyper. Samtliga prover som inkluderades i studien kördes först i den automatiska cellräknaren, Sysmex XN2000. Fyra av proverna visade på normala förhållanden

där cellpopulationerna låg väl avgränsade i de presenterade scatterdiagrammen utan några som helst tecken på abnormaliteter. Fördelningen av de olika celltyperna låg inom de angivna referensvärdena som presenteras i tabell 2.

Tabell 2. Aktuella referensvärden vid Klinisk Kemi i Helsingborg. Värdena representerar blodprover från vuxna

	<i>Neutrofila granulocyter</i>	<i>Eosinofila granulocyter</i>	<i>Basofila granulocyter</i>	<i>Lymfocyter</i>	<i>Monocyter</i>
Referensintervall					
Vuxna ($\times 10^9/L$)	1,7–8,0	<0,7	<0,3	1,1–4,8	<1,1

Därefter valdes sex specifika patologiska, abnorma prover ut med varierande kliniska förhållanden. Samtliga prover hade definierats som patologiska av instrumentet och krävde manuell differentialräkning. Abnormaliteter som KLL, omogen myelopoies, aktiverade lymfocyter, eosinofili och leukocytos förekom. Resultaten för respektive patientprov efter analysen i XN2000 redovisas i bilaga 1.

Samtliga blodprov ströks ut på objektglas 2-4 timmar efter provtagningstillfället med en mekanisk utstrykare, Molek Diffsmear (Molek AB, Årsta, Sweden). Ett av de abnorma proverna avvek från rutinerna då det ströks ett helt dygn efter provtagningen. Samtliga blodutstryk färgades in inom sex timmar efter att provet strukits ut. Tre differentialutstryk från samma patientprov färgades i respektive bruksbuffert, vilket resulterade i totalt 30 blodutstryk för varje färgning. Blodutstryken färgades med en Molek Diffstainer (Molek AB, Årsta, Sweden). Från en färdig Giemsa-lösning togs 12 mL för att sedan blandas upp med 200 mL av den aktuella bruksbufferten.

2.3. Manuell differentialräkning i CellaVision® DM1200

Analyserna av 200 celler per blodutstryk utfördes i CellaVision DM1200. För alla 90 diffutstryk resulterade detta i cirka 18 000 celler. Efter att datorn sammanställt sin förklassificering utfördes den slutgiltiga visuella bedömningen av leukocyterna och kontrollerades av en legitimerad BMA med lång erfarenhet. Instrumentets förmåga att klassificera celler infärgade med olika fosfatbuffertar jämfördes och utvärderades.

Statistisk bearbetning

Sambanden mellan DM1200:s förklassificering och den manuella omklassificeringen av de celler som färgats in med färgningsprotokoll med olika pH-justerade buffertarna jämfördes med en korrelationsanalys. En korrelationsanalys visade hur väl data överensstämde med en linjär regressionslinje. Korrelationskoefficienten (r) räknades ut och kvadrerades vid enkel linjär funktion, för att visa hur starkt det linjära sambandet var. R^2 benämns som detarminationskoefficienten och kan ligga mellan 0 och 1. En detarminationskoefficient nära 1 visar på en stark positiv korrelation (Körner & Wahlgren, 2002). Sambandet och noggrannheten undersöktes för samtliga celltyper infärgade i respektive buffert enligt en likvärdig statistisk metod som användes i studien av Hang le *et al.* (2013), då klassificering med CellaVision DM96 jämfördes med manuell mikroskopering. Bengtsson, (2015) använde sig av en regressionsanalys för att undersöka noggrannheten av det nyare instrumentet DM1200 mot referensmetoden DM96, här presenterades även detarminationskoefficienten för respektive

cell. Förutom linjära samband beräknades även andelen korrekt klassificerade celler av DM1200 och hur väl det stämde överens med det slutgiltiga resultatet.

Etiska aspekter

Det kliniska förhållningssättet i denna studie förhöll sig till de regler och riktlinjer som finns publicerade i förordning (2008:414) om kvalitets- och säkerhetsnormer vid hantering av mänskliga vävnader och celler följdes. Proven kan inte kopplas till en specifik patient och bryter därför inte mot personuppgiftslagen (1998:204; Codex, 2013).

3. Resultat

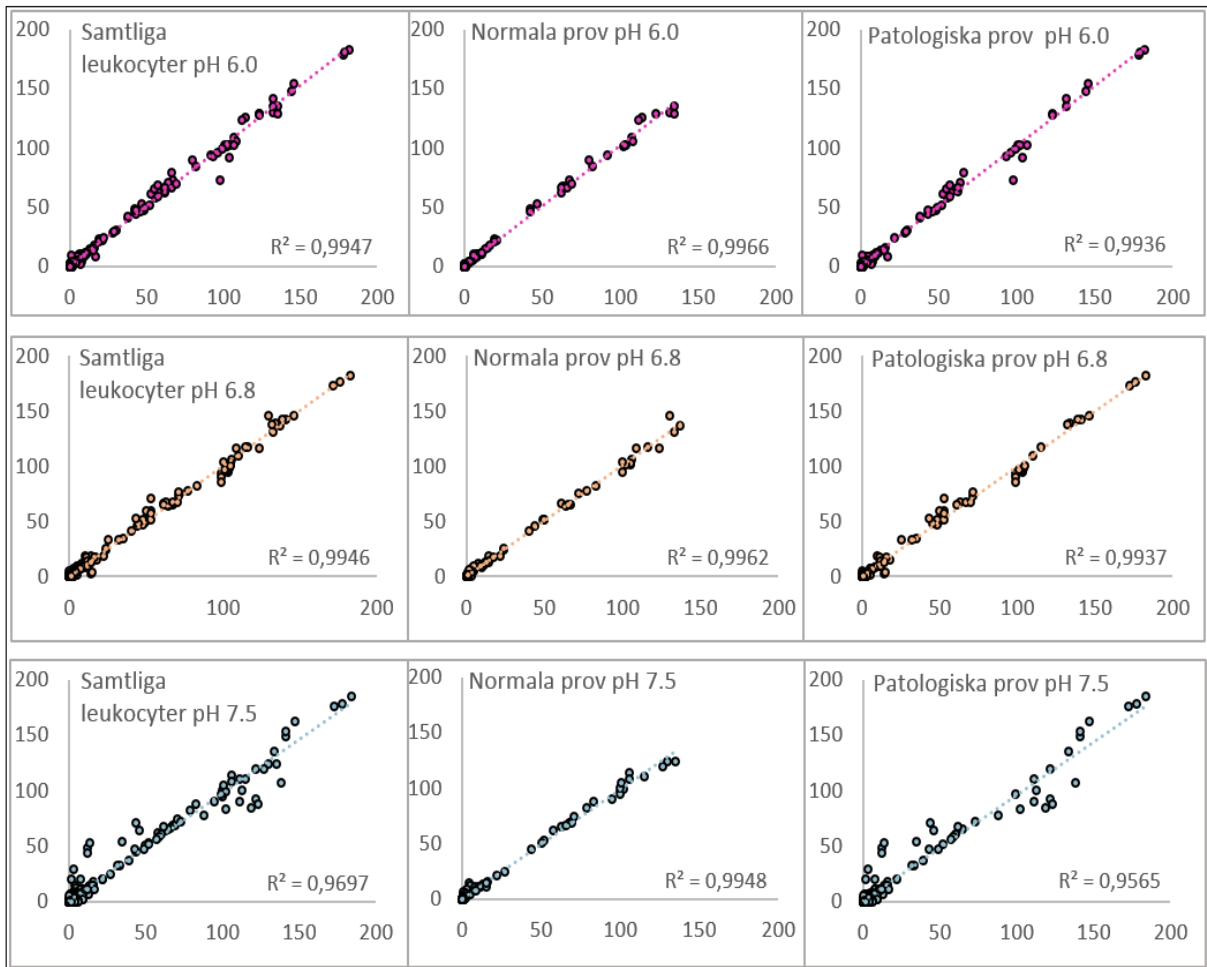
3.1. Samtliga leukocyter

Det totala antalet och andelen av leukocyterna som klassificerats av instrumentet i de olika infärgningarna visas i tabell 3. Tabellen visar även hur många leukocyter som klassificerats rätt och hur stor kvantitet som omklassificerats, detta inkluderar samtliga celler som flyttats även om den slutgiltiga fördelningen är densamma. I pH 7.5 har betydligt fler celler fått korrigerats manuellt. DM1200 gjorde en korrekt klassificering på 97.5 % av samtliga leukocyterna i pH 6.0, 96.5 % i pH 6.8 och 92.6 % i pH 7.5. Hur stor andel av de korrekt klassificerade cellerna som stämde överens med den slutgiltiga bedömningen redovisas i sista kolumnen. Tabellen visar på den högsta precisionen i pH 6.8 (95,4 %).

	<i>Totala antalet förklassificerade celler</i>	<i>Antalet celler korrekt klassificerade av DM1200</i>	<i>Totala antalet celler efter verifiering</i>	<i>Antalet omklassificerade celler</i>	<i>Andel celler korrekt klassificerade av DM1200</i>	<i>Andelen celler korrekt klassificerade i förhållande till verifierat resultatet</i>
pH 6.0	5898	5751	6069	465	97,5 %	94,8 %
pH 6.8	5904	5699	5976	482	96,5 %	95,4 %
pH 7.5	5793	5365	5887	950	92,6 %	91,1 %

Tabell 3. Resultatet av totala antalet leukocyter och DM1200 överrensstämmelse med omklassificeringen.

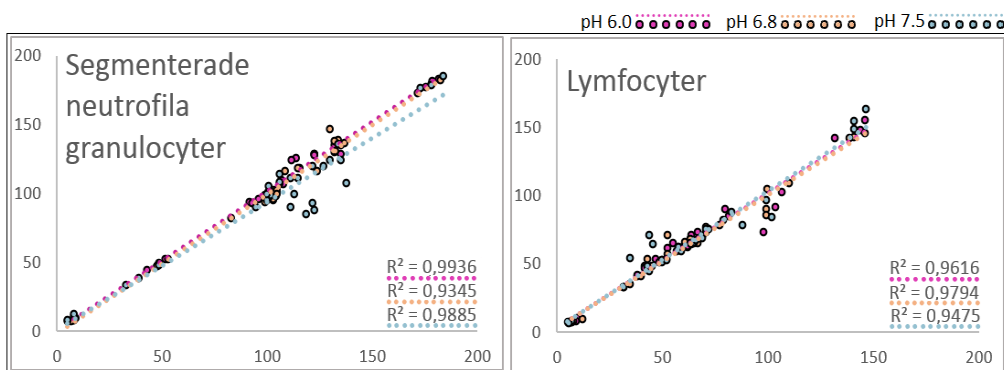
Resultatet av förklassificering som är den initiala klassificeringen av DM1200 visade på en god positiv korrelation i samtliga infärgningar. Determinationskoefficienten redovisas i diagrammen i figur 2 för respektive pH-buffert. En uppdelning gjordes mellan de normala och abnormala proverna som ingick i studien och presenteras i separata diagram. Här visar pH 7.5 på ett sämre samband. DM1200:s resultat visas på den vågräta axeln och den manuella bedömningen presenteras på lodräta axeln. För samtliga leukocyter gav determinationskoefficienten för pH 6.0 $R^2=0.9947$, pH 6.8 gav $R^2=0,9946$ och pH 7.5 gav ett R^2 -värde av 0,9697.



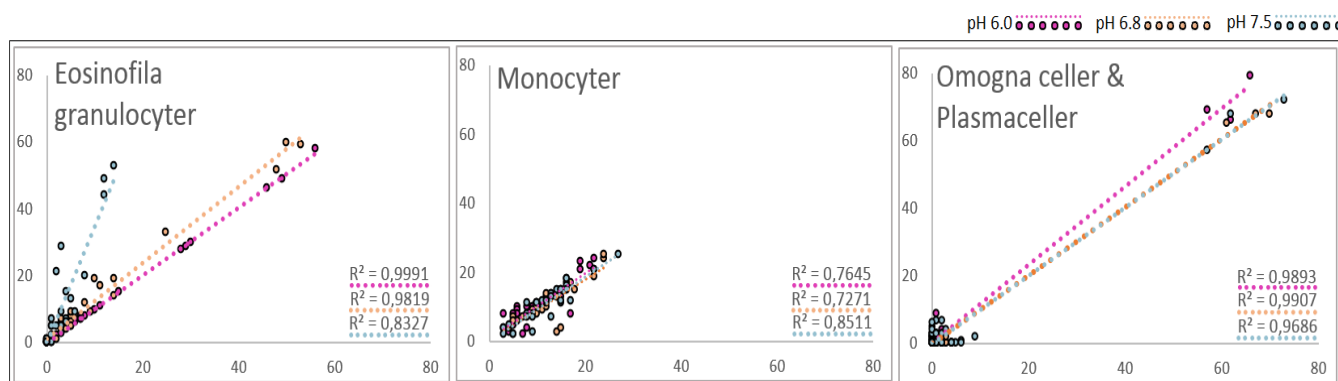
Figur 2. Korrelationen för respektive pH-buffert före och efter omklassificering.

3.2. DM1200 klassificering av enskilda celltyper

Hur väl DM1200 klarade av att klassificera respektive celltyp redovisas i figur 3 och 4. I vardera diagrammen presenteras en positiv linjär korrelation för samtliga pH-buffertar. De basofila granulocyterna visade på sämst korrelation i samtliga infärgningar och redovisas i bilaga 2. De omogna cellerna inkluderar blastceller, promyelocyter, myelocyter och metamyelocyter och samlades i ett gemensamt diagram tillsammans med plasmaceller, istället för att separera normala och patologiska prov (figur 3). DM1200:s resultat visas på den vågräta axeln och den manuella bedömningen presenteras på den lodräta axeln.



Figur 3. Korrelationen för DM1200:s klassificering och den slutgiltiga bedömningen.



Figur 4. Korrelationen för DM1200:s klassificering och den slutgiltiga bedömningen.

Den procentuella delen av respektive celltyp som förklassificerats korrekt presenteras i tabell 4. Tabellen visar samtliga celler härstammade från både de normala och abnormala proverna inom respektive celltyp. Här gjordes även en uppdelning på de olika myeloida cellerna och blastcellerna. Första kolumnen visar DM1200:s klassificering jämfört med det korresponderade resultatet. Kolumn två visar det korresponderande resultatet jämfört med den slutgiltiga klassificeringen.

Tabell 4. Sammanställning för hur väl DM1200:s klassificering stämde överens med den manuella valideringen.

Celltyper	Andelen celler korrekt klassificerade av DM1200			Andelen celler korrekt klassificerade av DM1200 i förhållande till verifierat resultat		
	pH 6,0	pH 6,8	pH 7,5	pH 6,0	pH 6,8	pH 7,5
Segmenterad neutrofil	99.1 %	97.5 %	92.5 %	97.8 %	98.1 %	98.3 %
Eosinofil	99.7 %	99.3 %	98.9 %	98.5 %	80.2 %	28.8 %
Basofil	85.0 %	64.0 %	84.6 %	56.7 %	51.6 %	52.4 %
Lymfocyt	96.7 %	97.6 %	96.9 %	93.6 %	95.6 %	92.2 %
Monocyt	88.8 %	88.1 %	86.2 %	86.1 %	95.7 %	92.4 %
Promyelocyt	100.0 %	33.3 %	11.1 %	25.0 %	50.0 %	20.0 %
Myelocyt	83.3 %	33.3 %	23.1 %	25.0 %	23.1 %	13.6 %
Metamyelocyt	22.2 %	40.0 %	16.7 %	28.6 %	13.3 %	6.7 %
Blast cell	98.4 %	93.7 %	95.4 %	85.9 %	96.0 %	95.4 %
Plasma cell	42.9 %	55.6 %	11.1 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %

3.3. Övriga objekt

Förutom leukocyterna registrerades samtliga objekt som DM1200 lokaliserade och klassificerade. Objekten inkluderar jättetrombocyter, trombocyttaggregat, erytroblast, megakaryocyter, söndriga celler, artefakter och även objekt eller celler som instrumentet inte klarat av att klassificera. Tabell 5 visar hur stor andel av dessa förklassificerade objekt samt leukocyter som klassificerats rätt. Störst noggrannhet erhöles i pH 6.8 med 94.3 %, därefter pH 6,0 med 94.0 % och lägst andel (90.6 %) korrekt klassificerade objekt erhöles i pH 7.5.

Tabell 5. Sammanställningen av de totala antal objekt som lokaliserats och klassificerats rätt av DM1200.

	Totala antalet objekt	Totala antalet korrekt klassificerade objekt	Andelen korrekt klassificerade objekt
pH 6.0	6655	6256	94.0 %
pH 6.8	7639	7201	94.3 %
pH 7.5	7747	7017	90.6 %

Kvantiteten av några av objekten efter den slutliga bedömningen av en legitimerad BMA visas i tabell 6 för respektive färgning. I pH-buffert 6.0 lokaliserades 36 jättetrombocyter, medan pH 6.8 och 7.5 lokaliserade 694 respektive 965. Tabellen visar även antalet oidentifierade objekt. De celler som inte kunde klassificeras alls, totalt 63, för samtliga färgningar hamnade under kategorin ej klassificerade och exkluderades ur studien.

Tabell 6. Totala antalet objekt i respektive färgning efter verifiering samt DM1200:s oidentifierade objekt.

Verifierade	pH 6.0	pH 6.8	pH 7.5
<i>Jättetrombocyter</i>	36	694	965
<i>Trombocyttaggregat</i>	0	8	27
<i>Söndriga celler</i>	443	556	528
<i>Artefakter</i>	87	380	318
<i>Ej klassificerade</i>	19	23	21
DM1200			
<i>Oidentifierade</i>	93	90	202

4. Diskussion

Totala andelen korrekt klassificerade leukocyter av DM1200 visade sig ha störst överensstämmelse med den manuella bedömningen i infärgning där buffert med pH 6.0 användes. Efter omklassificeringen stämde det slutgiltiga resultatet bäst överens med den korrekta förklassificeringen i pH 6.8. Leukocytfordelningar för samtliga prov sammanfattade i diagrammen i figur 3 visade på en likvärdig klassificering för pH 6.0 och 6.8. Determinationskoefficienten för pH 7.5 visade på något sämre korrelation, speciellt bland de abnormala proven där. Hur väl DM1200 klarade av att klassificera patologiska blodutstryk var av intresse då dessa kan medföra klassificeringssvårigheter även för erfaren kompetent personal. Aktiverade lymfocyter kan till exempel ibland misstas för monocyter och ge en felaktig diagnos (Balagopalan *et al.* 2011). De omogna cellerna samlades i ett gemensamt diagram i figur 5 då några av de normala proven innehöll fåtalet omogna celler trots att de inte var anmärkningsbara i Sysmex XN2000.

Det prov som avvek från protokollet och ströks ett helt dygn efter provtagningen exkluderades inte på grund av dess patologiska cellbild. Det var av intresse att undersöka DM1200 förmåga att klassificera patologiska blastceller. Under tiden för insamlingen var detta det enda prov med rikligt med blastceller som kom in till laboratoriet. Provet medförde en del svårigheter i klassificeringen eftersom EDTA efter en tid påverkar cellernas morfologi (Adewoyin & Nwogon, 2014). De myeloiska cellerna var speciellt svåra att klassificera då de var hypogranulerade. Blastcellerna kunde däremot lättare urskiljas. Ett av de normala proven innehöll en stor andel söndriga celler i samtliga utstryk. Celler som förklassificerats som söndriga, men trots det kunde identifieras placerades i respektive cellgrupp av en legitimerad

BMA. Instrumentets förklassificering var egentligen korrekt men då laboratoriets rutiner vid omklassificering skulle följas flyttades dessa celler. Eftersom det gällde samtliga utstryk som härstammade från samma prov bör det inte ha gett någon inverkan på resultatet då de olika infärgningarna ställdes mot varandra (Palmer *et al.* 2014).

En fosfatbuffert med pH 6.8 används på de flesta laboratorier. Förbättringar av de olika parametrarna som analyseras av DM1200 skulle kunna öka antalet morfologiska kategorier samt förbättra instrumentets förklassificering av celler (Ceelie *et al.* 2006). Bäst resultat bland celltyperna sågs bland de eosinofila i pH 6.0. Instrumentet visade på mycket god korrelation och missade få celler till skillnad från I pH 7.5 där de mörka eosinofila medförde svårigheter för DM1200. Den basiska miljön kan ha gjort att upptag av eosin Y lett till komplexbildning med azur B vilket resulterar i en mer röd-brun färg (Horobin, 2011). De eosinofila innehåller starkt basiska och cytotoxiska granulaprotein som är speciellt pH-beroende och känsliga för pH-förändringar. Deras starka affinitet till den sura färgen eosin gör att de färgas röd-orange (Barcia, 2007). Bäst korrelation bland de neutrofila sågs även i pH 6.0. I pH 7.5 klarade DM1200 av att bäst klassificera monocytter, i övrigt visade bufferten på sämst resultat bland övriga celler. Romanowski-effekten av kärnorna sågs i samtliga buffertar. Kontrasten mellan cytoplasman och kärnan var dock inte lika tydlig i pH 7.5 och kan ha bidragit till den sämre förklassificeringen.

Morfologin hos de basofila granulocyterna avvek i samtliga färgningar från det karakteristiska utseendet. Majoriteten var väldigt rödaktiga och saknade den distinkta mörka granuleringen. Förklassificeringen påverkades och även omklassificeringen medförde svårigheter. I ett av de abnormala proven med en myeloisk cellbild förekom hypergranulerade neutrofiler som var svåra att skilja från de basofila. Distributionen av basofilens granula kan vara ojämn på grund av att de tvättats ut under färgningen då de är vattenlösliga och kan därför ge intrycket av tomma fraktioner i cytoplasman (Theml *et al.* 2002).

Starkt basiska komponenter där eosinmolekylerna kan binda in tätt erhåller mest färg. Komponenter som innehåller färre proteiner och mer vatten erhåller inte lika mycket färg från eosin (Kiernan, 2010). Ändringar i pH påverkar infärgningen då den acidofila och basofila balansen rubbas (Barcia, 2007). Cellkomponenternas laddning styr deras infärgning och kan förklara pH-buffertarnas effekt på färgupptaget vilket tydligt ses på erythrocyterna i denna studie och även infärgningen av vissa granula. Då de elektriska laddningarna påverkas medför det att jonbytar-processen påverkas och influerar färgernas inbindningsmöjligheter (Horobin, 2011). Problemet med Romanowsky-färgningarna är att arbetslösningen är instabil. Lösningar bestående av en basisk och en sur färg ökar risken för precipitering av ett olösligt salt (Marshall *et al.* 1975a). Samtliga degraderingsprodukter av metylenblått bildar precipitat vid tillsats av eosin (Horobin, 2011). Något precipitat upptäcktes aldrig i denna studie vilket kan bero på att nya lösningar hölldes upp och byttes inför varje ny färgning. Marshall *et al.* (1975b) gjorde en studie som visade på att kombination av metyleneblått och azure B och eosin resulterade i minst kontaminationer av metallsalter. Denna kombination används även i May Grünwald-Giemsa som brukades i denna studie.

En visuell bedömning av erythrocyterna visade på tydliga skillnader. Ett högt pH resulterar i blå-gröna erythrocyter och även den polykroma kärninfärgningen är känslig för pH-ändringar. Vid pH 7-8 är infärgningen som mest intensiv och bleknar vid pH 6-5. Är bruksbufferterna så sura som 3.5 hämmas infärgningen helt (Barcia, 2007). I en studie av Marshall *et al.* (1975b) resulterade ett utbyte av bufferten från pH 6.8 till 7.2 i en orange-grå bild av erythrocyterna. Infärgningen av leukocyterna ansågs oförändrad. Ändringar i erythrocytbilden sågs även i denna studie, mindre skillnader kunde däremot även ses bland leukocyterna. I studien av Marshall *et*

al (1975a) testades olika Romanowsky-färgningar med en fosfatbuffert på 6.8 där MGG-färgningen visade på skillnader i infärgningen av erythrocyter från olika batcher. Att infärgningen varierat mellan olika batcher berodde på bildandet av precipitat. En annan studie gjordes där proverna färgades med en Romanowsky-färgning renad från metallsalter och jämfördes med MGG. Resultaten var likvärdiga förutom att den precipitat-fria Romanowsky färgningen gav ett konstant resultat medan MGG-infärgningen varierade (Marshall *et al.* 1978).

Det ska beaktas att högst antal artefakter och söndriga celler erhöles i pH 6.8, vilket kan ha medfört störningar i DM1200 förklassificering. Orsaken till den höga kvantiteten är okänd. Cellerna verkar minst känsliga för lägre pH och artefakterna minskar avsevärt. Resultatet I denna studie påvisade en stor skillnad mellan pH 6.0 och övriga pH, men med betydligt färre jättetrombocyter i samtliga utstryk infärgade med pH 6.0 där enbart 36 jättetrombocyter lokaliserades. Detta till skillnad från övriga buffertar där 694 respektive 965 st lokaliserades. Anledningen till detta kan vara den sura miljön som påverkar den sura infärgningen av de basofila trombocyterna vilket gör att de bleknar och undgår upptäckt av instrumentet. Inga artiklar har hittats som stödjer denna teori. Trombocyternas granulering ska erhålla lila färg från Romanowsky-effekten (Marshall *et al.* 1975a). Antalet oidentifierade celler och objekt var mer än dubbelt så många i pH 7.5 jämfört med resterande buffertar.

Det finns många begränsningar med studien då blodutstryken inte valdes slumpmässigt, vilket kan ha gett ett skevt resultat. Den procentuella andelen prover med patologiska celler är liten i rutinemässig hematologi och då svårigheterna föreligger vid förklassificering av abnorma celltyper gjordes medvetna selektiva urval. Trots det specifika urvalet var det väldigt låg andel basofiler, plasmaceller, omogna och abnorma celler i proverna. På grund av det låga antalet gav inte dessa celltyper ett tillförlitligt resultat. En möjlig felkälla i denna studie var att ingen kontroll av pH gjordes mer än vid buffertberedningen. Efter en muntlig konversation med en erfaren kemist på Klinisk Kemi i Helsingborg borde inte pH ha ändrats under en veckas tid då dunkarna förvarades stängda.

5. Slutsats

Denna studie visade på en god positiv linjär korrelation mellan DM1200 förklassificering och den slutgiltiga bedömningen av en legitimerad BMA i samtliga pH-optimerade fosfatbuffertar. Bäst resultat erhöles i pH 6.0 och 6.8. Ett högre pH medförde svårigheter för DM1200 att klassificera rätt, medan pH 6.0 visade på bäst korrelation med den biomedicinska analytikern i flera fall, däremot medför låga pH att jättetrombocyter och trombocyttaggregat undgår upptäckt av instrumentet. CellaVisions rekommendationerna av en bruksbuffert med pH 6.8 är validerad enligt denna studie.

6. Tackord

Jag skulle vilja tacka min handledare Camilla Streimer som hjälpt mig att sätta ihop en projektplan och bidragit till att studien blev genomförbar. Jag vill även ge ett stort tack till Elina och Lisa på CellaVision som kom med idén till studien och som har varit ett stort stöd för mig under kursens gång. Tack för att jag kunnat bolla idéer med er och för att ni lärt mig lite fler finesser med DM1200. Jag vill även tacka Ingrid för att du lagt ner tid och gjort den slutliga bedömningen på alla 90 blodutstryk. Slutligen så vill jag tacka Lina Axelsson som varit min handledare på högskolan, tusen tack för din support samt bra och snabb feedback.

7. Referenser

- Adewoyin, A.S & Nwogoh, B. (2014). Peripheral blood film - a review. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*. 12(2):71-9
- Ansari, M., Auerbach, M. & Bahrain, H. (2015). A case of CLL that was successfully treated resulted in the immediate development of AML from a coexistent myeloid line that had been suppressed. *Clinical Case Reports*. 3(3): 165-169
- Balagopalan, L., Sherman, E., Barr, V.A. & Samelson, L.E. (2011) Imaging techniques for assaying lymphocyte activation in action. *National Review Immunology*. 11(1): 21-33
- Barcia, J.J. (2007) The Giemsa Stain: Its History and Applications. *International Journal of Surgical Pathology*. 15(3):292-296
- Bengtsson, H-I. (2015)roll Clinical evaluation of leukocyte differential count performed by CellaVision DM1200 compared to CellaVision DM96 2nd study. *Quality Assurance Document*. KID-818
- Björnsson, S., Wahlström, S., Norström, E., Bernevi, I., O'Neill, U., Johansson, E., Runström, H. & Simonsson, P. (2008) Total Nucleated Cell Differential for Blood and Bone Marrow Using a Single Tube in a Five-Color Flow Cytometer. *Cytometry Part B*. 74(B): 91-103
- Cadman, E.T., Thyse, K.A., Bearder, S., Cheung, A.Y.N., Johnston, A.C. Lee, J.J. & Lawrence, R.A. (2014) Eosinophils Are Important for Protection, Immunoregulation and Pathology during Infection with Nematode Microfilariae. *PLoS Pathogens*. 10(3):e1003988
- Ceellie, H., Dinkelbaar, R. B. & van Gelder, W. (2006) Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *Journal of Clinical Pathology*. 60:72-79
- CellaVision AB. (2014). CellaVision® Användarhandbok. Ideon Science Park, Lund. Artikelnr: PM-10686
- Codex. (2013) Regler och riktlinjer för forskning. <http://www.codex.vr.se> [2015-05-24].
- Craig, F.E. & Foon, K.A. (2008) Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. (8):111
- Cromheecke J.L., Nguyen, K.T. & Huston, D.P. (2015) Emerging Role of Human Basophil Biology in Health and Disease. *Current Allergy Allergy and Asthma Reports*. 14(1):408
- Dale, D.C., Boxer, L. & Liles, W.C. (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 112(4)
- De Raedt, S., De Vos, A., Van Binst, A.M., De Waele, M., Coomans, D., Buyl, R. & De Keyser, J. (2015) High natural killer cell number might identify stroke patients at risk of developing infections. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*. 12:2(2):e71
- Gabrilovich, D.I. & Nagaraj, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 9(3) 162-174
- Granrot, P. O., Grubb, A. & Stenflo, J. (2003) *Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. 8 uppl.* Lund: Studentlitteratur. (723 s).
- Greenwald, G.I. & Ganz, T. (1987) Defensins Mediate the Microbicidal Activity of Human Neutrophil Granule Extract against *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infection and Immunity*. (6):1365-136
- Gregory, A.D., Hogue L.A., Ferkol T.W. & Link, D.C. (2007) Regulation of systemic and local neutrophil responses by G-CSF during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Blood*. 109(8): 3235-3243.
- Guo, W., Xing, C., Dong, A., Lin, X., Lin, Y., Zhu, B., He, M. & Yao, R. (2013) Numbers and cytotoxicities of CD3⁺CD56⁺ T lymphocytes in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia and acute lymphocytic leukemia. *Cancer Biology & Therapy*. 14(10):916-921

- Gustafson, M.P., Lin, Y., Maas, M.L., Van Keulen, V.P., Johnston, P.B., Peikert, T. Gastineau, D.A. & Dietz, A.B. (2015) A Method for identification and Analysis of Non-Overlapping Myeloid Immunophenotypes in Humans. *PLoS ONE*. 10:1371
- Hang Lee, L., Mansoor, A., Wood, B., Nelson, H., Higa, D. & Naugler, C. (2013) Performance of CellaVision DM96 in leukocyte classification. *Journal of Pathology Informatics*. 10.4103/2153-3539.114205
- Henderson, G. I. & Adams, P. M. (2012) *Leukocytes: Biology, Classification and Role in Disease*. Nova Biomedical. (197 s).
- Horobin, R.W. (2011). How Romanowsky stains work and why they remain valuable – including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotechnic & Histochemistry*. 86(1):36-51
- Invernizzi, R., Quaglia, F. & Della Porta, M.G. (2015) Importance of Classical Morphology in the Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 7(1): e2015035.
- Jin, J., Wang, X., Wang, Q., Guo, X., Cao, J., Zhang, X., Zhu, T., Zhang, D., Wang, J., Shen, B., Gao, X., Shi, Y. & Zhang, J. (2013) Chronic Psychological Stress Induces the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice. *PLoS ONE*. 8(9):e74497
- Kiernan, M.B. (2010) Chapter 2: General Oversight Stains for Histology and Histopathology. *Special Stains and Haemalum and Bind Eosin*. 29-36
- Kim, A. H., Lee, W., Kim, M. & Han, K. (2014) White blood cell differential counts in severely leukopenic samples: a comparative analysis of different solutions available in modern laboratory hematology. *Blood Research*. 49(2):120-126
- Kita, H. (2011) Eosinophils: Multifaceted Biologic Properties and Roles in Health and Disease. *Immunology review*. 242(1): 161–177
- Körner, S. & Wahlgren, L. (2002) *Praktisk statistik. 8 uppl.* Lund: Studentlitteratur. (252s).
- Lavinskiene, S., Malakauskas, K., Jeroch, J., Hoppenot, D. & Sakalauskas, R. (2015) Functional activity of peripheral blood eosinophils in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients. *Journal of Inflammation*. 12:25
- Marshall, P.N., Bentley, S.A. & Lewis, S.M. (1975a) An evaluation of some commercial Romanowsky stains. *Journal of Clinical Pathology*. 28:680-685
- Marshall, P.N., Bentley, S.A. & Lewis, S.M. (1975b) A standardized Romanowsky stain prepared from purified dyes. *Technical methods*. 920-923
- Marshall, P.N., Bentley, S.A. & Lewis, S.M. (1978) Staining properties and stability of a standardized Romanowsky stan. *Journal of Clinical Pathology*. 31:280-282
- Matsushita, H., Tanaka, Y., Sakairi, K. & Tanaka, Y. (2011) Sysmex XN-Series Automated Hematology Analyser. *Clinical Case report*. Vol 1. (78s).
- Matsuda, Y., Haneda, M., Kadomatsu, K. & Kobayashi, T. (2015) A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27⁻) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells *in vitro* via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. *Cellular Immunology*. 295(2): 127-136
- McFarlin, B.K., Venable, A.S., Prado, E.A, Henning, A.L. & Williams, R.R. (2014) Image-based Flow Cytometry Technique to Evaluate Changes in Granulocyte Function In Vitro. *Journal of Visualized Experiments*. (94) e52201
- Miwa, S. (1998) *Atlas of blood cells*. Tokyo, Japan: Bunkodo. (110 s).
- Munafó, D.B., Johnson, J.L., Ellis, B.A., Rutschmann, S., Beutler, B. & Catz, S.D. (2007) Rab27a is a key

component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *Biochemistry Journal*. 402(2): 229–239.

Ohshima, S., Mori, S., Shigenari, A., Miyamoto, A., Takasu, M., Imeada, N., Nunomura, S., Okayama, Y., Tanaka, M., Kulski, J.K., Inoko, H., Ando, A. & Kametani, Y. (2014) Differentiation ability of multipotent hematopoietic stem/progenitor cells detected by a porcine specific anti-CD117 monoclonal antibody. *BioScience Trends*. 8(6):308-15

Palmer, L., Briggs, C., McFadden, S., Zini, G., Burthem, J., Rozenberg, G., Proytcheva, M. & Machin, S.J. (2015) ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *International Journal of Laboratory Hematology*. 37(3):287-303

Rodak, B. F. & Carr, J. H. (2013) *Clinical Hematology Atlas*. 4th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier. (253s).

Rollins-Raval, M. A., Raval, J. S. & Contis, L. (2012) Experience with CellaVison DM96 for peripheral blood differentials in a large multi-center academic hospital system. *Journal of Pathology Informatics*. 10.4103/2153-3539.114205

Santos, A.F., Du Toit, G., Douiri, A., Radulovic, S., Stephens, A., Turcanu, V., Lack, G. (2015) Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 135(1):179-86

Sehgal, K.K., Tina, D., Choksey, U., Dalal, R.J. & Shanaz, K.J. (2013) Reference range evaluation of complete blood count parameters with emphasis on newer research parameters on the complete blood count analyser Sysmex XE-2100. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*. 56(2):120-124

Shafer, W.M., Martin, L.E. & Spitznagel, J.K. (1986) Late Intraphagosomal Hydrogen Ion Concentration Favors the In Vitro Antimicrobial Capacity of a 37-Kilodalton Cationic Granule Protein of Human Neutrophil Granulocytes. *Infection and immunity*. 53(3):651-655

Singh, R.K., Furze, R.C., Birrel, M.A., Rankin, S.M., Hume, A.N. & Seabra, M.C. (2014) A role for Rab27 in neutrophil chemotaxis and lung recruitment. *BMC Cell Biology*. (15): 39

Theml, H., Diem, H. & Haferlach, T. (2002) *Color Atlas of Hematology. Practical Microscopic and Clinical Diagnosis*. 2nd revised edition. Stuttgart, New York: Thieme. (198s).

Vithayasai, V., Sirisanthana, T., Sakonwasun, C. & Suvanpiyasiri, C. (1997) Flow Cytometric Analysis of T - Lymphocytes Subsets in Adult Thais. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY*. 15:141-146

Leukocyternas roll i kroppen

Vad händer då du blir sjuk? Hur tillfrisknar du från en förkylning eller bakterieangrepp? Du, liksom jag, har en liten eller rättare sagt gigantisk armé av leukocyter, ett tappert gäng krigare. Leukocyterna står för kroppens första försvarslinje gentemot infektioner. De offerar ofta sitt eget liv för att skydda oss och rekryterar nya celler kontinuerligt för att upprätthålla ett starkt försvar.

Sammanställningen av leukocyter i blodet är individuell och varierar med olika sjukdomsförlopp. Analys av cellerna är därför avgörande vid diagnostisering och uppföljning av olika blodsjukdomar. Vid sjukdom sker det en ökning eller minskning av den totala mängden leukocyter och det är av stor vikt att veta inom vilken celltyp rubbningen ligger. Immunförsvaret består av olika typer av leukocyter som ser olika ut med olika funktioner vid angrepp. Rutinmässigt delas leukocyterna in i fem klasser: neutrofila, eosinofila och basofila granulocyter, monocyter och lymfocyter. Majoriteten av cellerna mognar i benmärgen och cirkulerar i blodet i ett moget tillstånd. Vid akuta tillstånd då immunförsvaret aktiveras krävs en snabb rekrytering av leukocyter vilket medför en ökad risk för omogna celler i blodet. Förekomsten av omogna celler är ett tecken på sjukdom och ju omognare de är, ju mer kritiskt är det ofta för patienten. Cellerna delas lättast upp i respektive kategori genom analys i automatiska cellräknare. Men vid maligniteter, såsom cancer, omogna eller aktiverade celler ändras deras utseende vilket medför svårigheter för instrumentet att skilja dem åt. Då krävs istället en manuell bedömning av cellerna genom mikroskopering som är det mest tillförlitliga sättet att klassificera celler, det är dock tidskrävande och kräver erfaren personal. CellaVisions DM1200 är ett automatiserat cell-lokaliseringsinstrument som tar digitala bilder av varje enskild cell och presenterar dem på skärmen för att underlätta bedömning av leukocyterna då alla cellgrupper kan granskas samtidigt. DM1200 presenterar även förslag på en förklassificering av cellerna som sedan bedöms av en legitimerad biomedicinsk analytiker. Denna studie gick ut på att undersöka DM1200 förmåga att förklassificera cellerna när ändringar i infärgningen av blodutstryk gjordes. Färglösningen är förutom sura och basiska färger baserad på en fosfatbuffert. Fosfatbuffertens inverkan på förklassificeringen analyserades genom justeringar i dess pH. De olika pH-värdena som testades var 6.0, 6.8 och 7.5. Vid rutinmässigt laboratoriearbete är en fosfatbuffert med pH 6.8 rekommenderad. Vid infärgningen vill man nå något som kallas för Romanowsky-effekten som resulterar i en tydlig kontrast mellan cytoplasman och kärnan, där kärnstrukturen framhävs och färgas starkt lila. Färgningen är beroende av ett specifikt pH för att cellkomponenterna ska framträda. Den sura färgen färgar in basiska cellkomponenter röda medan den basiska färgar in sura blå.

Bilagor

Bilaga 1.

Tabell 1. De normala provernas leukocytfördelning analyserade i Sysmex XN2000.

Celltyp x 10 ⁹ /L	Prov 1	Prov 2	Prov 3	Prov 5
<i>Leukocyter</i>	6,72	6,94	6,68	9,22
<i>Neutrofila granulocyter</i>	3,63	4,20	3,49	5,75
<i>Eosinofila granulocyter</i>	0,28	0,37	0,16	0,21
<i>Basofila granulocyter</i>	0,05	0,03	0,02	0,11
<i>Lymfocyter</i>	2,00	1,48	2,48	2,43
<i>Monocyter</i>	0,74	0,48	0,49	0,65
<i>IG (omoget)</i>	0,3 %		0,6 %	0,8 %

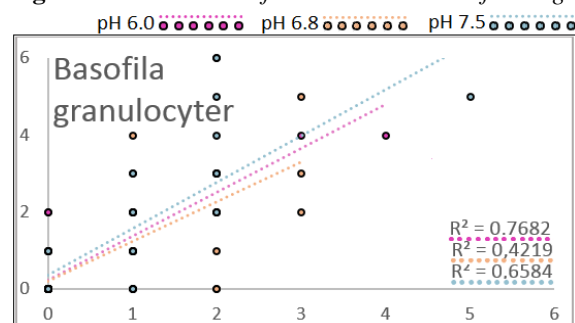
Tabell 2. De abnormala provernas leukocytfördelning analyserade i Sysmex XN2000.

Celltyp x 10 ⁹ /L	Prov 1	Prov 2	Prov 3	Prov 4	Prov 5	Prov 4
<i>Leukocyter</i>	9,16	8,83	21,23+	25,53+	5,04	6,89
<i>Neutrofila granulocyter</i>	4,30	4,26*	17,88+	4,82*	0,47*	3,29
<i>Eosinofila granulocyter</i>	2,45+	0,00	0,00	0,11	0,01	1,09*
<i>Basofila granulocyter</i>	0,04	0,01	0,03	0,03	0,00	0,07
<i>Lymfocyter</i>	1,82	4,07*	0,79-	19,06*	2,26*	2,00
<i>Monocyter</i>	0,53	0,39*	1,41+	1,44*	1,84*	0,43
<i>IG (omoget)</i>	0,2 %	1,1 %*	4,1 %	0,3 %*	9,1 %*	0,1 %

* Instrumentvarningar

Bilaga 2.

Figur 1. Korrelationen för DM1200:s klassificering och det verifierade resultatet.



Bilaga 3.

Tabell 3. Rådata från pH 6.0

DM \ User	Segmented										Erythroblast		Thrombocyte		Thrombocyte		Artefact		Not classed	
	Unidentified	neutrophil	Eosinophil	Basophil	Lymphocyte	Monocyte	Promyelocyte	Myelocyte	Metamyelocyte	Blast cell	Plasma cell	(NRBC)	thrombocyte	thrombocyte aggregation	Megakaryocyte	Smudge cell	Artefact	Not classed	DM	
Unidentified	0	10	1	8	29	11	3	5	2	6	0	0	0	0	0	8	5	5	93	
Segmented neutrophil	0	3016	1	5	4	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	12	1	1	3043	
Eosinophil	0	1	332	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	333	
Basophil	0	3	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	
Lymphocyte	0	0	0	1906	11	0	0	5	0	23	0	0	0	0	0	11	3	12	1971	
Monocyte	0	3	0	0	25	285	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	321	
Promyelocyte	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
Myelocyte	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
Metamyelocyte	0	0	0	0	7	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
Blast (no lineage spec)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	183	0	0	0	0	0	1	1	0	186	
Plasma cell	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	7	
Erythroblast (NRBC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	4	
Giant thrombocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	2	1	0	39	
Thrombocyte aggregation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3	
Megakaryocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Smudge cell	0	50	3	0	61	22	0	1	0	1	0	0	0	0	403	6	0	0	547	
Artefact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	65	1	0	71	
Not classed	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
User	0	3083	337	30	2037	331	8	20	7	213	3	1	36	0	0	443	87	19	0	

Tabell 4. Rådata från pH 6.8

DM \ User	Segmented		Eosinophil	Basophil	Lymphocyte	Monocyte	Promyelocyte	Myelocyte	Metamyelocyte	Blast cell	Plasma cell	Erythroblast		Thrombocyte	Thrombocyte aggregation	Megakaryocyte	Smudge cell	Artefact	Not classed	DM	
	Unidentified	neutrophil										thrombocyte	Giant (NRBC)								
Unidentified	0	15	6	5	21	4	0	0	5	3	2	0	0	0	2	0	0	4	22	1	90
Segmented neutrophil	0	2972	49	9	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	11	0	0	3047
Eosinophil	0	0	280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	282
Basophil	0	6	0	16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	25
Lymphocyte	0	0	0	0	1915	7	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	1	7	4	22	1962
Monocyte	0	0	0	0	36	311	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	353
Promyelocyte	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Myelocyte	0	1	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	9
Metamyelocyte	0	0	0	1	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Blast (no lineage spec)	0	0	0	0	4	0	0	1	0	0	193	0	0	0	0	0	1	7	0	0	206
Plasma cell	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Erythroblast (NRBC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
Giant thrombocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	690	0	0	0	3	0	693
Thrombocyte aggregation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	2	28	0	37
Megakaryocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Smudge cell	0	35	14	0	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	518	33	0	622
Artefact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	287	0	291
Not classed	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
User	0	3029	349	31	2004	325	4	13	15	201	5	0	0	694	8	2	556	380	23		

Tabell 4. Rådata från pH 7.5

DM \ User	Unidentified		Segmented		Basophil	Eosinophil	Lymphocyte	Monocyte	Promyelocyte	Myelocyte	Metamyelocyte	Blast cell	Plasma cell	Erythroblast Giant		Thrombocyte aggregation	Megakaryocyte	Smudge cell	Artefact	Not classed	DM
	neutrophil		neutrophil											thrombocyte	(NRBC)						
Unidentified	0	15	11	6	76	14	0	5	3	0	0	0	0	0	29	3	0	6	32	2	202
Segmented neutrophil	0	2855	200	14	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	3	2	3087
Eosinophil	0	0	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	90
Basophil	0	1	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	26
Lymphocyte	0	2	0	0	1883	11	0	3	1	9	0	0	0	0	2	0	1	15	4	12	1943
Monocyte	0	8	1	0	26	318	1	5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	369
Promyelocyte	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	9
Myelocyte	0	1	0	0	1	0	0	3	3	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1	0	13
Metamyelocyte	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6
Blast (no lineage spec)	0	0	1	0	6	0	0	0	0	187	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	196
Plasma cell	0	0	0	0	42	0	3	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	1	0	1	54
Erythroblast (NRBC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	1	14
Giant thrombocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	926	1	0	0	5	0	932
Thrombocyte aggregation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	22	0	0	19	0	45
Megakaryocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Smudge cell	0	23	6	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1	0	484	16	1	538
Artefact	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	220	1	223
Not classed	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
User	0	2905	309	42	2043	344	5	22	15	196	6	0	965	27	1	528	318	21			