

Nora Alvilde Lyngstad  
Malin Lie Skaaden

# Estimering av antall trombocytter i blodutstryk i CellaVision som verifiserende tiltak ved lave trombocyttdverdier

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Veileder: Marthe Wedø Aune, Grethe Hellem, Kristin Fonn, Elin Skånøy, Gunhild Garmo Hov og Anne Lise Hjertø

Mai 2020



Nora Alvilde Lyngstad  
Malin Lie Skaaden

# **Estimering av antall trombocytter i blodutstryk i CellaVision som verifiserende tiltak ved lave trombocytterverdier**

Bacheloroppgave i bioingeniørfag  
Veileder: Marthe Wedø Aune, Grethe Hellem, Kristin Fonn, Elin Skånøy, Gunhild Garmo Hov og Anne Lise Hjertø  
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Bachelorprosjektet ble gjennomført i forbindelse med fullføringen av Bioingeniørutdanningen ved Institutt for bioingeniørfag, Fakultet for naturvitenskap, ved NTNU i Trondheim.

Oppdragsgivere for prosjektet er Seksjon for hematologi ved Avdeling for Medisinsk Biokjemi (AMB) på St. Olavs hospital, og ble gitt av seksjonsleder Marthe Wedø Aune.

Som følge av coronapandemien (SARS-CoV-2) var det usikkert om bachelorprosjektet måtte gjøres om til en teoretisk oppgave, men takket være våre faglige veiledere og deres engasjement for prosjektet, kunne det gjennomføres så godt som planlagt. De har tilrettelagt sin jobbhverdag og utført alt det praktiske laboratoriearbeidet, mens vi har bearbeidet tallmaterialet som vi fikk tilsendt fra dem. De har også gitt god faglig veiledning over videomøter under hele bachelorperioden. Vi vil derfor gi en stor takk til Seksjonsleder Marthe Wedø Aune, Fagansvarlige bioingeniører Grethe Hellem og Kristin Fonn, bioingeniør Elin Skånøy og Medisinsk faglig veileder Gunhild Garmo Hov. Til slutt vil vi takke prosessveileder Anne Lise Hjertø, 1. lektor ved Institutt for bioingeniørfag ved NTNU i Trondheim, som har vært til stor hjelp med den skriftlige delen av oppgaven og gitt oss god digital oppfølging.

Trondheim, 20.mai 2020

Nora Alvilde Lyngstad



Malin Lie Skaaden



## Sammendrag

Analysering av trombocytter (PLT) i fullblod er viktig for vurdering av blødningsrisiko, og korrekt prøveresultat er kritisk for å unngå feil medisinsk behandling. I dag benyttes impedansemetoden (PLT-I) som standard for telling av PLT ved avdeling for Medisinsk Biokjemi (AMB), St. Olavs hospital. Metoden er ikke feilfri og utfordringer kan oppstå ved lave PLT-verdier, aggregering og/eller tilstedeværelse av interferenter. Dette påvirker påliteligheten til prøvesvarene som kan bli både falskt for lave og falskt for høye. Mange prøvesvar krever dermed oppfølgende tiltak før de kan rapporteres. Ved AMB benyttes en fluorescensmetode (PLT-F) og en immunologisk metode med monoklonalt antistoff (CD61) som verifiserende tiltak. CD61 anses som fasitmetoden for telling av PLT ved AMB. Dette er dyre analyser, og det er dermed ønskelig å undersøke om en billigere og enklere metode for telling av antall PLT kan tas i bruk.

Målet med prosjektet var å finne ut om estimering av antall PLT i blodutstryk kan benyttes som alternativ til metodene som brukes ved AMB i dag; PLT-F og CD61. Dette er gjennomført ved å sammenligne PLT-verdier målt med metodene PLT-I og PLT-F i Sysmex XN20, CD61 i Celdyn Sapphire, og estimert antall PLT i blodutstryk i CellaVision, spesielt i lavt PLT-nivå. Det var også ønskelig å gjøre en sammenligning av dagens metoder, med CD61 som referansem metode. Prøvene som ble analysert var fullblod tatt av inneliggende pasienter under behandling på St. Olavs hospital, og ble analysert innen 24 timer.

Resultatene viser at uten tilstedeværelse av interferenter vil antall PLT målt med metodene PLT-F og CD61 samsvare godt i lave PLT-nivå, mens antall PLT målt med PLT-I vil gi systematisk høyere PLT-verdier. Ved interferensproblematikk i lavt PLT-nivå kan metodene PLT-I og PLT-F gi falskt for lave eller falskt for høye PLT-verdier i forhold til CD61. Våre funn viser at estimering av antall PLT i blodutstryk samsvarer godt med metodene som benyttes ved AMB i dag; PLT-I, PLT-F og CD61, i PLT-nivå  $<35 \times 10^9/L$ . Presisjonen til estimering av antall PLT i blodutstryk, både i lavt og normalt PLT-nivå, viser seg å ligge over kravet på  $<3,0\%$ .

Konklusjonen er at de eksisterende metodene benyttet ved AMB gir tilnærmet like PLT-verdier ved prøver uten interferenter, men at antall PLT målt med CD61 ser ut til å være den eneste korrekte metoden ved interferensproblematikk. Estimering av antall PLT i blodutstryk har god riktighet i lave PLT-nivå, men presisjonen er ikke innenfor oppgitt krav, og tyder på at metoden ikke er pålitelig nok til å kunne benyttes uten videre undersøkelser.

## **Abstract**

Thrombocyte (PLT) analysis in whole blood is important for assessing bleeding risk, and correct results are critical to avoid wrong medical treatment. Today, the impedance method (PLT-I) is used as a standard for counting PLT at the Department of Medical Biochemistry (AMB), St. Olav's Hospital. The method is not faultless and challenges can occur at low PLT values, aggregation and/or presence of interferences. This affects the reliability of the test results, which can be falsely too low and falsely too high. Many test results require follow-up measures before they can be reported. At AMB, a fluorescence method (PLT-F) and an immunological method with monoclonal antibody (CD61) are used as verification measures. CD61 is the method considered to be most correct at AMB for counting PLT. These analyzes are expensive, and it is thus desirable to look into a cheaper and easier method for counting PLT.

The main purpose of this project was to find out if estimating the number of PLTs in blood smears can be used as an alternative to the methods used by AMB today; PLT-F and CD61. This was achieved by comparing PLT values with the PLT-I and PLT-F methods in Sysmex XN20, CD61 in Celdyn Sapphire, and estimating the number of PLTs in blood smears in CellaVision, especially at low PLT levels. It was also desirable to compare today's methods, with CD61 as a reference method. The samples analyzed were whole blood from patients under treatment at St. Olav's Hospital and were analyzed within 24 hours.

The results show that without presence of interferences the number of PLTs counted with the PLT-F and CD61 methods are corresponding well at low PLT levels, but the PLT-I will provide systematic higher PLT-values. Interference problems at low PLT levels, can give falsely too low or falsely too high PLT values counted with PLT-I and PLT-F methods, relative to the CD61 method. By comparison, our findings show that estimation of the number of PLTs in blood smears correspond well with the methods used by AMB today; PLT-I, PLT-F and CD61, at PLT levels  $<35 \times 10^9/L$ . The precision for estimating the number of PLTs in blood smears, both at low and normal PLT levels, are found to exceed the requirement of  $<3,0\%$ .

The conclusion is that without interferences, the methods used at AMB will provide approximately the same PLT values, but CD61 appear to be the only correct method for samples with interference problems. Estimating the number of PLTs in blood smears has good

accuracy at low PLT levels, however the precision does not meet the requirement, suggesting the method is not reliable enough and should be examined more closely.



## **Forkortelser og ordforklaringer**

PLT: Trombocytter

TPO: Trombopoetin

AMB: Avdeling for Medisinsk Biokjemi

RBC: Erytrocytter

WBC: Leukocytter

PLT-I: PLT-impedansemetoden

PLT-F: PLT-fluorescensmetoden

CD61: CD61-metoden

IPF%: Umodne platefraksjoner i prosent

MPV: Et mål av gjennomsnittlig platevolum.

PDW: Et uttrykk for størrelsesvariasjon av trombocytterne.

CV: Variasjonskoeffisient

SD: Standardavvik

## Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Forkortelser og ordforklaringer</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>1</b>
1.1 Oppbygging og produksjon av PLT .....	1
1.2 Funksjonen til PLT i hemostasen .....	2
1.3 Klinisk relevans ved funn av unormale PLT-verdier .....	3
1.3.1 Lave PLT-verdier .....	4
1.3.2 Høye PLT-verdier .....	5
1.4 Instrumenter og analyseprinsipper for telling og vurdering av antall PLT .....	5
1.4.1 Sysmex XN20 .....	6
1.4.2 Celldyn Sapphire .....	10
1.4.3 CellaVision DM96 .....	12
1.4.5 Rutiner for oppfølging av lave PLT-verdier .....	14
1.5 Generelle feilkilder ved telling av antall PLT .....	15
1.6 Instrumentenes muligheter og begrensninger .....	16
1.6.1 Sysmex XN20 .....	17
1.6.2 Celldyn Sapphire .....	18
1.6.3 CellaVision DM96 .....	18
1.7 Problemstilling .....	18
<b>2. Material og metode</b> .....	<b>20</b>
2.1 Prøvemateriale .....	20
2.2 Analysering av prøver .....	20
2.2.1 Sammenligning av PLT-verdier i ulike PLT-nivå estimert i blodutstryk i CellaVision og målt med PLT-I- metoden .....	20
2.2.2 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå estimert i blodutstryk, og målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61 .....	21
2.2.3 Repeterbarhet for estimering av antall PLT i blodutstryk i lavt og normalt PLT-nivå .....	21
2.2.4 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå og prøver med interferensproblematikk, målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61 .....	21
2.3 Statistiske metoder .....	22
<b>3. Resultater</b> .....	<b>23</b>
3.1 Sammenligning av PLT-verdier i ulike PLT-nivå estimert i blodutstryk i CellaVision og målt med PLT-I- metoden .....	23
3.2 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå estimert i blodutstryk, og målt med metodene PLT-I-, PLT-F og CD61 .....	25
3.2.1 Regresjons- og korrelasjonsanalyser med antall PLT målt med PLT-I som referansemetode .....	26
3.2.2 Differanseplott med PLT-I, PLT-F og CD61 som referansemetoder .....	31
3.3 Repeterbarhet for estimering av antall PLT i blodutstryk i lavt og normalt PLT-nivå .....	35
3.4 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå og prøver med interferensproblematikk, målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61 .....	36

4. Diskusjon.....	39
5. Konklusjon .....	42
6. Kilder.....	43
7. Vedlegg .....	45

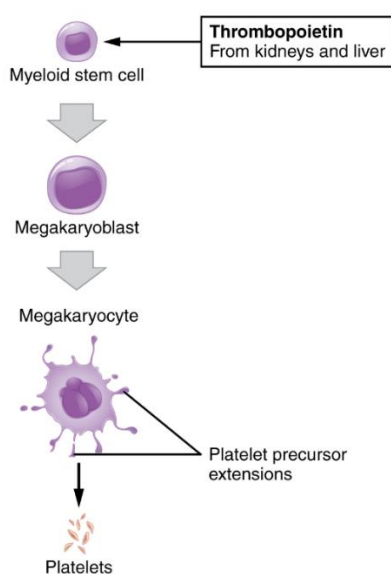
## 1. Innledning

Dette kapittelet tar for seg generell teori om trombocytter (PLT), samt klinisk relevans ved funn av høye og lave verdier. De ulike analysemetodene for telling av PLT ved St. Olavs hospital presenteres, og muligheter og begrensninger gjennomgås. Videre vil kapittelet forklare hensikten med denne studien.

### 1.1 Oppbygging og produksjon av PLT

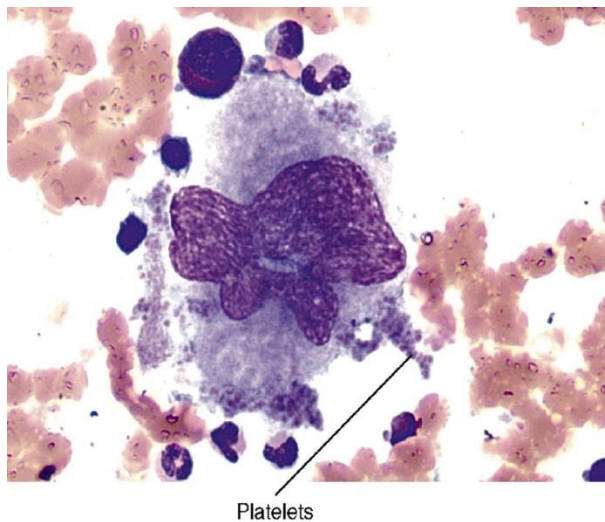
PLT er kjerneløse cellefragmenter med bikonveks form og jevn overflate, som sirkulerer hvilende i blodet. PLT er svært biologisk aktive og har en kompleks cytoplasmatisk struktur som inneholder blant annet mikrofilamenter og mikrotubuli, som utgjør cytoskjelettet, og rikelig med ulike typer granuler (kap. 1.2) (1).

Produksjon av PLT påvirkes av flere faktorer. De dannes fra unike benmargceller som kalles for megakaryocytter, som er de største cellene i benmargen. Trombopoietin (TPO) er en vekstfaktor som hovedsakelig produseres i leveren og sirkulerer i plasma. TPO sammen med cytokin IL-3, induserer stamceller til å differensiere fra en felles myelogen stamcelle. Gjennom flere modningstrinn differensieres stamcellen til en moden megakaryocyt (figur 1.1). Denne prosessen, samt produksjon av PLT, reguleres og forsterkes av TPO og cytokinene IL-6 og IL-11. Mengde PLT i plasma reguleres ved en negativ tilbakekopling med TPO. Det vil si at ved lave PLT-verdier vil TPO produksjonen øke, som igjen fører til økt PLT (1).



1.1: Produksjon av PLT fra en myelogen stamcelle i benmargen (2).

I det siste modningstrinnet mister megakaryocyttene evnen til å dele seg, men beholder DNA-replikasjon og cytoplasmisk modning. Den utvikler seg til en polyploid celle som inneholder flere kromosomkopier. Denne utviklingen er en form for mitose som er unikt for megakaryocytter og kalles for endomitose. Cytoplasma syntetiseres av DNA-kopiene og PLT blir dannet ved avsnøring av cytoplasma, en prosess som kalles for trombocytopoiese (figur 1.2). Membran-kanaler, som er biologisk identiske med megakaryocyttens plasmamembran, vokser innover fra plasmamembranen og deler opp og avgrenser hele cytoplasma. Nydannede PLT frigjøres i blodstrømmen og etterlater nakne megakaryocyt-kjerner, som blir konsumert av makrofager i benmargen. En enkelt megakaryocyt kan danne 2000-4000 PLT. I et gjennomsnittlig friskt individ vil  $10^8$  megakaryocytter produsere  $10^{11}$  PLT hver dag (1).



1.2 Frigjøring av PLT fra en moden megakaryocyt, en prosess kalt trombocytopoiese (1).

## 1.2 Funksjonen til PLT i hemostasen

Hemostasen er delt inn i primær og sekundær hemostase, og PLT er essensiell for normal funksjon. Primær hemostase inntreffer ved skade på mindre blodkar og hensikten er å danne en plateplugg som midlertidig stopper blødningen. Det første trinnet innebærer at blodkaret kontraherer for å redusere blodstrømmen. Ved skade på blodkarveggen eksponeres kollagen fra ekstracellulær matriks. Ødelagte endotelceller frigjør von Willebrand Faktor (vWF) fra cytoplasmiske organeller, som fester seg til kollagenet i det skadede området. Faktoren vWF binder seg til reseptor GPIIb (reseptor for vWF) på PLT, som fører til oppbremsing og adheering av PLT til skadestedet. PLT blir da aktivert og endrer form. Formendringen fører til

at fibrinogen binder seg til reseptor GPIIb/IIIa (reseptor for fibrinogen) og danner forbindelser mellom PLT som da vil aggregere (1).

Samtidig vil aktiverte PLT frigjøre  $\alpha$ -granuler og tette granuler, som bidrar til dannelsen av en plateplugg. Tette granuler migrerer til plasmamembranen og sekreterer en rekke små molekyler, blant annet serotonin som forårsaker kontraksjon av blodkarene, og adenosin difosfat (ADP) som fremmer aggregering av flere PLT. I tillegg sekreteres kationene  $Ca^{2+}$  og  $Mg^{2+}$  som bidrar til aktivering av PLT og koagulasjon. Innholdet som frigjøres fra  $\alpha$ -granuler er hovedsakelig koagulasjonsproteinene fibrinogen, faktor V (5), VIII (8) og vWF, som også deltar i den sekundære hemostasen. Den sekundære hemostasen trer inn ved større skader på blodkar og resulterer i dannelse og kryssbinding av fibrin som forsterker platepluggen. Ved helbredelse av skaden på blodkaret oppstår fibrinolysen som tar for seg gradvis nedbrytning og fjerning av kryssbundet fibrin. Selv om PLT har størst betydning i primær hemostase, henger prosessene i den primære og sekundære hemostasen sammen som en kaskade (1).

### 1.3 Klinisk relevans ved funn av unormale PLT-verdier

Som vist i tabell 1.1 varierer referanseområdet for antall PLT per liter blod med alder, og barn har høyere referanseområde enn voksne. Gjennomsnittlig antall PLT for kvinner er litt høyere enn for menn, og er litt lavere for begge kjønn over 65 år (1).

Tabell 1.1 Referanseområder for antall PLT per liter blod ved ulike aldre (3).

Alder	2-6 mnd	6 mnd– 2 år	2-6 år	6-12 år	12-19 år	>19 år
Konsentrasjon $\times 10^9/L$	304-619	229-497	228-435	204-406	179-363	164-370

### 1.3.1 Lave PLT-verdier

Trombocytopeni, PLT-verdi  $<100 \times 10^9/L$ , er den vanligste årsaken til blødninger av klinisk interesse (1). Det er viktig at man utelukker falskt for lave PLT-verdier grunnet dårlig prøvepreparering, som fører til for eksempel aggregering (4). Dette blir videre utdypet i kapittel 1.6. Pålitelige prøvesvar er spesielt kritisk ved lave PLT-verdier for å sikre riktig medisinsk behandling. Et eksempel er ved spørsmål om PLT-transfusjon hos pasienter som behandles med cytostatika. PLT-verdien er da helt avgjørende for om transfusjon gjennomføres eller ikke (1). Ved Avdeling for Medisinsk Biokjemi (AMB) ved St. Olavs hospital er grensen for PLT-transfusjon for disse pasientene på PLT-verdi  $<10 \times 10^9/L$  (oppgitt av faglig veileder).

De primære patofysiologiske prosessene som fører til trombocytopeni er unormal fordeling, nedsatt produksjon og økt ødeleggelse av PLT. Endret fordeling kan skyldes forstørret milt, splenomegali. En del av PLT vil være «gjemt» i milten, og antallet i venøst blod vil være lavere enn normalt. Nedsatt produksjon av PLT kan deles inn i to kategorier; en type assosiert med megakaryocyt-hypoplasi, og en knyttet til ineffektiv trombopoiesis som kan sees ved forstyrret proliferasjon av megakaryocytter. Defekter i produksjon kan være medfødt, og blir da linket til spesielle kromosomale abnormiteter eller spesifikke genetiske defekter. Det kan også være neonatal trombocytopeni som vil si at det oppstår hos foster eller nyfødte. Dette kan skyldes blant annet cytomegalovirus (CMV), herpes eller HIV, og er i 75% av tilfellene tilstede ved fødsel eller innen 72 timer. Studier tyder på at CMV inhiberer megakaryocytene og dens forløpere, som dermed fører til lavere plateproduksjon (1).

Nedsatt produksjon av PLT kan også skyldes ervervet trombocytopeni, som for eksempel kan være legemiddelindusert. Et bredt spekter av kjemoterapeutiske midler (cytostatika) som brukes til behandling av hematologiske og ikke-hematologiske maligne tilstander, undertrykker celleproduksjonen i benmargen. Noen cytostatiska påvirker spesifikt megakaryocytopoiesen, mens andre påvirker andre hematopoetiske celler i tillegg. Ved behandling med cytostatika vil det være legemiddelindusert trombocytopeni som er den avgjørende faktoren for dosen legemiddel (1). Andre årsaker til nedsatt produksjon av PLT kan være aplastisk anemi, akutt leukemi, myelomatose eller toksisk benmargsdepresjon (3).

Økt ødeleggelse av PLT kan forårsakes av immunologiske reaksjoner og/eller mekanisk skade eller konsumering. Det fører til økt produksjon av PLT, og pasienten blir først trombocytopen

når produksjonskapasiteten ikke lenger er adekvat til å dekke det økte forbruket. Et eksempel på en immunologisk reaksjon er akutt og kronisk immunologisk trombocytopeni, som innebærer at kroppen danner antistoffer som festes til PLT og dermed fører til nedbryting. Legemidler kan også medføre immunologiske reaksjoner, for eksempel heparinindusert trombocytopeni. Et eksempel på forhøyet konsumering av PLT er disseminert intravaskulær koagulasjon (DIC), som er en tilstand hvor det dannes fibrintromber på grunn av ukontrollert aktivering av hemostasesystemet. Dette fører til blødningsfare ettersom PLT og koagulasjonsfaktorer forbrukes. Mistanke om DIC er en av indikasjonene for å analysere PLT-verdier, da dette kan være svært kritisk (1).

### **1.3.2 Høye PLT-verdier**

Ved PLT-verdier i området  $450\text{--}1000 \times 10^9/\text{L}$  blir tilstanden ofte betegnet som reaktiv trombocytose. Det vil si at antallet PLT er forhøyet over en begrenset periode på bakgrunn av inflammasjon, operasjon, andre traumer eller underliggende tilstander som for eksempel jernmangel (1). Det er viktig at man utelukker falskt for høy PLT-verdi grunnet analysemetodenes begrensninger, som feks at små erytrocytter (RBC) telles som PLT (kap. 1.6.1). Andre begrensninger blir videre utdypet i kapittel 1.6. PLT-verdier  $>1000 \times 10^9/\text{L}$  kan indikere myeloproliferative sykdommer som polycytemi vera, kronisk myelogen leukemi og essensiell trombocytemi. Ved enkelte av disse tilfellene vil man ha økt produksjon av PLT i benmargen, men trombocytffunksjonen er ikke optimal, og det kan dermed foreligge blødningsfare (3)(5).

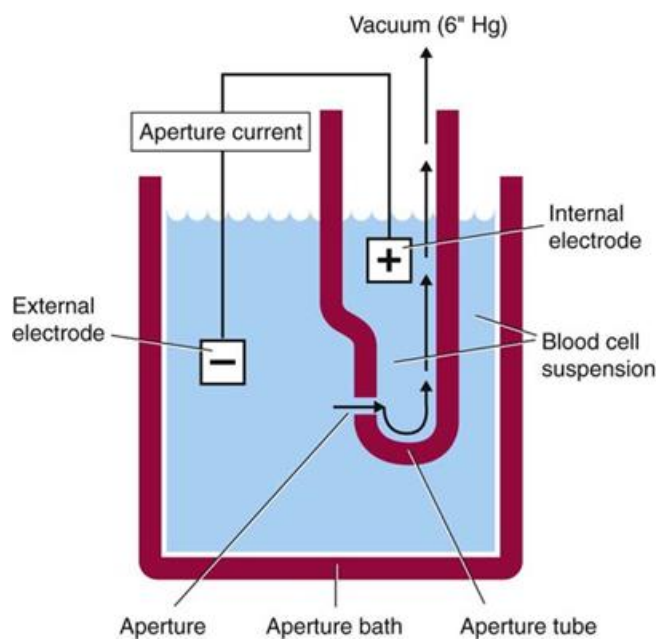
### **1.4 Instrumenter og analyseprinsipper for telling og vurdering av antall PLT**

De fleste laboratorier i Norge har i dag automatiserte analyseinstrumenter for telling og vurdering av antall PLT, som bygger på ulike prinsipper. AMB på St. Olavs hospital utfører PLT-telling i Sysmex XN20 med impedanseprinsippet (PLT-I) som standardmetode. Avdelingen har i tillegg to analysemetoder som brukes ved behov for verifiserende tiltak, en optisk metode med fluorescens flowcytometri (PLT-F) i XN20 og en immunologisk metode (CD61), i CellaVison Sapphire. CD61 blir ved AMB ansett som gullstandard og fasitmetode. Disse metodene benyttes spesielt ved nærmere vurdering av svært lave PLT-verdier, der det er usikkerhet rundt svaret fra XN20. Det er også mulig å estimere antallet i blodutstryk på CellaVison DM96 (3)(6). Ettersom dette bachelorprosjektet går ut på å validere nettopp denne metoden, blir den omtalt mer detaljert i kapittel 1.4.3.



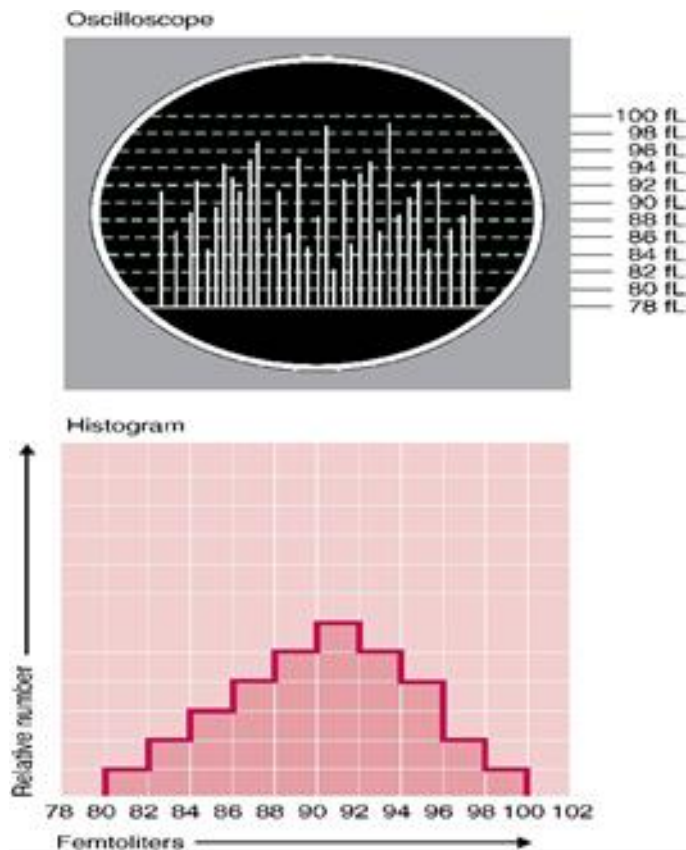
### 1.4.1 Sysmex XN20

XN20 ved AMB har både PLT-I og PLT-F til telling av antall PLT. Prinsippet for PLT-I er basert på måling av elektrisk spenningsendring som produseres av celler/partikler suspendert i et elektrisk ledende fortynningsmiddel (isoton saltvannsløsning). Cellene passerer enkeltvis gjennom en kapillæråpning. I tellekammeret er det lavfrekvent elektrisk strøm som går mellom en indre elektrode inne i kapillæret og en ytre elektrode suspendert i saltvannsløsningen (figur 1.3) (1).



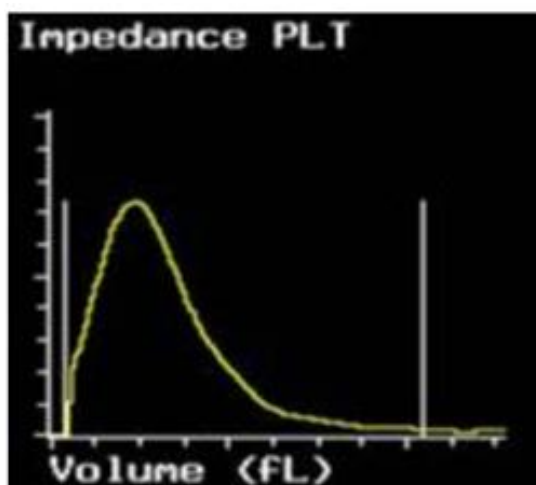
1.3: Impedanseprinsipp for telling av antall celler/partikler i en isoton saltvannsløsning med indre og ytre elektrode (1).

Når partiklene passerer gjennom åpningen vil det oppstå motstand mellom de to elektrodene, og det dannes spenningspulser som er målbare. Pulshøyden er proporsjonal med størrelsen på cellen og dette tillater metoden å diskriminere mellom celler med ulik størrelse. Figur 1.4 illustrerer pulshøydene målt i femtoliter (fL) av et oscilloskop. Resultatet plottes i et histogram med volum på x-aksen og antall på y-aksen, og gir et bilde av volumfordelingen til de talte cellene/partiklene (1).



Figur 1.4: Pulshøyder av celler/partikler målt av et oscilloskop (øverst) og histogram med antall på x-akse og volum på y-akse (nederst) (1).

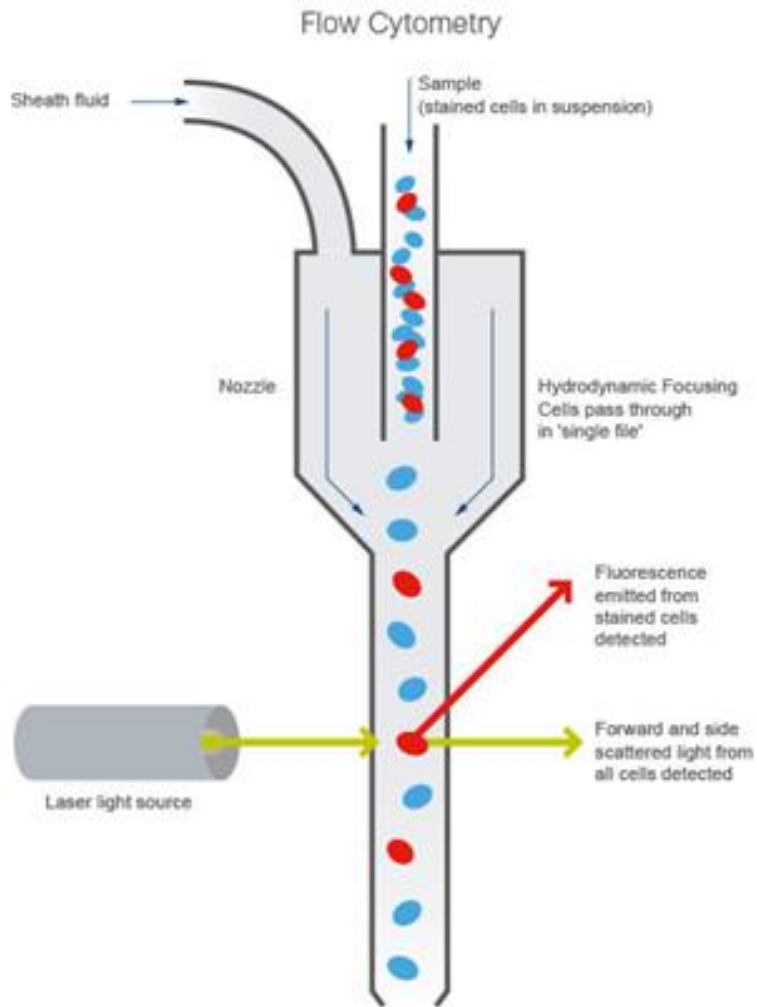
Metoden benytter diskriminatorgrenser for å separere ulike cellepopulasjoner basert på størrelse. Figur 1.5 illustrerer disse grensene i et PLT-histogram. Alle celler og partikler med volum mellom 2-30 fL vil registreres som PLT og vises i dette histogrammet. RBC og PLT telles i samme kanal, men blir separert på grunnlag av størrelse (3).



Figur 1.5: Talte PLT med volum på x-akse og antall på y-akse (3).

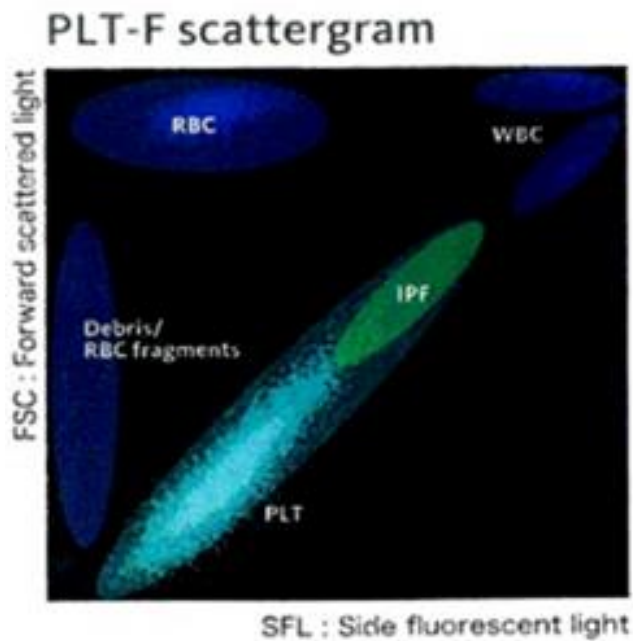
XN20 har også PLT-F som kombinerer fluorescens-flowcytometri og optisk lysspredning for å gi informasjon om hver enkelt celle som analyseres (3). Fluorescens (SFL) er emisjon av elektromagnetisk stråling fra en løsning med celler eller partikler merket med fluorescerende stoff, som har absorbert eksitasjonslys fra en lyskilde. Molekylet i løsningen absorberer lys av en bølgelengde og avgir lys med en lengre bølgelengde (7). Intensiteten av SFL gjenspeiler DNA/RNA innhold i de merkede cellene/partiklene (3).

Flowcytometri er et instrument hvor celler suspendert i en væske passerer enkeltvis gjennom et optisk vindu (figur 1.6). Lyskilden er som regel en tungsten-halogenlampe eller en helium-neonlaser. Laserlyset har monokromatisk lys, og ved passering av PLT gjennom laserlyset vil det spres i alle retninger. Fotodetektorer registrerer det spredte lyset ved spesifikke vinkler og omdanner det til elektriske signal. Forward scatter (FSC) er lysspredning ved 0 grader som korrelerer med cellevolum, og side scatter (SSC) er lysspredning ved 90 grader som samsvarer med indre kompleksitet (1).



1.6: Oversikt av et flowcytometer med celler/partikler i en væskestrøm som ledes enkeltvis gjennom laserstrålen og spres lyset i ulik grad (8).

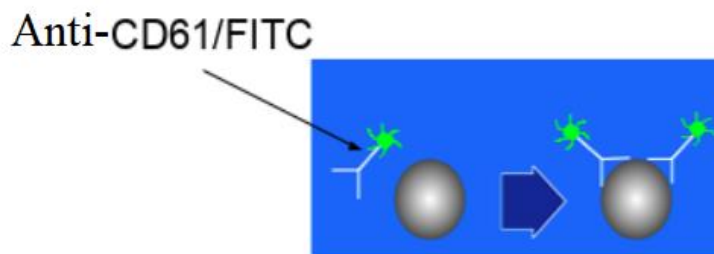
I PLT-F farges PLT og leukocytter (WBC) med fluorokromet Oxacin som farger kornet endoplasmatisk retikulum og mitokondrier (3)(9). Cellene/partiklene passerer enkeltvis gjennom en laserstråle. Resultatet blir presentert i et todimensjonalt scatterplot med SFL på x-aksen og FSC på y-aksen. Scatterplottet i figur 1.7 illustrerer hvordan PLT skilles fra RBC og WBC basert på forskjell i størrelse og RNA/DNA innhold. Det grønne feltet i plottet gir informasjon om mengde umodne PLT (IPF%) og er plassert i området med høy fluorescensaktivitet. Fragmenter og rester av RBC befinner seg til venstre i scatterplottet, mens WBC havner øverst til høyre (3).



1.7: Scatterplott fra PLT-F kanalen med fluorescens (SFL) på x-aksen og forward scatter (FSC) på y-aksen, samt avgrensning av ulike cellepopulasjoner (3).

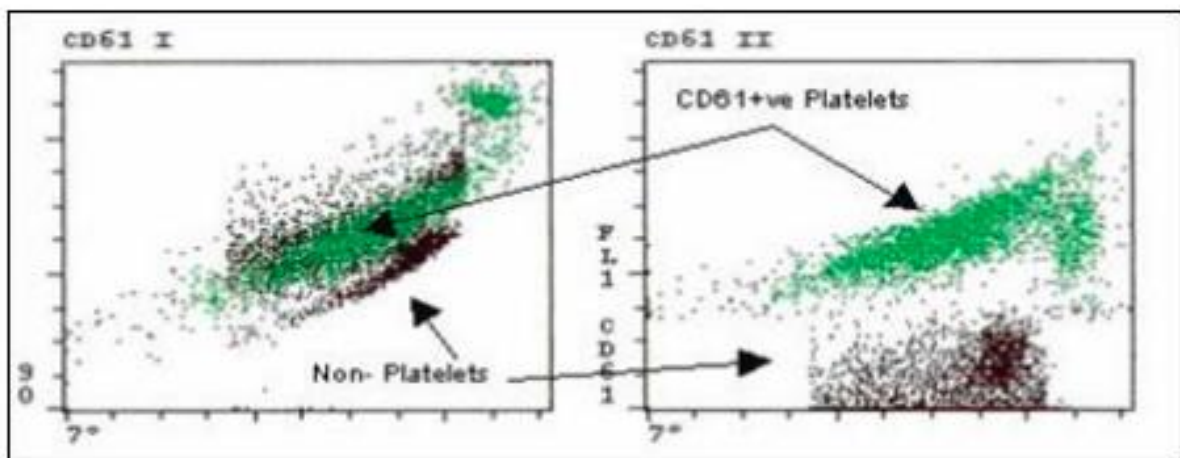
#### 1.4.2 Celdyn Sapphire

Et annet hematologisk analyseinstrument som benyttes ved AMB, St. Olavs hospital, er som nevnt Celdyn Sapphire. Instrumentet kan analysere antall PLT ved bruk av impedanse og optisk lysspredning i flowcelle. I tillegg detekteres PLT med en immunologisk metode kalt CD61. Metoden baserer seg på at reagenset inneholder et monoklonalt antistoff spesifikt for CD61 på PLT-overflaten, som er merket med et fluorokrom (FITC). CD61 på overflaten av alle normale hvilende og aktiverte PLT vil danne et kompleks med det fluorescensmerkede antistoffet (figur 1.8) (3).

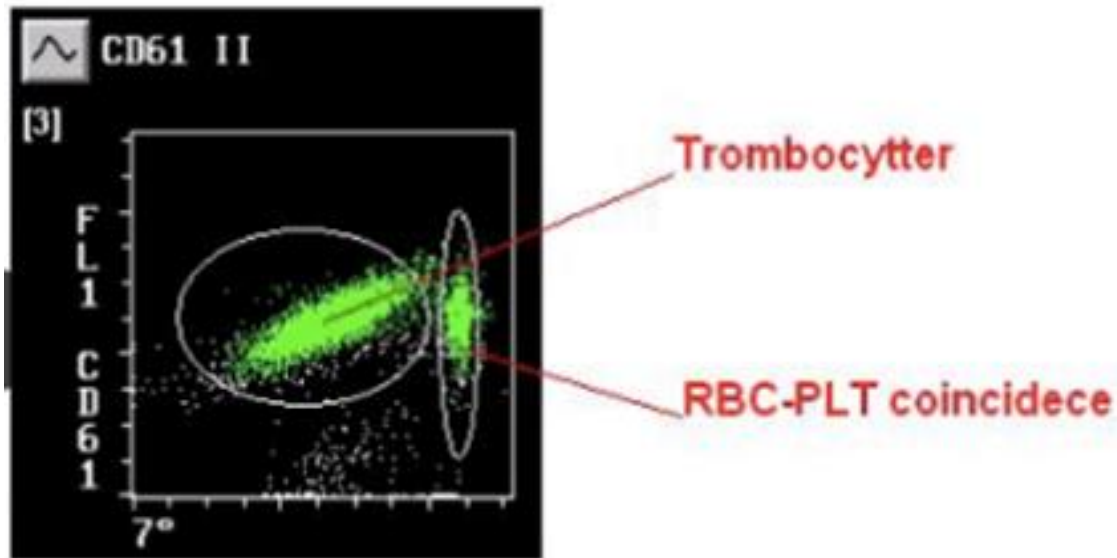


Figur 1.8: Fluorescensmerket anti-CD61/FITC bindes til antigen på overflaten spesifikt for PLT (10). Modifisert figur.

Komplekset fluorescerer ved ca. 530 nm, og måles av en detektor med optisk filter for grønn fluorescens (FL1). Siden denne metoden er spesifikk for PLT vil alle cellefragmentene registreres uavhengig av størrelse. I tillegg registreres lysspredningen ved 90 grader og 7 grader, som gjenspeiler henholdsvis kjerne- og cellestruktur. Det lages to scatterplott for CD61 (figur 1.9), et med lysspredning ved 7 grader på x-aksen og 90 grader på y-aksen (CD61 I), og et med med lysspredning ved 7 grader på x-aksen og fluorescens på y-aksen (CD61 II). PLT-målingen i CD61 I vil bli påvirket av fragmenter, men ved bruk av FL1 på y-aksen (CD61 II) vil disse bli eliminert. FL1 positive celler defineres som PLT, mens cellene som havner i coincidence-sonen blir eliminert fra resultatet (figur 1.10) (1)(3).



1.9: Til venstre vises plottet med lysspredning ved 7 grader på x-aksen og 90 grader på y-aksen. Til høyre vises plottet med lysspredning ved 7 grader på x-aksen og FL1 på y-aksen (3).

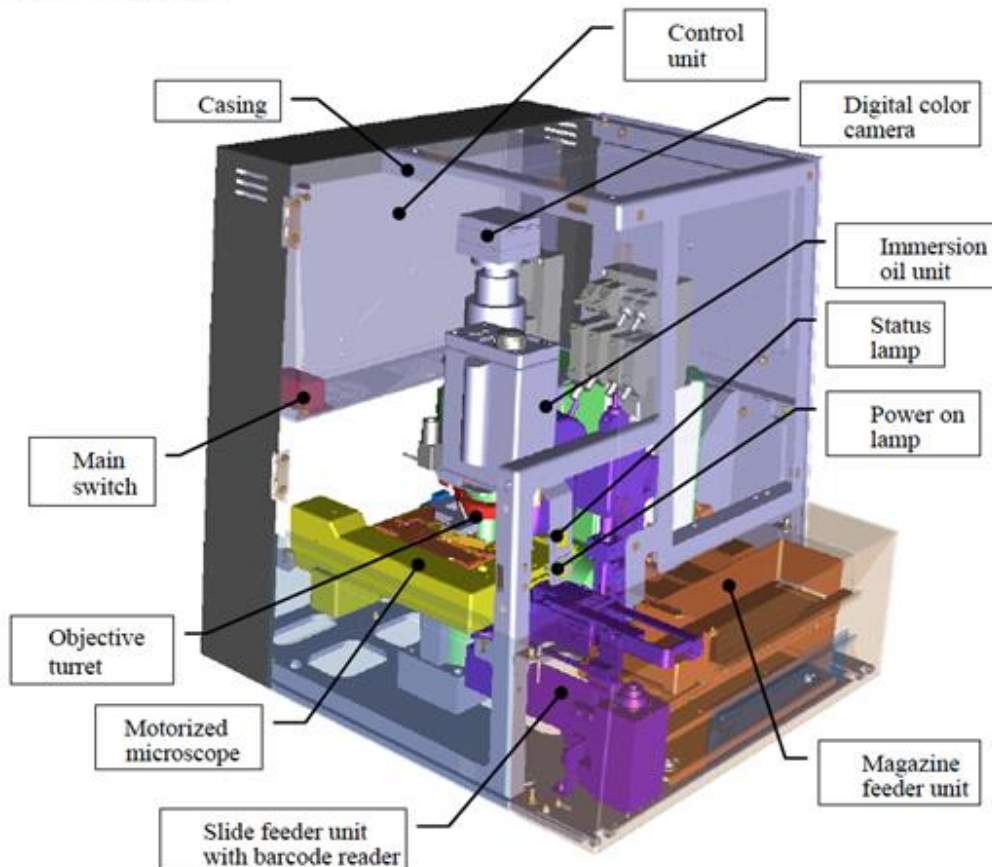


Figur 1.10: Lysspredning ved 7 grader på x-aksen, og FL1 på y-aksen. Cellene som havner i coincidence-sonen blir eliminert fra resultatet (3).

### 1.4.3 CellaVision DM96

CellaVision DM96 er et automatisert analyseinstrument som identifiserer celler i blodutstryk, utfører en differensialtelling av WBC, karakteriserer RBC-morfologi og estimerer antall PLT (11). Instrumentet består av en "slide feeder unit" hvor preparatet med barkode mates inn og registreres av en barkodeleser. I tillegg er det en "slide scanning unit" med blant annet et motorisert mikroskop og et digitalt fargekamera (figur 1.11), som er tilknyttet et datasystem med "CellaVision Blood Differential Software". Denne programvaren har en database med bilder av ulike celletyper, og blir brukt som referanse for å sammenligne og klassifisere blodcellene i blodutstryket (12).

### Slide scanning unit:



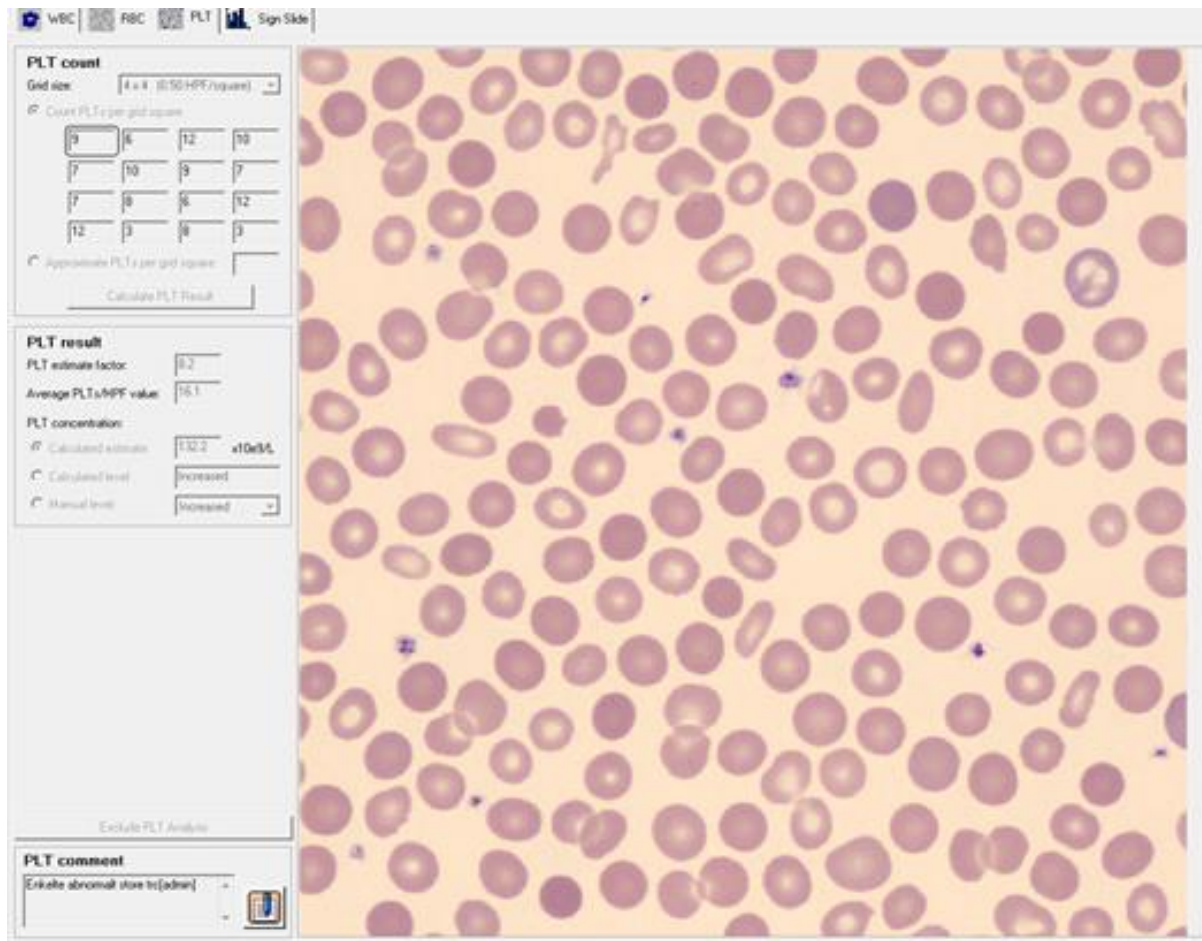
Figur 1.11: Slide scanning unit i CellaVision DM96 (12).

Før analyse av cellene må det lages et blodutstryk. Dette gjøres hovedsakelig på blodutstryks- og fargemaskinen SP10, som både lager, fikserer og farger utstryk på ca. 30 minutt. Ved AMB på St. Olavs Hospital er SP10 en del av oppsettet med XN20. For at SP10 skal kunne lage blodutstryk av konstant kvalitet, må verdien for erytrocytt volum fraksjon (EVF-verdi) vært kjent (13). Det vil si andelen RBC utgjør av det totale blodvolumet i prosent (1). Dersom EVF ikke er analysert, vil prøven automatisk analyseres i XN20, før prøven går videre til SP10. Denne verdien bestemmer vinkelen på blodsprederen i SP10, og sørger for at blodutstryket blir av riktig tykkelse og lengde. Preparatene farges med en tilpasset fargeprotokoll for bruk i CellaVision, her med May-Grunwald/Giemsa fargemetode (13).

Ferdig fikserte og fargede blodutstryk blir deretter analysert i CellaVision. Oversiktsbilder av cellene i blodutstryket blir presentert på en tilkoblet skjerm. Systemet preklassifiserer WBC og RBC, og bioingeniøren som opererer instrumentet validerer den foreslåtte klassifikasjonen av de ulike cellene. PLT blir ikke klassifisert og antall PLT må estimeres manuelt av bioingeniører. De må være spesielt trent til å bruke utstyret og ha god kompetanse innen cellemorfologi, da dette også må vurderes. Det er flere måter å utføre en estimering av antall



PLT på, men den som blir brukt i dette bachelorprosjektet er å telle PLT i 16 oversiktsbilder (figur 1.12). Gjennomsnittlig antall PLT ganges opp med en gitt faktor for å finne konsentrasjonen av PLT. Faktoren er fastsatt i instrumentet, men kan justeres av bioingeniørene på avdelingen (11)(12).



1.12: Figuren viser ett av de 16 oversiktsbildene (den markerte ruten øverst til venstre), og en estimering av antall PLT (9) i det aktuelle utsnittet. PLT-I= 185. Skjermdump fra CellaVision brukt med tillatelse fra faglig veileder ved AMB.

### 1.4.5 Rutiner for oppfølging av lave PLT-verdier

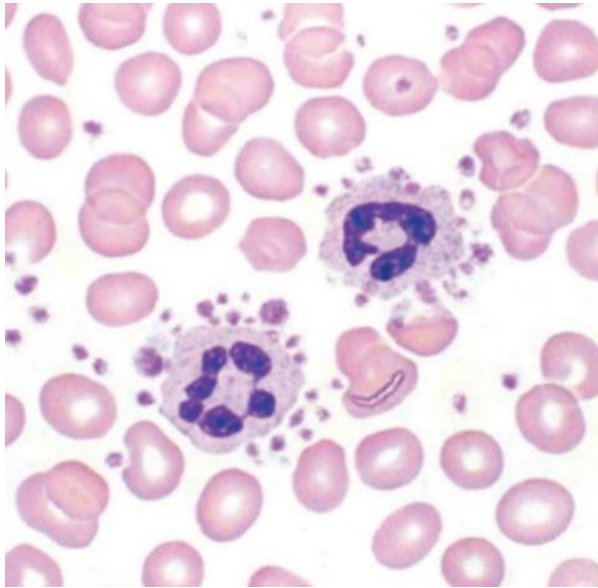
Ved PLT-verdier  $<100 \times 10^9/L$  målt med PLT-I, vil valideringssystemet i Sysmex (EPU) stoppe prøven. Det kreves kompetanse fra bioingeniører til å vurdere log-normalfordelingen til volum på kurven (starter og slutter på x-aksen), og om den ligger innenfor diskriminatorens grensene (kap. 1.4.1). Hensikten med denne vurderingen er å avgjøre om det er nødvendig med verifiserende tiltak, som i første omgang vil være reanalysering med PLT-F. Ved PLT-verdier  $<20 \times 10^9/L$  vil EPU på grunnlag av valideringsreglene automatisk reanalysere med denne metoden (6).

Dersom scatterplottet fra PLT-F er abnormalt vil bioingeniøren ta en avgjørelse på om CD61 skal benyttes. Da vil pasienthistorikk og sammenligning mellom resultater fra dag til dag tas med i vurderingen. Prøven sjekkes alltid for aggregering i blodutstryk ved hjelp av mikroskop før bruk av CD61. Dette gjøres også i noen tilfeller før analysering med PLT-F, og ved ukjent pasienthistorikk med lave verdier målt med PLT-I (6). PLT-aggregering i prøven må vurderes ettersom det ikke alltid vil telles med som PLT i analyseinstrumentene (4). Det er kun ved tilfeller hvor aggregering ikke er påvist og histogram/scatterplot for PLT fra XN20 ikke oppfyller bestemte kriterier, at CD61 benyttes (6).

### **1.5 Generelle feilkilder ved telling av antall PLT**

Ved telling av antall PLT må det tas hensyn til en rekke generelle feilkilder som kan forårsake falskt for lavt eller falskt for høyt resultat. Ved prøvetaking bør det helst benyttes K2-EDTA-rør, som har antikoagulerende effekt ved å binde opp kalsium som er essensiell for koagulasjon (7). I tillegg kan det benyttes citrat-rør med blå kork, og senkningsrør (SR-rør) med svart kork. Citratblod må multipliseres med en fortynningsfaktor ettersom det gir 15-25% for lave PLT-verdier på grunn av fortykning med citratløsning. Faktor ved bruk av citratrør er 1,11, og faktor til SR-rør er 1,25. Citratblod brukes dersom det er mistanke om pseudotrombocytopeni (EDTA-antistoff) (3)(6).

PLT-aggregering vil si at flere PLT ligger tett sammen og forårsaker falskt for lavt resultat, ettersom de ikke blir talt enkeltvis (3). Det kan oppstå in vivo, ved for eksempel autoantistoff, eller in vitro på grunn av blant annet henstand og/eller transport. En annen type in vitro aggregering er pseudotrombocytopeni, som er et resultat av antistoffer som er aktive i nærvær av EDTA (1). Det kan observeres enten som store aggregater eller PLT-satellitisme rundt nøytrofile granulocytter eller monocytter, som anvist i figur 1.12 (4). Andre årsaker til falskt for lavt resultat kan være kuldeagglutinerer og lipemi (1).



Figur 1.13: PLT-satellitisme rundt nøytrofile granulocytter (1).

Falskt forhøyede resultater kan forårsakes av en rekke interferenter som blant annet medtelling av små RBC, samt cellefragmenter fra WBC og RBC. Andre partikler som kan interferere er fibrin og malariaparasitter. En annen årsak er langvarig stase under prøvetaking, som kan resultere i at rød cellestroma fra hemolyserte RBC kan påvirke PLT-tellingen. I enkelte tilfeller kan det også oppstå kryoglobuliner og -fibrinogen ved oppbevaring i kjøleskap, som kan påvirke resultatet. I tillegg kan reagenser som er forurenset gi økte PLT-verdier (1)(3).

### 1.6 Instrumentenes muligheter og begrensninger

Måleområdet for de ulike analyseprinsippene i XN20 og Celdyn Sapphire sier noe om metodenes sensitivitet. Tabell 1.2 viser at måleområdet for metodene PLT-F og CD61 er lavere enn for PLT-I. Dette gir en indikasjon om at PLT-F og CD61 er bedre metoder å benytte ved lavere PLT-verdier, da de er mer sensitive.

Tabell 1.2: Måleområder for Sysmex XN20 og Celdyn Sapphire med tilhørende analyseprinsipper (3).

Instrument	Enhet	PLT-I	PLT-F	CD61
Sysmex XN20	$\times 10^9/L$	2-5000	1-5000	-
Celdyn Sapphire	$\times 10^9/L$	Ikke relevant	-	1-1000

Holdbarheten for analysene er også en begrensende faktor, og det er derfor viktig at prøver analyseres innenfor tiden (se tabell 1.3). Dette er spesielt nødvendig ved telling av antall PLT da de har en tendens til å klumpe seg sammen i prøvetakingsrøret om det blir stående over lengre tid (14).

Tabell 1.3: Oppgitt holdbarhet for analyser (i timer) ved Seksjon hematologi, AMB (15).

<b>Parameter</b>	<b>Sysmex XN20 (timer i romtemp)</b>	<b>Sysmex XN20 (timer i kjøleskap)</b>	<b>Celldyn Sapphire (timer i romtemp)</b>	<b>Celldyn Sapphire (timer i kjøleskap)</b>
<b>PLT-I</b>	96	96	96	96
<b>PLT-F</b>	24	96	-	-
<b>CD61</b>	-	-	96	96

### 1.6.1 Sysmex XN20

En begrensning ved bruk av PLT-I er at prøven ikke kan analyseres før etter henstand i 15-30 min. Dette er fordi EDTA i prøvetakingsrøret bidrar til å øke volumet til PLT ved å endre formen slik at det blir runde (3). Ved bruk av PLT-I er dette nødvendig for at PLT-kurven skal bli log-normalfordelt (starter og slutter på x-aksen) (6). Falskt for lavt resultat kan oppstå dersom prøven analyseres for tidlig, da formen til PLT ikke er tilstrekkelig endret, og PLT vil havne utenfor nedre diskriminatorgrense (3).

Diskriminatorgrensene til PLT-I i XN20 medfører også risiko for at store PLT ikke telles med da de havner utenfor øvre grense, og likedan med små PLT da de havner utenfor nedre grense. Dette forklarer også hvordan små RBC kan telles som store PLT, og omvendt. Metoden er ikke spesifikk nok til å kunne utelukke at eventuelle RBC- og WBC-fragmenter i prøven blir registrert. Dersom størrelsen på fragmentene tilsier at de havner innenfor diskriminatorgrensene til PLT, vil de telles som PLT og dermed føre til falskt for høyt resultat (3).

En begrensning ved bruk av PLT-F er at prøvene ikke kan være mer enn 24 timer gamle (6) (15). Denne metoden teller også WBC i samme kanal, og WBC-fragmenter kan dermed interferere og gi falskt for høyt resultat (3).

### **1.6.2 Celldyn Sapphire**

Selv om CD61 blir sett på som fasitmetoden ved AMB, og blir brukt som referansemetode i en rekke studier (16) (17), har den også noen feilkilder. I tilfeller hvor pasienten har sykdommen Glanzmanns trombasteni, vil CD61 rapportere falskt for lave PLT-verdier da pasienten mangler antigenet (GPIIIa). Autoantistoffer hos pasienter vil også kunne dekke over antigen på overflaten av PLT, og føre til falskt for lavt resultat (3). CD61 har i motsetning til de andre metodene kun mulighet til å analysere i autosampler, som krever 1 mL dødvolum i tillegg til prøvevolumet (10). Dette kan være en utfordring da det ikke alltid er mulig å få nok prøvemateriale. Ved verifisering av lav PLT-verdi hos nyfødte kan det dermed hende at CD61 ikke kan benyttes, på grunn av lite prøvemateriale.

### **1.6.3 CellaVision DM96**

For å sikre høy kvalitet på blodutstryk fra K2-EDTA-rør må det lages innen 4 timer (18). Ved oppbevaring av EDTA-blod i romtemperatur i mer enn 5 timer kan det oppstå for eksempel PLT-aggregater som vil påvirke prøveresultatet (1). Aggregatene vil legge seg på kanten og ved halen av blodutstryket (4). Disse vil ikke observeres i CellaVision ettersom det ikke er her instrumentet lokaliserer og identifiserer blodceller (19).

## **1.7 Problemstilling**

Det er viktig å oppnå korrekt analyseresultat, spesielt ved lave PLT-verdier, for å unngå feil medisinsk behandling. Standard metode for telling av antall PLT ved AMB og de fleste andre sykehus i Norge er som nevnt PLT-I, og som verifiserende tiltak benyttes metodene PLT-F og CD61. De sistnevnte metodene er svært dyre analyser, og ikke alle sykehuslaboratorier har mulighet til å benytte seg av disse. Estimering av antall PLT i blodutstryk i CellaVision er en enklere og billigere metode som krever mindre prøvevolum (13)(19). Ettersom estimering av antall PLT utføres manuelt av en bioingeniør, vil det bli lettere å oppdage interferenter i prøvene da cellene observeres i oversiktsbilder tatt med mikroskopet i instrumentet (11).

Dette leder til problemstillingen “Gir metodene PLT-I, PLT-F og CD61 like analyseresultat for antall PLT, og har estimering i blodutstryk i CellaVision god nok riktighet og presisjon til å kunne gi samsvarende PLT-verdier i lave PLT-nivå, og dermed kunne benyttes som en alternativ metode?” I tillegg var det ønskelig fra faglig veileder å registrere MPV (middel PLT volum) og PDW (PLT distribusjonsbredde) på de analyserte prøvene for å vurdere om

det er noen sammenheng mellom disse resultatene og antall PLT målt med PLT-I-metoden, samt vurdere sammenhengen mellom MPV og IPF%. I samråd med veileder ble det bestemt at disse resultatene går litt utover dette bachelorprosjektet, og de er derfor lagt med i vedlegg 6, og vil ikke bli videre diskutert i oppgaven.

## **2. Material og metode**

### **2.1 Prøvemateriale**

Samtlige prøver til dette bachelorprosjektet ble tatt fra inneliggende pasienter under behandling på St. Olavs hospital, av bioingeniører eller andre ansatte på sykehuset. Det ble utført venøs blodprøvetaking ved bruk av K2-EDTA-rør, og prøvene ble analysert innen 24 timer. Det ble tilfeldig samlet inn prøver i ulike PLT-nivå og med interferensproblemtaikk, som WBC- og RBC-fragmenter, eller andre faktorer som forstyrret PLT-avlesningen. Prøvene med lavt PLT-nivå ble tatt fra kreft- eller leukemipasienter. Prøvene ble tatt i henhold til prosedyre for blodprøvetaking ved St. Olavs hospital (14).

### **2.2 Analysering av prøver**

For å undersøke om estimering av antall PLT i blodutstryk i CellaVision er en metode som alternativt kan benyttes som verifiserende tiltak, ble det gjort sammenligninger av antall PLT både i normalt og i lavt PLT-nivå målt med metodene PLT-I og PLT-F i XN20, CD61 i Celdyn Sapphire og estimert antall PLT i blodutstryk i CellaVision. Analysene ble utført i henhold til prosedyrer og brukermanualer for de ulike målemetodene ved St. Olavs hospital. Analyseprinsippene for telling av antall PLT ble nærmere beskrevet under kapittel 1. Det ble benyttet korrekte reagenser til de ulike analysene, og kontroller ble analysert og godkjent før analysering av prøvene. På grunn av omstendighetene (SARS-CoV-2-pandemien) ble samtlige analyser utført av ansatte ved seksjon for AMB på St. Olavs hospital:

#### **2.2.1 Sammenligning av PLT-verdier i ulike PLT-nivå estimert i blodutstryk i CellaVision og målt med PLT-I-metoden**

For å undersøke om de to metodene ga samme analysesvar på prøver med ulike PLT-verdier, ble det analysert 19 prøver med PLT-I i XN20 og estimert antall PLT i blodutstryk i CellaVision. Det ble utført regresjons- og korrelasjonsanalyse med PLT-I som referansemetode på x-aksen, plottet mot resultatene fra CellaVision på y-aksen. I tillegg ble det laget et differanseplott med antall PLT målt med PLT-I på x-aksen og differansen mellom metodene på y-aksen (kap. 2.3). Etter ønske fra faglig veileder ble det benyttet en grense på  $\pm 20\%$  avvik fra referansemetoden til vurdering av resultatene fra estimering av PLT i blodutstryk.

### **2.2.2 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå estimert i blodutstryk, og målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61**

For å undersøke om de fire metodene ga samme analysesvar på prøver med lave PLT-verdier ( $<50 \times 10^9/L$ ), ble 50 prøver analysert med estimering av antall PLT i CellaVision, og antall PLT målt med metodene PLT-I og PLT-F i XN20. Noen av prøvene ble også analysert med CD61 i Celldyn Sapphire. I enkelte av prøvene ble det påvist aggregering ved analysering. Disse prøvene ble merket med “aggr.” i resultatet, men ble ikke videre diskutert. Regresjons- og korrelasjonsanalyse ble utført med antall PLT målt med PLT-I som referansemetode på x-aksen, mot henholdsvis antall PLT estimert i blodutstryk, antall PLT målt med PLT-F og antall PLT målt med CD61 på y-aksen. I tillegg ble det laget tre differanseplott for å observere differanser mellom samtlige metoder. Antall PLT målt med PLT-I, PLT-F og CD61 ble benyttet som referansemetoder på x-aksen, og differansene mellom de ulike metodene på y-aksen (kap. 2.3). Etter ønske fra faglig veileder ble det benyttet en grense på  $\pm 20\%$  avvik fra referansemetoden til vurdering av resultatene fra de ulike metodene.

### **2.2.3 Repeterbarhet for estimering av antall PLT i blodutstryk i lavt og normalt PLT-nivå**

For å undersøke presisjonen til estimering av antall PLT i blodutstryk i CellaVision i lavt PLT-nivå ble én prøve analysert 20 ganger, med manuell tillaging av blodutstryk. Tre av blodutstrykene var ikke optimale, og CV ble derfor beregnet ut i fra 17 verdier. For beregning av presisjon i normalt PLT-nivå ble én prøve analysert 17 ganger, hvor blodutstrykene ble laget i SP10. Variasjonskoeffisienten (CV) til parallellene for de to prøvene ble beregnet (kap. 2.3), og vurdert opp mot et krav på CV  $<3,0\%$  som benyttes ved metoder for telling av antall PLT ved AMB. I tillegg ble de sammenlignet med CV-verdier oppgitt for ulike analysemetoder i XN20 og Celldyn Sapphire, hentet fra valideringsrapporter til AMB.

### **2.2.4 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå og prøver med interferensproblematikk, målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61**

For å undersøke om de tre metodene ga samme analysesvar ble 357 prøver i svært lavt PLT-nivå og/eller med interferensproblematikk, som RBC- og WBC-fragmenter, analysert med metodene PLT-I og PLT-F i XN20 og CD61 i Celldyn Sapphire. Datamaterialet ble brukt til å vurdere forskjeller mellom de ulike metodene, og om det kan føre til feil analysesvar dersom kun PLT-I benyttes. For disse prøvene var det allerede anvendt differanseplott med antall PLT målt med CD61 som referansemetode på x-aksen, og med differansen mellom antall PLT målt



med PLT-I/PLT-F og CD61 på y-aksen (se kap. 2.3). Etter ønske fra faglig veileder ble det benyttet en grense på  $\pm 20\%$  avvik fra referansemetoden til vurdering av resultatene fra de ulike metodene.

### 2.3 Statistiske metoder

For å behandle rådata til metodesammenligning ble programvaren “Microsoft Office Excel, versjon 16.16.15 (191014)” benyttet. Det ble det utført regresjons- og korrelasjonsanalyse for å undersøke sammenhengen mellom en testmetode og en referansemetode.

Regresjonsanalysen ga informasjon om den lineære sammenhengen ved en rett linje  $y=ax+b$ , hvor  $a$  er stigningstallet og  $b$  er skjæringspunktet. Ved en perfekt lineær sammenheng mellom de to metodene vil  $a$  være lik 1 og  $b$  være lik 0. Korrelasjonskoeffisienten viste til graden av linearitet mellom metodene, fra -1 til 1, hvor 0 tilsvarer dårlig korrelasjon, mens -1 og 1 tilsvarer perfekt korrelasjon, henholdsvis negativ og positiv (20).

I tillegg til regresjons- og korrelasjonsanalyse ble det laget differanseplott, som ble brukt for å vise differansen mellom to metoder som en funksjon av antall  $PLT \times 10^9/L$  målt med referansemetoden. Plottet kan vise til om metodene har systematiske avvik, og om de er konstante og/eller konsentrasjonsavhengige (7).

Repeterbarhet, innen-serie presisjon, ble også beregnet. Det vil si i hvilken grad gjentatte målinger utført med like målebetingelser stemmer overens. Målinger vil være påvirket av tilfeldige feil, og denne usikkerheten i prøvesvarene kan oppgis som variasjonskoeffisienten (CV) (7). Denne ble beregnet ved bruk av gjennomsnittsverdien og standardavviket (SD) til parallellene med følgende formel:

$$CV = SD/middelverdi * 100 \quad (1)$$

### 3. Resultater

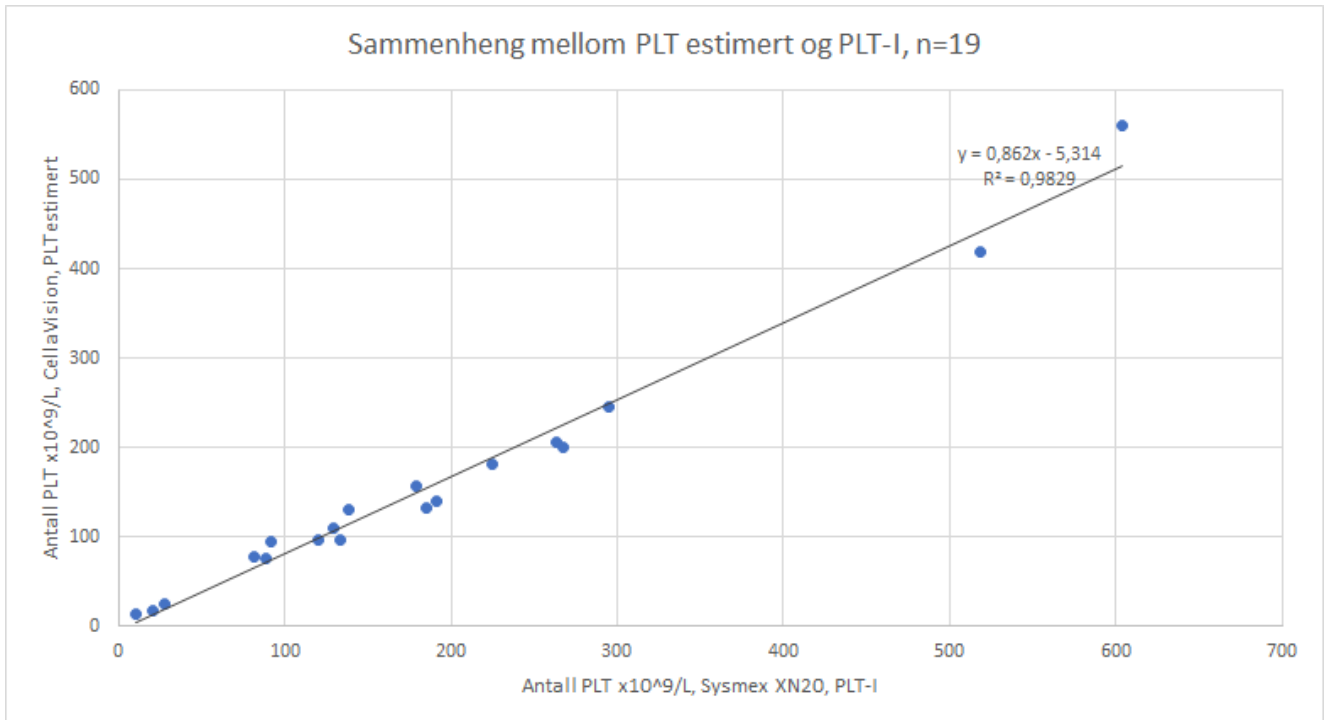
#### 3.1 Sammenligning av PLT-verdier i ulike PLT-nivå estimert i blodutstryk i CellaVision og målt med PLT-I-metoden

For å undersøke sammenhengen mellom antall PLT målt med referansemetoden PLT-I, og estimering i blodutstryk i CellaVision, ble 19 prøver i ulike PLT-nivå analysert med begge metoder. Regresjons- og korrelasjonsanalyse ble utført som beskrevet i kap. 2.2.1, og vist i tabell 3.1 og figur 3.1. Det ble som nevnt i kap. 2.2.1 også laget et differanseplott mellom estimering av antall PLT i blodutstryk og antall PLT målt med PLT-I, presentert i figur 3.2. For fullstendige data, se vedlegg 1 og 5.

Tabell 3.1: Utdrag fra regresjonsstatistikk mellom antall PLT estimert i blodutstryk og antall PLT målt med PLT-I-metoden.

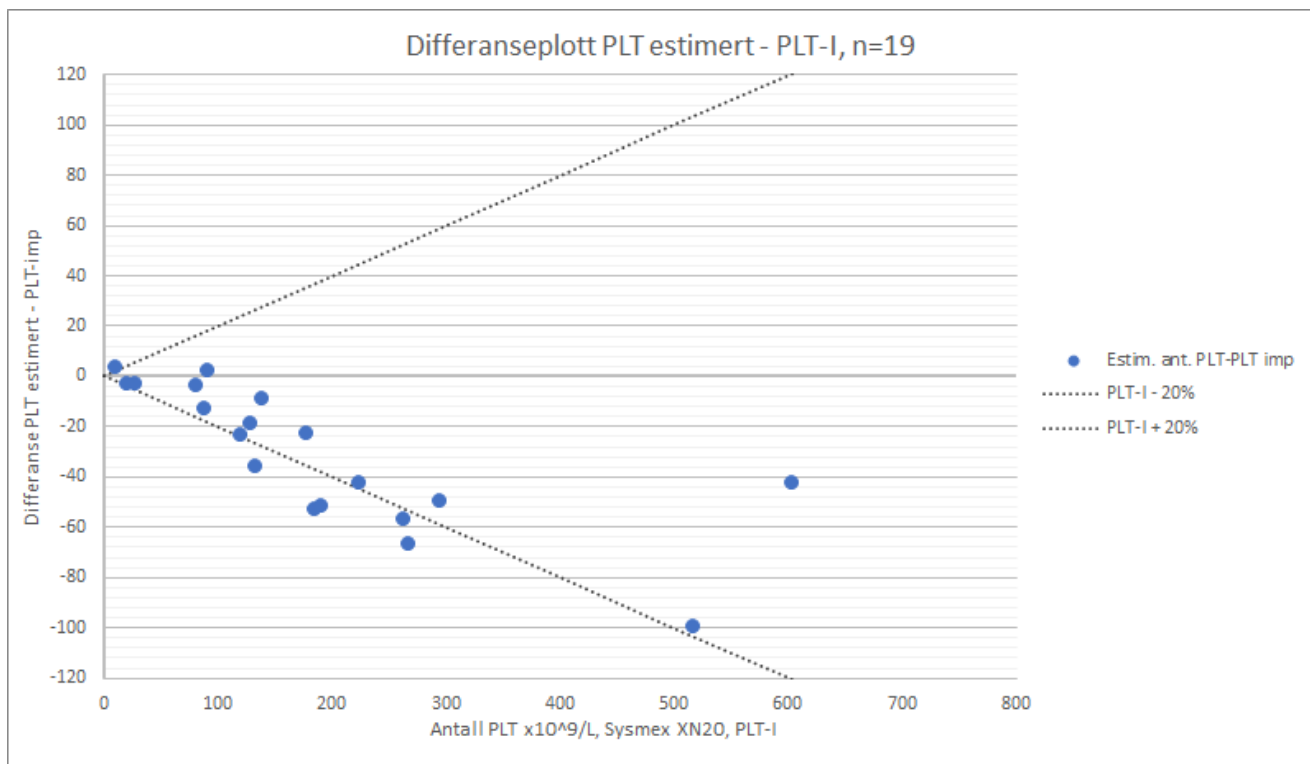
Regresjonsstatistikk			
Multipel R (korrelasjonskoeffisient)	0,991396095		
R-kvadrat (determinasjonskoeffisient)	0,982866218		
Koeffisienter		Nederste 95%	Øverste 95%
Skjæringspunkt	-5,313977642	-19,3711156	8,743160326
PLT-impedanse	0,861972445	0,803736271	0,92020862

Resultatene til determinasjonskoeffisienten og korrelasjonskoeffisienten tilsier god lineær sammenheng. 0 ligger innenfor 95% konfidensintervallet (KI) til skjæringspunktet. 1 befinner seg ikke i 95% KI til stigningstallet, som viser til proporsjonalt avvik mellom metodene.



Figur 3.1: Sammenheng mellom antall PLT målt med PLT-I (referansemetode) på x-aksen og antall PLT estimert i blodutstryk (testmetode) på y-aksen. Determinasjonskoeffisient ( $R^2$ ) og formel for regresjonslinje er oppgitt.

Resultatene viser at det er god korrelasjon mellom metodene ved at punktene ligger nært den tilpassede rette linjen  $y=0,862x-5,314$ . Regresjonslinjen viser derimot at y ikke er lik x. Det vil si at den ikke går gjennom origo og stigningstallet er  $<1$ , som tyder på at det foreligger systematiske avvik. Linjen viser et systematisk lavere antall PLT estimert i blodutstryk i forhold til antall PLT målt med PLT-I, som øker med PLT-konsentrasjonen.



Figur 3.2: Estimering av antall PLT i blodutstryk - antall PLT målt med PLT-I-metoden. Differansen på y-aksen og referansemetoden, PLT-I, på x-aksen.  $\pm 20\%$  fra PLT-I er lagt inn som stiplede linjer.

Resultatet for antall PLT estimert i blodutstryk sammenlignet med antall PLT målt med PLT-I viser at PLT-verdier  $< 100 \times 10^9/L$  ligger innenfor  $\pm 20\%$  grenser fra PLT-I og jevnt fordelt rundt midtlinjen. Dette viser til at det ikke foreligger systematisk avvik i dette området. PLT-verdier  $> 100 \times 10^9/L$  ligger derimot ikke rundt midtlinjen, men har en avtagende trend som tyder på systematisk avvik. Trendlinjen krysser x-aksen og skjærer y-aksen i et punkt forskjellig fra null, som viser til at metodene har konstant og konsentrasjonsavhengig avvik ved målinger i normale/høye PLT-nivå. Det vil si at jo høyere PLT-verdier, jo større er differansen mellom antall PLT estimert i blodutstryk og antall PLT målt med PLT-I.

### 3.2 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå estimert i blodutstryk, og målt med metodene PLT-I-, PLT-F og CD61

For å undersøke sammenhengen mellom antall PLT målt med PLT-I, estimert antall PLT i blodutstryk og antall PLT målt med metodene PLT-F og CD61, ble det analysert 50 prøver i lavt PLT-nivå med de nevnte metodene. Som beskrevet i kap. 2.2.2 ble regresjons- og korrelasjonsanalyse utført, og det ble fremstilt tre differanseplott. Statistikken presenteres i kap. 3.2.1 og 3.2.2. For fullstendige data, se vedlegg 2 og 5.

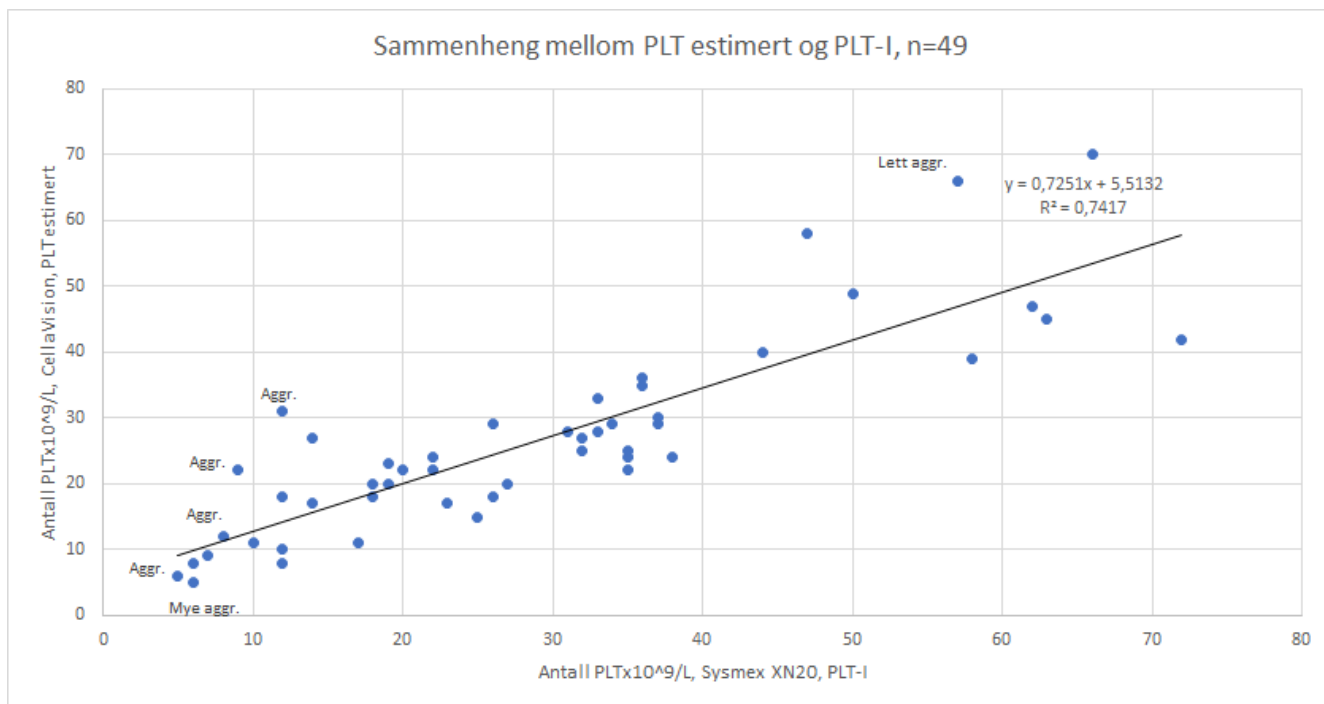
### 3.2.1 Regresjons- og korrelasjonsanalyser med antall PLT målt med PLT-I som referansem metode

Regresjons- og korrelasjonsanalyse av antall PLT estimert i blodutstryk som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, er vist som følger:

Tabell 3.2: Utdrag fra regresjonsstatistikk mellom antall PLT estimert i blodutstryk og antall PLT målt med PLT-I-metoden.

Regresjonsstatistikk			
Multipel R (korrelasjonskoeffisient)	0,861232957		
R-kvadrat (determinasjonskoeffisient)	0,741722206		
Koeffisienter		Nederste 95%	Øverste 95%
Skjæringspunkt	5,513216938	1,305692871	9,720741004
PLT-impedanse	0,725107911	0,599548702	0,850667119

Resultatene til determinasjonskoeffisienten og korrelasjonskoeffisient tilsier god lineær sammenheng. 0 befinner seg ikke i 95% KI til skjæringspunktet, og 1 befinner seg heller ikke i 95% KI til stigningstallet. Dette viser til at det både er konstant og proporsjonalt avvik mellom metodene.



Figur 3.3: Sammenheng mellom antall PLT målt med PLT-I (referansemetode) på x-aksen og antall PLT estimert i blodutstryk (testmetode) på y-aksen. Determinasjonskoeffisient ( $R^2$ ) og formel for regresjonslinje er oppgitt. Ved noen av prøvene ble det observert aggregering, markert med «aggr.».

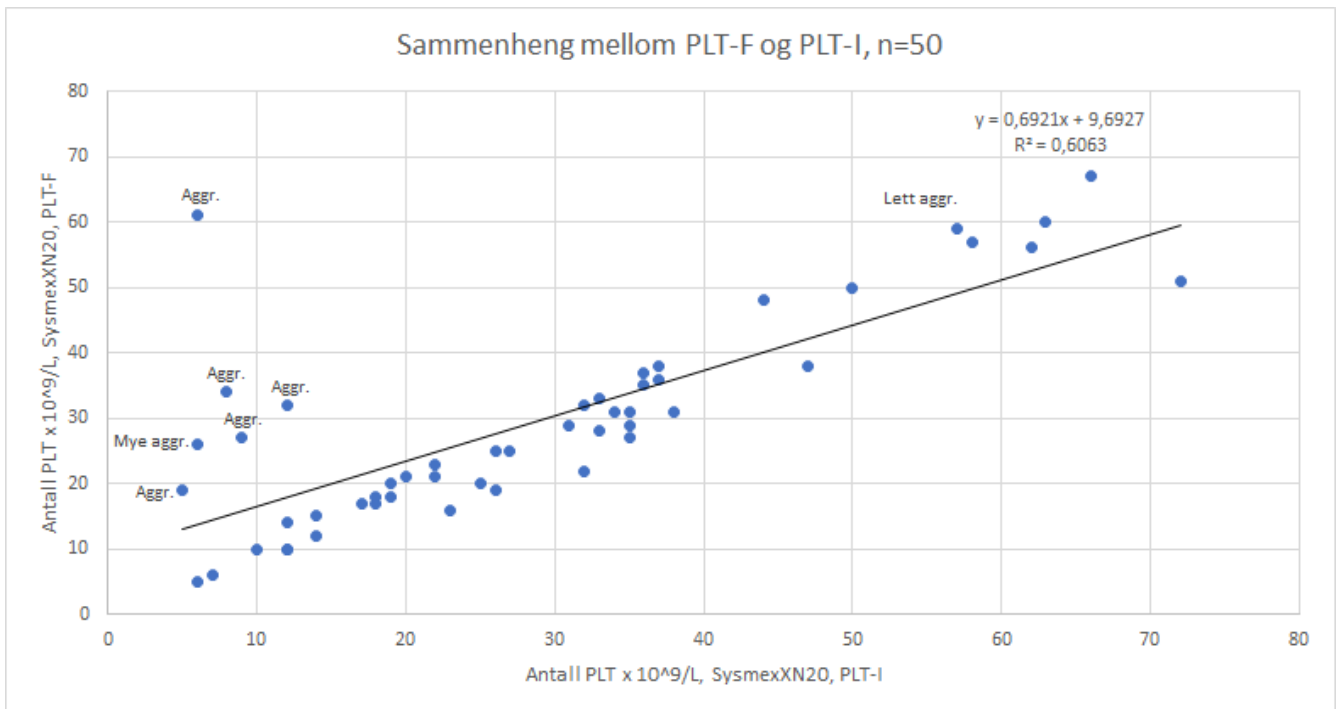
Resultatet viser at punktene ligger forholdsvis spredt rundt den tilpassede rette linjen  $y=0,7251x+5,5132$ . Regresjonslinjen viser at y ikke er lik x. Det vil si at den ikke går gjennom origo og stigningstallet er  $<1$ , som tilsier at det kan foreligge systematisk avvik. Ved lave PLT-verdier vil estimert antall PLT i blodutstryk i CellaVision vise systematisk for høye verdier, mens ved høye PLT-verdier vil metoden vise systematisk for lave verdier. Det observeres at regresjonslinjen ikke ville blitt betydelig påvirket dersom punktene med aggregering ble utelatt. Dette er vist ved regresjons- og korrelasjonsanalyse i vedlegg 5 og 6.

Regresjons- og korrelasjonsanalyse av antall PLT målt med PLT-F som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, er vist som følger:

Tabell 3.3: Utdrag fra regresjonsstatistikk mellom antall PLT målt med PLT-F-metoden og antall PLT målt med PLT-I-metoden.

Regresjonsstatistikk			
Multipel R (korrelasjonskoeffisient)	0,778683117		
R-kvadrat (determinasjonskoeffisient)	0,606347397		
Koeffisienter		Nederste 95%	Øverste 95%
Skjæringspunkt	9,692701906	4,3224363	15,06296751
PLT-impedanse	0,692076802	0,530245449	0,853908154

Resultatene til determinasjonskoeffisienten og korrelasjonskoeffisient tilsier relativt god lineær sammenheng. 0 befinner seg ikke i 95% KI til skjæringspunktet, og 1 befinner seg ikke i 95% KI til stigningstallet. Dette tilsier at det foreligger konstant og proporsjonalt avvik mellom metodene.



Figur 3.4: Sammenheng mellom antall PLT målt med PLT-I (referansem metode) på x-aksen og antall PLT målt med PLT-F (testmetode) på y-aksen. Determinasjonskoeffisient ( $R^2$ ) og formel for regresjonslinje er oppgitt. Ved noen av prøvene ble det observert aggregering, markert med «aggr».

Resultatene viser at punktene ligger nært den tilpassede rette linjen  $y=0,6921x-9,6927$ .

Regresjonslinjen viser at y ikke er lik x. Den går ikke gjennom origo og stigningstallet er  $<1$ , som tilsier at det kan foreligge systematisk avvik. Linjen viser at ved lave PLT-verdier vil antall PLT målt med PLT-F vise systematisk for høye verdier, mens ved høye PLT-verdier vil metoden vise systematisk for lave verdier. Det observeres derimot at regresjonslinjen ville hatt god korrelasjon og lite systematisk avvik, dersom punktene med aggregering ble utelatt. Dette er vist ved regresjons- og korrelasjonsanalyse i vedlegg 5 og 6.

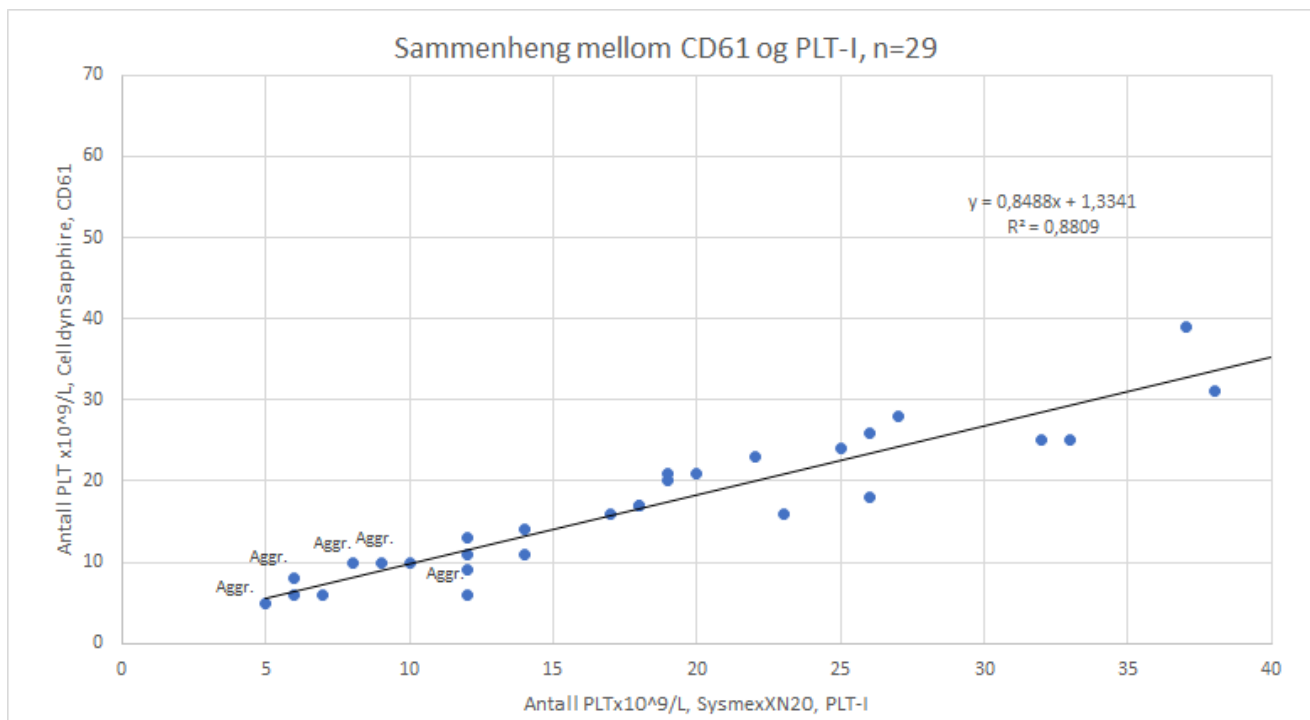


Regresjons- og korrelasjonsanalyse av antall PLT målt med CD61 som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, er vist som følger:

Tabell 3.4: Utdrag fra regresjonsstatistikk mellom antall PLT målt med CD61 og antall PLT målt med PLT-I metoden.

Regresjonsstatistikk			
Multippel R (korrelasjonskoeffisient)	0,93855687		
R-kvadrat (determinasjonskoeffisient)	0,880888999		
Koeffisienter		Nederste 95%	Øverste 95%
Skjæringspunkt	1,334073067	-1,179568968	3,847715102
PLT-impedanse	0,848789148	0,7255426	0,972035696

Resultatene til determinasjonskoeffisienten og korrelasjonskoeffisient tilsier god lineær sammenheng. 0 befinner seg i 95% KI til skjæringspunktet, men 1 befinner seg ikke i 95% KI til stigningstallet. Dette viser til at det foreligger proporsjonalt avvik mellom metodene.



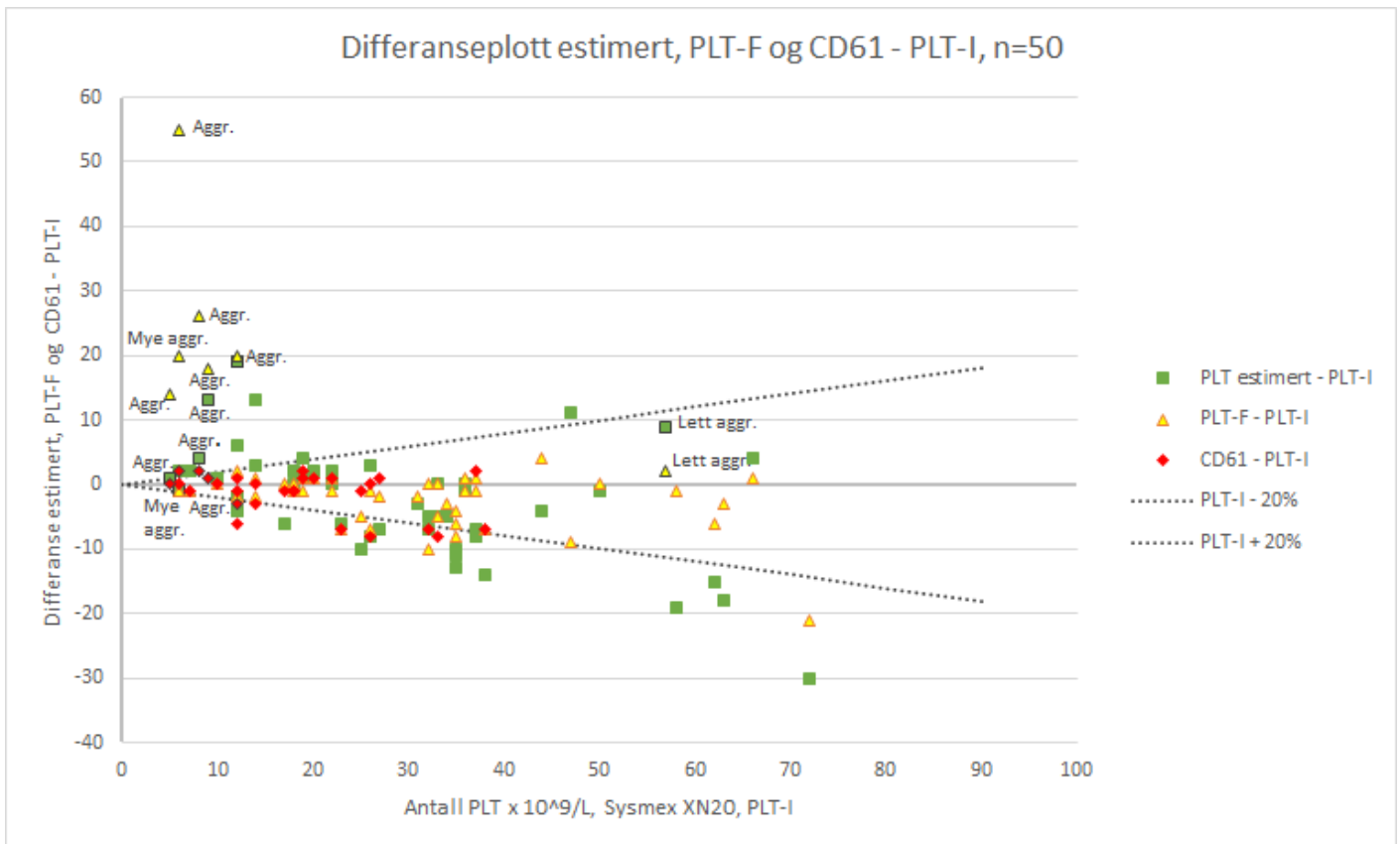
Figur 3.5: Sammenheng mellom antall PLT målt med PLT-I (referansemetode) på x-aksen og antall PLT målt med CD61 (testmetode) på y-aksen. Determinasjonskoeffisient ( $R^2$ ) og formel for regresjonslinje er oppgitt. Ved noen av prøvene ble det observert aggregering, markert med «aggr».

Resultatet viser at punktene ligger nært den tilpassede rette linjen  $y = 0,8488x + 1,3341$ .

Regresjonslinjen krysser nært origo og stigningstallet er ikke langt fra 1. Linjen viser derimot at y ikke er lik x, som tilsier at det kan foreligge et lite systematisk avvik. Det observeres noen ytterpunkt, som for eksempel punktet (12,6), som påvirker korrelasjonen negativt. Ved lave PLT-verdier samsvarer antall PLT målt med de to metodene godt, mens ved høye PLT-verdier vil antall PLT målt med CD61 vise systematisk lavere verdier enn antall PLT målt med PLT-I.

### 3.2.2 Differanseplott med PLT-I, PLT-F og CD61 som referansemetoder

Punkter med aggregering er tatt med i følgende differanseplott, men fører til usikre prøvesvar ved alle metodene, og vil ikke diskuteres videre. Følgende differanseplott fremstiller differansene mellom antall PLT estimert i blodutstryk, antall PLT målt med PLT-F og CD61, og antall PLT målt med PLT-I (referansemetode):



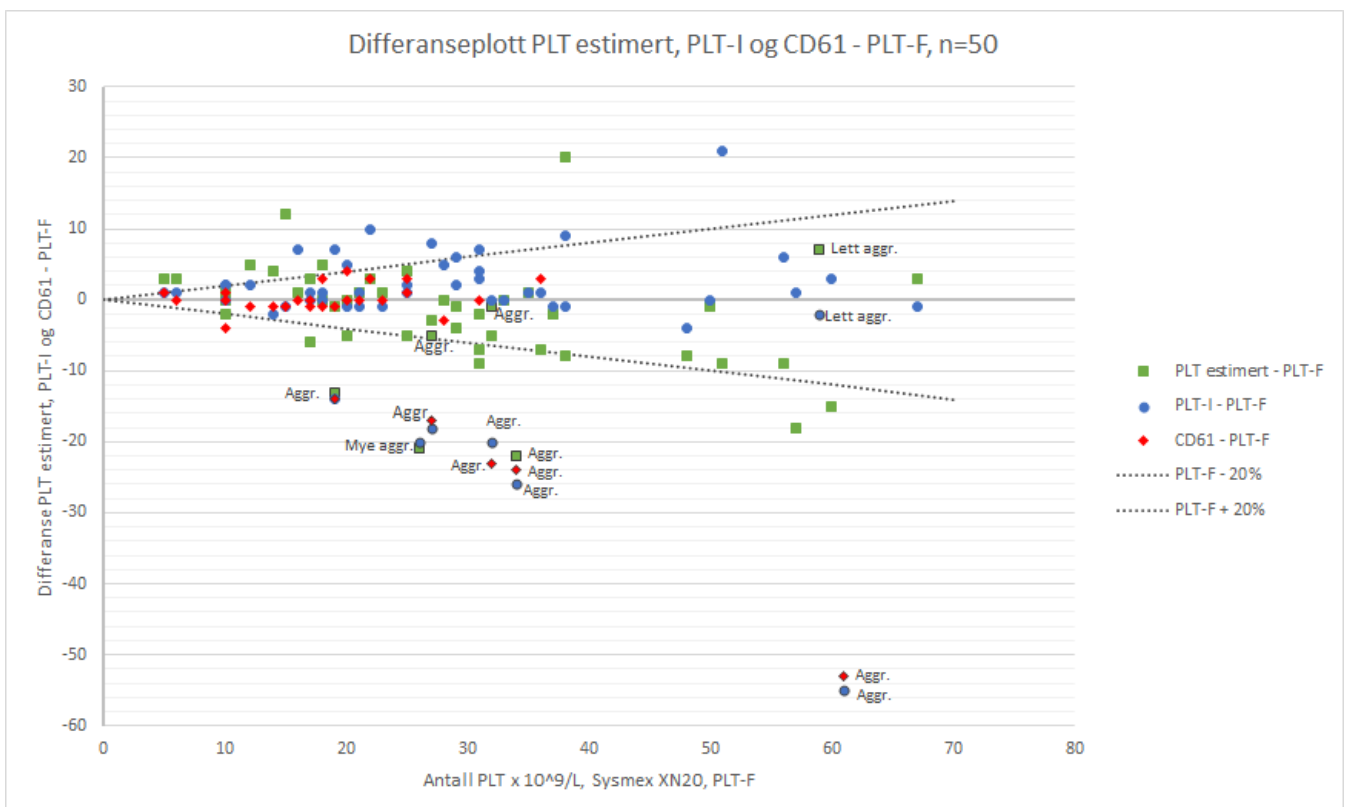
Figur 3.6: Estimert antall PLT, antall PLT målt med PLT-F og CD61 - antall PLT målt med PLT-I. Differansene mellom metodene er plottet på y-aksen og referansemetoden PLT-I på x-aksen. Ved noen av prøvene ble det observert aggregering, markert med "aggr".  $\pm 20\%$  fra PLT-I er lagt inn som stiplede linjer.

Resultatet for antall PLT estimert i blodutstryk sammenlignet med antall PLT målt med PLT-I viser at PLT-verdier i nivå  $< 35 \times 10^9/L$  ligger jevnt rundt midtlinjen, og tyder på at det ikke foreligger systematisk avvik i dette området. Punktene befinner seg både innenfor og utenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med PLT-I. PLT-verdier i nivå  $> 35-100 \times 10^9/L$  har derimot en avtagende trend som tyder på systematisk avvik. Disse punktene ligger rundt en linje som krysser x-aksen og skjærer y-aksen forskjellig fra null, som viser til både konsentrasjonsavhengige og konstante avvik mellom metodene.

Resultatet for antall PLT målt med PLT-F sammenlignet med antall PLT målt med PLT-I viser at punktene ikke ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen, og at det dermed foreligger systematisk avvik. De fleste punktene ligger innenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med PLT-I. I PLT-nivå  $25-100 \times 10^9/L$  har punktene en svakt avtagende trend som krysser x-aksen, og viser til proporsjonalt avvik.

Resultatet for antall PLT målt med CD61 sammenlignet med antall PLT målt med PLT-I viser at punktene ikke ligger relativt jevnt fordelt rundt midtlinjen, og at det dermed foreligger systematisk avvik. De fleste punktene ligger innenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med PLT-I. I PLT-nivå  $10-100 \times 10^9/L$  har punktene en svakt avtagende trend som krysser x-aksen, og viser til proporsjonalt avvik.

Følgende differanseplott fremstiller differansene mellom antall PLT estimert i blodutstryk, antall PLT målt med PLT-I og CD61, og antall PLT målt med PLT-F (referansemetode):



Figur 3.7: Estimert antall PLT, antall PLT målt med PLT-I og CD61 - antall PLT målt med PLT-F. Differansene mellom metodene er plottet på y-aksen og referansemetoden PLT-F på x-aksen. Ved noen av prøvene ble det observert aggregering, markert med "aggr".  $\pm 20\%$  fra PLT-F er lagt inn som stiplede linjer.

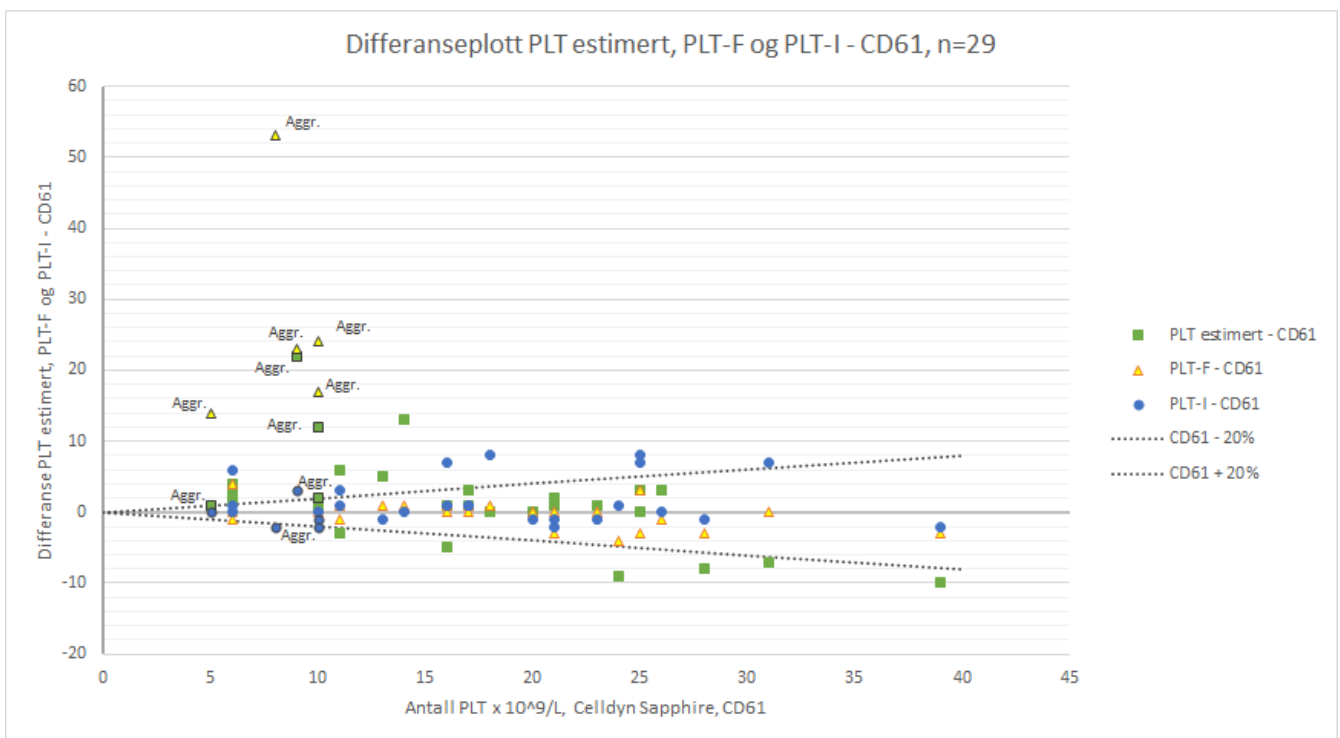
Resultatet for antall PLT estimert i blodutstryk sammenlignet med antall PLT målt med PLT-F viser at PLT-verdier i nivå  $< 35 \times 10^9/L$  ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen, og viser til at det ikke foreligger systematisk avvik i dette området. De fleste punktene ligger innenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med PLT-F. PLT-verdier i nivå  $> 35-100 \times 10^9/L$  ligger derimot rundt en avtagende linje som tyder på systematisk avvik. Disse punktene ligger rundt en linje som

krysser x-aksen og skjærer y-aksen forskjellig fra null, som viser til både konsentrasjonsavhengige og konstante avvik mellom metodene.

Resultatet for antall PLT målt med PLT-I, sammenlignet med antall PLT målt med PLT-F viser at punktene ikke ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen, og at det dermed foreligger systematisk avvik. De fleste punktene ligger innenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med PLT-F. Punktene har en økende trend som krysser x-aksen, og viser til proporsjonalt avvik.

Resultatet for antall PLT målt med CD61 sammenlignet med antall PLT målt med PLT-F viser at punktene ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen, med kun ett punkt utenfor  $-20\%$  fra antall PLT målt med PLT-F. Det ser dermed ikke ut til å være systematisk avvik mellom metodene.

Følgende differanseplott fremstiller differansene mellom antall PLT estimert i blodutstryk, antall PLT målt med PLT-F og PLT-I, og antall PLT målt med CD61 (referansemetode).



Figur 3.8: Estimert antall PLT, antall PLT målt med PLT-F og PLT-I - antall PLT målt med CD61. Differansene mellom metodene er plottet på y-aksen og referansemetoden CD61 på x-aksen. Ved noen av prøvene ble det observert aggregering, markert med "aggr.".  $\pm 20\%$  fra CD61 er lagt inn som stiplede linjer.

Resultatet for antall PLT estimert i blodutstryk sammenlignet med antall PLT målt med CD61 metoden viser at punktene ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen. Punktene ligger både innenfor og utenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med CD61. Dette tyder dermed på at det ikke foreligger systematisk avvik mellom metodene.

Resultatet for antall PLT målt med PLT-F sammenlignet med antall PLT målt med CD61 viser at punktene ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen, med kun ett punkt utenfor  $+20\%$  fra antall PLT målt med CD61. Det ser dermed ikke ut til å være systematisk avvik mellom metodene.

Resultatet for antall PLT målt med PLT-I metoden sammenlignet med antall PLT målt med CD61 metoden viser at punktene ikke ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen, og at det dermed foreligger systematisk avvik. De fleste punktene ligger innenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med CD61. Punktene en svakt økende trend som krysser x-aksen, og viser til proporsjonalt avvik.

### 3.3 Repeterbarhet for estimering av antall PLT i blodutstryk i lavt og normalt PLT-nivå

For å vurdere repeterbarheten ved estimering av antall PLT i blodutstryk i CellaVision ble det beregnet CV for parallellene til én prøve i lavt PLT-nivå estimert 17 ganger, og én prøve i normalt PLT-nivå estimert 17 ganger. Formel (1) ble brukt til beregning av CV, som er presentert i tabell 3.5. For fullstendige data, se vedlegg 3.

Tabell 3.5: Resultater fra beregning av repeterbarhet for paralleller analysert i CellaVision i lavt og normalt PLT-nivå.

	Instrument	Antall paralleller	Middelverdi (x10 <sup>9</sup> /L)	Standardavvik	CV (%)
<b>Normalt PLT-nivå</b>	CellaVision	17	210	14,2	6,8
<b>Lavt PLT-nivå</b>	CellaVision	17	40	7,2	18,2

Resultatene viser at CV til de analyserte parallellene i lavt PLT-nivå er høyere enn CV til parallellene i normalt PLT-nivå. For sammenligning er CV for andre analysemetoder satt opp i tabell 3.6.

Tabell 3.6: CV-verdier oppgitt for ulike analysemetoder til Sysmex XN20 og Celldyn Sapphire, hentet fra valideringsrapporter til AMB.

Instrument	Analysemetode	PLT-nivå ( $\times 10^9/L$ )	CV (%)
Sysmex XN20	PLT-I	164	2,3
Sysmex XN20	PLT-I	50	6,2
Sysmex XN20	PLT-F	15	2,4
Celldyn Sapphire	CD61	19	1,6

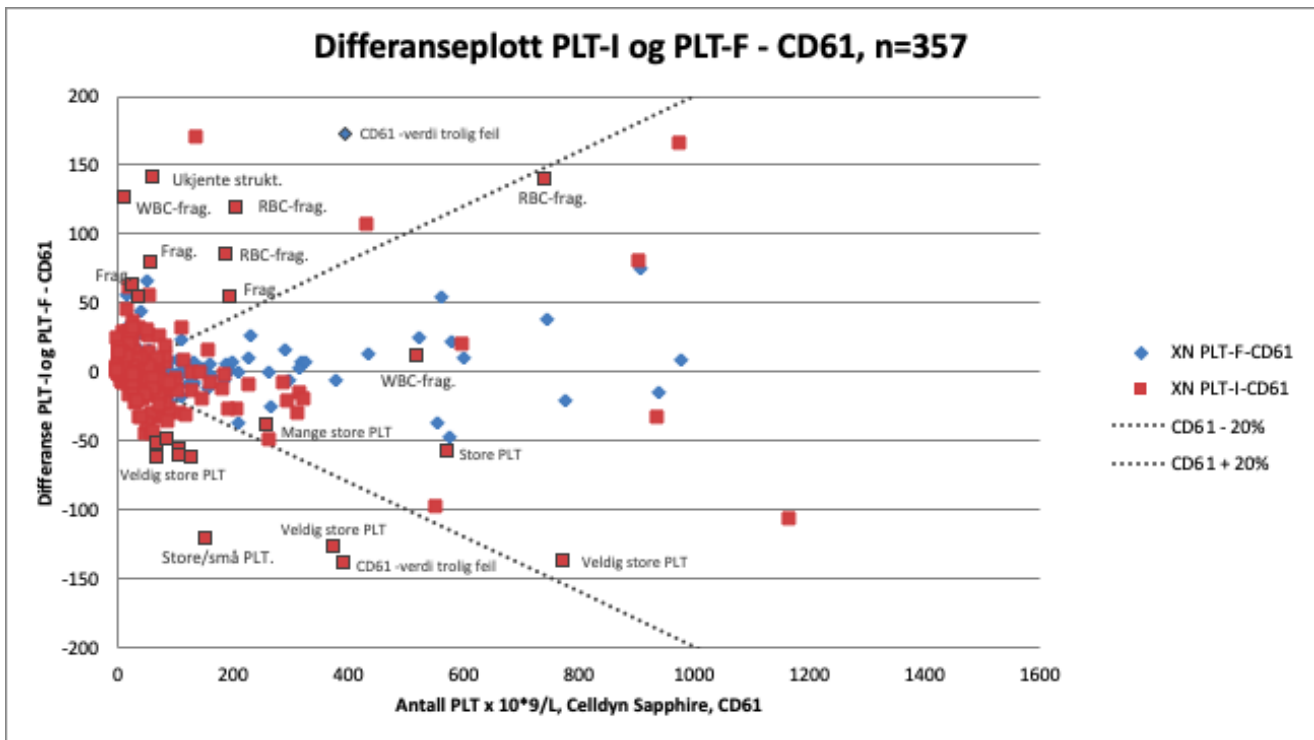
Resultatet i tabell 3.5 viser at i normalt PLT-nivå er CV for estimering av antall PLT blodstryk i CellaVision høyere enn for antall PLT målt med PLT-I i XN20. I lavt PLT-nivå har estimering av antall PLT i blodstryk i CellaVision også en høyere CV enn antall PLT målt med PLT-I og PLT-F i XN20, og CD61 i Celldyn Sapphire.

### 3.4 Sammenligning av PLT-verdier i lavt PLT-nivå og prøver med interferensproblematikk, målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61

For å observere sammenhengen mellom antall PLT målt med PLT-I, PLT-F og CD61 ble det samlet inn 357 prøver i lavt PLT-nivå eller med interferensproblematikk, og analysert med de nevnte metodene. Det ble fremstilt differanseplott med CD61 som referansemetode, som vist i figur 3.9 og 3.10. For fullstendige data, se vedlegg 4.







Figur 3.10: Antall PLT målt med PLT-F (blå) og PLT-I metoden (rød) - antall PLT målt med CD61. Differansene mellom metodene er plottet på y-aksen og referansemeteren, CD61, på x-aksen. En del av prøvene som har påvist interferenter er merket i plottet.  $\pm 20\%$  fra CD61 er lagt inn som stiplede linjer.

Resultatene for antall PLT målt med PLT-I sammenlignet med antall PLT målt med CD61 viser at verdiene ikke ligger jevnt fordelt rundt midtlinjen, og at det dermed foreligger systematisk avvik mellom metodene. I PLT-nivå  $< 100 \times 10^9/L$  observeres det mange punkt som ligger utenfor  $\pm 20\%$  fra CD61. Punktene ligger rundt en linje som skjærer y-aksen forskjellig fra null, og som viser til at det er konstant avvik mellom metodene.

#### 4. Diskusjon

Hensikten med dette bachelorprosjektet var å undersøke om estimering av antall PLT i blodutstryk kan være et alternativ til de verifiserende metodene som benyttes ved AMB i dag, i lavt PLT-nivå. Det var dermed hensiktsmessig først å sammenligne de eksisterende metodene for telling av antall PLT ved AMB; PLT-I, PLT-F og CD61. Dette ble gjort for å finne ut om metodene ga samsvarende PLT-verdier ved analysing av prøver i lavt PLT-nivå og/eller med tilstedeværelse av interferenter. Dette var viktig for deretter å kunne undersøke hvordan den nye metoden ligger i forhold til de eksisterende metodene som benyttes ved AMB, og om den er god nok til å kunne tas i bruk.

Ved analysing av 50 prøver i lavt PLT-nivå ser det ut til at antall PLT målt med PLT-I gir systematisk litt høyere PLT-verdier i forhold til antall PLT målt med PLT-F og CD61. Det observeres at antall PLT målt med PLT-F og CD61 stemmer veldig godt overens i PLT-nivå  $5-100 \times 10^9/L$  (figur 3.7 og 3.8), og ligger innenfor  $\pm 20\%$  med unntak av ett punkt. Disse prøvene hadde ingen observerte interferenter, og resultatene sier kun noe om hvordan metodene samsvarer i lavt PLT-nivå. Det kan også være en usikkerhet knyttet til resultatet, da bare 50 prøver er analysert, og kun 23 av disse er analysert med CD61.

Ved analysing av 357 prøver i lavt PLT-nivå og/eller med interferensproblematikk viser det seg at antall PLT målt med PLT-F viser avvik opp mot  $\pm 50$  fra CD61, mens antall PLT målt med PLT-I viser avvik opp mot  $\pm 150$ . Dette observeres spesielt i PLT-nivå  $< 100 \times 10^9/L$ , og skyldes hovedsakelig interferenter som medfører at metodene gir både falskt for lave og falskt for høye PLT-verdier. Verdiene for antall PLT målt med PLT-I og PLT-F i prøver uten interferenter, ser derimot ut til å stemme bedre overens med antall PLT målt med CD61. En del sykehus i Norge bruker antall PLT målt med PLT-I som standard, og har ikke innført metodene PLT-F og CD61 som verifiserende tiltak. Våre funn viser at dersom kun prøvesvaret fra PLT-I ved lave PLT-verdier vurderes, vil det være en mulighet for feil medisinsk behandling. Dersom PLT-I gir et falskt for høyt prøvesvar på grunn av interferenter, kan trombocytopen pasienter som skulle hatt transfusjon ved PLT-verdi  $< 10 \times 10^9/L$  (kap.1.3.1), risikere å ikke få det.

For å minimere risikoen for feil medisinsk behandling verifiseres lave PLT-verdier ved AMB, først og fremst ved telling av antall PLT med PLT-F. Tidligere studier har vist til at denne metoden har god presisjon og nøyaktighet i lavt PLT-nivå ( $< 50 \times 10^9/L$ ), og at den ikke

påvirkes av intereferenter (21). Våre funn tyder imidlertid på at PLT-F ikke er tilstrekkelig for verifisering av PLT-verdier i lavt PLT-nivå ved interferensproblematikk. Ut i fra sammenligningen av metodene som benyttes ved AMB per i dag, kan det konkluderes med at metodene PLT-I og PLT-F ikke alltid gir pålitelige prøvesvar ved interferensproblematikk, og kun CD61 (fasitmetoden) vil gi korrekte PLT-verdier for disse prøvene.

For å undersøke hvordan estimering av antall PLT i blodutstryk samsvarer med de nevnte metodene; PLT-I, PLT-F og CD61, ble det analysert 19 prøver i ulike PLT-nivå og 50 prøver i lavt PLT-nivå. Disse ble analysert ved estimering av antall PLT i blodutstryk og med antall PLT målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61. Våre funn tyder på at det er god korrelasjon mellom estimering av antall PLT i blodutstryk og antall PLT målt med PLT-I (figur 3.1). Antall PLT estimert i blodutstryk ligger innenfor  $\pm 20\%$  fra antall PLT målt med PLT-I i PLT-nivå  $< 100 \times 10^9/L$ , men viser systematisk lavere verdier i PLT-nivå  $> 100 \times 10^9/L$  (figur 3.2). Resultatene viser også at estimering av antall PLT i blodutstryk samsvarer godt med de andre metodene i PLT-nivå  $< 35 \times 10^9/L$  (figur 3.6, 3.7 og 3.8), til tross for at ikke alle PLT-verdiene ligger innenfor  $\pm 20\%$ . Funnene tyder derimot på at antall PLT estimert i blodutstryk vil gi systematisk lavere verdier i PLT-nivå  $> 35-100 \times 10^9/L$ , i forhold til antall PLT målt med metodene PLT-I og PLT-F. Ut i fra disse funnene kan det konkluderes med at estimering av antall PLT i blodutstryk bør kunne benyttes som en verifiserende metode ved lave PLT-verdier, da den ser ut til å samsvare godt med antall PLT målt med fasitmetoden. Antall PLT estimert i blodutstryk har en tendens til å gi lavere PLT-verdier ved økende konsentrasjon, men avvikene i PLT-nivå  $> 100 \times 10^9/L$  er ikke like relevante, da det har liten klinisk relevans.

For å kunne ta i bruk estimering av antall PLT i blodutstryk var det nødvendig å undersøke metodens repeterbarhet og sammenligne med CV til metodene som benyttes ved AMB i dag (tabell 3.5 og 3.6). Beregnet CV for 17 paralleller estimert i blodutstryk i lavt PLT-nivå er funnet til å være 18,2%. Sammenlignet med CV for antall PLT målt med metodene PLT-I, PLT-F og CD61 i lavt PLT-nivå, henholdsvis 6,2%, 2,4% og 1,6%, tyder våre funn på at den nye metoden har dårligere presisjon. Beregnet CV for 17 paralleller estimert i blodutstryk i normalt PLT-nivå ga en CV på 6,7%. Sammenlignet med CV for antall PLT målt med PLT-I i normalt PLT-nivå, på 2,3%, har den nye metoden en dårligere presisjon også i normalt PLT-nivå. Mulige feilkilder ved denne undersøkelsen kan være at blodutstrykene i lavt PLT-nivå er laget manuelt, i motsetning til de i normalt PLT-nivå som er laget i SP10. I SP10 lages blodutstryk som nevnt ut i fra en konstant vinkel på blodsprederen bestemt av prøvens EVF-

verdi, som sørger for god kvalitet med lik tykkelse og lengde på blodutstrykene (kap. 1.4.3). Den samme kvalitetssikringen gjelder ikke for manuelle blodutstryk, da de påvirkes av menneskelige feil. Våre funn viser til at estimering av antall PLT i blodutstryk i lavt og normalt PLT-nivå har CV over kravet på  $<3,0\%$ , som dermed tyder på at metoden ikke er presis nok til å kunne benyttes uten videre utprøvinger.

## 5. Konklusjon

Våre funn viser at estimering av antall PLT i blodutstryk har god riktighet i PLT-nivå  $<35 \times 10^9/L$ , men i PLT-nivå  $>35 \times 10^9/L$  vil metoden gi systematisk lavere verdier sammenlignet med metodene som benyttes ved AMB i dag; PLT-I, PLT-F og CD61.

Presisjonen til estimering av antall PLT i blodutstryk viser seg å være høyere enn kravet på  $<3,0\%$  i lavt PLT-nivå, men dette kan delvis skyldes at blodutstrykene er laget manuelt. I normalt PLT-nivå er presisjonen bedre enn i lavt PLT-nivå, men også denne er høyere enn kravet på  $<3,0\%$ . Konklusjonen blir dermed at estimering av antall PLT i blodutstryk har god riktighet i lavt PLT-nivå. Presisjonen ligger imidlertid over oppgitt krav, og tyder på at metoden ikke er pålitelig nok til å kunne benyttes uten videre undersøkelser.

Ut i fra sammenligningen av metodene som benyttes ved AMB per i dag, kan det konkluderes med at antall PLT målt med metodene PLT-F og CD61 i lavt PLT-nivå ( $<100 \times 10^9/L$ ), gir samsvarende PLT-verdier uten tilstedeværelse av interferenter. Antall PLT målt med PLT-I vil derimot avvike fra de andre metodene i lavt PLT-nivå ved å gi systematisk høyere verdier. Våre funn tyder på at metodene PLT-I og PLT-F ikke samsvarer like godt med CD61-metoden ved prøver med interferensproblematikk i lavt PLT-nivå. PLT-I-metoden viser seg å gi svært upålitelige prøvesvar med store avvik. PLT-F-metoden avviker mindre fra CD61-metoden, men resultatene viser at metoden allikevel ikke er pålitelig nok til å benyttes som verifiserende tiltak ved prøver med tilstedeværelse av interferenter.

## 6. Kilder

1. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. Rodak's Hematology, clinical principles and applications. Fifth edition. Elsevier;
2. 18.4 Leukocytes and Platelets - Anatomy and Physiology | OpenStax [Internett]. [sitert 19. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/18-4-leukocytes-and-platelets>
3. Fonn K, Wedø TN. Trombocytter, Sysmex XN, Advia 2120i, Celldyn Sapphire, ABX Micros, Sysmex XP-300. AMB og AIT. 2020.
4. Hellem G. Trombocyttaggregering, vurdering i utstryk - AMB/ ORK. 2018.
5. Myeloproliferative sykdommer (MPN) [Internett]. Blodkreftforeningen. [sitert 27. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.blodkreftforeningen.no/myeloproliferative-sykdommer-mpn/>
6. Aune MW, Wedø TN. Rutiner for oppfølging av hematologiske resultater. AMB. 2020.
7. Burtis CA, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Seventh Edition. United States of America: Elsevier Saunders;
8. Flow cytometry introduction | Abcam [Internett]. [sitert 18. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
9. Advanced Clinical Parameters and Technology. XN-Series Automated Hematology Analyzers. Sysmex America, Inc.; 2014.
10. Cell-Dyn Sapphire Immuno PLT (CD61) Assay. Abbot Diagnostics; 2010.
11. Wedø TN. CellaVision DM96 - oppstart, bruk og vedlikehold, AMB. 2019.
12. Cellavision DM96. Users's Manual (English). CellaVision AB;
13. Wedø TN. SP-10 blodutstryks- og fargemaskin. Oppstart, bruk og vedlikehold. AMB. 2018.
14. Hegseth H. Medisinsk biokjemi - Prøvetaking - En veileder for blodprøvetakere.
15. Vedlegg til dokument 26B42, Holdbarhet for analyser ved seksjon hematologi. AMB versjon 3.1 - EQS.
16. Hummel K, Sachse M, Hoffmann JJML, Dun LPJM van. Comparative evaluation of platelet counts in two hematology analyzers and potential effects on prophylactic platelet transfusion decisions. Transfusion (Paris). 2018;58(10):2301–8.
17. Cid J, Nascimento JD, Vicent A, Aguinaco R, Escoda L, Ugarriza A, mfl. Evaluation of low platelet counts by optical, impedance, and CD61-immunoplatelet methods: estimation of possible inappropriate platelet transfusion. Transfusion (Paris). april 2010;50(4):795–800.

18. Hellem G. Blodutstryk - tillaging og ansvar for vurdering. AMB. 2018.
19. CellaVision® DM9600 [Internett]. [sitert 19. mai 2020]. Tilgjengelig på:  
<https://www.cellavision.com/en/our-products/products/cellavision-dm9600>
20. Løvås GG. Statistikk for universitet og høyskoler. 3. utgave. Universitetsforlaget; 2013.
21. Y T, Y T, K G, Y M, T K, S A, mfl. Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-series Automated Hematology Analyzers [Internett]. Bd. 28, Journal of clinical laboratory analysis. J Clin Lab Anal; 2014 [sitert 19. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24648166/>

## 7. Vedlegg

- Vedlegg 1: Rådata til 19 prøver estimert i blodutstryk i CellaVision og analysert i SysmexXN20 med PLT-I
- Vedlegg 2: Rådata til 50 prøver estimert i blodutstryk i CellaVision, analysert i SysmexXN20 med PLT-I og PLT-F, og i Celldyn Sapphire med CD61
- Vedlegg 3: Rådata til 1 prøve i lavt PLT-nivå estimert 17 ganger i blodutstryk i CellaVision, og 1 prøve i normalt PLT-nivå estimert 17 ganger
- Vedlegg 4: Rådata til 357 prøver analysert i SysmexXN20 med PLT-I og PLT-F, og i Celldyn Sapphire med CD61
- Vedlegg 5: Utdata fra regresjonsstatistikk
- Vedlegg 6: Korrelasjonsdiagram



**Vedlegg 1 - Rådata til 19 prøver estimert i blodutstryk i CellaVision og analysert i SysmexXN20 med PLT-I**

	PLT-I	Estimert antall PLT	Differanse estimert antall PLT - PLT-I	MPV	PDW	Kommentarer fra CellaVision
1	120	96	-24	9,7	11,4	
2	295	245	-50	9,9	10,6	
3	179	156	-23	10,8	11,9	
4	263	206	-57	10	10,7	
5	82	78	-4	10,3	11,5	
6	28	25	-3	9,5	10,6	
7	133	97	-36	12	15,5	
8	11	14	3	9,5	9,6	
9	89	76	-13	9,8	10,6	
10	21	18	-3	10,9	12,1	
11	518	418	-100	11,1	11,3	
12	268	201	-67	11,4	14,6	
13	185	132	-53	10	11,3	
14	139	130	-9	10,1	11,9	
15	129	110	-19	9,4	9	
16	225	182	-43	10,7	11,9	
17	92	94	2	10,4	11,5	
18	191	139	-52	9,7	10,7	
19	604	561	-43	10,4	11,8	

**Vedlegg 2 - Rådata til 50 prøver estimert i blodutstryk i CellaVision, analysert i SysmexXN20 med PLT-I og PLT-F, og i Celdyn Sapphire med CD61**

STUDENTPROSJEKT TROMBOCYTTER									
	PLT-I x 10 <sup>9</sup> /L	PLT-F x 10 <sup>9</sup> /L	CD-61 x 10 <sup>9</sup> /L	PLT- ESTIMERT x 10 <sup>9</sup> /L	MPV fL	PDW	IPF %	FRAG.	KOMMENTARER:
1	20	21	21	22	9,7	14,8	1,4		
2	17	17	16	11	14,5	16,5	1,6		
3	22	23	23	24	11,6	17,6	6,7		
4	12	10	6	10	9,8	10,1	3,1		
5	7	6	6	9	13,9	10,3	0,9		
6	23	16	16	17	13,7	16,2	5,3		
7	10	10	10	11	9,6	10,1	1,9		
8	37	36	39	29	11,7	16	7,3		
9	63	60		45	13,6	18,4	11,4		
10	36	35		36	11,9	14,6	10,9		
11	12	32	9	31	12,1	10,3	20		Aggregering
12	72	51		42	-		11,9		
13	34	31		29	13,8	18,9	13,3		
14	14	12	11	17	10,6	10,3	1,3		
15	33	28	25	28	12,3	16,1	8,7		
16	12	14	13	18	-	13,1	4		
17	22	21		22	10,6	12,2	5,4		
18	57	59		66	11,5	13,1	6,5		Lett aggregering sett i Cellavision
19	9	27	10	22	13	10,4	38,2		Aggregering
20	31	29		28	10,3	9,2	1,8		
21	35	27		24	13,2	14,4	10		
22	6	5	6	8	-	14	2,7		
23	27	25	28	20	10,9	19	7,6		
24	26	19	18	18	13,6	12,9	14,6		
25	36	37		35	9,5	11,2	5,1		
26	62	56		47	11,7	13,3	7,6		
27	35	29		25	11,9	12,3	5,3		
28	5	19	5	6	-	12	24,8		Aggregering
29	32	22	25	25	-	24,6	20,3		
30	19	18	21	23	10,6	13,4	1,1		
31	33	33		33	12	14,4	11,6		
32	18	17	17	20	10,7	16,6	2,1		
33	32	32		27	10,9	12,6	5,8		

34	58	57		39	13,2	14,6	17,3		
35	38	31	31	24	-	27,8	24,2		
36	35	31		22	11,3	12,2	1,9		
37	18	18	17	18	10,3	13,1	0,4		
38	14	15	14	27	9,3	14,2	1,1		
39	12	10	11	8	10,9	12,5	3,7		
40	25	20	24	15	11,5	16,2	1,7		
41	47	38		58	-		23,5		
42	37	38		30	9,8	9,5	2,6		
43	19	20	20	20	10,3	14,1	0,6		
44	50	50		49	10,8	11,8	4,6		
45	44	48		40	10,9	10,1	4,6		
46	26	25	26	29	9,9	13,1	1,1		
47	6	26		5	11,1	16,1	38,6		Aggregering MYE!
48	6	61	8	-	12,6	11,8	22		Aggregering
49	66	67		70	9,7		1,6		
50	8	34	10	12	12,1	10,3	29,4		Aggregering

**Vedlegg 3 - Rådata til 1 prøve i lavt PLT-nivå estimert 17 ganger i blodutstryk i CellaVision, og 1 prøve i normalt PLT-nivå estimert 17 ganger**

Kreftpasient med PLT:  $43 \times 10^9/L$ . Høy SR og RBC hadde tendens til pengerulledannelse.

PDW: 11,1 MPV: 10,2 PCT: 0,0

Estimering av PLT i Cellavision, blodutstryk laget manuelt		
Blodutstryk nr.	PLT $\times 10^9/L$	Kommentarer:
ER110	38	
ER111	16	Dårlig utstryk, for kort og tynt.
ER112	38	
ER114	25	Dårlig utstryk, for tynt, lite RBC.
ER115	31	
ER115	43	
ER116	38	
ER117	38	
ER118	58	
ER119	41	
ER121	42	
ER122	55	
ER123	36	
ER124	34	
ER125	34	
ER126	62	Ikke monolayer-pengerulledannelse
ER127	43	
ER128	34	
ER129	34	
ER130	38	

Blodutstryk med kommentar er ikke tatt med i beregning.

Kreftpasient med PLT:  $222 \times 10^9/L$ . Høy SR og RBC hadde tendens til pengerulledannelse.

PDW: 11,9    MPV: 10,6    PCT: 0,24

Estimering av PLT i CellaVision, blodutstryk laget i SP10		
Blodutstryk nr.	PLT $\times 10^9/L$	Kommentarer:
1	225	
2	202	
3	203	
4	218	
5	187	
6	199	
7	178	
8	211	
9	221	
10	203	
11	221	
12	205	
13	209	
14	227	
15	221	
16	207	
17	230	

**Vedlegg 4 - Rådata til 357 prøver analysert i SysmexXN20 med PLT-I og PLT-F, og i  
Celldyn Sapphire med CD61**

CD61 vs PLT-F, samlet fra 18.01.16					
dato	Prøve nr.	XN20 PLT-I	XN20 PLT-F	CD61 Celldyn Sapphire	Kommentarer:
05.02.2016	1	123	115	115	
05.02.2016	2	65	55	29	WBC fragmenter gjør at CD61 er eneste analyse som gir riktig res.
02.02.2016	3	16	13	13	
22.01.2016	4	17	15	15	
22.01.2016	5	23	23	18	
25.01.2016	6	6	4	5	
01.02.2016	7	1141	985	976	
22.01.2016	8	23	23	18	
09.02.2016	9	21	19	19	
05.02.2016	10	3	12	11	
11.02.2016	11	53	59	62	
11.02.2016	12	903	921	936	
14.02.2016	13	50	39	21	RBC fragmenter interfererer med resultatet på de andre metodene. CD61 er riktig
15.02.2016	14	2	4	5	
15.02.2016	15	34	37	21	Samme pas som nr. 13. RBC fragmenter interfererer med PLT-F res.
15.02.2016	16	5	5	6	
05.02.2016	17	3	12	11	
15.02.2016	18	19	17	18	*
18.02.2016	19	69	42	38	
17.02.2016	20	539	447	433	
19.02.2016	21	31	23	19	
17.02.2016	22	2	1	1	
17.02.2016	23	1	7	8	
20.02.2016	24	12	11	8	
22.02.2016	25	9	6	6	
24.02.2016	26	59	55	61	
24.02.2016	27	15	14	13	
24.02.2016	28	138	66	59	Fragmenter, PLT-F er ganske OK. Fosterblod

24.02.2016	29	15	16	16	
25.02.2016	30	72	80	87	
29.02.2016	31	23	25	27	
01.03.2016	32	7	5	5	
02.03.2016	33	9	18	19	
04.03.2016	34	182	192	185	
07.03.2016	35	4	0	1	
07.03.2016	36	56	63	64	
16.03.2016	37	26	35	46	Veldig store PLT. MPV=17,5. Bare CD61 som får med alle PLT
14.03.2016	38	153	159	162	
05.03.2016	39	8	8	9	
06.03.2016	40	12	9	10	
30.03.2016	41	247	370	375	Veldig store PLT. Samme pas som nr. 37
28.03.2016	42	7	5	6	
05.04.2016	43	6	2	3	
06.04.2016	44	33	32	34	
08.04.2016	45	637	755	775	Enkelte abnormt store PLT. Bare CD61 som får med alle PLT
19.04.2016	46	24	21	20	
25.04.2016	47	2	0	0,6	
25.04.2016	48	29	25	29	
09.05.2016	49	51	132	108	Enkelte abnormt store PLT. Bare CD61 som får med alle store PLT, men hvorfor er PLT-F høyere?
09.05.2016	50	11	5	5	
29.04.2016	51	81	86	93	
01.06.2016	52	219	256	229	Fragmenter som drysser ned i PLT-F
02.06.2016	53	49	43	44	
24.06.2016	54	80	69	53	Støy i PLT-F plot
22.06.2016	55	13	11	11	
06.07.2016	56	18	13	13	
07.07.2016	57	111	62	56	Støy i PLT-F plot
11.07.2016	58	302	326	318	
17.07.2016	59	1	1	1	
08.08.2016	60	41	83	75	Enkelte abnormt store PLT. Bare CD61 som får med alle store PLT, men hvorfor er PLT-F høyere?
19.08.2016	61	308	140	138	
19.08.2016	62	249	203	195	Støy ala fragmenter som drysser ned i PLT-F
31.08.2016	63	29	28	17	PLT clumps? Fragmenter som drysser ned i PLT-F. WBC-fragmenter gjør at CD61 er eneste analyse som gir riktig res. WBC=194
02.09.2016	64	32	25	23	PLT clumps? Samme pas som nr. 63. Her stemmer PLT-F med CD61. Halvert lpk res fra i går. WBC=103

02.09.2016	65	15	10	6	Støy i PLT-F plot
01.09.2016	66	68	68	55	WBC fragmenter gjør at CD61 er eneste analyse som gir riktig res. WBC=207
03.09.2016	67	8	7	7	Dispen. WBC=19,6
04.09.2016	68	3	3	3	Dispen. WBC=1,5
02.09.2016	69	31	23	20	
02.09.2016	70	23	16	11	
03.09.2016	71	27	19	10	
04.09.2016	72	24	19	7	
05.09.2016	73	13	13	5	
06.09.2016	74	24	21	21	
18.09.2016	75	8	4	3	
18.09.2016	76	9	10	9	
18.09.2016	77	51	30	28	
19.09.2016	78	15	20	18	
20.09.2016	79	60	61	60	Masse fragmenter, men PLT-F er bra. WBC=250. Samme pas som nr. 80 og 81
21.09.2016	80	50	49	45	
22.09.2016	81	60	70	67	
24.09.2016	82	9	11	4	Noen få RBC-fragmenter, poikilocytose. WBC-fragmenter?
28.09.2016	83	17	11	9	
29.09.2016	84	40	36	33	
24.10.2016	85	22	22	22	
26.10.2016	86	16	58	57	
16.11.2016	87	95	110	101	Lett falskt for høy PLT-F. WBC=330
18.11.2016	88	93	101	102	
21.11.2016	89	70	88	82	*
07.10.2016	90	4	4	1	
24.11.2016	91	82	66	57	WBC=208
27.11.2016	92	46	33	17	WBC=268
05.12.2016	93	78	117	108	20 PLT Large i Sapphire
07.12.2016	94	91	91	85	WBC=183
08.12.2016	95	325	208	207	RBC-fragmenter i blodutstryk
18.12.2016	96	10	7	8	
18.12.2016	97	22	34	40	CD61 Feil. Samme pas som nr. 98 og 101
17.12.2016	98	47	113	47	
18.12.2016	99	15	16	13	
19.12.2016	100	12	8	3	WBC=194
20.12.2016	101	31	52	35	
23.12.2016	102	28	18	17	
30.12.2016	103	8	9	9	



04.01.2017	104	54	58	77	
05.01.2017	105	47	43	42	
11.01.2017	106	14	4	4	
19.01.2017	107	38	18	9	RBC-fragmenter, WBC-fragmenter i blodutstryk
08.02.2017	108	16	8	6	
09.02.2017	109	63	76	75	
10.02.2017	110	6	5	4	
22.02.2017	111	220	261	260	* (PLT-F). Mange store PLT som ikke telles i impedansemetoden
20.02.2017	112	4	0	0,3	
06.03.2017	113	4	0	1	
17.03.2017	114	20	20	19	
15.03.2017	115	41	55	58	
20.03.2017	116	64	86	92	
24.03.2017	117	28	31	32	
28.03.2017	118	17	26	25	
28.03.2017	119	25	25	25	
21.04.2017	120	1	0	1	
10.05.2017	121	68	74	74	
10.05.2017	122	7	7	8	
24.05.2017	123	10	9	10	
19.06.2017	124	12	7	7	
23.06.2017	125	50	47	42	WBC=155
26.06.2017	126	39	29	21	WBC=291
28.06.2017	127	33	20	12,5	WBC=330
25.07.2017	128	48	47	47	
26.07.2017	129	16	69	69	* too many events outside limits. Veldig store PLT. MPV=16,3. CD61 får med alle store PLT og PLT-F er veldig bra
16.07.2017	130	4	22	22	
29.07.2017	131	52	91	89	
22.07.2017	132	3	2	2	
21.07.2017	133	6	4	4	
25.07.2017	134	24	7	6	
14.08.2017	135	13	12	13	
19.07.2017	136	10	7	7	
22.08.2017	137	56	49	56	
22.08.2017	138	7	4	4	
14.08.2017	139	15	10	12	
23.08.2017	140	174	166	159	
09.08.2017	141	1058	101	1165	Bulletin fra Sysmex 01.09.17. Feil med reagenset. CD61 over lineært område. Kontrollert ved fort 1+1=1160
23.08.2017	142	10	7	8	

15.08.2017	143	38	56	55	
14.08.2017	144	616	608	597	
02.08.2017	145	70	67	69	
30.08.2017	146	11	4	3	
30.08.2017	147	5	2	2	
31.08.2017	148	17	4	2	
04.09.2017	149	98	67	72	MPV=12,6
05.09.2017	150	3	0	2	
11.09.2017	151	93	81	83	
12.09.2017	152	0	1	2	
11.09.2017	153	1	0	1	
12.09.2017	154	11	11	13	
13.09.2017	155	5	3	3	
01.08.2017	156	77	74	69	
19.06.2017	157	275	292	297	PLT large:39
21.07.2019	158	28	23	25	Advia Gastro ga ut 33 til NSL. Korrigert til CD61. Masse RBC-fragmenter
20.09.2017	159	812	615	560	Mange ulike RBC-fasonger og fragmenter
25.09.2017	160	178	170	206	PLT clumps mld. * PLT-F analysert 26.09.17
17.10.2017	161	1	0	2	
20.10.2017	162	143	116	112	
23.10.2017	163	1	0	0	
25.10.2017	164	15	9	7	
10.11.2017	165	8	5	5	
16.11.2007	166	255	568	395	Hvorfor er PLT-F så mye høyere enn CD61? Mulig CD61 er feil pga høy IGM + påvist irregulært erythrocyttas (anti-J (a)) i plasma
16.11.2017	167	41	37	34	
04.12.2017	168	410	27	25	Poikilocytose med masse bittesmå røde. Myelofibrose?
07.12.2017	169	23	30	28	Fragmenter fra Sysmex XN
07.12.2017	170	366	18	16	Samme pas. som nr.168
07.12.2017	171	28	28	7	PLT-F: masse støy i plott. Ikke blodutstryk i CellaVision pga. kort hale
07.12.2017	172	1	2	1	
08.12.2017	173	5	56	50	Store PLT
08.12.2017	174	39	32	13	Samme pas. som nr. 171
12.12.2017	175	1	3	1	
12.12.2017	176		3	1	Ikke målbar. Samme pas. som nr. 175
12.12.2017	177	45	44	34	Samme pas. som nr. 171 og 174
19.12.2017	178	13	7	5	
04.01.2018	179	29	20	19	
18.01.2018	180	31	22	9	Residiv ALL. RBC-frag. Nr. 180, 181, 182, 184, 188, 189, 191 er samme pas.

19.01.2018	181	17	17	9	"
21.01.2018	182	30	21	14	"
22.01.2018	183	70	78	72	
22.01.2018	184	15	14	8	"
21.01.2018	185	23	16	18	
23.01.2018	186	18	14	11	
23.01.2018	187	280	306	289	
24.01.2018	188	32	27	21	"
25.01.2018	189	27	19	12	"
25.01.2018	190	51	28	23	
29.01.2018	191	33	25	16	"
08.02.2018	192	39	41	44	
13.02.2018	193	113	136	128	
16.02.2018	194	986	981	906	
21.02.2018	195	17	22	22	
20.02.2018	196	883	782	744	RBC-frag. i blodutstryk
19.02.2018	197	38	43	50	
26.02.2018	198	2	0	1,5	
23.02.2018	199	8	4	2	
28.02.2018	200	214	239	263	
02.03.2018	201	12	8	8	
02.03.2018	202	9	4	1	MHES pas. Masse store prikker i CD61. Disse telles muligens med i PLT-F
19.03.2018	203	12	32	33	Store PLT
18.03.2018	204	12	8	3	MHES pas. Masse store prikker i CD61. Disse telles muligens med i PLT-F
03.03.2018	205	20	16	15	
03.04.2018	206	16	17	17	
18.01.2018	207	37	52	49	
23.03.2018	208	56	63	65	
18.03.2018	209	31	141	153	Store eller små PLT som ikke telles med i PLT-I
18.03.2018	210	33	29	29	
18.03.2018	211	4	1	1	
18.04.2018	212	6	6	5	
10.04.2018	213	276	191	191	Noen RBC-frag.
11.04.2018	214	33	45	41	PLT-F: Falskt for høyt? Litt sammenhengende kurve opp mot høyre. CD61: Enkelte abnormt store PLT.
11.04.2018	215	31	36	41	
20.04.2018	216	168	176	181	
13.04.2018	217	129	149	149	
14.04.2018	218	39	33	32	
19.04.2018	219	5	5	6,5	

24.04.2018	220	10	10	10	
04.05.2018	221	53	56	54	
18.05.2018	222	13	7	1	MHES pas. Masse store prikker i CD61. Disse telles muligens med i PLT-F
19.05.2018	223	3	3	3	Samme pas som 222, men interferenten er borte.
18.05.2018	224	15	54	60	Mange store PLT
23.05.2018	225	9	8	6	
15.05.2018	226	53	51	54	
11.06.2018	227	65	67	69	
24.05.2018	228	42	48	49	
06.06.2018	229	87	110	119	Store PLT
07.06.2018	230	61	79	84	
08.06.2018	231	282	317	313	
20.06.2018	232	10	5	5	
26.06.2018	233	5	4	4	
11.07.2018	234	8	7	7	
28.07.2018	235	11	13	12	
31.07.2018	236	24	19	19	
06.08.2018	237	165	195	193	Små PLT som ikke reg. i sysmex.
10.08.2018	238	8	4	2	Masse støy i PLT-F plot.
10.08.2018	239	83	57	53	
13.08.2018	240	127	120	128	
13.08.2018	241	31	34	33	
22.08.2018	242	102	95	84	AML med WBC=250, mange frag. som membran-avsnøringer ol.
23.08.2018	243	77	76	68	AML med WBC=182, Samme pas som 238. Lavere WBC i dag.
27.08.2018	244	15	17	15	
29.08.2018	245	4	38	38	Veldig store PLT, havner utenfor PLT-l.
06.09.2018	246	88	55	26	Hemolyse, dette gir fragmenter.
05.09.2018	247	4319	236	225	MCV=42, RBC telles som PLT.
10.09.2018	248	10	11	12	
09.09.2018	249	4	3	2	
10.09.2018	250	10	11	12	
10.09.2018	251	24	19	20	
14.09.2018	252	10	16	16	
15.09.2018	253	5	6	5	
17.09.2018	254	10	9	10	
28.09.2018	255	59	57	62	
10.10.2018	256	19	6	2	Fragmenter?
03.10.2018	257	60	66	65	
23.10.2018	258	10	11	11	

31.10.2018	259	48	37	37	Leukemi, WBC=225
04.11.2018	260	19	16	18	
16.10.2018	261	10	8	7	
01.11.2018	262	57	45	26	Fragmenter? WBC=275
31.10.2018	263	48	49	37	Fragmenter? WBC=225, samme pas som over.
03.11.2018	264	31	61	63	PLT-I: mange store PLT. CD61: Prøven var 2 døgn ved analysering.
14.11.2018	265	45	33	32	
14.11.2018	266	25	33	33	
07.11.2018	267	16	15	16	
12.11.2018	268	42	42	49	
14.11.2018	269	4	2	2	
13.11.2018	270	33	32	33	
21.11.2018	271	22	18	15	WBC=249
23.11.2018	272	23	10	10	
29.11.2018	273	850	598	576	Ekstrem aniso- og poikilocytose. Kun CD62 er riktig.
26.12.2018	274	24	10	0,4	WBC=172, masse WBC-frag. Kun CD61 er riktig.
16.12.2018	275	1	1	1	
04.01.2019	276	48	53	54	
02.01.2019	277	52	43	46	
11.01.2019	278	12	11	10	
16.01.2016	279	515	526	573	Store PLT, kun CD61 måler disse.
18.01.2019	280	41	27	22	WBC=254, en del WBC-frag. Kun CD61 måler disse.
23.01.2019	281	55	81	74	Store PLT
18.01.2019	282	20	22	23	
22.11.2018	283	46	90	108	Store PLT
24.11.2018	284	4	4	4	
24.11.2018	285	8	10	11	
26.11.2018	286	8	35	31	Mange store PLT
15.12.2018	287	11	14	10	Fragmenter?
02.01.2019	288	7	4	5	
15.01.2019	289	9	10	10	
18.01.2019	290	20	22	23	
19.01.2019	291	53	50	50	
23.01.2019	292	55	81	74	Store PLT. Aggr?
30.01.2019	293	203	63	62	En del lysegrå strukturer sees i blodutstryk. Disse telles med i PLT-I.
13.02.2019	294	14	15	14	
14.02.2019	295	4	4	4	
17.02.2019	296	3	2	2	
06.03.2019	297	21	9	9	
11.03.2019	298	23	21	19	

07.03.2019	299	19	7	3	WBC=111. Frag.?
18.03.2019	300	144	149	145	
18.03.2019	301	61	65	57	WBC=200,7. Frag.?
28.03.2019	302	90	102	104	
20.03.2019	303	18	19	18	
19.03.2019	304	304	332	324	
03.04.2019	305	50	41	41	
03.04.2019	306	3	0	0	
12.04.2019	307	69	74	76	
22.05.2019	308	531	547	521	WBC=109,5. Frag.?
20.05.2019	309	43	35	35	
23.05.2019	310	22	13	9	WBC=112. Frag. i de andre metodene.
23.05.2019	311	33	33	33	
03.06.2019	312	29	51	59	Veldig store PLT, kun CD61 teller disse.
05.06.2019	313	49	80	74	Veldig store PLT, rart at PLT-F er høyere enn CD61. Rotete PLT-F plot.
05.06.2019	314	24	25	25	
14.06.2019	315	82	56	21	WBC=123,9. Fragmenter, kun CD61 er riktig.
15.06.2019	316	138	69	12	WBC=3216, samme pas som over. Frag.
20.06.2019	317	55	59	61	
25.06.2019	318	6	72	69	Mange abnormt store PLT
23.06.2019	319	0	0	0,4	
01.07.2019	320	1	1	0,5	
03.07.2019	321	6	8	6	
04.07.2019	322	92	82	38	Dårlig blodutstryk, men det sees fragmenter.
12.07.2019	323	33	39	29	WBC=111. Frag.?
14.07.2019	324	0	0	1	
17.07.2019	325	66	122	129	Veldig store PLT.
02.07.2019	326	62	51	17	WBC=120. Frag.
03.07.2019	327	13	53	51	
17.07.2019	328	23	25	24	
23.07.2019	329	26	32	32	
22.08.2019	330	6	6	7	
16.09.2019	331		1	1,6	
20.09.2019	332	15	12	12	
27.09.2019	333	456	518	554	
30.09.2019	334	18	58	62	
07.10.2019	335		2	2	
16.10.2019	336	15	26	28	
21.10.2019	337	11	11	10	
18.10.2019	338	27	28	28	
28.10.2019	339	4	8	5	

01.11.2019	340	49	61	62	
01.11.2019	341	4	4	2	
01.11.2019	342	21	12	9	Frag.
02.11.2019	343	10	4	1	Frag.?
04.11.2019	344	29	46	47	
04.11.2019	345	18	32	27	WBC=132. Frag.
05.11.2019	346	7	10	7	Svart rund pop i CD61. Immunglobulin?
10.11.2019	347	8	6	7	
11.11.2019	348	14	12	10	WBC=139
11.11.2019	349	2	2	2	
13.11.2019	350	27	29	29	
14.11.2019	351	13	32	35	
17.11.2019	352	1	1	0,5	
20.11.2019	353	7	39	40	Stor PLT, kjent Bernard Soulier syndrom.
22.11.2019	354	29	21	18	WBC=158,7
27.11.2019	355	38	68	88	Giant PLT.
06.12.2019	356	15	1	1	
06.01.2020	357	81	82	90	
	Antall	354	357	357	
	Mean	83,9	67,2	67,3	
	Min	0,0	0,0	0,0	
	Max	4319,0	985,0	1165,0	
	% avvik fra XN imp	0,0	-19,9	-19,8	

## Vedlegg 5 - Utdata fra regresjonsstatistikk

Estimering av PLT i blodutstryk i CellaVision som funksjon av PLT-I i ulike PLT-nivå

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,991396095
R-kvadrat	0,982866218
Justert R-kvadrat	0,981858348
Standardfeil	18,21555554
Observasjoner	19

<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	323574,974	323574,974	975,1918962	1,86827E-16
Residualer	17	5640,70988	331,806464		
Totalt	18	329215,684			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	-5,313977642	6,66273304	-0,79756725	0,436121045
PLT imp	0,861972445	0,0276025	31,2280626	1,86827E-16

<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
-19,37111561	8,743160326	-19,37111561	8,743160326
0,803736271	0,92020862	0,803736271	0,92020862



## MPV som funksjon av PLT-I i ulike PLT-nivå

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,281924973
R-kvadrat	0,079481691
Justert R-kvadrat	0,025333555
Standardfeil	0,696907655
Observasjoner	19

<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	0,712908932	0,712908932	1,467856453	0,242256561
Residualer	17	8,256564752	0,48568028		
Totalt	18	8,969473684			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	10,05420045	0,254909034	39,44230731	3,71346E-18
PLT imp	0,001279449	0,001056042	1,211551259	0,242256561

<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
9,516389397	10,5920115	9,516389397	10,5920115
-0,000948605	0,003507503	-0,000948605	0,003507503

## PDW som funksjon av PLT-I i ulike PLT-nivå

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,129966702
R-kvadrat	0,016891344
Justert R-kvadrat	-0,040938577
Standardfeil	1,524717293
Observasjoner	19

<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	0,679032009	0,679032009	0,292086574	0,595896979
Residualer	17	39,52096799	2,324762823		
Totalt	18	40,2			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	11,26524822	0,557698296	20,19953852	2,54433E-13
PLT imp	0,00124868	0,002310443	0,540450344	0,595896979

<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
10,08860767	12,44188877	10,0886077	12,44188877
-0,003625929	0,006123288	-0,0036259	0,006123288

**Antall PLT estimert i blodutstryk i CellaVision som funksjon av PLT-I i lavt PLT-nivå**

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,86123296
R-kvadrat	0,74172221
Justert R-kvadrat	0,73622693
Standardfeil	7,47275444
Observasjoner	49

<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	7537,25996	7537,25996	134,974607	2,0393E-15
Residualer	47	2624,57677	55,842059		
Totalt	48	10161,8367			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	5,51321694	2,09148448	2,63603052	0,01132991
PLT imp	0,72510791	0,06241322	11,6178572	2,0393E-15

<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
1,30569287	9,720741	1,30569287	9,720741
0,5995487	0,85066712	0,5995487	0,85066712

**Estimering av PLT i blodutstryk i CellaVision som funksjon av PLT-I i lavt PLT-nivå, uten aggregering**

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,87069962
R-kvadrat	0,75811783
Justert R-kvadrat	0,75221827
Standardfeil	6,63633477
Observasjoner	43

<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	5659,43777	5659,43777	128,504021	3,2639E-14
Residualer	41	1805,67851	44,0409392		
Totalt	42	7465,11628			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	5,06207862	2,16755134	2,33539042	0,02449635
PLT imp	0,71051758	0,06267819	11,3359614	3,2639E-14

<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
0,68461989	9,43953736	0,68461989	9,43953736
0,5839364	0,83709876	0,5839364	0,83709876

**Antall PLT målt med PLT-F som funksjon av PLT-I i lavt PLT-nivå**

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,778683117
R-kvadrat	0,606347397
Justert R-kvadrat	0,598146301
Standardfeil	9,806797007
Observasjoner	50

<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	7110,563158	7110,563158	73,9349233	2,78572E-11
Residualer	48	4616,316842	96,17326754		
Totalt	49	11726,88			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	9,692701906	2,670930454	3,628960796	0,000688796
PLT imp	0,692076802	0,080487693	8,598541928	2,78572E-11

<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
4,3224363	15,0629675	4,3224363	15,06296751
0,530245449	0,85390815	0,530245449	0,853908154

**Antall PLT målt med PLT-F som funksjon av PLT-I i lavt PLT-nivå, uten aggregering**

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,96542198
R-kvadrat	0,9320396
Justert R-kvadrat	0,93038203
Standardfeil	3,99439105
Observasjoner	43

<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	8971,46635	8971,46635	562,292477	1,4747E-25
Residualer	41	654,161554	15,9551598		
Totalt	42	9625,62791			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	0,7354735	1,30464299	0,56373544	0,57600488
PLT imp	0,89458147	0,03772583	23,7127071	1,4747E-25

<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
-1,8993065	3,37025348	-1,8993065	3,37025348
0,81839262	0,97077033	0,81839262	0,97077033

### Antall PLT målt med CD61 som funksjon av PLT-I i lavt PLT-nivå

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,93855687
R-kvadrat	0,880889
Justert R-kvadrat	0,87647748
Standardfeil	2,99499354
Observasjoner	29

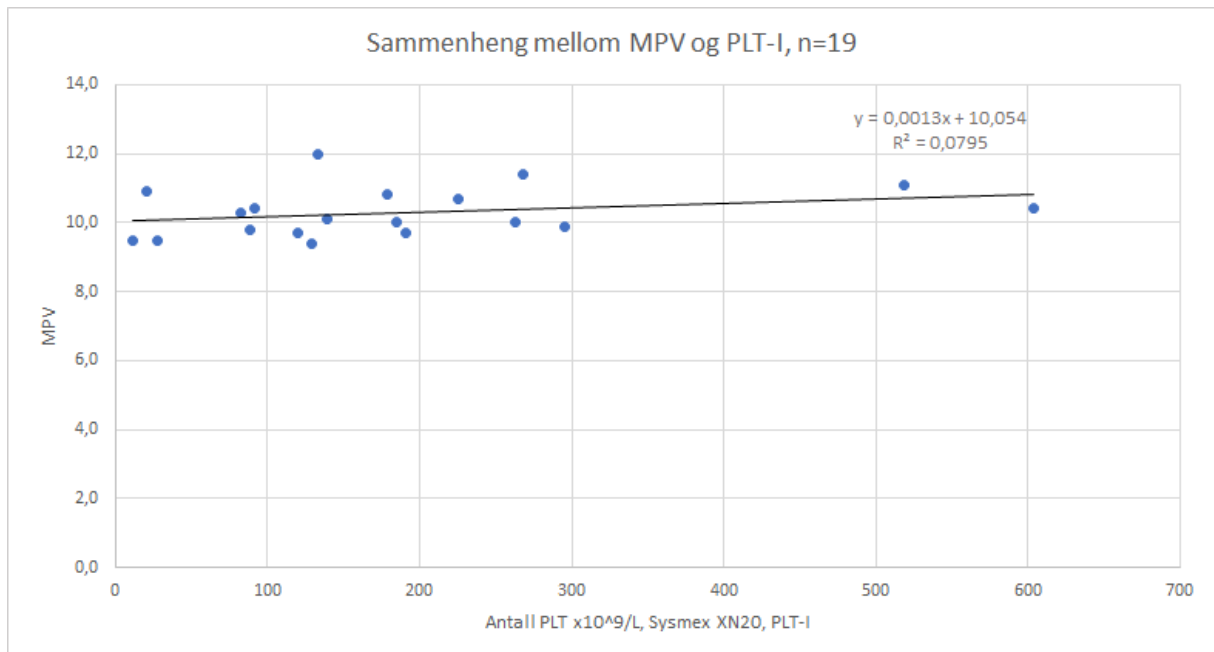
<i>Variansanalyse</i>					
<i>Signifikans-F</i>					
	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	
Regresjon	1	1791,12071	1791,12071	199,679314	5,4091E-14
Residualer	27	242,189631	8,96998633		
Totalt	28	2033,31034			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>
Skjæringspunkt	1,33407307	1,22507294	1,0889744	0,28578993
PLT imp	0,84878915	0,06006663	14,1307931	5,4091E-14

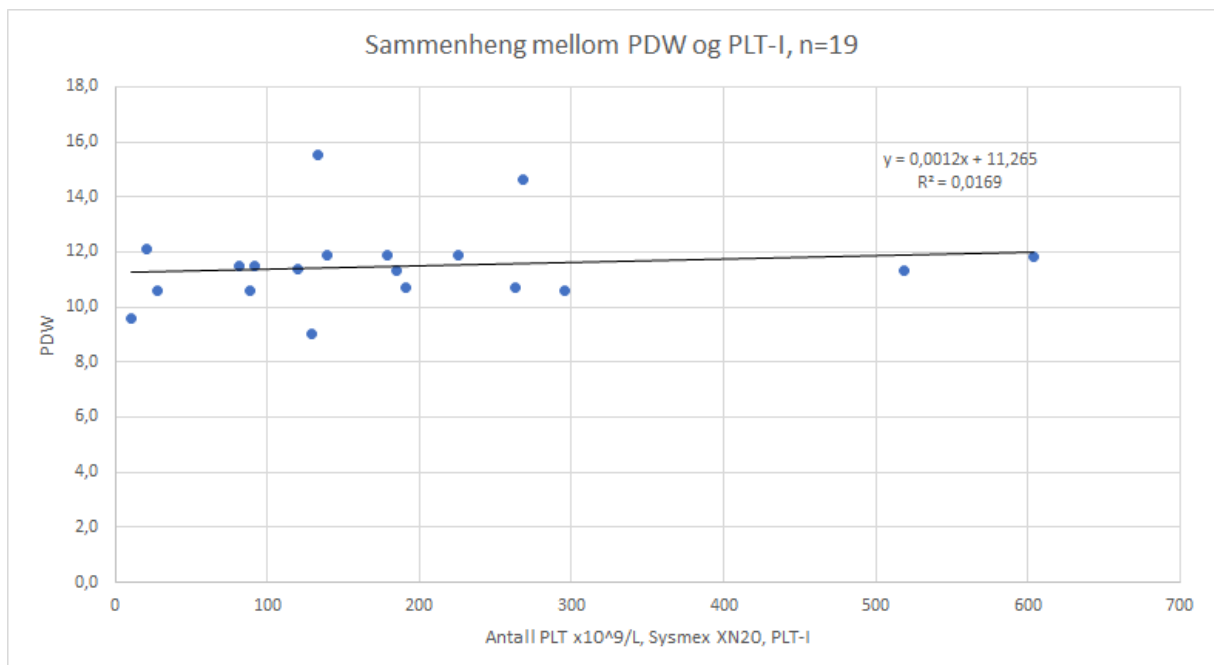
<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
-1,179569	3,8477151	-1,179569	3,8477151
0,7255426	0,9720357	0,7255426	0,9720357

## Vedlegg 6 - Korrelasjonsdiagram

### MPV som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, n=19

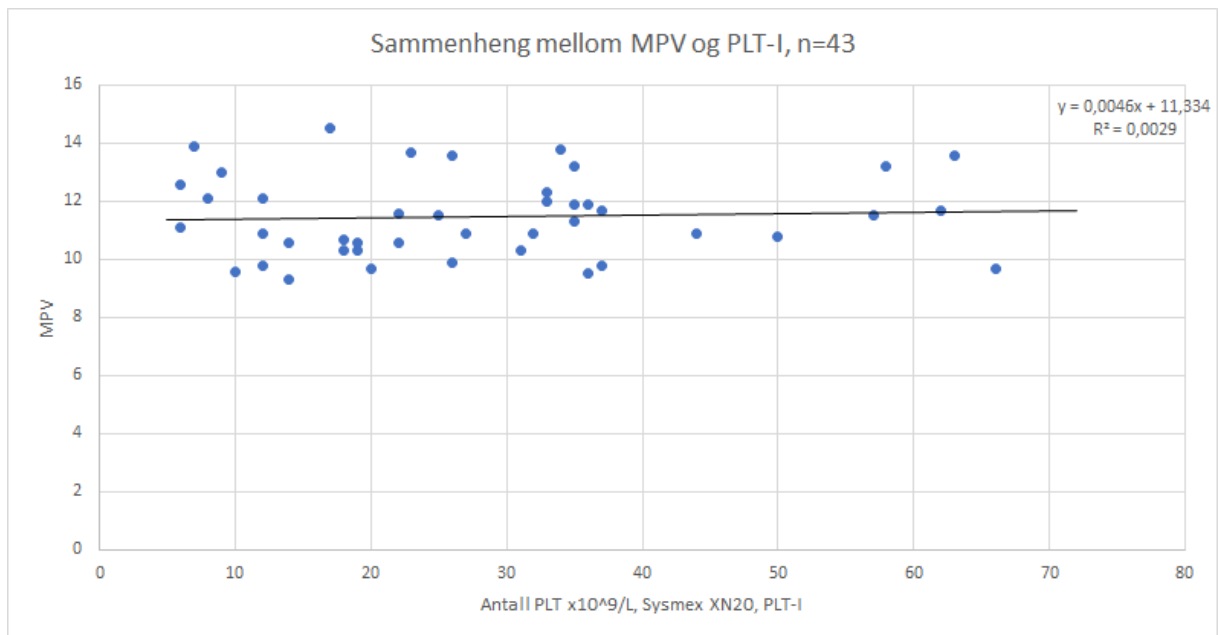


### PDW som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, n=19

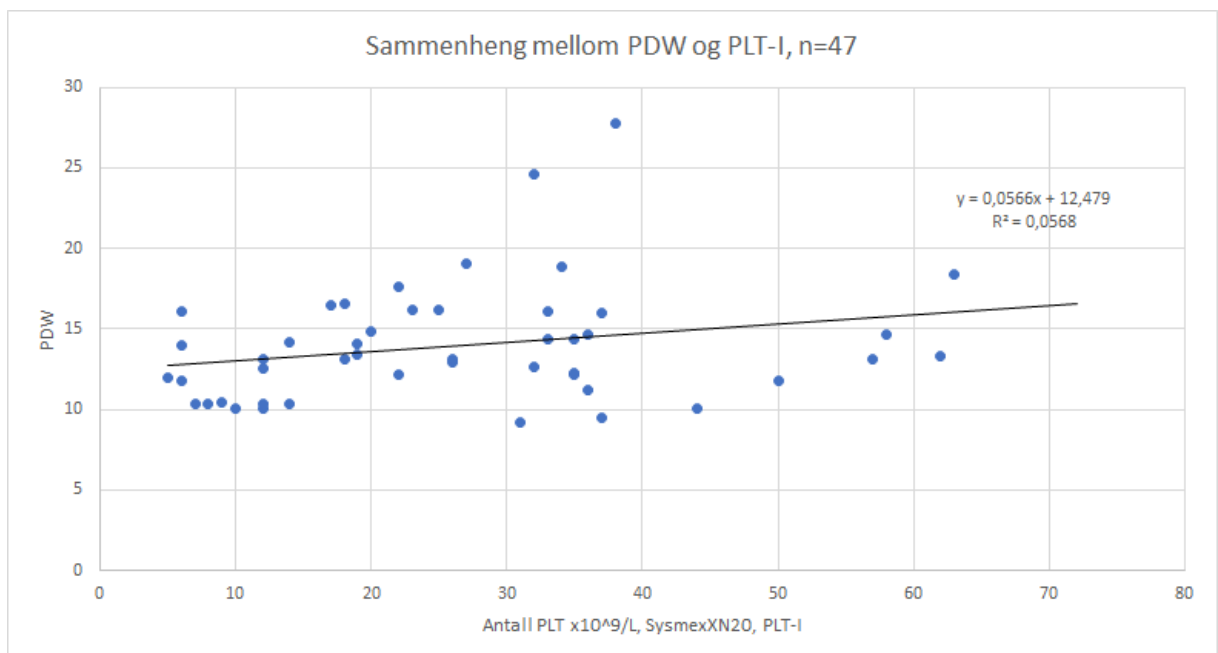




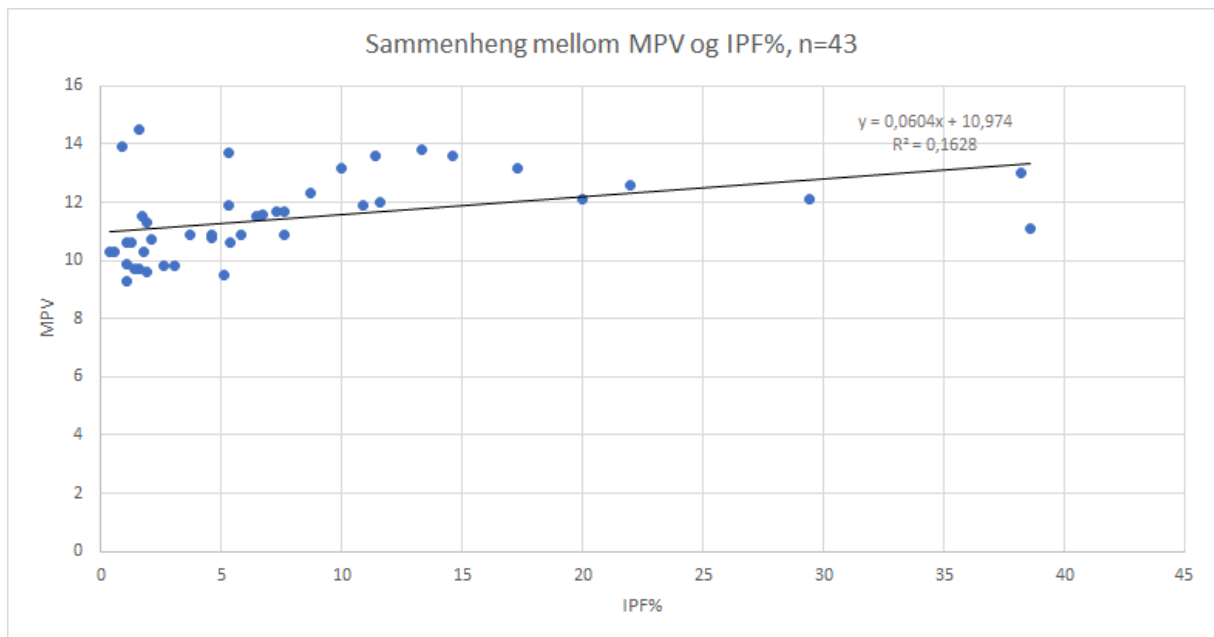
### MPV som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, n=43



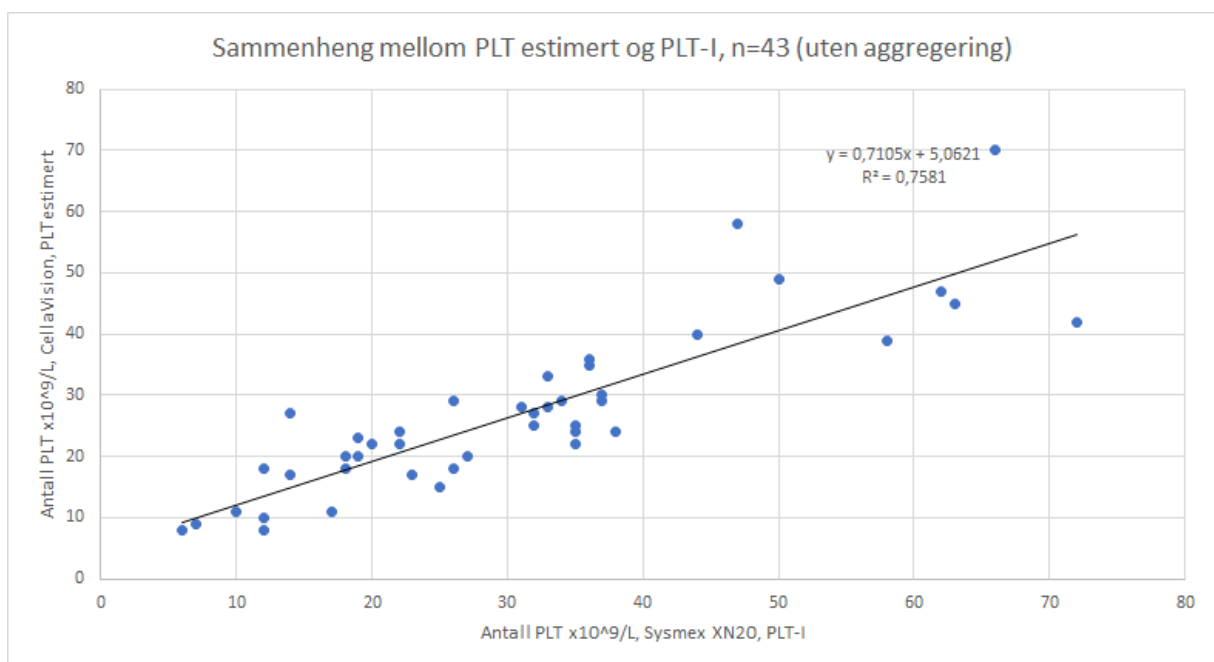
### PDW som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, n=47



### MPV som funksjon av IPF%, n=43



### Estimert antall PLT i blodutstryk i CellaVision som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, n=43, uten aggregering



**Antall PLT målt med PLT-F som funksjon av antall PLT målt med PLT-I, n=50, uten aggregering**

