

Marius Berg

# Undersøkelse av 'flagging' og blastmelding ved automatiske celletellingsmaskiner hos et utvalg kreftpasienter ved St. Olavs hospital

Hovedoppgave i medisin

Veileder: Anne Sophie von Krogh

August 2020



Marius Berg

# **Undersøkelse av 'flagging' og blastmelding ved automatiske celletellingsmaskiner hos et utvalg kreftpasienter ved St. Olavs hospital**

Hovedoppgave i medisin  
Veileder: Anne Sophie von Krogh  
August 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for medisin og helsevitenskap  
Institutt for klinisk og molekylær medisin



**NTNU**

Kunnskap for en bedre verden



## Sammendrag

*Kontekst.* Automatiske celledellingsmaskiner klassifiserer blodceller i ulike fraksjoner og flagger unormale prøver. Det er en viss diskrepans mellom forskjellige maskiner, og på St. Olavs hospital fører dette til merarbeid for laboratoriet.

*Mål.* Det er ønskelig å minimere merarbeidet ved å avdekke mulig feilklassifisering av celler og unødig 'flagging' av prøver som unormale.

*Metode.* Denne studien sammenligner to celledellingsmaskiner, ADVIA 2120i (Siemens) og Sysmex XN, og manuell vurdering av blodutstryk i mikroskop (200 celler). 49 prøver fra pasienter på Kreftklinikken i tidsrommet 18.5.2017-28.8.2017 ble inkludert og undersøkt med de tre metodene. Inklusjonskriteriene var leukocytter  $>3.7$  og samtidig  $\geq 5$  % blaster og/eller  $\geq 7$  % LUC (Large Unstained Cells).

*Resultat.* Særlig monocytterne skilte seg ut i sammenligningen mellom metodene. Sysmex fant definitivt flest og ADVIA definitivt færrest monocytter, mens resultatene fra mikroskopien plasserte seg imellom disse. Til tross for at ADVIA blastflagget 25 av prøvene og Sysmex fire viste det seg ved mikroskopi kun å være blaster i to av prøvene. ADVIA var dermed mer sensitiv, men mindre spesifikk enn Sysmex. Videre viste det seg å være sannsynlig at ADVIA feilklassifiserte monocytter som LUC og dermed fikk en høyere forekomst av flagging enn Sysmex. Utdrag av resultatene ble fremstilt i Bland-Altman-plot, og det ble foretatt lineær regresjon som viste at monocytter på Sysmex tilsvarte  $1.193 \cdot$  monocytter  $+ 0.607 \cdot$  LUC på ADVIA.

*Konklusjon.* En del av de cellene som på Sysmex klassifiseres som monocytter blir sannsynligvis hos ADVIA klassifisert som LUC. På bakgrunn av denne studiens datautvalg er det ikke mulig å si noe om hvorfor dette skjer med akkurat denne pasientpopulasjonen; til det er inklusjonskriteriene for vide og heterogeniteten i materialet for stor.

## Forord

Denne hovedoppgaven bygger på innsamlede data fra studien «Undersøkelse av feilklassifisering av monocytter i prøver fra enkelte kreftpasienter analysert på Advia2120», ledet av fagansvarlig bioingeniør Ellen Marie Hageler ved Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital. Medarbeidere i prosjektet har vært biokjemiker og sivilingeniør Ketil Thorstensen ved Avdeling for medisinsk biokjemi, og førsteamanuensis ved Institutt for klinisk og molekylær medisin og overlege ved Avdeling for blodsykdommer, St. Olavs hospital, Anne Sophie von Krogh. Hun har også veiledet meg i skrivingen av denne hovedoppgaven. Jeg er dem en stor takk skyldig. Takk rettes også to andre gode hjelpere: sivilingeniør Roar Bakken Stovner, stipendiat ved Institutt for lærerutdanning og skoleforskning, UiO, for hjelp med å penetrere statistikkens verden, og til professor Stian Hårstad ved Institutt for språk og litteratur, NTNU, for nødvendig språkvask.

## Introduksjon

### Formål og bidrag

Automatiske celledellingsmaskiner er et viktig diagnostisk hjelpemiddel i sykehus, og daglig utføres det ved St. Olavs hospital svært mange slike undersøkelser. Automatiske celledellingsmaskiner kan håndtere store prøvemengder og gir på kort tid svar på full blodtelling og differensialtelling av hvite blodceller, og de kan varsle om patologi i blodbildet. Som ved alle laboratorieanalyser er også automatisk celledelling heftet med feilkilder, og det er dessuten ulikheter mellom maskinene. Bakgrunnen for denne studien er observasjoner gjort ved Laboratorium for prøvetaking og spesiell hematologi ved Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital. Resultater fra ADVIA 2120i (Siemens), en av de automatiske celledellingsmaskinene, indikerer at blodprøver fra enkelte av Kreftklinikken pasienter flagges som inneholdende en større mengde LUC (Large Unstained Cells) og blaster. Samtidig viser de samme prøvene relativt lave andeler monocytter, og bioingeniørene ved laboratoriet har hatt en mistanke om at disse to forholdene henger sammen. Et blodbilde med avvikende celler som LUC og/eller blaster er ikke uventet hos pasienter med hematologisk malignitet, men Kreftklinikken pasienter har hovedsakelig lymfomer og solide svulster; funn av slike celler medfører derfor mye ekstra arbeid i form av tillaging og vurdering av blodutstryk i mikroskop. Denne metoden regnes for å være gullstandard for celledelling (1), men den er ressurskrevende, og det er et mål for laboratoriet å søke å begrense slike manuelle evalueringer.

Denne studien har som formål å undersøke blodverdiene hos en studiepopulasjon fra Kreftklinikken og å sammenholde disse med kliniske opplysninger om diagnoser og behandlingsforløp. Vi søker å bringe klarhet i hvorvidt pasientene faktisk har for mye LUC og blaster, samt å kaste lys over fysiologiske mekanismer bak den mulige feilklassifiseringen av blodceller. Dette vil gi et bidrag til analysetolkning for aktuell pasientgruppe og muligens kunne føre til forbedrede prosedyrer og økt trygghet rundt håndtering av avvikende prøver.

## Forskningsspørsmål og hypoteser

To hypoteser undersøkes i denne studien:

1. ADVIA 2120i feilklassifiserer monocytter som blaster eller LUC og har derfor høy forekomst av flagging, sammenlignet med Sysmex-XN.
2. Faktorer relatert til kreftpasienters behandling, som cytostatika eller bruk av vekstfaktor, forklarer avvikene i hematologiske tellinger i denne populasjonen med økt forekomst.



## Materiale og metode

### Innsamling av prøvemateriale

Alle blodprøver av pasienter tilhørende Kreftklinikken, både polikliniske og inneliggende, som ble avlagt i tidsrommet 18.5.2017-28.8.2017, og som tilfredsstilte følgende kriterier ble inkludert:

- Leukocyttall  $>3.7 \times 10^9/L$ , og samtidig
- LUC  $\geq 7\%$  og/eller blaster  $\geq 5\%$

Det ble dermed ikke tatt hensyn til verken diagnose, sykdomsforløp eller behandling ved inklusjon, og det forelå ingen eksklusjonskriterier.

For å sette prøvesvarene i en klinisk kontekst ble det hentet opplysninger om følgende forhold fra journal: diagnose, sykdomsstatus, kjent benmargsaffeksjon, behandlingsprotokoll, antall dager siden oppstart av eventuell kjemoterapi, eventuell vekstfaktor og antall dager siden den ble gitt, bruk av steroider.

### Analyse av prøver

Blodprøvene ble analysert på tre måter: I tillegg til ADVIA 2120i ble de også analysert på en annen automatisk celletellingsmaskin, Sysmex-XN, samt manuelt evaluert i mikroskop.

#### *ADVIA 2120i*

Denne maskinen benytter to kanaler for å telle leukocytter; en basokanal og en perox-kanal. I basokanalen telles alle kjerneholdige celler, og kjernen vurderes med henblikk på kompleksitet og størrelse. Det angis hvorvidt den er mono- eller polynukleær, og maskinen forsøker å trekke fra kjerneholdige erytrocytter. Resultatet fremstilles i et grafisk plot hvor eventuelle blaster legger seg på en fast plass. I perox-kanalen foretas differensialtelling, og resultatene presenteres i et plot med mengden peroksidase i cellene på x-aksen og cellenes størrelse på y-aksen. Ettersom granulocytter inneholder mest peroksidase og lymfocytter lite eller ingenting vil det avtegne seg et gjenkjennelig mønster i dette plottet. LUC legger seg på en fast plass ovenfor lymfocytterne på y-aksen grunnet at de er større enn normalstore lymfocytter.

Produsenten opplyser i brukermanualen at en forhøyet prosentandel LUC kan skyldes tilstedeværelsen av enten store, atypiske lymfocytter, blaster og/eller andre store abnormale

og peroksidasenegative celler. Store lymfocytter defineres kun ved at de er større enn den typiske lymfocyttopulasjonen. Når prosentandelen blaster trekkes fra den økte prosentandelen LUC vil den resterende andelen skyldes atypiske lymfocytter (2).

### *Sysmex XN*

Laboratoriesenteret benytter tre Sysmex XN-maskiner, henholdsvis en XN-20 og to XN-10. Disse er koblet sammen på et transportbånd, og ved komplett blodtelling (CBC) og differensialtelling av leukocytter er det vilkårlig hvilket instrument prøven blir analysert på. Maskinen har også en kanal for detektering av atypiske lymfocytter og blaster (WPC-kanal). Analyser i denne utføres automatisk etter valideringsregler angitt i programvaren. Metoden kvantiterer ikke cellene, men gir beskjed om at blodutstryk bør vurderes for å verifisere eller avkrefte funn. I motsetning til ADVIA-maskinene benytter Sysmex ikke LUC-kategorien, og cellene som hos ADVIA ville ha havnet der må hos Sysmex plasseres i en av de andre kategoriene.

### *Mikroskopi*

Morfologisk diagnostikk ved mikroskopi er en gammel metode, men benyttes fremdeles ofte til validering av maskinenes tall og funn. Blodutstryk kan tilvirkes manuelt eller maskinelt og farges ad modum May-Grünwald-Giemsa. Farging skjer enten i en fargemaskin eller ved at utstrykene dyppes i fargebad. Førstnevnte er en langt mindre tidkrevende metode med sine 5-10 minutters varighet, mot fargebadets 40.

For å bekrefte eller avkrefte forekomsten av blaster i en flagget prøve gjør bioingeniørene en rask vurdering av blodutstryket i mikroskop og beskriver celletypen. Det finnes en rekke unntak fra prosedyren for «forventede resultater», men det står spesifikt at blodutstryk skal tilvirkes dersom prosentandelen blaster overstiger 5, og ved en ikke tidligere kjent eller ikke forventet LUC på >7 %. Over tid utgjør disse prøvene en ikke uvesentlig del av materialet Kreftklinikken ønsker analysert, og i enkelte tilfeller hvor morfologien er uklar sendes utstrykene også til en offisiell manuell differensialtelling. (3)

I denne studien ble blodutstryk tilvirket manuelt, farget med May-Grünwald-Giemsa og vurdert av stud.med. Marius Berg under veiledning av overlege, førsteamanuensis Anne Sophie von Krogh. 200 nukleære celler ble talt i hvert utstryk, og leukocytene ble vurdert i seks fraksjoner: nøytrofile granulocytter, eosinofile granulocytter, basofile granulocytter, lymfocytter, monocytter og umodne granulocytter.

## Flagging og rapportering

Som nevnt rapporterer maskiner funn ved hjelp av flagg, og laboratoriet benytter default-kriteriene fra produsenten for flagging. ADVIA-flaggene som er av interesse for denne studien er «ATYP» (atypiske lymfocytter), «BLASTS» og «IG» (umodne granulocytter). Inklusjonskriteriene for studien relaterer seg kun til BLASTS-flagget og %LUC, men ATYP og IG er interessante fordi prøvene også ga mange utslag på disse.

ATYP benyttes når maskinen finner  $\%LUC \geq 4.5$  og samtidig  $\%LUC \geq (\%BLAST + 1.5)$ . BLASTS-flagget kan aktiveres på tre forskjellige vis: 1)  $\%BLASTS$  1.5 til 50 og  $\%LUC \geq 4.5$ , 2)  $\%BLASTS > 5.0$  av WBCB (totalt antall hvite celler), 3)  $\%BASO + \%BASO\ Susp + \%BASO\ Sat \geq 10$ . Blaster klassifiseres ellers uavhengig i baso-kanalen, men kan også gjenfinnes i LUC-området på perox-cytogrammet. IG-flagget benyttes dersom  $[(\%NEUT + \%EOS) - \%PMN] \geq 5$ .

Ved flagging av blaster med ++, dvs.  $\geq 5\%$ , eller differensialtelling som viser  $\%LUC$  på  $\geq 7$ , undersøkes prøvene manuelt med mikroskopering av blodutstryk, i henhold til laboratoriets prosedyre. (3)

Sysmex benytter flaggene «Blasts?», «Atypical\_Lympho?» og «Abn\_Lympho?». For alle praktiske formål ses lymfocytflaggene under ett.

## Statistikk

Samvariasjonen mellom de ulike målemetodene ble målt med Pearsons korrelasjonskoeffisienter, Bland-Altman-analyser og lineær regresjon. I et Bland-Altman-plot ses to metoders differanser og gjennomsnitt i sammenheng, med gjennomsnittsdifferanse og tilhørende 95 %-konfidensintervall markert. Bland-Altman bød imidlertid på noen problemer ettersom dataene ikke var normalfordelt.

Alle statistiske utregninger og fremstillinger av plot ble gjennomført med statistikkprogrammet SPSS. De kliniske variablene ble det funnet mest hensiktsmessig å presentere deskriptivt.

## Godkjenning

Studien ble godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) som 2017/2071. Denne hovedoppgaven bygger på det innsamlede materialet fra studien og vil kunne brukes som grunnlag for eventuelle artikler studien måtte avføde.

## Resultater

49 pasientprøver fra 36 pasienter oppfylte inklusjonskriteriene. Fire pasienter fikk inkludert tre prøver, fem fikk inkludert to.

En sammenligning av totaltall av leukocytter, samt underklasser av disse som kan være med på å utløse blastflagg er vist under i tabellen. Dette inkluderer lymfocytter, monocytter, LUC på ADVIA, IG på Sysmex og umodne granulocytter ved mikroskopering. Gjennomsnitt, standardavvik og variasjonsbredde for de tre sammenlignede metodene viste tilnærmet likt totaltall av leukocytter mellom maskinene. Det var størst forskjell på lymfocytter mellom ADVIA og mikroskopi, det var klart flest monocytter hos Sysmex, mens det var ganske like funn av IG på Sysmex og umodne granulocytter ved mikroskopi.

**Tabell 1.** Utvalgte fraksjoner fra differensialtelling av leukocytter på ADVIA2120i, Sysmex-XN og ved mikroskopi.

ADVIA 2120i				
		Mean ± SD	95% KI	Variasjonsbredde
<b>Leukocytter</b>	[10 <sup>9</sup> /L]	6.10 ± 3.21	[5.12, 6.92]	3.70–17.72
<b>Lymfocytter</b>	[%]	32.05 ± 12.5	[28.45, 35.64]	5.8–60.1
<b>Monocytter</b>	[%]	9.99 ± 4.11	[8.81, 11.17]	3.0–21.0
<b>LUC</b>	[%]	9.3 ± 4.57	[7.98, 10.61]	2.8–22.7

Sysmex-XN				
		Mean ± SD	95% KI	Variasjonsbredde
<b>Leukocytter</b>	[10 <sup>9</sup> /L]	6.18 ± 3.28	[5.26, 7.09]	3.66–17.94
<b>Lymfocytter</b>	[%]	35.85 ± 14.07	[31.81, 39.89]	8.5–64.8
<b>Monocytter</b>	[%]	18.44 ± 5.87	[16.75, 20.12]	6.3–31.4
<b>IG</b>	[%]	2.72 ± 5.1	[1.25, 4.19]	0.2–26.5

Mikroskopi				
		Mean ± SD	95% KI	Variasjonsbredde
<b>Leukocytter</b>	[10 <sup>9</sup> /L]	–	–	–
<b>Lymfocytter</b>	[%]	38.41 ± 17.28	[33.45, 43.37]	8.5–75.0
<b>Monocytter</b>	[%]	14.71 ± 7.72	[12.49, 16.93]	3.0–37.0
<b>Umodne granulocytter</b>	[%]	2.75 ± 4.89	[1.34, 4.15]	0.0–24.0

En sammenligning av prosentandelen monocytter mellom celledellingsmaskinene viste en tydelig sammenheng på tvers av prøvene. Uten unntak målte Sysmex høyere andel monocytter enn ADVIA, og differansen ble også større dess flere monocytter som ble målt, se plot 3.

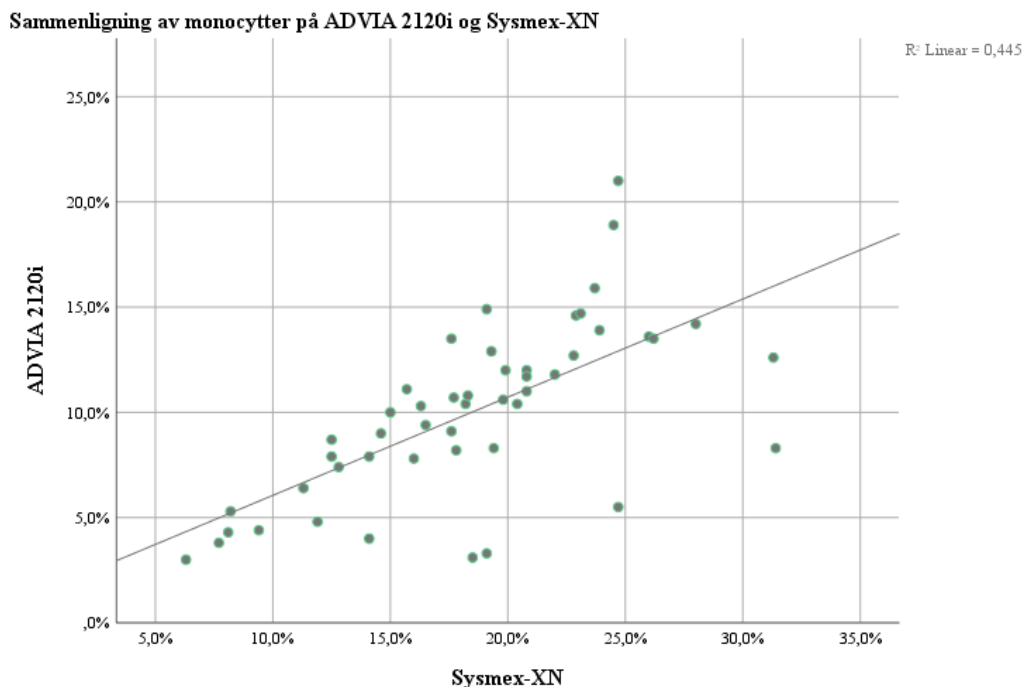
**Tabell 2.** Sammenlignbarhet mellom fraksjoner på hver av metodene, målt med Pearsons korrelasjonskoeffisient  $r$ .

	n	$r$ (47)	p-verdi
<b>Monocytter, ADVIA</b> vs. <b>monocytter, Sysmex</b>	49	0.667	<0.01
<b>Monocytter, ADVIA</b> vs. <b>monocytter, mikroskopi</b>	49	0.636	<0.01
<b>Monocytter, Sysmex</b> vs. <b>monocytter, mikroskopi</b>	49	0.500	<0.01
<b>Lymfocytter, ADVIA</b> vs. <b>lymfocytter, Sysmex</b>	49	0.968	<0.01
<b>Lymfocytter, ADVIA</b> vs. <b>lymfocytter, mikroskopi</b>	49	0.876	<0.01
<b>Lymfocytter, Sysmex</b> vs. <b>lymfocytter, mikroskopi</b>	49	0.874	<0.01
<b>Monocytter og LUC, ADVIA</b> vs. <b>monocytter, Sysmex</b>	49	0.648	<0.01
<b>Monocytter og LUC, ADVIA</b> vs. <b>monocytter, mikroskopi</b>	49	0.102	0.486
<b>LUC, ADVIA</b> vs. <b>monocytter, Sysmex</b>	49	0.038	0.796
<b>LUC, ADVIA</b> vs. <b>monocytter, mikroskopi</b>	49	-0.472	0.001

Her er det tydelig at det er en signifikant positiv korrelasjon mellom flere av metodene. Monocytter på ADVIA og monocytter på Sysmex, samt monocytter på ADVIA og monocytter ved mikroskopi viser henholdsvis  $r(47) = 0.667$  og  $r(47) = 0.636$ , mens

lymfocytter på ADVIA og lymfocytter på Sysmex hele  $r(47) = 0.968$ . Korrelasjonen mellom lymfocytter på ADVIA og ved mikroskopi og mellom lymfocytter på Sysmex og ved mikroskopi er omtrent like god, med  $r(47) = 0.876$  og  $r(47) = 0.874$ . Korrelasjonen mellom monocyter og LUC på ADVIA og monocyter ved mikroskopi var derimot ikke signifikant med  $p = 0.486$ , ei heller mellom LUC på ADVIA og monocyter på Sysmex, med  $p = 0.796$ . LUC som egen gruppe ble inkludert for å se hvordan den forholdt seg til Sysmex' monocyter og monocyttene ved mikroskopi. Korrelasjonen mellom LUC og monocyter ved mikroskopi var faktisk signifikant negativ med  $p = 0.001$  og  $r(47) = -0.472$ .

### Plot 1.



Hypotese 1 sier at ADVIA feilklassifiserer monocyter som blaster eller LUC og derfor har høy forekomst av flagging sammenlignet med Sysmex. Totalt trigget 25 av de 49 prøvene rene blastflagg hos ADVIA, mot fire på Sysmex. I mikroskop ble det påvist blaster i kun to av prøvene, henholdsvis 2.5 % i en prøve ADVIA hadde flagget med ++ og 0.5 % i en prøve ADVIA hadde flagget med +++. Sysmex blastflagget kun den andre av disse.

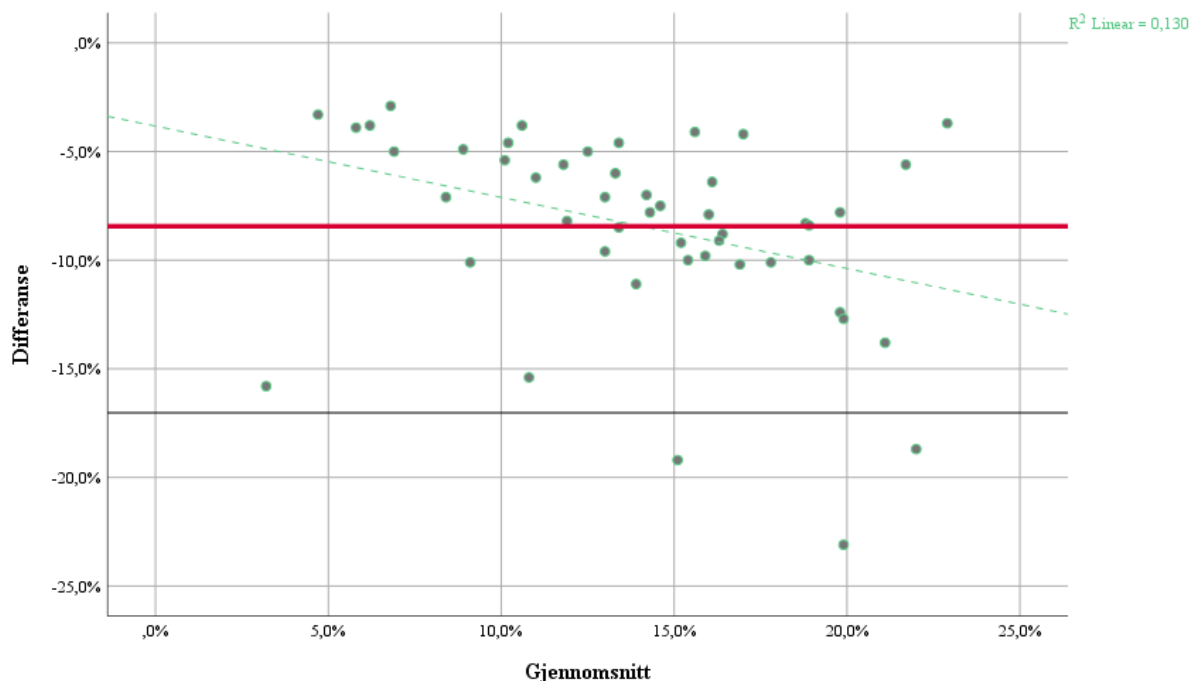
En t-test gjort på differansen mellom monocytter på ADVIA og Sysmex viste en statistisk signifikant forskjell på ni prosentpoeng og en p-verdi på  $<0.001$  og indikerte en proporsjonal bias. Forsøk på et Bland-Altman-plot visualiserte dette tydelig (plot 2). Gjennomsnittslinjen er trukket i rødt, og en stiptet linje indikerer trenden (best fit). Kun grensen for nedre 95 %-konfidensintervall har blitt med grunnet at grensen for øvre lå såpass langt over øverste prøve at den havnet utenfor plotet. Det kan bemerkes at konfidensintervallene i denne studien generelt er veldig vide, grunnet stor variasjon og et relativt lite utvalg, og at resultatene dermed er usikre.

ADVIA og Sysmex målte altså ikke det samme når de målte monocytter, og det måtte være en forskjell blant maskinene i hvilke celler som ble inkludert i denne kategorien.

Gjennomsnittsdifferansen var  $-8.44\%$  i ADVIAs favør, det vil si at ADVIA i gjennomsnitt telte  $8.44\%$  færre monocytter enn Sysmex.

## Plot 2.

Bland-Altman-plot over monocytter på ADVIA 2120i og Sysmex-XN



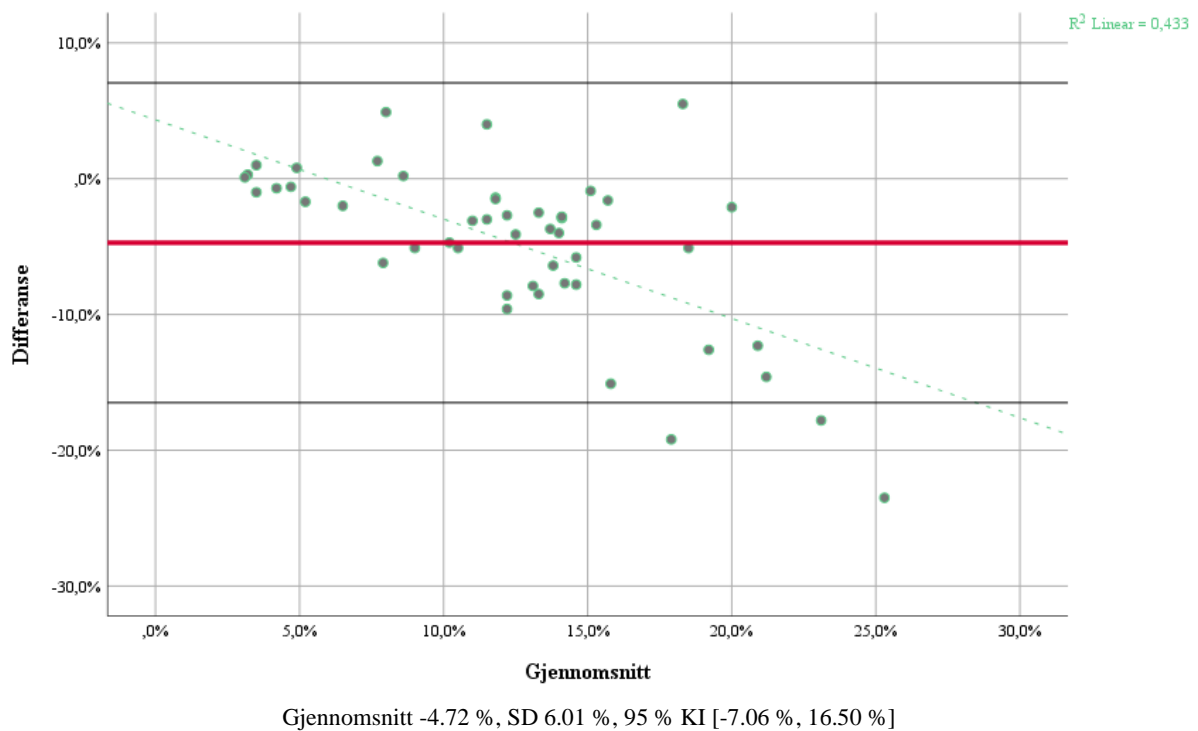
Gjennomsnitt  $-8.44\%$ , SD  $4.38\%$ , 95 % KI [ $-17.02\%$ ,  $0.14\%$ ]



Samme tendens så man ved Bland-Altman-plot av monocytter på ADVIA og ved mikroskopi. Gjennomsnittsdifferansen var her -4.72 % i ADVIAs favør, det vil si at på ADVIA og mikroskopøren var mer enige om monocytterne enn ADVIA og Sysmex. Merk at også her, som på forrige plot, øker differansen mellom metodene jo flere monocytter de målte i gjennomsnitt:

### Plot 3.

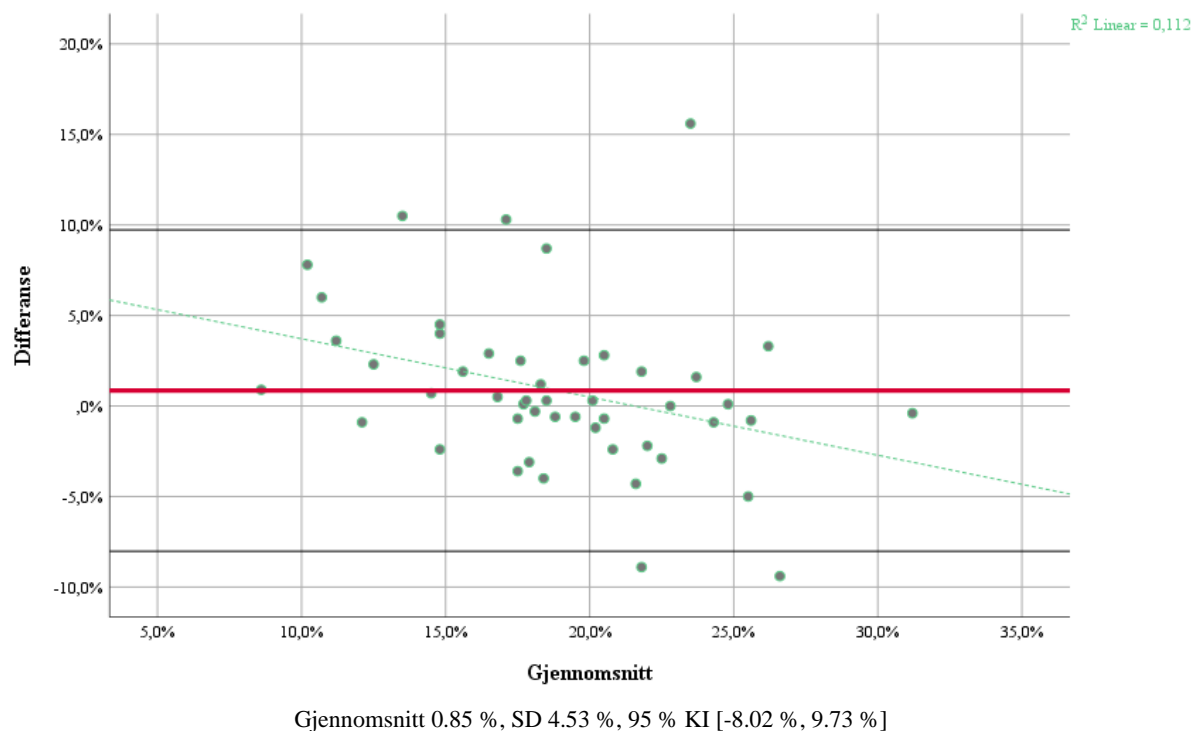
Bland-Altman-plot over monocytter på ADVIA 2120i og ved mikroskopi



Da det ble gjort et Bland-Altman-plot over monocytter og LUC på ADVIA sammen med monocytter på Sysmex var det derimot mer samling rundt nullpunktet med en gjennomsnittsdifferanse på 0.85 % flere celler i ADVIAs favør. Følgelig ga monocytter på Sysmex subtrahert fra både monocytter og LUC på ADVIA tilnærmet null for mange av prøveresultatene. Noen slengere trakk medianlinjen oppover, men det lot til å bli en bedre korrelasjon når man sammenlignet disse fraksjonene.

#### Plot 4.

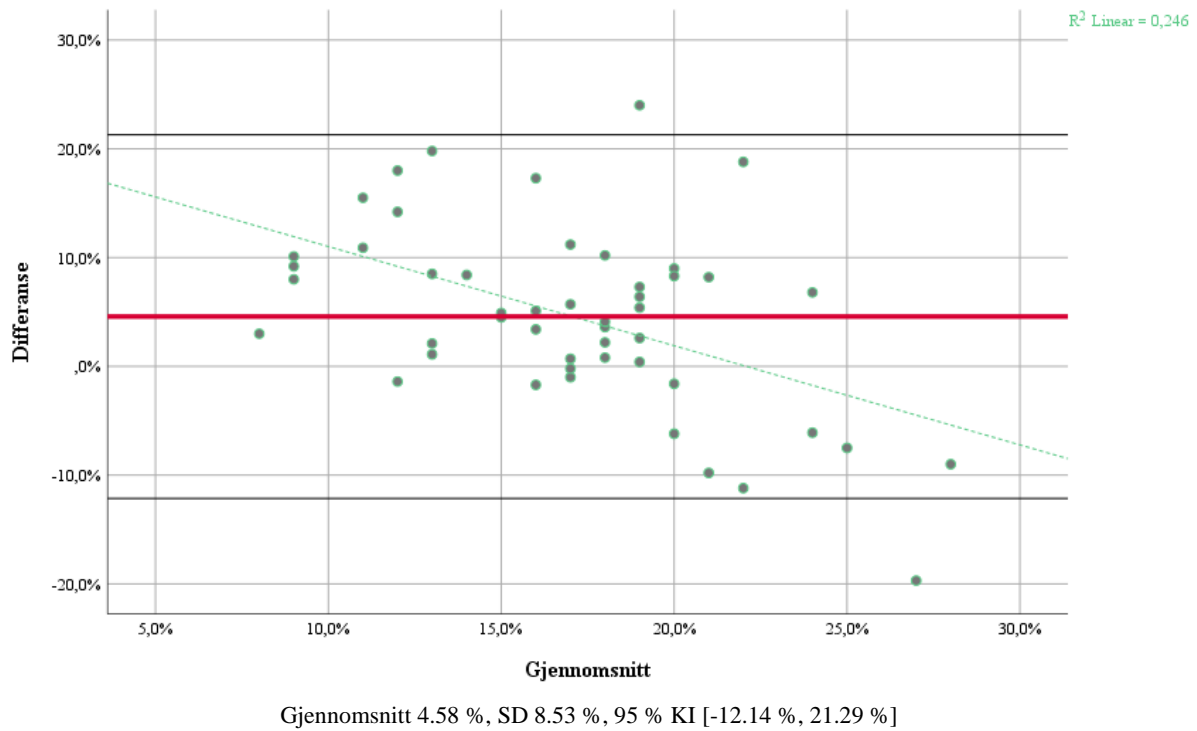
Bland-Altman-plot over monocytter + LUC på ADVIA 2120i og monocytter på Sysmex-XN



Da monocytyter og LUC på ADVIA ble sjekket opp mot monocytyter ved mikroskopi var gjennomsnittsdifferansen 4.58 % i ADVIAs favør:

### Plot 5.

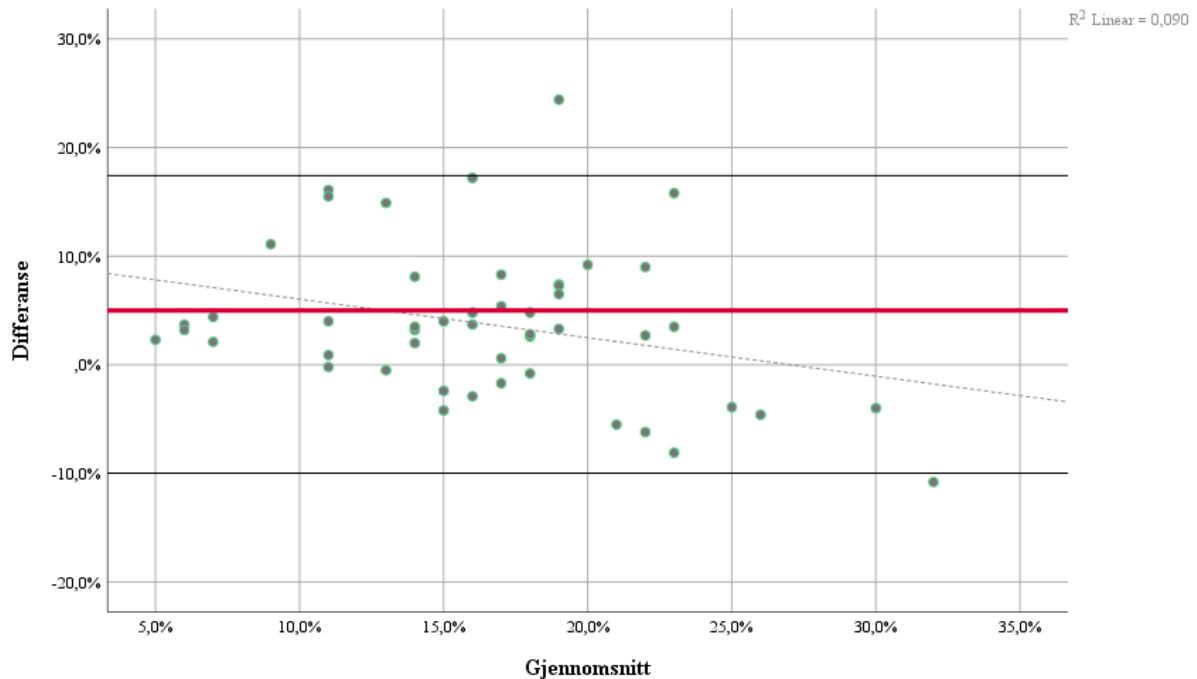
Bland-Altman-plot over monocytyter + LUC på ADVIA 2120i og monocytyter ved mikroskopi



Her er det en p-verdi på 0.486, og dataene synes da også å være mer normalfordelt.

## Plot 6.

Bland-Altman-plot over monocytter på Sysmex og monocytter ved mikroskopi

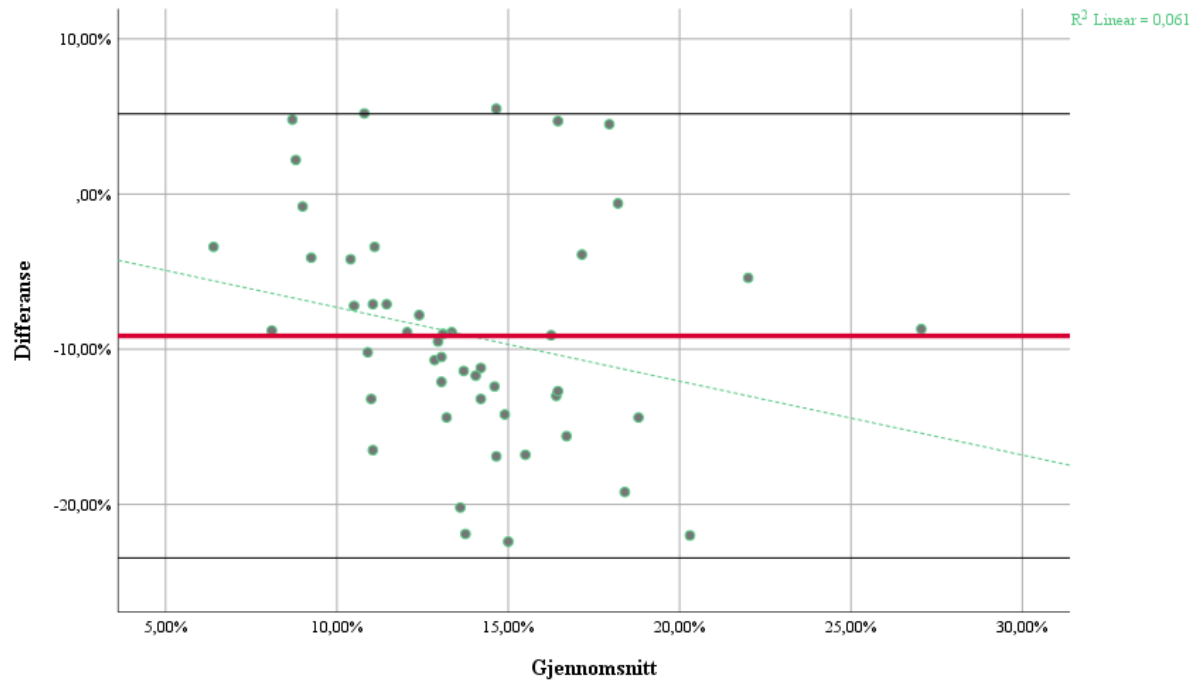


Her ser vi at monocyttandelen hos Sysmex er noe likere monocyttandelen ved mikroskopi, med flere av prøvene plassert ganske nært opptil null; i gjennomsnitt telte Sysmex 3.72 % flere monocytter enn det ble gjort ved mikroskopi. Også her er tendensen at dess flere monocytter som er telt i gjennomsnitt på de metodene, dess større blir differansen, med et par unntak oppe på midten i plotet.

Kun LUC fra ADVIA og monocytter fra Sysmex ble også for ordens skyld målt sammen, og tendensen til at det jevnt over er flere monocytter hos Sysmex enn det er LUC hos ADVIA skimtes også her, til tross for et stort konfidensintervall.

### Plot 7.

Bland-Altman-plot over LUC på ADVIA 2120i og monocytter på Sysmex-XN



Ettersom formålet med denne studien er å minimere antall manuelle vurderinger i mikroskop er det interessant å forsøke å finne en sammenheng i hvordan ADVIA og Sysmex fordeler celler i de forskjellige fraksjonene. For å tallfeste forholdet mellom ADVIAs måleverdier og Sysmex' monocyttemåling ble det kjørt en lineær regresjon som ga følgende likning:

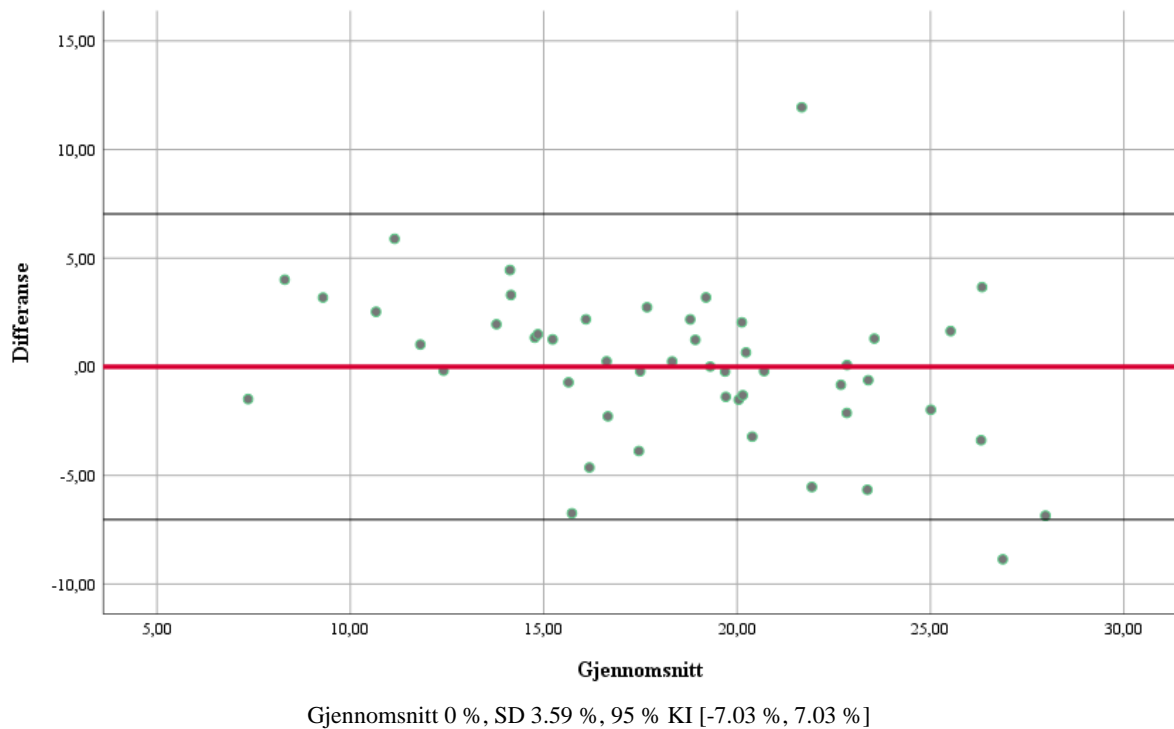
$$\text{Monocytter på Sysmex} = 1.193 \cdot \text{Monocytter på ADVIA} + 0.607 \cdot \text{LUC på ADVIA}$$

Denne modellen predikerer Sysmex' monocyttverdi ut fra ADVIAs monocytt- og LUC-verdier. Også fraksjonen lymfocytter på ADVIA ble først inkludert som uavhengig variabel, men da det viste seg at koeffisienten var svært lav (-0.8) og ikke statistisk signifikant ble den utelatt fra modellen. Usikkerheten til de to regresjonskoeffisientene som ble inkludert i ligningen er henholdsvis (95 % KI [0.888, 1.497]) for 1.193 og (95 % KI [0.338, 0.877]) for 0.607.

Modellen tilsier at 60 % av ADVIAs LUC blir til monocytter hos Sysmex. Videre sier den at man må legge til monocyttverdien på ADVIA pluss en ytterligere økning på 19.3 %. Det kan være tilfeldig variasjon som medfører dette, og det er ikke sikkert at det hadde blitt slik med et annet utvalg. Ved å lage et sett med forventede verdier for monocytter på Sysmex basert på denne likningen kunne vi sette opp følgende Bland-Altman-plot:

## Plot 8.

Bland-Altman-plot over forventede og målte verdier av monocytter på Sysmex-XN



Her ser vi at gjennomsnittslinjen ligger akkurat på null, og proporsjonal bias er fjernet. Selv om ligningen gir verdier som fjerner bias for dette datasettet er dette ikke garantert på nye datasett. Det må nye undersøkelser til for å stadfeste hvorvidt monocyttverdiene denne ligningen gir fremdeles inneholder bias, og i så fall hvor mye.

## Flagging

Av totalt 49 prøver flagget ADVIA 25 med BLASTS- og 29 med ATYP-flagget.  $\geq 7$  % LUC ble funnet i 38 prøver. I ti prøver var det utslag på både ATYP og BLASTS og i ni av prøvene både ATYP, BLASTS og  $\geq 7$  % LUC.

Sysmex flagget fire prøver som Blasts? og 16 som enten Atypical\_Lympho? eller Abn\_Lympho?. De fire blastflaggene sammenfalt alle med prøver som også hadde utslag på lymfocytflaggene.

## Mikroskopisk vurdering

Flagging hører til maskinenes verden, men også ved manuell vurdering i mikroskop gjør man seg noen tanker om sammenhengen i det man ser. Det var svært lite blaster å finne i prøvene, som opprinnelig alle var blastsuspekter fra ADVIAs side. Kun i to av prøvene ble det funnet blaster, en prøve med 2.5 % og en prøve fra en annen pasient med 0.5 %. Med den 200-cellers metoden som her er benyttet utgjør dette henholdsvis 5 og 1 celle.

For å unngå for fraksjonerte data ble alle lymfocytter samlet i en kategori, selv om det underveis var fristende å dele dem inn i normalstore og ellers morfologisk sett upåfallende lymfocytter og i såkalt atypiske eller reaktive lymfocytter. Denne siste gruppen forekom ofte, på tvers av pasientene, og i noen prøver var det den dominerende lymfocytfraksjonen. I enkelte tilfeller kunne det være vanskelig å skille en stor atypisk lymfocytt fra en mindre monocytt, og det er lett å forstå at ADVIA tyr til LUC-kategorien for å gjøre av disse et sted, mens Sysmex og mikroskopører må forsøke å få plass til dem hovedsakelig i monocytt- og lymfocyttgruppene.



## Kliniske variabler

Hypotese 2 omhandlet hvorvidt faktorer relatert til kreftpasienters behandling, som cytostatika eller bruk av vekstfaktor, kunne forklare avvikene i hematologiske tellinger i denne populasjonen med økt forekomst. Ved gjennomgang av de kliniske variablene var følgende verdt å notere seg:

### Diagnose

39 % av pasientene hadde en eller annen lymfomdiagnose (Hodgkins lymfom, diffust storcellet B-cellelymfom, småcellet B-cellelymfom, mantelcellelymfom, aggressivt T-cellelymfom og småcellet lymfocytært lymfom), 53 % hadde en solid svulst (ca. recti, ca. ventriculi, ca. coli, ca. vesica, ca. mamma, ca. pancreas, ca. prostata, ca. pulm, ca. renis, ca. oesophagus, osteosarkom), 5.5 % hadde både en lymfomdiagnose og en solid svulst, og 2.5 % hadde mucosis fungoides. De 36 pasientene representerer dermed et ytterst heterogent diagnosespekter.

### Sykdomsstatus

23 av 36 pasienter var under eller mellom behandlinger, tre pasienter avla prøve under utredning eller ved diagnosetidspunkt, fire var ferdig behandlede, fire i residiv, en i remisjon og en ved oppdagelsen av posttransplantasjonslymfom. Hovedvekten av pasientene var altså under behandling, men det sammenfaller nok godt med at hovedvekten av pasienter fra Kreftklinikken som avlegger blodprøver er nettopp det. Det er interessant at hele sju pasienter som var enten ubehandlede eller i remisjon ble inkludert. Av de fire pasientene som hadde utslag på blastflagg hos Sysmex var tre under behandling, mens en var ferdig behandlet for Hodgkins lymfom, men hadde en pågående infeksjon.

De to pasientene som hadde blastflagg vektet +++ på ADVIA er verdt å se nærmere på. De hadde henholdsvis diffust storcellet B-cellelymfom («double hit») og mantelcellelymfom. Sysmex blastflagget kun den første av disse, og dette var den prøven som det i mikroskop ble funnet 0.5 % blaster i. Ellers ble det funnet 19 % umodne granulocytter; et høyt tall i dette prøvematerialet.

### Kjent benmargsaffeksjon

Fem pasienter hadde kjent benmargsaffeksjon på det tidspunktet prøven ble tatt. Ytterligere fire hadde benmargsaffeksjon opprinnelig, men ikke/ukjent ved residivet, og en hadde på grunn av en samtidig KLL. De resterende 26 pasientene hadde ikke benmargsaffeksjon.

### Behandling

Datamaterialet er også relativt heterogent hva angår behandling. En cut-off-grense på maksimum 21 dager fra påbegynt behandling til prøvetidspunkt ga følgende liste over behandlingsregimer: Fire FLOX, fire stråling, en av hver av R-DHAP, FLV, ABVD, Taxotere, R-EPOCH, EC-90, Brentuksimab + Bendamustin, Taxol + Karboplatin, FLIRI + Bevacizumab, Cisplatin + Etoposid, B-FOLFIRINOX, Gemcitabin + Karboplatin og Targetin. En pasient hadde gjennomgått HMAS BEAM den siste måneden. De resterende pasientene hadde enten ikke mottatt behandling i det hele tatt fordi de var i en utredningsfase eller de hadde mottatt behandling mer enn 21 dager før prøvetidspunkt.

### Vekstfaktor

Bruken av vekstfaktor var ikke alltid like godt dokumentert i journalene, men pegfilgrastim (Neulasta), en G-CSF, ble gitt til i hvert fall ni av pasientene innen tidsvinduet på 21 dager. Ytterligere fire hadde fått det innen de siste 67 dager.

## Analyse og diskusjon

Hypotese 1 tok utgangspunkt i at ADVIA feilklassifiserer monocytter som blaster eller LUC og derfor har høy forekomst av flagging, sammenlignet med Sysmex-XN. Det stemte at ADVIA flagget langt flere prøver enn Sysmex, totalt 25 prøver ble flagget for blaster og 29 prøver ble flagget for atypiske lymfocytter hos ADVIA. Hos Sysmex ble fire flagget for blaster og 16 som abnorme og/eller atypiske lymfocytter. Videre ser det ut til å stemme at årsaken til høy forekomst av flagging hos ADVIA skyldes tilstedeværelsen av celler som på ADVIA telles i LUC-fraksjonen og på Sysmex som monocytter. Minst gjennomsnittsdifferanse (0.85 %) mellom forskjellige fraksjoner målt på forskjellige metoder ble funnet mellom monocytter + LUC på ADVIA og monocytter på Sysmex. Ved lineær regresjon ble det vist at Sysmex' monocytter forholder seg til summen av to disse to fraksjonene på ADVIA med en faktor på henholdsvis 1.193 og 0.607. En del av cellene som Sysmex klassifiserer som monocytter havner altså blant LUC på ADVIA, men ettersom det er rom for feilklassifisering også hos Sysmex er det ikke mulig å si med sikkerhet at alle disse er monocytter.

Hypotese 2 var at faktorer relatert til kreftpasienters behandling forklarte avvikene i hematologiske tellinger i denne populasjonen med økt forekomst. Dette har ikke latt seg bekrefte, da samtlige kliniske variabler avslørte stor heterogenitet i pasientutvalget prøvene var hentet fra. Dette gjaldt både diagnose, sykdomsstatus, behandling, kjent benmargsaffeksjon og bruk av vekstfaktor.

Metodene benyttet i denne studien har i noen grad vært egnet til å teste hypotesene. En mulig bias i materialet er at prøvene allerede var flagget fra ADVIA før de ble sendt til Sysmex. Det er fullt mulig at resultatet ville sett annerledes ut dersom prøver flagget fra pasientpopulasjonen Sysmex betjener hadde blitt sendt til validering på ADVIA. Bruegel et al fra 2015 (4), med 349 prøver, viste at Sysmex fant blaster i 14 prøver som ikke kunne bekreftes ved mikroskopi, ADVIA fant 12. De få sammenligningsstudiene som inkluderer ADVIA kan sammenfattes slik:

- Hos Shelat et al fra 2010 (5) viste ADVIA god sensitivitet for blaster sammenlignet med Beckman-Coulter LH750 (100 vs. 62), men lavere spesifisitet (49 vs. 86).

- Hos Depoorter et al fra 2014 (6) utviste ADVIA høyest sensitivitet for blaster sammenlignet med Beckman-Coulter DXH800, Abbott Cell-Dyn Sapphire, Sysmex XN-2000 og XE-2100 (84 vs. 39, 30, 20 og 61).
- Hos Kang et al fra 2008 (7) viste forgjengeren ADVIA 120 dårligere sensitivitet (59.1 vs. 63.6) og spesifisitet (85.8 vs. 97.5) enn samme LH750 og også langt dårligere sensitivitet (59.1 vs. 90.9) og spesifisitet (85.8 vs. 90.4) enn Sysmex-modellen XE-2100.
- Hos Bruegel et al 2015 (4) viste ADVIA dårligere sensitivitet (65 vs. 97), men lik spesifisitet (97 vs. 98).

Den svært høye sensitiviteten på ADVIA hos Shelat et al kan kanskje forklares med at denne studien benyttet fire blastrelaterte flagg på hver av maskinene, for ADVIAs del var dette 'blast', 'basophil-no valley', ATYP, og 'large unstained cells (LUC) >7 %'. Kang et al og Bruegel et al aksepterte kun det rene blastflagget, og ADVIA presterte da dårligere, særlig med henblikk på sensitiviteten.

Den generelle hyppigheten av blastflagg på ADVIA synes å være høyere enn Sysmex (8), til dels langt høyere, som i en studie fra 2012, hvor ADVIA og Sysmex hver hadde ni ekte positive blastflagg i et materiale på 1138 prøver, men hvor ADVIA hadde 105 falsk-positive, mot Sysmex' ni (9). Denne høye andelen falsk-positive fant man også hos ADVIA 120 i sammenligning med Cell-Dyn Sapphire, Beckman-Coulter LH750 og Sysmex XE-100 på både blastflagget, IG-flagget og atypiske lymfocytter-flagget (7).

Ettersom blastflagget på ADVIA kan utløses også av en høy andel LUC, og LUC som fraksjon ikke benyttes ved mikroskopering, er det ikke mulig å si at nesten samtlige av prøvene i vår studie hos ADVIA var falsk-positive selv om de ved mikroskopering ikke ble funnet å inneholde  $\geq 5$  % blaster. Maskinen indikerer ikke nøyaktig hva som har utløst flagget, men hele 43 av 49 prøver inneholdt  $\geq 4.5$  % LUC, som sammen med kun 1.5 % blaster er nok til å utløse blastflagget alene. Imidlertid var det kun én av prøvene som ved mikroskopi viste seg å ha  $\geq 1.5$  % blaster, så andelen falsk-positive er trolig høy. I en tidligere studie med 932 prøver hadde 61 en LUC-fraksjon som oversteg 10 %, men kun i 13 av prøvene var det mulig å påvise blaster ved mikroskopi (10).

ADVIA og Sysmex målte altså ikke det samme når de målte monocytter, og det måtte være en forskjell blant maskinene i hvilke celler som ble inkludert i denne kategorien. Denne forskjellen har blitt bemerket i tidligere, blant annet hos Nguyen et al fra 2013 (9), hvor monocyttene var den eneste parameteren som var systematisk forhøyet på Sysmex i forhold til ADVIA. Det ble konkludert med at denne forskjellen sannsynligvis skyldtes forskjell i metodene brukt for å telle monocytter. Tidligere sammenligningsstudier av maskiner som inkluderte forgjengeren ADVIA 120, fant også systematisk lavere monocytter på ADVIA 120 enn maskinene den ble sammenlignet med (11, 12) og tilskrev dette underestimering på grunn av peroksidasefargingen. Det samme fant Bruegel et al fra 2015, som sammenlignet fem maskiner, inkludert ADVIA2120i (4). I en sammenligningsstudie fra 2002 med ADVIA 120 viste det seg at en signifikant andel nøytrofile hadde blitt feilklassifisert som LUC, muligens på grunn av at pasientene hadde hatt myeloperoksidasemangel (MPO) (10).

Dette ser vi også i vår studie: Ikke i noen prøver målte ADVIA flere monocytter enn Sysmex. Fra plot 1 ser vi dessuten at antallet monocytter på Sysmex øker når antallet på ADVIA øker, men det øker *mer* på Sysmex. En av prøvene med ca. 5 % monocytter på ADVIA hadde 7.5 % på Sysmex, og slik fortsetter økningen utover i plotet til en prøve med 15 % monocytter på ADVIA som hadde ca. 29 % på Sysmex. Av plot 2 ses at ADVIA målte 8.44 % færre monocytter enn Sysmex, og av plot 3 at ADVIA målte 4.72 % færre monocytter enn ved mikroskopi. Manuell vurdering i mikroskopi ga dermed en gjennomsnittlig monocyttandel som utgjorde en mellomting mellom ADVIA og Sysmex. Plot 4 viser at ADVIA og Sysmex kom ganske nært hverandre i prosentandel celler når monocytter ble inkludert fra Sysmex og både monocytter og LUC ble inkludert fra ADVIA. Sammenlignet man monocytter og LUC på ADVIA med monocytter fra mikroskopi økte derimot forskjellen mellom metodene igjen til 4.58 % flere celler hos ADVIA. Dette åpnet for muligheten for at 1) monocytter hos Sysmex inkluderte en del av cellene som hos ADVIA ble kategorisert som LUC, 2) en del av monocyttene ved mikroskopi ble kategorisert som andre celler, mest sannsynlig store og atypiske lymfocytter, og plassert i lymfocytfraksjonen. En sammenligningsstudie av ADVIA 120 og en annen Sysmex-maskin, XE-2100, konkluderte faktisk med at den høyere monocyttandelen funnet på Sysmex skyldtes atypiske lymfocytter, i tillegg til myeloblaster (13).

Selv om mikroskopi skal være gullstandard ved differensialtelling er morfologien tidvis utfordrende å tolke. Mikroskopiens crux i denne studien besto i det uklare grenselandet

mellom små monocytter og store, til dels atypiske lymfocytter. Selv om atypiske lymfocytter ble observert i mange av prøvene ble de ikke ved mikroskopisk telling offisielt fordelt i en normal og en atypisk fraksjon grunnet den beskjedne datamengden og muligheten for å tilføre for stor usikkerhet og dermed sjansen for tilfeldig statistisk signifikante funn. Vanskeligheten med å klassifisere lymfocytter som enten normale eller atypiske er godt kjent fra før, og ettersom ingen standardisert definisjon av lymfocytty varianter finnes er det opp til morfologisten å bestemme hvilken som er normal og hvilken som er atypisk (14, 15). Dette gjelder også stavformede nøytrofile og i noe mindre grad monocytter (16).

Det er likevel verdt å forklare fenomenet atypiske lymfocytter nærmere. Begrepet har blitt omtalt i litteraturen ved flere anledninger og under flere navn fra de først ble beskrevet hos en pasient med infeksjons mononukleose i 1907 (17). Viktige bidrag kom i 1923 (18), 1967 (19) og 1978 (20), og selv om disse bidragene i stor grad konsentrerer seg om celler som opptrer i infeksjøs tilstander er det trolig også noe å lære av morfologien når man studerer kreftsykdom og behandling av denne som underliggende årsak til atypien. Wood og Frenkel (19) identifiserer fem grupper atypiske lymfocytter, hvor type B synes å være av særskilt interesse: Monocytoide lymfocytter, som de også har blitt kalt (21), blir beskrevet som 14 til 20 $\mu$  i diameter og med relativt rikelig cytoplasma, «frothy (vacuolated) and light blue to medium slate-grey in color». En celletype som passer godt til denne beskrivelsen var til stede i prøvene til mange av pasientene i vår studie, og det kan godt tenkes at disse både bidro til å øke LUC-andelen hos ADVIA, og til at de i noen grad ble telt som monocytter hos Sysmex og dermed bidro til å øke differansen mellom monocytter på ADVIA og Sysmex ytterligere. Slik det fremgår av regresjonslikningen utgjorde Sysmex' monocytter alle ADVIAs monocytter pluss ytterligere 19.3 %, samt ca. 60 % av alle ADVIAs LUC. Dersom vi går ut fra at LUC-kategorien i vår studie ikke i noen særlig grad inneholdt blaster, ettersom kun henholdsvis 2.5 % og 0.5 % blaster ble observert i to av prøvene ved mikroskopi, måtte den nødvendigvis inneholde andre celler som ikke automatisk klassifiserte som klassiske monocytter hos ADVIA, som atypiske lymfocytter og mulig små og atypiske monocytter. St. Olavs hospitals egne korrelasjonsstudier fra 2005 viste at prosentandelen monocytter analysert på Sysmex XE-2100 tilsvarte prosentandelen monocytter +  $0.33 \cdot$  LUC analysert på den tidligere modellen ADVIA 120, samt at prosentandelen lymfocytter analysert på Sysmex XE-2100 tilsvarer ca. prosentandelen lymfocytter +  $0.67 \cdot$  LUC analysert på ADVIA 120. Dette ble bekreftet ved validering av Sysmex XN i 2015 (22). Disse korrelasjonsstudiene hevder også at ca. 1/3 av LUC vil bestå av (myelo)peroksidasefattige monocytter. Muligheten

for myeloperoksidasemangel og høy andel av monocytter og LUC på ADVIA er allerede beskrevet i en studie, men da samtidig med pseudonøytropeni (23). En slik misklassifisering av nøytrofile som monocytter så vi ikke i vår studie, men det er ikke umulig at myeloperoksidasefattige nøytrofile har bidratt til å øke LUC-andelen hos ADVIA. Imidlertid viser en annen studie at myeloperoksidasemangel som gir økt andel LUC og monocytter på ADVIA ikke vil gi utslag i form av monocytose eller LUC-aktige celler ved mikroskopi (24), hvilket vi derimot fant i vår studie.

### Mulige feilkilder

Studien er heftet med usikkerhet grunnet et lite utvalg prøver. Det er muligheter for stor heterogenitet i de kliniske variablene ettersom pasientene kun er plukket ut på bakgrunn av klinikktilhørighet og prøveresultater, ikke diagnose, sykdomsstatus eller behandling. Videre kan tilgang til data og flagging indusere observatørbias i estimatet av lymfocytvarianter (14, 25). Dette ble forsøkt unngått ved at maskinenes resultater ikke var kjent før blodutstrykene ble vurdert i mikroskop og at de først ble sammenholdt med tallene fra de manuelle tellingene etter disse var ferdige. Andre forhold knyttet til blodutstrykene og tolkningen av disse kan også være feilkilder. Utstryk kan være teknisk uperfekte, det forekommer både intra- og interobservatoriell inkonsekvens (26), og i tillegg spiller tilfeldighetene inn: Det er tilfeldig hvilke celler som blir med på utstryket, og det er i noen grad tilfeldig hvilke celler som blir telt av morfologisten. Dette blir gjerne omtalt som «The unavoidable error», slik Barnett beskrev den i 1933 (27). Til slutt bør nevnes at ettersom det kun foreligger ett datasett kan ikke likningen fra den lineære regresjonen bekreftes, men det hadde vært interessant om videre forskning kunne avklare dette.

## Avslutning

Denne studien tok utgangspunkt i forekomsten av flagging av blodprøver hos et utvalg kreftpasienter og undersøkte to hypoteser om mulige årsaker til flaggingen. Hypotese 1 gikk ut på at monocytter ble feilklassifisert som LUC og blaster og derved utløste flaggingen. Datagrunnlaget fra herværende studie viste at ADVIA flagget langt flere prøver enn Sysmex og at en del av cellene Sysmex klassifiserte som monocytter havnet i LUC-kategorien hos ADVIA. Det må bemerkes at andelen monocytter telt ved mikroskopi ligger mellom antallene telt på ADVIA og Sysmex, og at det er en mulighet for at Sysmex feilklassifiserer andre celler som monocytter, for eksempel atypiske lymfocytter. Hypotese 2 gikk ut på at faktorer knyttet til diagnose, behandling og sykdomsstatus kunne forklare den eventuelle feilklassifiseringen. Denne hypotesen lot seg ikke bekrefte på grunn av den svært heterogene og begrensede pasientpopulasjonen. Videre forskning med spissede kriterier for inklusjon må til for å kunne bekrefte eller avkrefte denne.



## Referanser

1. Briggs C, Culp N, Davis B, D' Onofrio G, Zini G, Machin SJ. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014;36(6):613-27.
2. Inc. SHD. ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems : Operator's Guide. Tarrytown, NY, USA: Forfatter; 2010.
3. Aune MW, Wedø TN. Rutiner for oppfølging av hematologiske resultater. Trondheim: St. Olavs hospital; 2020.
4. Bruegel M, Nagel D, Funk M, Fuhrmann P, Zander J, Teupser D. Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2015;53(7):1057-1071.
5. Shelat SG, Canfield W, Shibutani S. Differences in detecting blasts between ADVIA 2120 and Beckman-Coulter LH750 hematology analyzers. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2010;32(1p2):113-116.
6. Depoorter M, Goletti S, Latinne D, Defour J. Optimal flagging combinations for best performance of five blood cell analyzers. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2015;37(1):63-70.
7. Kang SH, Kim HK, Ham CK, Lee DS, Cho HI. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2008;30(6):480-486.
8. Kim S, Kim Y, Shin S, Song J, Choi J. Comparison Study of the Rates of Manual Peripheral Blood Smear Review From 3 Automated Hematology Analyzers, Unicel DxH 800, ADVIA 2120i, and XE 2100, Using International Consensus Group Guidelines. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2012;136(11):1408-1413.
9. Nguyen VTP, Vancles P, Rozen L, Noubouossie D, Demulder A. Évaluation de l'automate d'hématologie Sysmex XN-2000® pour une utilisation en routine : comparaison avec l'Advia 2120i®. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 2013;28(2-3):125-132.
10. Meer Wvd, Dinnissen JWB, Keijzer MHd, Scott CS. Comparative evaluation of Abbott CellDyn CD3700, Bayer ADVIA 120 and Sysmex XE-2100 automated leucocyte differentials and flagging. *Laboratory hematology*. 2002;8:102-117.
11. Meintker L, Ringwald J, Rauh M, Krause SW. Comparison of automated differential blood cell counts from Abbott Sapphire, Siemens Advia 120, Beckman Coulter DxH 800, and Sysmex XE-2100 in normal and pathologic samples. *American journal of clinical pathology*. 2013;139(5):641-650.

12. Grimaldi E, Carandente P, Scopacasa F, Romano MF, Pellegrino M, Bisogni R, et al. Evaluation of the monocyte counting by two automated haematology analysers compared with flow cytometry. *Clinical & Laboratory Haematology*. 2005;27(2):91-97.
13. 이범희, Bum Hee L, 변남섭, Nam Sub B, 지명석, Myung Suk G, et al. 자동혈구분석기 XE-2100, ADVIA-120와 Manual Differential Count의 상관성 및 Morphology Flag 평가 (Correlation of XE-2100, ADVIA-120 and Manual Differential Count and Evaluation of Morphology Flag). *대한임상검사과학회지 (Korean Journal of Clinical Laboratory Science)*. 2004;36(2):144-152. (English summary)
14. Meer WVD, Scott CS, Keijzer MHD. Automated flagging influences the inconsistency and bias of band cell and atypical lymphocyte morphological differentials. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2004;42(4):371-377.
15. Koepke JA. A delineation of performance criteria for the differentiation of leukocytes. *Am J Clin Pathol*. 1977;68(1 Suppl):202.
16. Koepke JA, Dotson MA, Shifman MA. A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method. *Blood cells*. 1985;11(2):173-186.
17. Türk W. Septische Erkrankungen bei Verkümmerng des Granulozytensystems. *Wiener klinische Wochenschrift*. 1907;20:157-162.
18. Downey HAL, McKinlay CA. Acute lymphadenosis compared with acute lymphatic leukemia. *Archives of internal medicine (1908)*. 1923;32(1):82-112.
19. Wood TA, Frenkel EP. The atypical lymphocyte. *The American Journal of Medicine*. 1967;42(6):923-936.
20. Shiftan TA, Mendelsohn J. The circulating "atypical" lymphocyte. *Hum Pathol*. 1978;9(1):51-61.
21. Schmid JR, Oechslin RJ, Moeschlin S. Infectious Mononucleosis An Autoradiographic Study of DNA-and RNA-Synthesis. *Scand J Haematol*. 1965;2(1):18-30.
22. Fonn K. Differensialtelling av leukocytter og totaltall neutro, lymfo og eos, Sysmex XN, Advia2120i, Celldyn Sapphire, ABX Micros, Sysmex XP-300. Trondheim: St. Olavs hospital; 2020.
23. Roh S, Ham JY, Song KE, Hwang N, Lee NY. Myeloperoxidase Deficiency Manifesting as Pseudoneutropenia with Low Mean Peroxidase Index and High Monocyte Count in 4 Adult Patients. *Lab Med*. 2019;51(2):e16-e19.
24. Rośniak-Bąk K, Jeleń A, Bąk M. Analysis of Separation of White Blood Cells in Peripheral Blood as an Indicator of MPO Deficiency. *Ann Clin Lab Sci*. 2017;47(4):422-431.
25. Bacus JW. The observer error in peripheral blood cell classification. *Am J Clin Pathol*. 1973;59(2):223-230.

26. Butcher TF. Leukocyte Differentials: Are They Worth the Effort? Clinics in Laboratory Medicine. 1984;4(1):71-87.
  
27. Barnett CW. The unavoidable error in the differential count of the leukocytes of the blood. The Journal of clinical investigation. 1933;12(1):77-85.

