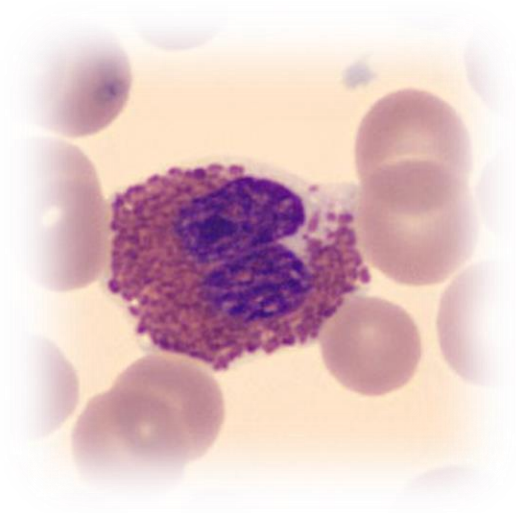


Anbefalinger:

Når bør det lages blodutstryk basert på celletellinger og/eller flagg fra hematologiinstrumenter?



1. Innledning

På en workshop innen hematologi arrangert våren 2016 ble det tydelig at det er behov for nasjonale anbefalinger for når blodutstryk bør lages basert på informasjon fra hematologiinstrument. Norsk kvalitetsforbedring av laboratorieundersøkelser (Noklus) tok derfor initiativ til utarbeidelse av anbefalinger for bruk av blodutstryk i medisinske laboratorier i Norge. Det ble nedsatt en arbeidsgruppe i 2017 bestående av:

- Anne Elisabeth Solsvik (leder), kvalitetskoordinator, seksjon for sykehus- og private laboratorier, Noklus
- Tor-Arne Hagve, overlege, professor II, AHUS (med frem til høst 2018)
- Helle Borgstrøm Hager, avdelingsoverlege Sentrallaboratoriet, Sykehuset i Vestfold
- Marthe Wedø Aune, seksjonsleder hematologi, St. Olavs Hospital
- Heidi Eilertsen, universitetslektor, OsloMet
- Kristin Lilleholt, avdelingsoverlege, medisinsk biokjemi, Sørlandet sykehus (med fra høsten 2018)

Arbeidet har foregått i en arbeidsgruppe i fysiske møter og telefonmøter, og er basert på eksisterende retningslinjer/ guidelines, litteratursøk og egne erfaringer.

Utkast til veileder ble deretter sendt til høring hos aktuelle organisasjoner/fora (NSMB, BFI og ekspertgruppen i Noklus innen medisinsk biokjemi tilknyttet Seksjon for sykehus- og private laboratorier).

Høsten 2021 foretok arbeidsgruppen en mindre revisjon.

Innhold

1. Innledning	2
2. Bruk av blodutstryk i laboratoriet.	4
3. Utstryksteknikk	4
4. Definisjoner og forklaringer	5
5. Kriterier for oppfølging basert på pasientinformasjon	5
6. Kriterier for oppfølging basert på antall celler	6
7. Kriterier for oppfølging basert på differensialtelling av leukocytter	7
8. Kriterier for oppfølging basert på kvalitative flagg og abnormal grafikk	9
9. Besvarelse av utstryk	10
10. Referanser	12

2. Bruk av blodutstryk i laboratoriet.

Norske medisinske laboratorier har god tilgang til avanserte instrumenter for hematologianalyser. Når analyseinstrumentene har problemer med å identifisere celler eller varsler om mulige abnormale/umodne/atypiske celler, eller det kan være mistanke om interferens, må man ha nok kunnskap til å gjøre en manuell klassifisering av celler og identifisere viktige morfologiske endringer i cellene.

Alle medisinske laboratorier bør ha minst to ansatte med kompetanse innen morfologisk karakterisering av blodceller. Ved manglende kompetanse lokalt, bør det foreligge skriftlig avtale med samarbeidende laboratorium eller hematolog som sikrer mulighet for sikker vurdering av blodutstryk innen akseptabel svartid.

Blodutstryk rekvirert som ledd i diagnostikk av hematologisk sykdom eller behandling er ikke omfattet av våre anbefalinger. Vi har konsentrert oss om å gi anbefalinger for når utstryk bør lages og vurderes på laboratoriet basert på hematologiverdier eller flagging fra hematologiinstrumentene. Disse anbefalingene passer ikke for alle laboratorier, og lokale retningslinjer bør utarbeides basert på egen pasientpopulasjon.

3. Utstryksteknikk

Blodutstryk bør lages kort tid etter prøvetaking, helst innen fire timer. Både automatisk og manuell utstryksteknikk kan brukes. Dette dokumentet gir ikke en detaljert beskrivelse av hvordan blodutstryk lages. En slik beskrivelse finnes tilgjengelig i annen litteratur f.eks. på nettsidene til Equalis, https://www.equalis.se/media/3xfbpsny/s001_morfologisk-klasificering_3-1.pdf (1).

Sentrifugerende utstryksteknikk (f.eks. DiffSpin fra Fisher eller Advia SMS Slide Maker Stainer fra Siemens) kan være et godt alternativ til tradisjonell blodutstryksteknikk (2). Abnormale celler kan ødelegges ved en manuell utstryksteknikk og maskinell utstryksteknikk (Wedge teknikk), mens sentrifugerende teknikk er mer skånsom. Ved mistanke om abnormale celler og > 5 % smudge celler bør alternativ utstryksteknikk som en sentrifugerende utstryksteknikk eventuelt benyttes. Vær oppmerksom på fare for aerosoldannelse og derfor økt smitterisiko ved sentrifugerende utstryksteknikk. Bruk eventuelt annen utstryksteknikk ved kjent blodsmitte.

Alternativ til sentrifugerende teknikk er å tilsette humant albumin (20 %) til EDTA-blodet i forholdet 1:5 før utstrykes lages. Albumin bidrar til å stabilisere cellemembranene i leukocytene slik at det dannes færre kjerneskygger eller smudge cells (3).

4. Definisjoner og forklaringer

Ukjent funn er definert som at ett av følgende kriterier er oppfylt:

- a) Fravær av tidligere resultater
- b) Et unormalt resultat, flagg eller melding som ikke var til stede i forrige prøve

Alder

Voksne er definert som 16 år eller eldre og barn er definert som yngre enn 16 år.

Trombocyttaggregater

Trombocyttaggregater påvises i blodutstryk eller med alternativ metode (f.eks. plasma på objektglass med dekkglass over). Aggregatene kan variere betydelig i størrelse, fra tre til fem plater opp til flere hundre i ett aggregat («drueklaser»). Hvis man ser mange små aggregater kan trombocytantallet også være falskt for lavt (4).

Hvis mulig bør ny prøve tas i natrium-citrat, husk å korrigere for fortykning.

5. Kriterier for oppfølging basert på pasientinformasjon

Selv ved abnormale morfologifunn som hos aktuell pasient er kjent fra tidligere kan det være viktig å følge opp med utstryk (som f.eks. leukocytaggregeringer, trombocyttaggregeringer eller inklusjoner i erytrocytter).

Spesielle funn bør dokumenteres i laboratoriets interne datasystem eller autovalideringssystem slik at fremtidige prøver tidlig plukkes ut og håndteres riktig. Eksempel på funn som bør knyttes til pasienten er kjent hematologisk sykdom som f.eks. kronisk lymfatisk leukemi (KLL), trombocyttaggregater, store trombocytter, funn av kryoglobuliner eller leukocyttagglutinerings.

6. Kriterier for oppfølging basert på antall celler

Blodutstryk kan være aktuelt for å utelukke interferens eller som et ledd i den tekniske validering av resultatene.

Tabell 1

Komponent	Pasient	Kriterium som utløser blodutstryk	Begrunnelse / kommentar	Litteratur / egne erfaringer
LPK ($\cdot 10^9$ celler/L)	Voksne / barn	$< 3,0 \cdot 10^9/L$ $> 30 \cdot 10^9/L$	<i>Anbefaler at resultater fra maskinell differensialtelling rapporteres, vurder utstryk hvis ukjent. Se etter umodne celler eller ødelagte celler, ev. fibrinneslag som inneholder leukocytter (og gir falsk for lave leukocytter).</i>	ISLH guidelines tilpasset (5)
TPK ($\cdot 10^9$ celler/L)	Voksne Barn	$< 100 \cdot 10^9/L$, ukjent funn $> 1000 \cdot 10^9/L$, ukjent funn $< 150 \cdot 10^9/L$, ukjent funn	$< 100 \cdot 10^9/L$ (voksne) / $< 150 \cdot 10^9/L$ (barn) undersøk for aggregater. $> 1000 \cdot 10^9/L$ bekreft reell trombocytose og at interferenser ikke er tilstede. Dersom aggregater, legg inn kommentar om falskt for lavt svar (blødningsfare ved uttalt trombocytose). Se etter tegn til myeloproliferativ sykdom (f.eks. umodne nøytrofile granulocytter og kjempestore trombocytter («giant platelets»)).	(5) Barn: (6)
RDW-CV (CV%)	Voksne / barn	$> 22\%$ og ukjent funn, når det er kjent at pasienten ikke har mottatt erytrocyttkonsentrat	Utelukke tilstedeværelse av schistocytter (erytrocyttfragmenter)	(5) (6)
NRBC (NRBC/100 LPK)	Voksne / barn	Voksne og barn > 7 dager gamle > 1 NRBC/100 LPK og ukjent funn, første leveuke > 5 NRBC /100 LPK	Bekreft forekomst av kjerneholdige erytrocytter. Se etter tegn på hemolytisk anemi (kjerneholdige erytrocytter sees typisk ved blødning, hemolyse og ved beinmargsaffeksjon)	(6)

7. Kriterier for oppfølging basert på differensialtelling av leukocytter

Tabell 2

Komponent	Pasient	Kriterium som utløser blodutstryk	Begrunnelse / kommentar	Litteratur / egne erfaringer
Nøytrofile granulocytter ($\cdot 10^9/L$)	Voksne / barn	$< 1,0 \cdot 10^9/L$, ved ukjent funn	<i>Bekreftede reell nøytropeni; se etter ødelagte celler, agglutinerer eller fibrinansamlinger med leukocytter som kan gi falsk nøytropeni. Se etter ev. umodne celler/blaster. Hvis nøytropeni ser ut til å være reell skal talletall fra instrument benyttes.</i>	(5) (6)
Eosinofile granulocytter ($\cdot 10^9/L$)	Voksne / barn	$> 2,0 \cdot 10^9/L$, ved ukjent funn	<i>For å bekrefte reell eosinofili, spesielt viktig hvis eosinofilpopulasjonen i scatterplott ser «rar» ut. Falsk eosinofili kan skyldes hypergranulering av nøytrofile granulocytter eller interferens, f.eks. ved malarieinfeksjon (plasmodium vivax). Ved malaria vil det oftest være samtidig trombocytopeni.</i>	(5) (6)
Basofile granulocytter ($\cdot 10^9/L$ eller %)	Voksne / barn	$> 0,5 \cdot 10^9/L$ og / eller $> 3\%$, ved ukjent funn	<i>For å utelukke falsk basofili og se etter tegn på myeloproliferativ sykdom (spesielt venstreforskyvning av nøytrofile granulocytter). Uttalt basofili sees bare ved myeloproliferative sykdommer. Ved kronisk myelogen leukemi (KML) er basofili nærmest et obligat funn. Også ved andre myeloproliferative sykdommer som polycytemia vera, myelofibrose, essensiell trombocytose og mastocytose kan det være lett til moderat basofili.</i>	(5) (6)
Lymfocytter ($\cdot 10^9/L$)	Voksne Barn	Ved ukjent funn: $> 5,0 \cdot 10^9/L$ Ved ukjent funn: $> 11,0 \cdot 10^9/L$ < 2 år, $> 9,0 \cdot 10^9/L$ 2-6 år $> 6,0 \cdot 10^9/L$ 6-12 år	<i>Se etter abnormale (mistenkt maligne) eller reaktive (aktiverede / variantform) celler. Hvis alder > 40 år og gjentatte målinger med lymfocytter $> 5,0$ vurder lymfoproliferativ sykdom som ved KLL. Ikke nødvendig med utstryk ved kjent KLL.</i>	(5) (6)
Monocytter ($\cdot 10^9/L$)	Voksne / barn	$> 1,5 \cdot 10^9/L$, ved ukjent funn	<i>For å utelukke falsk monocytose, utelukke blaster og morfologiske</i>	(6)

Vurder høyere grenser for innlagte pasienter	<i>avvik (spesielt dysplasi i myeloid rekke).</i>
--	---

Maskinell differensialtelling bør brukes fremfor manuell differensialtelling fra blodutstryk med mindre utstryk viser helt ulike fordelinger. Hvis det sees umodne celler, kan disse rapporteres som kommentarer (f.eks. X % av leukocytene utgjøres av blastsuspekte celler), eller det kan gis ut en manuell differensialtelling med angivelse av fordeling av de ulike celleklasser.

8. Kriterier for oppfølging basert på kvalitative flagg og abnormal grafikk

Flagg fra instrumentene er ikke alltid pålitelige. Årsaker til falske flagg kan f.eks. være feil klassifisering av celler, overskredet holdbarhet osv. Det frarådes å rapportere flagg fra instrumentene direkte til rekvirenter.

Tabell 3

Komponent	Pasient	Kriterium som utløser blodutstryk	Begrunnelse / kommentar	Litteratur / egne erfaringer
Umodne granulocytter (IG flagg)	Voksne / barn	Vurder scatterplott, lokale regler	<i>Kan indikere tilstedeværelse av umodne celler.</i>	(5)
Atypiske lymfocytter	Voksne / barn	Vurder tillaging av utstryk	<i>Vurder om det er maligne celler eller reaktive celler.</i>	(5)
Blast flagg	Voksne / barn	Blodutstryk vurderes hvis antall leukocytter, Hb eller trombocytter er utenfor referanseområdet og / eller abnormale funn i plott	<i>Se etter blaster og umodne celler. Andre faktorer som må vurderes er: Kjent diagnose Uventet endring fra tidligere hematologiske resultater.</i>	(5) (7) (8)
Abnormal leukocytografikk	Voksne / barn	Ved dårlig separasjon av leukocyttopulasjonene bør blodutstryk lages, eventuelt reanalyseres med annen teknologi.	<i>Kan være tekniske problemer med definering av cellepopulasjoner eller forekomst av abnormale celler.</i>	Egen erfaring
Fragment flagg	Voksne / barn	Indikasjon for å lage blodutstryk hvis samtidig anemi og trombocytopeni, eller fall i trombocytter på minst 50 %	<i>Utelukke eller verifisere tilstedeværelse av schistocytter (erytrocyttfragmenter). Schistocytene kan telles som trombocytter og gi falsk for høye trombocytter.</i>	(6) (9)
Retikulocyt flagg	Voksne / barn	Vurder utstryk ved abnormalt retikulocyttscaatter.	<i>Utelukke falskt forhøyede verdier på grunn av interferenter som f.eks. Howell-Jolly legemer, malariaplasmodier, sigdceller og Pappenheimer legemer.</i>	Egen erfaring, (10)
NRBC flagg	Voksne / barn	Alle flagg som indikerer tilstedeværelse av NRBC	<i>Bekreft forekomst av kjerneholdige erytrocytter. Korriger leukocytallet hvis det ikke gjøres automatisk av instrumentet. Se etter tegn på hemolytisk anemi (kjerneholdige erytrocytter sees typisk ved blødning, hemolyse og ved beinmargssaffeksjon)</i>	(6)

9. Besvarelse av utstryk

Vurdering av blodutstryk omfatter celleklassifisering av leukocytter og en kvalitativ beskrivelse av leukocytter, erytrocytter og trombocytter. Utstryk som ikke er bestilt, men laget på grunn av regler, kan være laget på tilsendte gamle prøver fra primærhelsetjenesten. Det er ikke nødvendig å gi en fullstendig beskrivelse av alle celleklasser hvis utstryket ikke har høy nok kvalitet. Be om ny, fersk prøve hvis tolkningen er vanskelig og det er grunn til å mistenke patologi av betydning.

Den kvalitative vurderingen skal omfatte morfologi og funn av eventuelle interferenter. En detaljert beskrivelse av ulike celletyper (med bilder) og bilde av ulike typer inklusjoner bør være lett tilgjengelig for ansatte som skal vurdere blodutstryk. Eksempler på slik litteratur er morfologisk atlas laget av bioingeniører ved Akershus universitetssykehus (11), nettsidene til UK Neqas, http://haematologyetc.co.uk/Haematology_ETC, lærebøkene Clinical Hematology Atlas (12) og Blood cells, A practical guide (13).

I Equalis sine anbefalinger til standardisering av morfologisk klassifisering og vurdering av celler i blodutstryk finnes i appendiks fire en anbefaling som omhandler hvordan morfologiske forandringer bør besvares (1).

Leukocytter:

Leukocytter kan klassifiseres i følgende kategorier; segmenterte nøytrofile granulocytter, stavkjernede nøytrofile granulocytter, metamyelocytter, myelocytter, promyelocytter, myeloblaster, eosinofile granulocytter, basofile granulocytter, lymfocytter, prolymfocytter, lymfoblaster, monocytter, promonocytter, monoblaster og plasmaceller. Det er ofte ikke mulig å skille myeloblaster fra lymfoblaster ved mikroskopi alene. Unntaket er hvis man ser Auerstaver i blastene, da kan man være sikker på at det er myeloblaster.

Funn av umodne celler, abnormal lobulering av cellekjerner, abnormal eller fravær av granulering eller patologiske inklusjoner bør beskrives.

Smudge cells som kan klassifiseres rapporteres i respektive celleklasse (for eksempel en ødelagt eosinofil granulocytt som er lett gjenkjennelig pga. sine røde granula). Ved tilstander med økt andel smudge cells der det er åpenbart hvilken celleklasse de ødelagte cellene må tilhøre, som for eksempel ved KLL, skal de også telles med i respektive intakte celleklasse (13).

Erytrocytter:

Vurder fargemetning, størrelse, form og eventuell forekomst av kjerneholdige erytrocytter, inklusjoner eller funn av parasitter. Angivelse av avvikende erytrocyttmorfologi kan graderes i henhold til anbefalinger fra Equalis (1), som igjen bygger på (14).

Ved mistanke om trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP) eller hemolytisk uremisk syndrom (HUS) er det viktig å se etter schistocytter i blodutstryk. Det anbefales å oppgi hvor mange prosent schistocytter utgjør av totalt antall erytrocytter hvis de utgjør mer enn 1 %. Tilstedeværelse av schistocytter vurderes ved medium forstørrelse (x 40, 50 eller 60) og estimeres som en prosent etter at man har telt minst 1000 erytrocytter (4). Forenklet metode hentet fra nettsiden Up To Date

anbefaler å angi at det er økt antall schistocytter hvis det sees to eller flere schistocytter per synsfelt ved 100 x forstørrelse (5). Hvis man benytter programvare til automatisert differensialtelling som kan differensiere erytrocytter, som CellaVision med erytrocyttprogram, kan man bruke prosenttallet derfra etter å ha kvalitetssikret klassifikasjonen.

Ved TTP/HUS er funn av schistocytter vanligvis det eneste funn i utstryk, eventuelt i tillegg til polykromasi og enkelte kjerneholdige erytrocytter. Det skal ikke telles schistocytter når de forekommer som et av mange morfologiske avvik i den røde rekken, som f.eks. ved talassemier, myelodysplastisk syndrom, myelofibrose og megaloblastisk anemi.

Trombocytter:

Økt eller nedsatt antall trombocytter, unormal cellestørrelse, fravær av granula, tilstedeværelse av trombocyttaggregater, satellittisme og fragmenter av megakaryocytter eller funn av megakaryocytter bør beskrives. Hvis antall trombocytter er over $1000 \cdot 10^9$ celler/L bør man se etter patologiske forandringer i myelogene cellerrekker.

Rapportering:

Patologiske funn i utstryket må dokumenteres i laboratoriedatasystemet. Eventuell anbefaling om kontroll eller henvisning til hematolog bør angis. Følgende funn skal alltid forsøkes ringt til rekvirenten (hvis ukjent):

- Blaster
- Promyelocytter med Auerstaver
- Umodne plasmaceller
- Schistocytter (hvis eneste funn) og samtidig trombocytopeni /fall i trombocytter
- Malariaplasmodier, parasitter
- Bakterier

Det er utarbeidet en norsk anbefaling for varsling av sterkt avvikende kvantitative analyseresultater til rekvirenter utenfor sykehus (15)

10. Referanser

1. Equalis. Rekommanderat om standardiserat rutinmetod för morfologisk klassifisering och bedömning av celler i blodutstryk Equalis.se: Equalis; 2018 [Available from: https://www.equalis.se/media/3xfbpsny/s001_morfologisk-klassifisering_3-1.pdf
2. Rodak B. Diagnostic Hematology. 1995. p. 149.
3. Kandice Kottke-Marchant BD. Laboratory Hematology Practice. Wiley-Blackwell First edition 2012.
4. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hematol.* 2007;29(1):4-20.
5. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E, international consensus group for h. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol.* 2005;11(2):83-90.
6. Geneviève F, Galois A.C., Mercier-Bataille, D., Wagner-Ballon, O., Trimoreau, F., Fenneteau, O., Schillinger, F., Leymarie, V., Girard, S., Settegrana, C., Daliphard, S., Soenen-Cornu, V., Cividin, M., Lesesve, J.F., Châtelain, B.; Troussard, X., Bardet, V. Smear microscopy revision: propositions by the GFHC. *feuillets de Biologie.* 2014;317:1-9.
7. Eilertsen H, Hagve TA. Do the flags related to immature granulocytes reported by the Sysmex XE-5000 warrant a microscopic slide review? *Am J Clin Pathol.* 2014;142(4):553-60.
8. Eilertsen H, Vollestad NK, Hagve TA. The usefulness of blast flags on the Sysmex XE-5000 is questionable. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(5):633-40.
9. Zini G, d'Onofrio G, Briggs C, Erber W, Jou JM, Lee SH, et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(2):107-16.
10. van Berkel M, Besselaar E, Kuijper P, Scharnhorst V. Instrument-dependent interference of Howell-Jolly bodies in reticulocyte enumeration. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(6):e137-9.
11. Akershus universitetssykehus SS. Blodutstryk, Vurdering. Morfologisk atlas. 2011.
12. Rodak B, Carr J. Clinical Hematology Atlas, 5th edition. Elsevier, editor 2016.
13. Bain B. Blood cells, A practical guide. 5th edition. Blackwell W, editor 2015.
14. Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(3):287-303.
15. Aakre K.M HGG, Skadberg Ø, Piehler A, Distant S, Hager H.B. Varsling av sterkt avvikende analyseresulater til rekvirenter utenfor sykehus. *Tidsskr Nor Legeforen.* 2013;133:2.