

Uppsala Universitet
Examensarbete 15hp, VT2008
Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi
Biomedicinska Analytikerprogrammet

Evaluation of platelet parameters from Advia 2120 and Sysmex XT-2000iV in samples from dogs, horses and cats.

Maria Mitander Wallin



Handledare: Inger Lilliehöök, laboratorieveterinär, Harold Tvedten, universitetsadjunkt, Institutionen för kemiska vetenskaper, Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU, Uppsala.

ABSTRACT

Haematology instruments using optical and fluorescence techniques have improved the platelet count in domestic animals. There are still some difficulties present, especially when counting cat thrombocytes due to their ability to aggregate and the occurrence of large platelets.

The objective of this study was to evaluate and compare the platelet count, mean platelet volume and platelet crit in dogs, horses and cats on Advia 2120 and Sysmex XT-2000iV.

Fresh blood samples from 64 dogs, 40 horses and 39 cats with various medical conditions were analysed on both instruments. Manual blood smears of all feline samples were scrutiniously analysed to evaluate the aggregation warning flag from Advia.

There was good agreement between the instruments for the optical platelet count in dogs and cats. Slightly higher values were reported from Advia. Samples from horses presented poor correlations for all studied parameters. Platelet clumps appeared in 70% of the 37 scrutinized feline blood smears, while 46% of the samples generated aggregation warning flags from the Advia instrument.

Advia and Sysmex showed good agreement for platelet counts in blood from dogs and cats. Mean platelet volume and platelet crit need further evaluation before conclusions can be made concerning their clinical relevance. The sensitivity of the platelet aggregation warning flag from the Advia instrument needs further elevation.

KEY WORDS: platelet counts, mean platelet volume, platelet crit, platelet clumps, platelet aggregation flag

INTRODUKTION

Trombocyten är den minsta blodcellen med en storlek på mellan 2 – 4 μ m (hos människa). De bildas i benmärgen genom fragmentering av megakaryocyten cytoplasma och utsöndras sedan till blodcirkulationen. Produktionen styrs framförallt av tillväxtfaktorn trombopoetin som tillverkas i lever och njurar. Trombopoetin binds till de cirkulerande trombocyterna och endast den fria fraktionen kan påverka megakaryocyterna till ökad produktivitet. Trombocyterna saknar cellkärna (förutom hos fåglar och kräldjur) men innehåller flertalet cytoplasmiska organeller vars innehåll har en viktig roll i den primära hemostasen. Kliniska studier utförda både på djur och människor visar att trombocyten även har en viktig roll vid inflammatoriska tillstånd. I dess organeller finns vasoaktiva ämnen som serotonin och 'platelet activation factor' (PAF). Dessutom frisätter trombocyten cytokiner och interagerar med neutrofila leukocyter [Allegrezza-Giulietti m.fl.1991, Flad m.fl. 1997].

De senaste åren har nya metoder för räkning av trombocyter introducerats på de automatiserade hematologiinstrumenten. Genom att använda sig av optisk ljusspridning och/eller fluorescens har instrumenten blivit bättre på att urskilja och därmed räkna trombocyter. Tidigare har instrument med impedansmätning dominerat marknaden och den metodiken är inte alltid att föredra, speciellt inte vid trombocyträkning hos katt som har makrotrombocyter [Briggs m.fl. 2007, Willis och Wardrop 2008].

I denna studie har två avancerade hematologiinstrument använts: Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) och Advia 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA).

Sysmex XT-2000iV är ett vanligt instrument inom humanmedicinen. Nyligen har instrumentet fått mjukvara (XT-2000iV) som har modifierats för att fungera inom veterinärdiagnostiken. Det finns fördefinierade inställningar för åtta olika djurarter (hund, häst, katt, mus, råtta, kanin, apa, och marsvin). Det är möjligt att mäta fem olika trombocytparametrar; trombocytpartikelkoncentration med impedansmätning (TPK-I), trombocytpartikelkoncentration med optisk mätning (TPK-O), 'platelet large cell ratio' (P-LCR), 'mean platelet volume' (MPV), 'platelet crit' (PCT) och 'platelet distribution width' (PDW) då trombocyterna distribueras normalt. Sysmex XT-2000iV räknar trombocyter på två olika sätt. Vid räkning med impedansteknik späds EDTA-blodet i en elektrolytlösning och trombocyterna passerar sedan genom en apparatur med hjälp av hydrodynamisk fokusering. Då trombocyter är dåliga ledare av elektricitet ökar impedansen i mätkammaren när cellen passerar. Detta ger upphov till en elektrisk puls som registreras i en likspänningskrets över mätkammaren. Pulsstorleken är proportionell mot blodkroppens storlek, vilket gör att instrumentet kan skilja trombocyter från erythrocyter och bestämma antal och storlek för respektive cellsort [Briggs m.fl. 2007]. Den andra mätprincipen är flödescytometri där en semikonduktorlaser används. Trombocyterna märks in med fluorescerande färg, polymethin, som färgar nukleinsyror. Laserstrålen belyser varje enskild cell som passerar flödescellen och separerar dem utifrån tre olika signaler; 'Forward Scatter' (FSC), 'Side Scatter' (SSC) och sidofluorescens (SFL). 'Forward scatter' indikerar cellens volym, 'Side scatter' ger ett mått på cellkomponenter som kärna(or) och granula och sidofluorescensen påvisar cellens DNA- och RNA-innehåll [Briggs m.fl. 2007].

Advia 2120 har nyligen tagits i bruk (mars 2008) på laboratoriet för klinisk kemi på Universitetsdjursjukhuset, SLU och är ett hematologiinstrument baserat på flödescytometri. Instrumentet är tillverkat för prover från människa men mjukvaran är specialanpassad för djurprover. Trombocyter och erythrocyter räknas i samma kanal när de passerar genom en flödescell. Trombocyterna belyses av en stråle monokromatiskt ljus från en semikonduktorlaser vid $670 \pm 10\text{nm}$ som emitteras av en fotodiod då de befinner sig i flödescellen. Själva mätprincipen grundar sig på Mies teori om ljusets spridning i små partiklar. Enligt Mies ljusspridningsteori så är intensiteten hos monokromatiskt ljus, då det sprids i en viss vinkel av en enhetlig sfär, endast beroende av sfärens volym och skillnaden i refraktärt index mellan sfären och det befintliga mediet. Systemet mäter intensiteten hos ljusspridningssignalerna vid en låg vinkel: $2^\circ - 3^\circ$ och en hög vinkel: $5^\circ - 15^\circ$ [Macey m.fl. 1999]. Ljusspridningssignalerna förstärks 30 gånger vid låg vinkel och 12 gånger vid hög vinkel. Den låga vinkelns ljusspridning är beroende av cellvolymen och den höga vinkelns ljusspridning är beroende av cellens refraktära index vilket hos trombocyten är relaterat till granuleringsgraden. Instrumentet använder sig av komplexa flaggningsalgoritmer för att uppmärksamma användaren vid avvikelser. De flaggsystem som finns synliggörs vid diskrepanser i morfologi och kvantitet. Det finns även prov- och systemflaggor.

Advia 2120 kan presentera en mängd olika trombocytparametrar varav en del endast används inom forskningen då deras kliniska relevans ännu ej är klarlagd. 'Mean platelet volume' (MPV), 'platelet size deviation width' (PDW) och 'platelet large cell ratio (P-LCR) är tre parametrar som studerats närmare och har visat sig kunna bidra med viktig information vid immunmedierad trombocytopeni och vid aplastisk anemi hos människa [Kaito m.fl. 2004]. De tre nämnda parametrarna är inte accepterade för användning inom den rutinmässiga diagnostiken och behöver utvärderas ytterligare.

Det finns ett flertal studier där MPV:s kvalitéer undersökts. Det har påvisats att MPV är en pålitlig indikator för den kvarvarande trombocytfunktionen i trombocyt koncentrat som lagrats, där en ökning av MPV indikerar att produkten försämrats [Beyan m.fl. 2006]. Det har också rapporteras att en ökning av MPV korrelerar bättre med ökad trombocytproduktion än vad ljusmikroskopiska bedömningar av trombocytstorleken gör, men

man har även sett att MPV påverkas av preanalytiska omständigheter och andra mätningsartefakter. Bland annat borde natriumcitrat användas istället för EDTA som får trombocyterna att svälla. Stora trombocyter hamnar oftast utanför mätområdet i automatiska cellräknare som använder impedansteknik vilket gör att MPV-värdet underskattas. Små erythrocyter är ytterligare en faktor som kan interferera med trombocytantalet och uppskattningen av MPV [Saxon m.fl. 1998].

Trombocyter hos människor och olika djur skiljer sig åt på vissa punkter. Antalet och volymen varierar mellan olika arter liksom deras egenskaper och morfologiska utseende. Trombocyter hos människa har en volym (MPV) på $7,1 \pm 4,9$ fl och referensvärdena för TPK är $150-350 \times 10^9/l$.

Hästar har bland de lägsta trombocytantalerna som uppmätts hos däggdjur [Meyer 1985]. Advia 2120, som är i bruk på laboratoriet där studien utfördes, har referensvärden för hästtrombocytantal på $105-240 \times 10^9/l$. Hästens trombocyter liknar människans morfologiskt sett, men de azurofila granula som finns i hästtrombocyterna är så små att de är svåra att se även i 100 gångers (x) förstoring med immersionsolja. Trombocyttaggregat är en sällsynt förekomst i blodutstryk från häst, men de kan induceras i provröret av EDTA [Lunn m.fl. 1998].

Hos hund ligger trombocytantalet mellan $157-394 \times 10^9/l$ [Willis och Wardrop 2008], men referensintervallen varierar både mellan olika instrument och laboratorier. Advia 2120 som användes i den här studien har referensvärden på $170-490 \times 10^9/l$. Trombocyterna är vanligtvis runt $1-3 \mu m$ stora hos friska hundar [Wilkerson och Shuman 2001], men de kan vara större än erythrocyter vilket tydligt ses vid mikroskopering. Cytoplasman är ofta klar till ljus grå och innehåller många små rosa-lila granula. Aktiverade hundtrombocyter kan bilda små klumpar alternativt större aggregat som återfinns i fransen på blodutstryket.

Katter har normalt $100-630 \times 10^9/l$ (referensvärden från Advia 2120 som användes i studien) trombocyter cirkulerande i blodet. Provtagningen kan orsaka mjältkonstriktion hos katten beroende på stress och oro, vilket ökar antalet cirkulerande trombocyter. MPV ligger runt 12-17 fl om provet ej innehåller aggregat men aggregering är vanligt i samband med provtagning [Zelmanovic och Hetherington 1998]. Katter har ofta makrocytära trombocyter som kan vara ovala/långsträckta till sin form.

Trombocyträkning i helblod från katt som utförs på automatiska cellräknare baserade på impedansteknik kan visa kraftigt felaktiga mätvärden [Tasker m.fl. 1999, Willis och Wardrop 2008], vilket gjort att veterinärdiagnostiska laboratorier rutinmässigt inte lämnat ut numeriska värden på trombocytparametrar vid analys av helblod från katt. Antalet har istället beskrivits som lågt, normalt eller högt och MPV lämnas sällan ut överhuvudtaget [Zelmanovic och Hetherington 1998]. Det är främst två orsaker som ligger till grund för detta tillvägagångssätt. I blodprover från katt överlappar ofta storleken hos trombocyter och erythrocyter. Eftersom impedansinstrument enbart skiljer på de båda celltyperna via storlek går det inte att få korrekta värden vare sig för trombocytantalet eller MPV [Tasker m.fl. 2001, Zelmanovic och Hetherington 1998]. Den andra orsaken är att katttrombocyter har en hög tendens att bilda aggregat och när aggregatbildning sker kan inte instrumentet utföra en korrekt trombocyträkning [Séverine m.fl. 1999, Willis och Wardrop 2008].

Aggregatbildning kan resultera i pseudotrombocytopeni. Detta är en förekomst som kan leda till att diagnostiska undersökningar utförs i onödan samt att läkemedel ordineras till individer som inte lider av trombocytopeni [Willis och Wardrop 2008]. Pseudotrombocytopeni beror främst på att trombocyttaggregering sker *in vitro* vilket gör att ett missvisande lågt trombocytantal rapporteras både vid räkning med automatiserade hematologiinstrument och vid manuell räkning. Pseudotrombocytopeni kan uppkomma om blodprovtagningen är traumatisk och då trombocyterna aktiveras. Pseudotrombocytopeni kan också induceras av

vissa antikoagulanter, exempelvis av EDTA som är en vanlig antikoagulant när en fullständig hematologiundersökning utförs [Willis och Wardrop 2008]. Hos katt ses trombocyttaggregat ofta oberoende av vilket antikoagulantia som använts [Norman m.fl. 2001].

Trombocytopeni är ett tillstånd som drabbar både hund, häst och katt och kan ha ett flertal bakomliggande orsaker. Vissa läkemedel kan ha toxisk inverkan på megakaryocyterna vilket leder till minskad produktion. Förbrukningen av trombocyter kan öka vid vissa infektionssjukdomar, hemolytisk anemi och disseminerad intravaskulär koagulopati (DIC). Trombocytopeni hos t.ex. hund är ofta immunmedierad. Den främsta orsaken är att trombocyter täckts av antikroppar och därför destrueras i snabbare takt än vanligt genom fagocytos av makrofager i mjälten och andra vävnader [Mackin 1995].

Bland våra vanliga hundraser har man påvisat en trombocytdefekt hos Cavalier king charles spaniels. Cirka 50% av hundarna inom denna ras lider av en autosomt recessivt nedärvd benign trombocytrubbning som resulterar i att hunden får trombocytopeni, makrotrombocyter och/eller nedsatt trombocyttaggregation vid ADP-stimulering [Cowan m.fl. 2004]. Oftast befinner sig trombocytantalet runt $30-90 \times 10^9/l$, men hundarna visar dock sällan några tecken på blödning eftersom de har normal trombocytmassa och normal PCT [Pedersen m.fl. 2002, Bertazzolo m.fl. 2007].

Syftet med denna studie var att jämföra trombocytparametrar (TPK-I, TPK-O, MPV och PCT) på två hematologiinstrument (Sysmex XT-2000iV och Advia 2120) vid analys av helblod från hund, katt och häst. Vi ville även försöka fastställa vilka parametrar som är användbara i diagnostiken och vilka som ej är tillförlitliga eller ger irrelevant information. Eftersom trombocyttaggregering i helblod från katt är vanligt förekommande och försvårar vid automatisk trombocyträkning studerades manuella blodutstryk för att uppskatta/fastställa graden av trombocyttaggregering i dessa prover. Dessutom ville vi kontrollera i vilken utsträckning Advia 2120 kan detektera trombocyttaggregat och uppmärksamma användaren på dessa genom trombocytalarm, samt se om 'cutoff'-värdet för aggregatdetektion är rimligt eller om instrumentet missar prover där omfattande aggregering skett.

MATERIAL OCH METOD

Provmaterialet utgjordes av färskt helblod från hund, häst och katt samlat i 4,5ml K₃EDTA-rör (Vacuette, Greiner bio-one, Österrike, BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Storbritannien samt Venoject, Terumo Europe, Belgien). Blodprover från 64 hundar, 39 katter och 40 hästar med diverse sjukdomar/symtom som inkom till Universitetsdjursjukhuset, SLU under studiens gång togs med i utvärderingen. Proverna förvarades i rumstemperatur tills analys som utfördes inom 3 timmar från provtagningstillfället. Innan analys sattes de i en provrörsvagga för att se till att blodkomponenterna hade en jämn fördelning i röret. De instrument som användes var Advia 2120 med mjukvara av version 5.3.1. och Sysmex XT-2000iV med tillhörande mjukvara av version 8. De parametrar som valdes ut för närmare granskning och jämförelse mellan instrumenten var TPK-O, MPV och PCT. Ett manuellt blodutstryk gjordes på varje enskilt prov.

Sysmex XT-2000iV

Sysmex XT-2000iV har förprogrammerade artspecifika inställningar för ett antal olika djurslag: hund, katt, häst, mus, apa, råtta, kanin och marsvin. I detta arbete användes inställningarna för hund, katt och häst utan några modifikationer.

Impedansräkningen (TPK-I) och den optiska räkningen på Sysmex XT-2000iV jämfördes inbördes på instrumentet hos alla tre djurslagen. Samtliga plottar och histogram granskades och eventuella avvikelser noterades. För att testa precisionen hos Sysmex XT-2000iV för samtliga utvalda parametrar kördes ett blodprov från häst och ett blodprov från hund 10 respektive 9 gånger efter varandra i följd.

Det medföljer tre kontroller (e-check, helblod) från instrumentleverantören, en låg (bl.a. lågt Hb och lågt antal trombocyter), en normal samt en hög kontroll. Under studien kördes en låg och en normal kontroll dagligen vid uppstart av instrumentet. Måndag, onsdag och fredag kördes kontrollerna i det automatiska läget och tisdag och torsdag analyserades de i manuellt läge.

Advia 2120

Advia 2120 har förprogrammerade artspecifika inställningar för ett antal olika djurslag: hund, katt, häst, mus, apa, råtta, kanin, får, gris, nöt, get, och marsvin. De inställningar som fanns för hund, häst och katt användes utan några modifikationer.

Samtliga cytogram granskades för att upptäcka eventuella tecken på trombocyttaggregering eller andra problem med trombocytanalyserna. För att kontrollera i vilken utsträckning trombocyttaggregat förekom i proverna studerades framförallt området intill lymfocyterna i peroxidascytogrammen där aggregaten oftast ses.

Advia 2120 har ett system där prover som innehåller stora trombocyter uppmärksammas. Flaggan 'large platelets' (L-PLT) har en graderingsskala från ett plustecken till tre där ett plustecken betyder att 10,0-11,9% av trombocytantalet är större än 20fl, två plustecken: 12,0-14,0% och tre plustecken: >14%.

En låg och en normal kontroll (Advia 3•in•1 TESTpoint™ Hematology Controls) kördes dagligen vid uppstart av instrumentet. Kontrollerna är tillverkade av samma företag (Siemens Healthcare Diagnostics) som tillhandahåller instrumentet med tillhörande reagenser.

Manuell metod - blodutstryk

För att utvärdera hur trombocyträkningen på de automatiserade instrumenten fungerade vid närvaro av aggregat gjordes ett manuellt blodutstryk på varje blodprov som ingick i studien. Alla utstryk från katt granskades och för hund och häst studerades de utstryk där provet orsakat ett larm eller där cytogrammen avvek. Med hjälp av blodutstryken kunde även Advia 2120:s förmåga att flagga för trombocyttaggregat utvärderas.

Utstryken färgades med May Grünwald-Giemsa i en Hema-tek slide stainer (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA). Alla blodutstryk från katt studerades i ljusmikroskop (Zeiss, Standard 25, Oberkochen, Tyskland). Hela fransen studerades i 10x förstoring och om trombocyttaggregat förekom användes 40x förstoring och 100x förstoring med immersionsolja för noggrann räkning. Aggregaten kategoriserades enligt följande: <10 trombocyter/aggregat, >10 trombocyter/aggregat, >50 trombocyter/aggregat, >100 trombocyter/aggregat. Omfattningen av aggregaten sammanfattades enligt en subjektiv graderingsskala från 0 – 4+ som indikerade utbredningen av aggregerade trombocyter i varje utstryk. 0 = utstryk fritt från aggregat, 1+ = mild aggregering ett fåtal (1-7) mindre aggregat med > 10 trombocyter, 2+ = flera (≥ 10) mindre aggregat och/eller ett fåtal (1-3) större innehållande > 50 trombocyter, 3+ = flertalet aggregat i varierande storlek där de fortfarande går att kvantifiera och 4+ betyder att hela fransen/utstryket är fullt av aggregat (okvantifierbart).

Dessutom studerades tio synfält i monolagret vid 100x förstoring med immersionsolja och antalet trombocyttagregat i varje synfält noterades. I monolagret räknades formationer av minst tre trombocyter som aggregat och de kategoriserades som >10, =10 och <10.

Datasammanställning

Utskriften från Sysmex XT-2000iV med samtliga mätvärden, cytogram och eventuella larm häftades ihop med motsvarande utskrift från Advia 2120 plus kopian av remissen. Sedan fördes de relevanta parametrarna in i ett exceldokument (Microsoft Office Excel 2003, Redmond, USA) tillsammans med labnummer, djurslag, provtagningstid samt eventuella larm/flaggor.

Diagram utformades där värdena för varje parameter och metod plottades mot varandra. De olika djurslagen hund, häst och katt behandlades var för sig. Hos Sysmex XT-2000iV jämfördes också TPK-I och TPK-O sinsemellan i ett eget diagram. Genom att infoga en regressionslinje i diagrammen och räkna fram korrelationskoefficienten så kunde linjariteten metoderna emellan beskrivas. Medelvärde och differens mellan metoderna räknades ut för varje prov. Ett differensdiagram skapades där differensen mellan metoderna plottades mot medelvärdet för bägge metoderna för varje enskilt prov. Standardavvikelse, medelvärde och median räknades fram för varje parameter för respektive djurart och sammanställdes i en tabell. Trombocyttagregatflaggorna från Advia 2120 relaterades till aggregatkoncentrationen i respektive prov och sambandet däremellan synliggjordes med hjälp av en tabell. Provresultaten från hund- och hästproverna som analyserades i syfte att testa precisionen hos Sysmex XT-2000iV sammanställdes och variationskoefficienten (CV%) räknades fram för varje parameter och djurslag.

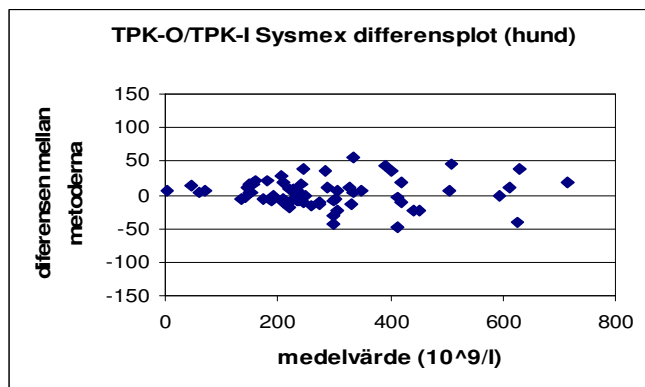
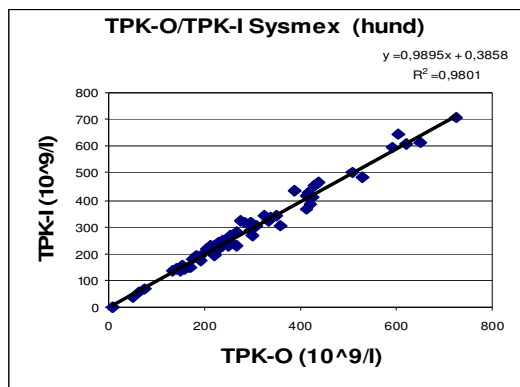
RESULTAT

Trombocyträkning på Sysmex XT-2000iV, inbördes jämförelse av impedans- och optisk metod.

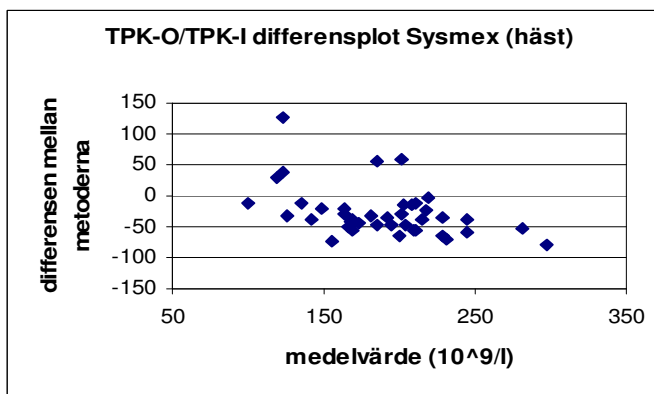
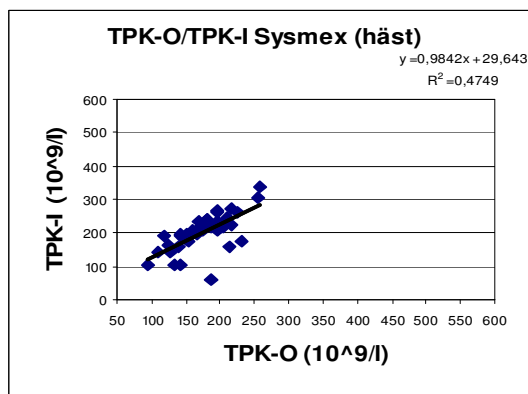
Vid jämförelse av trombocytantal mellan impedans och optisk räkning på Sysmex XT-2000iV överensstämde resultatet för hundproverna bra. Korrelationen var utmärkt ($r^2=0,98$) och instrumenten var relativt överens nivåmässigt (se figur 1) En hund led av kraftig trombocytopeni med värden på $2 \times 10^9/l$ (impedans) och $7 \times 10^9/l$ (optisk). Trots det låga antalet var mätmetoderna relativt samstämmiga.

Hos häst var överensstämmelsen inte fullt lika tydlig ($r^2=0,47$). Det kan delvis bero på att provresultaten låg på en likvärdig nivå med en mycket begränsad spridning både vad gäller höga och låga värden (se figur 2). Resultaten från den optiska mätningen ligger i medeltal 16% lägre än impedansmätningen. Ett hästprov avvek markant från de andra: TPK-I blev $59 \times 10^9/l$ och TPK-O blev $186 \times 10^9/l$. När blodutstryket studerades var hela fransen full med aggregat vilket delvis kan förklara den stora skillnaden.

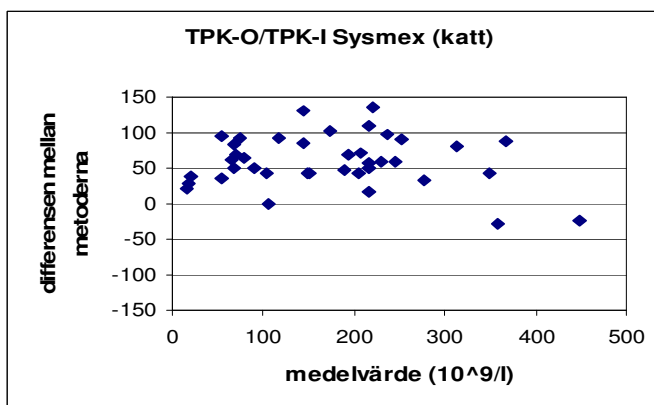
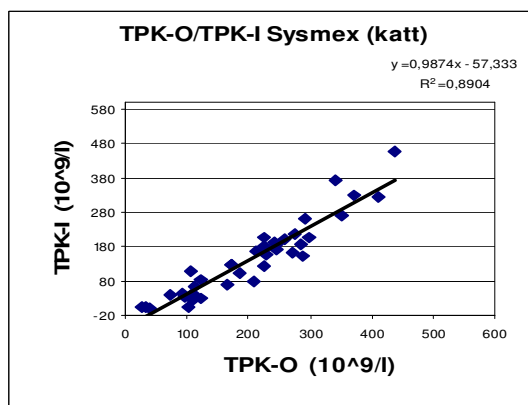
För kattproverna blev korrelationen $r^2 = 0,89$, men det var stora skillnader i nivåer. Flera kattprover hade trombocytvärden där antalet från impedansräkningen var från ca. $7-70 \times 10^9/l$ och motsvarande prov i den optiska räkningen gav mellan ca. $102-165 \times 10^9/L$. Flera andra kattprov hade också markanta skillnader mellan mätningarna (se figur 3). Detta resulterade i att de optiska värdena systematiskt låg i medeltal 40% högre än impedansvärdena (se figur 3).



Figur 1. Diagrammet till vänster visar det linjära sambandet mellan impedansräkningen och den optiska räkningen på Sysmex XT-2000iV (n=64). Till höger är en differensplot där medelvärdet för de två metoderna illustreras på x-axeln och differensen (optisk - impedans) mellan metoderna åskådliggörs på y-axeln.



Figur 2. Diagrammen visar det linjära sambandet respektive differensen (optisk - impedans) för häst (n=40) vid jämförelse av den optiska räkningen och impedansräkningen på Sysmex XT 2000iV. Resultaten för den optiska mätningen hos häst ligger i medeltal 16% lägre än impedansräkningen vilket framgår av differensplotten.



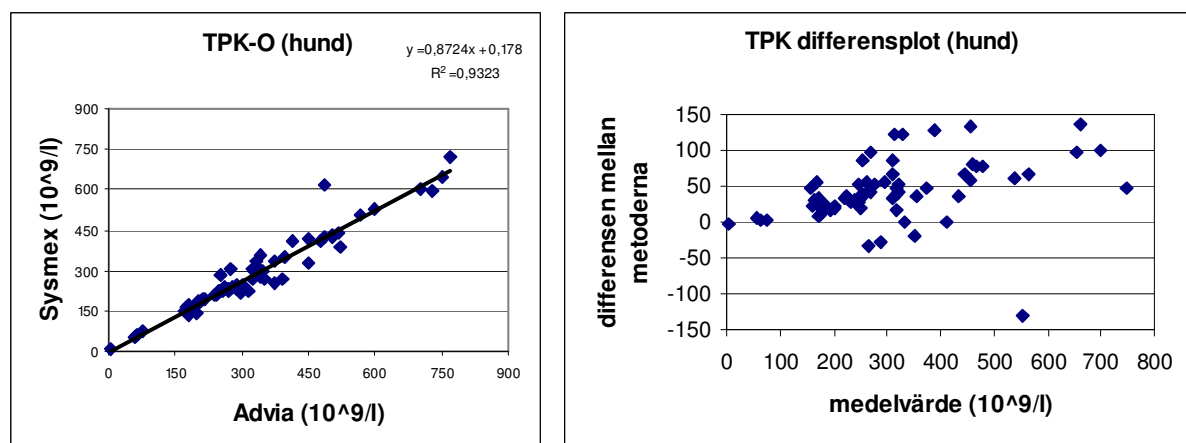
Figur 3. Diagrammen synliggör det linjära sambandet respektive differensen (optisk - impedans) för den optiska/impedansräkningen hos katt (n=39). Differensplotten visar att den optiska mätningen systematiskt ger högre värden (i medeltal 40%) än impedansräkningen.

TPK-O, MPV och PCT – jämförelse mellan instrumenten.

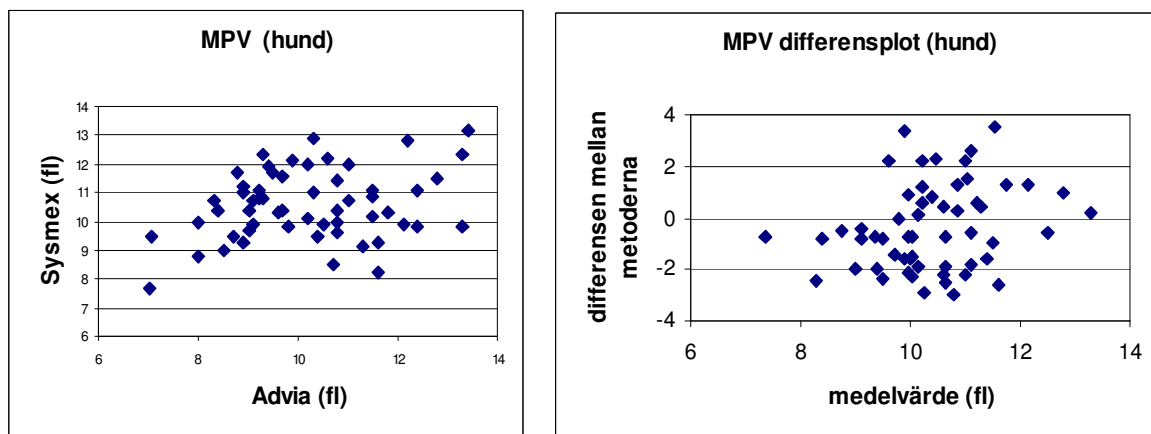
TPK-O, MPV och PCT jämfördes på Advia 2120 och Sysmex XT-2000iV och gav varierande resultat. För hundproverna överensstämde trombocytantalet väl och korrelationen r^2 blev 0,93. Ett hundprov avvek i kurvan med $488 \times 10^9/l$ enligt Advia 2120 och $619 \times 10^9/l$ enligt Sysmex XT-2000iV (se figur 4). Hundprovet som hade extremt lågt trombocytantal ($7 \times 10^9/l$) från Sysmex XT-2000iV hade enligt Advia 2120 $3 \times 10^9/l$, vilket tyder på en bra överensstämmelse även vid mycket låga värden i det enskilda fallet. Advia 2120 gav i medeltal 10% högre värden vid trombocyträkningen. Vid jämförelsen av MPV sågs ingen tydlig korrelation mellan instrumenten men medelvärde och median blev nästintill likvärdiga hos båda instrumenten (se tabell 1). PCT för hundproverna visade en bättre samstämmighet än vad MPV gjorde (se figur 5 och 6). Advia 2120 gav i medeltal 9% högre värden för PCT hos hundproverna.

Tabell 1. Tabellen visar data från Sysmex XT-2000iV (Sx) och Advia 2120 (Ad) för samtliga studerade parametrar hos hund.

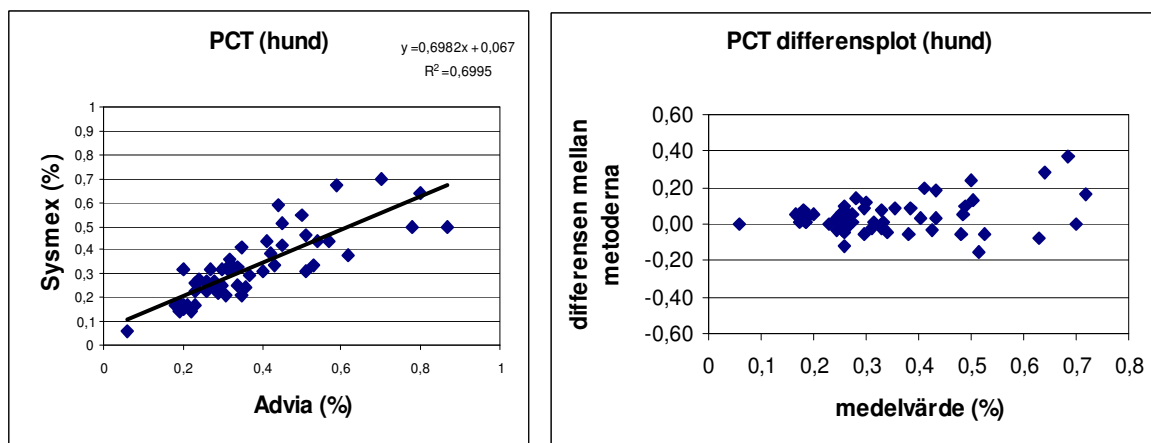
Parametrar, hund	Medelvärde \pm standardavvikelse	Median	Min	Max
Sx TPK-I ($\times 10^9/l$) n=64	286 \pm 146	250	2	705
Sx TPK -O ($\times 10^9/l$) n=64	289 \pm 146	251	7	723
Ad TPK-O ($\times 10^9/l$) n=64	331 \pm 162	302	3	769
Sx MPV (fl) n=56	10,6 \pm 1,20	10,4	7,7	13,2
Ad MPV (fl) n=56	10,4 \pm 2,0	10,3	7,0	19,2
Sx PCT (%) n=56	0,32 \pm 0,14	0,30	0,06	0,70
Ad PCT (%) n=56	0,34 \pm 0,17	0,31	0,06	0,87



Figur 4. Diagrammet till vänster visar det linjära sambandet mellan den optiska trombocyträkningen på Sysmex XT-2000iV och Advia 2120 (n=64). Till höger ses en differensplot (Advia - Sysmex) där det framgår att Advia 2120 överlag gav högre värden (10% högre i medeltal).



Figur 5. Diagrammet till vänster illustrerar sambandet mellan MPV för hund hos de båda instrumenten (n=56). Korrelationen blev inte alls bra, därför presenteras varken en trendlinje eller ekvation för linjariteten. I differensplotten till höger ser man en relativt stor spridning av värdena, inget instrument ligger markant högre eller lägre än det andra.

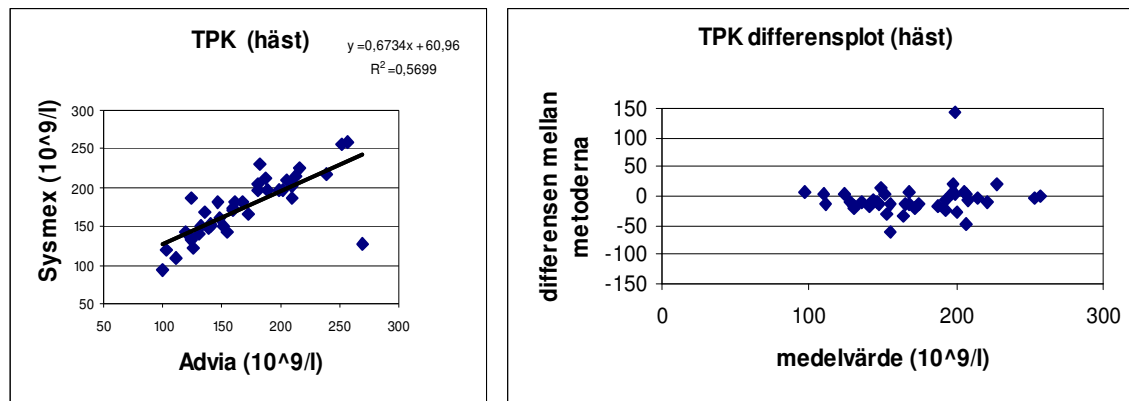


Figur 6. Diagrammet till vänster visar det linjära sambandet för PCT mellan instrumenten (n=56). Advia 2120 gav i medeltal 9% högre värden än Sysmex XT-2000iV vilket ses i differensplotten (Advia - Sysmex) till höger.

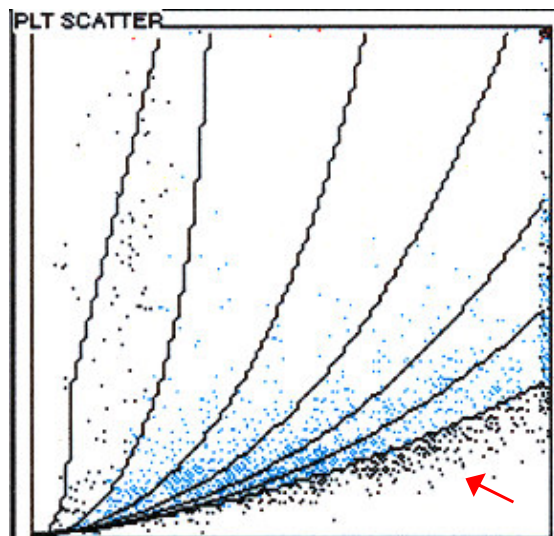
Hästproverna fick en korrelation (r^2) för trombocytantalet som låg på 0,57, vilket inte kan anses vara något bra resultat. En häst avviker ordentligt ur kurvan med TPK-O på $128 \times 10^9/l$ hos Sysmex XT-2000iV och $270 \times 10^9/l$ hos Advia 2120 (se figur 7). Advia 2120 gav i medeltal 5% lägre värden för trombocyträkningen. I trombocytytogrammet från Advia 2120 kunde man se att det systematiskt fanns en cellpopulation nedanför den gräns som avskiljer trombocytdistributionsområdet (se figur 8). Resultaten för MPV resulterade inte i någon linjär kurva (se figur 9), delvis på grund av den minimala spridningen. Men instrumenten var ändå relativt överrens då medelvärde och median jämfördes (se tabell 2). PCT-diagrammet liknade MPV:s distribution men med ett lite tydligare linjärt samband (se figur 10). Samma hästprov som avvek i kurvan för TPK-O visade även här stor differens i PCT mellan instrumenten. Sysmex XT-2000iV gav överlag högre PCT värden än Advia 2120 som i medeltal låg 25% lägre.

Tabell 2. Tabellen visar data från Sysmex XT-2000iV (Sx) och Advia 2120 (Ad) för samtliga studerade parametrar hos häst.

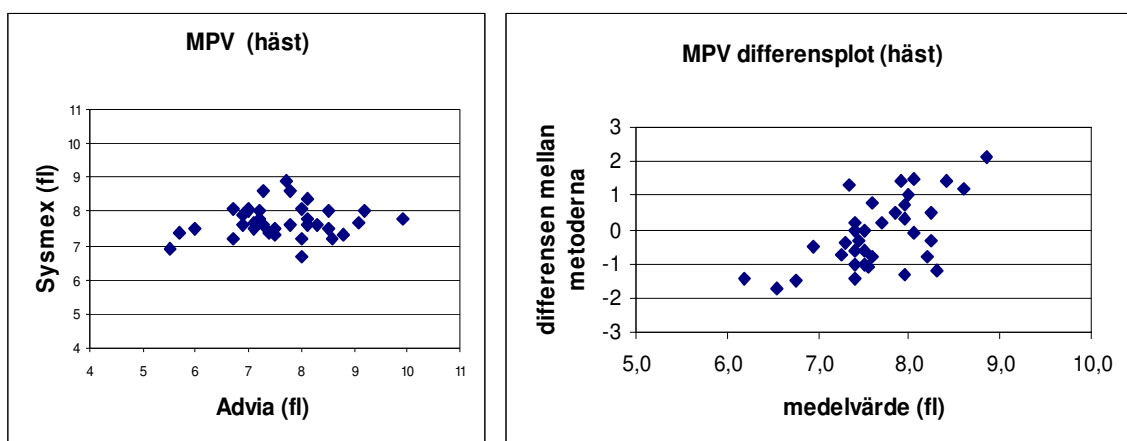
Parametrar, häst	Medelvärde ± standardavvikelse	Median	Min	Max
Sx TPK-I (10 ⁹ /l) n=40	202 ± 55	210	59	337
Sx TPK -O (10 ⁹ /l) n=40	175 ± 39	178	94	258
Ad TPK-O (10 ⁹ /l) n=40	169 ± 44	161	100	270
Sx MPV (fl) n=35	7,7 ± 0,47	7,6	6,7	8,9
Ad MPV (fl) n=35	7,6 ± 0,95	7,5	5,5	9,9
Sx PCT (%) n=35	0,16 ± 0,036	0,16	0,08	0,25
Ad PCT (%) n=35	0,13 ± 0,040	0,12	0,08	0,27



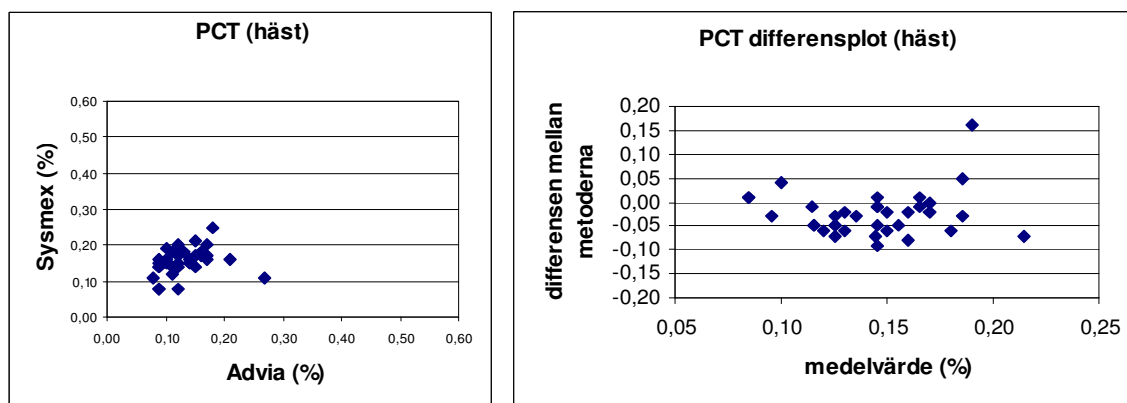
Figur 7. Diagrammet till vänster visar korrelationen för TPK-O mellan instrumenten (n=40). Till höger visas en differensplot (Advia - Sysmex) där värdena oftast ligger nära noll-strecket. Advia 2120 gav i medeltal 5% lägre värden än Sysmex XT2000iV.



Figur 8. Cytogrammet visar trombocytdistributionen hos häst från Advia 2120. De blå punkterna är trombocyter. Den röda pilen visar på en cellpopulation (svarta punkter) som hamnat utanför cytogrammets avgränsningslinje.



Figur 9. Diagrammen ovan visar det linjära sambandet (vänstra) respektive differensen (högra) mellan instrumenten för MPV hos häst (n=35). Differensplotten antyder ett systematiskt fel.

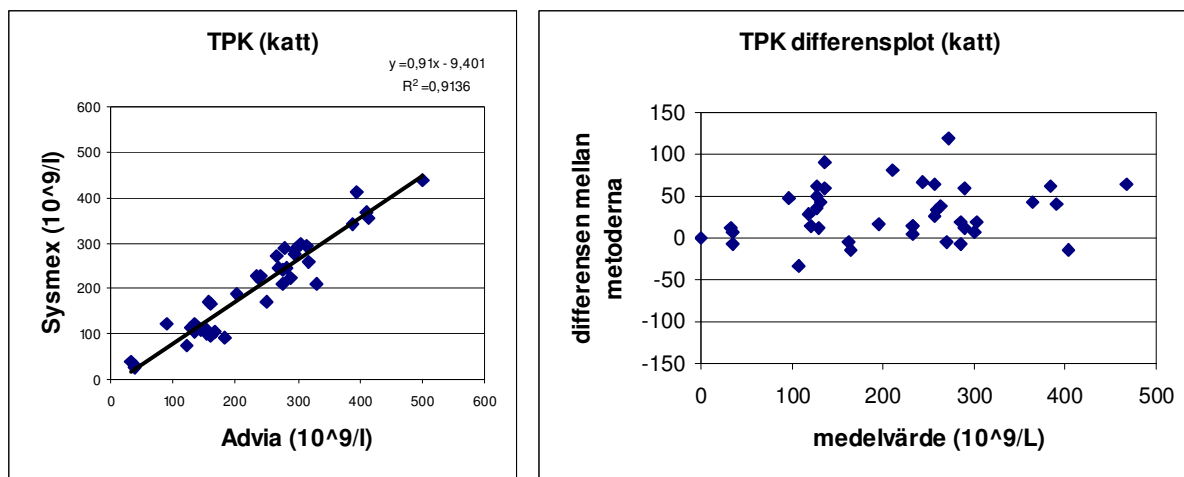


Figur 10. Diagrammet till vänster anger korrelationen mellan Advia 2120 och Sysmex XT-2000iV för PCT hos häst (n=35). Differensplotten (Advia – Sysmex) till höger uppmärksammar det faktum att Advia 2120 i medeltal gav 25% lägre värden än Sysmex XT-2000iV.

Vid analys av kattblod på Sysmex XT-2000iV så erhöles inga värden för varken MPV eller PCT eftersom de parametrarna baseras på impedanstekniken och alla kattprover gav upphov till onormala TPK-I histogram. Därför kunde endast TPK-O mellan instrumenten jämföras. Korrelationen (r^2) för TPK-O blev 0,91 (se figur 11) vilket var ett bra resultat. Advia 2120 visade i medeltal 13% högre TPK-O värden än Sysmex XT-2000iV. MPV- och PCT-värdena från Advia togs med i tabell 3.

Tabell 3. Tabellen visar data från Sysmex XT-2000iV (Sx) och Advia 2120 (Ad) för samtliga studerade parametrar hos katt.

Parametrar, katt (n=39)	Medelvärde ± standardavvikelse	Median	Min	Max
Sx TPK-I ($\times 10^9/l$)	142 ± 110	128	1	459
Sx TPK-O ($\times 10^9/l$)	202 ± 105	212	27	436
Ad TPK-O ($\times 10^9/l$)	233 ± 110	240	31	500
Ad MPV (fl)	16,7 ± 5,3	15,3	9,1	31,5
Ad PCT (%)	0,34 ± 0,13	0,33	0,07	0,63



Figur 11. Diagrammen ovan åskådliggör det linjära sambandet (vänstra) och differensen (högra) mellan instrumenten för TPK-räkning hos katt (n=39). I differensplotten (Advia - Sysmex) kan man se att Advia 2120 gav högre värden (i medeltal 13%).

Ljuskroskopisk bedömning av blodutstryk från hund och häst med avvikande cytogram eller flaggor, samt alla utstryk från katt.

Advia 2120 har ett system där instrumentet känner av om det finns trombocyttaggregat i provet. Om mer än 150 händelser registreras i regionen PLT clumps i peroxidascytogrammet kommer det upp en flagga (PLT-CLM) som uppmärksammar detta. Aggregaten måste vara stora som en lymfocyt (\varnothing 6-18 μm) för att överhuvudtaget inkluderas i aggregaträkningen. (Sysmex XT-2000iV har inget larm för trombocyttaggregat.)

Bland de 64 proverna från hund flaggade Advia 2120 för förekomst av aggregat i ett enda fall. Blodutstryket från det provet studerades noggrant, men endast ett litet aggregat hittades i fransen innehållandes >10 trombocyter. Utstryken från tre andra prover med avvikande cytogram granskades och i alla utstryken sågs aggregat. I ett av proverna var fransen full med aggregat, närmare 25 stycken med >50 trombocyter i varje. I de andra två proverna fanns det 8 aggregat med >50 trombocyter respektive 2 aggregat med <50 trombocyter samtliga fynd gjordes i fransen på blodutstryket.

Tre prover från häst gav PLT-CLM-larm. I ett av dessa fanns ett aggregat med <50 trombocyter och ett aggregat med >50 trombocyter, båda i fransen. De andra två proverna innehöll inga aggregat förutom två små (<10 trombocyter) i monolagret. Ett av de andra hästproverna med avvikande impedanskurva visade sig ha rikligt (okvantifierbart) med stora aggregat i hela fransen.

I kattproverna såg fördelningen lite annorlunda ut. Samtliga PLT-CLM, PLT-CL och L-PLT-flaggor finns samlade i tabell 4 där de är relaterade till aggregatantalet/omfattningen vid respektive larm. Den mikroskopiska granskningen av utstrykens frans visade sig ge mest relevant information om aggregatutbredningen varför de enstaka fynd som gjordes i monolagret ej redovisas. Av de 39 proverna från katt studerades 37 blodutstryk, ett av de två andra saknades och det resterande var ej möjligt att bedöma då det förekom hemolys samt färgningsartefakter.

Tabell 4. Tabellen visar sambandet mellan aggregatförekomst och stora trombocyter hos katt relaterat till utlösta trombocytalarm hos Advia 2120; PLT-CLM: morfologiflagga, PLT-CL: systemflagga, L-PLT: stora trombocyter. Antalet och storleken på trombocyttaggregaten bedömdes i ljusmikroskop och sedan klassificerades de enligt en subjektiv skala från 0 - 4+, där 0 = 0 aggregat och 4+ = okvantifierbart antal aggregat. De proven med den allvarligaste graden av trombocyttaggregering (4+) hade samtliga utlöst flaggor och i de allra flesta fall följdes de tre flaggorna åt.

Larm från Advia 2120		Manuell bedömning av trombocyttaggregat				
Flagga	Totalt (% av 37 katter)	0 (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	4+ (%)
PLT-CL	43					100
PLT-CLM	46					100
L-PLT	38	7		7		86
Ingen flagga	49	50	11	11	28	

L-PLT-flaggor från Advia 2120 hos hund och häst.

För 15 av de 64 hundproverna (23%) indikerade Advia 2120 förekomst av stora trombocyter genom att visa flaggan L-PLT. Majoriteten av hundproverna hade endast ett plustecken (10,0-11,9% av trombocytantalet är större än 20fl) tillsammans med flaggan. Inget av hästproverna gav upphov till någon L-PLT-flagga

Precisionstest på Sysmex XT-2000iV.

Variationskoefficienten uttryckt i procent för respektive djurslag och parameter finns sammanställda i tabell 5. Sysmex XT-2000iV visade sig ha bäst precision för TPK-O i hundproverna och MPV genererade även ett utmärkt CV% hos proverna från häst. Ett precisionstest för trombocyträkning i kattprover hade körts tidigare under en annan studie så det materialet fanns redan på laboratoriet. TPK-I för kattproverna gav det högsta CV-värdet på 19,9%.

Tabell 5. Tabellen visar precisionen hos Sysmex XT-2000iV för de studerade parametrarna, uttryckt som variationskoefficienten (CV) uttryckt i procent. Samtliga analyserade prover hade normala trombocytparametrar

Parameter	CV% för hund (n=9)	CV% för häst (n=10)	CV% för katt (9)
TPK-I ($10^9/l$)	3,0	3,2	19,9
TPK-O ($10^9/l$)	2,1	4,7	4,4
MPV (fl)	2,6	1,9	
PCT (%)	6,1	3,2	

DISKUSSION

Den optiska räkningen och impedansräkningen av trombocytantalet på Sysmex XT-2000iV visade en utmärkt överensstämmelse för hundproverna. När den optiska räkningen jämfördes mellan Advia 2120 och Sysmex XT-2000iV korrelerade resultaten väl även där, men Advia 2120 gav systematiskt högre värden.

Korrelationen för trombocyträkning i hästproverna blev inte bra när TPK-I/TPK-O jämfördes inbördes på Sysmex XT-2000iV eller när TPK-O jämfördes mellan de olika instrumenten. Sannolikt berodde det på att spridningen i trombocytantal mellan hästproverna var relativt snäv. För hästproverna gav båda instrumenten TPK-O värden på mellan 100-

$270 \times 10^9/l$ (se figur 7), till skillnad från både hund- och kattproverna som har en betydligt bredare spridning med höga samt låga värden. Vid analys av hästproverna fick Sysmex XT-2000iV:s optiska trombocyträkning i medeltal 16% lägre värden jämfört med impedansräkningen. Det kan ha berott på att små erythrocyter inkluderades i impedansmätningen och därför gav ett falskt högt trombocytantal. När impedanshistogrammen studerades hade 40% av dem en inkorrekt kurva (se figur 12). I cytogrammen från den optiska mätningen på Sysmex XT-2000iV sågs en tydlig uppdelning mellan erythrocyter och trombocyter (se figur 13). I trombocytcytogrammen från Advia 2120, för hästproverna, kunde man se en cellpopulation nedanför den linje som avgränsar trombocyternas distributionsområde (se figur 8) Eftersom detta förekom systematiskt på i stort sett alla prover från häst var orsaken sannolikt den att inställningarna för trombocyträkning hos häst inte var optimala utan borde justeras. Detta kan vara anledningen till att Sysmex XT-2000iV i 67% av proverna ger högre TPK-O värden än Advia 2120. Advia 2120 missar sannolikt trombocyter som ligger nedanför distributionsområdet i cytogrammet.

Resultaten från jämförelsen av MPV i hund- och hästproverna gav ingen bra korrelation, men en relativt liten variation mellan individerna noterades. De flesta värdena för hundproverna låg runt 10fl (se tabell 1) och runt 7,6fl för hästproverna (se tabell 2) vilket bidrog till att kurvan inte blev bra. Här har det faktum att instrumenten har lite olika system för att räkna fram MPV också betydelse. Sysmex XT-2000iV räknar ut MPV från impedansmätningen genom att ta PCT dividerat med $TPK \times 10^9/l$ och sedan multiplicera resultatet med 1000. Hos Advia 2120 tas MPV fram som medelvärdet av det tvådimensionella trombocytvolymhistogrammet. Alltså finns det väsentliga skillnader i tillvägagångssättet som kan ha gjort att resultaten från instrumenten inte överensstämmer.

Det har visats att en ökning av MPV kan indikera att trombocytproduktionen är stegrad. Men trots att MPV oftast erhålls från de flesta befintliga hematologiinstrument så kan det bli problematiskt då blodprov från kraftigt trombocytopeniska individer analyseras [Kickler m.fl. 2006]. En av hundarna som ingick i studien led av kraftig trombocytopeni. När det blodprovet analyserades på Sysmex XT-2000iV uteblev både MPV och PCT. Detta beror på att trombocytantalet i trombocytopeniska prover är så lågt att histogrammet från impedansmätningen blir inkorrekt och MPV och PCT kan därmed inte beräknas [Kickler m.fl. 2006, Zelmanovic och Hetherington 1998]. Advia 2120 klarade av att räkna fram MPV och bestämde det till 13,5fl, vilket ligger några enheter högre än medelvärdet (10,4fl) för hundproverna. Frågan är dock hur pålitligt värdet är vid så låga trombocytantal ($3 \times 10^9/l$).

MPV blev snarlik för alla de 40 hästproverna, variationen var väldigt liten med endast två enheters skillnad på Sysmex XT-2000iV och fyra enheters skillnad på Advia 2120. Hästarna som ingick i studien var drabbade av olika sjukdomstillstånd varav några troligen kunnat påverka MPV. Med hänsyn till detta resonemang kan MPV:s kliniska relevans för hästar ifrågasättas.

Korrelationen för PCT i hund- och hästproverna var något bättre än för MPV vilket delvis kan bero på att värdena hade en större spridning. Advia 2120 räknar ut PCT enligt följande: $PCT = TPK \times MPV / 10\ 000$. Sysmex XT-2000iV analyserar PCT på samma sätt som erythrocytvolymfractionen (EVF).

I denna studie utvärderades både impedansanalysen och den flödescytometriska metodiken på Sysmex XT-2000iV vid trombocyträkning. Impedanstekniken har en del brister som blir extra tydliga vid analys av katttrombocyter eftersom de till en del utgörs av makrotrombocyter [Norman m.fl. 2001]. Värdena från impedansmätningen hos Sysmex XT-2000iV var i medeltal 40% lägre än de som erhöles från den optiska mätningen. Det beror till stor del på att impedanstekniken fallerar när stora trombocyter finns i provet. Instrumentet utesluter de stora trombocyterna ur räkningen eftersom de överskrider apparaturens mätintervall för trombocyter. Vid impedansmetoden på Sysmex XT-2000iV klassas trombocyterna som stora

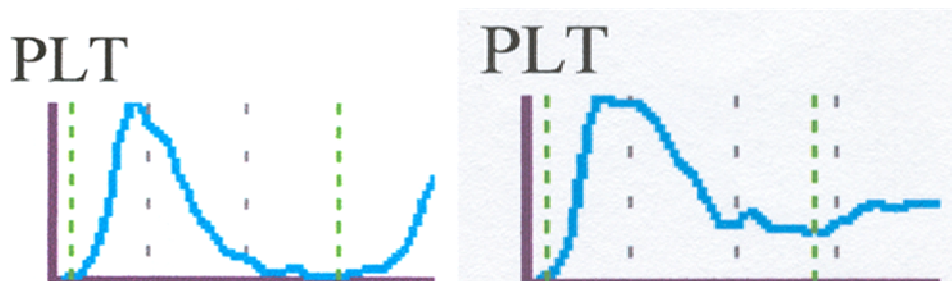
då de har en volym på 12fl till 30fl [Briggs m.fl. 2007]. Den optiska metoden på Sysmex XT-2000iV identifierar även mycket stora trombocyter. Advia 2120 räknas alla trombocyter mellan 20 och 60fl som stora. Trombocytantalet blir falskt lågt när trombocyttagregat finns i provet, vilket är mycket vanligt hos katt. I prover med små erythrocyter/erythrocytfragment kan TPK-antalet bli falskt högt då dessa felaktigt tas för trombocyter. [Briggs m.fl. 2000, Briggs m.fl. 2007, Norman m.fl. 2001].

Korrelationen för TPK-O i kattproverna mellan instrumenten blev bra med tanke på de svårigheter som finns vid analys av denna parameter. Advia 2120 gav i medeltal 13% högre värden än TPK-O från Sysmex XT-2000iV. Av de 40 kattprover som ingick i studien kunde 37 blodutstryk bedömas. 46% av dessa innehöll en så stor mängd aggregat att dessa ej gick att kvantifiera, samtliga utlöste också larm på Advia 2120. 24% av proverna innehöll aggregat men framkallade inga larm, några av dessa innehöll så pass stora aggregat eller många mindre att de kraftigt påverkat analysresultatet och ett falskt lågt värde hade sannolikt svarats ut. Sensitiviteten hos PLT-CLM – flaggan borde således förbättras, men problemet däri ligger i svårigheten att avgöra var detektionsgränsen skall dras.

Man har sett att trombocyttagregat finns i minst 50% av de blodprover som tas på katt [Norman m.fl. 2001] och andra studier har genererat siffror på 66,6% [Zelmanovic och Hetherington 1998] och 56% [Byrne m.fl. 1994]. I 70% av de färskas proverna från katterna i vår studie fanns aggregat i varierande utsträckning, en siffra som ligger nära resultatet som Zelmanovic och Hetherington erhöll.

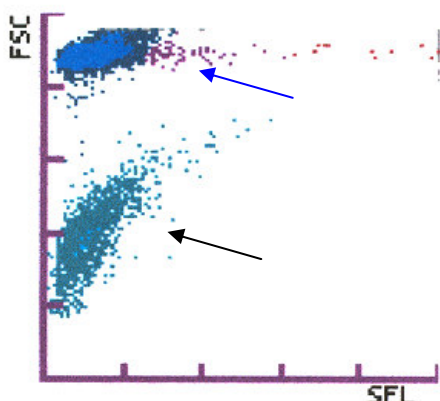
Bland hund- och hästproverna granskades endast blodutstryken från de prover där antingen ett larm eller cytogram indikerat trombocyttagregat (se figur 14) Ett prov från respektive djurslag, med avvikande cytogram, innehöll trombocyttagregat i sådan omfattning att det definitivt hade påverkat provsvaret men inget larm förekom. De övriga proverna från hund (1 av 64) och häst (3 av 40) som gav PLT-CLM-flaggor innehöll få aggregat. Koplitz m.fl. genomförde en studie på hund och kom fram till att trombocyttagregat inte är homogent fördelade i blodprov. Storleken på aggregaten i utstryken skiftar från små betydelselösa aggregat till tydliga stora klumpar och koncentrationen varierar också mellan utstryk från samma blodprov [Koplitz m.fl. 2001]. Med ovanstående resultat i åtanke kan man inte utesluta att hundprovet och eventuellt hästproverna som Advia 2120 flaggade för innehöll aggregat i större uträkning än vad som kunde konstateras utifrån ett enda utstryk.

Precisionstestet som utfördes på Sysmex XT-2000iV gav godtagbara CV%-värden för samtliga parametrar utom just impedansräkningen hos katt. CV-värdet för impedansräkningen låg på 19,9% till skillnad mot 4,4% från den optiska räkningen. Dessa resultat var förväntade och bekräftar ytterligare den problematik som uppstår när impedansteknik används vid analys av katttrombocyter.

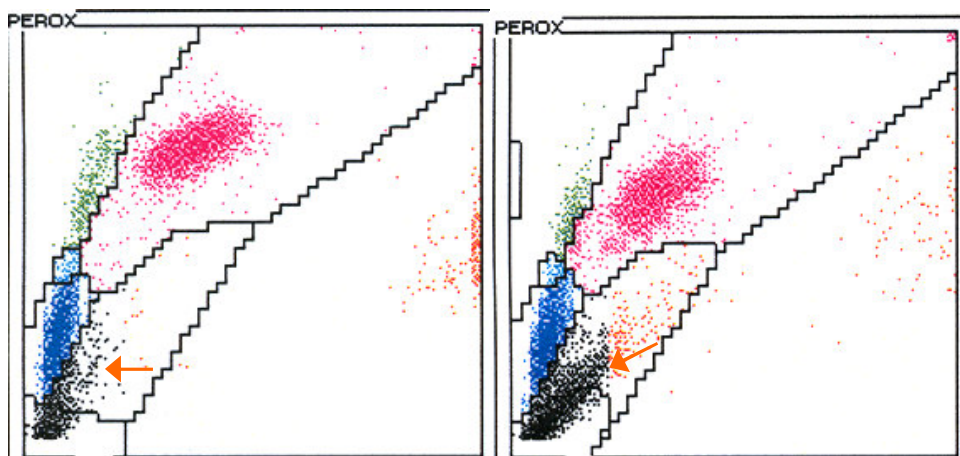


Figur 12. Figuren till vänster föreställer ett impedanshistogram från Sysmex XT-2000iV med normalt utseende. Kurvan till höger går inte ända ner i botten vilket bland annat kan bero på att provet innehåller stora trombocyter och/eller mikrocytära erythrocyter.

PLT-O



Figur 13. Figuren föreställer ett trombocytcytogram från Sysmex XT-2000iV som erhålls från den optiska räkningen. Den blåa pilen pekar på erythrocyterna och den svarta visar på trombocyterna. Det är en tydlig avgränsning mellan cellpopulationerna och trombocyterna ligger fint samlade.



Figur 14. Figuren föreställer två peroxidascytogram (häst) från Advia 2120 där leukocyterna delas in efter respektive sort. Den orangea pilen pekar på troliga trombocytaggregat (svarta punkterna).

Sammanfattningsvis överensstämde trombocyträknigen väl för hund och katt vid jämförelsen mellan den optiska trombocyträknigen från Sysmex XT-2000iV och Advia 2120, även om värdena systematiskt blev högre på Advia 2120. Hästproverna betedde sig lite annorlunda vid jämförelsen av trombocyträknigen mellan instrumenten, något som sannolikt kan avhjälpas om inställningarna hos Advia 2120 justeras. Eftersom trombocyträknigen är kliniskt viktigast bland de studerade parametrarna var det positivt att TPK-O räkningen från bägge instrumenten visade en god överensstämmelse. Vad gäller PCT och MPV var resultaten inte lika entydiga. Där skiljer också tillvägagångssättet för bestämning av parametrarna väsentligt mellan instrumenten. Det var svårt att dra några slutsatser om MPV:s och PCT:s betydelse för den rutinmässiga diagnostiken. De skulle sannolikt behöva studeras utförligare under en längre tid med djur från olika sjukdomsgrupper inkluderade.

För kattprover kan Advia 2120 vara ett bra val ur trombocyträknings synpunkt då instrumentet indikerar förekomst av trombocytaggregat. Men på grund av katttrombocyternas högfrekventa aggregeringstendens går det inte att helt lita på de värden som erhålls från en

trombocyträkning, oavsett vilken metod som använts [Tvedten och Korcal 2001]. En förutsättning för att Advia 2120 ska fungera för katttrombocyter är att sensitiviteten på PLT-CLM-flaggan förbättras så att användaren kan vara säker på att alla prover med omfattande trombocyttaggregering uppmärksammas. Tills dess bör alla utstryk från katt granskas så inga prover med omfattande aggregering släpps igenom. När provresultaten från prover (oavsett djurslag) med omfattande aggregering skall svaras ut bifogas alltid en kommentar där det framgår att trombocytantalet är falskt lågt på grund av aggregatförekomst.

ACKNOWLEDGEMENTS

Jag vill först och främst rikta ett stort tack till min handledare, Inger Lilliehöök, som trots sina många åtaganden tagit sig tid att besvara mina frågor och funderingar samt har guidat mig rätt i skrivandeprocessen. Jag vill också tacka all personal på kliniskt kemiska laboratoriet på Universitetsdjursjukhuset som med sitt trevliga bemötande alltid fick mig att känna mig välkommen.

REFERENSER

- Allegrezza-Giulietti A, Serretti R, Beccerica E et al (1991) Platelet release products modulate some aspects of polymorphonuclear leukocyte activation. *Journal of Cellular Biochemistry* **47** 242-250
- Beyan C, Kaptan K, Ifran A (2006) Platelet count, mean platelet volume, platelet distribution width, and plateletcrit do not correlate with optical platelet aggregation responses in healthy volunteers. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* **22** 161-164
- Bertazzolo W, Comazzi S, Sesso L et al (2007) Comparison of methods for determining platelet numbers and volume in Cavalier King Charles spaniels. *The Journal of Small Animal Practice* **48** 556-561
- Briggs C, Harrisson P, Machin J (2007) Continuing developments with the automated platelet count. *International Journal of Laboratory Hematology* **29** 77-91
- Briggs C, Harrison P, Grant D et al (2000) New quantitative parameters on recently introduced automated blood cell counter – the XE 2100™. *Clinical and Laboratory Haematology* **22** 345-350
- Byrne RF, Andrews CM, Libretto SE et al (1994) Canine and feline haematology analysis: comparative performance of Technicon H*1 and AVL MS8 VET analysers. *Comparative Haematology International* **4** 212-217
- Cowan SM, Bartges JW, Gompf RE et al (2004) Giant platelet disorder in the Cavalier King Charles spaniel. *Experimental Hematology* **32** 344-350
- Flad HD, Härter L, Petersen F (1997) Regulation of neutrophil activation by proteolytic processing of platelet-derived alpha-chemokines. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **421** 223-230

- Kaito K, Otsubo H, Usui N et al (2004) Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* **128** 698-702
- Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ (2006) A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *American Journal of Clinical Pathology* **125** 282-287
- Koplitz SL, Scott MA, Cohn LA (2001) Effect of platelet clumping on platelet concentrations measured by use of impedance or buffy coat analysis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **219** 1552-1556
- Lunn DP, Holmes MA, Antczak DF (1998) Equine leukocyte antigens II. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **62** 99-183
- Macey MG, Carty E, Webb L et al (1999) Use of mean platelet component to measure platelet activation on the Advia 120 haematology system. *Cytometry* **38** 250-255
- Mackin A (1995) Canine immune-mediated thrombocytopenia. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* **17** 353-362
- Meyer KM (1985) Pathobiology of animal platelets. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* **30** 131-165
- Norman EJ, Barron RCJ, Nash AS et al (2001) Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Veterinary Clinical Pathology* **30** 137-140
- Pedersen HD, Häggström J, Olsen LH et al (2002) Idiopathic asymptomatic thrombocytopenia in Cavalier king charles spaniels is an autosomal recessive trait. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **16** 169-173
- Saxon BR, Mody M, Blanchette VS et al (1998) Reticulated platelet counts in the assessment of thrombocytopenic disorders. *Acta Paediatrica Supplement* **424** 65-70
- Tasker S, Cripps PJ, Mackin AJ (1999) Estimation of platelet counts on feline blood smears. *Veterinary Clinical Pathology* **28** (2) 42-45
- Tasker S, Cripps PJ, Mackin AJ (2001) Evaluation of methods of platelet counting in the cat. *Journal of Small Animal Practice* **42** 326-332
- Tvedten H, Korcal D (2001) Vortex mixing of feline blood to disaggregate platelet clumps. *Veterinary Clinical Pathology* **30** 104-106
- Wilkerson MJ, Shuman W (2001) Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. *Veterinary Clinical Pathology* **30** 107-113
- Willis TB, Wardrop KJ (2008) Pseudothrombocytopenia secondary to the effects of EDTA in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* **44** 95-97

Zelmanovic D, Hetherington J (1998) Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Veterinary Clinical Pathology* **27** (1) 2-9