

Passer konsensusreglene fra ISLH for norske laboratorier?

INTERNATIONAL Society for Laboratory Hematology (ISLH) har laget et sett regler for validering av prøvesvar fra hematologimaskiner og morfologiske funn i utstryk. Men hvor godt passer disse reglene for norske laboratorier?

Av **MARTHE WEDØ AUNE**, bioingeniør og seksjonsleder ved Seksjon for hematologi og immunologi, Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin, St Olavs Hospital, Trondheim

Et automatisert hematologiinstrument vil, avhengig av instrumenttype, rapportere fra 8 til 256 parametere per prøve som analyseres. Dette betyr at det produseres en stor mengde informasjon som bioingeniører må ta stilling til - både rekvirerte og ikke rekvirerte parametere. Alle laboratorier bør ha regler for hvordan resultatene skal behandles. Noen resultater må verifiseres med korrigerende tiltak før svar kan rapporteres. Tallverdier, flagg eller abnormale funn i scatterplot kan medføre at analyseresultatene må verifiseres ved reanalyse i samme type instrument, reanalyse i instrument med annen teknologi, manuell telling i mikroskop, manuell hemoglobin eller vurdering av utstryk i mikroskop.

Behov for standardisering

Det har i mange år vært behov for en standardisering og utarbeidelse av felles regler for hvordan analyseresultater fra hematologiinstrumenter skal håndteres. Per dags dato fins det ingen nasjonale standarder eller regler som laboratoriene i Norge automatisk kan implementere. Hvert enkelt laboratorium utarbeider derfor sine egne regler - eller de tilpasser andres til eget bruk.

International Society for Laboratory Hematology (ISLH) grep fatt i behovet for retningslinjer. Den nå avdøde grunnleggeren, Berend Houwen, inviterte 20 eksperter fra 17 laboratorier i seks land (USA, Canada, Storbritannia, Australia, Spania, Sveits) til et møte våren 2002 (1). Målet var å utarbeide kriterier for hvilke resultater for Complete Blood Count (CBC) og differensialtelling (DIFF) som skulle holdes tilbake/valideres med andre metoder før verifisering av svar.

83 regler ble utarbeidet ved konsensus og deretter testet av 15 laboratorier i totalt 13 298 blodprøver (2). Det ble laget blodutstryk av alle prøvene for å verifisere/avkrefte funn i analyseinstrumentene. Etter en detaljert analyse av alle dataene fra de analyserte prøvene, ble reglene gjennomgått, justert og konsolidert. Resultatet ble 41 konsensusregler (tabell 1) (3). Reglene omfatter analyse av første prøve av pasienten i tillegg til "deltaregler" for prøver tatt og analysert av samme pasient innen 72 timer. "Deltareglene" går ut på at man sjekker resultatet mot forrige resultat fra samme pasient og setter inn en prosentgrense som aksepteres uten at alarmer går. Oppfølgende tiltak for verifisering av svar er i hovedsak vurdering av blodutstryk (tiltak for 29 av 41 regler).

I tillegg ble det utarbeidet en liste over hvilke funn i utstryk som skulle regnes som positive. Det vil si bekreftede tallverdier eller flagg fra analyseinstrumentene (tabell 2 og 3).

Norske forhold

Norske laboratorier skiller seg fra laboratorier i andre land ved at vi har instrumentering med to eller flere forskjellige teknologier. Det gir oss mulighet til å reanalysere abnormale prøver med annen type teknologi for å bekrefte/avkrefte funn.

For inntil fem - ti år siden var økonomien i norske laboratorier så god at det ved nyanskaffelser var vanlig å kunne velge instrumentering etter faglige begrunnelser. Det er ikke lenger tilfelle.

Autovalideringssystemer hvor valideringsregler er definert av instrumentleverandør og/eller laboratoriet selv, er tatt i bruk av cirka 25 norske laboratorier. Bruk av autovalideringssystem tvinger seg fram av flere årsaker; akkreditering, krav til standardisering og en stadig mer presset økonomi. Med autovalidering trenger en langt færre bioingeniører til å drifte hematologiinstrumentene, samtidig som en oppnår standardisert svarbehandling 24 timer i døgnet, sporbarhet og betydelig kortere svartider.

Det finnes to modeller for konsolidering; - *Instrumenter med én type teknologi*. Korrigerende tiltak for verifisering av prøvesvarene vil være vurdering av utstryk og manuell telling. Det må settes av ressurser til validering av resultatene i utstrykene og eventuelt andre manuelle metoder. Dette er den vanligste konsolideringsmodellen både i og utenfor Norge.

–*Eklektisk modell.* Man har ett hovedanalyse-system med autovalidering hvor alle prøvene analyseres. Regler fra autovalideringssystemet stopper verifisering av svar ut fra definerte regler. Prøvene reanalyseres med annen teknologi etter gitt prøveflytsmodell styrt via en mellomvareløsning koblet til hovedanalyseinstrumentet. Mindre enn to prosent av prøvene valideres med utstryk. Denne modellen, som benyttes ved enhet for hematologi ved St. Olavs hospital, er meget effektiv.

Passer reglene for norske forhold?

ISLH-reglene er ganske generelle og ikke veldig spesifikke med hensyn til alder og kjønn. Den største begrensningen og utfordringen er at 29 av dem innebærer vurdering av utstryk. En del norske laboratorier mangler bioingeniører og/eller leger med tilstrekkelig morfologisk kompetanse til å bekrefte/avkrefte funn fra analysemaskiner i utstryk. Dette bør utdanningsinstitusjonene og BFI se på som en utfordring med tanke på etter- og videreutdanning av bioingeniører. Under er en del av reglene listet opp. Det er kommentert hvilke tiltak vi praktiserer ved St. Olavs hospital.

Regel 1: Lage utstryk på første prøve av alle for tidlig fødte.

Kommentar: Vi anser det som unødvendig dersom WBC (leukocytantall) ikke er abnormt lavt eller høyt og scattergram er normalt etter alder. Prøven analyseres i et instrument med NRBC-kanal og eventuelt i lyseresistent mode.

Regel 5. WBC <4,0 og >30,0. Første prøve av pasienten. Utstryk lages og vurderes.

Kommentar: Ved WBC >30,0 lages utstryk automatisk i utstrykmaskinen. Prøven reanalyseres også med komplementær teknologi. Etter at prøven er reanalyserert, vurderes det om det skal gjøres manuell DIFF-telling. NORIPs referanseområde for WBC er $3,5 - 8,8 \times 10^9/L$.

Vi benytter en grense på <3,0 med hensyn til validering av WBC. Da rapporterer vi resultatet til rekvirenten og vi tilleggsrekvirerer DIFF hvis pasienten er ukjent. Utstryk blir kun laget og vurdert hvis DIFF eller scatterplott er abnormale eller det flagges for blaster/umodne celler. Gjennomgang av en dags produksjon viser at ca 5-10 prosent av prøvene har WBC <4,0. Dette ville gitt vurdering av mellom 38 - 75 utstryk per dag (arbeid for to bioingeniører én dag) hvis vi hadde fulgt reglene.

Regel 6. WBC <4,0 og >30,0. Utstryk lages hvis deltasjekk slår ut og prøven er tatt innen 72 timer etter første prøve.

Kommentar: Vi benytter grensene <3,0 og >30,0 og deltasjekk +/- 15 prosent i forhold til forrige prøve. Dette fører til reanalyse med DIFF og deretter tillaging

av utstryk hvis abnormt scatter eller WBC <1,0. Dette generer mindre enn fem utstryk per dag.

Regel 7. PLT <100 og >1000: Vurder i utstryk.

Kommentar: PLT <100 bør alltid sjekkes i utstryk med hensyn til aggregering og pseudotrombocytopeni hvis pasienten er ukjent. Dette er nå standard ved mange norske laboratorier. PLT >1000: Her er reanalyse i samme instrument eller komplementær teknologi naturlig før eventuelt utstryk lages og vurderes.

Regel 9. Hgb <7g/dl eller >2g/dl over øvre referansegrense for kjønn og alder og første prøve. Vurder i utstryk og sjekk prøvens bestandighet.

Kommentar: Her bør det sjekkes om prøven er tatt riktig (tilblending av f. eks intravenøs væske ved prøvetaking?). Reanalyse i samme instrument eller i Advia 120/2120 for vurdering av RBC-scatter. Resultatene vurderes totalt. Deretter vurderes tillaging og vurdering av utstryk.

Regel 10: MCV <75 eller >105. Første prøve. Vurder i utstryk.

Kommentar: Våre grenser er: MCV <79,4 eller >102,4; resultatene rapporteres hvis pasienten er ukjent. Reanalyse i Advia 120/2120 hvis ekstremt lave eller høye MCV-verdier. Vurdering av RBC-scatter. Utstryk vurderes ved ekstreme MCV-verdier.

Regel 11: MCV >105 og prøven er >24 timer gammel. Vurder i utstryk med henblikk på makrocytære endringer - be eventuelt om fersk prøve.

Kommentar: I analyseinstrumenter med optiske målemetoder vil MCV-verdiene være 6 - 8 prosent falskt for høye 24 timer etter prøvetaking og 13 - 16 prosent falskt for høye etter 48 timer (hvis oppbevart i romtemperatur). Vurdering i utstryk har liten verdi. Hvis prøven er >14 timer og oppbevart ved romtemperatur: Prøven reanalyseres i impedanseinstrument som har relevant teknologi (og reagenser) og hvor MCV er holdbar. Alternativt be om fersk prøve.

Regel 13: MCHC > 2 g/dl over referansegrense. Sjekk lipemi, hemolyse, agglutiner, sfærocytter.

Kommentar: I mange norske laboratorier er det satt en grense på 37 g/dl for sjekk mht. lipemi, hemolyse, agglutiner og sfærocytter. Dette er satt ut fra referanseverdiene hos voksne. Her bør det differensieres noe ut fra alder. Denne regelen er til ettertanke - den viser et forbedringspotensial.

Regel 15. RDW > 22 og første prøve. Vurder i utstryk.

Kommentar: Behov for tillaging og bedømmelse av erytrocyttene i utstryk vurderes etter sjekk av samtlige RBC-parametere og eventuelt etter reanalyse med komplementær teknologi (Sysmex XE 2100/Advia 120).

Regel 16 - 21 for DIFF: Vurder i utstryk.

Kommentar: Prøven vil alltid først reanalyseres med

Tabell 1. ISLH konsensus guidelines: Reglene er oversatt og gjengitt fra www.islh.org/2009/index.php?page=consensus_rules

Regel	Parameter	1. kriterium	Og	2. krit.	Og/ eller	3. krit	Og/ eller	4. krit	Handling/ tiltak 1	Handling/ tiltak 2	Handling/ tiltak 3
1	For tidlig fødte barn	Første prøve							Vurder utstryk		
2	WBC, RBC, HGB, PLT, Retik	Overskrider lineariteten							Fortynn prøven og reanalyser		
3	WBC, PLT	Lavere enn laboratoriets verifiserte instrument-linearitet							Følg laboratoriets prosedyrer		
4	WBC, RBC, HGB, PLT	Vote Out (får ikke ut svar)							Sjekk prøven mht klotter/ sammenklumpninger	Reanalyse av prøven	Ved fortsatt vote out, reanalyser med annen metode
5	WBC	<4.0 eller >30.0	og	Første gang					Vurder utstryk	Reanalyse av prøven	
6	WBC	<4.0 eller >30.0	og	Delta-sjekk slår ut	og	Prøven tatt innen tre døgn etter første prøve			Vurder utstryk		
7	PLT	<100 eller >1000	og	Første gang					Vurder utstryk		
8	PLT	Enhver verdi	og	Delta-sjekk slår ut					Vurder utstryk		
9	HGB	<7 g/dl eller >2 g/dl over øvre referansegrense for kjønn og alder	og	Første gang					Vurder utstryk	Sjekk prøvens bestandighet	
10	MCV	<75 fl eller >105 fl (voksen)	og	Første gang	og	Prøven <24 timer gammel			Vurder utstryk		
11	MCV	>105 fl	og	Voksen	og	Prøven <24 timer gammel			Vurder utstryk for bedømmelse av forekomst av makrocytære erytrocytter	Be om fersk prøve hvis ingen makrocytære endringer sees i utstryk	Rapporter med kommentar hvis fersk prøve ikke er tilgjengelig
12	MCV	Enhver verdi	og	Delta sjekk slår ut	og	Prøven <24 timer gammel			Sjekk prøvens bestandighet		
13	MCHC	>=2 enheter over øvre referansegrense							Sjekk mht lipemi, hemolyse, RBC agglutinasjon, sfærocytter.		
14	MCHC	<30 g/dL	og	Normal/høy MCV					Sjekk mht IV kontaminasjon eller annen prøve spesifikk årsak		
15	RDW	>22	og	Første gang					Vurder utstryk		
DIFF og RETIK											
16	Ingen DIFF eller ufullstendig								Manuell DIFF og vurdering av utstryk		
17	Neut #	<1.0 eller > 20.0	og	Første gang					Vurder utstryk		
18	Lymph #	>5.0 (voksnet) eller >7.0 (<12 år)	og	Første gang					Vurder utstryk		
19	Mono #	>1.5 (voksen) eller >3.0 (<12 år)	og	Første gang					Vurder utstryk		
20	Eos #	>2.0	og	Første gang					Vurder utstryk		
21	Baso #	>0.5	og	Første gang					Vurder utstryk		
22	NRBC #	Enhver verdi	og	Første gang					Vurder utstryk		
23	Retik absoluttverdier	>0.100	og	Første gang					Vurder utstryk		

komplementær teknologi før eventuell tillaging og vurdering av utstryk samt eventuell manuell DIFF.

Kommentar: Prøven reanalyseres i instrument med NRBC-kanal. Automatisk korreksjon av WBC.

Regel 22: NRBC og første gang. Vurder i utstryk.

Regel 23: Retikulocytt >0,100. Vurder i utstryk.

Regel	Parameter	1. kriterium	og	2. krit.	Og/ eller	3. krit	Og/ eller	4. krit	Handling/ tiltak 1	Handling/ tiltak 2	Handling/ tiltak 3
SUSPEKT FLAG											
24	Suspekt flag (unntatt ImmG/Band)	Flag +	og	Første gang	og	Voksen			Vurder utstryk		
25	Suspekt flag	Flag +	og	Første gang	og	Barn			Vurder utstryk		
26	Flag for upålitelig WBC	Flag +		Hvilke som helst					Sjekk prøvens bestandighet og reanalyser prøven	Hvis fortsatt feil, sjekk hva instrumentet rapporterer	Vurder utstryk og manuell DIFF hvis indikert
27	RBC fragmenter	Flag +		Hvilke som helst					Vurder utstryk		
28	Dimorf RBC kurve/scatterplot	Flag +		Hvilke som helst	Første gang				Vurder utstryk		
29	Lyse resistente RBC	Flag +		Hvilke som helst					Vurder/inspiser WBC histogram/cytogram	Valider etter laboratoriets prosedyrer (vurder om retik resultat er feil)	Vurder utstryk mht abnormal RBC morfologi
30	PLT clump flag	Et hvert talletall							Sjekk prøven mht klotter/sammenklumpninger	Vurder utstryk/estimer evt antall PLT	Hvis PLT aggregater/klumper fins, følg lab-prosedyrer
31	Platelet Flag	PLT & MPV flag unntatt plt clumps							Vurder utstryk		
32	Immature granulocyte flag	Flag +	og	Første gang					Vurder utstryk		
33	Immature granulocyte flag	Flag +		Tidligere konfirmert res.	og	Positiv delta-sjekk for WBC			Vurder utstryk		
34	Left shift flag	Flag +							Følg laboratoriets prosedyrer		
35	Atypical/Variant lymphs	Flag +	og	Første gang					Vurder utstryk		
36	Atypical/Variant lymphs	Flag +	og	Tidligere konfirmert res.	og	Positiv delta-sjekk for WBC			Vurder utstryk		
37	Blast flag	Flag +	og	Første gang					Vurder utstryk		
38	Blast flag	Flag +	og	Tidligere konfirmert res.	og	Delta-sjekk OK eller negativ delta-sjekk	og	I løpet av 3 -7 dg	Følg laboratoriets prosedyrer		
39	Blast flag	Flag +	og	Tidligere konfirmert res.	og	Positiv delta-sjekk for WBC	og	I løpet av 3 -7 dg	Vurder utstryk		
40	NRBC flag	Flag +							Vurder utstryk	Hvis funn av NRBC, tell antall NRBC og korrigér WBC tall hvis nødv.	
41	Retik	Abnormalt mønster/ histogram/ cytogram							Sjekk hva instrumentet rapporterer	Reanalyser hvis innsagningsproblem	Hvis abnormalt "mønster" fortsatt er der etter reanalyse, vurder i utstryk

Kommentar: St. Olav: Manuell metode for retikulocytter blir kun utført ved feil grensesetting i retic scatterplott.

Regel 24 og 25: Suspekt flag. Første gang. Hhv voksen og barn. Vurder i utstryk.

Kommentar: Reanalysering med komplementær teknologi før eventuell tillaging av utstryk. Prøver som

ikke kan rapporteres fra Sysmex XE 2100 kan for de fleste prøver rapporteres fra Advia 120/2120 og man unngår vurdering i utstryk.

Regel 28: Dimorf RBC populasjon. Første gang. Vurder i utstryk.

Kommentar: Reanalyse med komplementær

teknologi. Utstryk vurderes ved ekstreme verdier.

Regel 29. Lyse resistente RBC, vurder histogram/cytogram, valider etter laboratoriets prosedyrer. Vurder i utstryk mht. abnormal RBC morfologi.

Kommentar: Reanalyseres i instrument med lyse-resistent kanal.

Regel 2, 3, 4, 12, 26, 27, 30, 34, 38, 39 og 41 samsvarer med våre rutiner. Det er med andre ord sammenfallende regler og tiltak for 11 av 41 foreslåtte regler. For 30 av reglene vil reanalyse i samme instrument eller instrument med komplementær teknologi som oftest medføre at resultater kan rapporteres uten tap av viktig informasjon.

ISLH-reglene for hva som skal være positive funn i utstryk (tabell 2) harmonerer godt med vår praksis. Det er flott at ISLH har laget en beskrivelse som alle kan forholde seg til og følge.

Tabell 2. Gjengitt fra www.islh.org/2009/index.php?page=consensus_smear Oppstilling av de kriteriene som ble brukt for å bekrefte positive funn i utstryk i forhold til de foreslåtte kriteriene som utløste et oppfølgende tiltak for CBC og DIFF i henhold til tabell 1.

1. MORFOLOGI
a. RBC morfologi med 2+ / Moderat eller mer. Eneste unntak er malaria, hvor ethvert funn vil bli betraktet som et positivt funn.
b. PLT morfologi (abnormalt store trombocytter) ved enten 2+ / Moderat eller mer.
c. Trombocyttaggregater >noen få.
d. Dohle bodies ved enten 2+ / Moderat eller mer.
e. Toxisk granulering ved 2+ / Moderat eller mer.
f. Vakuoler ved enten 2+ / Moderat eller mer.
2. FUNN AV ABNORMALE CELLE TYPER
a. Blast >1
b. Metamyelocytter >2
c. Myelocytter / Promyelocytter >1
d. Atypiske lymfocytter >5
e. NRBC >1
f. Plasmaceller >1

Tabell 3. Oversikt andel sanne positive, falske positive, sanne negative og falske negative resultater ved bruk av konsensusreglene. Resultater fra 13 298 prøver som ble analysert i 15 laboratorier (4).

	Antall	Prosentvis
Sanne positive	1483	11,2
Falske positive	2476	18,6
Sanne negative	8953	67,3
Falske negative	386	2,9
Totalt antall prøver	13298	100

Oppsummering

En prøveflytmodell med reanalyse i samme instrument, eller instrument med komplementær teknologi, er effektiv og bidrar til kortere svartid enn en modell som innebærer tillaging og vurdering av utstryk for de fleste kausus. Det ser ikke ut til at vesentlig informasjon går tapt ved en slik praksis. Vurdering av utstryk er tidkrevende og krever betydelige personalressurser. Dersom reglene fra ISLH skal implementeres i norske laboratorier, må morfologikompetansen være tilgjengelig i alle laboratorier 24 timer i døgnet. Det er en utfordring for de fleste norske laboratorier.

Konsensusreglene fra ISLH er det første steget mot en standardisering. Reglene kan være et godt utgangspunkt for fastsettelse av denne type regler også i norske laboratorier, uavhengig av om laboratoriet har en praksis hvor resultatene valideres manuelt eller ved hjelp av et autovalideringssystem. ISLH-reglene kan benyttes som basis i autovalideringssystemer og med fordel justeres noe med hensyn til sensitivitet og spesifisitet (4).

De fem største instrumentleverandørene (Sysmex, Siemens, Coulter, Abbott og ABX) kan alle tilby løsninger med autovalideringssystemer tilpasset sine instrumenter. Sysmex med autovalideringssystemet SIS har etablert en europeisk standard med regler hvor elementer er tatt fra ISLH-reglene, men SIS har langt flere regler (cirka 100 mot 41 ISLH-regler). Reglene er mer detaljerte og spesifikke enn ISLH-reglene.

Coulter's autovalideringssystem REMISOL kan tilby systemet med ISLH-reglene implementert (hvis ønskelig) for det nye instrumentet DxH 800. Siemens system HEMALINK er helt åpent og reglene kan legges inn om en ønsker det.

Valideringsregler er viktige med tanke på kvalitets-sikring av svarrapportering, standardisering, lik prøve-håndtering og svarrapportering 24 timer i døgnet. Utvikling av nye regler pågår (av ISLH, hos instrument-leverandører og i laboratoriene) og på sikt vil reglene sannsynligvis også kunne være diagnostiske verktøy (påvisning av malaria, sepsis, tilstedeværelse av blaster, B12 eller folatmangel, leukemier, anemier) i tillegg til å sikre at vi rapporterer korrekte resultater. ■

Referanser

1. www.islh.org/2009/index.php?page=consensus_laboratories
2. Lab Hematology 2005;11(2):83-90, "The international consensus group for haematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis", Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Sinsom E; International consensus group for haematology.
3. www.islh.org/2009/index.php?page=consensus_rules
4. www.islh.org/2009/index.php?page=consensus_truth