

15. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 49-55.
16. Reinhart K, Karzai W, Meisner M. Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1193-1200.
17. Vincent J-L, Mercan D. Dear Sirs, what is your PCT? *Intensive Care Med* 2000; 26: 1170-1171.
18. Hazelzet JA, Groot R de, Mierlo G van, et al. Complement activation in relation to capillary leakage in children with septic shock and purpura. *Infect Immun* 1998; 66: 5350-5356.
19. Hazelzet JA, Kleijn ED de, Groot R de. Endothelial protein C activation in meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001; 345: 1776-1777.
20. Kleijn ED de, Groot R de, Hack CE, et al. Activation of Protein C following infusion of Protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: a randomized, double blinded, placebo controlled dose finding study. *Crit Care Med* 2003; 31: 1839-1847.
21. Pollack M, Ruttimann U, Getson P. Pediatric risk of mortality (PRISM) score. *Crit Care Med* 1988; 16: 1110-1116.
22. Deuren M van, Brandtzaeg P, Meer J van der. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 144-166.
23. Klein N, Heyderman R, Levin M. Management of meningococcal infections. *Br J Hosp Med* 1993; 50: 42-49.
24. Kaay DC van der, Kleijn ED de, Rijke YB de, Hop WC, Groot R de, Hazelzet JA. Procalcitonin as a prognostic marker in meningococcal disease. *Int Care Med* 2002; 28: 1606-1612.
25. Meisner M, Tschaikowsky K, Palmers T, Höfig J, Schüttler J. Procalcitonin and CRP in septic shock: inflammatory parameters with different kinetics. *Int Care Med* 1996; 22, Suppl 1: 13.

### Summary

*BRAHMS PCT<sup>®</sup>-Q semi-quantitative test method to determine procalcitonin in children with meningococcal disease. Kaay DCM van der, Kleijn ED de, Groot R de, Hazelzet JA and Rijke YB de. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 308-313.*

*Objective:* To assess the value of the BRAHMS PCT<sup>®</sup>-Q test method in clinical practice in relation to the quantitative test in children with meningococcal disease.

*Design:* Retrospective study. Twenty patients with septic shock were included; 24 samples were used to perform the PCT<sup>®</sup>-Q. Severity of meningococcal disease was determined using lactate, fibrinogen, leucocytes, thrombocytes, CRP, the PRISM-score and time between development of petechiae and the first blood sample.

*Results:* Comparing the two PCT tests, we found a discrepancy in results in 3 patients. In the quantitative test we measured 4.1 µg/l, 3.6 µg/l and 1.6 µg/l respectively while in the PCT<sup>®</sup>-Q test concentrations were classified as 0.5-2 µg/l, 0.5-2 µg/l and <0.5 µg/l respectively. Clinically, two patients were recovered and one patient was still ill.

*Conclusions:* Although the PCT<sup>®</sup>-Q test is a valuable tool in the diagnosis of meningococcal disease, it's a poor parameter in the clinical course of the sepsis.

*Keywords:* Meningococcal disease; procalcitonin; PCT<sup>®</sup>-Q

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 313-316*

## De virtuele differentiatie van bloedcellen als hulpmiddel om de controverse van de beoordeling van de staafkernige granulocyt te toetsen

W. van der MEER<sup>1</sup>, F.L.A. WILLEKENS<sup>2</sup>, W. van GELDER<sup>3</sup> en J.L. WILLEMS<sup>1</sup>

De differentiatie van witte bloedcellen (dif) is een wereldwijd geaccepteerd diagnosticum. Het hier beschreven onderzoek behelst enerzijds de beschrijving van de virtuele dif als kwaliteitsinstrument en anderzijds het vaststellen van de controverse met betrekking tot de beoordeling van de staafkernige granulocyt. De virtuele dif kan als aanvulling op de bestaande bloedcelmorfologierondzending een bruikbaar middel zijn om de kwaliteit van de beoordeling van bloedcellen te testen. Van een gekleurd (May-Grünwald-Giemsa) bloeduitstrijkje werden 100 microfotopopnamen gemaakt en naar de 157 deelnemers

van de SKML-bloedcelmorfologie rondzending gestuurd met het verzoek deze te beoordelen. 106 deelnemende laboratoria (756 individuele beoordelingen) hebben resultaten ingestuurd. Het gemiddelde aantal staafkernige granulocyten was 31% met een spreiding tussen 11 en 52% voor de deelnemende laboratoria. Voor de individuele waarden was het gemiddelde ook 31%, maar lag de spreiding tussen 4 en 64%. Deze enorme variatie van het aantal staafkernige granulocyten is aanleiding om de staafkernige granulocyten niet meer kwantitatief maar kwalitatief te beoordelen.

*Trefwoorden:* staafkernige granulocyt; bloedcelmorfologie rondzending; virtuele dif

Nog steeds geldt de differentiatie van witte bloedcellen (dif) als een wereldwijd geaccepteerd diagnosticum. De microscopische dif is een dure routinetest met een slechte statistische betrouwbaarheid (1). Desalniettemin kan de dif een belangrijke rol spelen bij

*Afdeling Klinische chemie, UMCN St Radboud, Nijmegen<sup>1</sup>, Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem<sup>2</sup> en Klinisch Chemisch Laboratorium, Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht<sup>3</sup>*

Correspondentie: Ing. W. van der Meer, 564 AKC, UMCN St Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.  
E-mail: w.vandermeer@akc.umcn.nl

screening, diagnose of nabehandeling van hematologisch gerelateerde ziekten en als infectieparameter (2). In de meeste gevallen worden 100 kernhoudende cellen gedifferentieerd en gerapporteerd als percentage van de totale leukocytenverdeling. Afwijkingen als toxische korreling etc. worden kwalitatief uitgedrukt (zwak/sterk positief).

Een van de cellen waarover een gebrekkige consensus bestaat is de staafkernige granulocyt. Met name de kwantificering van deze cellen maakt de dif tot een specifieke laboratoriumtest met een slechte reproduceerbaarheid. Dit ondanks het feit dat de beoordelingscriteria van de staafkernige granulocyt binnen de Nederlandse laboratoria zijn gestandaardiseerd (VHL): het dunste deel van de kern moet in verhouding tot het dikste deel van de kern meer zijn dan eenderde. De slechte reproduceerbaarheid heeft grote gevolgen voor de sensitiviteit en de specificiteit voor deze test, omdat in een aantal gevallen het vaststellen van de aanwezigheid van staafkernige granulocyten van klinisch belang kan zijn. Nieuwe testen maken in de toekomst de telling van staafkernige granulocyten mogelijk overbodig (3). De komst van apparatuur waarmee automatische differentiaties worden uitgevoerd heeft bovendien geleid tot afname van expertise op dit gebied. Al met al leidt dit tot een grote variatie in de rapportage van dit celtype en wellicht zou een andere rapportagesystematiek met betrekking tot de aanwezigheid van een verhoogd aantal staafkernige granulocyten deze variatie kunnen inperken.

Door middel van externe kwaliteitscontrole rondzendingen wordt de expertise op het gebied van celherkenning getoetst. Dat gebeurt aan de hand van gefixeerde, ongekleurde bloeduitstrijkjes, waarna de deelnemer de preparaten kleurt en beoordeelt. De gemiddelde resultaten worden opgestuurd aan de SKML. Deze rapporteert de referentie-uitslag en het landelijke gemiddelde. Daarbij spelen variaties in de preparaten, kleuring, het gekozen beoordelingsgebied en lokaal geldende beoordelingscriteria een rol. In eerder onderzoek is al aangetoond dat de beoordeling van dezelfde uitstrijkjes door verschillende personen zowel binnen hetzelfde laboratorium als laboratoria onderling, tot grote variaties leidt (4). Variaties in kleuring en uitstrijkje spelen daarbij geen rol. Met de ontwikkeling van een virtuele dif kan de variatie getoetst worden van alleen de beoordelingscriteria omdat de beoordelaars allen dezelfde cellen zien. Op basis daarvan kunnen eventuele aanpassingen in de celbeoordeling worden afgesproken. Dit artikel beschrijft een eerste aanzet voor de ontwikkeling van zo'n virtuele dif en onderstreept het verschil in de beoordeling van staafkernige granulocyten.

### **Materiaal en methoden**

Van EDTA-ontsteld bloed is een uitstrijkje gemaakt en gekleurd volgens May-Grünwald-Giemsma. Van dit preparaat zijn 100 digitale foto-opnamen gemaakt met behulp van een Olympus BH-2-microscop met een Olympus objectief met vergroting 60x en een Sony 3CCD kleurenvideocamera. Per beeld was één cel te zien die beoordeeld diende te worden. Het monster was afkomstig van een patiënt met een sep-

sis, de CRP was 359 mg/l. De beelden werden in een 'Power Point'-presentatie gezet en op cd-rom gebrand. Aan de deelnemers van de morfologierondzending werd de cd-rom toegestuurd met het verzoek om de cellen te laten beoordelen door gekwalificeerde personen. Alle afzonderlijke uitslagen zijn in Excell-bestanden ingevoerd en van ieder laboratorium werd een gemiddelde berekend. Om het totaal gemiddelde niet te veel te laten beïnvloeden door enkele laboratoria, zijn per laboratorium maximaal 20 uitslagen ('at random') verwerkt voor verdere analyse. Indien de uitslagen onvolledig waren ingevuld werden deze niet verwerkt. De difuitslagen van zowel de deelnemers als de individuele beoordelaars werden gemiddeld en een standaarddeviatie werd berekend. Per beeld werd bovendien naar de frequentie (aantal celbenoemen) gekeken waarbij als grens voor een overeenstemmende beoordeling 80% werd genomen. Met deelnemer wordt bedoeld het laboratorium, met individu wordt de individuele beoordeling bedoeld.

### **Resultaten**

Van 157 deelnemers aan de SKML-rondzending bloedcelmorfologie hebben 106 deelnemers (68%) resultaten ingestuurd. De kwaliteit van de beelden werd door 31 deelnemers als matig en door 67 deelnemers als goed beoordeeld, 8 deelnemers hebben dit niet aangegeven. De kwaliteit van de kleuren werd door 2 deelnemers als slecht, 38 deelnemers als matig en 58 als goed beoordeeld, 8 keer is geen mening ingevuld. Wat betreft het criterium voor benoeming van staafkernige granulocyt gaven 81 deelnemers aan dat zij > 1/3 kerndikte en 11 deelnemers > 2/3 kerndikte hanteerden; 16 keer werd niets ingevuld. Bij 51 van de 100 cellen werd door meer dan 80% van de deelnemende individuen een zelfde beoordeling afgegeven. Een niet overeenstemmende beoordeling (< 80%) werd gevonden bij 49 cellen: 38 beoordelingen betroffen het onderscheid tussen een segmentkernige en een staafkernige granulocyt, 4 keer tussen een monocyt en een metamyelocyt, 5 keer tussen een staafkernige granulocyt en een metamyelocyt en 2 keer tussen een monocyt en een lymfocyt (tabel 1). In 280 beoordelingen werden lichaampjes van Döhle positief beoordeeld, 120 maal toxische korreling, 60 maal atypische lymfo's en een enkele keer 'hairy cells' of atypische lymfocyten. Slechts een enkele keer werd melding gemaakt van afwijkingen in bloedplaatjes en rode bloedcellen; deze zijn niet meegenomen in dit onderzoek.

De gemiddelde waarden van de dif-uitslagen door de deelnemende laboratoria en van de individuele waarden zijn vermeld in tabel 2. Voor geen enkele cel geldt dat alle deelnemers unaniem waren in hun beoordeling. Het hoogste aantal gelijke benoemen was 753 uit 756 (99,6%) en betrof een segmentkernige granulocyt (nr. 68). Als consensus voor de dif-uitslag werd de modus (het hoogste aantal benoemen) per cel genomen hetgeen leidde tot de volgende uitslag: 15% monocyten, 6% lymfocyten, 45% segmentkernige granulocyten, 28% staafkernige granulocyten, 5% metamyelocyten en 1% basofiele granulocyten. Slechts drie individuele beoordelingen waren gelijk aan de consensusuitslag.

**Tabel 1.** Percentages van celbenoeming door de individuele deelnemers, waarbij de modus vetgedrukt is, percentages van <10% zijn niet opgenomen

Nr.	Celsoort in percentages						Nr.	Celsoort in percentages						Nr.	Celsoort in percentages							
	Mo	Ly	Sg	St	Me	My		Ba	Mo	Ly	Sg	St	Me		My	Ba	Mo	Ly	Sg	St	Me	My
1			<b>97</b>				34		<b>73</b>	27				68		<b>100</b>						
2	<b>87</b>						35		<b>96</b>					69		30	<b>70</b>					
3	<b>78</b>				14		36		<b>94</b>					70		<b>98</b>						
4			<b>54</b>	46			37		29	<b>70</b>				71								<b>98</b>
5			11	<b>89</b>			38			<b>94</b>				72		16	<b>84</b>					
6		<b>99</b>					39			<b>99</b>				73		<b>92</b>						
7			<b>52</b>	48			40		<b>89</b>					74		<b>58</b>	42					
8			<b>60</b>	40			41			35	<b>61</b>			75		<b>97</b>						
9			<b>67</b>	33			42	<b>71</b>		10	15			76	<b>97</b>							
10			12	<b>88</b>			43			<b>51</b>	48			77		38	<b>62</b>					
11			<b>53</b>	43			44			<b>57</b>	43			78		19	<b>81</b>					
12			34	<b>66</b>			45		<b>95</b>					79		<b>88</b>	12					
13			<b>62</b>	37			46			35	<b>64</b>			80		24	<b>76</b>					
14	<b>82</b>		15				47				<b>98</b>			81		13	15	<b>60</b>				
15			32	<b>67</b>			48			<b>63</b>	37			82	<b>97</b>							
16			35	<b>65</b>			49	<b>75</b>			12			83		<b>97</b>						
17			<b>94</b>				50			<b>65</b>	34			84		<b>86</b>	13					
18			<b>65</b>	34			51			<b>86</b>	12			85	<b>99</b>							
19			<b>96</b>				52				15	<b>72</b>		86		22	<b>77</b>					
20			<b>71</b>	29			53			<b>99</b>				87		<b>98</b>						
21			48	<b>52</b>			54			<b>99</b>				88		24	<b>75</b>					
22	<b>81</b>						55	<b>90</b>						89	<b>59</b>	24						
23			20	<b>79</b>			56			22	<b>78</b>			90	<b>85</b>							
24			25	<b>74</b>			57	<b>65</b>	12			11		91		<b>99</b>						
25			<b>98</b>				58			<b>68</b>	32			92		32	<b>68</b>					
26			<b>91</b>				59			<b>67</b>	33			93		<b>66</b>	34					
27			20	<b>80</b>			60			<b>90</b>	10			94			<b>91</b>					
28			<b>99</b>				61			14	18	<b>49</b>	17	95		14	21	<b>53</b>				
29			<b>86</b>	14			62			<b>99</b>				96		<b>91</b>						
30	<b>83</b>			11			63			<b>97</b>				97		<b>98</b>						
31			31	<b>69</b>			64		<b>90</b>					98	<b>68</b>	18						
32			<b>98</b>				65			<b>54</b>	46			99		21	<b>76</b>					
33			37	<b>62</b>			66			<b>100</b>				100		<b>62</b>	36					
							67				14	<b>74</b>										

\*mo= monocyt, ly= lymfocyt, sg= segmentkernige neutrofiële granulocyt, st= staafkernige neutrofiële granulocyt, me= metamyelocyt, my= myelocyt, ba= basofiele granulocyt.

**Tabel 2.** De waarden van de deelnemers (n= 106) en individuen (n=756)

Celtype	Deelnemende laboratoria (106)			Individuele waarden (756)		
	Gem (%)	SD	Range (%)	Gem (%)	SD	Range (%)
Monocyt	12,4	2,2	3,0-15,3	12,4	3,1	2-19
Lymfocyt	6,6	1,5	3,0-15,0	6,6	1,8	1-18
Segment <sup>1</sup>	42,9	7,8	22,5-64,4	43,9	11,2	15-72
Staaft <sup>2</sup>	31,4	7,6	11,4-52,3	30,6	11,0	4-64
Metamyelocyt	4,4	1,6	0,0-10,0	4,2	2,4	0-15
Myelocyt	0,8	0,9	0,0-0,5	0,8	1,4	0-13
Eo <sup>3</sup>	0,0	0,1	0,0-0,5	0,0	0,1	0-1
Baso <sup>4</sup>	1,0	0,1	0,6-2,0	1,0	0,2	0-3
Overig	0,5	0,6	0,0-3,0	0,5	1,1	0-8

<sup>1</sup>segmentkernige neutrofiële granulocyt, <sup>2</sup>staafkernige neutrofiële granulocyt, <sup>3</sup>eosinofiele granulocyt, <sup>4</sup>basofiele granulocyt.

## Discussie

De dif geldt nog steeds als een veel aangevraagde en uitgevoerde routinetest, maar de komst van automatische celtellers leidt tot afname van de expertise. Het aantal cellen dat een automatische celteller differentieert is vele malen groter dan de microscopische dif waarbij normaliter 100 cellen worden beoordeeld. Deze automatische dif dient in de meeste gevallen als voorscreening en indien alarmeringen hiertoe aanleiding geven zal een microscopische dif worden uitgevoerd, hoewel een telling van 100 cellen een statistisch veel geringere betrouwbaarheid kent. Gezien de continue ontwikkeling van deze celtellers en de beschikbaarheid van biochemische testen om bijvoorbeeld een sepsis vast te stellen, is de microscopische dif aan een revisie toe. Deze studie beschrijft enerzijds de ontwikkeling van een virtuele dif en anderzijds de controverse die er bestaat bij de beoordeling van staafkernige en segmentkernige granulocyten. Met behulp van deze virtuele dif kan op een objectieve manier informatie verkregen worden over de beoordeling van de verschillende bloedcellen. In dit onderzoek

hebben wij ons gericht op de controverse tussen de segmentkernige en staafkernige granulocyten.

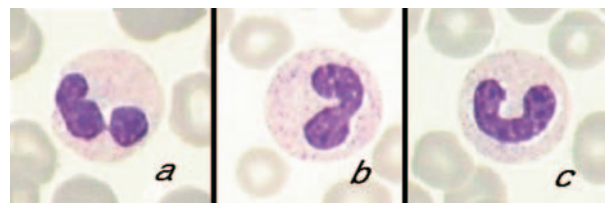
Het nadeel van een virtuele dif is dat het effect van de kleuring, dat toch van invloed blijkt te zijn, niet getest kan worden. Daarom zal de bestaande rondzending ook zeker blijven bestaan. Bovendien kan ook het gebied in het preparaat waar men normaliter de cellen beoordeelt niet worden getest. Het gemis van het scherpstellen (ook wel focussen of micrometeren genoemd) kan met de huidige technieken nog niet worden gecompenseerd, maar zal in de toekomst zeker gestalte krijgen. Het grote voordeel van de virtuele dif is echter dat iedereen dezelfde cel ziet.

Over de beoordeling van staafkernige/segmentkernige granulocyten bestaat al geruime tijd consensus en gelden voor de Nederlandse laboratoria de criteria beschreven in Wintrobe's Clinical Hematology (5). Ondanks deze afspraken wordt door de deelnemers 11 maal (10%) aangegeven dat men een ander criterium hanteert. Opmerkelijk detail is daarbij dat er qua resultaten geen verschil zit tussen de deelnemers van dit of een ander criterium. Het verschil in de benoeming van staafkernige en segmentkernige granulocyten is reeds eerder aangetoond (4, 6). In 1993 heeft het College of American Pathologists (CAP) onder 6600 hematologisch geschoolde analisten een test uitgevoerd om de kwaliteit van de differentiatie tussen staafkernige en segmentkernige granulocyt vast te stellen. De lage reproduceerbaarheid was aanleiding om die kwaliteit niet meer te testen (7).

De cellen waarbij een duidelijke afsnoering van de kern te zien worden eenduidig als segmentkernige granulocyt beoordeeld. Echter zodra de verbinding tussen twee lobben wat dikker wordt begint de twijfel. Ook als de kern een beetje ongelukkig in de cel ligt, kan deze verbinding moeilijker te zien zijn. Indien geen versmalling van de kern te zien is, wordt de cel eenduidig als staafkernige granulocyt beoordeeld (fig. 1). Ondanks de afspraken die gemaakt zijn over de benoeming van staafkernige granulocyten en segmentkernige granulocyten, leiden interpretatieverschillen toch tot tegenvallende resultaten. Omdat staafkernige granulocyten in slechts enkele gevallen enig klinisch belang hebben (3), blijft signalering van deze cellen nodig. We moeten ons wel afvragen in hoeverre het zin heeft om de staafkernige granulocyten te kwantificeren.

Gezien de grote inter- en intra-observer variatie is het aan te bevelen om voortaan uitsluitend een kwalitatieve beoordeling van de aanwezigheid van staafkernige granulocyten te geven. Daarbij wordt gedacht aan het aangeven van positief indien duidelijke staven aanwezig zijn (bijvoorbeeld fig. 1c). Bovendien kan een kritische kijk op de aanwezigheid van metamyelocyten hierbij een hulpmiddel zijn: aanwezigheid van staven zonder metamyelocyten kan duiden op de (benigne) anomalie van Pelger Huët, terwijl de aanwezigheid van metamyelocyten kan duiden op een sepsis of maligne aandoening.

In deze eerste aanzet voor een virtuele dif zijn we ingegaan op de controverse van de beoordeling van de staafkernige granulocyt. Een volgende stap is om de kleuring aan te passen waardoor de gevonden ver-



Figuur 1. (a) Voorbeeld van een cel (nr. 66) waarbij 99,6% een segmentkernige granulocyt werd gescoord. (b) De verhouding in de beoordeling tussen segmentkernige en staafkernige granulocyt was 52,2/47,8% bij deze cel (nr. 7). (c) Deze cel (nr. 47) gaf een overeenstemming van 97,5% voor staafkernige granulocyt.

schillen in de beoordeling van monocyten, lymfocyten en metamyelocyten waarschijnlijk minder worden. Vanuit enkele deelnemers is de vraag gekomen om een vergelijkbaar onderzoek te doen naar de beoordeling van de atypische lymfocyt. Een volgende virtuele dif zal waarschijnlijk deze controverse van de atypische lymfocyt belichten.

### Dankbetuiging

Wij willen alle deelnemers die aan deze 'pilot' rondzending hebben meegewerkt bedanken voor het enthousiasme en de goede respons.

### Literatuur

1. Rümke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. *Blood Cells* 1985; 11: 311-314.
2. Houwen B. The differential cell count. *Lab Hematol* 2001; 7: 89-100.
3. Cornblet PJ. Clinical utility of the band cell. *Clin Lab Med* 2002; 22: 101-136.
4. Meer W van der, Scott CS, Keijzer MH de. Automated flagging influencing the inconsistency and bias of band cell and atypical lymphocyte morphological differentials. *Clin Chem Lab Med* 2004; 4: 371-377.
5. Greer JP, GR, Foerster J, Lukens J, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11ed. Baltimore, Williams & Wilkins. 2004.
6. Novak RW. The beleaguered band count. *Clin Lab Med* 1993; 13: 895-901.
7. Schelonka RL, Yoder BA, Hall RB. Band neutrophil counts in neonates. *J Pediatr* 1995; 126: 505-506.

### Summary

*Investigation of the controversy over band cell assessment with aid of a virtual slide. Meer W van der, Willekens FLA, Gelder W van and Willems JL. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 313-316*

The differentiation of white blood cells is a worldwide-accepted method to obtain medical information. In the present study we have developed a new instrument for the assessment of the different blood cells and the controversy of band cells with this method. Our conclusion is that the virtual slide can be a useful supplementary survey in the testing of the quality of microscopic blood cell assessment. 100 Microphotographs were made of a stained (May-Grünwald Giemsa) slide and sent to 157 participating laboratories of the blood cell morphology quality system. 106 laboratories responded with several (a total of 756) individual results. The mean of the band cells for the laboratories and individuals was 31%, with a range from 11-52% and 4-64% respectively.

Because of the enormous variation of band cell counting, the way of presenting information of the amount of band cells should be reconsidered. We recommend reporting band cells qualitatively if present in increased numbers.

*Key words: band cells; virtual slide; blood cell morphology*