

Gestabiliseerd controlemateriaal

F.J.L.M. HAAS

Het universeel gebruik van gestabiliseerd materiaal in de interne en externe kwaliteitscontrole heeft beperkingen. Afhankelijk van de wijze van stabilisatie en samenstelling van het controle materiaal, in combinatie met de gebruikte apparatuur, zullen de resultaten vergelijkbaar zijn.

Voor de Nederlandse situatie is een vergelijking gemaakt tussen de drie meest gebruikte programma's, J.T. Baker, Instruchemie en Ortho, in relatie tot de drie meest voorkomende typen apparaten, Coulter, Technicon en Toa Sysmex. In dit onderzoek is de vergelijkbaarheid in resultaten alsmede de stabiliteit van het controlemateriaal voor de genoemde apparatuur nader onderzocht.

Het gebruik van gestabiliseerd bloed ten behoeve van interne en/of externe kwaliteitscontrole hemocytometrie is in de rapporten van de European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS) (1, 2) genoemd en ook de randvoorwaarden voor het bereiden van het controlebloed (3) zijn duidelijk beschreven. In de wetenschappelijke literatuur is echter het aantal publikaties over de bereiding en eigenschappen van gestabiliseerd bloed erg beperkt. Het feit dat met dit soort controlematerialen vaak grote commerciële belangen zijn gemoeid, zal hier mede debet aan zijn.

Dankzij de ontwikkelingen op het gebied van de elektronische hemocytometrische apparatuur werd het mogelijk de vereiste nauwkeurigheid, gezien de grootte van de biologische spreiding van de parameters (4) (figuur 1), te verbeteren. Echter door de verschillen in de meetapparatuur en het door de firma's geleverde apparaat-specifieke kalibratie bloed, ontstond een situatie waarin de onderlinge vergelijkbaarheid in juistheid en precisie te wensen overliet.

Om de verschillen tussen de diverse typen hematologische analysers te verkleinen, zijn richtlijnen opgesteld voor de maximaal toelaatbare analytische "bias" en "imprecision" van meerkanals analysers (5). De aanbevolen maximale aanvaardbare analytische afwijking (tabel 1) en spreiding (tabel 2) zijn gedefinieerd voor zowel het lage, midden alsook het hoge bereik. De verbetering van de analytische variatie coëfficiënt (VC) werkt door in de totale VC van de bepaling. De grootte van de bijdrage van de analytische VC in de totale VC komt het sterkst tot uiting in de VC van het MCV (tabel 3).

De hematologische analysers zijn ontworpen voor het

meten van verse bloedmonsters en het is daarom onjuist de producent van deze apparatuur te verwijten dat de verschillende typen apparaten zich anders gedragen bij het meten van gestabiliseerd bloed. De voornaamste oorzaak is de verandering in de flexibiliteit van de erythrocyt ten gevolge van de (gedeeltelijke) fixatie of stabilisatie. De verminderde flexibiliteit komt tot uiting in de zgn "shape factor" bij de impedantie meting. Deze factor wordt mede bepaald door de afmeting van de telopening, de elektronische karakteristiek van het apparaat en de gebruikte verdunningsvloeistof. Door de combinatie van deze variabelen kan het MCV, en dus het Ht en MCHC, tussen de diverse instrumenten verschillen.

Daarnaast kan het MCV ook verschillen als gevolg van veroudering, waarbij de erythrocyten volume verandering ondergaan. Afhankelijk van de gebruikte meettechniek, impedantie of lichtverstrooiing, is een toename (6) of een afname (7) meetbaar. Naar mate gestabiliseerd bloed meer overeenkomst heeft met vers bloed, zal het probleem van de stabiliteit toenemen.

Door het gebruik van gemiddelde waarden van erythrocyten indices, afkomstig van patiëntenpopulaties, is het mogelijk een onafhankelijke stabiele component toe te voegen aan een kwaliteitsprogramma met gestabiliseerd bloed. Tevens kunnen zowel de gebruiker alsook de producent van het gestabiliseerd materiaal problemen in de bereiding snel onderkennen (8, 9) (tabel 4).

Om een waarde voor de verschillende parameters van een gestabiliseerd bloed vast te stellen, zou de producent over het hele meetbereik van het instrument via de referentie methoden de waarden van verse bloedmonsters moeten vaststellen en vervolgens deze verse monsters en het gestabiliseerd bloed op het instrument meten. De richtwaarde voor het gestabiliseerd bloed kan als volgt worden vastgesteld:

$$\text{richtwaarde} = \frac{\text{waarde vers bloed (referentie methode)} \times \text{waarde gestabiliseerd bloed (met instrument)}}{\text{waarde vers bloed (met instrument)}}$$

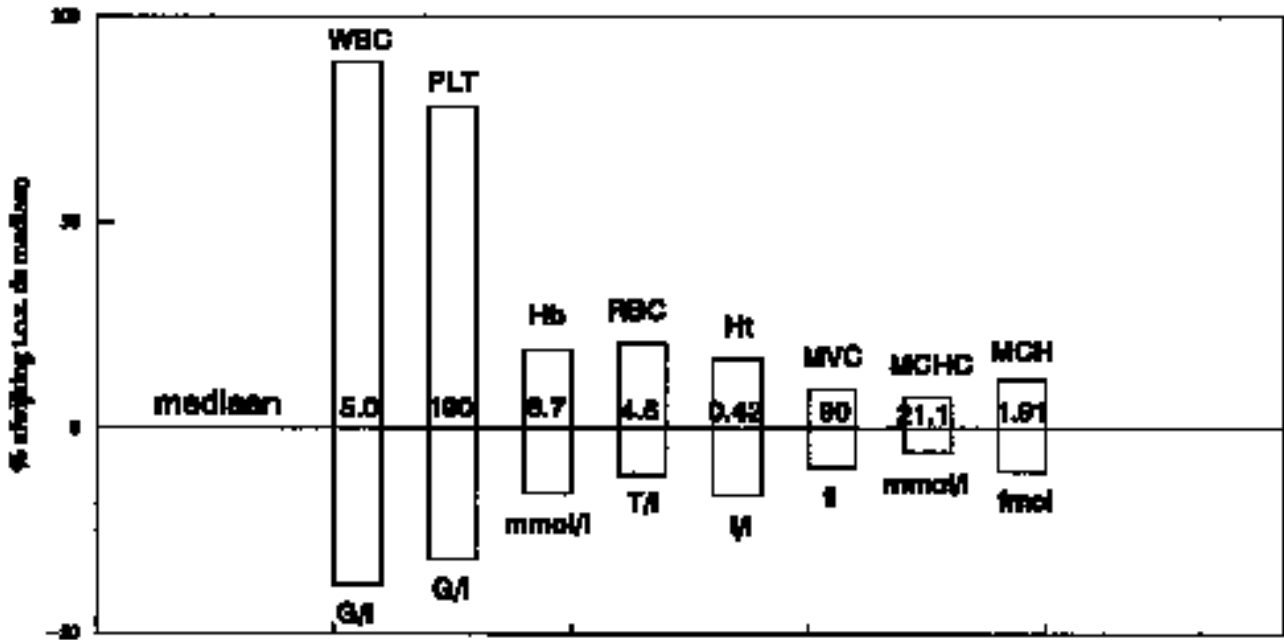
De verschillen tussen de opgegeven waarde en de op juiste wijze vastgestelde waarde kunnen vooral voor

Tabel 1. Maximaal toelaatbare onjuistheid (%)

Parameter	lage bereik	midden bereik	hoge bereik
WBC	± 14,6	± 14,6	± 14,6
RBC	± 6,1	± 5,3	± 5,0
Hb	± 6,4	± 4,5	± 5,4
MCV	± 4,9	± 4,2	± 4,4
PLT	± 22,0	± 22,0	± 22,0

Klinisch Chemisch Laboratorium, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Correspondentie: Drs. F.J.L.M. Haas, Klinisch Chemisch Laboratorium, St. Antonius Ziekenhuis, Koekoekslaan 1, 3435 CM Nieuwegein



Figuur 1. Betrouwbaarheidsintervallen (2,5%-97,5%, N = 411 ♀) voor de inter-individuele biologische spreiding van de hemocytometrische parameters.

Tabel 2. Limieten voor de spreiding (%)

Parameter	lage bereik		midden bereik		hoge bereik	
	VC	D duplo*	VC	D duplo	VC	D duplo
WBC	2,83	± 12,0	2,83	± 12,0	2,83	± 12,0
RBC	1,13	± 4,8	0,87	± 3,7	0,90	± 3,8
Hb	1,33	± 6,8	0,70	± 3,0	1,00	± 4,2
MCV	1,00	± 4,2	0,77	± 3,3	0,83	± 3,5
PLT	3,50	± 14,8	3,50	± 14,8	3,50	± 14,8

*: maximaal verschil tussen twee metingen: $3\sqrt{2} \cdot VC$ (bereik afhankelijk).

Tabel 3. Invloed van de analytische VC op de totale VC (%)

Parameter	Optimale analyt VC	Biologische VC*	Totale VC	Bijdrage analyt VC op totale VC
WBC	2,80	13,7	14,0	2,2
RBC	0,87	3,7	3,8	2,7
Hb	0,70	3,0	3,1	3,3
MCV	0,77	1,6	1,8	12,5
PLT	3,50	8,0	8,7	8,8

*: intra-individueel

Tabel 4. Fouten bij metingen met gestabiliseerd bloed (%)

problemen met gestabiliseerd bloed	15
problemen met de analyser	19
foutieve kalibratie	33
overige fouten	33

de leucocyten en trombocyten erg groot zijn, tot ruim 20 % voor leucocyten en 40 % voor trombocyten, afhankelijk van de gebruikte gestabiliseerde celsuspensie en apparatuur (10). De variatie in gebruikt gestabiliseerd materiaal veroorzaakt mede de hoogte van het verschil tussen opgegeven waarde en de op de juiste wijze vastgestelde waarde. Zo kunnen voor de erythrocytentelling en volumemeting gestabiliseerde humane erythrocyten, zoals Stabiccels (11), gefixeerde

humane erythrocyten of latex deeltjes worden gebruikt. Voor de leucocyten telling kunnen eveneens gestabiliseerde humane erythrocyten worden gebruikt, alsmede gefixeerde vogelerythrocyten, humane of zoogdier leucocyten. Voor de trombocyten telling kunnen gefixeerde humane trombocyten worden toegepast, maar meestal worden gefixeerde zoogdier (varkens) trombocyten verwerkt. Het gebruik van gekalibreerde latex deeltjes, te verkrijgen via het Standaardisatie Bureau van Europese Gemeenschap (BCR), biedt de mogelijkheid de volume meting van erythrocyten beter te standaardiseren (12). De commerciële gestabiliseerde controle materialen zijn veelal bestemd voor een specifieke apparatengroep, maar voor de onderlinge vergelijkbaarheid is er grote behoefte aan universeel controle bloed.

Tabel 5. Vergelijking van de items

1. aard materiaal
2. producent
3. ervaring met programma
4. omvang van programma
5. stabiliteit batch c.q. geopend flesje
6. voor welke apparatuur beperkingen
7. verpakkingsvorm
8. resultaat insturen
9. resultaat verwerking
10. rapportage

Tabel 6. J.T. Baker

1. RBC: gestabiliseerde humane ery's
WBC: gefixeerde humane ery's
PLT: zoogdier trombo's
(donorcontrole vlg's FDA normen)
2. producent: bereiding + uitvullen in Amerika vls specs
3. 37 lots, d.i. 9 jaar ervaring
4. circa 120 inzenders
5. stabiliteit: 110 dagen (=13+2 weken) gesloten
twee weken geopend
6. Sysmex NE 8000 geeft problemen
7. 2,5/8 ml schroefdop
2,5/4,5 ml doorprikdop
8. invulformulier
9. resultaat eerste week opsturen
10. cum overzicht laatste vier rondzendingen plus uitgebreide uitwerking laatste periode

Door het gebruik van gefixeerd humaan volbloed in het Addenbrooke's Hospital (Cambridge), regionale kwaliteitsprogramma (13,14) bleken er duidelijke verschillen te bestaan tussen de apparaatgroepen Coulter (Isoton III), Technicon H1/H2, Sysmex K1000 en Sysmex NE8000. De grootste verschillen werden gevonden in de waarden van MCV en WBC, waarbij de Coulter waarden steeds het hoogst waren. De MCV meting echter van de Sysmex NE8000 is

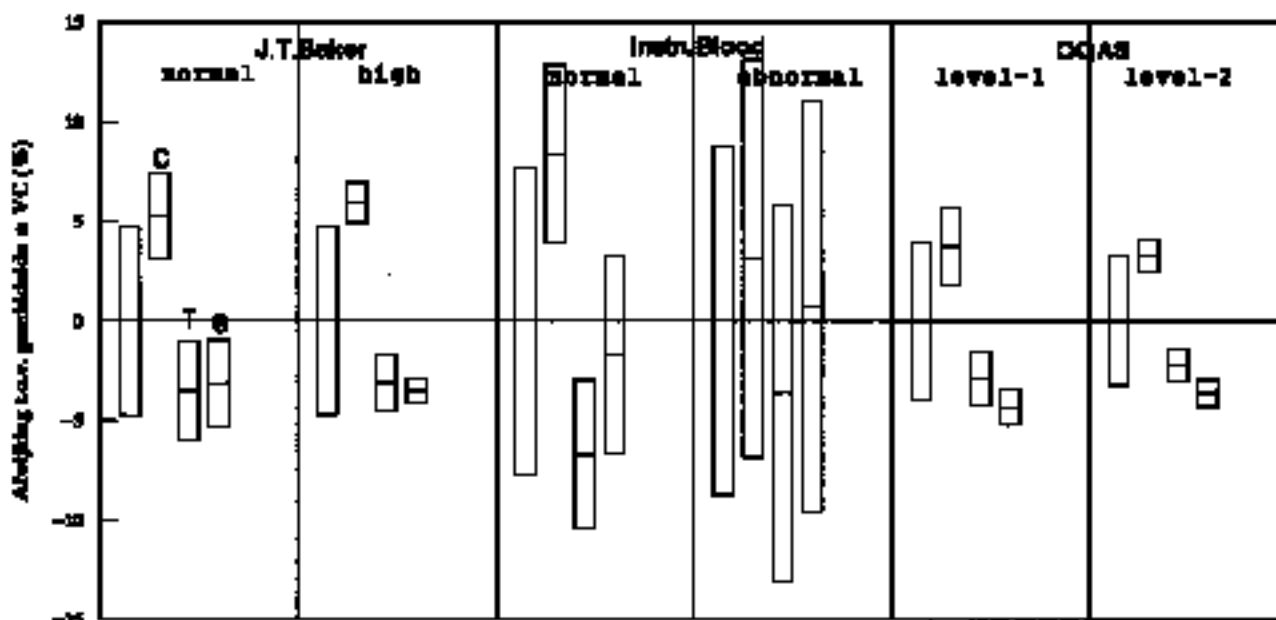
Tabel 7. InstruBlood

1. RBC: gefixeerde humane ery's
WBC: gefixeerde humane leuco's (voorheen ery's)
PLT: gefixeerde humane trombo's
Herkomst: Nederlandse en Duitse bloedbanken
verlopen eryconc. en verse of verlopen buffy coats
2. Bereiding door Analytics B.V., Delfzijl
3. ervaring sinds 1986
4. circa 60 inzenders
5. stabiliteit: 105 dagen (=13+2 weken) gesloten
2 weken geopend
6. universeel
7. 3/6 ml schroefdop
8. invulformulier
9. duplo resultaten eerste week opsturen (Winterswijk)
10. uitwerking laatste periode
eigen initiatief VKCN: verwerking via SKZL

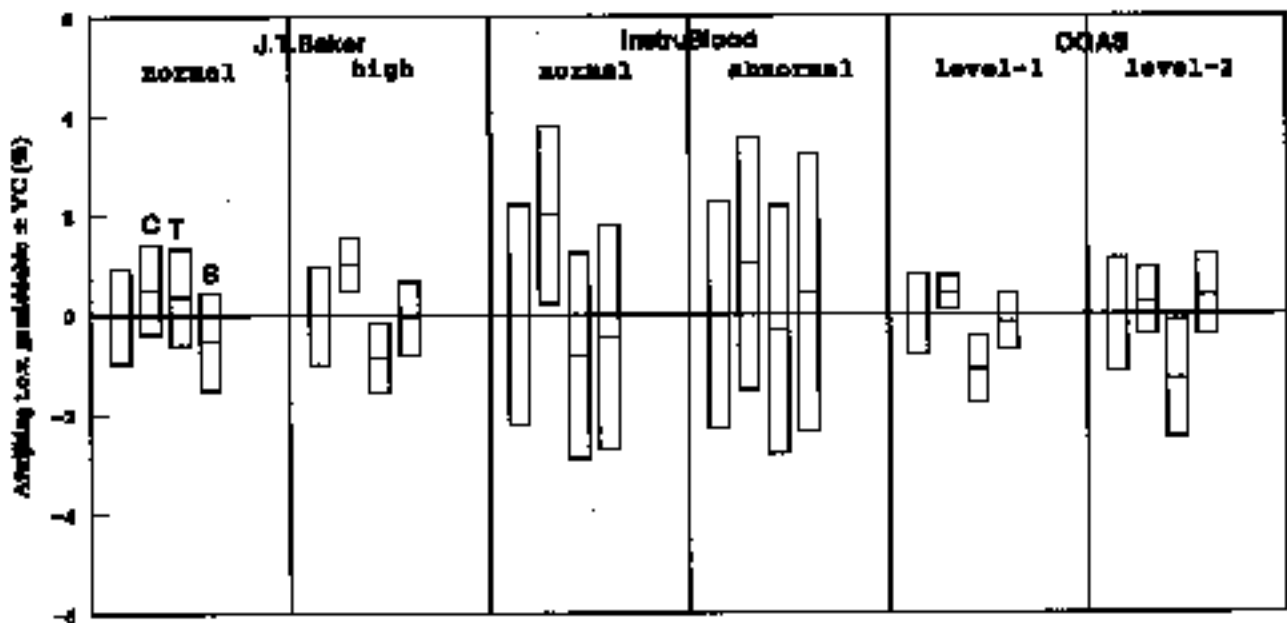
Tabel 8. OQAS

1. RBC: gestabiliseerde humane ery's
WBC: gefixeerde runder granulocyten (voorheen vogelery's)
PLT: gefixeerde varkenstrombo's
(donorcontrole vlg's FDA normen)
2. Bereiding R&D Amerika, uitvullen Ortho Duitsland
3. circa 15 jaar zes weeks programma
sinds 1991 een 12 weeks programma
4. circa 340 deelnemers (50 Benelux)
5. stabiliteit: 100 dagen gesloten
een week geopend
6. universeel
7. 3,6 ml schroefdop
8. aanstreeppformulier (Levey-Jennings), diskette, modem
9. resultaten eerste, t/m zesde en t/m twaalfde week
10. resultaten eerste week, resultaten t/m zesde week
resultaten t/m twaalfde week plus cum rapportage zes
voorgaande perioden lab/system, lab/all en system/all

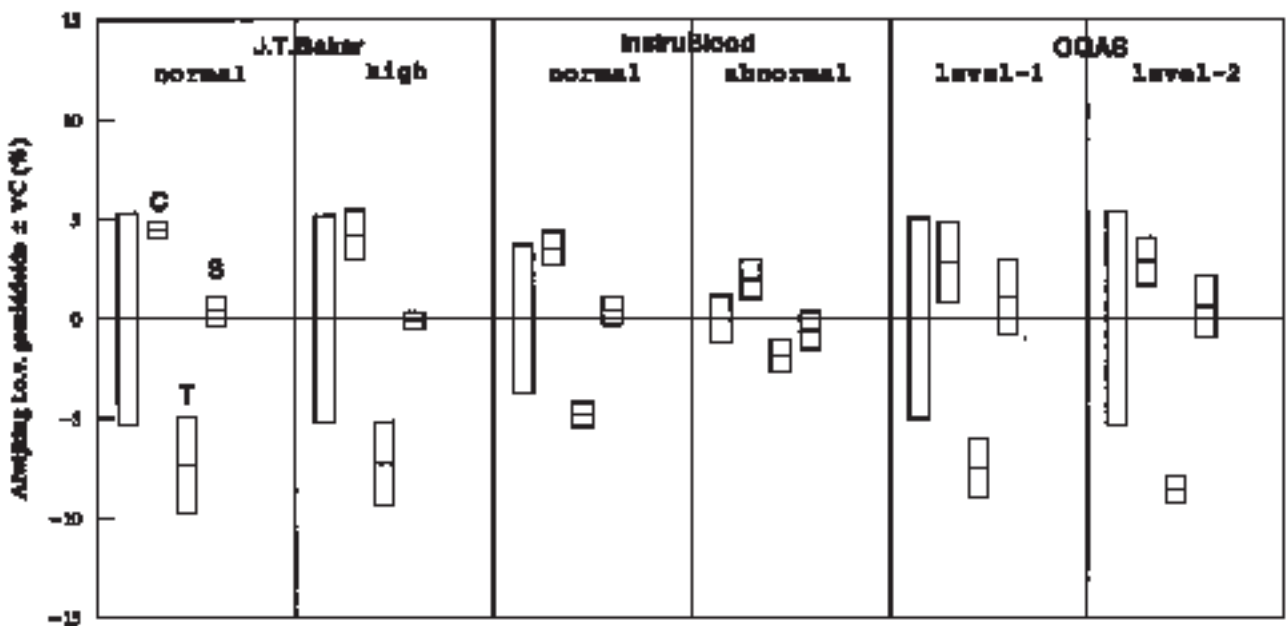
met de hoogste waarden sterk afwijkend, waardoor een aparte indeling nodig was.



Figuur 2. De gemiddelde ligging en spreiding van de de Coulter (C), Technicon (T) en Toa Sysmex (S) WBC meetresultaten voor de twee niveaus van de drie controlematerialen t.o.v. alle deelnemers.



Figuur 3. De gemiddelde ligging en spreiding van de de Coulter (C), Technicon (T) en Toa Sismex (S) RBC meetresultaten voor de twee niveaus van de drie controlematerialen t.o.v. alle deelnemers.



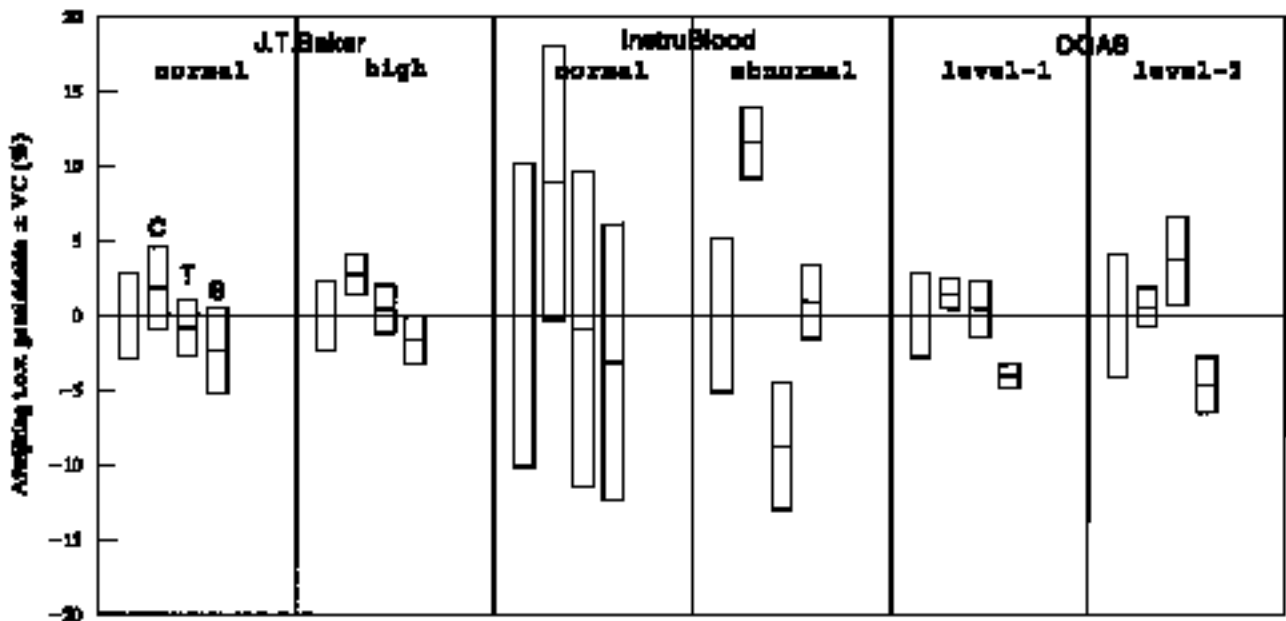
Figuur 4. De gemiddelde ligging en spreiding van de de Coulter (C), Technicon (T) en Toa Sismex (S) MCV meetresultaten voor de twee niveaus van de drie controlematerialen t.o.v. alle deelnemers.

De resultaten van de Nederlandse regionale (VHL) en landelijke (SKZL) kwaliteitscontrole wijken hiervan af, omdat daarbij niet wordt gewerkt met gefixeerd bloed (zie J. de Jongh-Leuvenink et al. in dit tijdschrift).

MATERIAAL EN METHODEN

Om inzicht te krijgen in het gebruik van gestabiliseerd bloed in de interne kwaliteitsbewaking in Nederland en de daarmee verkregen resultaten, is voor de drie meest gebruikte programma's: Rapid Stat/J.T. Baker - Deventer, InstruBlood/Instruchemie - Hilversum en OQAS/Ortho Diagnostic Systems - Beersse (B), en de drie meest gebruikte apparaten: Coulter,

Technicon en Toa Sismex een vergelijking opgezet. De vergelijking is in samenwerking met de betrokken leveranciers van het controle bloed uitgevoerd, waarbij een aantal items nader zijn bekeken (tabel 5 t/m 8). Voor de vergelijking van de meetwaarden zijn drie opeenvolgende batches vanaf begin 1994 nader onderzocht: J.T. Baker lot 134, 135 en 136 normal/high, Instruchemie 50070294/51070294, 50080894/5180894 en 50080594/5109594 normal/abnormal en Ortho periode 15, 16 en 17 level-1/2. De stabiliteit van de verschillende controlematerialen is onderzocht door alle gemeten waarden over één houdbaarheidsperiode (Y) uit te zetten tegen de tijd (X) en vervolgens de richtingscoëfficiënt van de lineaire regressie lijn te berekenen.



Figuur 5. De gemiddelde ligging en spreiding van de de Coulter (C), Technicon (T) en Toa Sysmex (S) PLT meetresultaten voor de twee niveaus van de drie controlematerialen t.o.v. alle deelnemers.

RESULTATEN EN CONCLUSIES

Er is geen vergelijking gemaakt van de Hb waarden, omdat de verschillen daarin marginaal zijn. De resultaten zijn voor WBC, RBC, MCV en PLT grafisch verwerkt in de figuren 2 t/m 5. Per parameter is per controle materiaal eerst de gemiddelde totale spreiding en vervolgens de gemiddelde ligging en spreiding voor de drie groepen Coulter (C), Technicon (T) en Toa Sysmex (S) uitgezet.

Uit de grafieken is af te lezen dat het gemiddelde voor WBC en MCV in alle gevallen $C > T/S$, voor RBC in alle gevallen $C > T$ en vijf van de zes keer $C > S$ en voor PLT in vijf van de zes keer $C > T$ en in alle gevallen $C > S$. Indien de opeenvolgende batches sterk vergelijkbaar zijn, is de spreiding klein. Omdat bij de bereiding niet altijd wordt uitgegaan van een

onderlinge vergelijkbaarheid, zoals bij InstruBlood, is de spreiding geen kwaliteitsnorm. De waarden van de richtingscoëfficiënten van de lineaire regressielijnen, als maat voor de stabiliteit, zijn vermeld in tabel 9. Indien er geen verloop van de waarden in de tijd is, zal de richtingscoëfficiënt van de lineaire regressielijn gelijk aan nul moeten zijn. De resultaten tonen aan dat bij de onderzochte batches er:

- voor WBC alleen in de combinatie J.T. Baker high/Technicon verloop plaatsvindt
- geen verloop is in de RBC waarden
- het MCV verloopt bij alle drie de controlematerialen, het sterkst voor InstruBlood zowel gemeten met de Coulter als Technicon apparatuur
- een verloop voor de PLT duidelijk aanwezig is in de combinaties J.T. Baker high/Coulter en InstruBlood normal/Technicon.

Over de bruikbaarheid van de verschillende controle materialen zal geen waarde oordeel worden gegeven. De wijze van o.a. het aanleveren van het materiaal, het insturen van de meetresultaten, en de vorm van de rapportage, alsmede de periode waarover wordt gerapporteerd, zal eventueel in combinatie met de prijs, de keuze voor deelname bepalen. Omwille van de daarvoor benodigde ruimte zijn de getoonde voorbeelden van rapportage achterwege gelaten. Belangstellenden zullen zelf met de betrokken firma's contact dienen op te nemen.

Tabel 9. Stabiliteit van het controle bloed

	Coulter STKS	Sysmex K 800	Technicon H1
<i>J.T. Baker lot 137 N / H</i>			
WBC	0.001 / 0.005	0.006 / 0.007	0.009 / 0.034
RBC	0.001 / <0.001	0.001 / 0.002	-0.002 / -0.003
MCV	0.018 / 0.043	0.017 / 0.028	0.013 / 0.025
PLT	0.033 / -0.294	0.029 / 0.040	0.029 / 0.040
<i>InstruBlood Intern 943 N / A</i>			
WBC	-0.001 / -0.001	0.004 / 0.001	0.002 / -0.008
RBC	<0.001 / <0.001	<0.001 / 0.001	-0.002 / 0.001
MCV	0.090 / 0.098	0.045 / 0.046	0.101 / 0.086
PLT	-0.091 / 0.018	0.050 / 0.030	0.243 / -0.001
<i>OQAS periode 16 LI / LII</i>			
WBC	0.001 / <0.001	-0.004 / -0.004	<0.001 / 0.001
RBC	<0.001 / <0.001	0.001 / <0.001	-0.001 / -0.001
MCV	0.030 / 0.026	0.057 / 0.056	-0.032 / 0.008
PLT	0.012 / 0.017	-0.132 / 0.031	0.002 / 0.035

De vermelde waarden zijn de richtingscoëfficiënten van de lineaire regressielijnen berekend uit de meetwaarden (Y) tegen de tijd (X).

Literatuur

1. Standard for Quality Assurance part 4: Internal Quality Control in Haematology, ECCLS Document Vol. 4, No 2, Beuth Verlag GMBH, Berlin, Köln, 1987.
2. Standard for Quality Assurance part 5: External Quality Assessment in Haematology, ECCLS Document Vol. 3, No 1, Beuth Verlag GMBH, Berlin, Köln, 1986.
3. Quality Assurance in Haematology, Lewis SM, Verwilghen RL, Baillièere Tindall, London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, 1988.

4. Thom R. Calibration in Haematology. New Approaches to Laboratory Medicine. Editor Rosalki SB, Transactions of the 2nd Merz + Dade Exploratory Seminar, Düringen, June 11 - 12, 1981; GIT Verlag Ernst Giebler, Darmstadt 1981.
5. Klee GG. Performance goals for international quality control of multichannel haematology analysers. Firts International Conference on Advances in Clinical Haematology: Current practice and future directions for quality assessment in laboratory haematology. Durham, North Carolina, 18-19 september 1989. Clin lab Haemat 1990; 12, Suppl 1: 65-74.
6. Lombarts AJPF, Leijnse B. Outdated blood and redundant buffy-coats as sources for the preparation of multiparameter controls for Coulter-type (resistive-particle) hemocytometry. Clin Chim Acta 1984; 143: 7-15.
7. Bartels PC, Roijers AFM. Effect of Aging on Preserved Red Blood Cell Populations as Measured by Light Scattering. J Clin Chem Biochem 1988; 26: 29-33.
8. Levy WC, Bull BS, Koepke JA. The Incorporation of Red Blood Cell Index Mean Data into Quality Control Programs. Am J Clin Pathol 1986; 86: 193-199.
9. Bull BS, Richardson-Jones A, Gibson M, Fimlt NZ, Twedt D. A method for the Independent Assessment of the Accuracy of Hematology Whole-Blood Calibrators. Am J Clin Pathol 1992; 98: 623-629.
10. England JM. Recommended methods for the assignment of assay values to stabilized cell suspensions. Clin lab Haemat 1990; 12, Suppl 1: 13-21.
11. Helleman PW. Het gebruik van "Stabicells" voor de kwaliteitsbewaking bij de erythrocytometrie. Tijdschrift NVKC 1983; 8: 152-153.
12. England JM, Lewis SM, Rowan RM, Thom R. Surrogate materials for calibration and control: the use of latex particles as calibrants for red cell volume measurements. Clin lab Haemat 1990; 12, Suppl 1: 55-63.
13. Reardon DM, Mack C, Warner B, Hutchinson D. A whole blood control for blood count analysers, and source material for an external quality assessment scheme. Med Lab Sci 1991; 48: 19-26.
14. Warner B, Reardon D. External quality assessment of the full blood count, and problems associated with the use of fixed blood preparations. Br J Biomed Sci 1993; 50: 96-102.

Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 156-159

Tijd- en anticoagulantia-gebonden effecten in de hemocytometrie

W. GOOSSENS en A. van ORSHOVEN

Belangrijke onnauwkeurigheden bij de analyse worden veroorzaakt door inadequate bloed/anticoagulans-verhouding en door tijdgebonden fenomenen. Anticoagulans-effecten werden simultaan nagegaan met 5 automatische analysesystemen en 8 verschillende K₂- of K₃-EDTA containers voor gezonde en hematologisch abnormale personen. In optimale condities qua bloed/anticoagulans-verhouding en tijdsduur na de bloedname worden identieke resultaten verkregen met K₂- of K₃-EDTA. Bij EDTA-concentraties boven 5 g/l bloed treden aanzienlijke verschillen op in functie van EDTA-type en analyseapparatuur, in hoofdzaak voor MCV, MPV, trombocytentelling en automatische leucocytdifferentiatie. Tijdgebonden effecten werden simultaan nagegaan met 4 automatische analysesystemen op K₂-EDTA-bloed van gezonde en hematologisch abnormale personen over een tijdverloop van 48 uur, en als initiële tijdeffecten over 1 uur vanaf bloedname. Hoewel meerdere meetgegevens tot 48 uur ongewijzigd blijven, zijn trombocytentelling, MCV, MPV, en RDW in het algemeen niet langer dan 24 uur stabiel. Duidelijke wijzigingen in de automatische leucocytaire differentiatie gebeuren vanaf 16 uur na de bloedname. Uitgesproken initiële tijdeffecten treden op voor trombocytentelling en automatische leucocytaire differentiatie. Een betrouwbaar analyseresultaat kan pas verkregen worden na 30 minuten.

Laboratorium Hematologie, Universitaire Ziekenhuizen Katholieke Universiteit Leuven, België

Correspondentie: Dr. W. Goossens, Laboratorium Hematologie, Universitaire Ziekenhuizen K.U. Leuven, Herestraat 49, B-3000 Leuven, België.

Toepassing van de meest uitgebreide kwaliteitsbewakingsprogramma's voor de hemocytometrie kan niet beletten dat een aantal monster-gebonden foutenbronnen aan de interne kwaliteitscontrole ontsnappen. Deze foutenbronnen behoren doorgaans tot de zogenaamde pré- en/of post-analytische fase van het onderzoek. Een aantal van deze fouten zijn voor de hand liggend en vermijdbaar, zoals onjuiste identificatie of onvolledige homogenisatie van het bloedmonster. Ook houding van de patiënt bij, en tijdstip van de bloedname beïnvloeden de analyseresultaten. Hiernaast echter kunnen belangrijke onnauwkeurigheden bij de analyse geïntroduceerd worden door gebruik van niet-geschikt anticoagulans of een verkeerde bloed/anticoagulans-verhouding, evenals door tijdgebonden fenomenen, zowel bij te verse als bij te oude bloedmonsters.

Anticoagulans-effecten

Routinematig worden di- en tri-kalium (K₂ en K₃) zouten van ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA) gebruikt als anticoagulans in de hemocytometrie. Als optimale concentratie wordt 1,5-2,2 g/l (3,7-5,4 mmol/l) aanvaard. Het niet-optimaal gebruik van beide EDTA-zouten kan verschillende tijd- en concentratie-afhankelijke effecten bij de basis-hematologische bepalingen veroorzaken (1-3). Het meest gekende fenomeen is verschrompeling van de erythrocyten, waardoor het MCV en bijgevolg de hematocrietwaarde gereduceerd worden. De mate van verschrompeling staat in verhouding tot de overmaat anticoagulans en is het meest uitgesproken bij het trikaliumzout (-15% bij 1,5 g K₃EDTA /l bloed; bepaling via microhematocrietcentrifuge); hierom wordt door