

Summary

Is better adjustment of analytical results between clinical laboratories achievable? Bilirubin as a model. Bakker A.J. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 62-65.

In the northern part of the Netherlands, we investigated the possibility of achieving a better adjustment of analytical results between clinical laboratories. Since a bilirubin calibrator is available in the Netherlands through the SKZL, we choose for bilirubin as a model analyte. All participating laboratories calibrated the bilirubin assay according to their daily practice. Thereafter, they assayed the three bilirubin standards together with two QC-samples. For monitoring their daily QC, all participating laboratories used the same batch QC-material. The

results show that between laboratory CV can be improved by using the same calibrator (CV = 13.7 and 11.9% before and 10.7 and 8.2% after recalibration using one of the bilirubin calibrators). Another interesting observation is that the laboratories which calibrate their bilirubin assay daily, have a inter-laboratory CV that is considerably higher (7.0 and 4.3%) than the inter-laboratory CV for the laboratories which use a constant calibration factor instead (3.6 and 1.9%). We therefore conclude that a better adjustment for analytical results between laboratories is possible. A second conclusion is that using a fixed calibration factor for bilirubin reduces the CV in comparison to a daily calibration procedure.

Keywords: bilirubin; adjustment of analytical results; calibration procedure

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 65-67

Het syndroom van Evans: een valkuil voor celtellers

M. H. de KEIJZER, W. van der MEER, A. E. J. P. MOOREN en D. W. SWINKELS

Hematologie-automaten werken volgens het principe van de impedantiemeting of m.b.v. lichtverstrooiing. Aan de hand van een patiëntje met het syndroom van Evans wordt geïllustreerd dat bij pathologische bloedmonsters met beide meetmethoden onjuiste uitslagen worden verkregen. Deze casus laat zien dat ook bij automatisering van de celtellingen door hematologie-analysers kennis van de beperkingen van deze apparatuur vereist is.

Trefwoorden: syndroom van Evans; cel-indices; celtellers; hematologie-analysers

In het verleden werden met behulp van handmethodes het hemoglobinegehalte, de hematocriet en het aantal bloedcellen van de verschillende cellijnen bepaald. Tegenwoordig worden automatische celtellers gebruikt die naast het meten en berekenen van een aantal hematologische parameters ook in staat zijn een differentiatie van de leucocyten uit te voeren. Het principe van de moderne hematologie-automaten berust op impedantiemeting of op lichtverstrooiing, al dan niet na hydrodynamische focussing van de verschillende cellen. Door het verschil in meettechniek kunnen apparaten verschillende resultaten produceren van eenzelfde bloedmonster, zeker wanneer er sprake is van pathologische monsters. Daarnaast bestaan er apparaatgebonden opties om tot een zo juist mogelijke meting te komen.

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis St. Radboud Nijmegen.

Correspondentie: Dr M. H. de Keijzer, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.
Ingekomen: 09.09.95

Aan de hand van analyses van het bloed van een patiënt met het syndroom van Evans (combinatie van door auto-antistoffen veroorzaakte trombopenie en hemolyse) wordt geïllustreerd dat het principe van de meettechniek en apparaatgebonden opties consequenties kan hebben voor de laboratoriumpraktijk.

Casus

Bij een jongetje werd elders op de leeftijd van 2 jaar en 8 maanden de diagnose idiopathische trombocytopenische purpura (ITP) gesteld. Na drie maanden werd tevens een anemie geconstateerd en een vergrote milt. Het patiëntje werd naar ons ziekenhuis overgeplaatst, waar vanwege de voortdurende hemolyse transfusies van erythrocyten en trombocyten noodzakelijk waren. Kruisproeven van donoreenheden packed cells met serum van het patiëntje waren echter positief. Onderzoek door het Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst in Amsterdam leerde dat hier sprake was van auto-agglutinatie van de erythrocyten die persisteerde na wassen met fysiologisch zout bij 37°C. Zelfs 6 maal wassen bij 45°C bleek geen afdoende resultaat te hebben. Na behandeling van de erythrocyten met dithiothreitol (DTT; inactiverend IgM antistoffen) verdween de auto-agglutinatie wel. Vanwege de sterke auto-agglutinatie is een directe anti-globuline test niet uitgevoerd. In het serum van de patiënt werden complete warmte-antistoffen van de IgM klasse aangetoond. Bloedgroep-specificiteit kon niet worden vastgesteld en incomplete warmte-antistoffen van de IgG klasse waren niet aantoonbaar. I.v.m. de beschikbaarheid van het materiaal is geen onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van koude agglutinen en hemolysinen. Ook naar auto-antistoffen tegen trombocyten is niet gezocht. De combinatie van ITP en auto-immuun hemolytische anemie door warmte-antistoffen wordt het

syndroom van Evans genoemd (1). Dit syndroom is zeldzaam en komt bij kinderen slechts sporadisch voor (2). Ook het feit dat de warmte-antistoffen van het IgM-type zijn is ongebruikelijk. Om te voorkomen dat (allo-) antistoffen werden gevormd, luidde het transfusie-advies dat het patiëntje bloed diende te ontvangen dat negatief is voor K- en E-antigenen. De behandeling bestond uit het toedienen van immunoglobulinen en onderdrukking van de immunrespons door methylprednisolone, anti-thymocytenoglobuline (ATG) en cyclosporine, echter zonder resultaat. Na splenectomie bleek de ernst van de hemolyse weliswaar verminderd te zijn, maar door de spontane bloedingen blijft het patiëntje transfusie-behoefstig. Het kind is, na drie maanden in ons ziekenhuis te zijn opgenomen, overgeplaatst naar een ziekenhuis dichterbij het ouderlijk huis. Momenteel is zijn conditie redelijk, maar de prognose lijkt somber.

MATERIALEN EN METHODEN

Op het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Nijmegen St Radboud staan een Sysmex NE-8000™ (TOA, Kobe, Japan; voor cito monsters en monsters met leucocyten-differentiatie) en een H*1 Junior Technicon® (Bayer Technicon, Tarrytown, USA; voor de overige monsters). Deze laatste maakt gebruik van het principe van de lichtverstrooiing (3), terwijl de Sysmex mbv een impedantiemeting de verschillende celkenmerken kan karakteriseren (4).

De bepaling van de verschillende parameters op beide hematologie-analysers blijkt gedurende de totale opnametijd van het patiëntje zeer consistent voortdurend terugkerende discrepanties te geven. In het navolgende wordt aan de hand van een representatief bloedmonster (figuur 1 A en 1 B) op een aantal hiervan nader ingegaan.

Trombocyten

In het lage gebied ($< 30 \times 10^9/l$) zijn de trombocytentellingen van de NE-8000 meer in overeenstemming met de handtelling (in dit monster $14 \times 10^9/l$) dan die van de H*1 Junior. Het aantal trombocyten wordt door de H*1 Junior overschat, waarschijnlijk door de aanwezigheid van kleine erythrocyten. Hiervoor wordt echter wel gealarmeerd, zodat alsnog een manuele trombocytentelling of een telling na ureumbehandeling kan worden verricht om het juiste aantal trombocyten te kunnen vaststellen.

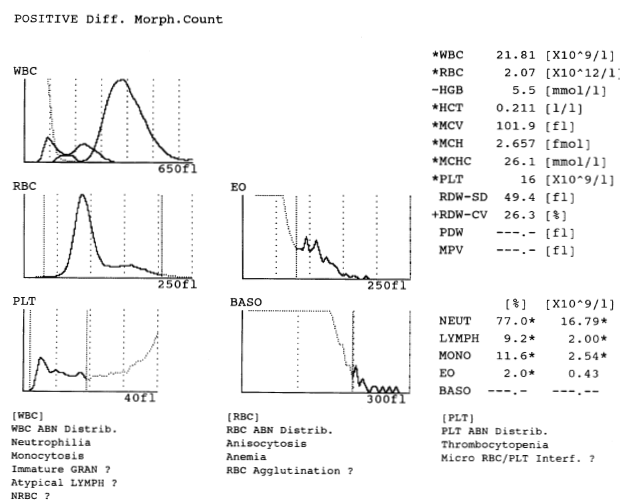
Erythrocyten

De agglutinatie veroorzaakt bij beide apparaten een onderschatting van het aantal rode bloedcellen. Het door de H*1 Junior getelde erythrocytenaantal blijkt in elk monster systematisch hoger te zijn dan het aantal getelde erythrocyten door de NE-8000. Dit wordt veroorzaakt doordat de H*1 Junior gebruik maakt van een coïncidentie-correctie.

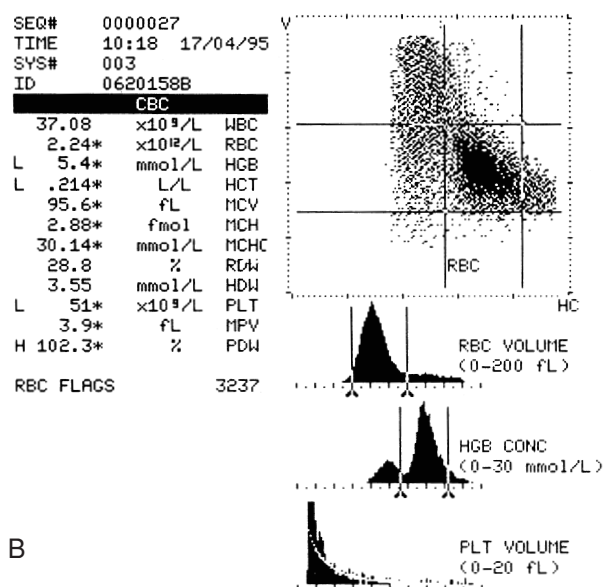
Op de uitdraai van zowel de H*1 Junior als de NE-8000 valt in de RBC- grafiek de populatie macrocytaire cellen op, die zou kunnen worden toegeschreven aan jonge erythrocyten. Hierop zal hieronder worden ingegaan.

Leucocyten

De discrepantie tussen beide hematologie-apparaten wordt veroorzaakt door het grote aantal erytroblasten (handtelling: 104 per 100 leucocyten) in dit monster. De H*1 rekent deze kernhoudende cellen tot de leucocyten. Na correctie voor het aantal erytroblasten bedraagt het H*1 Junior leucocyten-aantal $18,2 \times 10^9/l$ ($= 100/204 * 37,08$). De NE-8000 kan door te discrimineren op celgrootte de erytroblasten van de leucocyten onderscheiden.



A



B

Figuur 1. Print-outs en uitslagen van de NE-8000 (A) en de H*1 Junior (B) van een patiënt met het syndroom van Evans. De "RBC flags" (3237) van de H*1 duiden op anisocytose (+++), macrocytose (++) en hyperchromasie (+).

Hemoglobine

In het algemeen komen de uitslagen van de H*1 Junior en de NE-8000 redelijk met elkaar overeen. Opmerkelijk was bij de H*1 Junior het vóórkomen van een additionele erythrocyten-populatie met een lager hemoglobine (Hb) gehalte per cel dan normaal. Mogelijk bestaat deze populatie uit een relatief groot aantal jonge rode bloedcellen (verhoudingsgewijs grote cellen met weinig hemoglobine).

De bepaling van de Hb-concentratie kan problemen opleveren als patiënten, zoals ook dit patiëntje, parenteraal gevoed moeten worden. Zowel de NE-8000 als de H*1 Junior meten te hoge Hb-concentraties bij lipemische monsters. Met de H*1 kan de concentratie hemoglobine nog wel berekend worden uit het produkt van hematocriet en CHCM (de H*systemen hebben de mogelijkheid de Hb-concentratie per erythrocyt te meten en daarna te middelen). Ook de manuele methode levert goede resultaten als het - troebele - monster eerst gefiltreerd wordt.

Cel-indices

Tussen beide apparaten blijken aanzienlijke verschillen te bestaan voor wat betreft de mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin concentration (MCHC) en mean cell hemoglobin (MCH). Opvallend zijn de extreem hoge waarden voor met name de MCH en de MCHC. Dit wordt veroorzaakt door de agglutinatie van de erythrocyten, waardoor het aantal erythrocyten te laag wordt gemeten en de berekende celindices te hoog gerapporteerd worden (5). Het door de NE-8000 berekende MCV is aanzienlijk groter dan het MCV van de H*1 Junior. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het meetprincipe: met name bij de MCV treden verschillen op tussen op impedantie gebaseerde en op lichtverstrooiing gebaseerde methoden (6). Deze verschillen blijken toe te nemen naarmate er meer microcytaire en/of macrocytaire erythrocyten aanwezig zijn. Ook het sferisch maken van de erythrocyten bij de H*1 Junior zou hierbij van invloed kunnen zijn.

Beschouwing

Het gebruik van hematologie-analyzers is in het moderne laboratorium inmiddels gemeengoed geworden. De snelheid, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van deze apparaten is superieur vergeleken met die van de handtellingen. Toch zijn er nadelen aan het gebruik van hematologie-apparaten. Een bekend gegeven is dat de praktische kennis van de analist t.a.v. de microscopische differentiatie en de handtelling terugloopt naarmate het aantal microscopisch te differentiëren of te tellen monsters afneemt. Ook het normale bloedbeeld wordt niet meer gezien omdat de automaat hiervoor geen alarmeringen produceert. Daarnaast dreigt het gevaar dat blindelings wordt ver-

trouwd op de uitslagen van de automaat en er dus niet meer kritisch naar de afzonderlijke parameters wordt gekeken en geen gebruik meer wordt gemaakt van de diverse grafische researchschermen. Het resultaat is dat in een aantal gevallen ten onrechte geen microscopische differentiatie en/of handtelling wordt verricht en foutieve uitslagen ter beschikking van de kliniek komen.

Bovenstaande casus toont aan dat een weinig kritische instelling zou kunnen leiden tot een onjuiste interpretatie van de resultaten van de analyzer en dat zodoende foutieve uitslagen gerapporteerd dreigen te worden.

De aanschaf van een tweede analyzer met een ander meetprincipe is echter niet nodig; een kritische instelling en een gedegen besef van de mogelijkheden en de onmogelijkheden van de in gebruik zijnde analyzer is voldoende. Indien aan de juistheid van de uitslag getwijfeld wordt, kan met behulp van een handmethode alsnog de correcte waarde aan de kliniek doorgegeven worden.

Literatuur

1. Evans RS, Takahashi K, Duane RT et al. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia: evidence for a common etiology. *Arch Intern Med* 1951; 87: 48-52.
2. Pui CH, Wilimas J, Wang W. Evans syndrome in childhood. *J Pediatr* 1980; 97: 754-758.
3. Ross DW, Bentley SA. Evaluation of an automated hematology system (Technicon H-1). *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 803-808.
4. Hallawell R, O'Malley C, Hussein S, Dauer RJ, Tanti M, Wootton AM, McGrath KM. An evaluation of the Sysmex NE-8000® hematology analyzer. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 594-601.
5. Kohse KP, Wisser H. Antibodies as a source of analytical errors. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 881-892.
6. 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.

Summary

Evans' syndrome: a problem for hematology analyzers. Keijzer MH de, Meer W van der, Mooren AEJP and Swinkels DW. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 65-67.

The technology of hematology analyzers is based on impedance or on laser scattering. Both principles have their pros and cons when analyzing pathological blood samples. To illustrate this, determinations were performed with two different analyzers and blood of a pediatric patient with Evans' syndrome.

We conclude that when analyzing pathological blood samples, knowledge of the possibilities of the employed analyzer is indispensable.

Key-words: Evans' syndrome; hematology analyzers; cell indices; cell counting