

Uit de Laboratoriumpraktijk

Vaardigheidstest agglutinatie technieken

N.J. VREESWIJK¹, N. de KRAA² en M.A.M. OVERBEEKE²

De kwaliteit van de bloedgroepserologische bepalingen die op een laboratorium worden verricht, wordt bepaald door de volgende aandachtspunten:

- Keuze procedure, techniek, apparatuur en reagentia
- Betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid van de procedure
- Algemene vaardigheid van laboratoriummedewerkers
- Afleesvaardigheid van laboratoriummedewerkers

Voor het eerste punt zullen in de regel periodiek de gebruikte procedure, apparatuur en reagentia, middels een kwaliteitscontrole programma gecontroleerd worden. De procedure en techniek, die schriftelijk zijn vastgelegd in een werkvoorschrift (SOP), dienen regelmatig getoetst te worden of zij nog voldoen aan geldende richtlijnen. Dat geldt ook voor de algemene vaardigheid van de laboratoriummedewerkers. Hun vaardigheden moeten regelmatig met behulp van interne kwaliteitscontroles (zelfgemaakt of commercieel verkrijgbare) getoetst worden. Ook via externe kwaliteitscontrole (SKZL) krijgt men een indruk omtrent de totale vakkundigheid van de analisten. Voor de afleesvaardigheid (in de buisjestechniek) bestaat er geen goede optische afleesapparatuur om het onderscheid tussen een positieve en een negatieve uitslag te kunnen vaststellen. Tot nu toe blijkt het menselijk oog het beste in staat dit onderscheid te maken. Dit betekent dat de reacties niet meetbaar zijn in absolute zin, waarbij de betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid van de procedure mede afhankelijk zijn van de afleesvaardigheid van de laboratoriummedewerkers. Daarom richten we ons in dit artikel op de kwaliteit en vaardigheid van het aflezen van agglutinaties door laboratoriummedewerkers. Met de door onze beschreven standaardisatie van de vaardigheidstest kan de intra- en interanalistenvariatie objectief beoordeeld worden.

Vaardigheid van aflezen

De reproduceerbaarheid van de visuele aflezing binnen de groep analisten dient onderzocht en vastgelegd te worden. Als er te grote verschillen zijn, moet

Gamma Biologicals BV¹, CLB², Stichting Sanquin Bloedvoorziening Laboratorium Erythrocytenserologie

Correspondentie: N.J. Vreeswijk, Gamma Biologicals BV., Splinterlaan 154 b, 2352 SM Leiderdorp.
Ingekomen: 13.08.98

men besluiten om de afleestechiek middels een extra training te verbeteren. Het is raadzaam om tenminste één, doch liefst twee keer per jaar de afleesvaardigheid te inventariseren en vast te leggen. De intra- en interanalistenvariatie kan hiermee worden vastgesteld. Men kan deze procedure vergelijken met een validatie van apparatuur. Afhankelijk van de gevonden resultaten kan men besluiten om de frequentie van dit onderzoek al dan niet te handhaven of aan te passen.

Onderzoek intra- en interanalistenvariatie

Via een vastgesteld programma kan de vaardigheid van alle medewerkers bij het aflezen van agglutinaties worden geëvalueerd. Een praktische methode is het maken van een verdunningsreeks van anti-D en met behulp van Rhesus D positieve erythrocyten de IAGT uit te voeren en te beoordelen. Een tweevoudige verdunningsreeks op volgorde zal in het algemeen éénvoudig worden afgelezen. Indien men echter de verdunningen in willekeurige volgorde zet, zullen verschillen in afleesvaardigheid zichtbaar gemaakt kunnen worden. Dit wordt gedaan door de agglutinaties van dezelfde verdunningen in verschillende buizen willekeurig door elkaar te zetten en af te laten lezen door één en dezelfde analist(e) en door verschillende analisten. De uitslagen (agglutinatiescore en titer) van dezelfde analist(e) worden met elkaar vergeleken (intra-analistenvariatie) en de uitslagen tussen de analisten worden onderling vergeleken (inter-analistenvariatie). Er mag geen verschil bestaan tussen de beoordeling: positief (agglutinatie) en negatief (geen agglutinatie). Bij de beoordeling van de sterkte van de positieve reacties is een minimaal verschil aanvaardbaar (tabel 1).

Tabel 1. Normen voor de verschillen die bij intra- en interanalistenvariatie zijn toegestaan

Agglutinatiescore

4+ tot 3+: Acceptabel

3+ tot 2+: Acceptabel

2+ tot 1+: Acceptabel

1+ tot (+): Acceptabel

(+) tot 0: Niet acceptabel

> 1+ verschil: Niet acceptabel

Titratie-score

1 titratie stap verschil is acceptabel

Voor de validatie van de afleestechiek is het raadzaam om de variabelen tot een minimum te beperken. Laat daarom een verdunningsreeks in één groot volume door één en dezelfde persoon (bijv. een kwaliteitsmedewerker) maken.

Verdeel deze verdunningen in gestandaardiseerde volumina (50 µl, 100 µl etc.) en gebruik dezelfde testerythrocyten. Het onderzoek kan vanaf dit punt op twee manieren vervolgd worden. De twee mogelijkheden zijn:

- Alleen de afleesvaardigheid wordt onderzocht. De bepaling wordt ingezet door een kwaliteitsmedewerker en willekeurig genummerd. Alleen het aflezen van de reactiesterkte wordt verricht door de analisten die getoetst worden.
- De verdunningen worden gemaakt door de kwaliteitsmedewerker en willekeurig verdeeld. De volledige IAGT wordt uitgevoerd door de analisten die getoetst worden. De verdunningen worden als het ware ingezet als een patiëntenmonster en beoordeeld (beoordeling algemene vaardigheid en afleesvaardigheid)

Daar de algemene vaardigheid met een intern en extern kwaliteitscontroleprogramma al regelmatig bewaakt wordt, is in ons laboratorium gekozen om twee keer per jaar bij alle laboratoriummedewerkers alleen de afleesvaardigheid te toetsen. Zoals al eerder is aangegeven is het van groot belang om de variabelen per test tot een minimum te beperken. Daarom hebben wij deze procedure in een voorschrift verwerkt, dat hierna wordt beschreven.

Maken van een testerythrocyten suspensie

Selecteer R_{1r} (CDe/ce) erythrocyten, was deze 3 keer in een overmaat PBS. Decanteer na de derde wasstap en maak een standaard erythrocytensuspensie van 3% waarmee getest wordt. Bij de kolomtest moet een 0,8% oplossing gemaakt worden.

In de praktijk zijn er geen standaarden beschikbaar. Daarom hebben wij gekozen om met R_{1r} (CDe/ce) erythrocyten te werken. Op deze erythrocyten zijn de Rhesus D antigenen minder sterk aanwezig. Het is raadzaam om tenminste een pool van 4 R_{1r} (CDe/ce) donorerythrocyten te nemen zodat men minder last heeft van de variatie in de antigeendichtheid per donor.

Maken van een verdunningsreeks

Maak een tweevoudige verdunningsreeks in AB serum (let op dat deze ook vrij is van irregulaire erythrocytenantistoffen). Neem 200 µl polyclonaal anti-D (met een titer van 1:64) en voeg hieraan 6 ml AB serum toe, dit is de startverdunning.

Neem 12 buizen en nummer deze van 1 t/m 12. Pipetteer 2 ml AB serum in buis 2 t/m 12, pipetteer 2 ml startverdunning in buis 1 en 2, meng buis 2 en pipetteer 2 ml uit buis 2 over in buis 3. Meng buis 3 en pipetteer 2 ml uit buis 3 over in buis 4 etc. totdat buis 12 ook gevuld is. Gebruik het benodigde volume dat voor de test nodig is (bijv. 100 µl van elk van de verdunningen zoals beschreven in de testprocedure voor de IAGT in de buisjestechniek).

Buis 1 t/m 12 bevat nu een reeks met tweevoudige verdunningen, welke volgens een vaste IAGT testprocedure met de standaard Rhesus D positieve (R_{1r}) erythrocyten ingezet kan worden.

Zet de verdunningsreeks op een willekeurige volgorde in en denk er aan om extra verdunningen uit de verdunningsreeks te selecteren die een (+) en negatieve reactie te zien geven.

Codeer de buizen van A t/m L en deel de reeks in met de volgende verdunningen:

- 8 x verdunning uit de titatiereeks
- 2 x AB verdunningsmedium (= 0)
- 2 x verdunning met (+) reactie

Naam deelnemer	
Datum	
Lotnummer anti-IgG	
Lotnummer CC Cellen	

Buis nummer	Reactiesterkte
A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	
H	
I	
J	
K	
L	
Diversen c.q. opmerkingen	
Paraaf deelnemer:	

Figuur 1. Registratieformulier afleesvaardigheidstest

naam QC begeleider:	
Datum:	
datum bereiding testerytrocyten:	
datum bereiding verdunningen:	
Testmethode:	

Buis Nummer	deelnemer nummer										Uitslag
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C											0
I											1:2
A											1:4
L											1:8
E											1:16
G											1:32
B											1:64
H											1:128
J											1:256
D											1:512
F											1:1024
K											1:2048

Conclusie:

Paraaf kwaliteitsmedewerker:
Datum:

Figuur 2. Registratieformulier totaal overzicht t.b.v. vaardigheidstest agglutinatiesterkte.

Tabel 2. Indeling agglutinatiesterkte

4+ reactie :	Een groot agglutinaat in een heldere vloeistof
3+ reactie :	Enkele grote agglutinatien in een heldere vloeistof
2+ reactie :	Veel gelijkmatige agglutinatien in een heldere vloeistof
1+ reactie :	Veel agglutinatien en losse cellen, vloeistof is niet helder
(+) reactie :	Veel kleine agglutinatien en veel losse cellen, vloeistof is niet helder
0/- reactie :	Egale verdeling van de cellen, het sediment komt gelijkmatig los
Hemolyse :	Helder rood gekleurde vloeistof met soms weinig tot geen cellen

Testprocedure voor deelnemers

In ons laboratorium werken wij in de meeste gevallen met de buisjestechniek. Daarom hebben wij gekozen om de testprocedure in buisjes te verrichten. De procedure is aangepast. Er wordt namelijk geen agglutinatieversterker toegevoegd en de incubatie is verlengd tot 30 minuten bij 37°C. Uiteraard staat het vrij om dit onderzoek exact volgens de routine procedure (bijv. PEG-IAGT of kolomtest) te laten verlopen. Afhankelijk van de keuze of men alleen de afleesvaardigheid of ook de algemene vaardigheid wil testen kan gekozen worden dit onderdeel door de te toetsen analist(e) volledig te laten uitvoeren. Men kan er ook voor kiezen punt 1 t/m 6 door de kwaliteitsmedewerker en alleen punt 7, 8 en 9 door de te toetsen analist(e) te laten uitvoeren. De stappen zijn als volgt:

1. Nummer 12 buisjes en voeg aan ieder buisje 100 µl verdunning toe
2. Voeg 50 µl testerythrocytensuspensie toe
3. Meng en incubeer 30 minuten bij 37°C
4. Was het mengsel 3 keer in een overmaat PBS
5. Voeg 100 µl anti-IgG toe
6. Centrifugeer 1 minuut bij 120-200 g
7. Lees macroscopisch af
8. Voeg aan de negatieve reacties Coombs controlecellen toe
9. Centrifugeer 1 minuut bij 120-200 g en lees macroscopisch af. De reactie moet nu positief zijn.

Registratie

- Vul de gevonden resultaten in op een werkformulier voor de individuele deelnemer (figuur 1).
- Vul de gevonden resultaten van de verschillende deelnemers in op het totale registratieformulier, zoals bijvoorbeeld weergegeven in figuur 2.
- Beoordeel het aantal onjuist positieve of negatieve resultaten. Afhankelijk van de gevonden testresultaten kan men beoordelen wie er buiten de gestelde grenzen valt. Zo nodig kan de afleestechniek extra getraind worden. Vergeet niet de betrokken analisten zelf de resultaten te laten beoordelen en het zelfregulerend karakter te stimuleren.

Beoordeling agglutinatiesterkte

Van belang is vooraf de definitie van reactiesterkte vast te leggen. Eén van de meest gehanteerde indelingen is in tabel 2 weergegeven.

Ervaringen

Ervaring heeft ons geleerd dat dit validatiesysteem binnen de groep analisten een zelfregulerend systeem is. Belangrijk is dat de resultaten in het werkoverleg worden besproken. De uitkomsten van de testresultaten spreken voor zich en de individuele analisten zijn goed in staat hier zelf een conclusie uit te trekken.

Een half jaarlijkse validatietest biedt bovendien de medewerkers de kans om de eigen vaardigheid te toetsen, waardoor men meer zekerheid krijgt.

De beschreven procedure kan uiteraard ook worden toegepast voor die laboratoria die met een kolomsysteem of microtiterplaattechniek werken, waarbij geen automatische afleesapparatuur gebruikt wordt.

Het kan bovendien ook zinvol zijn om deze procedure te gebruiken om de huidige afleesapparatuur met de visuele beoordeling van de analisten te vergelijken.

Literatuur

1. Voak D, Downie M, Moore BP, Ford S, Engelfriet CP, Case J. Replicate Tests for the Detection and Correction of Errors in Anti-Human Globulin (AHG) Tests: Optimum Conditions and Quality Control. *Haematologia* 1988; 21: 3-162.
2. Vreeswijk NJ, Frame TH. Kwaliteitscontrole immunohematologie, versie 3 augustus 1994 Gamma Biologicals Nederland BV.
3. Anonymus. Model Kwaliteitshandboek 1e druk. Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie (NVKC), te Utrecht 1992.
4. Rhenen D van, Castel A, Dijk B van et al. Het compatibiliteitsonderzoek ten behoeve van bloedtransfusie in ziekenhuizen. *Tijdschrift NVKC* 1992; 17: 156-160.
5. Overbeeke MAM en Engelfriet CP. Bloedgroepenonderzoek, theorie en praktijk. Bohn, Scheltema en Holkema, Utrecht 1989.
6. Quinley ED. Quality Assurance Regulation and Safety in Immunohematology *Immunohematology Principles and Practice*.
7. Vreeswijk NJ, Vermeij H. Zinnvolle kwaliteitscontrole in het transfusielaboratorium. *Analyse* 1995; 50: 78-81.
8. Anonymus. Council of Europe Guide to the use, preparation and quality control of blood components, 3rd edition.
9. Philips PK, Voak D, Whitton CM, Downie M, Bebbington C. BCSH-NIBSC anti-D reference reagent for antiglobulin tests: the in house assesement of red cell washing centrifuges and of operator variability in the detection of weak macroscopic agglutination. *Transfusion Medicine* 1993; 3: 143-148.
10. Anonymus. BCSH Blood Transfusion Task Force. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Tranfusion Medicine* 1996; 6: 273-283.