

Acknowledgement

The authors thank Dr. M.J.D. van Tol, Dr. A.J. van Houte, Dr. G.T. Rijkers, Dr. F.H.J. Gmelig Meyling, A. Hannema and C. de Kat Angelino for participation in this study.

Literature

1. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM et al. New International Reference Preparation for proteins in human serum (RPPHS). Clin Chem 1994; 40: 934-938.

2. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins, CRM470. Brussels: Community Bureau of Reference, Commission of the European Communities, 1993: 1-172.
3. Evaluation of matrix effects; Proposed guideline NCCLS document EP14-P. Vol 18, No 2, April 1998.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 162-165

Automatische detectie van linksverschuiving en onrijpe granulocyten door de Sysmex SE-9000 hematologieautomaat: waarde van het IMI-kanaal bij de leukocytendifferentiatie

J.J.H. HENS en R.J. KRAAIJENHAGEN

De sensitiviteit en specificiteit van de automatische melding voor linksverschuiving en aanwezigheid van onrijpe granulocyten in de leukocytendifferentiatie werden onderzocht op de Sysmex SE-9000 hematologieautomaat. In 298 bloedmonsters afkomstig van zowel klinische als poliklinische patiënten is een leukocytendifferentiatie van het perifere bloed uitgevoerd. Als standaard methode voor leukocytendifferentiatie is gebruik gemaakt van de microscopische beoordeling van 100 leukocyten in bloeduitstrijkjes. De sensitiviteit en de specificiteit van linksverschuiving op de SE-9000 bedragen respectievelijk 100% en 80%; voor de aanwezigheid van onrijpe granulocyten respectievelijk 70% en 86%. Wij concluderen dat de automatische melding "Linksverschuiving" en "Aanwezigheid van onrijpe granulocyten" door de SE-9000 beperkt bruikbaar is bij het reduceren van het aantal uit te voeren microscopische leukocytendifferentiaties.

Trefwoorden: automatische leukocytendifferentiatie; Sysmex SE-9000; IMI-kanaal; linksverschuiving; onrijpe granulocyten

De leukocytendifferentiatie wordt voornamelijk ten behoeve van infectiediagnostiek veelvuldig gebruikt (1). Bij bacteriële infecties kunnen leukocytose met linksverschuiving, toxische korreling, vacuolisatie en lichaampjes van Döhle worden waargenomen; bij virale infecties komt vaak lymfocytose voor. Door toepassing van automatische telapparatuur is het mogelijk grote aantallen leukocyten te tellen en deze

op soort en ontwikkelingsstadium te differentiëren. Hierdoor is de precisie van de huidige celtelapparatuur superieur aan die van de microscopische beoordeling van de leukocytendifferentiatie (2). Of dit ook voor de juistheid van de leukocytendifferentiatie geldt valt te bezien.

Hoewel de Sysmex SE-9000 hematologieautomaat al sinds 1994 op de markt is en een aantal bijzondere mogelijkheden biedt ten aanzien van het signaleren van onrijpe granulocyten, is het tot op heden nog steeds niet zo dat de microscopische differentiatie van leukocyten door de automatendifferentiatie te vervangen is. De in deze studie onderzochte SE-9000 genereert bij de leukocytendifferentiatie van het perifere bloed voor "Linksverschuiving" en "Aanwezigheid van onrijpe granulocyten" twee afzonderlijke resultaten, namelijk een zogenaamde Q-flag voor "L-shift?" en "Imm. gran?". De SE-9000 maakt bij de bepaling hiervan in belangrijke mate gebruik van het zogenaamd IMI-kanaal, waarbij IMI de afkorting is van *IM*mature *IN*formation. Voor deze studie hebben wij ons de vraag gesteld in hoeverre de door de Sysmex SE-9000 hematologieautomaat gedetecteerde linksverschuiving en aanwezigheid van onrijpe granulocyten klinisch te gebruiken zijn en de arbeidsintensieve microscopische differentiatie zouden kunnen vervangen (3).

MATERIAAL en METHODEN

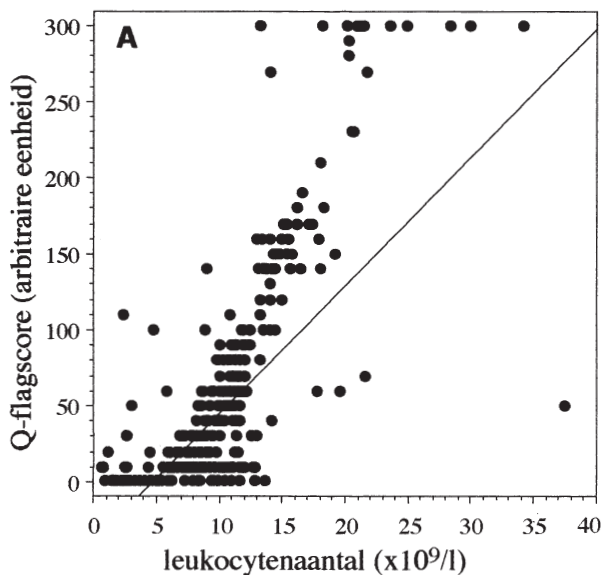
In bloed, afgenomen in 3 ml K₃-EDTA vacutainers, werd binnen vier uur een leukocytentelling en -differentiatie uitgevoerd met een 7-kanaals Sysmex SE-9000 hematologieautomaat (Toa Medical Instruments, Kobe, Japan). Van alle monsters zijn eveneens bloeduitstrijkjes gemaakt, waarin na fixatie en kleuren volgens de methode van May-Grünwald Giemsa, 100 leukocyten microscopisch zijn gedifferentieerd (4). Elk monsterpreparaat is door één routine analist

Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort

Correspondentie: Dr. J.J.H. Hens, Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Postbus 1502, 3800 BM Amersfoort. Ingekomen: 13.01.00

uit een groep van tien beoordeeld en door één van twee gespecialiseerde analisten gecontroleerd. De SE-9000 maakt voor de leukocytdifferentiatie gebruik van het zogenaamd DIFF(erentie)- en IMI-kanaal, waarin door een combinatie van impedantie-technieken in een gelijkstroomveld, radiogolven en voorbehandeling met lyseerreagentia differentiatie plaats vindt. Door per getelde leukocyt op de X-as het celvolume bepaald in het gelijkstroomveld, uit te zetten tegen de kerngrootte en dichtheid, gemeten met behulp van radiogolven, op de Y-as ontstaat een scattergram. Door vervolgens clusteranalyse toe te passen op het DIFF-scattergram worden lymfocyten, monocyt en granulocyten kwantitatief gedifferentieerd. Clusteranalyse van het IMI-scattergram resulteert in differentiatie van de onrijpe granulocyten, i.e.: staafkernige granulocyten, (pro/meta)myelocyten en myeloblasten. De SE-9000 genereert een zogenaamde Q-flagmelding wanneer door de fabrikant ingeprogrammeerd algoritmen, waarbij resultaten uit de clusteranalyses van zowel het DIFF- als IMI-scattergram worden gebruikt, resulteren in een arbitraire score >100 (minimum: 0 - maximum: 300) voor linksverschuiving ("L(ef)t-shift?") en voor aanwezigheid van onrijpe granulocyten ("Imm. gran?"). Wij spreken van linksverschuiving bij een aantal staafkernige granulocyten >0,6 x10⁹/l en van onrijpe granulocyten bij aanwezigheid van één of meer (pro/meta)myelocyten in de microscopische beoordeling van een bloeduitstrijkje. Een vollediger en bredere omschrijving van linksverschuiving is de aanwezigheid van staafkernige granulocyten (>0,6 x10⁹/l) en/of één of meer (pro/meta)myelocyten in de microscopische beoordeling (3). De fabrikant van de SE-9000 houdt de nauwere begripsomschrijving aan voor "L-shift?" en "Imm. gran?".

In het onderzoek zijn 298 patiëntenmonsters geïncludeerd, waarvan 112 minimaal één verhoogde Q-flagmelding voor linksverschuiving of onrijpe granulocyten te zien gaven. Vijfenvestig patiëntenmonsters zijn geïncludeerd op afwezigheid van enige melding



Tabel 1. Correlatiecoëfficiënten en bias in leukocytdifferentiatie per leukocyttype tussen de SE-9000 hematologieauto-maat en 100-cellen microscopische beoordeling. De bias ("paired-difference analysis") is per celtype uitgedrukt als het gemiddelde verschil tussen de SE-9000- en microscopische telling. Tussen haakjes is de standaarddeviatie vermeld.

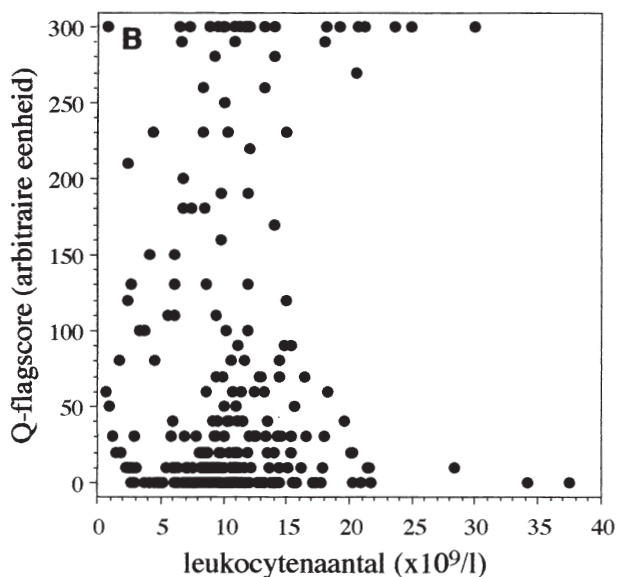
Leukocyttype	Correlatie coëfficiënt	Bias (SD) x10 ⁹ /l
Neutrofiële granulocyt	0,981	-0,0400 (0,6717)
Lymfocyt	0,963	-0,2211 (0,6778)
Monocyt	0,520	0,2638 (0,3446)
Eosinofiele granulocyt	0,645	0,0400 (0,1758)

van abnormaliteiten bij analyse door de SE-9000, die tot het uitvoeren van een microscopische beoordeling aanleiding geeft. Van de 298 monsters waren 31 afkomstig van patiënten met een leeftijd <1 jaar en 33 van patiënten met een leeftijd tussen 1 en 12 jaar.

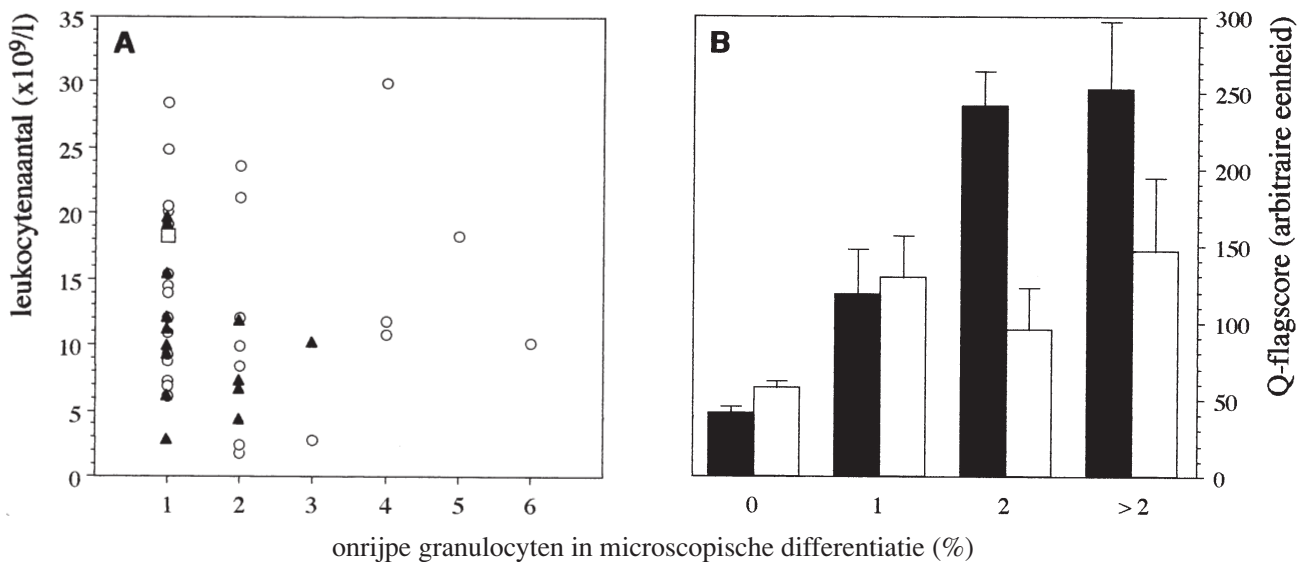
RESULTATEN en DISCUSSIE

In totaal zijn van 298 patiëntenmonsters leukocyten-differentiaties uitgevoerd door de SE-9000 hematologieauto-maat en door microscopische beoordeling van 100 leukocyten in bloeduitstrijkjes. De correlatie en bias tussen beide methoden zijn berekend aan de hand van de absolute testresultaten - dit omdat het klinisch belang van absoluut verhoogde leukocyten-aantallen doorgaans groter is dan voor procentuele afwijkingen - voor neutrofiële en eosinofiele granulocyten, lymfocyten en monocyt (tabel 1). Omdat de tellingen voor basofiele granulocyten in onze monsters altijd <0,15 x10⁹/l was is dit celtype buiten deze analyse gehouden. Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat beide methoden klinisch vergelijkbare uitkomsten geven voor de genoemde celtypen in de leukocytdifferentiatie.

Vervolgens zijn de gevoeligheid en juistheid van de Q-flagmeldingen op de SE-9000 bestudeerd. Er blijkt



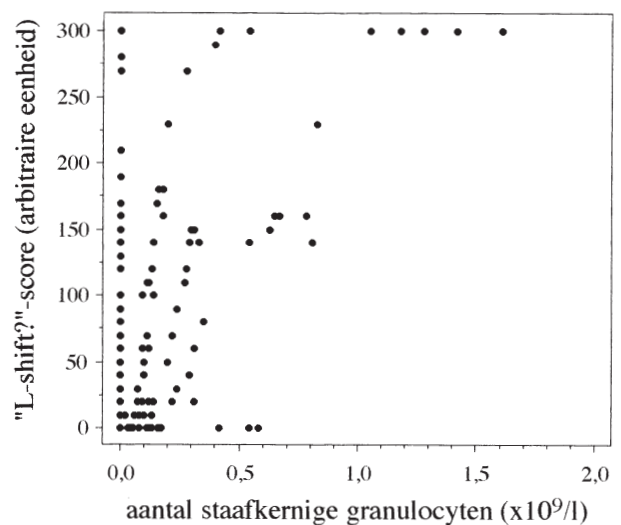
Figuur 1. Het verband tussen het leukocytenaantal en de Q-flag "L-shift?"- (A) en "Imm. gran?"-score (B) bij leukocytdifferentiatie op de SE-9000. De lijn in panel A geeft de correlatie weer: $y = 11,1x - 52,9$ ($r^2 = 0,580$).



Figuur 2. Het aantal waargenomen onrijpe granulocyten bij microscopische differentiatie van 100 leukocyten uitgezet tegen het leukocytenaantal (A) en de Q-flagscore (B) op de SE-9000. A: Bij de differentiatie van de onrijpe granulocyten is onderscheid gemaakt tussen metamyelocyten (cirkels), myelocyten (driehoeken) en promyelocyten (vierkant). B: De Q-flag "L-shift?"- (witte balken) en "Imm. gran?"-score (zwarte balken) zijn weergegeven als gemiddelden \pm SEM ("0" n=261; "1" n=16; "2" n=14; ">2" n=7).

een positief evenredig verband te bestaan tussen het totaal aantal leukocyten en de hoogte van de "L-shift?"-score (figuur 1A), terwijl dit niet het geval is voor de Q-flag "Imm. gran?" (figuur 1B). Een "L-shift?"-score >100 kwam in minder dan 3% voor bij leukocytenaantallen <10 x10⁹/l en was nooit >150. Een "L-shift?"-score >150 kwam in minder dan 4% voor bij leukocytenaantallen <15 x10⁹/l. Anderzijds bleek het aantal staafkernige granulocyten van meer dan 0,6 x10⁹/l, respectievelijk meer dan 0,9 x10⁹/l slechts voor te komen bij leukocytenaantallen van meer dan 12 x10⁹/l, respectievelijk meer dan 15 x10⁹/l. (Pro/meta)myelocyten werden in 37 microscopische differentiaties gevonden en vertoonden geen relatie met het leukocytenaantal op de SE-9000 (figuur 2A). De SE-9000 detecteerde hiervan 15 (41%) met een "L-shift?"-score >100, 26 (70%) met een "Imm. gran?"-score >100, en 32 (86%) met minimaal één van beide Q-flagscores >100. De SE-9000 heeft dus 14% van de monsters met aanwezigheid van onrijpe granulocyten niet gesignaleerd. Dit resultaat dient echter met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd gezien de breedte van het betrouwbaarheidsinterval bij microscopische beoordeling van 100 leukocyten (2). In figuur 2B staat weergegeven dat de SE-9000 uitsluitend voor de Q-flag "Imm. Gran?" een significant verhoogde score (dus >100) genereert wanneer er microscopisch minimaal 2% onrijpe granulocyten worden waargenomen. Het verband tussen het absolute aantal staafkernige granulocyten berekend aan de hand van het percentage in de microscopische beoordeling en het gemeten leukocytenaantal, en de "L-shift?"-score laat zien dat linksverschuiving met >0,6 x10⁹/l staafkernige granulocyten resulteert in "L-shift?"-scores \geq 140; dit komt overeen met een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 80% (figuur 3). Bij standaardinstelling van de SE-9000 berekenden wij aan de hand van de in tabel 2 samengevatte resultaten voor de "L-shift?"-melding een sensitiviteit van 53% en een specificiteit van 82%,

uitgaande van de brede omschrijving van linksverschuiving t.w.: de aanwezigheid van staafkernige granulocyten (>0,6 x10⁹/l) en/of één of meer (pro/meta)myelocyten in de microscopische beoordeling. Voor de "Imm. Gran?"-melding vonden wij een sensitiviteit van 70% en een specificiteit van 86%. Tevens is nagegaan wanneer de SE-9000 een foutieve "L-shift?"- of "Imm. gran?"-melding genereerde. Bij vier patiënten waarbij microscopisch één of twee erythroblasten gevonden werden, genereerde de SE-9000 een "Imm. gran?"-score >100. Bij drie van deze patiënten waren microscopisch geen linksverschuiving of onrijpe granulocyten terug te vinden. Overigens waren bij deze vier patiënten de Q-flagscore voor blasten 0 en die voor kernhoudende erythroblasten <100. Een fout-negatieve Q-flagmelding voor



Figuur 3. Het verband tussen het aantal staafkernige granulocyten in de microscopische leukocyten-differentiatie en de "L-shift?"-score. Het aantal staafkernige granulocyten is berekend aan de hand van het percentage staafkernige granulocyten in de microscopische beoordeling en het door de SE-9000 bepaalde leukocytenaantal.

Tabel 2. Resultaten van het SE-9000 Q-flagsysteem ten opzichte van de microscopische leukocytdifferentiatie. De "L-shift?"-melding is getoetst aan het criterium aanwezigheid van staafkernige granulocyten ($>0,6 \times 10^9/l$) en/of één of meer (pro/meta)myelocyten in de microscopische beoordeling (breed) en het criterium een aantal staafkernige granulocyten $>0,6 \times 10^9/l$ (nauw). Als criterium voor de "Imm. gran?"-melding is uitgegaan van de aanwezigheid van één of meer (pro/meta)myelocyten in de microscopische beoordeling van een bloeduitstrijkje.

Q-flagmelding	Fout positief	Terecht positief	Fout negatief	Terecht negatief
"L-shift?" (breed)	46 (15,4 %)	24 (8,0 %)	21 (7,1 %)	207 (69,5 %)
"L-shift?" (nauw)	58 (19,5 %)	12 (4,0 %)	0 (0 %)	228 (76,5 %)
"Imm. gran?"	36 (12,1 %)	26 (8,7 %)	11 (3,7 %)	225 (75,5 %)

kernhoudende erythroblasten dus, hetgeen overeenkomt met onze bevindingen op de SE-9000 bij geringe neonatale erythroblastose. Bij twee patiënten met myeloblasten genereerde de SE-9000 naast een verhoogde Q-flagscore voor myeloblasten, een maximale "Imm. gran?"-score. Deze patiëntenmonsters zijn echter vanwege andere analyseproblemen op de SE-9000 buiten deze studie gehouden. Voor de Sysmex NE-8000 is gepubliceerd dat in bloedmonsters van verschillende patiënten met acute leukemiën en afwezigheid van een blastmelding andere meldingen tot het uitvoeren van een microscopische beoordeling aanleiding gaven (5). Studies rapporteren een sensitiviteit van 88% (NE-8000) en 91% (SE-9000) en specificiteit van 96% (NE-8000) voor de Q-flag blastmelding (5, 6). In een recente studie uitgevoerd in een kankercentrum, waarbij patiëntenmonsters zijn geanalyseerd waarvan ruim 80% maligne cellen en/of onrijpe granulocyten bevatten, gaf de SE-9000 in bijna 10% van de gevallen geen analyseresultaat voor de leukocytdifferentiatie, hetgeen als nadelig werd ervaren (6). Tenslotte, konden wij geen verband vaststellen tussen de mate van toxische correlatie en de "L-shift?"- of "Imm. gran?"-score: in de microscopische beoordelingen waarin geen linksverschuiving en/of onrijpe granulocyten werden aangetroffen bleven zowel bij de beoordeling licht- (n=23) als matig toxische beeld (n=6) van de granulocyten de Q-flag "L-shift?"- als "Imm. gran?"-score onder de 100.

In het basofiele granulocyten meetkanaal van de SE-9000 bleek relatief vaak een specifiek analyseprobleem bij de leukocytdifferentiatie op te treden (37 van de 253 monsters; 15% van alle microscopische leukocytdifferentiaties). Bij microscopische beoordeling van deze 37 monsters bleek zonder uitzondering het aantal basofiele granulocyten echter normaal. Het leukocytenaantal ($16,0 \pm 1,1 \times 10^9/l$) en de "L-shift?"-score (141 ± 15) en "Imm. gran?"-score (114 ± 22) bleken wel verhoogd in deze patiëntenmonsters (gemiddelde \pm SEM). Bij nadere bestudering van de histogrammen waarin het aantal versus het cytoplasmatische volume van de basofiele granulocyten is uitgezet, bleek dat de automatische discriminator in het basofiele granulocytenkanaal niet gewerkt had omdat deze >200 fl lag. Dit analyseprobleem is storend te meer omdat de waarnemingen uit het basofiele granulocyten meetkanaal bijdragen aan de uitkomst van de algoritmen die resulteren in de Q-flag "L-shift?"- en "Imm. gran?"-score. Andere rapporten melden zelfs 20% verlies van data uit het basofiele granulocyten meetkanaal op de SE-9000 (7).

Conclusie

Wij concluderen dat de automatische meldingen voor linksverschuiving (Q-flag "L-shift?") en aanwezigheid van onrijpe granulocyten (Q-flag "Imm. gran?"), zoals standaard gegenereerd door de SE-9000 hematologieautomaat, beperkt bruikbaar zijn bij het reduceren van het aantal uit te voeren microscopische leukocytdifferentiaties, dat momenteel ongeveer 40% betreft van de 600 tot 700 wekelijkse aangevraagde leukocytdifferentiaties in onze populatie.

Literatuur

1. Broek PJ van den, Radder AM, Hermans J. De betekenis van lichaamstemperatuur, bezinking, C-reactief proteïne, leukocytenaantal en -differentiatie voor de diagnostiek van infecties op een eerste hulp afdeling voor inwendige geneeskunde. *Ned Tijdschr Geneesk* 1990; 134: 2536-2540.
2. Rümke ChrL. De nauwkeurigheid van percentages; een nomogram voor de bepaling van 95%-betrouwbaarheidsintervallen. *Ned Tijdschr Geneesk* 1983; 127: 885-888.
3. Berg GA van den, Storm H, Smit JW. Linksverschuiving zonder microscoop. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 91-93.
4. Anonymus. Aanbevelingen CCKL subcommissie hematologie, januari 1990; Hematomorfologie. Bijlage *Ned Tijdschr Klin Chem* 1991; 16: 57-67.
5. Meer W van der, Swinkels DW, Willems JL. Automatische detectie van blasten door de Sysmex NE-8000TM: een vergelijking met de H*1 Technicon. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1998; 23: 12-14.
6. Albitar M, Dong Q, Saunderson D, Lucas L, Kaabi L, Zaldivar W, Thall PF. Evaluation of automated leukocyte differential counts in a cancer center. *Lab Hematol* 1999; 5: 10-14.
7. Hübl W, Andert S, Bayer PM. Evaluation of the Sysmex SE-9000 haematology analyser. *Sysmex J Internat* 1995; 5: 85-95.

Summary

Automatic detection of left shift and immature granulocytes by the Sysmex SE-9000 haematology analyser: performance of the IMI channel in the white blood cell differential count. Hens JJH and Kraaijenhagen RJ. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 162-165.

The sensitivity and specificity for the automatic detection of left shift and immature granulocytes in the white blood cell differential count were studied using the Sysmex SE-9000 haematology analyser. White blood cell differential counts were performed in 298 whole blood samples from in- and outpatients. The 100-cells microscopic white blood cells differential was considered the reference method. The sensitivity and specificity of the SE-9000 for left shift were 100% and 80%, respectively. The sensitivity and specificity for the presence of immature granulocytes were 70% and 86%, respectively. We conclude that the automatic detection of "Left shift" and "Presence of immature granulocytes" by the SE-9000 is of limited use in the reduction of the number of microscopic white blood cell differential counts that has to be performed.

Key-words: Automatic white blood cell differential count; Sysmex SE-9000; IMI channel; left shift; immature granulocytes