

In een tweede experiment is de correlatie tussen effectieve osmolaliteit en conductiviteit, gemeten door de UF-100, onderzocht. Daarvoor is m.b.v. vriespuntverlaging de osmolaliteit van 42 patiënturines gemeten en de effectieve osmolaliteit berekend door van het meetresultaat de ureumconcentratie af te trekken. Figuur 1B laat zien dat er een goede overeenkomst is tussen de effectieve osmolaliteit en de conductiviteit: $\text{conductiviteit} = 0,043 \times \text{osmolaliteit} + 3,2$ (95% betrouwbaarheids intervallen 0,039 - 0,046 en 2,3 - 4,3), $r = 0,98$ (Spearman rank correlation).

Onze resultaten laten zien dat lysis van erythrocyten in eiwitarme oplossingen al bij licht hypotone osmolaliteiten begint. Om fout-negatieve resultaten te voorkomen moet dus de effectieve osmolaliteit van urines, die d.m.v. optische technieken (microscopie, flowcytometrie) op hematurie worden onderzocht, worden vastgelegd.

De UF-100 meet de conductiviteit tijdens de analyse van urines. De conductiviteit houdt lineair verband met de effectieve osmolaliteit (figuur 1B). Wanneer de settings van de fabrikant gebruikt worden, genereert de UF-100 een 'low reliability'-vlag bij een conductiviteit van kleiner dan 5 mS/cm (8) terwijl lysis van erythrocyten al bij 11 mS/cm, ongeveer 200 mosmol/kg, begint. Wij concluderen dat urines met een conductiviteit kleiner 11 dan mS/cm niet betrouwbaar met optische methoden op de aanwezig-

heid van erythrocyten kunnen worden onderzocht. In plaats daarvan kan de analyse met een dipstick worden uitgevoerd of om een nieuw, geconcentreerder urinemonsters worden gevraagd.

Literatuur

1. Fenili D, Pirovano B. The automation of sediment urinalysis using a new urine flow cytometer (UF-100). *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 909-917.
2. Langlois MR, Delanghe JR, Steyaert SR, Everaert KC, De Buyzere ML. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. *Clin Chem* 1999; 45: 118-122.
3. Delanghe JR, Kouri TT, Huber AR, Hannemann-Pohl K, Guder WG, Lun A, et al. The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice. *Clin Chim Acta* 2000; 30: 1-18.
4. Georgopoulos M, Schuster FX, Porpaczky P, Schramek P. Evaluation of asymptomatic microscopic haematuria-influence and clinical relevance of osmolality and pH on urinary erythrocyte morphology. *Br J Urol* 1996; 78: 192-196.
5. Vaughan ED Jr, Wyker AW Jr. Effect of osmolality on the evaluation of microscopic hematuria. *J Urol* 1971; 105: 709-711.
6. Goldwasser P, Antignani A, Avram MM. Effect of urine chemistry on red cells. *Nephron* 1991; 59: 328-329.
7. Jones BF. Urine osmolality and urinary red cell morphology. *Nephron* 1991; 59: 157.
8. Sysmex Corporation. Operator's manual fully automated urine cell analyzer UF-100. Kobe, Japan: Sysmex Corporation, September 1998.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 268-271

Digitale beeldverwerking bij de differentiatie van bloedcellen: een aanwinst voor de klinische chemie? Een evaluatie van de DiffMaster™ Octavia

R.H. TRIEPELS, I. HUISKES-BLOEMEN en C.J.A. DOELMAN

De ontwikkeling van kwalitatief hoogwaardige computer- en camerasystemen opent mogelijkheden tot automatisering van de microscopische celdifferentiatie. De DiffMaster Octavia is een geautomatiseerde microscoop waarmee via geavanceerde computersoftware op grond van optische ceileigenschappen preclassificatie van leukocyten mogelijk wordt gemaakt. Door 10 gespecialiseerde analisten zijn ruim 700 bloedpreparaten uit de dagelijkse routine met de DiffMaster geanalyseerd. Een adequate arbeidstijdsanalyse in relatie tot de manuele differentiatie en voor- en nadelen zijn nauwkeurig geregistreerd. De mate van pathologie in de te analyseren patiëntenpopulatie is bepalend voor juistheid van de DiffMas-

ter Octavia. Voor de totale leukocytenpopulatie haalt de DiffMaster een juistheid van 85%. De digitale beeldbeoordeling alsmede het gemis van de basale microscoopfuncties vereist enige gewenning van de gebruiker. Meer ervaring van de operator zal de voordelen van digitale beeldverwerking van cellen uiteindelijk zwaarder laten wegen dan de nadelen.

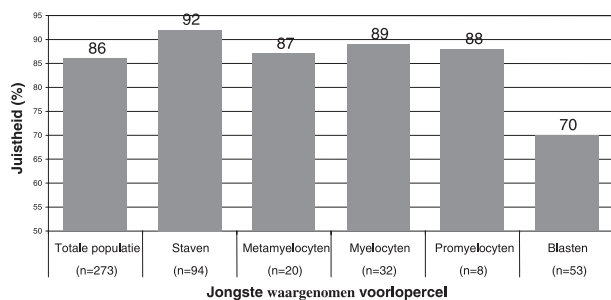
De differentiatie van witte, rode bloedcellen en trombocyten is een dagelijkse bezigheid in klinische laboratoria. De differentiatie van bloedcellen is een essentieel onderdeel van de diagnostiek van infectieziekten, hemato-oncologische afwijkingen en erfelijke erythrocytaire afwijkingen. Met de hedendaagse geavanceerde apparatuur van celtellers en de daarbij behorende automatische differentiatie met behulp van radiogolven in combinatie met weerstandsmeetings, lichtverstrooiing of lasertechnologie, is de differentiatie van bloedcellen al reeds vele jaren geautomatiseerd. Ondanks deze automatisering is de microscoop

Medisch Spectrum Twente, Enschede

Correspondentie: dr. C.J.A. Doelman, Medisch Spectrum Twente, Laboratorium, Postbus 50.000, 7500 KA Enschede
E-mail: c.doelman@ziekenhuis-mst.nl

nog steeds onmisbaar. Variërend per laboratorium blijkt naar schatting ruim 10% van de bloedmonsters niet betrouwbaar te differentiëren met behulp van de hedendaagse apparatuur. Voor deze populatie bloedmonsters is microscopische beoordeling door goed geschoolde analisten noodzakelijk. De benodigde arbeidstijd die hiervoor nodig is, is over het algemeen lang. De ontwikkeling van kwalitatief hoogwaardige computer- en camerasystemen opent mogelijkheden tot automatisering van de microscopische celdifferentiatie. Cellavision AB, (Lund, Zweden) heeft een geautomatiseerde microscoop (DiffMaster Octavia) ontwikkeld waarbij bloeduitstrijkjes systematisch worden doorgescand en digitale afbeeldingen worden gemaakt van alle kernhoudende cellen. De DiffMaster is in feite een microscoop met daarop een CCD-camera. Batchgewijs worden preparaten onder de lens gebracht, waarbij van elke passerende kernhoudende cel een digitale foto wordt gemaakt. De beelden worden opgeslagen en via geavanceerde computersoftware op grond van overeenkomstige optische ceileigenschappen vergeleken met bekende cellen uit een 'artificial neural network' database. Op grond van deze vergelijking worden de kernhoudende cellen gecategoriseerd. De analist kan alle afbeeldingen per categorie beoordelen op het computerbeeldscherm en via eenvoudige verwerking kunnen cellen eventueel anders worden ingedeeld en worden geautoriseerd. De DiffMaster kan gekoppeld worden aan het laboratoriuminformatiesysteem om zo patiëntgegevens en noodzakelijke aanvullende analysegegevens (totaal aantal leukocyten, geteld op andere apparatuur) te herkennen. Verder kan de DiffMaster naar wens worden geprogrammeerd, waarbij bijvoorbeeld het maximaal aantal te tellen cellen kan worden ingesteld. De DiffMaster is eveneens in staat om één digitale afbeelding van het bloeduitstrijkpreparaat te maken dat gelijk is aan 35 aaneengesloten gezichtsvelden van een manuele microscoop. De DiffMaster is in staat hieruit het rode bloedbeeld van commentaar te voorzien, hetgeen door de analist naar wens kan worden aangepast.

De kwaliteit en bruikbaarheid van de DiffMaster is getoetst voor de in het laboratorium van Medisch Spectrum Twente gehanteerde werkwijze met betrekking tot celdifferentiatie van witte bloedcellen. De kwaliteiten van de DiffMaster bij de verwerking van het rode bloedbeeld is niet bestudeerd en valt dan ook buiten beschouwing van dit artikel.



Figuur 1. De juistheid van de DiffMaster per type jongste voorlopercel

Materialen en methoden

Het laboratorium van Medisch Spectrum Twente beschikt over een hematologische robotstraat met twee gekoppelde Sysmex-9500-apparaten, waarmee alle differentiatieaanvragen worden verwerkt. Van de monsters die door de Sysmex-apparatuur om de één of andere reden worden aangeduid als afwijkend, wordt automatisch een uitstrijkpreparaat gemaakt met de Sysmex-SP100-apparatuur. Deze preparaten worden microscopisch beoordeeld door daarvoor gespecialiseerde analisten.

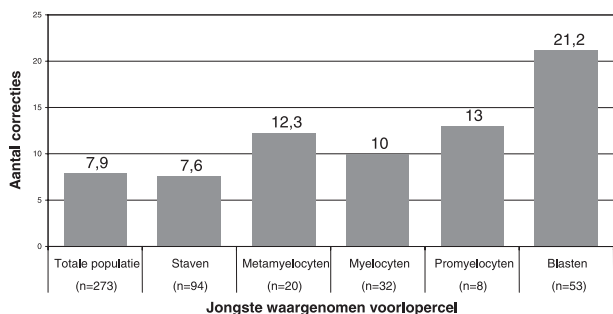
Door 10 gespecialiseerde analisten zijn in totaal ruim 700 bloedpreparaten, die op grond van uiteenlopende pathologie door de Sysmex-9500-apparatuur zijn geselecteerd uit de dagelijkse routine, zowel met de DiffMaster als microscopisch geanalyseerd. Per preparaat werden 105 bloedcellen van de witte reeks beoordeeld. Een adequate arbeidstijdanalyse en vooreen nadelen van het gebruik van de Diffmaster zijn geregistreerd. Alhoewel het overgrote deel van de difpreparaten is uitgestreken met de automatische uitstrijkapparatuur (SysmexSP100) is de vergelijking met handuitstrijken eveneens meegenomen.

Resultaten

De door de DiffMaster verkregen afbeeldingen werden softwarematig ingedeeld in de volgende groepen, lymfocyten, monocyt, neutrofiel, basofiel en eosinofiel granulocyt, staafkernig granulocyt, metamyelocyt, myelocyt, promyelocyt, blast, kapotte cel, erytroblast, artefact en reuzentrombocyt. Iedere ingedeelde cel kon in vrijwel één oogopslag worden bekeken en eventueel met een muisklik worden verschoven naar een andere groep. Het uiteindelijke resultaat van de differentiatie vindt op het einde plaats en wordt dus bepaald door de gebruiker achter het scherm. Het aantal verschuivingsacties werd softwarematig bijgehouden. Om de juistheid van de voorclassificatie van de DiffMaster te toetsen zijn 273 preparaten door één geroutineerde analist verwerkt met de DiffMaster. Over de totale populatie van 273 preparaten (27.300 digitale foto's) bereikt de DiffMaster naar het oordeel van de uitvoerende analist een juistheid van 86% (figuur 1). Wanneer de preparaten worden ingedeeld aan de hand van het type jongste voorlopercel dat in het preparaat werd waargenomen, daalt de juistheid naar 70% (figuur 1) wanneer de blast als jongste voorloper voorkomt. Het aantal correcties dat de analist per preparaat moet uitvoeren is dan vanzelfsprekend eveneens afhankelijk van de jongste voorlopercel die wordt waargenomen (figuur 2). Dit varieert van 8 correcties per preparaat voor de totale geteste populatie tot 21 correcties per preparaat voor de populatie preparaten waarin de blast als jongste type voorlopercel werd waargenomen. De genoemde juistheid van de DiffMaster verandert niet als deze wordt berekend over een totale populatie van 700 preparaten, die door 10 verschillende gespecialiseerde analisten zijn geanalyseerd. Door alle individuele verschuivingen van alle afzonderlijke digitale afbeeldingen (totaal ruim 73.000) nauwkeurig te registreren, is de relatieve onder- en overdiagnostiek per celtype in beeld gebracht

(figuur 3). Onder relatieve overdiagnostiek wordt de hoeveelheid cellen van één celtype verstaan, die door de DiffMaster aan een specifieke groep is toebedeeld, maar die door de desbetreffende analist anders is geclassificeerd. Onderdiagnostiek is de hoeveelheid cellen van één celtype die volgens de desbetreffende analist door de DiffMaster niet als zodanig herkend zijn. Figuur 3 geeft de onderlinge verhouding weer van over- en onderdiagnostiek van alle celcategorieën. Hierin is waarneembaar dat met name blasten van de witte reeks voor een groot deel niet als zodanig worden herkend. Deze blasten worden in een andere groep teruggevonden. In de categorie erythroblasten werden na de voorclassificatie een groot aantal cellen gevonden, die achteraf geen erythroblasten bleken te zijn.

Buiten een adequate differentiatie van witte bloedcellen is tijdswinst misschien wel de meest opgevoerde reden om de Diffmaster aan te schaffen. Tijdens de testperiode hebben alle 10 gespecialiseerde analisten een adequate tijdregistratie bijgehouden. Batchgewijs werd nauwkeurig de effectieve tijd geregistreerd die de analist nodig had van voorbereiding tot uiteindelijke autorisatie met de DiffMaster. Een gelijke tijdregistratie werd gevolgd bij de microscopische beoordeling van dezelfde geanonimiseerde monsters. Bij bloeduitstrijkjes met een minimale pathologie (geen voorlopers) werd een marginale tijdswinst geboekt door het gebruik van de DiffMaster. Maar naarmate het aantal voorlopercellen toeneemt is de microscopische beoordeling door gespecialiseerde analisten sneller. Tijdens het gebruik van de DiffMaster zijn zeker voor-, maar ook nadelen van geautomatiseerde digitale differentiatie aan het licht gekomen. Tabel 1 geeft een overzicht van de door de 10 gebruikers meest genoemde voor- en nadelen. Met name het 'walk away'-principe van de DiffMaster alsook de zeer eenvoudige bediening en adequate data-opslag worden genoemd als voordelen. Monsters met een laag leukocytenaantal zijn manueel doorgaans moeilijk te analyseren omdat langdurig gezocht moet worden naar een acceptabel aantal cellen. De Diffmaster daarentegen zoekt snel een acceptabel aantal cellen, waardoor deze monsters beter worden geanalyseerd. Het gemis van vlamgebieddetectie, een micrometeroptie en een zelflerend vermogen worden door de gebruiker als minpunten ervaren. Vaak wil de analist één specifieke cel of celtype terugzien om deze visueel te beoordelen. Door gemis van een terugzoekoptie is dit niet mogelijk, hetgeen als nadelig wordt ervaren.



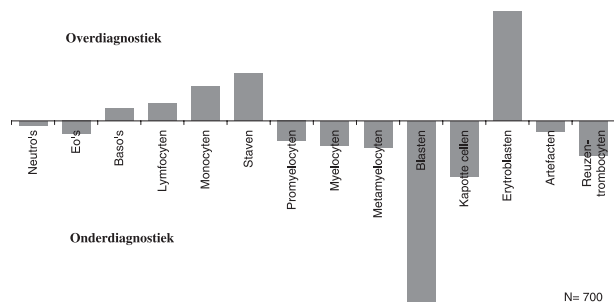
Figuur 2. Aantal correctiehandelingen per uitstrijkpreparaten-groep.

Tabel 1. Ervaren voor- en nadelen van het gebruik van de DiffMaster

Voordelen	Nadelen
Relatief snel bij monsters met een laag leukocytenaantal	Geen vlamgebieddetectie (vereist automatisering van uitstrijken)
'Walk away'-principe	Geen micrometeroptie
Cellen gemakkelijk te vergelijken	Geen zelflerend vermogen
Eenvoudige bediening	Geen microscopische terugzoekoptie
Goede dataopslag	

Discussie

Of het gebruik van digitale beeldverwerking bij bloedceldifferentiatie een aanwinst is voor de laboratoriumgeneeskunde is zeker een vraag die we met zorg moeten beantwoorden. Aan de kwaliteit van de verkregen afbeeldingen zal het niet liggen. Met de huidige kwaliteit lenzen en camera's kunnen zeker kwalitatief hoogwaardige afbeeldingen van bloedcellen worden gemaakt. Of we deze beelden in de huidige diagnostiek gaan gebruiken ligt veelal aan het hoge verwachtingspatroon dat de gebruiker eraan toekent. Digitale beelden kunnen eenvoudig softwarematig worden geclassificeerd op specifieke ceileigenschappen, zolang deze van cel tot cel verschillend zijn. Deze stelling wordt ruimschoots door de DiffMaster onderbouwd, daar waar deze zonder tussenkomst van een analist een juistheid van bijna 90% haalt bij de classificatie van witte bloedcellen. Naarmate de cellen meer op elkaar gaan lijken, zal logischerwijs de softwarematige classificatie meer fouten produceren. Zo is gebleken dat blasten in eerste instantie veelal onjuist worden geclassificeerd. Deze cellen lijken softwarematig veel op (atypische) lymfocyten, monocytten of erythroblasten, waardoor ze daar worden ondergebracht (figuur 3). De beoordeling van staafkernige granulocyten ten opzichte van niet-staafkernige granulocyten is bij analisten regelmatig aan discussie onderhevig. Softwarematig is dit probleem kennelijk ook niet goed op te lossen, daar waar de DiffMaster volgens de betrokken analisten een granulocyt te snel als staafkernige granulocyt herkent. Een zelfde discussie leeft bij de beoordeling van reuzentrombocyten. Softwarematig wordt een



Figuur 3. Relatieve verhouding van over- en onderdiagnostiek per cellijn door de DiffMaster.

kleine lymfocyt vaak onterecht als reuzentrombocyt herkend. Tevens worden cellen die kapot zijn gegaan tijdens de uitstrijk toch ingedeeld in een klasse. Om die reden wordt de categorie 'kapotte cellen' veelal ondergediagnosticeerd. Hoe dan ook, digitale beeldverwerking bij bloedceldifferentiatie kan nog niet als enige techniek gebruikt worden. Het oog en de expertise van gespecialiseerde analisten zullen altijd nodig blijven. Digitale microscopie zal de beoordeling door een gespecialiseerde analist op dit moment nog niet vervangen.

Over de tijdswinst bij inzet van de DiffMaster valt nog te discussiëren. In de twee maanden waarin de DiffMaster is geëvalueerd binnen het laboratorium van Medisch Spectrum Twente is vrijwel geen tijdswinst geregistreerd ten opzichte van microscopische beoordeling. Naarmate er meer voorlopercellen in de preparaten werden waargenomen verlengt het re-classificeren van de ogenschijnlijk op elkaar lijkende cellen de uiteindelijke analyseduur. Mogelijk is de evaluatietijd tekort geweest. De analisten die hebben meegewerkt hebben doorgaans maar één dag met de DiffMaster gewerkt. Alhoewel de DiffMaster zeer eenvoudig en vriendelijk in het gebruik is, kan langere ervaring wellicht resulteren in een meer efficiënte en tijdsparende inzet. De tijdswinst die met de DiffMaster gerealiseerd wordt is mede afhankelijk van de graad van pathologie die voorkomt in de te testen populatie. Uit de resultaten blijkt dat de verwerking van preparaten met veel vroege voorlopers (voornamelijk blasten) de meeste tijd vergt. Medisch Spectrum Twente kent een uitgebreide hemato-oncologische kliniek, resulterend in een hoge mate van pathologie. Centra met minder pathologie zullen waarschijnlijk meer tijd besparen met digitale beeldverwerking.

De voordelen van digitale beeldverwerking zijn zeker noemenswaardig. De DiffMaster automatiseert alle microscopische handelingen waaronder scherpstelling, het juiste aantal cellen zoeken, tellen etc. Door een overzicht te geven van alle celafbeeldingen zijn deze onderling goed te vergelijken. Bovendien kunnen data in beeldvorm worden opgeslagen en op ieder gewenst tijdstip weer worden bekeken, zolang op afstand.

De nadelen van de DiffMaster zijn doorgaans niet gelegen in de kwaliteit van de afbeeldingen, maar meer met de softwarematige mogelijkheden. Zo kent de DiffMaster geen vlamgebieddetectie. Uitstrijkpreparaten die met de hand zijn uitgestreken hebben een variabel gelegen vlamgebied op het objectglas. De DiffMaster is dusdanig geprogrammeerd dat deze een standaard vlamgebied kiest. Met de hand uitgestreken preparaten worden dan ook veelal in een gebied geanalyseerd met een te hoge celdichtheid. Dit komt de kwaliteit van de digitale afbeeldingen en eigenlijke celstructuren niet ten goede. Deze preparaten zijn dan ook meestal niet te beoordelen met de DiffMaster. De gebruiker is dus verplicht om een geautomatiseerd uitstrijkapparaat te gebruiken. Ons laboratorium maakt gebruik van de Sysmex-SP100. Deze apparatuur stelt de uitstrijkcondities vast aan de hand van het hematocriet. Hierdoor ligt het vlamgebied van elk preparaat op dezelfde plaats op het objectglas. Het gebruik van de Sysmex-SP100 is echter niet voor elk monster en zeker niet voor elk laboratorium haalbaar. Het gemis van de micrometerfunctie wordt door alle analisten als bezwaarlijk gevonden. Digitale beelden worden met een bepaalde scherpte gemaakt. De scherptediepte kan achteraf niet softwarematig worden veranderd, hetgeen met een microscoop met behulp van de micrometerschroef wel mogelijk is. Een aantal afbeeldingen met verschillende scherptediepte per cel kan een optie zijn, alhoewel de uitgebreide dataopslagruimte waarschijnlijk het daarop volgende probleem vormt. De software kent geen zelflerend vermogen. Vaak zijn celeigenschappen patiënt- of populatieafhankelijk. Indien men softwarematig een bepaald celtype als zodanig zou kunnen definiëren, zal dit bij wederherkenning zeker een positief effect hebben op de juistheid van de voorclassificatie.

Geconcludeerd mag worden dat digitale beeldverwerking binnen de hematologische celherkenning zeker toekomst heeft. Over de kwaliteit van de afbeeldingen is vrijwel geen discussie. Echter de omschakeling van de analisten van jarenlang microscoopgebruik naar digitale beeldverwerking heeft tijd nodig. Misschien zullen softwarematige verbeteringen uiteindelijk de balans doen doorslaan.