

re-standardised their ECLIA assay to LC-MS/MS (8) giving approximately 10% lower values (Data from Roche Diagnostics). However, in comparison to our LC-MS/MS the ECLIA still overestimates 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations up to 4-fold, particularly in the lower concentration range (<30 nmol/l). This might somehow be related to the limited sensitivity of the ECLIA having a LOD of 10 nmol/l. Also at higher concentrations (>75 nmol/l) large individual discrepant patient's results were seen differing up to ± 50 nmol/l of 25(OH)D<sub>3</sub>. Matrix effects distorting effective displacement of 25(OH)D<sub>3</sub> from its binding protein may be responsible for the large inter-method variability in some individual patient sera. Another possibility is cross-reaction with other vitamin D metabolites in the ECLIA. In conclusion, the described LC-MS/MS method provides a rapid, accurate and sensitive alternative to other methods for determination of 25(OH)D, with a real advantage being the ability to report separate results for 25(OH)D<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>2</sub>. It compares well to the established DiaSorin radioimmunoassay but to a lesser extent to the recently re-standardised ECLIA vitamin D<sub>3</sub> assay from Roche.

#### Acknowledgements

We thank JPM Wielders, PhD (Meander Medical Center, Amersfoort, The Netherlands) for providing us with the DEQAS samples and Roche Diagnostics (Almere, The Netherlands) for the gift of kits free of charge for this study.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 203-205

## Geautomatiseerde morfologische analyse van perifeer bloed, liquor cerebrospinalis en andere lichaamsvloeistoffen met het digitale microscopiesysteem DM96\*

J.A. RIEDL en W. van GELDER

#### Introductie

Morfologische analyse van perifeer bloed en andere lichaamsvochten is een belangrijk diagnostisch hulpmiddel voor de clinicus. De huidige generatie bloedceltellers biedt een vrij complete analyse van perifeer bloed en veelal een 5-part-leukocytendifferentiatie.

---

*GKCL, Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht*

E-mail: j.riedl@asz.nl

\* De Body Fluid-studie is in aangepaste vorm geaccepteerd voor publicatie in The Journal of Clinical Pathology.

#### References

1. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-81.
2. Chen H, McCoy LF, Schleicher RL, Pfeiffer CM. Measurement of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25OHD<sub>3</sub>) and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> (25OHD<sub>2</sub>) in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison to a radioimmunoassay method. *Clin Chim Acta* 2008; 391: 6-12.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods, approved guideline - 3rd Edition, EP10A3 ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)), 2006.
4. Ouweland JMW van den, Beijers AM, Demacker PNM, Daal H van. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *J Chromatogr B* 2010; 878: 1163-8.
5. Vogeser M. Quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010, Mar 4. [Epub ahead of print].
6. Carter GD. 25-Hydroxyvitamin D assays: the quest for accuracy. *Clin Chem* 2009; 55: 1300-2.
7. Yates AM, Bowron A, Calton L, Heynes J, Field H, Rainbow S, Keevil B. Interlaboratory variation in 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is significantly improved if common calibration material is used. *Clin Chem* 2008; 54: 2082-4.
8. Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004; 50: 1415-7.

Voor pathologische bloedmonsters en andere lichaamsvochten zijn celtellers echter beperkt geschikt, aangezien ze niet in staat zijn om voorlopercellen en andere afwijkende cellen betrouwbaar te classificeren. Hierdoor blijft de manuele microscopische beoordeling de gouden standaard, ondanks alle technische en statistische beperkingen (1, 2).

Een aantal jaren geleden verscheen er een nieuwe generatie digitale microscopiesystemen op de markt. Het Zweedse bedrijf Cellavision bracht de Diffmaster Octavia en later de DM96 uit, waarvan werd gesteld dat ze volautomatische morfologische analyse van perifeer bloed mogelijk maakten. Tezamen met

enkele andere laboratoria hebben wij dit systeem uitvoerig getest op precisie en nauwkeurigheid in de classificatie van de voornaamste perifere leukocyten-categorieën (3-5). Het systeem is sinds 5 jaren met succes volledig in onze routinediagnostiek geïntegreerd. Sindsdien heeft de DM96 de morfologische analyse van perifere bloedmonsters in ons laboratorium verbeterd. Ten eerste heeft de DM96 voor een standaardisatie van het beoordelingsproces gezorgd. Ten tweede heeft de DM96 tot een verlaging van de turn-aroundtijd van analyse geleid. Tenslotte is de detectie van geringe aantallen abnormale celtypes (met name blasten) sinds de introductie van de DM96 aanmerkelijk verbeterd.

Andere lichaamsvochten zoals liquor cerebrospinalis vereisen technische expertise om juiste behandeling en analyse te garanderen. Afname van dergelijke materialen zorgt voor veel ongemak bij de patiënt. Er zijn meestal geringe volumina voorhanden voor analyse. Door de chemische samenstelling (en de cytopspinprocedure) van liquorpreparaten verliezen cellen in korte tijd hun karakteristieke morfologische eigenschappen. Hierdoor is snelle analyse van liquor noodzakelijk.

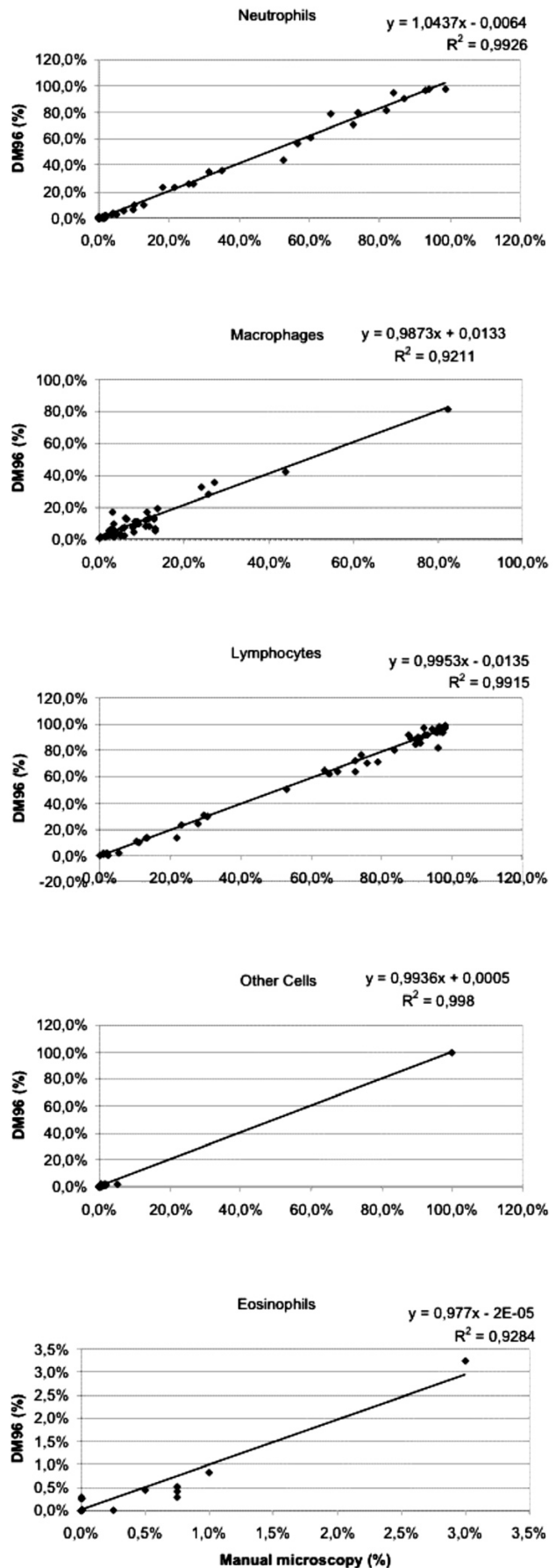
In een aantal gevallen vereist de uitkomst van morfologische analyse van liquor cerebrospinalis onmiddellijk klinisch handelen (bijv. bacteriële meningitis). De 24-uursbeschikbaarheid van liquordiagnostiek vereist een voldoende aantal morfologisch goed geschoolde analisten. Een snelle en betrouwbare geautomatiseerde morfologische analyse van liquor (en andere lichaamsvochten) kan daarom uitkomst bieden voor het klinisch-chemisch laboratorium.

De nieuwe 'Body Fluid' softwaremodule voor de DM96 maakt de automatische morfologische analyse van lichaamsvochten mogelijk. De 'Body Fluid' module herkent en classificeert automatisch neutrofiële granulocyten, lymfocyten, macrofagen, eosinofiele granulocyten, kapot gestreken cellen; alle andere cellen worden in de categorie 'overige cellen' (denk hierbij aan plasmacellen, erythroblasten, mesotheelcellen en tumorcellen) geplaatst. In deze studie hebben we de 'Body Fluid' module getest op het verrichten van een geautomatiseerde morfologische analyse van liquorpreparaten. We hebben de module getest op pre-, postclassificatie, binnenrunimpresie, nauwkeurigheid en efficiency en vergeleken met een groep van morfologische experts.

## Methoden

### Lichaamsvloeistoffpreparaten

Lichaamsvloeistoffpreparaten werden door middel van een cytopspinmethode gemaakt (Shandon cytopspin 4; 750 rpm, 10 minuten). Monsters werden verdund om een celconcentratie te verkrijgen van minder dan  $0,15 \times 10^9$  cellen per preparaat. Meer cellen per preparaat resulteert in het samenklonteren van cellen en het onvermogen van de DM96 tot het individueel analyseren van cellen. Preparaten werden vervolgens gekleurd binnen een uur (may-grünwald-giemsma, Merck, Darmstadt, Duitsland).



**Figuur 1.** Correlatie tussen de postclassificatie op de DM96 en de manuele microscopiemethode van liquor-cerebrospinalispreparaten.

### *Preparaatanalyse*

Alle lichaamsvloeistofpreparaten werden beoordeeld door 2 analisten uit een groep van 8 ervaren analisten met uitgebreide expertise in het morfologisch beoordelen van bloed, beenmerg en andere lichaamsvloeistoffen. Elk lichaamsvloeistofpreparaat werd onafhankelijk geanalyseerd door middel van een manuele microscopische analyse van 200 cellen door twee morfologische experts. Vervolgens werden de preparaten aangeboden aan de DM96 en vond postclassificatie plaats. De postclassificatie op de DM96 van eenzelfde preparaat werd niet door dezelfde analist verricht, maar door een andere expert. Ook de DM96 analyseerde 200 cellen. Preparaten met een hoog percentage kapotte cellen en/of artefacten (>20%) werden geëxcludeerd.

### *Statistische analyse*

Statistische analyse werd uitgevoerd door middel van Analyse-it, een software-add-in voor Microsoft Excel. Het studieontwerp is gebaseerd op de documenten H56A en EP09-A2 van het National Committee for Clinical Laboratory Standards. Nauwkeurigheid werd geanalyseerd door middel van statistische procedures volgens Bland en Altman en Passing-Bablok.

### **Resultaten**

Tijdens deze studie werden 100 liquor-cerebrospinalis-, 62 ascites- (gegevens niet getoond) en 15 CAPD- (gegevens niet getoond) preparaten geanalyseerd.

### *Nauwkeurigheid*

De nauwkeurigheid van celclassificatie voor liquor en andere lichaamsvloeistoffen (gegevens niet getoond) werd geëvalueerd door manuele tellingen van ervaren analisten te vergelijken met de postclassificatieresultaten van de DM96. Deze analyse werd verricht voor neutrofiële granulocyten, eosinofiele granulocyten, lymfocyten, macrofagen en de categorie 'overige cellen'. Zoals is te zien in figuur 1 variëren de regressiecoëfficiënten tussen de 0,92 en 0,99 voor liquor cerebrospinalis. Voor andere lichaamsvochten variëren de regressiecoëfficiënten tussen de 0,83 en 0,98 (gegevens niet getoond). Samengevat laat de evaluatie zien dat er geen systematische verschillen bestaan tussen de resultaten van de DM96 en de manuele beoordeling door morfologie-experts.

### *Preclassificatie*

Preclassificatie (de initiële celclassificatie door de DM96) werd tevens geëvalueerd en liet een preclassificatiescore zien van 90% voor liquor en 83% voor andere lichaamsvloeistoffen.

### *Binnenrunimprecisie*

De binnenrunimprecisie werd bepaald door 5 liquorpreparaten 10 maal aan te bieden aan de DM96 en liet waarden <6% (SD) zien; deze vielen daarmee binnen acceptabele grenzen.

### *Hands-on-tijd*

Een time-efficiëncystudie werd verricht door de analysetijd te vergelijken tussen een manuele differentiatie en de geautomatiseerde telling door middel van de DM96. Hiervoor werd een 100-leukocytendifferentiatie van 10 lichaamsvloeistofpreparaten verricht. De tijd die nodig was voor het verrichten van een manuele differentiatie tot aan rapportage in het laboratoriuminformatiesysteem (LIS) werd geregistreerd. Voor analyse met de DM96 werd enkel de tijd geregistreerd die nodig was voor de postclassificatie nadat de DM96 al een preclassificatie had verricht (hiervoor wordt immers geen analysetijd in beslag genomen van de analist). De DM96 liet een analysetijd van 162 seconden en de manuele differentiatie een analysetijd van 132 seconden zien.

### **Conclusie**

De DM96 Body Fluid module is een betrouwbaar en nauwkeurig systeem dat routinematige geautomatiseerde analyse van lichaamsvochten in het klinisch-chemisch laboratorium mogelijk maakt. De module classificeert efficiënt vijf hoofdcelgroepen: neutrofiële granulocyten, eosinofiele granulocyten, lymfocyten, macrofagen en 'overige cellen'. De 'overview'optie is bijzonder interessant, aangezien deze optie het herkennen van aberrante celgroepen faciliteert. Bovendien biedt de software door de opslag van afbeeldingen van alle cellen de mogelijkheid tot overleg met collega's binnen en buiten de eigen laboratoriumsetting. De DM96 biedt een 24-uurs preclassificatie met een lage variatiecoëfficiënt en een hoge overall classificatie-overeenkomst in vergelijking met zeer goed getrainde morfologische experts. Samengevat biedt de DM96 een betrouwbare en snelle morfologische analyse van perifere bloed en andere lichaamsvloeistoffen en draagt zo bij aan de kwaliteitsverbetering van morfologische analyse.

### **Referenties**

1. Rumke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. *Blood Cells* 1985; 11: 311-4, 315.
2. Bentley SA. Automated differential white cell counts: a critical appraisal. *Baillieres Clin Haematol* 1990; 3: 851-69.
3. Ceelie H, Dinkelaar RB, Gelder W van. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J Clin Pathol* 2007; 60: 72-79.
4. Swolin B, Simonsson P, Backman S, et al. Differential counting of blood leukocytes using automated microscopy and a decision support system based on artificial neural networks--evaluation of DiffMaster Octavia. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 139-47.
5. Kratz A, Bengtsson H, Casey JE, et al. Performance evaluation of the Cellavision DM96 system. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 770-81.