De leucodif door de jaren heen

Anneke Barends-Kraak, Laboratorium Klinische Chemie, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam en lid redactiecommissie, Jos Wielders, klinisch chemicus en voorzitter Historische Cie NVKC

Al vanaf de ontdekking van de bloedcellen werd gezocht naar de relatie tussen ziektebeelden en de samenstelling en aantallen (lange tijd alleen als percentage mogelijk) van de witte bloedcellen, de leukocyten. De manuele differentiatie van bloedcellen onder een microscoop met gebruik van de May Grunwald Giemsa kleuring was vele decennia de gouden standaard. De beoordeling van een bloeduitstrijk is erg tijdsintensief en vraagt met name voor de bijzondere pathologie zoals leukemieën een continue scholing van personeel.

Cytochemistry

Myeloperoxidase	Positief in immature myeloïde cellen die granules en Auer rode bevatten
Sudan Black	
Periodic acid-Schiff (PAS)	Positief in immature lymfoïde cellen en in erytroleukemie
Non-specific esterase (NSE)	Positief in monocytaire series
Acid phosphatase	Focale positiviteit in leukemische blasten in ALL en diffuse reactie in monocytaire cellen

Maar ook dan ontstaan nog klinisch significante interpretatie verschillen tussen analisten. Op basis van het lage aantal van 100 getelde cellen in de leuko-diff, schatte Rümke in 1983 het 95% betrouwbaarheidsinterval bij 5% op 2-11 en voor 30% op 21-40, dat zijn zorgwekkende cijfers qua precisie. En dan spreken we nog niet eens over de mogelijke bias door de verdeling van de cellen over de 'vlam' van het uitstrijkje en of over de selectie van het te microscoperen gebied. Men realiseerde zich in de jaren 1970 dat het differentiëren van bloedcellen ook automatisch kon, waarbij door grotere cel aantallen de telfout aanzienlijk kleiner wordt. De vraag naar differentiatie van leukocyten werd met name vanaf de jaren 80 steeds groter. Steeds meer afwijkingen werden herkend en gedetailleerde leukemie indelingen werden opgesteld zoals de French-American-British (FAB) indeling. Die was oorspronkelijk gebaseerd op morfologie en cytochemische reacties waaronder de PAS en de MPO kleuring, om de myeloïde van de lymfatische leukemiën te kunnen onderscheiden (zie tabel). Inmiddels zijn deze specifieke kleuringen, die arbeidsintensief en zeker niet volledig waren, vervangen door immunofenotyperingen. De eerste diff automaten waren deels gebaseerd op cytochemie zoals peroxidasekleuring en deels op fysisch chemische principes (jaren 1980: Hemalog D, H6000 en later de H1, firma Technicon). Een andere benadering was het opzoeken van de leuko's in het bloeduitstrijkje zoals de Honeywell ACS1000. Een stap verder dan alleen opzoeken was de analyse van de morfologische kleuring van een automatisch gemaakt uitstrijkje, door middel van gedetailleerde patroonherkenning/ pixel analyse, zoals de Hematrak van Geometric Data Corporation rond 1983 of de Abbott ADC-500.

Evaluatie van dergelijke automaten ten opzichte van uitgebreide microscopische tellingen door specialisten, leerde dat normale 'bloedjes' goed verwerkt werden. Echter sporadische blasten werden soms gemist en sommige automaten hadden moeite met kernhoudende ery's of jonge neutrofielen. De automaten werden dan ook vooral ingezet in laboratoria met een groot aandeel aan niet-pathologische monsters.
Een geheel nieuwe ontwikkeling vanaf midden jaren 1980 was het gebruik van alleen fysisch chemische technieken als lichtverstrooiing en impedantie metingen (elektrische weerstand met wisselstroom), waarbij grootte, volume en celinhoud/dichtheid gemeten werd. Populair was in de beginjaren de zogenaamde three-part diff waarbij neutrofielen en lymfocyten goed gemeten konden worden, met name door grootte verschillen. De mono's, eo's en baso's vormden de restgroep. Voorbeelden hiervan zijn de Sysmex M-2000 en E-4000 en de Coulter Diff-3. Deze three-part diff waren zeer geschikt voor bijvoorbeeld huisarts patiënten, door een strakke keuze van de 'vlag-criteria' konden pathologische monsters redelijk goed uit de monsterstroom gevist worden voor nadere evaluatie met bijvoorbeeld de combinatie van H1 en microscopie.

Voor het vaststellen van o.a. Minimal Residual Disease (dat is het aanwezig zijn van een kleine rest leukemie cellen) en voor het stellen van een precieze diagnose werden steeds hogere eisen aan de automatische differentiatie gesteld. De moderne celtellers /diffautomaten tellen gemakkelijk 10.000 cellen. Digital imaging is op dit moment de meest geavanceerde techniek (CellaVision) waarbij gekleurde cellen automatisch opge-

zocht worden, digitaal gefotografeerd, grofweg gerubriceerd en onbekende cellen op een apart scherm worden weergegeven ter inspectie.

De diff automaat is opgenomen in een track waarbij 2 celtellers, uitstrijk en kleurunit (SP10)en een CellaVision unit achter elkaar staan, zodat uit één bloedmonster automatisch een compleet bloedbeeld met diff bepaald wordt. De microscoop of haar moderne equivalent, de digitale afbeelding op het scherm, blijft echter essentieel bij de beoordeling van bijzondere bloedcellen; dysplastische cellen, plasmacellen, blasten, fragmentocyten, erytrocyten agglutinatie en trombocyten aggregaten moeten altijd onder de microscoop bekeken worden alsmede bloed van pasgeboren en leukemiepatiënten. Wereldwijd bestaat ook nu nog een grote variatie in beoordeling, terminologie en rapportage van bloeduitstrijkjes. In 1990 hebben de VHL/NVKC het Difboekje geschreven voor Nederlandse laboratoria met als doel: 'een éénduidige naamgeving van cel soorten afwijkingen, een éénduidige kwantificering van morfologische afwijkingen en eisen inzake verplicht te rapporteren afwijkingen', de laatste revisie dateert uit 2013. Een aantal publicaties uit verschillende landen met aanbevelingen voor beoordeling en rapportage van bloeduitstrijkjes leidde in 2015 tot artikelen van de International Council for Standardization in Haematology over verschillende richtlijnen voor o.a. kleurmethodes, classificatie en terminologie van cellen en gebruik van digitale morfologie analyzers. Verschillende landen gebruiken hun eigen methodes en terminologie. Zelfs over de eenheid van rapporteren van het Hb is internationaal nog geen eenduidigheid. Bijvoorbeeld Nederland en Denemarken rapporteren in de SI eenheid mmol/L maar Duitsland, Frankrijk en Engelstalige landen gebruiken nog veelal g/L.

Amsterdam UMC
Universitair Medische Centra

Het Endocrinologisch Laboratorium

van het Amsterdam UMC heeft vacatures:

Hoofdanalist Diagnostiek

(leidinggevende functie, 32-36 uur)

en

Sr analist methodeontwikkeling

(mbv LC-MS/MS, 32-36 uur)

Meer informatie op:

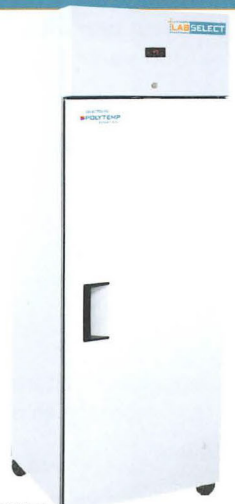
https://www.nvml.nl/vacatures of

https://werkenbijamc.nl/

LABSELECT

De winnende selectie voor standaard koeling op het laboratorium

Bestel online op labselect.nl
Direct uit voorraad leverbaar!



Exclusief bij Poly Temp Scientific

Uitstekende temperatuurstabiliteit

Digitale controller

Kasthoogte onder 2 meter

LED verlichting

Standaard back-up batterij

Verwisselbaar Monoblock Koelsysteem

Basic 700 -20°C vriezer

Basic 700 +4°C koelkast

Labselect is een merk van Poly Temp Scientific. Zorgvuldig samengesteld en geselecteerd op basis van ervaring van labmanagers, technici en analisten.