

# Lymfocytose

E.M. (Margo) Molhoek, Mieke M.J.F. Koenders, Jolanda Droogendijk en Yvette Kluiters-De Hingh

**+** GERELATEERD ARTIKEL Ned Tijdschr Geneeskd. 2015;159:A8808

**De bepaling van het bloedbeeld met differentiatie van leukocyten is tegenwoordig geautomatiseerd. Wanneer is differentiatie zinvol, en wat zegt de uitslag 'lymfocytose'?**

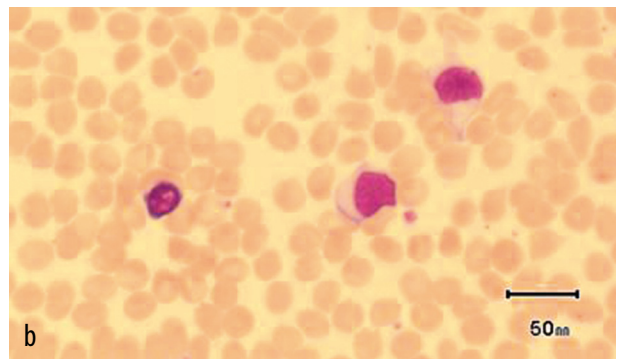
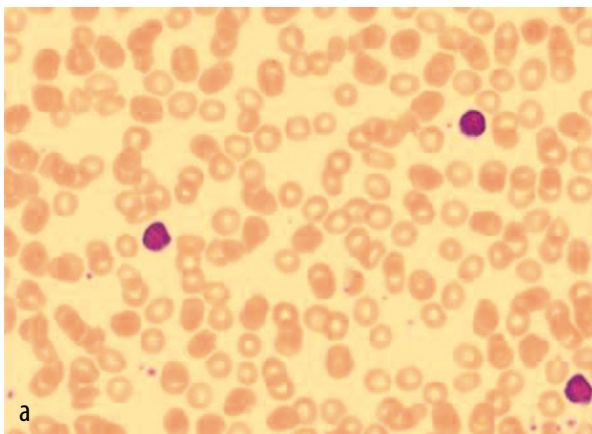
## CASUS 1

**Patiënt A**, een 18-jarige vrouw, komt bij de huisarts wegens 2 maanden bestaande vermoeidheid die ontstaan is na een flinke keelontsteking met koorts. De huisarts vraagt op basis van de verdenking op een infectie met het Epstein-Barr-virus een bloedbeeld en virusserologie aan ter bevestiging. Het bloedonderzoek toont een lymfocytose met atypische lymfocyten, verdacht voor reactieve lymfocytose. Daarnaast blijkt uit het serologisch onderzoek dat er inderdaad sprake is van mononucleosis infectiosa.

In figuur 1a en 1b ziet u beelden van atypische lymfocyten.

**VRAAG CASUS 1 Welk beeld met atypische lymfocyten hoort bij patiënt A?**

- a Geen van beide.
- b De lymfocyten in figuur 1a.
- c De lymfocyten in figuur 1b.



**FIGUUR 1** Atypische lymfocyten. Het maatstreepje geeft een lengte van 50  $\mu\text{m}$  aan.

## CASUS 2

**Patiënt B**, een 66-jarige man, komt bij de huisarts met klachten van aanhoudende vermoeidheid. Bij lichamelijk onderzoek zijn zowel links als rechts axillair en inguinaal de lymfeklieren palpabel en rubberachtig van consistentie. De patiënt heeft geen koorts. Uit de anamnese blijkt dat hij geen last heeft van gewichtsverlies of nachtzweeten. De lever en milt zijn niet palpabel.

De huisarts vraagt oriënterend laboratoriumonderzoek aan waarvan de uitslagen staan vermeld in tabel 1.

**VRAAG CASUS 2 Welke onderstaande beweringen is juist?**

- a Er is sprake van een neutropenie en een lymfocytose.
- b Er is sprake van een lymfocytose.
- c Er is sprake van een laboratoriumartefact gezien de aanwezigheid van kapotgestreken cellen.

**> ANTWOORDEN EN UITLEG ELDERS IN DIT NUMMER**
**TABEL 1** Uitslagen van de laboratoriumdiagnostiek bij patiënt B

laboratoriumparameter	patiënt B*	referentiewaarden†
Hb	9,9	♂ 8,5-11 mmol/l ♀ 7,5-10 mmol/l
erythrocyten	5,3	♂ 4,5-5,5 x 10 <sup>12</sup> /l ♀ 4,0-5,0 x 10 <sup>12</sup> /l
trombocyten	200	150-400 x 10 <sup>9</sup> /l
leukocyten	<b>15</b>	4-10 x 10 <sup>9</sup> /l
MCV	88	80-100 fl
<b>automatische leukocytdifferentiatie (absoluut)</b>		
neutrofielen	1,6	1,5-7,5 x 10 <sup>9</sup> /l
lymfocyten	<b>13,1</b>	1,0-3,5 x 10 <sup>9</sup> /l
monocyten	0,2	0,1-1,0 x 10 <sup>9</sup> /l
eosinofielen	0,1	0,1-0,5 x 10 <sup>9</sup> /l
basofielen	0,0	0,0-0,2 x 10 <sup>9</sup> /l
<b>automatische leukocytdifferentiatie (procentueel)</b>		
neutrofielen	<b>11</b>	40-75%
lymfocyten	<b>87</b>	20-45%
monocyten	1	2-10%
eosinofielen	1	1-5%
basofielen	0	0-2%
<b>microscopische leukocytdifferentiatie (procentueel)</b>		
neutrofielen	<b>8</b>	40-75%
lymfocyten	<b>90</b>	20-45%
monocyten	2	2-10%
eosinofielen		1-5%
basofielen		0-2%
<b>leukocytenmorfologie</b>		
atypische lymfocyten		+ (suspect maligne)
kapotgestreken cellen		++
CRP	< 10 mg/l	< 10 mg/l

\* Blauw: waarden onder de referentiewaarden; rood: waarde boven de referentiewaarden.

† Referentiewaarden uit St. Elisabeth Ziekenhuis Tilburg.

## ANTWOORDEN OP DE LABQUIZ

## Lymfocytose

E.M. (Margo) Molhoek, Mieke M.J.F. Koenders, Jolanda Droogendijk en Yvette Kluiters-De Hingh

## ANTWOORD CASUS 1: 1C IS JUIST

**Patiënt A**, een 18-jarige vrouw, komt bij de huisarts wegens 2 maanden bestaande vermoeidheid die ontstaan is na een flinke keelontsteking met koorts. Uit lichamelijk onderzoek blijkt dat aan beide zijden van de hals opgezette pijnlijke lymfeklieren voelbaar zijn.

Hoewel bij de klinische verdenking op een infectie met Epstein-Barr-virus (EBV) laboratoriumonderzoek weinig toevoegt aan de diagnose, vraagt de huisarts virusserologie en een bloedbeeld met leukocytendifferentiatie aan. De leukocytendifferentiatie toont een lymfocytose ( $12,1 \times 10^9/l$ ). Bij de automatische leukocytendifferentiatie wordt voldaan aan de criteria voor microscopische differentiatie – lymfocytose en de aanwezigheid van atypische lymfocyten, zie tabel 2 en figuur 2c in de verdieping bij deze labquiz –, waarna de leukocyten manueel worden gedifferentieerd en het bloedbeeld kwalitatief wordt beoordeeld. Onder de microscoop worden hoofdzakelijk atypische lymfocyten gezien (zie figuur 1b). De atypische lymfocyten kenmerken zich door hun variabiliteit aan vormen en worden getypeerd als ‘verdacht voor reactieve lymfocyten’. De verdenking op mononucleosis infectiosa wordt bevestigd met virusserologie. De patiënte is positief voor IgM tegen EBV viraal capsule-antigeen (EBV-VCA) en EBV-VCA-IgG. IgM-antistoffen tegen EBV-VCA komen op in de acute fase van de infectie en verdwijnen na circa 10 weken uit het bloed. IgG-antistoffen tegen EBV-VCA verschijnen later, ongeveer 1 maand na de infectie, en blijven levenslang aanwezig. Op basis van het serologisch onderzoek concludeert de huisarts dat er sprake is van een EBV-infectie.

St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg.

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium:

dr. E.M. Molhoek, klinisch chemicus in opleiding;

dr. Y. Kluiters-De Hingh, klinisch chemicus.

Afd. Interne Geneeskunde: drs. J. Droogendijk,  
internist-hematoloog.

Elkerliek Ziekenhuis, Algemeen Klinisch Laboratorium, Helmond.

Dr. M.M.J.F. Koenders, klinisch chemicus.

Contactpersoon: dr. E.M. Molhoek (m.molhoek@elisabeth.nl).

**+ GERELATEERD ARTIKEL** Ned Tijdschr Geneesk. 2015;159:A8808

**TABEL 2** Criteria waarbij automatische hematologie-analysers een waarschuwing afgeven om over te gaan op manuele microscopische differentiatie

oorzaak waarschuwing	voorbeeld
abnormale celmorfologie	atypische lymfocyten
abnormale cellen die onvoldoende beoordeeld kunnen worden	blasten voorlopercellen uit de granulocytair reeks voorlopercellen uit de erytroïde reeks (erytroblasten)
zeer hoge of lage aantallen cellen*	
leukocyten	$< 2,5 \times 10^9/l$ of $> 30 \times 10^9/l$
lymfocyten	$> 4,5 \times 10^9/l$
monsterkenmerken	trombocytenaggregaten koude agglutinaties

\* De waarden waarop de celtellers alarmeren zijn per laboratorium ingesteld en kunnen dus per laboratorium verschillen.

## ANTWOORD CASUS 2: 2B IS JUIST

**Patiënt B**, een 66-jarige man, komt bij de huisarts met klachten van aanhoudende vermoeidheid. Bij lichamelijk onderzoek zijn axillair en inguïnaal de lymfeklieren bilateraal palpabel en rubberachtig van consistentie. Uit de anamnese blijkt dat de patiënt geen last heeft van gewichtsverlies of nachtzweeten. De lever en milt zijn niet palpabel. De procentuele leukocytendifferentiatie toont een lymfocytose en een neutropenie. Deze neutropenie is echter relatief en wijst niet op een verminderde hoeveelheid neutrofielen; het absolute aantal neutrofielen is niet afwijkend. Bij de automatische leukocytendifferentiatie door de hematologie-analyser is er sprake van lymfocytose, een criterium om over te gaan tot microscopische differentiatie (zie tabel 2), waarna de leukocyten manueel worden gedifferentieerd en het bloedbeeld kwalitatief wordt beoordeeld. De resultaten van de manuele en automatische leukocytendifferentiatie verschillen niet significant van elkaar. Hiermee worden de resultaten van de automatische differentiatie bevestigd. Onder de microscoop worden de lymfocyten morfologisch getypeerd als ‘atypische lymfo-

cyten, suspect maligne' (zie figuur 1a). De atypische lymfocyten kenmerken zich door hun uniformiteit. Daarnaast valt het hoge aantal kapotgestreken cellen op. Op basis van de lymfocytose met atypische lymfocyten die verdacht zijn voor maligniteit in combinatie met kapotgestreken cellen denkt de huisarts bij deze patiënt aan een lymfoproliferatieve aandoening en verwijst hem door naar de hematoloog. Aldaar wordt immunofenotypering van het perifere bloed ingezet. Hieruit blijkt dat

90% van de lymfocyten bestaat uit B-lymfocyten die monoklonaal zijn en een afwijkend immunofenotype hebben. Op basis van het hoge aantal monoklonale B-lymfocyten, de karakteristieke morfologie en het specifiek afwijkende fenotype wordt de diagnose 'chronische lymfatische leukemie' (CLL) gesteld.

 **LEES HET ARTIKEL EN DE UITLEG OP [WWW.NTVG.NL/A7693](http://WWW.NTVG.NL/A7693)**

# Lymfocytose

E.M. (Margo) Molhoek, Mieke M.J.F. Koenders, Jolanda Droogendijk en Yvette Kluiters-De Hingh

## ACHTERGROND

Leukocyten worden onderverdeeld in granulocyten (eosinofiele, basofiele en neutrofiële granulocyten), lymfocyten (o.a. T- en B-lymfocyten) en monocyt en ontstaan uit de hematopoëtische stamcel. Deze pluripotente stamcel bevindt zich in het beenmerg en kan zich differentiëren tot een myeloïde of een lymfoïde stamcel. De differentiatie tot verschillende cellijnen en de proliferatie van de cellijnen vindt onafhankelijk van elkaar plaats.<sup>1,2</sup> De myeloïde stamcel kan zich in het beenmerg verder differentiëren tot granulocyt, monocyt, erythrocyt of trombocyt. De lymfoïde stamcel kan zich verder differentiëren tot onder andere T- en B-lymfocyten. Lymfocyten spelen een belangrijke rol in de verworven, specifieke afweer. B-lymfocyten ontwikkelen zich na activatie tot antistofproducerende plasmacellen. T-lymfocyten zijn in staat om verschillende ziekteverwekkers direct aan te vallen en helpen andere afweercellen, zoals de B-lymfocyten, in hun functie.

Bij een toename van het aantal leukocyten boven een waarde van  $10 \times 10^9/l$  spreekt men bij volwassenen van een leukocytose. Het is echter weinig informatief om te spreken van een leukocytose, aangezien vaak slechts één cellijn in verhoogde mate aanwezig is. Voor de interpretatie is het noodzakelijk om onderscheid te maken tussen de verschillende celtypen. Naast een toename van het aantal neutrofielen (neutrofilie) is een toename van het aantal lymfocyten (lymfocytose) de meest voorkomende oorzaak van een leukocytose. Bij volwassenen spreekt men van een lymfocytose bij circulatie van meer dan  $3,5 \times 10^9/l$  lymfocyten en dit kan een reactieve of maligne oorsprong hebben.

Een reactieve lymfocytose is secundair en wordt veroorzaakt als respons op een onderliggende aandoening; bij het verdwijnen van de aandoening zal de lymfocytose normaliseren. Een reactieve lymfocytose wordt meestal veroorzaakt door virale infecties en komt veelvuldig voor bij kinderen. Bacteriële infecties veroorzaken over het algemeen een toename van het aantal neutrofielen. Er zijn echter specifieke bacteriële infecties, zoals die met *Bordetella pertussis*, de veroorzaker van kinkhoest, die een lymfocytose kunnen veroorzaken. Voorbijgaande stressgerelateerde lymfocytose kan verband houden met

**+ GERELATEERD ARTIKEL** Ned Tijdschr Geneeskd. 2015;159:A8808

een myocardinfarct, trauma, obstetrische complicaties of een status epilepticus.<sup>4</sup>

Maligne lymfocytose kan het gevolg zijn van een lymfoproliferatieve aandoening. Dit is de verzamelnaam voor een grote groep neoplastische aandoeningen van het lymfatisch systeem die gekenmerkt worden door een woekering van maligne lymfocyten.

## LEUKOCYTDIFFERENTIATIE BIJ ZIEKTE VAN PFEIFFER NIET ZINVOL

Een veelvoorkomende oorzaak van een reactieve lymfocytose is mononucleosis infectiosa, ook wel ziekte van Pfeiffer genoemd. Deze virale infectie wordt veroorzaakt door het Epstein-Barr-virus (EBV) en treft voornamelijk adolescenten. Op de kinderleeftijd verloopt een acute EBV-infectie over het algemeen asymptomatisch. Adolescenten kunnen zich presenteren met ziekteverschijnselen als vermoeidheid, keelpijn, koorts, hepatosplenomegalie en lymfeklierzwellingen, voornamelijk van de cervicale lymfeklieren.<sup>4,5</sup>

Virale en bacteriële keelontstekingen genezen doorgaans spontaan binnen 7 dagen. Het is daarom niet zinvol om aanvullend bloedonderzoek te doen. Bloedonderzoek is pas zinvol bij diagnostische onzekerheid.

Voor de diagnostiek van mononucleosis infectiosa is het niet zinvol om hematologisch bloedonderzoek – leukocytentelling en -differentiatie – aan te vragen, aangezien de uitslag geen invloed heeft op het beleid. Hoewel bij een EBV-infectie in het perifere bloed een relatief groot aantal karakteristieke atypische lymfocyten aanwezig zijn (zie figuur 1b), die zich kenmerken door hun heterogeniteit, kunnen deze behalve op mononucleosis infectiosa ook wijzen op een infectie met andere micro-organismen.<sup>3</sup>

## LEUKOCYTDIFFERENTIATIE BIJ DE DIAGNOSTIEK VAN CLL

De lymfoproliferatieve aandoening chronische lymfatische leukemie (CLL) is de meest voorkomende en daarmee belangrijkste oorzaak van een niet-reactieve lymfocytose in het perifere bloed. In Nederland is de gemiddelde incidentie van CLL 3,8 per 100.000 mensen per jaar en komt ongeveer 2 keer vaker voor bij mannen dan bij vrouwen. Hoewel CLL op iedere leeftijd voor kan komen, loopt de incidentie op met de leeftijd; CLL is bij kinderen zeer zeldzaam en komt voornamelijk voor bij patiënten ouder dan 60.<sup>6</sup>

Patiënten presenteren zich over het algemeen met alleen aspecifieke klachten, zoals vermoeidheid. Bij lichamelijk onderzoek kunnen patiënten zich presenteren met zwellingen van verschillende lymfeklieren. Daarnaast kunnen, vooral in een gevorderd stadium, de lever en milt vergroot zijn en kan er sprake zijn van anemie en cytopenie.

Bij CLL is sprake van een persisterende, langer dan 3 maanden durende lymfocytose met meer dan  $5 \times 10^9/l$  lymfocyten. In de perifere bloeduitstrijk zijn er morfologisch rijpe, atypische lymfocyten aanwezig die zich kenmerken door hun uniformiteit, ook wel 'monotoon beeld' genoemd. Vaak is er een hoog aantal ( $> 10\%$ ) kapotgestreken cellen aanwezig. De aanwezigheid van kapotgestreken cellen is echter niet specifiek voor CLL en kan ook voorkomen bij virale infecties en andere leukemieën.<sup>7</sup>

Hoewel de kans op een lymfoproliferatieve aandoening klein is, wordt bij patiënten vanaf 50 jaar de kans groter dat de lymfocytose wordt veroorzaakt door een lymfoproliferatieve aandoening.<sup>8,9</sup> Bij de meerderheid van de patiënten lukt het om op basis van de morfologie van de leukocyten een lymfoproliferatieve aandoening te onderscheiden van een reactief beeld (heterogeen vs. monotoon). In onduidelijke gevallen en bij een beperkte lymfocytenconcentratie is het noodzakelijk om immunofenotypering uit te voeren, om te discrimineren tussen een reactief en maligne karakter. Bij patiënten bij wie nog niet eerder sprake was van een lymfocytose zonder klinische verschijnselen, kan ook een afwachtend beleid gehanteerd worden. Bij persisterende lymfocytose ( $> 3$  maanden) kan vervolgdagnostiek ingezet worden.

Met immunofenotypering is het mogelijk om te achterhalen of de lymfocyten van oorsprong monoklonaal –

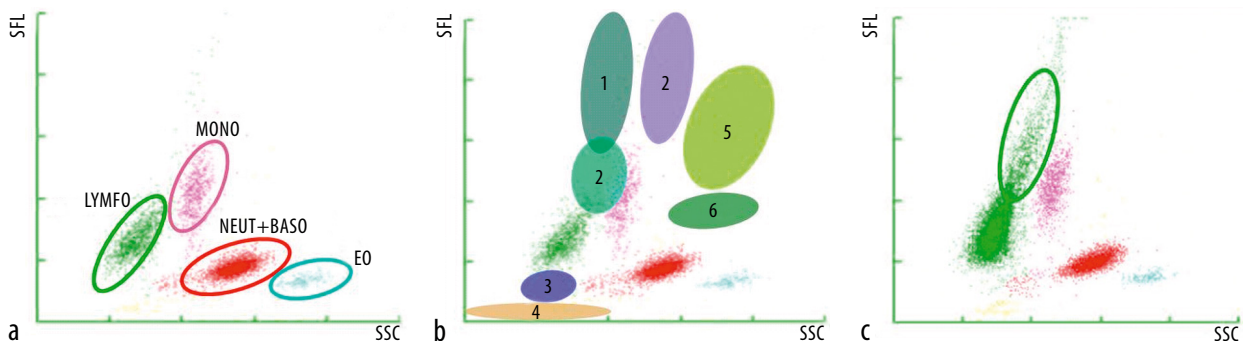
afkomstig vanuit één cel – en dus maligne zijn. Daarnaast toont immunofenotypering aan in welk differentiatiestadium de lymfocyten zich bevinden en of er markers aanwezig zijn die passen bij een specifieke lymfoproliferatieve aandoening. Of verdere duiding van het type lymfoproliferatief proces met behulp van immunofenotypering wenselijk is, hangt af van de klinische verschijnselen en de leeftijd van de patiënt. Het advies is daarom bij patiënten met verdenking op een lymfoproliferatieve aandoening te overleggen met de hematoloog.

De WHO-classificatie van tumoren van hematopoëtische en lymfoïde weefsels stelt dat gesproken kan worden van een klassieke CLL bij een monoklonale B-cel populatie van minimaal  $5 \times 10^9/l$  met de karakteristieke morfologie en het immunofenotype van een CLL.<sup>10</sup> Bij patiënten met een monoklonale B-cel populatie kleiner dan  $5 \times 10^9/l$  in het bloed bij wie geen aanwijzingen zijn voor een lymfatische maligniteit – dus geen hepatosplenomegalie of lymfoproliferatieve ziekten in de voorgeschiedenis – spreekt men van een monoklonale B-cellymfocytose (MBL). MBL is een premaligne stadium van CLL dat sporadisch kan evolueren naar een CLL.<sup>11</sup>

## BEPALINGEN

### LEUKOCYTENDIFFERENTIATIE

Leukocytendifferentiatie vindt tegenwoordig plaats op geavanceerde hematologie-analysers die in staat zijn om het aantal leukocyten, trombocyten en erythrocyten te tellen. Daarnaast kunnen deze analysers 5 soorten leukocyten (neutrofiële granulocyten, lymfocyten, monocyt, eosinofiele granulocyten en basofiele granulocyten) van elkaar onderscheiden op basis van grootte en celinhoud.



**FIGUUR 2** Scatterplots van een automatische leukocytendifferentiatie op een hematologie-analyser van de firma Sysmex. (a) Verschillende celpopulaties worden gescheiden op basis van formaat, uitgezet op de X-as als 'SSC', en de mate van fluorescentie (SFL, uitgezet op de Y-as). (b) Weergave van de verwachte locatie van verschillende afwijkende cellen: 1: atypische lymfocyten; 2: abnormale lymfocyten of blasten; 3: erytroblasten; 4: debris; 5: jonge granulocyten; 6: linksverschuiving. (c) Scatterplot van patiënt A. Naast de gebruikelijke celpopulaties (vergelijk met figuur 2a) zijn atypische lymfocyten aanwezig (vergelijk met figuur 2b). LYMFO = lymfocyten; NEUT = neutrofiële granulocyten; BASO = basofiele granulocyten; EO = eosinofiele granulocyten.

Hierbij maken de verschillende fabrikanten gebruik van een of meer van de volgende technieken: impedantie, radiofrequentie, optische en cytochemische methoden.

Een voorbeeld van een automatische leukocytendifferentiatie door de hematologie-analyser van de firma Sysmex is weergegeven in figuur 2a. De leukocyten worden van elkaar gescheiden op basis van grootte en mate van fluorescentie na cytochemische aankleuring. De hematologie-analyser differentieert 10.000 leukocyten, in tegenstelling tot de 100 of 200 leukocyten bij een manuele, microscopisch differentiatie. De automatische differentiatie is hierdoor vele malen nauwkeuriger en verdient de voorkeur.

Ondanks de nieuwe ontwikkelingen en verbeteringen in prestatie na de eerste introductie van hematologie-analysers in de jaren 80 is – afhankelijk van het gebruikte type en de patiëntenpopulatie – voor 10-40% van de automatisch uitgevoerde leukocytendifferentiaties alsnog een microscopische beoordeling vereist om een betrouwbaar resultaat te krijgen. Dit is onder andere het geval als de analyser afwijkende celpopulaties heeft waargenomen (figuur 2b). Op basis van de expertise van deskundigen zijn laboratoriumafhankelijke criteria op de hematologie-analysers ingesteld waarbij het apparaat een waarschuwing afgeeft (zie tabel 2). Bij waarschuwing vindt een manuele leukocytendifferentiatie plaats ter bevestiging van de telling van de hematologie-analyser en voor additionele of ontbrekende informatie, zoals de aanwezigheid van afwijkende cellen.<sup>12,13</sup>

Bij een manuele leukocytendifferentiatie worden na aankleuring van de cellen minimaal 100 leukocyten onder een microscoop gedifferentieerd. Daarnaast wordt het aspect van de cellen kwalitatief beoordeeld op onder andere insluitsels en het aspect van de kern. De aanwezigheid van afwijkende cellen zoals erytroblasten, myeloid voorstadia, atypische lymfocyten en kapotgestreken cellen (> 10%) wordt altijd gerapporteerd.

De term ‘atypische lymfocyt’ wordt door veel laboratoria gebruikt als verzamelnaam voor allerlei afwijkende lymfocyten. Dat kan variëren van de kenmerkende reactieve lymfocyten bij mononucleosis infectiosa (zie figuur 1b) tot verschillende maligne lymfocyten, waaronder de kenmerkende kleine, rijpe lymfocyten met afwijkende kern bij een CLL (zie figuur 1a). Om onderscheid te maken tussen deze typen atypische lymfocyten plaatsen de meeste laboratoria hier een opmerking bij over het aspect van de lymfocyten (‘reactief’ vs. ‘maligne’).<sup>14</sup>

De manuele beoordeling van het bloedbeeld is zeer arbeidsintensief en wordt uitgevoerd door goed geschoolde analisten; de arbeidskosten zijn daardoor hoog. De ontwikkeling van hoogwaardige computer- en camera-systemen heeft de afgelopen jaren geleid tot de ontwikkeling van de digitale microscoop. De digitale microscoop maakt gedeeltelijke automatisering van de

microscopische leukocytendifferentiatie mogelijk. Meerdere laboratoria in Nederland maken al gebruik van digitale microscopie. Hierbij worden preparaten automatisch onder de lens gebracht, waarbij van elke passerende kernhoudende cel een digitale foto wordt gemaakt. Met behulp van geavanceerde computersoftware wordt op grond van optische ceileigenschappen een preclassificatie van de leukocyten gemaakt. Analisten controleren en reclassificeren waar nodig en rapporteren de definitieve resultaten. Het voordeel van deze techniek is dat de beelden digitaal worden opgeslagen en dat herbeoordeling op een later tijdstip mogelijk is.

#### IMMUNOFENOTYPERING

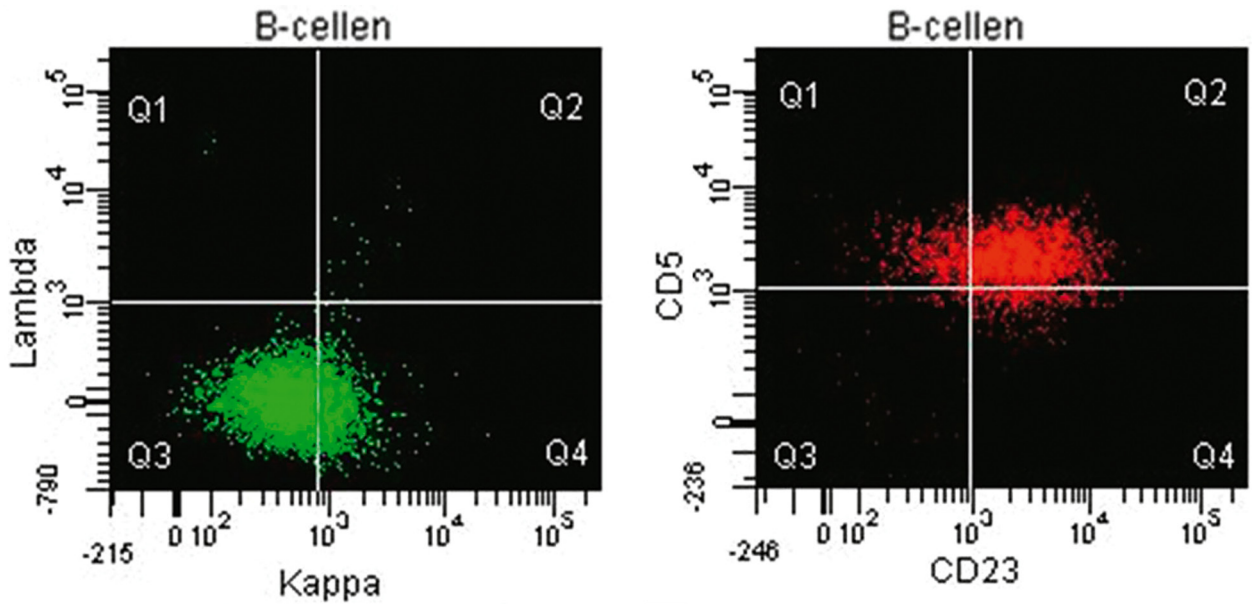
Bij immunofenotypering wordt gebruik gemaakt van het feit dat alle bloedcellen en hun voorlopers karakteristieke combinaties van antigenen bezitten. Zo zijn de antigenen CD3, CD4 en CD8 specifiek voor T-lymfocyten, terwijl CD19 en CD22 alleen op B-lymfocyten voorkomen. Met behulp van antistoffen, gekoppeld aan verschillende fluorescerende labels, kunnen meerdere antigenen op één cel worden aangetoond met behulp van een flowcytometer. Deze techniek wordt immunologische typering of immunofenotypering genoemd.

Bij ziekteprocessen en maligniteiten kunnen antigeenpatronen of de mate van antigeenexpressie veranderen. Hiervan wordt gebruik gemaakt om verschillende aandoeningen aan te tonen. Zo is bij rijpe-B-celmaligniteiten membraangebonden immuuglobuline (SmIg) de belangrijkste marker voor monoklonaliteit, en daarmee voor het maligne karakter van de B-cel. Normaliter komen zowel SmIg-kappa als SmIg-lambda voor op B-cellen. Bij woekering van één kloon gaat één type SmIg – kappa of lambda – overheersen.

Daarnaast kan met verschillende combinaties van markers en de mate van expressie onderscheid gemaakt worden tussen verschillende lymfoproliferatieve aandoeningen (chronische B-celmaligniteiten, non-Hodgkin-lymfomen, multipel myeloom). Bij CLL is de combinatie van CD5, CD23 en zwak monoklonaal SmIg een klassieke combinatie (figuur 3).<sup>10</sup>

#### VALKUILEN

De leukocytendifferentiatie kan zowel procentueel als in absoluut aantal cellen worden gerapporteerd. Procentuele rapportage suggereert een onderlinge afhankelijkheid van de cellijnen die er fysiologisch niet is. Dit is te zien aan de leukocytendifferentiatie van patiënt B (zie tabel 1), bij wie op basis van de procentuele telling sprake leek te zijn van een lymfocytose (89%) en neutropenie (11%). Als de percentages in relatie tot de leukocytenconcentratie ( $15 \times 10^9/l$ ) worden beoordeeld, wordt duidelijk dat er alleen sprake is van een lymfocytose ( $15 \times 10^9 \times 89\% =$



**FIGUUR 3** Immunofenotypering van het perifere bloed van een patiënt met chronische lymfatische leukemie (CLL). De B-cellen zijn monokonaal voor membraangebonden immuunglobuline (Smlg-kappa, links). De expressie van het Smlg is zwak. De B-cellen zijn positief voor CD5 en CD23 (rechts).

$13,4 \times 10^9/l$ ) en niet van een neutropenie ( $15 \times 10^9 \times 11\% = 1,7 \times 10^9/l$ ).

Het aantal leukocyten dat wordt gemeten door hematologie-analysers kan worden beïnvloed door de aanwezigheid van erythroblasten of erythrocyten die abnormaal hemoglobine bevatten. In beide gevallen wordt ten onrechte een verhoogde leukocytentelling gemeten. De meeste analysers corrigeren hiervoor of geven een waarschuwing om verkeerde uitslagen te voorkomen.

#### REFERENTIEWAARDEN, BESLISGRENZEN EN TESTEIGENSCHAPPEN

Leeftijdafhankelijke referentiewaarden voor de leukocyten en leukocytendifferentie zijn weergegeven in tabel 3.

#### WANNEER VERSCHILT EEN UITSLAG SIGNIFICANT VAN DE VORIGE UITSLAG?

Bij herhaling van een laboratoriumbepaling is het van belang te weten wanneer de uitslagen voldoende van elkaar verschillen om te kunnen spreken van een daadwerkelijk klinisch relevant verschil, de zogenoemde 'kritische verschilwaarde'. Voor het berekenen van het kritische verschil gebruikt men de biologische variatie binnen een persoon ([www.westgard.com/biodatabase1.htm](http://www.westgard.com/biodatabase1.htm)) en de analytische variatie (tabel 4). Wanneer de procentuele toe- of afname van een uitslag groter is dan het kritisch verschil, mag men de uitslag klinisch significant verschillend noemen van de voorgaande uitslag.

**TABEL 3** Referentiewaarden ( $\times 10^9/l$ ) voor leukocytendifferentie per leeftijdsklasse

celtype	leeftijdsklasse					
	neonaten	< 0,5 jaar	0,5-2 jaar	3-6 jaar	7-15 jaar	> 15 jaar
leukocyten	12-24	6-17	4-16	4-15	4-14	4-10
neutrofielen granulocyten	5,0-20,0	1,0-8,5	1,0-9,0	1,5-9,0	1,5-8,0	1,5-7,5
eosinofiele granulocyten	< 2,0	< 2,0	< 0,8	< 0,8	< 0,5	< 0,5
basofiele granulocyten	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
lymfocyten	2,0-10,0	4,0-13,5	1,5-8,0	1,0-6,5	1,0-5,0	1,0-3,5
monocyten	< 2,0	0,1-1,0	0,1-1,0	0,1-1,0	0,1-1,0	0,1-1,0



**TABEL 4** Variatiecoëfficiënten en kritisch verschil voor automatische leukocytendifferentieatie

laboratoriumparameter	VC <sub>a</sub> ; %	VC <sub>b</sub> ; %	kritisch verschil* in %
Hb	1	2,5	5,5
trombocyten	3,6	9,1	12,6
leukocyten	2,1	11,4	14,4
neutrofiële granulocyten	3,1	17,1	20,2
lymfocyten	4,4	10,2	13,9
monocyten	9,4	17,8	22,9

VC<sub>a</sub> = analytische variatiecoëfficiënt; VC<sub>b</sub> = intra-individuele biologische variatiecoëfficiënt.

\* Kritisch verschil =  $2,8 \times \sqrt{(VC_a^2 + VC_b^2)}$ .

Bij de manuele leukocytendifferentieatie worden slechts 100 of 200 cellen microscopisch beoordeeld, in tegenstelling tot 10.000 cellen in de automatische differentiatie. Door het lage aantal getelde cellen in de manuele leukocytendifferentieatie brengt dit een aanzienlijke statistische fout met zich mee. Voor het beoordelen van een manuele leukocytendifferentieatie kan gebruik gemaakt worden van het 95%-betrouwbaarheidsinterval van Rümke (tabel 5). Dit betrouwbaarheidsinterval geeft de marge aan van het gevonden percentage cellen.<sup>15</sup>

Van de tabel van Rümke wordt ook gebruikgemaakt bij controle van de automatische leukocytendifferentieatie. Dit kunnen we illustreren met de uitslagen van de leukocytendifferentieatie van patiënt B. Omdat de hematologie-analyser bij deze patiënt lymfocytose signaleerde, werd een manuele differentiatie uitgevoerd waarbij 100 cellen gedifferentieerd werden. Hiervan waren er 90 een lymfocyt (90%). Volgens tabel 5 is het bijpassende betrouwbaarheidsinterval 82-98. De automatische telling (93%) valt binnen dit betrouwbaarheidsinterval; de automatische en de manuele telling komen dus overeen. Als de manuele differentiatie van de neutrofiële granulocyten,

**TABEL 5** 95%-betrouwbaarheidsinterval van het percentage microscopisch getelde cellen in een manuele leukocytendifferentieatie

celtelling; %	100 cellen geteld; 95%-BI	200 cellen geteld; 95%-BI
0	0- 4	0- 2
1	0- 5	0- 4
2	0- 7	1- 5
3	1- 9	1- 6
4	1- 10	2- 8
5	2- 11	2- 9
6	2- 13	3- 10
7	3- 14	4- 12
8	4- 15	5- 13
9	4- 16	5- 14
10	5- 18	6- 15
15	9- 24	10- 21
20	13- 29	15- 26
25	17- 35	19- 32
30	21- 41	24- 37
35	26- 45	28- 42
40	30- 50	33- 47
45	35- 55	38- 52
50	40- 60	43- 57
60	50- 70	53- 76
70	60- 79	63- 76
80	71- 89	74- 85
90	82- 98	85- 94
100	96-100	98-100

lymfocyten, monocyten, eosinofiele granulocyten en basofiele granulocyten overeenkomt met de automatische differentiatie, wordt bij voorkeur de automatische differentiatie gerapporteerd in verband met de hogere nauwkeurigheid.

**> KIKJ OOK OP WWW.NTVG.NL/KLINISCHE PRAKTIJK**

## LITERATUUR

- Hoffmann JJML, Akkerman JWN, Overbeeke MAM. Hematologie. Arnhem: Syntax Media; 2006. p 97-106.
- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Essential Haematology. 4e dr. Oxford: Blackwell Publishing; 2001. p. 1-12.
- NHG. Landelijke Eerstelijns Samenwerkingsafspraken. Rationeel aanvragen van laboratoriumdiagnostiek. [www.nhg.org/themes/publicaties/lesa-rationeel-aanvragen-van-laboratoriumdiagnostiek](http://www.nhg.org/themes/publicaties/lesa-rationeel-aanvragen-van-laboratoriumdiagnostiek), geraadpleegd op 23 februari 2015.
- Stock W, Hoffman R. White blood cells 1: non-malignant disorders. Lancet. 2000;355:1351-7.
- Van der Meer J. Interne geneeskunde. Houten: Bohn Stafleu van Loghum; 2010.
- Van den Broek EC, Kater AP, van de Schans SAM, et al. Chronic lymphocytic leukemia in the Netherlands; trends in incidence, treatment and survival, 1989-2008. Eur J Cancer. 2012;48:889-95.

- 7 Simson E, Gascon-Lema MG, Brown DL. Performance of automated slidemakers and stainers in a working laboratory environment - routine operation and quality control. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(1 Pt 1):e64-76.
- 8 Tseng V, Morgan AS, Leith CP, Yang DT. Efficient assessment of peripheral blood lymphocytosis in adults: developing new thresholds for blood smear review by pathologists. *Clin Chem Lab.* 2014;52:1763-70.
- 9 Andrews JM, Cruser DL, Myers JB, Fernelius CA, Holm MT, Waldner DL. Using peripheral smear review, age and absolute lymphocyte count as predictors of abnormal peripheral blood lymphocytoses diagnosed by flow cytometry. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(9):1731-1737.
- 10 WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4e dr. Lyon: IARC; 2008.
- 11 te Raa GD, van Oers MHJ, Kater AP, HOVON-werkgroep chronische lymfatische leukemie. Richtlijn monoklonale B-cellymfocytose: incidentie, risicostratificatie en aanbevelingen voor de dagelijkse praktijk. *Nederlands Tijdschrift voor Hematologie.* 2012;9:138-46.
- 12 Hotton J, Broothaers J, Swaelens C, Cantinieaux B. Performance and abnormal cell flagging comparisons of three automated blood cell counters: Cell-Dyn Sapphire, DxH-800, and XN-2000. *Am J Clin Pathol.* 2013;140:845-52.
- 13 Meintker L, Ringwald J, Rauh M, Krause SW. Comparison of automated differential blood cell counts from Abbott Sapphire, Siemens Advia 120, Beckman Coulter DxH 800, and Sysmex XE-2100 in normal and pathologic samples. *Am J Clin Pathol.* 2013;139:641-50.
- 14 VHL/NVVC. Richtlijn Aanbevolen werkwijze en terminologie bij de microscopische beoordeling van het bloedbeeld (het "Difboekje"). Utrecht: VHL/NVVC; 2013.
- 15 Rümke CL. The statistically expected variability in differential leukocyte counting. In: Koepke, JA. (red): *Differential leukocyte counting.*, Skokie: College of American Pathologists; 1978. p. 39.