Risultati della sperimentazione multistrumentale in ematologia automatizzata: lo stato dell'arte

M. Buttarello

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera - Azienda USL 16, Padova

GdS Ematologia-SIMeL
P. Cappelletti (*coordinatore*), B. Biasioli (*vice-coordinatore*), P. Bulian, M. Buttarello (*vice-coordinatore*), B. Casolari, A. Cenci, G. Da Rin, P. Doretto, C. Feruglio, V. Miconi, L. Pasini, C. Piccinini, E. Piva.

Introduzione

Negli ultimi anni sono stati prodotti e commercializzati analizzatori ematologici in grado di eseguire il conteggio leucocitario differenziale completo con prestazioni sempre più elevate per cadenza analitica, precisione e accuratezza. Questi analizzatori sono inoltre caratterizzati dalla progressiva estensione del conteggio a nuove popolazioni cellulari: dai reticolociti agli eritroblasti, fino ai granulociti immaturi o alle cellule staminali.
I risultati strumentali quando valutati con i metodi di riferimento basati sull'analisi microscopica quali gli standard NCCLS H20-A e NCCLS-ICSH H44-A[1,2] sono generalmente considerati eccellenti per alcuni citotipi quali i neutrofili, i linfociti e i granulociti eosinofili, accettabili per i monociti e i reticolociti e scadenti per i basofili.
La ridotta concordanza con i metodi di riferimento viene da molti fatta risalire al limitato numero di cellule analizzate e quindi ai limiti del metodo microscopico, in special modo quando si tratta di popolazioni percentualmente poco rappresentate come ad esempio i granulociti basofili.
Sull'argomento da alcuni anni si sta discutendo circa la possibilità di nuovi standard di riferimento basati sulla citometria a flusso e sull'uso di opportuni pannelli di anticorpi monoclonali[3,4]. Ciò renderebbe il metodo di riferimento molto più valido sotto il profilo statistico data la possibilità di analizzare parecchie migliaia di cellule, e più oggettivo in quanto meno vincolato all'interpretazione dell'operatore. Questo metodo rappresenta certamente un miglioramento quando si debbano analizzare campioni normali o con ben definite tipologie di cellule immature quali ad esempio gli eritroblasti, ma presenta dei limiti sui campioni patologici in cui le cellule normali possono coesistere con un'ampia varietà di cellule immature o atipiche (ad esempio: granulociti immaturi, blasti, linfociti atipici, plasmacellule, linfociti attivati, ecc.).
Nel caso si considerino ulteriori aspetti quali la sensibilità clinica (cioè la generica capacità di distinguere i campioni normali da quelli patologici), o l'attendibilità degli allarmi nel segnalare la presenza di definite tipologie di cellule immature o atipiche le cose si complicano poiché i risultati sono di solito ottimi nel primo caso ma modesti nel secondo.
L'evoluzione della tecnologia (sia per l'utilizzo di nuovi principi fisici che per i progressivi affinamenti software) ha comportato un miglioramento continuo delle prestazioni nelle generazioni strumentali che si sono succedute nel tempo.
Il Gruppo di Studio in Ematologia della Società Italiana di Medicina di Laboratorio (SIMeL) ha progettato e condotto a termine nell'ottobre del 2002 una sperimentazione tendente a valutare lo stato dell'arte sulla leucocitometria differenziale (LD) e sul conteggio reticolocitario. In questo lavoro vengono presentati i risultati ottenuti relativamente ad imprecisione e inaccuratezza dei cinque più moderni analizzatori disponibili in commercio.

Materiali e metodi

Nell'ottobre del 2002 per un periodo di 2 settimane sono stati valutati in parallelo, presso l'Ospedale S. Maria degli Angeli di Pordenone, gli analizzatori ematologici Abbott Cell Dyn 4000 (Abbott, Santa Clara, CA); ABX Pentra 120 (ABX, Montpellier, Francia); Bayer Advia 120 (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY); Coulter LH 750 (Beckman Coulter, Hialeah, FL); Sysmex XE 2100 (Sysmex, Kobe,

Corrispondenza a: Dott. Mauro Buttarello, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale "S. Antonio", Via Facciolati, 71 - 35126 Padova. Tel 049-8216611 - Fax 049-8216614, e-mail: mbuttarello@yahoo.it

Giappone). La tabella I riporta i principi tecnologici utilizzati per la LD e per il conteggio reticolocitario. Su tutti gli strumenti sono stati analizzati 334 campioni di cui 143 provenienti da soggetti normali e utilizzati per il calcolo dell'intervallo di riferimento. Mentre su tutti i campioni è stato eseguito il conteggio reticolocitario, soltanto 197 sono stati utilizzati per lo studio quantitativo sulla LD, cioè quelli non allarmati e con la differenziazione completa.

Tabella I. Principi analitici utilizzati per il conteggio reticolocitario e la leucocitometria differenziale.

ANALIZZATORE	METODO
ABBOTT Cell-Dyn 4000	Axial light loss (analisi dimensionale)
	High angle scatter (complessità)
	Polarizzazione
	Fluorescenza
ABX Pentra 120	Corrente continua (analisi dimensionale)
	Citochimica selettiva (assorbanza)
	Lisi selettiva
	Fluorescenza
BAYER Advia 120	Forward light scatter (analisi dimensionale)
	Citochimica selettiva (assorbanza)
	Lisi selettiva
BECKMAN COULTER LH 750	Corrente continua (analisi dimensionale)
	Radiofrequenza (opacity) (composizione e struttura)
	Intermediate angle scatter (complessità)
SYSMEX XE 2100	Forward scatter (analisi dimensionale)
	Side scatter (complessità)
	Radiofrequenza
	Lisi selettiva
	Fluorescenza

I campioni sono stati prelevati sottovuoto, utilizzando K2 EDTA come anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, Plymout, Gran Bretagna), e analizzati entro 6 ore dal prelievo in duplicato, con reinserimento casuale nella serie. Da ogni campione sono stati eseguiti entro 4 ore dal prelievo, 3 strisci di sangue per la LD e 2 strisci previa colorazione con nuovo blu di metilene per il conteggio reticolocitario.
La metodologia utilizzata per la valutazione è quella prevista dagli standard NCCLS H20-A per la LD e NCCLS–ICSH H44-A per il conteggio reticolocitario. L'unica variante apportata riguarda il metodo di riferimento microscopico per la LD che è costituito dalla media di 4 conte in cieco a 200 cellule, ciò per dare maggiore consistenza statistica al metodo di riferimento.
In sintesi l'imprecisione per ogni metodo è stata valutata con l'analisi della varianza fra duplicati dopo aver suddiviso i campioni in base alla concentrazione delle singole popolazioni studiate (valori bassi, normali o aumentati), ottenendo quindi 3 valori di CV% per ogni parametro[5]. Per lo studio della concordanza sono state confrontate le medie ottenute sui duplicati per ciascuna popolazione e per ciascun strumento con la media dei 4 conteggi al microscopio per la LD e di 2 conteggi a 1000 cellule ciascuno per i reticolociti.

Risultati

La tabella II riporta gli intervalli di riferimento per ciascun metodo e ciascuna popolazione. Come si può notare nel caso della LD questi sono sovrapponibili con modeste differenze per i monociti che mostrano valori leggermente inferiori per il metodo di riferimento, Pentra 120 e Advia 120, rispetto agli altri tre metodi. Per il conteggio reticolocitario le differenze sono invece più rilevanti.
La tabella III evidenzia l'imprecisione analitica calcolata sui duplicati. Le prestazioni strumentali seppur con differenze talvolta rilevanti (specie per le popolazioni meno rappresentate quali monociti, eosinofili, basofili e reticolociti) sono sempre migliori di quelle ottenute con metodo microscopico e pubblicate in letteratura[6,7].
La tabella IV riporta i dati sintetici delle equazioni delle rette di regressione ottenute nella comparazione fra ciascun analizzatore e il metodo di riferimento. Le figure 1 e 2 visualizzano la comparazione fra metodi per due popolazioni esemplificative: i neutrofili per i quali la concordanza è sempre elevata e i monociti

Tabella II. Intervalli di riferimento per la leucocitometria differenziale e per il conteggio reticolocitario (valori espressi in percentuale) n=143.

	METODO DI RIFERIMENTO		ABBOTT		ABX		BAYER		BECKMAN COULTER		SYSMEX	
PARAMETRI			Cell Dyn 4000		Pentra 120		Advia 120		LH 750		XE 2100	
	2.5°	97.5°	2.5°	97.5°	2.5°	97.5°	2.5°	97.5°	2.5°	97.5°	2.5°	97.5°
Neutrofili	41.4	69.0	41.4	70.0	43.1	71.3	43.2	73.0	43.5	72.0	40.5	70.4
Linfociti	22.9	49.4	21.7	48.7	20.3	45.4	20.0	46.6	19.1	46.2	20.9	47.8
Monociti	3.8	8.9	5.3	11.6	4.6	10.2	3.6	8.7	5.4	12.8	5.4	12.5
Eosinofili	0.7	5.6	0.9	6.0	1.4	6.6	1.0	6.2	0.7	5.9	0.9	6.4
Basofili	0.0	1.25	0.0	0.6	0.3	1.3	0.2	1.1	0.3	1.0	0.2	0.9
Reticolociti	0.6	2.7	0.6	2.6	0.6	2.3	0.7	2.0	0.4	2.1	0.6	2.1

Figura 1 (a, b, c, d, e):

Comparazione sul conteggio percentuale dei granulociti neutrofili.

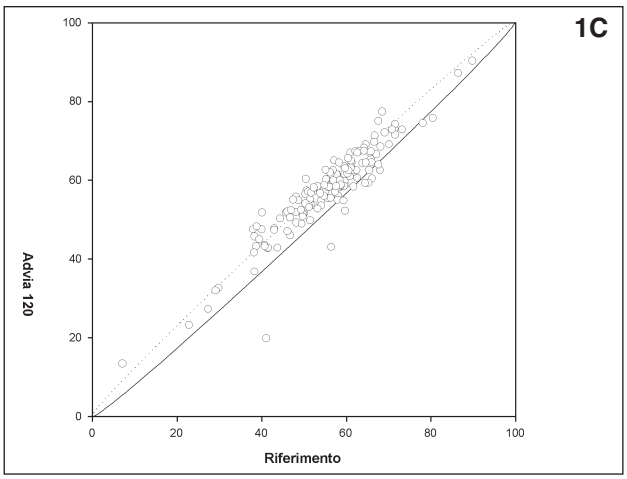
a: Cell Dyn 4000,

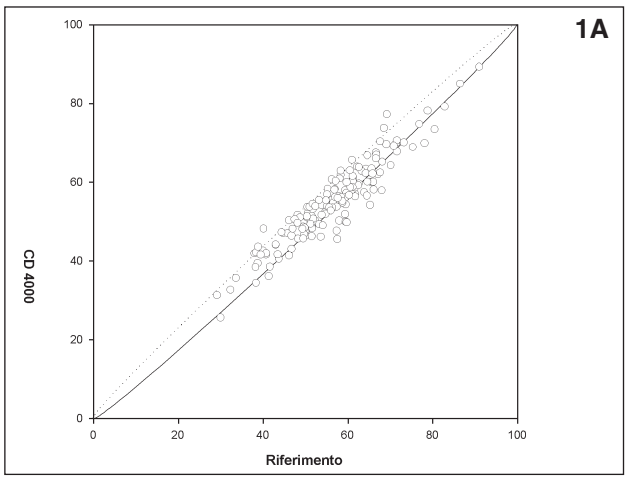
b: Pentra 120,

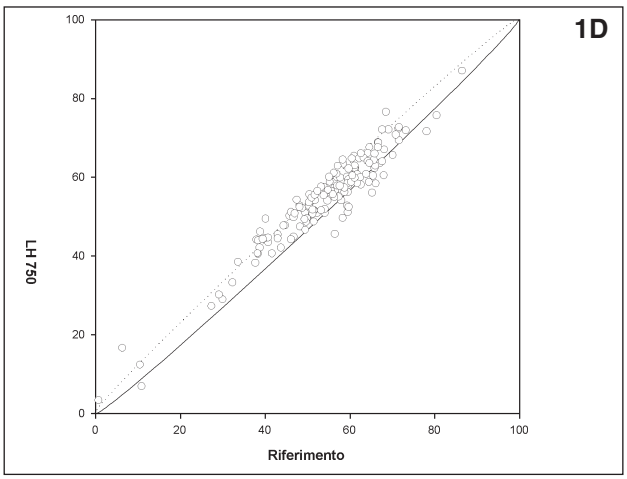
c: Advia 120,

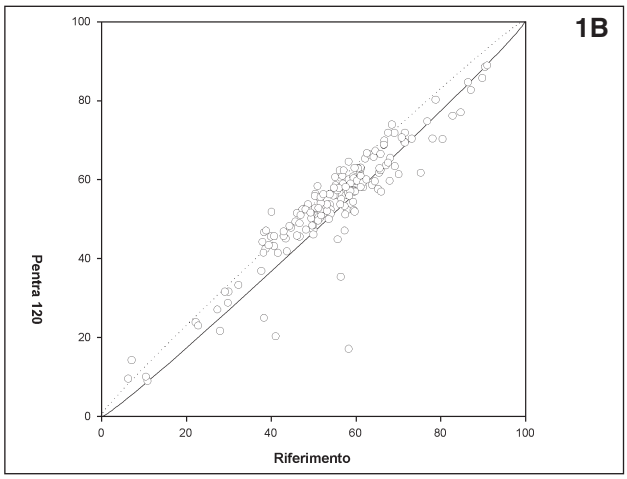
d: LH 750,

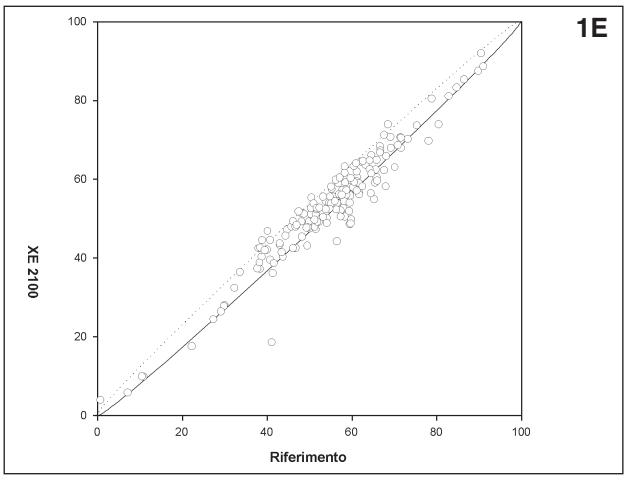
e: XE 2100.











per i quali in genere è più modesta. Come si può vedere dalla tabella IV, la comparabilità è elevata per le popolazioni dei neutrofili, linfociti ed eosinofili, inferiore ma comunque accettabile per i monociti e i reticolociti e decisamente modesta per i basofili.

Discussione

Nell'epoca del contenimento dei costi, il conteggio microscopico su un'elevata percentuale di campioni che richiedono la LD risulta improponibile; inoltre, quando eseguita a 100 cellule come di routine, questa è soggetta a imprecisione e inaccuratezza elevate, oltre che a bassa sensibilità clinica. Diventa perciò di fondamentale importanza disporre di analizzatori automatici in grado di eseguire conteggi accurati e precisi sulle 5 popolazioni normali per un ampio intervallo di concentrazioni. Simili considerazioni vanno fatte per i reticolociti per i quali conteggi attendibili sono richiesti soprattutto alla basse concentrazioni, cioè quando è necessario diagnosticare e

Figura 2 (a, b, c, d, e):
Comparazione sul conteggio percentuale dei monociti.

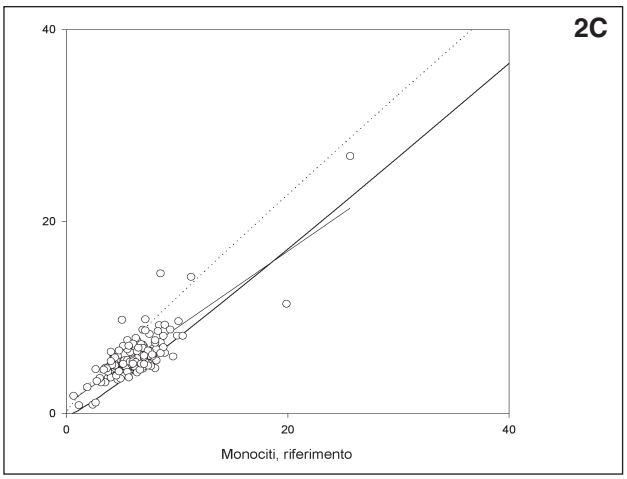
a: Cell Dyn 4000,

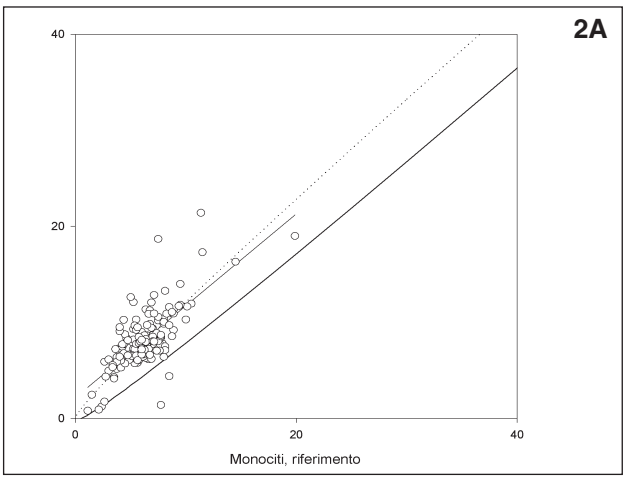
b: Pentra 120,

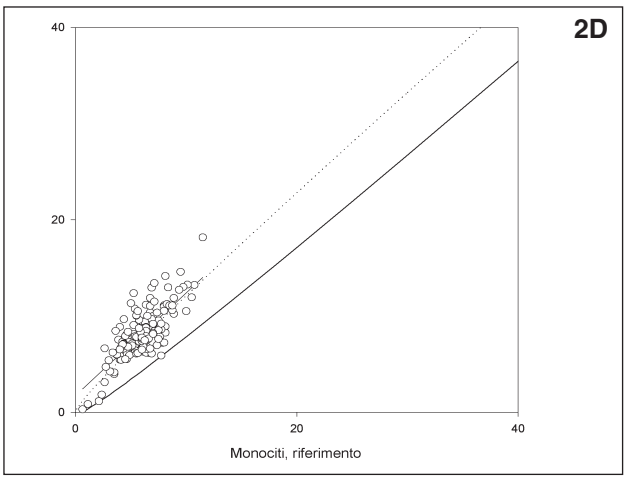
c: Advia 120,

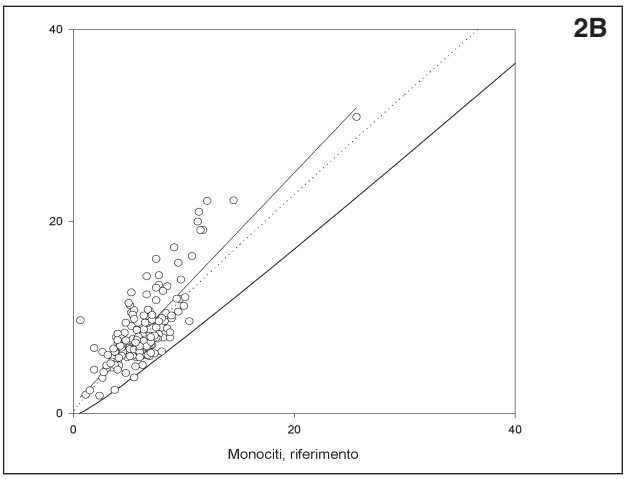
d: LH 750,

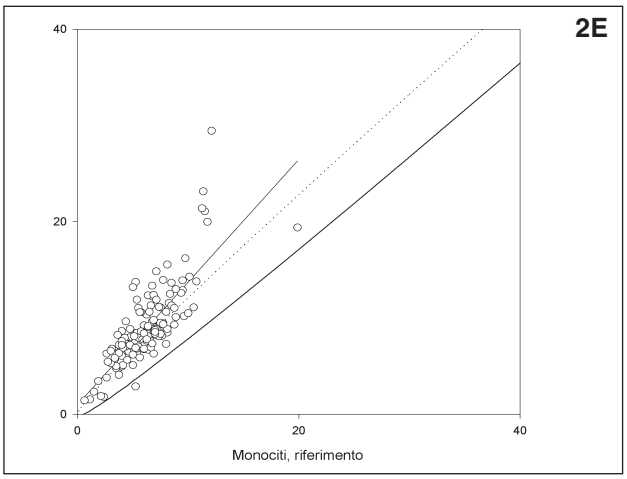
e: XE 2100.











controllare nel tempo soggetti in aplasia midollare. A queste concentrazioni infatti il metodo microscopico tradizionale mostra limiti non superabili.

I risultati ottenuti indicano che nella LD gli intervalli di riferimento sono sostanzialmente sovrapponibili fra i vari metodi con l'unica eccezione della soglia superiore dei monociti che risulta più bassa per il metodo microscopico, per Advia 120 e in minor misura per Pentra 120 (da 8.7 a 10.2 %), rispetto agli altri metodi (da 11.6 a 12.8%). Questo comportamento trova riscontro in altre sperimentazioni in cui siano stati utilizzati gli stessi tipi di analizzatori[8,9] e può essere giustificato dal diverso riferimento scelto dai singoli Costruttori per la calibrazione di questa popolazione: metodo microscopico o metodo citofluorimetrico. Quest'ultimo se utilizzato con opportuni pannelli di MoAb (esempio CD14 e CD163 o CD 64 e CD163) può dar luogo ad un maggior recupero di cellule identificabili come monociti[10].

Diverso è il caso dei reticolociti per i quali gli inter-

Tabella III. Imprecisione analitica per la leucocitometria differenziale e per i reticolociti (CV% calcolato sui duplicati)

	METODO														
	ABBOTT			ABX			BAYER			BECKMAN COULTER			SYSMEX		
	Cell Dyn 4000			Pentra 120			Advia 120			LH 750			XE 2100		
PARAMETRI	bassi	normali	alti	bassi	normali	alti	bassi	normali	alti	bassi	normali	alti	bassi	normali	alti
Neutrofili	3.5	1.4	1.2	5.3	2.2	1.5	2.5	1.5	0.8	2.9	1.4	0.9	4.3	1.6	0.9
Linfociti	4.3	3.0	2.6	5.3	3.0	3.0	2.8	2.4	1.4	3.3	1.9	1.1	5.6	3.0	2.9
Monociti	19.1	6.8	8.0	25.6	9.5	6.5	13.4	7.2	6.4	9.0	5.6	4.6	13.9	8.9	9.3
Eosinofili	17.5	12.8	7.1	32.5	11.1	10.3	19.2	9.7	6.4	50.1	8.9	4.8	53.8	9.4	3.8
Basofili	—	70.7	53.2	32.4	22.9	13.7	48.8	25.8	30.3	48.5	20.4	25.4	72.3	24.9	12.6
Reticolociti	11.7	5.4	3.3	25.2	9.7	4.5	20.9	8.7	5.8	41.6	11.8	8.1	13.8	6.1	4.7

LD n= 184; Reticolociti n= 332

valli di riferimento non risultano sovrapponibili soprattutto per la soglia inferiore che varia dallo 0.4% di LH 750 allo 0.7% di Advia 120, e poiché è proprio questa la soglia più importante dal punto di vista clinico è necessario utilizzare intervalli strumento specifici. Questi risultati confermano quanto già pubblicato nella letteratura recente[7].

Dei vari metodi per valutare lo stato dell'arte sull'imprecisione e l'inaccuratezza uno dei più oggettivi utilizza criteri basati sulla variabilità biologica[11,12]. I dati relativi a quest'ultima sono noti dalla letteratura[13,14] e sono stati confermati in un esperimento collaterale a quello oggetto di questa presentazione[15]. L'obbiettivo previsto da questo modello (imprecisione inferiore o uguale a 0.5 x CV% intraindividuale e bias inferiore o uguale a 0.25 x (CV% intraindividuale^2 + CV% interindividuale^2)$^{1/2}$ è riportato nella tabella V.

I due estremi riportati in tabella sono ottenuti componendo rispettivamente i valori minimi e massimi della variabilità biologica intra ed interindividuale disponibili in letteratura[13-15].

L'imprecisione strumentale riportata è quella riferita alla concentrazione "normale" dei singoli parametri, mentre il bias percentuale è calcolato a partire dalle medie e dalle differenze medie ottenute nello studio sulla comparabilità. Si può notare che per i neutrofili e i linfociti gli obbiettivi per l'imprecisione e l'inaccuratezza sono raggiunti da tutti gli analizzatori. Per i monociti l'obbiettivo per l'imprecisione può dirsi sostanzialmente raggiunto (CV % fra 5.6 di LH 750 e 9.5 di Pentra 120), non altrettanto per il bias, con l'unica eccezione di Advia 120 (differenza media di 4.21%). Questo risultato è immediatamente percepibile dall'osservazione della figura 2 e può dipendere, come già detto per le soglie degli intervalli di riferimento, da differenti metodi utilizzati per la calibrazione di questa popolazione.

Per gli eosinofili l'obbiettivo è stato raggiunto sia per l'imprecisione che per il bias, seppur in quest'ultimo caso, con notevoli differenze fra i vari analizzatori (da 1.29% di LH 750 a 16.2% di Pentra 120). Per i basofili i risultati sono lontani dall'ottimale per l'imprecisione, mentre per il bias l'obbiettivo è raggiunto da LH 750 e XE 2100. Per i reticolociti l'obbiettivo per l'imprecisione è raggiunto (anche se limitatamente alle concentrazioni entro l'intervallo di

Tabella IV. Comparazione tra metodi.

	METODO														
	ABBOTT			ABX			BAYER			BECKMAN COULTER			SYSMEX		
	Cell Dyn 4000			Pentra 120			Advia 120			LH 750			XE 2100		
PARAMETRI	a	b	r^2	a	b	r^2	a	b	r^2	a	b	r^2	a	b	r^2
Neutrofili	4.8	0.89	0.88	5.17	0.89	0.85	7.15	0.91	0.87	6.15	0.89	0.92	1.14	0.95	0.92
Linfociti	4.23	0.86	0.88	2.79	0.86	0.84	2.04	0.88	0.86	1.68	0.88	0.92	1.63	0.92	0.91
Monociti	2.16	0.96	0.52	0.94	1.20	0.66	1.00	0.79	0.67	1.77	1.06	0.59	0.27	1.27	0.63
Eosinofili	0.25	0.99	0.96	0.77	0.88	0.82	0.43	0.97	0.87	0.06	0.97	0.96	0.17	1.00	0.97
Basofili	0.27	0.12	0.02	0.41	0.63	0.39	0.45	0.39	0.27	0.39	0.41	0.23	0.21	0.63	0.37
Reticolociti	0.18	0.90	0.96	0.19	0.81	0.95	0.07	0.86	0.89	0.14	0.75	0.89	0.02	0.79	0.95

a: intercetta; b: pendenza; r^2: coefficiente di determinazione.
LD n= 197; Reticolociti n= 334

Tabella V. Obbiettivi analitici e risultati ottenuti per l'imprecisione e l'inaccuratezza.

Parametri	Abbott Cell Dyn 4000		ABX Pentra 120		Bayer Advia 120		Beckman Coulter LH 750		Sysmex XE 2100		Obbiettivo per l'imprecisione	Obbiettivo per l'inaccuratezza
	Imp CV%	Bias %	Imp CV%	Bias %	Imp CV%	Bias %	Imp CV%	Bias %	Imp CV%	Bias %	CV%	Bias %
Neutrofili	1.4	2.74	2.2	1.16	1.5	3.36	1.4	0.75	1.6	2.8	5.0 - 11.6	7.41 - 9.61
Linfociti	3.0	0.86	3.0	6.15	2.4	5.97	1.9	6.99	3.0	3.58	4.9 - 7.0	5.68 - 8.52
Monociti	6.8	30.7	9.5	35.4	7.2	4.21	5.6	35.5	8.9	43.0	4.8 - 8.2	5.95 - 8.44
Eosinofili	12.8	8.0	11.1	16.2	9.7	12.6	8.9	1.29	9.4	5.6	4.2 - 13.1	16.1 - 18.71
Basofili	70.7	38.2	22.9	38.9	25.8	24.5	20.4	10.9	24.9	1.8	3.6 - 12.7	8.0 - 13.3
Reticolociti	5.4	0.0	9.7	8.0	8.7	10.2	11.8	16.4	6.1	21.8	1.4 - 10.0	8.1 - 9.52

normalità), non altrettanto per il bias, con le eccezioni di Cell-DYN 4000 e Pentra 120.

Questi risultati portano ad almeno due conclusioni: la prima è che il criterio di giudizio basato sulla variabilità biologica è realistico, la seconda è che gli sforzi di miglioramento che i Costruttori devono mettere in atto andranno indirizzati prevalentemente ad alcune popolazioni (basofili e monociti innanzitutto, e in minor misura reticolociti) poiché per le altre questi obbiettivi sono in pratica raggiunti.

Bibliografia

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Approved standard H20-A.Wayne (PA): NCCLS; 1992.
2. National Committee for clinical Laboratory standards. Methods for reticulocyte counting (flow cytometry and supravital dyes). Approved guideline H44-A. Wayne (PA): NCCLS; 1997.
3. Hübl W, Wolfbauer G, Andert S, et al. Toward a new reference method for the leukocyte five-part differential. Cytometry (communications in clinical cytometry) 1997; 30: 72-84.
4. Houwen B. The differential cell count. Lab hematol 2001; 7: 89-100.
5. International Council for Standardization in Haematology. Expert panel on cytometry. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. Clin Lab Haematol 1994; 16: 157-74.
6. Buttarello M, Lorenz C, Gadotti M, et al. Evaluation of four automated hematology analyzers. A comparative study of differential count (imprecision and inaccuracy). Am J Clin Pathol 1992; 97: 345-52.
7. Buttarello M, Bulian P, Farina G, et al. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. Am J Clin Pathol 2001; 115: 100-11.
8. Buttarello M, Lorenz C, Gadotti M, et al. Diagnostic performance. A comparative study of the leucocyte differential on four automated haematology analysers. Eur J Clin Chem Biochem 1993; 31: 251-8.
9. Van Den Bossche J, Devreese K, Malfait R, et al. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analyzers: ABX Pentra 120, Coulter Gen-S, Sysmex Se 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 69-73.
10. Zarev PV, Davis BH. Comparative study of monocyte enumeration by flow cytometry: improved detection by combining monocyte-related antibodies with anti-CD 163. Lab Hematol 2004; 10: 24-31.
11. Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, Ricos C. Proposal for setting generally applicable quality goals solely based on biology. Ann Clin Biochem 1997, 34: 8-12.
12. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. Clin Chem 1999; 45: 321-3.
13. Statland BE, Winkel P, Harris SC, Burdsall MJ, Saunders AM. Evaluation of biologic sources of variation of leukocyte counts and other hematologic quantities using very precise automated analyzer. Am J Clin Pathol 1978; 69: 48-54.
14. Richardson Jones A, Twedt D, Swaim W, Gottfried E. Diurnal change of blood count analytes in normal subjects. Am J Clin Pathol 1996; 106: 723-7.
15. Buttarello M, GdSE-SIMeL. Variabilità biologica dei parametri ematologici. Riv Med Lab 2003; 4 (suppl.1): 88-91.