

Valutazione multicentrica dei conteggi cellulari ottenuti con 8 analizzatori ematologici automatici

Sabrina Buoro¹, Silvia Pipitone², Alessandra Fanelli³, Sara Francione⁴, Giorgio Da Rin⁵, Annamaria Di Fabio⁶, Fabiana Fiorini⁷, Alessandra Marini⁸, Angela Papa⁹, Michela Seghezzi¹, Anna Benegiamo², Benedetta Peruzzi³, Marco Borin⁴, Fosca Siviero⁵, Lucia Francioni⁷, Tiziana Lari⁸, Franca Cocci⁹, Fiamma Balboni¹⁰, Maria Laura Ciardelli¹¹, Francesco Dima¹², Luca Germagnoli¹³, Maria Gioia¹⁴, Antonio La Gioia⁷ a nome del Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio Diagnostica Ematologica

¹SMEL Generale di base - Analisi chimico-cliniche, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

²UO Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

³Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

⁴Laboratorio Analisi, ASL NO, Borgomanero (NO)

⁵Medicina di Laboratorio APE 3, Bassano del Grappa (TV)

⁶UOC Patologia Clinica, Ospedale Civile, Avezzano (AQ)

⁷UO Patologia Clinica, Ospedale "F. Lotti", USL Toscana Nord-Ovest, Pontedera (PI)

⁸Laboratorio Analisi, Ospedale Versilia, USL Toscana Nord-Ovest, Lido di Camaiore (LU)

⁹Medicina di Laboratorio, Fondazione G. Monasterio, CNR Regione Toscana, Pisa

¹⁰Laboratorio Analisi, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA), Firenze

¹¹Servizio Analisi Chimico Cliniche Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

¹²UOC Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona

¹³Synlab Italia, Milano

¹⁴Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "V. Cervello", Palermo

ABSTRACT

Multicenter evaluation of blood cell counts on 8 automated hematology analyzers. The cellular analysis performed on hematology analyzers is based on the interaction of cells with electrical or optical signals. The heterogeneity of adopted methods and technologies by different analyzers can translate in a lack of homogeneity in analytical performance. This study compares 8 hematological analyzers vs. optical microscopy (OM) and, where possible, also compares the analyzers among each other. Correlations were assessed by Pearson's coefficient of correlation, Passing and Babcock regression and Bland-Altman bias plot analysis. The comparison among analyzers regarding leukocyte differential counts showed a good level of agreement, except for the basophil cell count. For this "critical population", the bias ranged from -5,8% (Cell-Dyn Sapphire vs. XN-9000) to 30,6% (Advia 2120i vs. XE-2100). The comparison between automated differential leukocyte counts and OM showed also a good level of agreement, with a bias ranging from -0,9% to 8.9%. The bias for basophil cell count was however very high (79.5%).

INTRODUZIONE

Gli analizzatori ematologici automatici sono utilizzati per la valutazione qualitativa e quantitativa delle cellule presenti nel sangue periferico, definita comunemente come esame emocromocitometrico (emocromo). L'emocromo di base comprende il dosaggio

dell'emoglobina (HGB), il conteggio degli eritrociti (RBC), delle piastrine (PLT) e dei leucociti (WBC), totali e differenziati per tipo cellulare [formula leucocitaria (FL)] in neutrofilii (NE), linfociti (LY), monociti (MO), eosinofili (EO) e basofili (BA) (1-3). L'emocromo comprende inoltre parametri relativi alla serie rossa [volume corpuscolare medio (MCV), ematocrito (HT), contenuto e

Corrispondenza a: Silvia Pipitone, UO Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. Via Gramsci 14, 43126 Parma. Tel. 0521703053, Fax 0521703791, E-mail spipitone@ao.pr.it.

Ricevuto: 22.01.2016

Revisionato: 19.04.2016

Accettato: 18.05.2016

Publicato on-line: 01.08.2016

DOI: 10.19186/BC_2016.029

concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCH e MCHC), ampiezza della curva di distribuzione volumetrica (RDW) e alla serie piastrinica [volume corpuscolare medio (MPV), piastrinocrito (PCT), ampiezza della curva di distribuzione volumetrica (PDW)] (4, 5). Sugli stessi analizzatori è possibile ottenere il conteggio diretto o come "reflex test" dei reticolociti (RET) e degli eritroblasti (NRBC). Infine, la maggior parte degli analizzatori ematologici fornisce parametri aggiuntivi, spesso tecnologia o metodologia specifici, quali ad esempio:

- per i leucociti: il conteggio leucocitario esteso [granulociti immaturi (IG)], le cellule ad alta fluorescenza (HFC), le grandi cellule perossidasi negative (LUC), i parametri leucocitari morfologico-posizionali (CPD) per NE, LY e MO;
- per la serie rossa: la percentuale di emazie ipocromiche, ipercromiche, microcitiche e macrocitiche; il conteggio dei frammenti eritrocitari (FRC); il contenuto (o concentrazione media) emoglobinico dei RET; il volume corpuscolare dei RET;
- per la serie piastrinica: la percentuale di grandi piastrine.

Alcuni di questi parametri sono di uso consolidato, per altri vi sono segnalazioni di utilità clinica (6-11). Per altri ancora, una stretta dipendenza dalla tecnologia o dalla metodologia e/o problemi preanalitici ne limita l'uso (1-5).

Oltre ai conteggi cellulari e agli altri parametri quantitativi, gli analizzatori ematologici forniscono numerosi allarmi e segnalazioni, che possono essere di ausilio nella corretta gestione del risultato ematologico complessivo. Questi segnali, insieme alle anomalie quantitative, rappresentano nella grande maggioranza dei casi gli item per la formulazione delle regole di "reflex" o di revisione microscopica nei "middleware" o nei sistemi gestionali in uso.

Le metodologie di conteggio impiegate da tutti gli analizzatori sono basate sull'interazione delle cellule con segnali elettrici (impedenziometria, analisi di radiofrequenza) o con segnali ottici ("laser scatter", assorbanza, polarizzazione). Questi ultimi, in particolare, sono maggiormente utilizzati nell'analisi di leucociti, reticolociti e piastrine che, generalmente, subiscono pretrattamenti citochimici o con coloranti fluorescenti o di lisi selettiva. Le cellule in questo modo sono analizzate per le loro caratteristiche di grandezza, complessità interna e contenuto in acidi nucleici ovvero per il contenuto enzimatico e assemblate in "cluster" omogenei il cui insieme costituisce il cosiddetto citogramma, rappresentazione grafica strumentale delle diverse popolazioni cellulari analizzate (1, 2).

Le differenze tecnologiche e metodologiche tra gli analizzatori ematologici si traducono in una disomogeneità delle prestazioni analitiche complessive e, in particolare, di alcuni conteggi cellulari e degli allarmi morfologici a carico di WBC, RBC e PLT (1-5).

Per questi motivi, una delle sfide per i laboratori di diagnostica ematologia è rappresentata dall'armonizzazione del processo diagnostico intesa

anche come capacità di utilizzare e adeguatamente valorizzare tutte le informazioni che il rapido progresso tecnologico a carico degli analizzatori ematologici mette a disposizione in termini di prestazioni analitiche e tipologia di parametri di approfondimento forniti (1-4).

L'analisi dei dati di uno studio condotto dal Gruppo di Studio SiBioC Diagnostica Ematologica (GdS-DE) su un campione di laboratori rappresentativo della realtà italiana ha mostrato un'evidente disomogeneità di gestione della fase analitica (12). Nel questionario non erano presenti elementi sufficienti per comprendere se l'eterogeneità di comportamento fosse dovuta al modello organizzativo adottato o alle competenze disponibili o se fosse invece dipendente dalla tecnologia adottata. Per chiarire tale aspetto è parso utile uno studio di comparazione delle prestazioni analitiche dei principali analizzatori ematologici. Lo studio ha coinvolto 9 laboratori italiani che utilizzano gli analizzatori ematologici maggiormente diffusi. Nello studio sono stati confrontati gli strumenti per quanto riguarda i conteggi cellulari, i parametri RBC-derivati (HCT, MCH, MCHC, MCV) e la concentrazione di HGB. Inoltre, i conteggi delle 5 popolazioni leucocitarie sono stati confrontati anche con la microscopia ottica (OM) (13-15). Lo studio si è sviluppato comparando i singoli analizzatori quando possibile e comparando il conteggio differenziale fornito dai singoli analizzatori al metodo di riferimento in OM.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 2843 campioni di sangue periferico (SP) raccolti in provette EDTA_{K2} (Becton Dickinson e Greiner Bio-One) da soggetti apparentemente sani o con patologia al primo accesso. Per garantire una composizione del campione omogenea per tutti i laboratori e per ridurre la variabilità preanalitica nello studio, sono stati definiti i seguenti criteri di inclusione e randomizzazione:

- a) il primo giorno sono stati selezionati i primi 10 campioni di emocromo pervenuti in laboratorio dalle 09:00 alle 10:00;
- b) il secondo giorno sono stati selezionati i primi 10 campioni di emocromo pervenuti in laboratorio dalle 10:00 alle 11:00;
- c) il terzo giorno sono stati selezionati i primi 10 campioni di emocromo pervenuti in laboratorio dalle 11:00 alle 12:00.

Il ciclo di raccolta è stato ripetuto fino a collezionare un numero minimo di 100 campioni per centro e la raccolta dati si è sviluppata per un anno a partire dal luglio 2013.

Metodi

Lo studio è stato eseguito in conformità con la Dichiarazione di Helsinki, secondo i termini della legislazione locale vigente, con l'approvazione preventiva del comitato di bioetica per i protocolli di verifica e validazione strumentale, applicati in laboratorio

in accordo con la linea guida dell'“International Council for Standardization in Hematology” (ICSH) 2014 (13).

I campioni raccolti sono stati analizzati su: ABX Pentra (ABX-Horiba), Advia 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics), BC-6800 (Mindray), Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics), DxH800 (Beckman Coulter), XE-2100 (Sysmex), XE-5000 (Sysmex), XN-9000 (Sysmex), secondo le specifiche dei produttori ed entro due ore dal prelievo.

Ciascun laboratorio ha garantito il corretto funzionamento degli strumenti con l'esecuzione della manutenzione richiesta dal costruttore, con la verifica di calibrazione della strumentazione quando necessaria, con l'adeguato utilizzo e verifica di CQI e la partecipazione almeno a un programma di VEQ.

Per tutti i campioni inclusi nel protocollo è stato eseguito lo striscio di sangue periferico.

Per ciascun campione sono stati ottenuti:

- i dati strumentali informatici nei diversi formati resi disponibili dalle diverse tecnologie;
- la stampa del referto strumentale con tutti i parametri standard e relativi allarmi morfologici e/o strumentali;
- striscio di sangue periferico (almeno un vetrino), adeguatamente conservato;
- i dati del conteggio differenziale in OM per ciascun campione eseguito in doppio da due operatori.

Nell'elaborazione dei dati sono stati utilizzati i dati strumentali estratti e i risultati dell'OM.

I centri che nell'arco temporale dello studio avevano a disposizione due strumentazioni hanno processato lo stesso campione con entrambi gli analizzatori disponibili. Di seguito sono riportati i centri (LAB) con le relative tecnologie in uso:

- LAB1: Advia 2120i vs. XE-2100 e Advia 2120i vs. XE-5000;
- LAB2: Advia 2120i vs. XE-2100;
- LAB3: Advia 2120i vs. XE-2100;
- LAB4: XE-2100;
- LAB5: Advia 2120i;
- LAB6: BC-6800 vs. XE-2100;
- LAB7: ABX Pentra;
- LAB8: XN-9000 vs. Cell-Dyn Sapphire;
- LAB9: DxH800.

Per i centri LAB1, LAB2, LAB3, LAB6 e LAB8 è stata valutata la correlazione fra i dati in automazione ottenuti dai due analizzatori presenti mediante il coefficiente di correlazione di Pearson e la regressione di Passing e Bablock, previa verifica della distribuzione lineare dei valori (test di Kolmogorov-Smirnov cusum) (13-15). È stato anche valutato il “bias” mediante il test di Bland-Altman e comparato con l'obiettivo di qualità come descritto in dettaglio nella Tabella 1 (16, 17).

Il conteggio differenziale leucocitario in automazione ottenuto con i diversi analizzatori è stato confrontato con il conteggio manuale in OM su striscio di sangue periferico previa colorazione con May-Grünwald-Giemsa. Il conteggio differenziale è stato eseguito da due operatori qualificati su 200 cellule a 1000x. Quando è stata rilevata una discordanza >5% fra il conteggio eseguito dai due operatori, la lettura microscopica è stata eseguita da un terzo operatore qualificato (13-15).

La valutazione morfologica di WBC, RBC e PLT è stata eseguita in accordo con i criteri classificativi descritti dall'ICSH (13, 18-20).

La correlazione tra la media dei conteggi manuali e il conteggio in automazione è stata valutata mediante coefficiente di correlazione di Pearson e regressione di Passing e Bablock, previa verifica della distribuzione lineare dei valori (test di Kolmogorov-Smirnov cusum). È stato anche valutato il “bias” mediante il test di Bland-Altman e comparato con l'obiettivo di qualità (Tabella 1).

RISULTATI

Confronto fra analizzatori automatici

Su 2483 campioni selezionati, 744 sono stati analizzati mediante doppia tecnologia e, tra questi, 509 campioni privi di “flag” morfologici a carico delle popolazioni leucocitarie sono stati inclusi nella valutazione comparativa come di seguito descritto:

- 281 campioni analizzati su Advia 2120i e XE-2100 (LAB1, LAB2 e LAB3);
- 127 campioni analizzati su BC-6800 e XE-2100 (LAB6);
- 101 campioni analizzati su Cell Dyn Sapphire e XN-9000 (LAB8).

La Tabella 2 riporta i risultati dei confronti. Il coefficiente di correlazione variava da un minimo di 0,73 per il parametro MCHC a un massimo di 1,00 per RBC nella comparazione di XE-2100 vs. BC-6800. La valutazione del “bias” comparata con gli obiettivi prestabiliti mostrava che solo HT nel confronto XN-9000 vs. Sapphire non era in grado di raggiungere l'obiettivo di qualità minimo.

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati dei confronti per il conteggio differenziale leucocitario in valore

Tabella 1

Obiettivi di “bias” utilizzati in questo studio. Da rif. 17^a

Parametro	Massimo “bias” accettabile		
	Prestazione minima	Prestazione desiderabile	Prestazione ottimale
WBC	±8,4%	±5,6%	±2,8%
HGB	±2,7%	±1,8%	±0,9%
RBC	±2,6%	±1,7%	±0,9%
HT	±2,6%	±1,7%	±0,9%
MCH	±2,0%	±1,4%	±0,7%
MCHC	±1,2%	±0,8%	±0,4%
MCV	±1,9%	±1,2%	±0,6%
PLT	±8,9%	±5,9%	±3,0%
NE	±13,7%	±9,1%	±4,6%
LY	±11,1%	±7,4%	±3,7%
MO	±19,8%	±13,2%	±6,6%
EO	±29,7%	±19,8%	±9,9%
BA	±23,1%	±15,4%	±7,7%

^aPer il significato delle abbreviazioni, vedi testo.

Tabella 2*Risultati del confronto tra analizzatori automatici relativi ai parametri dell'emocromo*

Parametro ^a (unità di misura)	Advia 2120i vs. XE-2100	BC-6800 vs. XE-2100	Cell Dyn Sapphire vs. XN-9000
WBC (*10 ⁹ /L)	Intervallo: Advia 2120i, 3,35-25,80 XE-2100, 3,29-26,02 r=0,98 y=1,02x (0,99/1,04) - 0,04 (-0,20/0,11) Bias: 1,8% (0/2,6)	Intervallo: BC-6800, 3,62-13,11 XE-2100, 3,67-13,37 r=0,99 y=0,98x (0,98/0,98) + 0,10 (0/0,15) Bias: 0,3% (-0,1/-0,8)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 3,27-14,00 XN-9000, 3,13-13,55 r=0,98 y=1,00x (0,98/1,03) + 0,03 (-0,10/0,19) Bias: 2,2% (0,6/3,8)
HGB (g/L)	Intervallo: Advia 2120i, 82-178 XE-2100, 80-175 r=0,98 y=0,97x (0,95/1,00) + 4,9 (1,0-7,1) Bias: 0,9% (0,62/1,36)	Intervallo: BC-6800, 92-171 XE-2100, 96-170 r=0,99 y=1,05x (1,00/1,08) - 0,02 (-0,5/0,6) Bias: -0,2% (-0,45/0,08)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 69-168 XN-9000, 65-165 r=0,99 y=0,96x (0,94/1,00) + 7,3 (3,0/9,6) Bias: 1,9% (1,6/2,3)
RBC (*10 ¹² /L)	Intervallo: Advia 2120i, 2,83-6,17 XE-2100, 2,82-5,72 r=0,97 y=1,01x (1,00/1,03) - 0,02 (-0,09/0,05) Bias: 0,9% (0,4/1,3)	Intervallo: BC-6800, 3,15-6,04 XE-2100, 3,16-6,09 r=1,00 y=1,01x (1,01/1,03) + 0 (-0,08/0) Bias: 0,7% (0,5/0,8)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 2,97-5,99 XN-9000, 2,85-6,02 r=0,99 y=1,01x (0,98/1,04) + 0,08 (-0,21/0,20) Bias: 1,4% (0,7/2,2)
HT (L/L)	Intervallo: Advia 2120i, 0,15-0,51 XE-2100, 0,24-0,49 r=0,91 y=0,98x (0,95/1,01) + 0,003 (-0,006/0,01) Bias: -0,33% (-1,11/0,46)	Intervallo: BC-6800, 0,28-0,51 XE-2100, 0,28-0,51 r=0,99 y=1,02x (1,01/1,06) + 0,004 (-0,003/0,01) Bias: 0,6% (0,35/0,84)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 0,23 -0,50 XN-9000, 0,22-0,49 r=0,98 y=1,04x (0,99/1,08) - 0,002 (-0,02/0,02) Bias: 2,5% (0,9/4,3)
MCH (pg)	Intervallo: Advia 2120i, 18,9-37,6 XE-2100, 18,9-37,5 r=0,94 y=0,98x (0,94/1,00) + 0,56 (-3,39/1,72) Bias: 0,1% (-0,2/0,5)	Intervallo: BC-6800, 24,3-33,8 XE-2100, 25,1-34,4 r=0,95 y=0,91x (0,85/0,96) + 2,9 (1,3/4,4) Bias: -0,5% (-0,8/-0,2)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 20,4-39,7 XN-9000, 19,9-38,5 r=0,91 y=1,02x (0,96/1,07) + 0,79 (-0,79/2,15) Bias: 0,8% (0/1,7)
MCHC (g/L)	Intervallo: Advia 2120i, 280-368 XE-2100, 290-361 r=0,73 y=1,00x (0,90/1,13) + 0,40 (-3,78/3,75) Bias: 1,0% (0,7/1,3)	Intervallo: BC-6800, 309-352 XE-2100, 308-359 r=0,73 y=0,81x (0,67/0,94) + 6,6 (2,3/10,9) Bias: -0,8% (-1,2/-0,4)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 300-354 XN-9000, 288-370 r=0,74 y=0,72x (0,63/0,85) + 8,8 (4,4/12,0) Bias: -0,7% (-2,3/0,9)
MCV (fL)	Intervallo: Advia 2120i, 30,1-115,0 XE-2100, 62,8-111,7 r=0,80 y=0,95x (0,90/1,00) + 3,45 (-1,10/7,83) Bias: -1,2% (-1,9/-0,4)	Intervallo: BC-6800, 78,3-103,3 XE-2100, 65,4-117,9 r=0,98 y=1,00x (0,99/1,00) + 0,02 (0,02/0,02) Bias: 0,3% (0,2/0,5)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 63,7-113,0 XN-9000, 62,8-107,7 r=0,94 y=1,04x (0,97/1,09) - 1,25 (-6,58/4,10) Bias: 5,1% (-0,3/10,5)
PLT (*10 ⁹ /L)	Intervallo: Advia 2120i: 31-1421 XE-2100, 35-1075 r=0,92 y=1,05x (1,01/1,10) - 10,2 (-20,5/1,0) Bias: 1,3% (-0,5/3,1)	Intervallo: BC-6800, 122-591 XE-2100, 121-592 r=0,85 y=1,00x (0,97/1,00) + 1,4 (0/11,29) Bias: 4,1% (3,2/4,9)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 69-536 XN-9000, 67-520 r=0,99 y=1,03x (1,00/1,06) + 7,7 (2,0/12,9) Bias: 8,9% (6,3/11,6)

^aPer il significato delle abbreviazioni, vedi testo.

assoluto. Il coefficiente di correlazione variava da 0,57 nella comparazione del conteggio dei BA fra XN-9000 e Cell Dyn Sapphire a 0,99 per il conteggio di NE e LY nella comparazione di XE-2100 vs. BC-6800. La valutazione del "bias" comparata con gli obiettivi prestabiliti mostrava che solo per BA nel confronto XE-2100 vs. Advia 2120i non era raggiunto l'obiettivo di qualità minimo.

Confronto fra conteggio leucocitario differenziale in automazione e in OM

1880 campioni sono stati inclusi nella valutazione comparativa con OM come di seguito descritto:

- 663 campioni analizzati su XE-2100 (LAB1, LAB2, LAB3, LAB4 e LAB6);
- 444 campioni analizzati su Advia 2120i (LAB1, LAB2,

Tabella 3*Risultati del confronto tra analizzatori automatici relativi al conteggio leucocitario differenziale*

Parametro ^a (unità di misura)	Advia 2120i vs. XE-2100	BC-6800 vs. XE-2100	Cell Dyn Sapphire vs. XN-9000
NE (*10 ⁹ /L)	Intervallo: Advia 2120i, 1,34-23,19 XE-2100, 1,17-22,96 r=0,98 y=1,01x (0,99/1,04) + 0,04 (-0,05/ 0,12) Bias: 2,7% (3,8/1,6)	Intervallo: BC-6800, 2,21-10,12 XE-2100, 2,22-10,32 r=0,99 y=0,98x (0,98/1,00) + 0,11 (0/0,13) Bias: 1,4% (0,8/2,0)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 0,97-11,60 XN-9000, 0,97-11,26 r=0,97 y=1,01x (0,99/1,03) - 0,03 (-0,09/0,02) Bias: 0,5% (-1,2/2,3)
LY (*10 ⁹ /L)	Intervallo: Advia 2120i, 0,59-5,38 XE-2100, 0,82-5,85 r=0,95 y=0,98x (0,95/1,00) - 0,06 (-0,11/-0,02) Bias: -5,7% (-7,1/-4,3)	Intervallo: BC-6800, 0,85-3,95 XE-2100, 0,81-4,02 r=0,99 y=0,98x (0,98/1,00) + 0 (-0,03/0,01) Bias: -1,2% (-1,7/-0,6)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 0,64-6,24 XN-9000, 0,58-4,91 r=0,91 y=1,00x (0,97/1,02) + 0,05 (-0,01/0,09) Bias: 6,7% (2,7/10,7)
MO (*10 ⁹ /L)	Intervallo: Advia 2120i, 0,05-1,04 XE-2100, 0,06-1,27 r=0,85 y=0,92x (0,84/1,00) + 0,03 (0/0,06) Bias: -1,8% (-4,1/-0,5)	Intervallo: BC-6800, 0,25-0,99 XE-2100, 0,25-1,14 r=0,97 y=0,97x (0,94/1,00) + 0 (-0,01/0,02) Bias: -4,1% (-5,4/2,8)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 0,15-1,58 XN-9000, 0,17-1,54 r=0,94 y=1,02x (0,95/1,08) - 0,02 (-0,05/0,01) Bias: -1,3% (-3,4/0,8)
EO (*10 ⁹ /L)	Intervallo: Advia 2120i, 0-0,90 XE-2100, 0-0,86 r=0,95 y=1,00x (1,00/1,04) + 0,01 (0/0,1) Bias: 7,6% (da 4,1 a 11,2)	Intervallo: BC-6800, 0-0,83 XE-2100, 0-0,85 r=0,99 y=1,01x (0,98/1,04) - 0,003 (-0,01/0,004) Bias: 1,7% (-4,2/7,5)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 0,04-0,82 XN-9000, 0,01- 0,82 r= 0,80 y=1,03x (0,99/1,08) + 0 (-0,01/0,01) Bias: 16,8% (9,6/4,0)
BA (*10 ⁹ /L)	Intervallo: Advia 2120i, 0-0,12 XE-2100, 0-1,10 r=0,62 y=1,50x (1,18/2,00) + 0 (-0,01/ 0,01) Bias: 30,6% (24,1/37,1)	Intervallo: BC-6800, 0,01-0,11 XE-2100, 0-0,10 r=0,87 y=0,85x (0,76/0,94) + 0,002 (-0,001/0,006) Bias: 11,2% (4,8/17,6)	Intervallo: Cell Dyn Sapphire, 0-0,13 XN-9000, 0-0,10 r= 0,57 y=1,2x (0,95/1,46) - 0,006 (-0,01/0) Bias: -5,8% (-17,5/5,9)

^aPer il significato delle abbreviazioni, vedi testo.

LAB3 e LAB5);

- 174 campioni analizzati su ABX Pentra (LAB7);
- 156 campioni analizzati su Cell Dyn Sapphire (LAB8);
- 134 campioni analizzati su BC-6800 (LAB6);
- 132 campioni analizzati su DxH800 (LAB9);
- 122 campioni analizzati su XN-9000 (LAB8).

Nella Tabella 4 sono riportati i risultati. Il coefficiente di correlazione variava da 0,41 per la comparazione del conteggio dei BA a 0,99 per la comparazione del conteggio dei NE.

Il "bias" in percentuale evidenziava prestazioni ottimali per il conteggio in automazione di NE, LY e EO. Il conteggio in automazione di MO mostrava una prestazione desiderabile, mentre quello dei BA, con un "bias" relativo del 79,5%, era caratterizzato da prestazioni di conteggio non accettabili.

La comparazione fra conteggio leucocitario differenziale in automazione e OM è stata valutata per tipo di analizzatore ematologico (Tabella 5). Il dato cumulativo per i LAB che utilizzavano lo stesso tipo di analizzatore è stato comparato previa verifica di assenza di "bias" di lettura microscopica fra i diversi LAB (dati non riportati).

Il conteggio in automazione dei NE con i diversi

analizzatori comparato al conteggio in OM era caratterizzato da coefficienti di correlazione compresi tra 0,98 e 1,00 e "bias" caratterizzanti prestazione di conteggio ottimali per tutti gli analizzatori (compreso tra 0,4% e -5,2%), ad eccezione del Cell Dyn Sapphire, la cui prestazione era di qualità desiderabile.

Il conteggio in automazione dei LY con i diversi analizzatori comparato al conteggio in OM era caratterizzato da coefficienti di correlazione $\geq 0,90$ e "bias" caratterizzanti prestazioni di conteggio ottimali per XE-2100, ABX Pentra, DxH800, e XN-9000, prestazioni desiderabili per Cell Dyn Sapphire e BC-6800, e prestazioni minime per Advia 2120i ("bias", -10,6%).

Il conteggio in automazione dei MO con i diversi analizzatori comparato al conteggio in OM era caratterizzato da coefficienti di correlazione più eterogenei, che variavano da 0,74 a 0,98 e "bias" caratterizzanti prestazioni di conteggio ottimali per ABX Pentra, BC-6800 e DxH800, prestazioni desiderabili per XE-2100 e prestazioni minime per Cell Dyn Sapphire, Advia 2120i e XN-9000.

Il conteggio in automazione degli EO con i diversi analizzatori confrontato con OM era caratterizzato da coefficienti di correlazione che variavano da 0,70 per

Tabella 4

Risultati del confronto tra formula leucocitaria in automazione e conteggio differenziale in microscopia ottica su 1880 campioni^a

Parametro ^b (*10 ⁹ /L)	Intervallo min-max	r	Parametri retta di regressione		Bias assoluto (CI 95%)	Bias relativo (CI 95%)	Qualità della prestazione strumentale
			Pendenza (CI 95%)	Intercetta (CI 95%)			
NE	0,10-26,72	0,99	1,01 (da 1,00 a 1,01)	-0,04 (da -0,07 a -0,02)	-0,03 (da -0,04 a -0,01)	-0,9% (da -1,3 a -0,5)	Ottimale
LY	0,14-8,68	0,94	0,96 (da 0,94 a 0,97)	0,05 (da 0,03 a 0,07)	-0,06 (da -0,07 a -0,05)	-2,0% (da -2,8 a -1,2)	Ottimale
MO	0,04-2,13	0,83	0,99 (da 0,96 a 1,01)	0,04 (da 0,03 a 0,05)	0,05 (da 0,04 a 0,06)	11,7% (da 10,5 a 12,8)	Desiderabile
EO	0,01-2,20	0,90	0,98 (da 0,96 a 1,00)	0 (da 0 a 0,01)	0,01 (da 0 a 0,01)	8,9% (da 6,2 a 11,6)	Ottimale
BA	0-0,46	0,41	0,90 (da 0,82 a 0,97)	0,01 (da 0,01 a 0,01)	0,01 (da 0,01 a 0,01)	79,5% (da 73,9 a 85,1)	Non accettabile

^aIntervallo numero leucociti nei campioni tra 1,28 e 27,98x10⁹/L.

^bPer il significato delle abbreviazioni, vedi testo.

CI, intervallo di confidenza.

Cell Dyn Sapphire a 0,99 per DxH800, e "bias" caratterizzanti prestazioni di conteggio ottimali per ABX Pentra, BC-6800, DxH800 e XE-2100, prestazioni desiderabili per Advia 2120i e XN-9000, e prestazioni minime per Cell Dyn Sapphire.

Il conteggio in automazione dei BA con i diversi analizzatori comparato al conteggio in OM era caratterizzato da coefficienti di correlazione $\leq 0,63$ e "bias" che evidenziavano prestazioni di conteggio non accettabili per tutti gli analizzatori (valori compresi tra -94,0% per DxH800 e 116,6% per Advia 2120i).

DISCUSSIONE

Nel nostro studio sono stati confrontati per la prima volta tra loro 8 analizzatori prodotti dalle 6 aziende attualmente "leader" nel settore. Per ciascuno di questi strumenti è stato effettuato anche il confronto tra il conteggio leucocitario differenziale in automazione e il metodo in OM, utilizzato come standard di riferimento. L'impossibilità logistica di disporre di tutti gli analizzatori in un unico centro e le problematiche di tipo preanalitico (conservazione e trasporto dei campioni), che non consentono lo scambio di campioni tra laboratori geograficamente lontani, non hanno permesso la comparazione di tutti gli strumenti impiegando la stessa campionatura, anche se questo è comunque avvenuto in alcuni centri che hanno utilizzato contemporaneamente due diverse tecnologie. E' stata così possibile la valutazione comparativa sugli stessi campioni di tecnologie diverse, quali la citochimica (Advia 2120i) vs. l'analisi di laser scatter e fluorescenza (XE-2100, XN-9000), o di quest'ultima vs. la polarizzazione multiangolo (Cell Dyn Sapphire) e anche di tecnologie equivalenti, come analisi di laser scatter e fluorescenza nelle piattaforme XE-2100 e BC-6800.

Complessivamente, la valutazione ha evidenziato una buona correlazione interstrumentale per WBC, RBC, MCH, NE, LY, MO. Le maggiori differenze sono

state osservate tra XN-9000 e Cell Dyn Sapphire per HGB, HT, PLT e EO e tra XE-2100 e Advia 2120i per MCHC, MCV, LY e BA. Sebbene nella maggior parte di queste correlazioni non ottimali possano avere un ruolo importante le differenze metodologiche precedentemente richiamate, alcune criticità interpretative rimangono. Appare sorprendente il mancato allineamento per l'HGB, la cui metodologia di determinazione, con poche differenze applicative, è la stessa su tutte, mentre si osserva che HCT e MCHC, che sono parametri derivati dai valori di RBC, HGB e MCV, al contrario, correlano bene.

Sebbene le più rilevanti diversità metodologiche siano usualmente a carico del conteggio leucocitario differenziale, tutti gli analizzatori hanno evidenziato correlazioni accettabili con il conteggio all'OM, con l'eccezione del conteggio dei BA, che risulta non accettabile per tutti gli strumenti, come peraltro già evidenziato anche in precedenti studi (1, 3). Per quest'ultima popolazione cellulare, tuttavia necessita un'ulteriore considerazione: nei casi in cui il conteggio BA è stato infatti effettuato con doppia tecnologia sugli stessi campioni, la correlazione tra analizzatori migliora sensibilmente, suggerendo la possibilità che il metodo di riferimento possa essere inadeguato. Infatti, il conteggio microscopico su 200 cellule non appare idoneo alla valutazione quantitativa e alla correlazione con il conteggio automatico di una popolazione fisiologicamente rappresentata da poche decine di elementi *10⁹/L e da percentuali spesso largamente <1% del totale delle restanti cellule.

L'armonizzazione dei dati emocromocitometrici garantisce la possibilità che un determinato risultato o un referto completo possano essere utilizzati in strutture diverse da quella in cui sono stati prodotti, mantenendo lo stesso potere informativo e la medesima possibilità di utilizzo clinico. Sebbene i risultati del nostro studio abbiano mostrato, con le eccezioni descritte, accettabili qualità prestazionali per tutti gli analizzatori, nella

Tabella 5
Risultati del confronto tra conteggio differenziale in automazione e metodo in microscopia ottica suddivisi per singolo analizzatore

Strumento	Intervallo min-max leucociti (*10 ⁹ /L)	No. campioni	Parametria	r	Parametri retta di regressione		"Bias" assoluto (CI 95%)	"Bias" relativo (CI 95%)	Qualità della prestazione strumentale
					Pendenza (CI 95%)	Intercetta (CI 95%)			
Cell Dyn Sapphire	3,27-15,90	156	NE	0,99	-0,11 (da -0,19 a -0,02)	-0,18 (da -0,22 a -0,13)	-5,2% (da -6,5 a -3,8)	Desiderabile	
				0,98	0,22 (da 0,16 a 0,28)	0,09 (da 0,05 a 0,13)	6,8% (da 4,1 a 9,3)	Desiderabile	
				0,77	0,04 (da -0,02 a 0,09)	0,07 (da 0,05 a 0,09)	14,3% (da 9,9 a 18,6)	Minima	
				0,70	0,03 (da 0,01 a 0,04)	0,02 (da 0 a 0,04)	23,5% (da 11,0 a 33,7)	Minima	
				0,30	0,02 (da 0,01 a 0,02)	0,01 (da 0,01 a 0,02)	98,7 (da 79,1 a 117,0)	Non accettabile	
				1,00	0 (da -0,01 a 0,01)	-0,01 (da -0,02 a 0,01)	-0,4% (da -0,8 a 0)	Ottimale	
ABX Pentra	2,60-17,37	174	LY	0,99	0 (da -0,01 a 0,01)	-0,01 (da -0,03 a 0)	-0,7% (da -1,4 a 0)	Ottimale	
				0,98	-0,01 (da -0,02 a 0)	0,01 (da 0,01 a 0,02)	2,1% (da 0,8 a 3,3)	Ottimale	
				0,76	-0,01 (da -0,02 a 0)	0,01 (da -0,01 a 0,02)	2,6% (da -2,5 a 7,8)	Ottimale	
				0,23	0,02 (da 0,01 a 0,02)	0,01 (da 0,01 a 0,02)	108,5% (da 101,3 a 124,3)	Non accettabile	
				0,98	-0,09 (da -0,15 a -0,03)	0,02 (da -0,02 a 0,06)	0,4% (da -0,6 a 1,4)	Ottimale	
				0,90	0 (da -0,07 a 0,06)	-0,22 (da -0,25 a -0,18)	-10,6% (da -12,4 a -8,9)	Minima	
Advia 2120i	1,48-25,8	444	MO	0,74	0,08 (da 0,05 a 0,11)	0,05 (da 0,04 a 0,06)	13,7% (da 10,8 a 15,4)	Minima	
				0,88	0,01 (da 0,01 a 0,02)	0,01 (da 0,01 a 0,02)	16,8% (da 11,0 a 22,8)	Desiderabile	
				0,23	0,02 (da 0,02 a 0,02)	0,02 (da 0,01 a 0,02)	116,6% (da 106,1 a 126,7)	Non accettabile	

Tabella 5 (continua)

BC-6800	3,62-13,11	134	NE	0,99	1,03 (da 1,00 a 1,05)	-0,01 (da -0,11 a 0,08)	0,08 (da 0,05 a 0,12)	1,8% (da -0,9 a 2,6)	Ottimale
			LY	0,96	1,00 (da 0,94 a 1,05)	-0,09 (da -0,20 a 0,01)	-0,11 (da -0,14 a -0,07)	-5,3% (da -6,9 a -3,7)	Desiderabile
			MO	0,84	1,03 (da 0,92 a 1,16)	-0,01 (da -0,06 a 0,04)	0,02 (da 0 a 0,03)	3,4% (da 0,2 a 6,7)	Ottimale
			EO	0,92	1,05 (da 0,98 a 1,14)	-0,01 (da -0,03 a 0)	0 (da -0,01 a 0,01)	4,4% (da -2,8 a 11,5)	Ottimale
			BA	0,56	0,67 (da 0,55 a 0,81)	0,01 (da 0,01 a 0,02)	0 (da 0 a 0,01)	41,8% (da 26,7 a 56,9)	Non accettabile
DxH800	1,7-12,9	132	NE	1,00	1,00 (da 0,98 a 1,01)	-0,03 (da -0,07 a 0)	-0,05 (da -0,07 a -0,03)	-1,6% (da -2,2 a -1,0)	Ottimale
			LY	0,99	1,01 (da 0,99 a 1,04)	0 (da -0,05 a 0,04)	0,02 (da 0 a 0,03)	0,9% (da 0 a 1,8)	Ottimale
			MO	0,96	1,07 (da 1,00 a 1,12)	-0,01 (da -0,04 a 0,02)	0,03 (da 0,02 a 0,04)	4,7% (da 2,5 a 6,9)	Ottimale
			EO	0,99	0,89 (da 0,82 a 0,94)	0,02 (da 0,01 a 0,03)	0 (da -0,01 a 0)	4,6% (da -13,0 a 3,9)	Ottimale
			BA	0,58	Non calcolabile ^b	Non calcolabile ^b	-0,01 (da -0,01 a 0)	-94,0% (da -115,6 a -72,3)	Non accettabile
XE-2100	1,28-27,98	663	NE	0,99	1,00 (da 1,00 a 1,01)	-0,01 (da -0,05 a 0,01)	-0,01 (da -0,04 a 0,02)	-0,1% (da -0,2 a 0)	Ottimale
			LY	0,94	0,96 (da 0,94 a 0,98)	0,04 (da 0,02 a 0,07)	-0,05 (da -0,07 a -0,02)	-1,0% (da -2,4 a 0,3)	Ottimale
			MO	0,84	0,98 (da 0,94 a 1,01)	0,04 (da 0,02 a 0,06)	0,06 (da 0,05 a 0,06)	13,0% (da 10,7 a 14,8)	Desiderabile
			EO	0,92	1,00 (da 0,97 a 1,02)	0 (da -0,00 a 0,00)	0 (da 0 a 0,01)	7,2% (da 2,7 a 11,7)	Ottimale
			BA	0,63	0,71 (da 0,64 a 0,77)	0,01 (da 0,01 a 0,01)	0,01 (da 0 a 0,01)	74,7% (da 66,3 a 83,2)	Non accettabile
XN-9000	2,89-18,85	122	NE	0,99	0,99 (da 0,96 a 1,01)	-0,06 (da -0,17 a 0,03)	-0,11 (da -0,16 a -0,06)	-2,8% (da -4,3 a -1,1)	Ottimale
			LY	0,96	0,88 (da 0,84 a 0,93)	0,23 (da 0,16 a 0,30)	0,02 (da -0,02 a 0,07)	4,9% (da 1,5 a 8,3)	Ottimale
			MO	0,83	0,97 (da 0,85 a 1,09)	0,09 (da 0,04 a 0,13)	0,07 (da 0,04 a 0,09)	15,2% (da 10,4 a 20,1)	Minima
			EO	0,85	0,83 (da 0,71 a 0,97)	0,02 (da 0,01 a 0,04)	0 (da -0,02 a 0,01)	11,6% (da -0,9 a 24,1)	Desiderabile
			BA	0,21	0,74 (da 0,52 a 1,20)	0,02 (da 0,01 a 0,02)	0,01 (da 0,01 a 0,02)	103,1% (da 82,4 a 123,8)	Non Accettabile

^aPer il significato delle abbreviazioni, vedi testo; ^bLo strumento DxH800 per il conteggio dei BA mostrava 92 campioni con un risultato uguale a 0,00*10⁹/L, un campione con un risultato di 0,20 e i restanti campioni con un valore di 0; 10.
CI, intervallo di confidenza.

diagnostica ematologica questo obiettivo non risulta ancora totalmente raggiunto. Un aspetto negativo, da questo punto di vista, è rappresentato dall'univoca dipendenza delle singole misurazioni non solo dalla metodologia, ma anche dalla tecnologia utilizzata. Per questi motivi, la conoscenza delle qualità prestazionali non solo relative a quelle di altri analizzatori, ma soprattutto riferite agli standard di riferimento riconosciuti, rappresenta uno strumento fondamentale per il miglioramento della qualità offerta dal laboratorio di ematologia.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol* 2008;130:104-16.
2. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int Jnl Lab Hem* 2009;31:277-97.
3. Buttarello M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. *Clin Chim Acta* 2004;346:45-54.
4. Lecompte TP, Bernimoulin MP. Novel parameters in blood cell counters. *Clin Lab Med* 2015;35:209-24.
5. Brugnara C, Mohandas N. Red cell indices in classification and treatment of anemias: from M.M. Wintrob's original 1934 classification to the third millennium. *Curr Opin Hematol* 2013;20:222-30.
6. Lou Y, Lin J, Chen H, et al. Utility of neut-X, neut-Y and neut-Z parameters for rapidly assessing sepsis in tumor patients. *Clin Chim Acta* 2013;422:5-9.
7. Le Roux G, Vlad A, Eclache V, et al. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100. *Int Jnl Lab Hem* 2010;32:237-43.
8. Furondarena JR, Araiz M, Uranga M, et al. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Int Jnl Lab Hem* 2010;32:360-6.
9. Arneth BM, Ragaller M, Hommel K, et al. Novel parameters of extended complete blood cell count under fluorescence flow cytometry in patients with sepsis. *J Clin Lab Anal* 2014;28:130-5.
10. Lee AJ, Kim SG. Mean cell volumes of neutrophils and monocytes are promising markers of sepsis in elderly patients. *Blood Res* 2013;48:193-7.
11. Celik IH, Demirel G, Sukhachev D, et al. Neutrophil volume, conductivity and scatter parameters with effective modeling of molecular activity statistical program gives better results in neonatal sepsis. *Int J Lab Hematol* 2013; 35:82-7.
12. Buoro S, Apassiti Esposito S, Balboni F, et al. Stato dell'arte della diagnostica ematologica nei servizi di Medicina di Laboratorio in Italia. *Biochim Clin* 2015;39:25-40.
13. Briggs C, Culp N, Davis B, et al. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol* 2014;36:613-27.
14. Clinical Laboratory Standards Institute. Validation, verification, calibration and quality control of automated hematology analyzers; Approved guideline, 2nd ed. CLSI document H26-P2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2009.
15. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods; Approved guideline, 2nd ed. CLSI document H20-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2010.
16. Ottomano C, Ceriotti F, Galeazzi M, et al. Linee guida per gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno. *Biochim Clin* 2008;32:102-21.
17. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
18. Ford J. Red blood cell morphology. *Int J Lab Hematol* 2013;35:351-7.
19. D'Onofrio G, Zini G. *Morfologia delle malattie del sangue*. Roma: Verducci Editore, 2013.
20. Palmer L, Briggs C, McFadden S, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol* 2015;37:287-303.