

## Applicazione di regole di validazione dell'esame emocromocitometrico nel laboratorio analisi dell'ospedale di Desio\*

Adele Cappellani<sup>1</sup>, Fabrizio Cappellini<sup>1</sup>, Francesca Maria Biella<sup>1</sup>, Flavia Sciarini<sup>1</sup>, Chiara Parma<sup>1</sup>, Giuseppe Limonta<sup>1</sup>, Paolo Mocarrelli<sup>1,2</sup>, Paolo Brambilla<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio (MI)

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina, Università Milano-Bicocca

### ABSTRACT

**Validation rules applied to blood cell count analysis at the clinical pathology laboratory of Desio hospital.** The impact of the autoverification algorithm proposed in 2005 by the International Consensus Group for Hematology Review (ICGER) has been evaluated at the laboratory of Desio hospital. A preliminary study to establish the diagnostic performance of the flags involved in the algorithm was conducted using 1000 samples (500 random and 500 abnormal). The efficiency of the validation system was then evaluated on the 500 random samples. 22.2% of the samples were blocked by the violation of at least one rule, while the remaining 77.8% was validated. After verifying the real existence of morphological and quantitative cell abnormalities, the samples were classified in true-positive (19.8%), false-positive (2.4%), true-negative (74%), and false-negative (3.8%). Obtained data fully comply with the goal suggested by the ICGER.

### INTRODUZIONE

L'esame emocromocitometrico automatizzato rappresenta un valido supporto nella diagnostica ematologica, in quanto fornisce in tempi rapidi una valutazione qualitativa e quantitativa degli elementi corpuscolati del sangue. In passato l'unico approccio possibile nella validazione dell'esame emocromocitometrico era basato sulla revisione al microscopio ottico dello striscio di sangue periferico; in seguito all'introduzione degli analizzatori automatici, in grado di segnalare eventuali anomalie morfologiche o numeriche attraverso allarmi (1,2), l'esame microscopico è diventato un'indagine complementare dei risultati strumentali, da effettuarsi solo quando specifiche condizioni lo richiedano, tanto che in alcuni contesti clinici la proporzione dei campioni che richiedono un'analisi microscopica raggiunge una quota pari o inferiore al 15-20% del totale degli esami emocromocitometrici effettuati (3).

Nel corso degli anni, la necessità di eseguire un esame il più possibile accurato ha portato alla costruzione di algoritmi che prevedono la valutazione complessiva di dati numerici, allarmi strumentali, età del paziente, eventuali esami precedenti e reparto di provenienza della richiesta (4,5). Lo scopo dell'applicazione di algoritmi è di poter ottenere la validazione automatica dei campioni che hanno superato il sistema delle regole impostate e nello stesso tempo identificare quei campioni che, bloccati da almeno una regola, devono essere sottoposti a diversi tipi di intervento: controllo dell'integrità del cam-

pione, ricontrollo del valore, ripetizione dell'analisi con un metodo differente, valutazione dei grafici strumentali, revisione microscopica dello striscio, inserimento di un commento; il dato strumentale potrà quindi essere rifiutato (5).

Nel 2005 il Gruppo di Consenso Internazionale per le Revisioni Ematologiche (ICGER) ha suggerito, sulla base di uno studio che ha coinvolto 15 laboratori in 6 differenti nazioni, le regole da implementare in un algoritmo di validazione dell'esame emocromocitometrico (6).

Gli allarmi strumentali che convergono nelle regole degli algoritmi non sempre sono in grado di identificare correttamente la presenza di una determinata anomalia, determinando talvolta un numero di risultati falsi positivi. D'altra parte, il mancato riscontro di un allarme strumentale non è sempre garanzia dell'assenza dell'anomalia corrispondente, comportando un certo numero di risultati falsi negativi (7). Risulta quindi necessario verificare la sensibilità e la specificità degli allarmi strumentali per potere applicare in maniera efficiente gli algoritmi di validazione automatica dei campioni.

Nel laboratorio analisi dell'ospedale di Desio si effettuano giornalmente circa 500 esami emocromocitometrici, mediante strumentazione Sysmex XE-2100 (Dasit). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'efficienza del sistema di regole suggerito da ICGER in questa realtà.

\*Questo lavoro è stato in parte presentato al 40° Congresso Nazionale SIBioC, 28-31 ottobre 2008, Rimini, sotto forma di poster (*Biochim Clin* 2008;32:414), ricevendo, nella persona del suo primo autore (A. Cappellani), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

## MATERIALI E METODI

Prima di valutare l'impatto dell'introduzione dell'algoritmo di convalida automatica dell'esame emocromocitometrico è stata studiata l'attendibilità degli allarmi strumentali presi in considerazione nelle regole che compongono l'algoritmo proposto da ICGER (Tabella 1). Nel periodo compreso tra luglio e agosto 2007 sono stati raccolti 1000 campioni: 500 selezionati in modo del tutto casuale e 500 scelti tra i campioni anomali al fine di incrementare il numero di casi con anomalie. Di ognuno è stato allestito uno striscio di sangue periferico mediante strumentazione SYSMEX SP-1000i (preparatore/coloratore completamente automatizzato di vetrini ematologici), che è stato valutato al microscopio ottico al fine di individuare eventuali anomalie. Su ogni campione è stato anche eseguito l'esame emocromocitometrico strumentale, per verificare la corrispondenza per ogni campione tra ciò che effettivamente presentava alla rilevazione microscopica e ciò che lo strumento aveva segnalato.

Una volta valutate le prestazioni strumentali, le regole proposte sono state adattate alla realtà lavorativa del nostro laboratorio dopo un'attenta valutazione da parte di tre ematologi, così come suggerito dallo stesso ICGER. Sono state individuate 38 regole che indagano sia i campioni giunti all'osservazione per la prima volta ("first time sample") sia i campioni che presentavano, nell'arco delle 72 ore precedenti, almeno un'altra determinazione ("repeat sample") sui quali effettuare un controllo "delta check" (Tabella 2). Per il controllo "delta check" sui parametri quantitativi (leucociti, piastrine, volume corpuscolare medio) è stato adottato il criterio della differenza critica (8,9).

Ognuno dei 500 campioni selezionati in maniera casuale dal lavoro di routine è stato quindi analizzato dal contaglobuli e il referto di ciascuno è stato filtrato dalle regole di validazione in studio. Nello stesso tempo, di tutti i 500 campioni sono stati allestiti i vetrini per l'analisi microscopica dello striscio di sangue periferico in modo da verificare la correttezza o meno della violazione di ogni regola. Questo ci ha permesso di classificare ogni campione nel modo seguente: vero positivo (VP) in

caso di campione correttamente bloccato; falso positivo (FP) in caso di campione erroneamente bloccato; vero negativo (VN) in caso di campione correttamente non bloccato; falso negativo (FN) in caso di campione erroneamente non bloccato. Infine sono state calcolate sensibilità, specificità e probabilità "post test" dell'algoritmo considerandolo di fatto come un esame diagnostico in grado di rilevare una condizione di anomalie in un campione di sangue periferico.

## RISULTATI

La valutazione preliminare degli allarmi morfologici strumentali ha evidenziato le prestazioni del sistema ematologico riportate nella Tabella 3. La probabilità "post test" positiva si è dimostrata significativamente differente dalla probabilità a priori per tutti gli allarmi considerati, ad eccezione di "Abn lymph/L-BI?" e "Atypical lymph?". La probabilità "post test" negativa, invece, è risultata significativamente più bassa della probabilità "pre test" solo per l'allarme "Imm gran?", quello che presenta la più alta prevalenza e, al contempo, fa registrare la migliore sensibilità. Nonostante ciò, si è deciso di considerare tutti gli allarmi comunque utili per poter essere utilizzati nelle regole dell'algoritmo.

La valutazione dell'efficacia dell'algoritmo ha prodotto i seguenti risultati (Tabella 4). Sul totale dei 500 campioni, 111 (22,2%) sono stati bloccati. Di questi, 99 (89,2%) erano VP e 12 (10,8%) erano FP. Dei 389 campioni non bloccati, 370 (95,1%) erano VN e 19 (4,8%) erano FN. Dei 420 campioni "first time", 60 (14,3%) hanno violato almeno una regola e 360 (85,7%) non sono stati bloccati. Dei 60 campioni bloccati, 51 (85%) erano VP e 9 (15%) FP. Dei 360 campioni non bloccati, 343 (95,3%) erano VN e 17 (4,7%) FN. Sul totale di 80 "repeat sample", 51 (63,8%) sono stati bloccati e 29 (36,3%) no. Dei 51 campioni bloccati, 48 (94,1%) erano VP e 3 (5,8%) erano FP. Dei 29 campioni non bloccati, 27 (93,1%) erano VN e 2 (6,8%) erano FN.

Nella Tabella 5 sono riportati i risultati della valutazione dell'efficienza dell'algoritmo in termini di sensibilità, specificità e probabilità "post test" positiva e negativa.

**Tabella 1**

*Allarmi strumentali utilizzati nelle regole dell'algoritmo proposto dal Gruppo di Consenso Internazionale per le Revisioni Ematologiche e loro abbreviazioni*

Allarme	Abbreviazione
Presenza di blasti	Blasts?
Presenti elementi immaturi della linea granulocitaria	Imm gran?
Granulociti a banda	Left shift?
Linfociti atipici in senso neoplastico	Abn lymph/L-BI?
Linfociti attivati	Atypical lymph?
Presenza di eritroblasti ortocromatici	NRBC?
Presenza di schistociti o emazie frammentate	Fragments?
Presenza di aggregati piastrinici	PLT clumps?
Anomala distribuzione delle piastrine	PLT abn dst?

**Tabella 2***Regole di validazione dell'esame emocromocitometrico*

	Descrizione	Azione	"First time sample"	"Repeat sample"
1	Il campione rappresenta il primo campione in assoluto di un neonato	Revisione microscopica	X	
2	Il campione è il primo e WBC <3 10 <sup>3</sup> /μL o >30.000 10 <sup>3</sup> /μL	Revisione microscopica	X	
3	Il campione è ripetuto e WBC "delta check" fallito	Revisione microscopica		X
4	Il campione è il primo e PLT <90 10 <sup>3</sup> /μL o >1000 10 <sup>3</sup> /μL	Eseguire conteggio PLT utilizzando metodo ottico	X	
5	Il campione è ripetuto e PLT "delta check" fallito	Revisione microscopica		X
6	Hb <7 g/dL o di almeno 2 g/dL maggiore rispetto al limite superiore di riferimento	Revisione microscopica	X	X
7	Il campione è il primo e MCV >105 fL e campione non più vecchio di 24 ore	Revisione microscopica	X	
8	Il campione è ripetuto e più vecchio di 24 ore e MCV >105 fL e MCV "delta check" fallito	Revisione microscopica		X
9	Il campione è ripetuto e non più vecchio di 24 ore e MCV "delta check" fallito	Revisione microscopica		X
10	MCHC di almeno 2 g/dL maggiore rispetto al limite superiore di riferimento adottato nel laboratorio	Revisione microscopica	X	X
11	MCHC <30 g/dL e MCV normale o alto	Revisione microscopica	X	X
12	Scattergram DIFF mancante o incompleto*	Revisione microscopica	X	X
13	Il campione è il primo e NEUT <1 10 <sup>3</sup> /μL o >20 10 <sup>3</sup> /μL	Verificare scattergram e inserire commento di neutropenia o neutrofilia	X	
14	Il campione è ripetuto e NEUT <1 10 <sup>3</sup> /μL o >20 10 <sup>3</sup> /μL e risultato precedente normale	Revisione microscopica		X
15	Il campione è il primo e LYMPH >5 10 <sup>3</sup> /μL (adulti) o >7 10 <sup>3</sup> /μL (bambini)	Verificare scattergram e inserire commento di linfocitosi	X	
16	Il campione è ripetuto e LYMPH >5 10 <sup>3</sup> /μL (adulti) o >7 10 <sup>3</sup> /μL (bambini) e risultato precedente normale	Revisione microscopica		X
17	Il campione è il primo e MONO >1,5 10 <sup>3</sup> /μL (adulti) o >3 10 <sup>3</sup> /μL (bambini)	Verificare scattergram e inserire commento di monocitosi	X	
18	Il campione è ripetuto e MONO >1,5 10 <sup>3</sup> /μL (adulti) o >3 10 <sup>3</sup> /μL (sotto i 12 anni) e risultato precedente normale	Revisione microscopica		X
19	Il campione è il primo e EOS >2 10 <sup>3</sup> /μL	Verificare scattergram e inserire commento di eosinofilia	X	
20	Il campione è ripetuto e EOS >2 10 <sup>3</sup> /μL e risultato precedente normale	Revisione microscopica		X
21	Il campione è il primo e BASO >0,5 10 <sup>3</sup> /μL	Verificare scattergram e inserire commento di basofilia	X	
22	Il campione è ripetuto e BASO >0,5 10 <sup>3</sup> /μL e risultato precedente normale	Revisione microscopica		X
23	Reticolociti >0,1 10 <sup>6</sup> /μL	Revisione microscopica	X	X
23	RBC fragments? flag+	Revisione microscopica	X	X
24	RBC lyse resistant flag+	Revisione microscopica	X	X
26	WBC abn scattergram flag+	Revisione microscopica	X	X

27	PLT clumps? flag+	Eseguire conteggio PLT nel canale ottico	X	X
28	PLT abn dst? flag+ e PLT >500 10 <sup>3</sup> /μL	Revisione microscopica	X	X
29	Il campione è il primo e Imm gran? flag+	Revisione microscopica	X	
30	Il campione è ripetuto e Imm gran? flag+ e risultato precedente normale ma WBC "delta check" fallito	Revisione microscopica		X
31	Left shift? flag+	Revisione microscopica	X	X
32	Il campione è il primo e Atypical lymph? flag+	Revisione microscopica	X	
33	Il campione è ripetuto e Atypical lymph? flag+ e risultato precedente normale ma WBC "delta check" fallito	Revisione microscopica		X
34	Blast? flag+	Revisione microscopica	X	X
35	NRBC? flag+	Revisione microscopica	X	X
36	Reticolociti abn scattergram? flag+	Revisione microscopica	X	X
37	Il campione è il primo e Abn lymph/L-BI? flag+	Revisione microscopica	X	
38	Il campione è ripetuto e Abn lymph/L-BI? flag+ e risultato precedente normale	Revisione microscopica		X

\*Rappresentazione grafica su assi cartesiani dei "cluster" cellulari dei globuli bianchi: l'asse delle ordinate indica l'intensità della fluorescenza ("side fluorescence", SFI), legata alla quantità di DNA e RNA presenti all'interno della cellula; l'asse delle ascisse indica la luce diffusa lateralmente dalla cellula ("side scatter", SS), correlata alla sua complessità strutturale (contenuto cellulare inteso come presenza di nuclei e granuli).

WBC, globuli bianchi; PLT, piastrine; Hb, emoglobina; MCV, volume corpuscolare medio; MCHC, concentrazione corpuscolare media dell'emoglobina; NEUT, neutrofilii; LYMPH, linfociti; MONO, monociti; EOS, eosinofili; BASO, basofili; RBC, globuli rossi; NRBC, eritroblasti ortocromatici.

**Tabella 3**

Prestazioni del sistema strumentale utilizzato nello studio

Tipo di allarme	VP	FN	VN	FP	SENS% (90% CI)	SPEC% (90% CI)	PRE TEST %	POST TEST+ %	POST TEST- %
Blasts?	23	9	919	49	71,9 (58,8-84,9)	94,9 (93,7-96,0)	0,4	5,4	0,1
Imm gran?	142	18	821	19	88,4 (84,2-92,5)	97,7 (96,8-98,5)	4,8	66,4	0,6
Left shift?	55	29	915	10	73,3 (64,9-81,6)	98,9 (98,3-99,4)	2,6	64,4	0,7
Abn lymph/L-BI?	32	8	815	145	80,0 (69,6-90,3)	84,9 (83,0-86,8)	2,0	9,8	0,5
Atypical lymph?	104	32	792	72	76,4 (70,4-82,3)	91,6 (90,0-93,2)	5,6	32,3	1,5
NRBC?	33	14	895	58	70,2 (59,2-81,1)	93,9 (92,6-95,2)	1,2	12,3	0,4
Fragments?	10	16	972	2	38,5 (22,8-54,1)	99,8 (99,5-99,9)	1,8	77,4	1,2
PLT clumps?	21	12	948	19	63,6 (49,9-77,3)	98,0 (97,3-98,7)	1,8	37,2	0,7
PLT abn dst?	10	5	913	72	66,6 (46,6-86,6)	92,7 (91,3-94,0)	0,4	3,5	0,1

VP, veri positivi; FN, falsi negativi; VN, veri negativi; FP, falsi positivi; SENS, sensibilità; CI, intervallo di confidenza; SPEC, specificità; PRE TEST, probabilità pre test; POST TEST, probabilità post test.

## CONCLUSIONI

Nello studio eseguito dal ICGER si riporta come traguardo per valutare l'efficienza dell'algoritmo nella realtà di ogni laboratorio l'ottenimento di un numero di casi FN inferiore al 5% e di casi FP inferiore al 18,6% (6). Percentuali superiori implicherebbero, rispettivamente la mancata identificazione di un numero troppo elevato di campioni con qualche anomalia e un eccessivo numero di blocchi ingiustificati. I risultati ottenuti nel presente studio si sono rivelati perfettamente in linea con gli obiet-

tivi raccomandati: i FN sono stati sempre inferiori al 5%, sia considerando i campioni "first time" (4,0%) che i campioni "repeat" (2,5%); i FP sono stati nettamente inferiori alla percentuale raccomandata: sui "first time" il 2,1%, e sui "repeat" il 3,8%. Risulterà tuttavia utile proseguire lo studio per ottimizzare la revisione microscopica, individuando ulteriori regole per una gestione differenziata dei campioni segnalati come anomali, che tenga in considerazione la reale utilità clinica della segnalazione delle anomalie riscontrate.

**Tabella 4***Risultati della valutazione dell'algoritmo proposto*

	Bloccati			Non bloccati		
	VP	FP	Totale	VN	FN	Totale
"First time" (n=420)	51	9	60	343	17	360
	12,1%	2,1%	14,3%	81,7%	4,0%	85,7%
"Repeat sample" (n=80)	48	3	51	27	2	29
	60,0%	3,8%	63,8%	33,8%	2,5%	36,3%
Totale (n=500)	99	12	111	370	19	389
	19,8%	2,4%	22,2%	74,0%	3,8%	77,8%

VP, veri positivi; FP, falsi positivi; VN, veri negativi; FN, falsi negativi.

**Tabella 5***Risultati della valutazione dell'efficienza dell'algoritmo di validazione*

Sensibilità	84%
Specificità	97%
Probabilità post test +	89%
Probabilità post test -	1,2%

**BIBLIOGRAFIA**

- Buttarelo M. Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione. Parte I: il metodo ad impedenza. RIMeL/IJLaM 2006;2:199-205.
- Buttarelo M. Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione. Parte II: il metodo ottico. RIMeL/IJLaM 2006;2:278-87.
- Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. N Engl J Med 2005;353:498-507.
- GdSE-SIMEL. Linee guida per il referto ematologico. Riv Med Lab - JLM 2002;3:87-93.
- Cappelletti P. L'ematologia di laboratorio. RIMeL/IJLaM 2005;1:247-58.
- Barnes PW, Mcfadden SL, Machin SJ, et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. Lab Hematol 2005;11:83-90.
- CLSI document H20-A2. Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods; Approved standard - 2<sup>a</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
- Spandrio L. Variabilità biologica intraindividuale e differenza critica. In: Spandrio L, ed. Biochimica clinica. 2<sup>a</sup> ed. Padova: Piccin Ed, 2000;113-8.
- Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491-500.