

Valutazione comparativa di due contaglobuli automatici

Simona Brambilla, Fabio Campielli, Irene Moraschinelli*, Vittorio Grazioli

Laboratorio Analisi, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (Milano) e *Diploma Universitario per Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

ABSTRACT

Comparative evaluation of two automatic haematological analyzers

On occasion of the change of our haematological analyzer, we were faced with the problem of assessing if such a change could be the cause for significant variation in the measurement of haematological parameters. A comparative evaluation of the "new" (Coulter Analyzer LH-750) versus the "old" (Abbott Cell-Dyn 4000) instrument was therefore carried out, by measuring common haematological parameters (WBC, RBC, Hb, MCV, platelets, RDW and haematocrit) in 184 fresh patient blood samples, covering wide intervals of values. Statistical comparison was performed by regression analysis (non-parametric linear regression, according to Passing and Bablok), and by the distribution of the differences approach. Statistically significant differences, generally lower than 3% and mainly due to slope values different from 1, were observed with most parameters, with the exception of RDW. With this exception, however, the average differences were lower than the critical difference calculated on the basis of biological variation, and were consistent with the inter-instruments variation recorded by external quality assessment scheme in haematology of the Regione Lombardia. It is concluded that changing the instrument may produce variation of results not interfering with their clinical interpretation, although statistically significant. There was no explanation for the inter-instrument differences observed for RDW: it is recommended that method-specific reference value are used for such haematological parameter.

RIASSUNTO

Nell'ambito del rinnovo della strumentazione, si è posto il problema di verificare se l'introduzione di un nuovo analizzatore ematologico (contaglobuli) inducesse variazioni significative nella stima dei comuni parametri ematologici. Si è pertanto confrontato lo strumento "nuovo" (Coulter Analyzer LH-750) con quello "vecchio" (Abbott Cell-Dyn 4000), comparando i risultati ottenuti nella analisi di 184 campioni freschi di sangue da paziente, coprenti per i differenti parametri (leucociti ed eritrociti, Hb, MCV, piastrine, RDW ed ematocrito) intervalli di valori (normali e patologici) abitualmente osservati. Il confronto statistico è stato effettuato con l'analisi della regressione non-parametrica (secondo Passing e Bablok) e della distribuzione delle differenze. Si sono riscontrate differenze statisticamente significative (prevalentemente per presenza di pendenza differente da 1), in genere inferiori a 3 %, ad eccezione di RDW. Tali differenze, ad eccezione di RDW, sono risultate inferiori alla differenza critica (calcolata sulla base dei valori della letteratura per la variabilità biologica) e compatibili con le differenze inter-strumenti rilevate nel programma di valutazione esterna della qualità della Regione Lombardia. Le variazioni casuali attorno ai valori medi di stima risultavano contenute tra il 2% e il 3 %, ad eccezione di piastrine e RDW. Si conclude che il cambio di strumentazione introduce variazioni di stima statisticamente significative ma non influenti dal punto di vista medico. Per RDW non si dispone di dati di confronto: appare opportuno che le differenze osservate (media: + 13,5%) siano compensate tramite la adozione di intervalli di riferimento strumento-specifici.

INTRODUZIONE

Nell'ambito del rinnovo della strumentazione del nostro laboratorio si è programmato di cambiare l'analizzatore ematologico automatico (contaglobuli). Poiché la scelta è caduta su strumento differente da quello in uso, ci si è posti il problema di verificare se le eventuali variazioni dei risultati derivanti dal cambio di strumentazione fossero di entità tale da influenzare la interpretazione dei risultati, con particolare riferimento al confronto di risultati precedenti (vecchia strumentazione) e risultati attuali (nuova strumentazione) per il medesimo paziente.

A tal fine è stata programmata e condotta una sperimentazione comparativa dei due strumenti, utilizzando un numero abbastanza elevato di campioni freschi da paziente, selezionati in modo da coprire gli intervalli di valori (normali e patologici) abitualmente riscontrati per i singoli parametri ematologici considerati.

Ai fini di valutare la significatività clinica e l'impatto medico delle differenze osservate, i risultati della comparazione sono stati confrontati con i dati di un programma di valutazione esterna della qualità (VEQ) in ematologia, e con i valori di differenza tollerabili stabiliti sulla base della variabilità biologica.

MATERIALI E METODI

Si sono utilizzati 184 campioni di sangue (prelevati su EDTA.K₃) selezionati tra i campioni inviati per esami ordinari, in modo da coprire ampi intervalli per i valori dei singoli parametri (vedi tabella 1). I campioni sono stati analizzati in singolo sui due strumenti, nella giornata del prelievo, in 16 differenti a gruppi di 8-15 campioni per volta, nell'arco di 46 giorni.

I due strumenti comparati erano rappresentati da Cell-Dyn 4000, Abbott (strumento "vecchio" indicato di seguito come "Abbott") e Coulter Analyzer LH-750, Beckman-Coulter (strumento "nuovo", indicato di seguito come "Beckman"). Per la misura dei parametri ematologici inclusi nello studio, i due strumenti utilizzano principi simili, comprendenti misura impedenziometrica delle particelle, calcolo del volume corpuscolare medio (MCV) dalla curva di distribuzione dei volumi e derivazione del valore dell'ematocrito dal valore di MCV e dal numero di eritrociti. Entrambi sono stati utilizzati e calibrati come suggerito dalle rispettive case, utilizzando i materiali forniti dalle medesime.

Per l'analisi statistica si è utilizzata la regressione lineare non-parametrica di Passing e Bablok (1) e l'analisi della distribuzione delle differenze (2), e le corrispondenti presentazioni grafiche, rispettivamente diagramma di dispersione (y/x) e cosiddetto "difference plot" (2). I valori forniti dal sistema "vecchio" sono stati uniformemente considerati variabile indipendente (x), non perchè essi rappresentassero una variabile stimata senza errore ma per evidenziare con uniformità il confronto del "nuovo" con il "vecchio". Per i calcoli si è utilizzato il pacchetto Method Validator (Philippe Marquis, Biologiste de hopiteaux, Metz, France) e l'applicativo MS Excel.

I dati derivanti da programma di VEQ sono stati ricavati dal riepilogo del 1° ciclo del programma di VEQ in ematologia della Regione Lombardia, anno 2001. Nel corso di tale ciclo 8 campioni di controllo erano stati analizzati dai partecipanti, ed i risultati erano stati analizzati statisticamente per "gruppi omogenei", comprendenti un gruppo (da 34 a 36 partecipanti nei differenti esercizi) di utilizzatori di differenti sistemi Abbott ed un gruppo (da 66 a 70 partecipanti nei differenti esercizi) di utilizzatori di differenti sistemi Beckman Coulter. I valori medi di tali gruppi sono pertanto basati su un numero di misure singole compreso

tra 271 e 277 per i sistemi Abbott, e tra 541 e 542 per i sistemi Beckman. Le differenze tra i valori dei due gruppi non possono essere considerate rappresentative delle differenze tra gli strumenti qui valutati, ma danno una indicazione sulle differenze "stato dell'arte" riscontrabili nelle analisi ordinarie eseguite con differenti strumenti, e rappresentano stime particolarmente robuste dato l'elevato numero di risultati su cui sono basate le medie.

La differenza critica (Dcr) è stata calcolata come $Dcr = 2,77 \sqrt{Vb^2 + Va^2}^{1/2}$ (3), dove Vb è la variabilità biologica intra-individuale riportata in letteratura (4,5) e nell'assunzione, (sostanzialmente confermata dai dati) che per la imprecisione analitica (Va) si potesse considerare: $Va = 1/2Vb$.

RISULTATI

La tabella 1 riporta le statistiche descrittive essenziali del campione utilizzato per il confronto tra i due sistemi.

I risultati del confronto tra metodi sono rappresentati graficamente, sottoforma di "difference-plots", nella figura 1 per sei dei sette parametri ematologici studiati. I risultati relativi al settimo (RDW) sono riportati nella figura 2, come "difference-plot" e come di grafico di dispersione: in questo ultimo caso i singoli valori sono confrontati con la retta di regressione (linea continua) e con la retta della equivalenza (linea tratteggiata). L'analisi statistica dei medesimi dati è riassunta nella tabella 2, che riporta i parametri della regressione lineare (secondo il modello di Passing e Bablok) e la media delle differenze, con i rispettivi intervalli di confidenza 95%.

I dati che misurano l'oscillazione dei singoli valori attorno alla stima di accordo medio (rispettivamente, regressione e media delle differenze), rappresentati dalla deviazione standard residua (Sy.x), dalla deviazione standard della media delle differenze e dal coefficiente di correlazione ("r"), sono riportati nella tabella 3.

Nella tabella 4 la deviazione sistematica percentuale "nuovo"/"vecchio" è confrontata con la deviazione sistematica percentuale "Beckman"/"Abbott", risultante dal programma di VEQ, e con la differenza critica, per i singoli parametri ematologici.

Tabella 1
Statistiche descrittive del campione utilizzato

Parametro ematologico	n.	Abbott			Beckman		
		m ± DS	Min	Max	m ± DS	Min	Max
Leucociti, 10 ⁹ /L	184	9,83±5,04	0,4	36,2	9,61±5,00	0,40	37,6
Eritrociti, 10 ¹² /L	184	3,96±0,78	2,30	5,62	3,83±0,73	2,21	5,51
Emoglobina, g/dL	184	11,4±2,12	7,00	16,1	11,5±2,24	7,20	16,6
MCV, fL	184	88,6±5,97	68,1	117,3	89,6±5,18	70,1	113,0
Piastrine, 10 ⁹ /L	184	252±124	1,0	671	260±128	3,0	808
RDW, %	180	13,3±2,11	10,4	21,7	15,1±2,56	11,3	26,3
Ematocrito, %	184	35,0±6,77	22,1	50,3	34,2±6,55	20,7	48,0

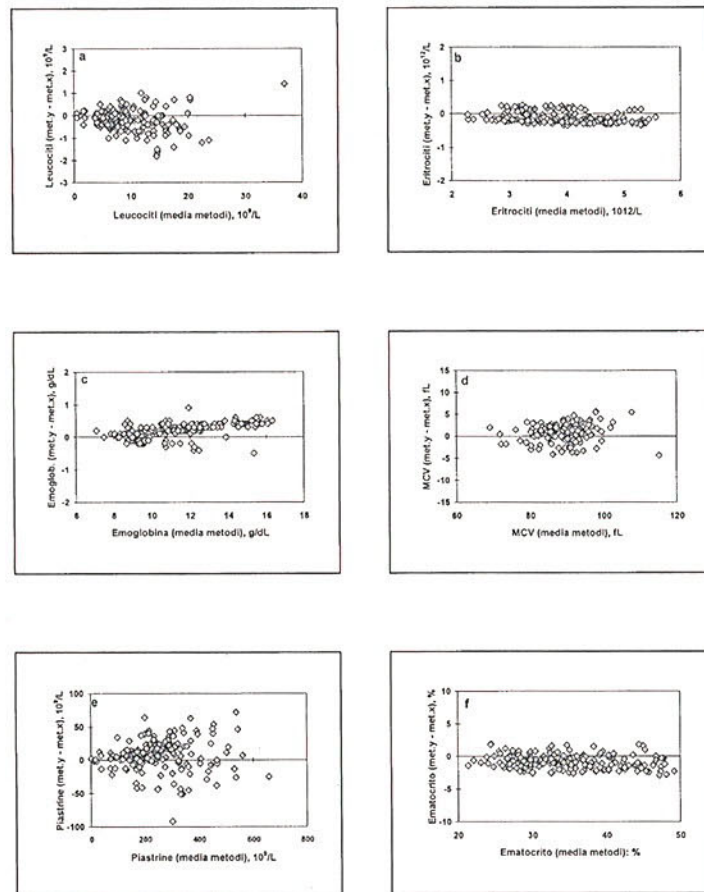


Figura 1

Confronto intermetodi, come "difference-plot". Sono riportati sull'ascisse la media delle due misure e sulle ordinate la differenza ($y - x$) tra le due misure, dove y è il sistema "nuovo", x il sistema "vecchio". I grafici da "a" ad "f" si riferiscono a: leucociti; eritrociti; emoglobina; MCV; piastrine; ematocrito

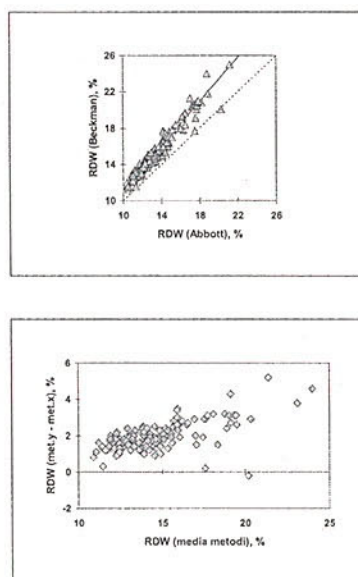


Figura 2

Confronto intermetodi nella determinazione di RDW. Le 180 coppie di valori ottenute con i sistemi "nuovo" (y) e "vecchio" (x) sono confrontate come grafico di dispersione (grafico superiore, dove le rette tratteggiate e continua sono le rette di equivalenza e di

Tabella 2Analisi statistica dei risultati del confronto tra strumenti ($x = Abbott$; $y = Beckman$)

Parametro ematologico	Regressione di Passing e Bablok		Analisi delle differenze
	Pendenza (i. c. 95%*)	Intercetta (i. c. 95%*)	Differenza media (y-x) (i. c. 95%*)
Leucociti, $10^9/L$	0,98 (0,97/1,00)	-0,03 (-0,20/0,10)	-0,22 (-0,29/-0,15)\$
Eritrociti, $10^{12}/L$	0,94 (0,92/0,96)#	0,05 (-0,03/0,14)	0,13 (-0,15/-0,10)\$
Emoglobina, g/dL	1,06 (1,05/1,07)#	0,48 (-0,61/-0,35)\$	0,20 (0,16/0,23)\$
MCV, fL	1,04 (0,98/1,09)	1,89 (-6,72/2,86)	1,02 (0,74/1,30)\$
Piastrine, $10^9/L$	1,04 (1,01/1,07)#	0,4 (-5,1/6,0)	7,78 (3,70/11,9)\$
RDW, %	1,21 (1,17/1,25)#	0,88 (-1,38/-0,35)\$	1,87 (1,77/1,97)\$
Ematocrito, %	0,97 (0,94/0,99)#	0,28 (-0,57/1,14)	0,81 (-0,57/2,14)

* intervallo di confidenza 95 %

significativamente differente da 1 (uno)

\$ significativamente differente da 0 (zero)

Tabella 3

Parametri statistici dell'adattamento dei singoli punti all'accordo medio

Parametro ematologico	Valore medio (x)	D.S. residua (regressione P.B.)	D.S. della media delle differenze:	r
Leucociti, $10^9/L$	9,83	0,47	0,48	0,996
Eritrociti, $10^{12}/L$	3,96	0,14	0,16	0,981
Emoglobina, g/dL	11,4	0,20	0,22	0,996
MCV, fl	88,6	1,91	1,82	0,952
Piastrine, $10^9/L$	252	28,5	28,1	0,975
RDW, %	13,3	0,59	0,74	0,974
Ematocrito, %	35,0	1,03	1,07	0,988

Tabella 4

Confronto tra le differenze percentuali medie, la variabilità biologica inter-individuale (Vb) e la differenza critica (Dcr)

Parametro ematologico	Differenza % (Beckman-Abbott)		Vb %	Dcr %
	Questo lavoro	VEQ		
Leucociti, $10^9/L$	9,83	0,47	0,48	0,996
Eritrociti, $10^{12}/L$	3,96	0,14	0,16	0,981
Emoglobina, g/dL	11,4	0,20	0,22	0,996
MCV, fl	88,6	1,91	1,82	0,952
Piastrine, $10^9/L$	252	28,5	28,1	0,975
RDW, %	13,3	0,59	0,74	0,974
Ematocrito, %	35,0	1,03	1,07	0,988

n.d. non disponibile

DISCUSSIONE

Sono state descritte modalità tecniche specifiche per una completa valutazione analitica degli analizzatori ematologici (6). In questo caso tuttavia il problema era di verificare l'entità e la significatività clinica delle differenze eventualmente introdotte dal cambio di sistema: si è adottata pertanto una tecnica classica di confronti inter-metodi, utilizzando campioni "reali". Poiché i parametri ematologici valutati possono essere considerati variabili continue, si sono applicate tecniche statistiche usuali per il confronto di metodi, anche se per l'ematologia

sono stati proposti approcci alternativi (7). In considerazione dei meriti relativi dei due più seguiti approcci alternativi (8), ossia la distribuzione delle differenze e l'analisi della regressione, si sono applicati entrambi, utilizzando nel secondo caso un modello "distribution free" (1), applicabile anche quando entrambe le variabili sono stimate con errore e che consente una stima più corretta dei parametri della regressione (9). La numerosità del campione statistico ($n = 184$) e l'ampiezza dell'intervallo dei singoli valori (tabella 1) possono essere considerati adatti per una stima corretta dei parametri della regressione (10).

Globalmente, i risultati del confronto statistico secondo i due approcci sono abbastanza se non sempre concordanti (tabella 2), sia per quanto concerne la incidenza di non-accordo statisticamente significativo tra i due metodi, sia per quanto concerne le dimensioni del disaccordo. L'analisi della regressione fornisce dati più analitici, in quanto permette di separare la componente costante (intercetta) dalla componente proporzionale (pendenza) dell'errore sistematico: è interessante osservare la prevalente significatività della intercetta, il che appare una buona premessa per un più semplice intervento di ricalibrazione o di ricalcolo qualora si ponesse il problema della equalizzazione dei risultati forniti dai due analizzatori. Si rileva comunque da tali dati che le differenze inter-metodo sono piuttosto piccole, ad eccezione di RDW che mostra una pendenza pari a 1,21, per la quale non esiste una spiegazione immediata dato che nei due sistemi RDW è definito nella stessa maniera (CV della distribuzione dei valori di volume globulare).

Le dispersioni dei singoli valori attorno alle stime di accordo medio valutate con i due metodi (deviazione standard residua e deviazione standard della media delle differenze) appaiono abbastanza contenute, con la esclusione del conteggio delle piastrine. Le due stime di dispersione (tabella 3) sono in effetti contenute entro il 2-3 % del valore medio per emoglobina, MCV ed ematocrito, tra il 4 % e il 5 % del valore medio per leucociti, eritrociti ed RDW, vicine a 11 % per piastrine.

Verificata l'esistenza di differenze statisticamente significative nei risultati forniti dai due analizzatori, resta da stabilirne la rilevanza medica. A questo scopo abbiamo confrontato i valori ottenuti nella nostra sperimentazione con quelli rilevati nel corso del programma di VEQ (come rappresentativi dello "stato dell'arte") e con le differenze critiche calcolate sulla base della variabilità biologica: per questo confronto tutti i valori sono stati espressi in %. Si rammenta che il riscontro di una differenza inter-metodi superiore alla differenza critica indica che il cambio di metodo ha di per sé introdotto una variazione superiore a quella casualmente derivante dalla combinazione delle variabilità biologica e analitica. In altri termini, qualora si effettuassero due analisi consecutive con i due sistemi al medesimo paziente, si attribuirebbe a reali variazioni delle condizioni cliniche dal paziente una eventuale differenza che sarebbe invece generata dalla differenza tra gli strumenti. I dati della tabella 4 mostrano come, in media, per i parametri ematologici studiati ad esclusione di RDW, le variazioni generate dal cambio dell'analizzatore sono abbastanza più piccole della differenza critica, ed abbastanza allineate con lo stato dell'arte, con qualche differenza in più od in meno. Per RDW non sono disponibili termini di confronto.

Nell'ambito dei differenti tipi di analizzatori automatici disponibili nel laboratorio moderno, gli analizzatori ematologici (contaglobuli) sembrano in genere essere tra i meglio "standardizzati" ossia tra quelli in grado di produrre risultati meglio comparabili. Ciò risulta, anche se non sempre documentato in maniera approfondita, in alcuni recenti lavori di valutazione (11,12) o, indirettamente, in lavori riguardanti la produzione di valori di riferimento per differenti strumenti (13). Anche per i conteggi leucocitari differenziali (formula leuco-

citaria), non inclusi nella nostra valutazione, si sono ottenuti soddisfacenti risultati di valutazione (14,15).

I dati nostri soddisfano positivamente lo scopo per cui sono stati prodotti, dimostrando un accordo accettabile tra i due strumenti valutati, sia in termini puramente analitici in confronto alla variabilità inter-strumenti evidenziata in programmi di VEQ, sia in termini di significato medico nei confronti della variabilità biologica, sia infine in confronto ai dati della letteratura. L'unica differenza di particolare entità è risultata evidente per RDW, per il quale peraltro non sono disponibili termini di confronto. Per questo ultimo parametro ematologico l'unica alternativa possibile sembra essere quella di adottare valori di riferimento strumento-specifici.

BIBLIOGRAFIA

1. Passing H, Bablok W. A general regression procedure for method transformation. Application of regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:783-90.
2. Hollis S. Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996;33:1-4.
3. Fraser CG. Analytical goals are applicable to all. *J Int Fed Clin Chem* 1990;2:84-6.
4. Franzini C. Relevance of analytical and biological variations to quality and interpretation of test results: example of application to haematology. *Ann Ist Super Sanità* 1995; 31:9-13.
5. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
6. Rowan RM, Englend JM. Special aspects in haematology. In *Evaluation Methods in Laboratory Medicine* (editore: R.Haackel). VCH mbH, Weinheim (Germania), 1993:141-51.
7. Magari RT. A statistical approach for hematology comparison studies. *Laboratory Hematology* 1998;4:199-203.
8. Dewitte K, Fierens C, Stockl D, Thienpont LM. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice (Letter). *Clin Chem* 2002;48:799-801.
9. Payne RB. Method comparison: evaluation of least squares, Deming and Passing/Bablok regression procedures using computer simulation. *Ann Clin Biochem* 1997;34:319-20.
10. Linnet K. Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis. *Clin Chem* 1999; 45:882-94.
11. Picard F, Gicquel C, Marnet L, Guesnu M, Lavy JP. Preliminary evaluation of the new hematology analyzer Coulter GEN-S in a university hospital. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:681-6.
12. Koenn ME, Kirby BA, Cook LL, Hare JL, Hall SH, et al. Comparison of four automated hematology analyzers. *Clin Lab Sci* 2001;14:238-42.
13. Van den Bossche J, Davreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated hematology analyzers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:69-73.
14. Stamminger G, Koppel C, Schaub A, Gartner I, Tonnendorf C, et al. Performance of the SE-9000 automated hematology analyser in a laboratory serving a haematological oncology unit. *Clin Lab Haem* 1998;20:143-9.
15. Siekmeier R, Bierlich A, Jaross W. The white blood cell differential: three methods compared. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:432-45.