

Valutazione dell'algoritmo Complete Blood Count-Optical: perché l'MCHC aumenta?

Maria Lorubbio, Claudia Artini, Paolo Anedotti, Massimiliano Pettinari, Agostino Ognibene

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Dipartimento Medicina di Laboratorio e Trasfusionale, Ospedale San Donato, Arezzo

Questo contributo è stato in parte presentato al 54° Congresso nazionale SIBioC di Genova, 4-7 ottobre 2022, essendo stato selezionato come Comunicazione Orale

ABSTRACT

Evaluation of the Complete Blood Count-Optical algorithm: why does the Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration increase?

Introduction: the increase of Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) in the Complete Blood Count (CBC) test is a complex issue, deserving great attention. Erythrocytes (RBC) count by impedance and the photometric hemoglobin (HGB) measurement can be influenced by both biological variables (cold agglutinins, lipemia, icterus, hemolysis, RBC alterations) and pre-analytical factors (collection, storage and transport of the sample). In this paper, the Complete Blood Count-Optical (CBC-O) algorithm is evaluated for the identification of the cause of the MCHC increase and for the suggested corrective action to correctly report the CBC parameters.

Methods: 255 samples, collected with K₂-EDTA anticoagulant, for the CBC test were used. The algorithm was triggered after the reticulocytes reflex testing (XN-RET) using the XN hematology analyzer (Sysmex), when MCHC was >365 g/L. The CBC-O tool uses a number of RBC and HGB measures and indices.

Results: the samples were classified by the CBC-O algorithm into 5 groups according to the causes of the MCHC increase: cold agglutinins (n=70), cold agglutinins and HGB interferences (n=10), HGB interferences (n=6), RBC pathologies or hemolysis (n=32) and unclear situations with normal RBC profile (n=137).

Discussion: MCHC elevation is a rare occurrence in routine daily practice, but it needs to be managed properly. The CBC-O algorithm is a useful tool since, in a short time, it allows to give indications on the probable causes of the increase and to report correct erythrocyte indices, without the need to treat the sample, which would otherwise lengthen the turn around time.

Parole chiave: emocromo, agglutinine a freddo, anemia emolitica

INTRODUZIONE

I parametri forniti dagli analizzatori ematologici sono fondamentali per permettere un rapido inquadramento diagnostico e terapeutico di diverse condizioni (1,2). In particolare, gli indici eritrocitari hanno un ruolo essenziale per la diagnosi differenziale dello stato anemico e policitemico (3,4). Tali parametri, determinati dagli analizzatori (5), in ragione di condizioni cliniche del paziente (anemie emolitiche e patologie eritrocitarie) o pre-analitiche del campione (interferenti, trasporto e conservazione) possono presentare risultati spuri (6,7). Il parametro che misura la concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC) può aumentare per diverse cause: in presenza di agglutinine a freddo (8), per emolisi *in vitro* o *in vivo*, lipemia, ittero e/o in presenza di discrasie plasmacellulari (9-11), per patologie eritrocitarie (12) e

in caso di disidratazione eritrocitaria per iponatriemia o uso di droghe e/o farmaci (chemioterapici) (6). Diverse sono le azioni correttive, che devono essere intraprese dal professionista di laboratorio, riconoscendo la causa dell'aumento. In presenza di agglutinine a freddo è necessaria la termostatazione del campione a 37°C per 2 ore (13), la sostituzione e/o diluizione del plasma in caso di interferenza preanalitica (ittero e lipemia) (14) la richiesta di un nuovo campione in caso di emolisi *in vitro* e la revisione microscopica per sospette patologie eritrocitarie (11). Il riconoscimento dell'aumento spurio dell'MCHC è importante per la corretta refertazione del parametro, che se non eseguita può influenzare le valutazioni cliniche e il percorso di diagnosi e cura del paziente. Recentemente è stato sviluppato, sullo strumento della Sysmex XN-10 RET, l'algoritmo Complete Blood Count-Optical (CBC-O), un supporto informatico di ausilio al professionista

Corrispondenza a: Maria Lorubbio, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Dipartimento Medicina di Laboratorio e Trasfusionale, Ospedale San Donato, Via Pietro Nenni, 20/22, 52100 Arezzo E-mail: maria.lorubbio@uslsudest.toscana.it.

Ricevuto: 20.07.2023

Revisionato: 10.08.2023

Accettato: 10.10.2023

Publicato on-line: 08.11.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.084

di laboratorio per l'individuazione delle cause di incremento dell'MCHC (6,15), suggerendo le possibili azioni da intraprendere per refertare correttamente il dato. In questo lavoro viene valutato l'algoritmo CBC-O nell'individuazione delle possibili cause preanalitiche e/o di patologia che possono aumentare il parametro MCHC, in particolare nel riconoscimento dell'interferenza dovuta alle agglutinine a freddo, che costituisce la causa più frequente di alterazione spuria degli indici eritrocitari dell'esame emocromocitometrico.

METODI

Campioni

Sono stati utilizzati 255 campioni di sangue intero raccolti in provette con anticoagulante K₂-EDTA, nel periodo tra settembre 2021 e agosto 2022, dalla routine giornaliera del laboratorio analisi chimico-cliniche dell'Ospedale San Donato di Arezzo, che avevano la richiesta di esame emocromocitometrico. I campioni sono stati analizzati con strumentazione ematologica XN-9000 (Sysmex, Giappone) per l'esecuzione del Complete Blood Count (CBC). Campioni di siero raccolti contestualmente venivano sottoposti ad analisi su analizzatori Cobas (Roche), con esecuzione di indici HIL (emolisi, ittero, lipemia). Il criterio di selezione dei campioni è stato il valore del parametro MCHC >365 g/L alla prima esecuzione dell'esame emocromo, ai quali è stato eseguito il test riflesso per i reticolociti (RET) e applicato l'algoritmo (CBC-O). Parallelamente all'applicazione dell'algoritmo, i campioni sono stati processati e valutati secondo procedure interne e quanto riportato in letteratura in caso di aumento dell'MCHC

dovuto ad agglutinine a freddo, interferenza preanalitica (ittero, emolisi *in vitro* e lipemia) e patologia eritrocitaria e/o emolisi *in vivo* (16). In particolare, i campioni che non presentavano interferenze ottiche valutate dall'indice HIL o possibili patologie eritrocitarie erano sottoposti a termostatazione a 37°C per 2 ore (13,17). L'accuratezza, la precisione e l'allineamento strumentale dei 5 contaglobuli XN-9000 (Sysmex) erano monitorati attraverso l'esecuzione di un controllo di qualità interno su 3 livelli (XN CHECK) con il supporto dell'applicativo web Caresphere™ XQC (18,19). È stato utilizzato materiale biologico residuale di campioni anonimizzati e analizzati precedentemente nella routine giornaliera; durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975 come emendata nel 2013 (20).

Popolazione di controllo

Una popolazione di controllo è stata utilizzata per confrontare e verificare la correlazione dei parametri eritrocitari eseguiti con metodologia impedenziometrica ed ottica. Il gruppo di controllo (n=1166) era costituito da esami emocromocitometrici eseguiti negli ultimi 6 mesi con test riflesso RET e i seguenti criteri di inclusione (15): assenza di allarmi strumentali, conteggio leucociti (WBC) <90x10⁹/L e valori MCHC compresi nell'intervallo 320-365 g/L.

Algoritmo CBC-O

Quando il parametro MCHC risulta >365 g/L, viene eseguito il test riflesso RET (conteggio dei reticolociti) con attivazione dell'algoritmo CBC-O, (Figura 1) che

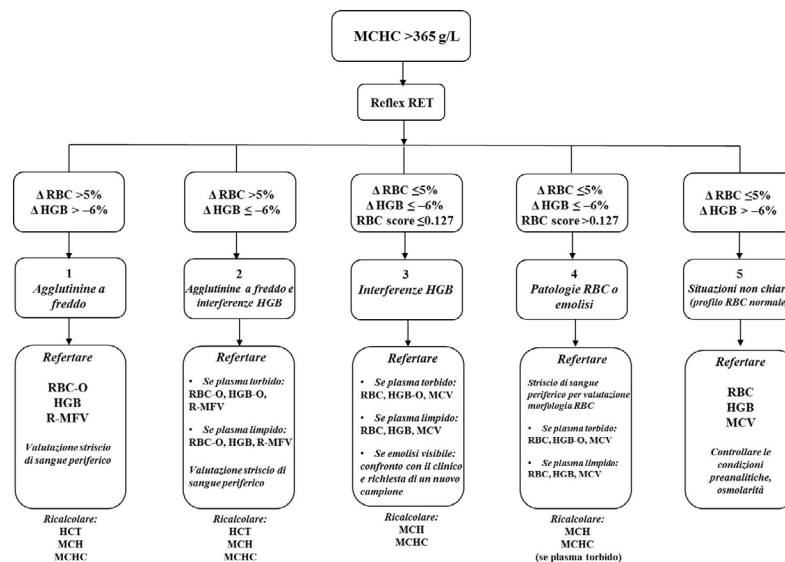


Figura 1

Algoritmo CBC-O secondo Berda-Haddad et al. (rif 6)

HGB, emoglobina; HCT, eematocrito; MCV, volume corpuscolare medio; MCH, concentrazione emoglobinica corpuscolare media; MCHC, concentrazione del contenuto emoglobinico corpuscolare medio; RET, reticolociti; HGB-O, Emoglobina-O; RBC-O, eritrociti-O; R-MFV, R-volume piastrinico medio; Δ RBC, delta-eritrociti; Δ HGB, delta-emoglobina; RBC, eritrociti; Score RBC¹.

¹ Il RBC score, basato sulla conta dei reticolociti (RET#) e dei frammenti eritrocitari (FRC%), viene calcolato dal nomogramma come descritto da Berda-Haddad et al. (6) per la predizione delle patologie eritrocitarie. Un RBC score di 0,127 è il valore soglia calcolato da questi autori per identificare il gruppo di pazienti con patologie eritrocitarie.

suggerisce sia le cause dell'incremento dell'MCHC (classificate in 5 gruppi) sia le azioni da intraprendere. L'algoritmo, basandosi sull'albero decisionale di Berda-Haddad et al. (6), utilizza attraverso l'attivazione del canale ottico RET, non solo i parametri del conteggio eritrocitario (RBC) e della determinazione dell'emoglobina (HGB), ma anche quelli Red Blood Cells-Optical (RBC-O) e Hemoglobin-Optical (HBG-O).

Determinazioni ematologiche e calcoli

L'RBC è determinato con metodo impedenziometrico utilizzando il sistema resistivo con focalizzazione idrodinamica a temperatura ambiente per ridurre il fenomeno della coincidenza, l'HGB è misurata fotometricamente dopo lisi dei globuli rossi con il reagente sodio lauril solfato (SLS). L'ematocrito (HCT) deriva dalla sommatoria dell'ampiezza degli impulsi quando ciascun eritrocita passa attraverso due elettrodi e l'MCV è calcolato dal rapporto HCT/RBC. Inoltre, è disponibile il parametro di servizio R-MFV (volume più frequente di RBC), che rappresenta il valore mediano dei volumi degli eritrociti (17); i parametri MCH (HGB/RBC) e MCHC (HGB/HCT) sono calcolati con le formule di Wintrobe (5). L'attivazione del canale RET, che utilizza la citometria a flusso per il conteggio cellulare, permette la determinazione in ottica dopo incubazione a 41°C, del conteggio totale di RBC (RBC-O), includendo la percentuale dei reticolociti e del parametro HGB-O, calcolato da RBC-O e dal contenuto di emoglobina degli eritrociti (RBC-He) (15,17). L'algoritmo è basato sulle differenze tra i parametri in impedenziometria e in ottica calcolando il

$$\Delta RBC (\%) = [(RBC-O - RBC) / RBC] \times 100$$

e il

$$\Delta HGB (\%) = [(HGB-O - HGB) / HGB] \times 100$$

L'RBC score, basato sul conteggio dei reticolociti (RET#) e dei frammenti eritrocitari (FRC%), viene calcolato dal nomogramma per la predizione delle patologie eritrocitarie (6). Le formule sono le seguenti

$$\Delta MCH (\%) = [(RBC-He - MCH) / MCH] \times 100 \text{ e}$$

$$\Delta MCHC (\%) = [(MCHC-O - MCHC) / MCHC] \times 100$$

I valori soglia decisionali per ΔRBC e ΔHGB sono quelli utilizzati nell'albero decisionale di Berda-Haddad et al. (6) e sono rispettivamente 5% e -6%.

Classificazione CBC-O delle cause di incremento dell'MCHC

Agglutinine a freddo. Quando i parametri sono: $\Delta RBC > 5\%$ e $\Delta HGB > -6\%$ (ad esempio -5%), l'incremento dell'MCHC può essere dovuto alla presenza di agglutinine a freddo (8). L'algoritmo suggerisce la causa e i parametri da refertare: quelli misurabili ottenuti dopo il test riflesso RET e attivazione algoritmo CBC-O (RBC-O e R-MFV), quelli ricalcolati perché interferiti dalla presenza di

agglutinine a freddo (HCT, MCH, MCHC) e il valore di HGB determinato fotometricamente, evitando la termostatazione del campione a 37°C per 2 ore.

Agglutinine a freddo e interferenza HGB. Quando i parametri sono $\Delta RBC > 5\%$ e $\Delta HGB \leq -6\%$ (ad esempio -8%), l'incremento dell'MCHC può essere dovuto alla presenza di agglutinine a freddo e a emolisi (interferenza dell'HGB), come suggerisce l'algoritmo, per probabile anemia emolitica autoimmune (AEA) da anticorpi caldi (IgG), anticorpi freddi (IgM) e/o misti o indotta da farmaci (21). L'algoritmo suggerisce di refertare i parametri misurabili RBC-O e R-MFV, quelli ricalcolati HCT, MCH, MCHC e il valore HGB-O in presenza di plasma torbido; refertare il valore di HGB determinato fotometricamente se il plasma è limpido.

Interferenze emoglobiniche. Quando i parametri sono $\Delta RBC \leq 5\%$, $\Delta HGB \leq -6\%$ (ad esempio -8%) con RBC score normale $\leq 0,127$ (6), l'incremento dell'MCHC può essere dovuto alla presenza di interferenze preanalitiche: lipemia, ittero ed emolisi *in vitro* (10,23). L'algoritmo, in caso di plasma torbido per lipemia o itterico, raccomanda di refertare i parametri RBC, HGB-O con i parametri calcolati MCH-O, MCHC-O e MCV; in caso di plasma limpido, l'algoritmo suggerisce di refertare i parametri RBC, HGB ed MCV.

Patologie eritrocitarie o emolisi. Quando i parametri sono $\Delta RBC \leq 5\%$, $\Delta HGB \leq -6\%$ (ad esempio -8%) con RBC score aumentato $> 0,127$ (6), l'incremento dell'MCHC può essere dovuto alla presenza di patologie eritrocitarie o emolisi *in vivo* (sferocitosi ereditaria, anemia falciforme). L'algoritmo, in caso di plasma torbido, suggerisce di refertare i parametri RBC, HGB-O ed MCV, mentre in caso di plasma limpido, i parametri RBC, HGB ed MCV. Se presente una patologia eritrocitaria è necessario refertare l'MCHC > 365 g/L.

Situazioni non chiare (profilo eritrocitario normale). Quando i parametri sono $\Delta RBC \leq 5\%$ $\Delta HGB > -6\%$ (ad esempio -5%) e RBC score normale $\leq 0,127$ (6), l'incremento dell'MCHC può essere dovuto a situazioni non chiaramente definite, che possono includere disidratazione intracellulare, osmolarità anomala, paziente in chemioterapia, ustioni, abuso alcolico o patologie epatiche. L'algoritmo, per tali probabili cause, suggerisce di refertare i parametri RBC, HGB, MCV ed i parametri calcolati.

Analisi statistica

I dati sono stati raccolti utilizzando il file Microsoft Excel ed elaborati con i software SPSS 20.0 (IBM) e GraphPad Prism. Sono state eseguite correlazioni di Pearson per distribuzioni non parametriche ed utilizzati il test statistico Kolmogorov-Smirnov per distribuzioni normali e il T test per il confronto tra medie.

RISULTATI

Nella Tabella 1 sono mostrate le medie, le SD, le mediane e i valori minimi-massimi dei parametri eritrocitari dei 5 gruppi di campioni classificati dall'algoritmo CBC-O. In Tabella 2 sono presenti le

Tabella 1

Media, mediana, deviazione standard (DS) e valori minimo e massimo dei parametri eritrocitari dei 5 gruppi di campioni classificati dall' algoritmo sull'esame emocromocitometrico completo-O (CBC-O).

Parametri	Agglutinine a freddo n=70		Agglutinine a freddo e interferenze HGB n=10		Interferenze HGB n=6		Patologie RBC o emolisi n=32		Situazioni non chiare (profilo RBC normale) n=137	
	Media (DS)	Mediana (Min-Max)	Media (DS)	Mediana (Min-Max)	Media (DS)	Mediana (Min-Max)	Media (DS)	Mediana (Min-Max)	Media (DS)	Mediana (Min-Max)
RBC (10 ¹² /L)	2,29 (1,02)	2,24 (0,48-4,44)	2,06 (1,14)	2,26 (0,23-3,49)	3,18 (0,87)	3,11 (2,25-4,19)	3,67 (1,52)	4,27 (1,59-5,62)	3,84 (0,92)	3,53 (2,26-5,76)
HGB (g/L)	111,00 (2,16)	102,00 (76,00-154,00)	101,20 (1,98)	100,00 (70,00-128,00)	116,33 (3,86)	95,00 (93,00-161,00)	137,44 (4,93)	141,00 (67,00-204,00)	128,61 (3,23)	120,00 (75,00-203,00)
HCT (L/L)	0,227 (9,69)	0,211 (0,052-0,407)	0,180 (10,38)	0,218 (0,018-0,275)	0,299 (10,89)	0,245 (0,213-0,438)	0,371 (±13,48)	0,379 (0,183-0,558)	0,345 (8,70)	0,324 (0,201-0,552)
MCV (fL)	100,3 (10,23)	102,2 (78,1-125,9)	85,0 (13,54)	78,8 (68,2-103,1)	92,7 (11,60)	94,7 (78,8-104,5)	104,8 (14,12)	99,3 (86,3-129,6)	89,9 (7,07)	88,4 (79,1-116,9)
MCH (pg)	63,2 (49,22)	46,1 (33,2-237,5)	142,1 (218,47)	40,5 (31,2-556,5)	36,7 (5,00)	38,4 (30,5-41,3)	38,9 (5,11)	36,4 (32,4-47,8)	33,5 (2,58)	33,0 (29,1-43,3)
MCHC (g/L)	624,8 (45,24)	444,0 (367,0-2192,0)	1785,4 (280,80)	459,0 (368,0-7111,0)	397,7 (3,18)	388,0 (368,0-437,0)	371,1 (0,69)	368,5 (366,0-394,0)	372,5 (0,55)	372,0 (366,0-387,0)
RET (%)	2,25 (1,53)	1,56 (0,88-8,34)	2,53 (1,33)	1,84 (1,1-4,57)	0,81 (0,34)	0,66 (0,53-1,25)	3,51 (2,16)	3,49 (0,49-8,10)	1,88 (0,88)	1,81 (0,14-3,48)
RET (10 ⁹ /L)	48,8 (0,03)	46,0 (11,1-151,3)	54,0 (0,06)	31,8 (7,7-159,5)	24,1 (0,01)	27,7 (16,5-28,1)	141,9 (0,10)	166,4 (7,8-341,8)	71,4 (0,03)	76,6 (4,8-142,3)
FRC (%)	0,75 (0,70)	0,68 (0,00-2,22)	2,44 (3,10)	0,78 (0,13-7,87)	0,39 (0,51)	0,09 (0,04-1,05)	1,86 (2,25)	0,60 (0,00-6,42)	0,20 (0,41)	0,00 (0,00-1,69)
RBC-O (10 ¹² /L)	3,73 (0,83)	3,83 (2,28-5,1)	4,15 (1,01)	4,27 (2,97-5,37)	3,00 (0,12)	2,93 (2,92-3,16)	3,78 (1,63)	4,38 (1,71-5,94)	3,95 (0,94)	3,73 (2,47-5,98)
HGB-O (g/L)	120,31 (2,76)	116,00 (77,00-184,00)	92,60 (1,65)	98,00 (65,00-112,00)	99,30 (1,76)	89,00 (87,00-122,00)	144,00 (6,21)	154,00 (60,00-232,00)	142,40 (3,63)	134,00 (82,00-224,00)
R-MFV (fL)	94,0 (10,80)	93,9 (60,6-118,4)	75,8 (16,82)	72,9 (54,5-98,6)	91,1 (13,24)	87,6 (78,3-107,3)	108,6 (19,33)	100,4 (81,3-139,3)	89,5 (8,21)	88,2 (76,8-122,2)
Δ RBC (%)	115,9 (176,17)	41,1 (5,0-727,1)	495,2 (918,1)	42,7 (20,3-2234,8)	-0,20 (24,7)	-5,8 (-24,6-29,8)	2,3 (4,7)	2,7 (-8,1-7,9)	3,1 (3,0)	3,5 (-5,7-9,3)
Δ HGB (%)	7,8 (6,84)	8,4 (-5,4-19,5)	-8,2 (4,2)	-9,2 (-12,5-(-1,01))	-12,3 (9,2)	-6,5 (-24,2-(-6,3))	1,9 (11,3)	6,7 (-18,9-16,1)	10,7 (4,7)	11,5 (-4,9-17,8)
Score RBC	0,107 (0,227)	0,009 (0,001-0,781)	0,397 (±0,508)	0,006 (0,002-0,994)	0,004 (0,003)	0,004 (0,001-0,008)	0,667 (0,249)	0,638 (0,189-0,999)	0,025 (0,031)	0,014 (0,001-0,132)

RBC, eritrociti; HGB, emoglobina; HCT, eematocrito; MCV, volume corpuscolare medio; MCH, concentrazione emoglobinica corpuscolare media; MCHC, concentrazione del contenuto emoglobinico corpuscolare medio; RET, reticolociti; FRC, frammenti eritrocitari; RBC-O, eritrociti-O; HGB-O, emoglobina-O; R-MFV, R-volume piastrinico medio; ΔRBC, delta-eritrociti; ΔHGB, delta-emoglobina.

Tabella 2

Caratteristiche delle distribuzioni di ΔRBC , ΔHGB , ΔMCH , $\Delta MCHC$ della popolazione di controllo (n=1 166).

	ΔRBC (%)	ΔHGB (%)	ΔMCH (%)	$\Delta MCHC$ (%)
Media	0,01	-0,25	-0,23	-0,28
Minimo	-5,61	-11,93	-11,88	-12,69
3° percentile	-3,85	-8,55	-7,89	-8,33
25° percentile	-1,86	-2,73	-3,76	-2,70
Mediana	-0,63	0,00	-0,65	0,00
75° percentile	0,83	2,53	3,53	2,33
97° percentile	8,25	7,90	8,04	7,49
Massimo	17,40	10,40	8,78	11,52

ΔRBC , delta eritrociti; ΔHGB , delta emoglobina; ΔMCH , delta contenuto emoglobinico corpuscolare medio; $\Delta MCHC$, delta concentrazione del contenuto emoglobinico corpuscolare medio.

caratteristiche delle distribuzioni di ΔRBC (%), ΔHGB (%), ΔMCH (%) e $\Delta MCHC$ (%) della popolazione di controllo. I parametri RBC ed HGB della popolazione di controllo determinati con i metodi impedenziometrico ed ottico avevano un'eccellente concordanza ($r^2=0,98$) versus RBC-O e ($r^2=0,97$) versus HGB-O rispettivamente. La Figura 1 rappresenta l'algoritmo CBC-O con i parametri ottenuti e/o calcolati da refertare, secondo Berda-Haddad et al. (6), in caso di MCHC elevato. Nella Figura 2 (pannelli a e b) sono rappresentate le differenze (ΔRBC e ΔHGB) in campioni con agglutinine a freddo, interferenza ottica (emolisi *in vivo* o *in vitro*, ittero e lipemia) e altro (patologie eritrocitarie o situazioni non chiare), classificati dell'algoritmo CBC-O.

Il ΔRBC è diverso in modo altamente significativo tra i campioni con agglutinine a freddo e quelli con sola interferenza ottica, come anche tra quelli con agglutinine a freddo e con altro ($p<0,0001$); tale differenza è comunque significativamente diversa ($p<0,05$) tra i campioni con sola interferenza ottica e quelli con altro (Figura 2 a). Il ΔHGB è diverso in modo altamente significativo ($p=0,0001$) tra i campioni con agglutinine a freddo e quelli con la sola interferenza ottica, come anche tra quelli con la sola interferenza ottica e quelli con altro ($p<0,0001$) ma è comunque significativamente diverso tra campioni con agglutinine a freddo e quelli con altro ($p<0,05$) (Figura 2 b). Nella Figura 3 (pannelli a-f) sono stati confrontati

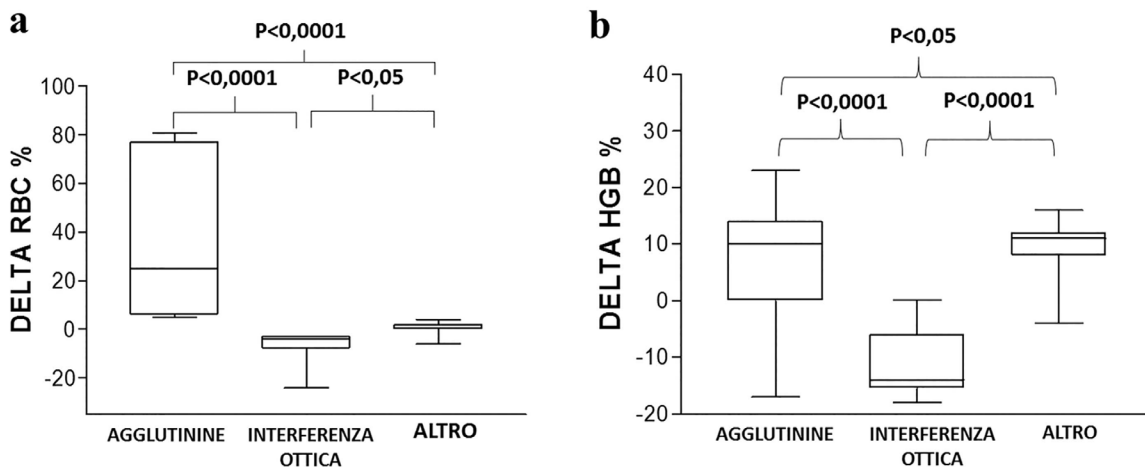


Figura 2

Delta RBC% (pannello a) e Delta HGB% (pannello b) dei campioni con agglutinine a freddo, interferenze preanalitiche (emolisi, ittero e lipemia) e altro (altri gruppi) secondo la classificazione dell'algoritmo CBC-O. RBC, eritrociti; HGB, emoglobina; CBC, esame emocromocitometrico completo.

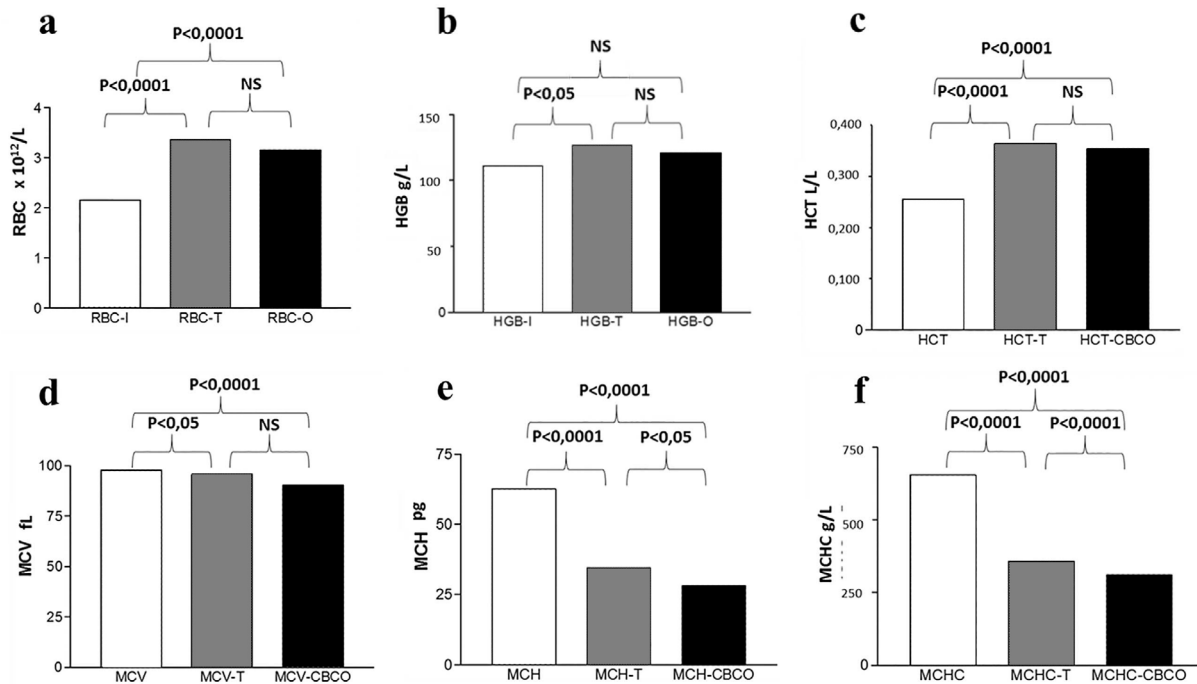


Figura 3

Indici eritrocitari: RBC (pannello a), HGB (pannello b), HCT (pannello c), MCV (pannello d), MCH (pannello e) e MCHC (pannello f) dei campioni con agglutinine a freddo eseguite in impedenziometria, in impedenziometria dopo termostatazione del campione a 37°C per 2 ore e nel canale ottico utilizzando l'algoritmo dell'esame emocromocitometrico completo-O (CBC-O).

HGB, emoglobina; HGBT, HGB in impedenziometria dopo termostatazione del campione a 37°C per 2 ore; HCT, ematocrito; HCTT, HCT in impedenziometria dopo termostatazione del campione a 37°C per 2 ore; MCH, concentrazione emoglobinica corpuscolare media; MCHC, concentrazione del contenuto emoglobinico corpuscolare medio; MCHCT, MCHC in impedenziometria dopo termostatazione del campione a 37°C per 2 ore; MCHT, MCH in impedenziometria dopo termostatazione del campione a 37°C per 2 ore; MCVT, MCV in impedenziometria dopo termostatazione del campione a 37°C per 2 ore; RBC, eritrociti; RBCT, RBC in impedenziometria dopo termostatazione del campione a 37°C per 2 ore.

tutti i parametri eritrocitari dei campioni con agglutinine a freddo (per i quali sono state escluse le altre possibili cause di aumento dell'MCHC) eseguiti in impedenziometria, con canale ottico (XN RET) e dopo termostatazione a 37° per 2 ore. Le differenze di tutti i parametri eritrocitari tra i campioni eseguiti in impedenziometria e quelli calcolati con l'algoritmo sono statisticamente molto significative ($p < 0,0001$), a parte l'HGB. Molto significative sono anche le differenze di RBC, HCT, MCH e MCHC ($p < 0,0001$) (Figura 3 pannelli a, c, e, f) e significative per i parametri HGB e MCV ($p < 0,05$) (Figura 3, pannelli b, d) tra campioni eseguiti in impedenziometria e dopo termostatazione. Le differenze tra i parametri eritrocitari ottenuti dopo termostatazione dei campioni e quelli ricalcolati dall'algoritmo risultano molto significative per l'MCHC ($p < 0,0001$) (Figura 3 f) e significative per l'MCH ($p < 0,05$) (Figura 3 e); nessuna differenza per RBC, HCT, HCT e MCV (Figura 3 a, b, c, d).

DISCUSSIONE

L'aumento del parametro MCHC è un evento raro nella pratica della routine giornaliera, ma come per altri parametri eritrocitari dell'emocromo (14), i risultati spuri devono essere correttamente gestiti (16). Un ausilio importante è rappresentato dalla comparsa di allarmi strumentali, in seguito al superamento di

soglie predeterminate, che possono indurre il sospetto sia di scarsa accuratezza del dato prodotto dai contaglobuli che della presenza di uno stato patologico. Nel caso dell'aumento dell'MCHC, possono presentarsi allarmi di possibili interferenze nella misura dell'HGB "Turbidity/HBC interference?", di probabile presenza di frammenti eritrocitari "Fragments" o probabile presenza di agglutinine "RBC Agglutination?". Negli strumenti XN di Sysmex, quando il parametro MCHC è > 365 g/L, viene eseguito il test riflesso per i reticolociti con attivazione dell'algoritmo CBC-O (6).

Considerando la popolazione analizzata nel periodo dello studio, si osserva che il numero più alto di campioni sono stati classificati dall'algoritmo nel gruppo 1-2 ($n=70$, $n=10$) e nel gruppo 5 ($n=137$), indicando che nella pratica quotidiana gli aumenti di MCHC sono causati più frequentemente dalla probabile presenza di agglutinine (evenienza oggetto di particolare attenzione in questo lavoro) o in situazioni non perfettamente comprensibili con profilo normale di RBC. Appartengono a quest'ultimo gruppo, pazienti con MCHC lievemente e transitoriamente aumentato [media (DS), 372,5 g/L (0,55)], a causa sia della variabilità pre-analitica (ritardi nell'esecuzione e impatto termico durante la conservazione e il trasporto) (22,23) che di quella pre-analitica e biologica di pazienti con iponatriemia o che potevano aver assunto droghe e/o sottoposti a terapia immunosoppressive, chemioterapiche o antivirali (17).

Rientrano nel gruppo, con profilo RBC normale, anche campioni pediatrici con lieve emolisi *in vitro* con assenza di anomalie del CBC, dei parametri di chimica clinica, della morfologia eritrocitaria e con RBC score normale (24). La presenza di agglutinine (gruppo 1 e 2) interferisce diminuendo il valore dei parametri RBC ed HCT ed aumentando gli indici di Wintrobe (MCV, MCH e MCHC), per cui viene raccomandata, dall'algoritmo, la refertazione del parametro RBC-O e del volume eritrocitario più frequente (R-MFV). Come si può notare dalla Tabella 1, la media e la mediana del parametro MCHC dei campioni con agglutinine a freddo (gruppi 1 e 2) sono molto più alte rispetto agli altri gruppi e infatti il Δ RBC è diverso in modo altamente significativo ($p=0,0001$) tra i campioni con agglutinine a freddo (gruppi 1 e 2) e gli altri gruppi (Figura 2 a) in accordo con quanto riportato anche da Berda-Haddad et al. (6). La classificazione dei campioni nel gruppo 2 è importante per indurre il sospetto di AEA da autoanticorpi, che provoca emolisi eritrocitaria (21). L'AEA può essere causata da anticorpi caldi, da anticorpi freddi e da anticorpi misti. Quella da anticorpi caldi è caratterizzata dal legame delle immunoglobuline policlonali (spesso IgG) agli antigeni RBC (proteine Rh o glicoforine A-D) alla temperatura di 37°C. La concentrazione di questi antigeni eritrocitari di solito non è abbastanza elevata da fissare il complemento, ma in alcuni casi anche il complemento si lega ai globuli rossi, che opsonizzati, saranno eliminati dai recettori Fc γ RIII o C3b sui macrofagi provocandone una distruzione extravascolare. La malattia da agglutinine fredde è causata, invece, da un anticorpo IgM clonale o oligoclonale, che si lega agli antigeni RBC (di solito polimeri a catena ramificata di amminilattosio disaccaridi) dalle deboli forze di van der Waals alle temperature ottimali di 0-5°C (21). Il legame del complemento si verifica nella maggior parte dei pazienti a causa della struttura delle IgM e dell'elevata densità di antigeni sui globuli rossi, portando all'aggregazione eritrocitaria (visibile allo striscio di sangue periferico e manifestata da acrocianosi clinica) e all'attivazione del complemento (25). L'attivazione del complemento può essere completa provocando emolisi intravascolare degli eritrociti o può essere incompleta con eliminazione dei globuli rossi da parte dei macrofagi nei siti extravascolari (21,26). Nel sospetto di AEA, anche l'aumento della lattato deidrogenasi (LDH) e la diminuzione dell'aptoglobina oltre alla valutazione della morfologia degli eritrociti allo striscio di sangue periferico devono essere considerati. In questi campioni, per poter refertare accuratamente il valore dell'emoglobina (se HGB-O o HGB), è necessario indicare all'algoritmo, rispettivamente, se si tratta di plasma con emolisi visibile o limpido (6). Le interferenze sull'HGB possono riguardare non solo l'emolisi, ma anche la bilirubinemia e la lipemia (22). Nei gruppi 2 e 3, le interferenze preanalitiche di emolisi, ittero e lipemia *in vitro* alterano la misura dell'HGB sovrastimandola, così che il calcolo delle medie e delle mediane del Δ HGB restituisce valori negativi raccomandando la refertazione del parametro HGB-O. Come sottolineato da Berda-Haddad et al. (6), in caso di emolisi è importante prestare particolare attenzione in quanto è noto che alcuni problemi pre-analitici (ritardo,

trasporto, temperatura) possono portare alla distruzione degli eritrociti fornendo una sottostima dell'HGB-O (6,16,17). In caso di emolisi *in vitro* quindi, è necessario richiedere un altro campione idoneo per l'analisi (15). Rispetto al gruppo 3 che individua campioni con interferenza preanalitica di emolisi *in vitro*, il gruppo 4 comprende pazienti il cui aumento dell'MCHC può essere dovuto a patologie eritrocitarie e/o emolisi *in vivo* con RBC score aumentato. Utilizzando il valore soglia dell'RBC score di 0,127 (6) alla sensibilità e specificità di 94,4% e 94,5% rispettivamente (27), sono stati individuati pazienti (con conta dei reticolociti e della FRC% elevate) con anemia emolitica. Si è potuto così procedere alla esecuzione dello striscio periferico rilevando la presenza di schistociti, anisopoichilocitosi e anisocromia eritrocitaria, confermando il dato con la misura di aptoglobina e LDH, oltre alla valutazione clinica del paziente. La valutazione della morfologia eritrocitaria allo striscio di sangue periferico e della torbidità del plasma è indispensabile quando l'algoritmo classifica un campione con "sospetta emolisi o patologia RBC" e "anomalia visibile del plasma e incremento dello score RBC". Durante una crisi emolitica, il valore dell'HGB può essere sovrastimato a causa dell'HGB libera, ma l'HGB-O può essere sottostimato dalla patologia eritrocitaria nel caso di sferocitosi e anemia falciforme (15). Per cui, si potrà refertare l'HGB-O se il plasma è torbido, l'HGB ed il valore aumentato di MCHC se il plasma è limpido (6).

Le proprietà ottiche degli eritrociti dipendono dalla dimensione, dalla forma e dal contenuto di HGB, quindi in presenza di un'importante eterogeneità del volume o del contenuto di HGB degli eritrociti osservati nell'anemia falciforme, il valore di HGB-O è errato e dovrà essere riportata la misura fotometrica dell'HGB sempreché il plasma non sia emolizzato (28). Nelle patologie eritrocitarie, il difetto intrinseco della membrana dei globuli rossi nella sferocitosi ereditaria, la polimerizzazione dell'HGB-S nell'anemia falciforme e le alterazioni ossidative inducono modifiche della permeabilità della membrana eritrocitaria, portando a disidratazione intracellulare (a causa di perdita di K⁺ e acqua) e alla caratteristica morfologia di eritrociti o sferociti densi osservati allo striscio di sangue periferico (29). Spesso, le alterazioni della membrana, in tali patologie inducono il rilascio di microparticelle con ridotto rapporto superficie/volume di RBC, aumento di MCHC (30) e distribuzione anomala degli eritrociti all'analizzatore ematologico (31). In caso di comprovata malattia dei globuli rossi e in assenza di interferenza ottica, l'MCHC elevato è reale e dovrà essere riportato con il valore di HGB misurato in fotometria. L'utilizzo dell'algoritmo CBC-O, soprattutto in presenza di agglutinine fredde, permette di ottenere risultati reali degli indici eritrocitari in breve tempo senza riscaldamento del campione, riducendo il ritardo di refertazione dell'emocromo, in particolare, in situazioni di emergenza. Anche in caso di torbidità del plasma per interferenze preanalitiche, il valore di HGB-O, ottenuto dall'attivazione del canale XN-RET, evita la sostituzione manuale del plasma con il diluente e la successiva rilettura dell'emocromo, riducendo i tempi di refertazione e i rischi per gli operatori legati alla manipolazione del

campione con stappatura della provetta e sostituzione del plasma.

CONCLUSIONI

Nella pratica quotidiana, a fronte di un MCHC elevato, è necessario capire la causa dell'incremento, sia per poter effettuare le azioni correttive in caso di risultati spuri e refertare in modo coerente gli indici eritrocitari riportando tal quale il parametro aumentato in caso di patologia eritrocitaria. In ogni caso il referto del CBC deve essere sempre completo di commenti come consigliato dal Gruppo di Studio Diagnostica Ematologica Integrata di SIBioC (32). L'algoritmo CBC-O, in caso di incremento di MCHC, soprattutto in presenza di agglutinine e/o interferenza preanalitica, mediante utilizzo del canale XN-RET, può essere uno strumento da implementare nella routine quotidiana durante l'esame di campioni ematologici, in quanto permette in tempi rapidi di valutare la causa dell'incremento e di refertare correttamente gli indici eritrocitari senza necessità di trattare i campioni. Questo aspetto è particolarmente importante, quando devono essere rispettate le tempistiche di refertazione (Turn Around Time) per campioni urgenti, garantendo la qualità dei risultati ottenuti, in base ai quali devono essere intraprese decisioni cliniche. Inoltre, per mezzo della valutazione del nomogramma con cui viene calcolato l'RBC score, si consente una più rapida ed immediata individuazione dei campioni che potrebbero necessitare di approfondimento (valutazione della morfologia eritrocitaria allo striscio di sangue periferico) per probabile presenza di anemia emolitica e/o patologie eritrocitarie.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Worku M, Aynalem M, Biset S, Woldu B, Adane T, Tigabu A. Role of complete blood cell count parameters in the diagnosis of neonatal sepsis. *BMC Pediatr* 2022;22:411.
2. Tefferi A, Hanson CA, Inwards DJ. How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults. *Mayo Clin Proc* 2005;80:923-36.
3. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol* 2016;38 Suppl1:S123-32.
4. Yavorkovsky LL. Mean corpuscular volume, hematocrit and polycythemia. *Hematology* 2021;26:881-4.
5. Wintrobe MM. Anemia classification and treatment on the basis of differences in the average volume and hemoglobin content in the red corpuscles. *Arch Intern Med* 1934;54:256-80.
6. Berda-Haddad Y, Faure C, Boubaya M, Arpin M, Cointe S, Frankel D et al. Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? *Int J Lab Hematol* 2017;39:32-41.
7. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol* 2007;29:21-41.
8. La Gioia A. Effects of cold agglutinins on the automated complete blood count accuracy. *Scand J Clin Lab Invest* 2022;82:69-70.
9. De Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionato M, Bittencourt JIM, Krum EA et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal* 2018 Jun;32:e22396.
10. Zeng SG, Zeng TT, Jiang H, Wang LL, Tang SQ, Sun YM et al. A simple, fast correction method of triglyceride interference in blood hemoglobin automated measurement. *J Clin Lab Anal* 2013;27:341-5.
11. Gulati G, Song J, Florea AD, Gong J. Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. *Ann Lab Med* 2013;33:1-7.
12. Nivaggioni V, Bouriche L, Coito S, Le Floch AS, Ibrahim-Kosta M, Leonnet C et al. Use of Sysmex XN-10 red blood cell parameters for screening of hereditary red blood cell diseases and iron deficiency anaemia. *Int J Lab Hematol* 2020;42:697-704.
13. Finland M, Peterson OL, Allen HE, Samper BA, Barnes MW, Stone MB. Cold agglutinins. I. Occurrence of cold isohemagglutinins in various conditions. *J Clin Invest* 1945;24:451-7.
14. Gulati G, Uppal G, Gong J. Unreliable automated complete blood count results: causes, recognition, and resolution. *Ann Lab Med* 2022;42:515-30.
15. Henry S, Gérard D, Salignac S, Perrin J. Optimizing the management of analytical interferences affecting red blood cells on XN-10 (Sysmex®). *Int J Lab Hematol* 2022;44:1068-77.
16. Godon A, Genevieve F, Marteau-Tessier A, Zandecki M. Automated hematology analysers and spurious counts part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes. *Ann Biol Clin* 2012;70:155-68.
17. La Gioia A, Fumi M, Fiorini F, Pezzati P, Balboni F, Bombara M et al. Short preheating at 41°C leads to a red blood cells count comparable to that in RET channel of sysmex analysers in samples showing cold agglutination. *J Clin Pathol* 2018;71:729-34.
18. Vidali M, Carobene A, Apassiti Esposito S, Napolitano G, Caracciolo A, Seghezzi M et al. Standardization and harmonization in hematology: instrument alignment, quality control materials, and commutability issue. *Int J Lab Hematol* 2021;43:364-71.
19. Napolitano G, Caracciolo A, Apassiti Esposito S, Guerra G, Buoro S. Valutazione delle prestazioni analitiche dei conteggi cellulari in automazione su liquidi biologici mediante un programma di controllo di qualità dedicato. *Biochi Clin* 2020;44:28-35.
20. Declaration of Helsinki – WMA – The World Medical Association. <https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/> (ultimo accesso: ottobre 2023).
21. Jäger U, Barcellini W, Broome CM, Gertz MA, Hill A, Hill QA et al. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: recommendations from the First International Consensus Meeting. *Blood Rev* 2020;41:100648.
22. Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt YM, Topfer G, Wisser H et al. The haemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J Lab Med* 2000;24:357-64.

23. Lippi G, Pavesi F, Avanzini P, Chetta F, Aloe R, Pipitone S. Development of simple equations for effective screening of spurious hemolysis in whole-blood specimens. *Int J Lab Hematol* 2015;37:253-8.
24. Kaila R, Hendrickson M, Avendano P, Davey C, Cullen R, Colbenson G et al. Hyperkalemia in a hemolyzed sample in pediatric patients: repeat or do not repeat? *Pediatr Emerg Care* 2023;39:e1-e5.
25. Jaffe CJ, Atkinson JP, Frank MM. The role of complement in the clearance of cold agglutinin-sensitized erythrocytes in man. *J Clin Invest* 1976;58:942-9.
26. Berentsen S, Hill A, Hill QA, Tvedt THA, Michel M. Novel insights into the treatment of complement-mediated hemolytic anemias. *Ther Adv Hematol* 2019;10:2040620719873321.
27. Maier-Redelsperger M, Lévy P, Lionnet F, Stankovic K, Haymann J-P, Lefèvre G et al. Strong association between a new marker of hemolysis and glomerulopathy in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis* 2010;45:289-92.
28. Friebel M, Helfmann J, Meinke MC. Influence of osmolarity on the optical properties of human erythrocytes. *J Biomed Optics* 2010;15:055005.
29. Schwartz RS, Musto S, Fabry ME, Nagel RL. Two distinct pathways mediate the formation of intermediate density cells and hyperdense cells from normal density sickle red blood cells. *Blood* 1998;92:4844-55.
30. Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, Da Costa L, Schillinger F, Bailly N et al. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. *Ann Hematol* 2011;90:759-68.
31. Conway AM, Vora AJ, Hinchliffe RF. The clinical relevance of an isolated increase in the number of circulating hyperchromic red blood cells. *J Clin Pathol* 2002;55:841-4.
32. La Gioia A, Balboni F, Buoro S, Fanelli A, Gioia M, Marini A. I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio. *Biochi Clin* 2016;40:255-69.