

VALUTAZIONE DEL SISTEMA EMATOLOGICO SYSMEX XE-2100 NELL'ANALISI DEI LEUCOCITI NEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO

Crippa A., Radice E., Ottomano C., Piazzalunga N., Parimbelli M.
 Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti di Bergamo

SCOPO DEL LAVORO

Il conteggio cellulare nel Liquido Cefalo Rachidiano (LCR) è ancora oggi effettuato a microscopio con metodo manuale che, oltre a impegnare notevoli risorse di tempo, ha limiti di imprecisione, variabilità tra gli operatori, scarsa standardizzazione. La bassa cellularità, la morfologia dei leucociti e i ridotti volume di campione del LCR ne hanno sempre limitato l'automazione su analizzatori di ematologia. Scopo del nostro studio è stata la valutazione del sistema ematologico Sysmex XE-2100 con nuovo software XE-Pro 00-23, nel conteggio e nella differenziazione dei leucociti nel LCR. XE-2100 analizza i leucociti in due canali di lettura, WBC-Baso e WBC-Diff, con metodo laser in fluorescenza. Il nuovo software di XE-2100 consente l'analisi leucocitaria anche su campioni con meno di 10 WBC/ μ l, ideale per questo tipo di applicazione.

MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 99 campioni di LCR, prelevati con puntura lombare, giunti al nostro laboratorio nel periodo compreso tra Marzo e Giugno 2004. I campioni sono stati analizzati al microscopio in camera di Nageotte dopo diluizione 1:2 con liquido di Türk (procedura analitica attuale) e su Sysmex XE-2100, con analisi da provetta aperta senza nessun pretrattamento o diluizione dei campioni. La cellularità dei 99 campioni analizzati è riportata in Tabella 1. I dati sono stati elaborati con software Analyse-it versione 1.71, modulo "General & Clinical laboratory".

Tabella 1: Cellularità dei campioni analizzati

	< 5 WBC/ μ l	da 5 a 50 WBC/ μ l	> 50 WBC/ μ l
Nr. Campioni (% sul totale)	61 (61,6%)	28 (28,3%)	10 (10,1%)

RISULTATI

CONTEGGIO LEUCOCITARIO

Il conteggio leucocitario a microscopio dei 99 campioni di LCR è stato correlato rispetto al conteggio dei due canali di lettura di Sysmex XE-2100, WBC-Diff e WBC-Baso. La regressione Passing-Bablok evidenzia ottima correlazione per il conteggio WBC-Diff (Fig. 1). Anche il conteggio WBC-Baso è ben correlato (Fig. 2) ma è più disperso e sovrastimato per conteggi a microscopio inferiori a 20 WBC/ μ l, come si evidenzia dal grafico di distribuzione dei valori in Fig. 3

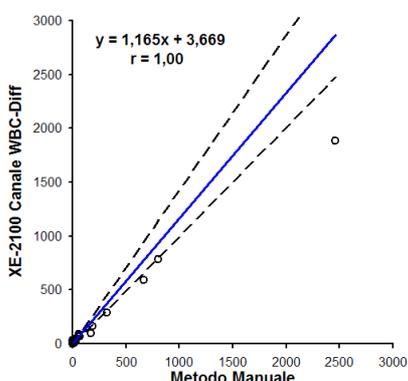


Fig. 1: Regressione Passing-Bablok WBC-Diff

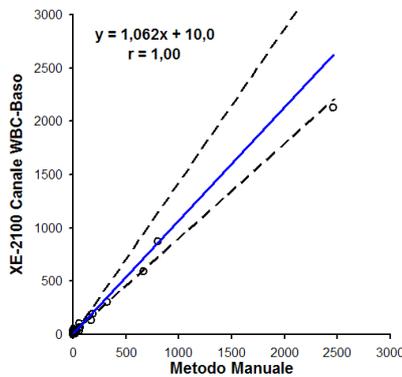


Fig. 2: Regressione Passing-Bablok WBC-Baso

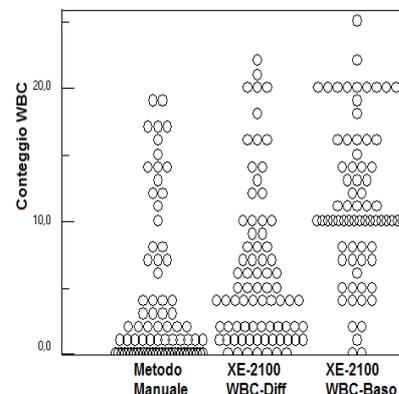


Fig. 3: Distribuzione valori per WBC < 20/ μ l

ACCURATEZZA DIAGNOSTICA

Lo studio delle curve ROC dimostra che, utilizzando come cut-off di positività un valore di 5 WBC/ μ l per il conteggio a microscopio e di 7 WBC/ μ l per XE-2100, si ottengono le performance diagnostiche indicate in Tabella 2. Il conteggio WBC-Diff di XE-2100 fornisce uno screening molto efficace dei campioni senza nessun Falso Negativo (Sensibilità Diagnostica SE=100%, Efficienza=91,8%). Il canale WBC-Baso, causa la sovrastima di conteggio sui campioni con bassa cellularità, ha valori di Specificità Diagnostica non soddisfacenti (SP=33,3%).

Tabella 2: Performance Diagnostiche XE-2100

	SE	SP	VPN	VPP	EFF
WBC-Diff XE-2100	100%	87,5%	100%	80,6%	91,8%
WBC-Baso XE-2100	100%	33,3%	100%	43,9%	56,2%

SE = Sensibilità SP = Specificità VPN = Valore Predittivo Negativo
 VPP = Valore Predittivo Positivo EFF = Efficienza

FORMULA LEUCOCITARIA

Su 32 campioni di LCR con cellularità superiore a 10 WBC/μl è stata valutata la differenziazione a microscopio in Mononucleati (MONO%) e Granulociti (GRAN%) rispetto alla somma di Linfo+Mono (MONO%) e Neutr+Eos+Baso (GRAN%) di XE-2100. La regressione Passing-Bablok evidenzia un'eccellente correlazione sia per i MONO % (Fig. 4) che per i GRAN % (Fig. 5). La concordanza tra XE-2100 e microscopio è stata valutata anche con metodo di Bland-Altman. La differenza media tra i due metodi è di +1.44 per MONO% (95% Int. Conf. da -2,36 a 5,24) e di -1.50 per GRAN% (95% Int. Conf. da -5,30 a 2,30).

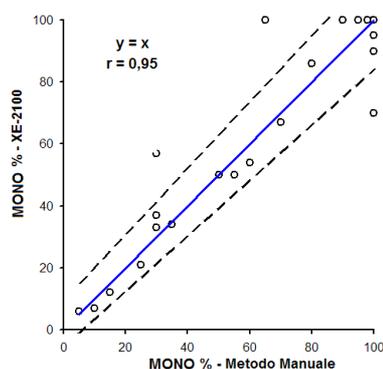


Fig.4: Regressione Passing-Bablok MONO %

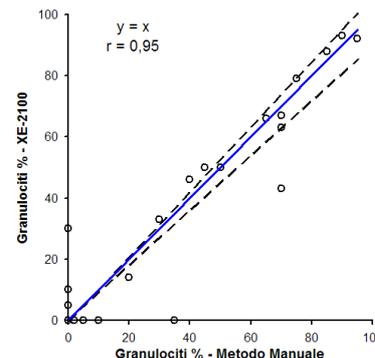


Fig. 5: Regressione Passing-Bablok GRAN %

IMPRECISIONE:

Valutata su 10 replicati di 4 campioni con cellularità da 4 a 580 WBC/μl (Tabella 3). Considerata l'imprecisione del metodo manuale e la variabilità tra gli operatori (con C.V. stimati del 45%⁽¹⁾ e oltre per WBC < 5/μl⁽²⁾) il conteggio WBC-Diff di XE-2100 garantisce un miglioramento delle prestazioni.

Tabella 3: Imprecisione Conteggio WBC

	C.V.% WBC-Diff	C.V.% WBC-Baso
4 WBC/μL	37,16	39,51
30 WBC/μL	17,02	20,27
75 WBC/μL	13,90	17,87
580 WBC/μL	4,26	3,61

LINEARITÀ

Valutata su 8 diluizioni seriali in fisiologica di due campioni con cellularità da 1.110 a 9 WBC /μL (1° campione, costituito al 99% da Linfociti) e da 1.490 a 6 WBC/μL (2° campione, costituito al 95% da Neutrofili). I dati di regressione, in Tabella 4, evidenziano le buone prestazioni del conteggio WBC-Diff

Tabella 4: Linearità

	WBC-Diff XE-2100	WBC-Baso XE-2100
LINFOCITI	r ² = 0,997 ; y=1,018x + 3,467	r ² = 0,992 ; y=1,027x + 13,291
NEUTROFLI	r ² = 0,999 ; y=0,997x - 4,258	r ² = 0,997 ; y=0,980x - 7,321

SENSIBILITÀ ANALITICA

Valutata su 10 replicati di un campione privo di cellule e 10 replicati di un campione con bassa cellularità (< 5 WBC/μl). La sensibilità analitica del conteggio leucocitario di XE-2100, calcolata con metodo di Büttner et al.⁽³⁾ è risultata di 2 WBC/μl per il canale WBC-Diff e di 9 WBC/μl per il canale WBC-Baso.

CITOGRAMMI FORMULA LEUCOCITARIA

La valutazione dei citogrammi del canale WBC-Diff (Fig. 6, 7, 8) aggiunge preziose informazioni sulla morfologia cellulare del LCR e consente l'approfondimento a microscopio in caso di anomala distribuzione per la presenza di cellule patologiche, sospetto di cellule degenerate o interferenze da rumore di fondo.



Fig. 6: Linfociti normali (nel riquadro)

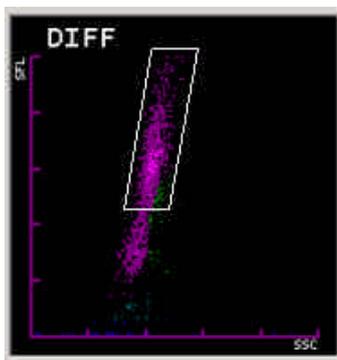


Fig 7: 30% Linfociti + 70% Blasti (nel riquadro)

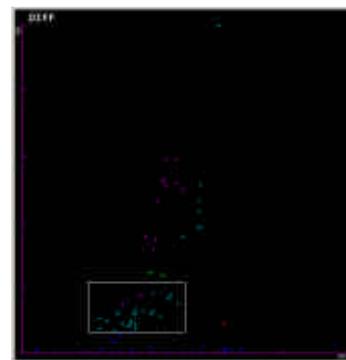


Fig. 8: Cellule degenerate (nel riquadro)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I nostri risultati dimostrano la praticabilità di impiego del canale di lettura WBC-Diff di XE-2100 nell'analisi del LCR, con conteggi e differenziazione leucocitaria ben correlati all'analisi microscopica, buone performance analitiche e diagnostiche e tutti i vantaggi dell'automazione: standardizzazione, riproducibilità, velocità di analisi, nessuna preparazione del campione. Altrettanto vantaggioso è il ridotto volume di campione richiesto per l'analisi (120 μl), considerate le ridotte quantità di campione che giungono in laboratorio. Causa la bassa cellularità del LCR è necessario precedere l'analisi con una o due "aspirazioni a vuoto" per azzerare il conteggio iniziale dello strumento. La valutazione dei citogrammi di formula leucocitaria fornisce un insostituibile contributo per l'approfondimento a microscopio nei casi di anomala distribuzione, per la sospetta presenza di cellule patologiche, degenerate o interferenze da rumore di fondo

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Henry JB: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 19th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996
- S. Mahieu, F. Vertessen, M. Van Der Planken: Evaluation of Advia 120 CSF assay vs chamber counting of cerebrospinal fluid specimens – Clinical Laboratory Haematology, 2004, 26
- Büttner J, Borth R, et al.: 1980b Assessment of analytical methods for routine use. J Clin Chem Clin Biochem 18:78