

GUIDA ALLA SCELTA DI UNO STRUMENTO PER L'EMATOLOGIA VETERINARIA: PROPOSTA DI UN PIANO DI CONTROLLO DI QUALITÀ E DI UN PROGRAMMA DI VALIDAZIONE

A. PASQUINI¹, A. GAVAZZA², G. LUBAS³, B. GUGLIUCCI⁴

¹Borsista "SEAC"

²Dottoranda in "Patologia Ambientale Veterinaria"

³Professore Associato di "Ematologia ed Immunologia Clinica Veterinaria"

⁴Ricercatore confermato "Gruppo V33B Clinica Medica Veterinaria"

Istituto di Patologia Speciale e Clinica Medica Veterinaria. Università degli Studi di Pisa. Direttore: Prof. A. Romagnoli

Riassunto

Il crescente interesse nei confronti dell'ematologia da parte dei medici veterinari che si dedicano agli animali d'affezione (cane, gatto e cavallo) ha di pari passo creato la necessità di approfondire le tematiche relative al controllo di qualità ed alla validazione dei contaglobuli. L'aver strumenti sempre in perfetta efficienza, tarati e validati per le specie con cui si opera permette di compiere analisi affidabili. In questa nota sono descritti i vari parametri ematologici che è possibile ottenere con i contaglobuli a impedenza elettrica e sono riportati un piano di controllo di qualità e un programma di validazione applicato ad un contaglobuli a cinque parametri appositamente studiato per l'ematologia veterinaria.

Summary

The increasing interest toward hematology from the practitioners involved in pets and horses has concurrently induced the needs to deep the topics connected to a quality control plan and cell counter validation. Having instruments always in perfect efficiency, well calibrated and validated for different animal species allows to carry out accurate results. In this paper the various hematological parameters that are possible to obtain from an electric impedance cell counter are described. Moreover a quality control plan and a validation procedure applied to a five parameters cell counter used in veterinary hematology are reported.

INTRODUZIONE

L'approccio dei medici veterinari all'ematologia ha subito negli ultimi anni notevoli cambiamenti; si è assistito infatti ad un sempre maggiore interesse per i vari aspetti ad essa connessi ed in particolare per le problematiche relative alla scelta ed all'affidabilità dei contaglobuli in veterinaria e per la realizzazione di un piano di controllo di qualità affidabile e duraturo nel tempo.

I contaglobuli elettronici sono strumenti capaci di fornire una conta rapida, precisa e ripetibile degli elementi corpuscolati del sangue, garantendo notevoli risparmi di tempo e di personale, oltre che una maggiore attendibilità nei risultati. Dal momento della loro introduzione in laboratorio hanno infatti portato dei cambiamenti radicali nell'esecuzione dell'emogramma, tanto che nelle determina-

zioni quantitative, hanno completamente sostituito le tecniche manuali.

Le aziende che si dedicano alla produzione dei contaglobuli elettronici offrono numerosi modelli con capacità di lavoro diverse e la vasta gamma di strumenti presenti sul mercato ne ha favorito l'introduzione anche nei laboratori più piccoli; d'altro canto, orientarsi nella scelta di uno strumento diventa tutt'altro che semplice, specialmente per coloro che, per la prima volta, si avvicinano all'ematologia automatizzata.

Ogni strumento, prima di essere immesso sul mercato, dovrebbe aver subito una serie di esami atti a valutarne l'accuratezza, la precisione, la specificità, la sensibilità, la linearità ed il cosiddetto "effetto trascinarsi" o carry over. Le aziende produttrici di strumentazioni elettroniche per l'ematologia veterinaria dovrebbero fornire, insieme al

proprio apparecchio ed ai reagenti, anche una documentazione comprovante l'esecuzione di queste prove, oltre che con sangue di controllo umano anche con quello delle varie specie animali per cui lo strumento è stato progettato, da parte di personale specializzato. Questi test, che peraltro possono essere eseguiti anche dal medico veterinario prima di acquistare un qualsiasi apparecchio, soprattutto se non provvisto della specifica documentazione, permettono di valutare lo strumento con i relativi reagenti.

TIPI DI CONTAGLOBULI

I contaglobuli o contaparticelle elettronici sono strumenti in grado di fornire la conta delle tre popolazioni cellulari ematiche (eritrociti, leucociti e piastrine), misurarne direttamente il volume, quantificare la presenza di emoglobina e quindi calcolare, sulla base delle misurazioni effettuate, gli indici eritrocitari e piastrinici. È poi possibile, con alcuni sistemi elettronici, avere una conta leucocitaria differenziale automatizzata, tanto più accurata e precisa quanto più sofisticate sono le tecniche utilizzate dallo strumento.

I contaglobuli elettronici basano il loro funzionamento su tre diversi principi: l'impedenza elettrica, il principio ottico della diffusione/rifrazione luminosa e la conduttività elettromagnetica. Vi sono contaglobuli che si basano su un unico principio, altri che ne sfruttano contemporaneamente due o più, ma tutti affiancano anche altre tecniche come la presenza di fotometri, citometri e/o l'impiego di particolari reagenti^{1,14,16,18}.

I contaglobuli basati sul principio dell'impedenza elettrica analizzano le cellule ematiche diluite in un mezzo elettrolita, che defluiscono per aspirazione in un capillare attraverso un piccolo orifizio ai lati del quale sono posti due elettrodi, tra i quali viene applicata una corrente continua. La preparazione del sangue, per la conta degli eritrociti, prevede in genere la diluizione 1/50.000 in soluzione fisiologica tamponata, che costituisce un mezzo elettrolita con una determinata conduttività. Per la conta dei leucociti è necessaria in genere una diluizione di 1/500 e l'aggiunta di un mezzo lisante i globuli rossi. Dal momento che le cellule sono rivestite da una membrana dotata di un'elevata resistività, ogni particella si comporta come uno scadente conduttore ed il suo passaggio attraverso l'orifizio causa una momentanea variazione della resistenza elettrica, generando una variazione di voltaggio. Questa viene registrata come un impulso di brevissima durata, corrispondente al tempo che la particella impiega ad attraversare il foro. Il numero di impulsi, opportunamente corretto in base sia alla diluizione effettuata, che al fenomeno della coincidenza (nel caso due cellule possano attraversare contemporaneamente il foro), fornisce la conta cellulare. L'ampiezza di cambiamento della corrente è proporzionale al volume della soluzione spostata, ovvero al volume della cellula, che può così essere direttamente misurato. Gli eritrociti degli animali domestici sono più piccoli di quelli umani e, solitamente, i contaglobuli tarati per il sangue umano non riescono a contare con precisione i globuli rossi delle specie che hanno un MCV inferiore a 55 fL. Anche i campioni prelevati dal cane, che ha gli eritrociti più vicini, per dimensio-

ni (MCV 60-75 fL), a quelli dell'uomo, se analizzati da un apparecchio tarato per il sangue umano possono risultare falsamente anemici o microcitici. I contaglobuli destinati all'uso in veterinaria dovrebbero perciò essere forniti di un discriminatore di impulsi, che permette di selezionare il volume minimo e massimo delle cellule da contare, in modo da adattarsi alle notevoli variazioni di volume esistenti tra le linee cellulari ematiche e le diverse specie. Tale discriminatore è necessario sia per eliminare dalla conta eventuali detriti cellulari o la polvere, che per limitare il conteggio di fondo, ad esempio causato da correnti non opportunamente trasportate a terra^{10,14,16}.

Nei contaglobuli il dosaggio dell'emoglobina si basa sul principio della misurazione della cianometemoglobina, un composto stabile che può essere quantitativamente determinato grazie alla presenza di un fotometro con filtro a 546 nm. Inoltre si possono distinguere sistemi semiautomatici, in cui è necessario affiancare un diluatore per preparare i campioni prima dell'analisi, da quelli automatici, in cui il campione viene automaticamente diluito e preparato con l'aggiunta del lisante dalla macchina immediatamente prima della lettura^{10,14,16,18}.

Gli strumenti che usano un sistema ottico si basano su una cellula fotoelettrica che esamina un fascio di luce laser che viene rifratta, diffratta o diffusa dalle cellule che passano attraverso una piccola area illuminata. Tale raggio laser così modificato viene captato da un rivelatore che genera impulsi elettrici di ampiezza proporzionale alla dimensione della particella. In questo modo, le cellule possono essere contate e misurate. Il numero delle interruzioni del fascio di luce, coincide con il numero delle cellule che lo attraversa mentre le modificazioni che il raggio luminoso subisce possono essere analizzate, anche da più angoli, ricevendo così informazioni sulle dimensioni e complessità interne della cellula in esame^{1,4,5,14,16,17,18}.

Infine un terzo principio, utilizzato da alcuni strumenti impiegati prevalentemente in medicina umana per poter fornire conteggi differenziali particolarmente accurati, sfrutta l'energia elettromagnetica ad alta frequenza per valutare la densità ed il volume dei nuclei. Si misura, in sostanza, la conduttività delle cellule che, in base alle caratteristiche del nucleo, ai costituenti dei granuli ed alla composizione chimica provocano, quando vengono attraversate dalle onde elettromagnetiche, dei cambiamenti di corrente opportunamente rilevabili^{1,4,5,14,18,19,20}.

La conta cellulare è comunemente eseguita con strumenti che utilizzano il principio dell'impedenza elettrica, mentre l'analisi della morfologia globulare è realizzata con sistemi ottici ed elettromagnetici.

In medicina veterinaria esistono relativamente pochi strumenti sul mercato che siano stati appropriatamente validati per l'analisi della morfologia cellulare. L'elevato rapporto costo/beneficio di questi strumenti, al momento, giustifica la modesta diffusione in ambito veterinario. Una accurata descrizione e valutazione di questi strumenti esula comunque dagli scopi di questa nota^{5,6,11,20}.

Gli strumenti a impedenza elettrica invece hanno incontrato il favore del mercato veterinario, soprattutto dei medi e piccoli laboratori, offrendo ottimi livelli di precisione e accuratezza dei conteggi cellulari, oltre a facilità e rapidità di esecuzione delle analisi ad un costo piuttosto contenuto.

PARAMETRI EMATOLOGICI

I contaglobuli ad impedenza elettrica possono fornire da un minimo di 5 parametri ematologici fino a 18, comprensivi talora per alcune specie (ad es. cavallo) di screening leucocitario con valori assoluti e in percentuale di linfociti, cellule mediane e granulociti. Le determinazioni ematologiche possibili sono^{7,8,9,11,12,18,21,22}:

RBC (Red Blood Cells): gli eritrociti sono contati nel sangue con anticoagulante, diluito e sospeso in soluzione fisiologica tamponata, che contiene anche leucociti e piastrine. I leucociti sono perciò contati con gli eritrociti, ma il numero di questi ultimi generalmente eccede sui globuli bianchi con un fattore di 500 o più, e quindi l'errore che si ripercuote sulla conta risulta normalmente trascurabile, anche se è tanto più grande quanti più sono i leucociti in circolo. Le piastrine sono elementi di volume ridotto rispetto agli eritrociti e l'impostazione di una soglia minima di volume cellulare impedisce che nella conta possano esserci interferenze, ad eccezione di quelle specie ove gli eritrociti hanno dimensioni più piccole e le piastrine risultano proporzionalmente più grandi (ad es. gatto, capra e pecora).

Hgb (Hemoglobin): il dosaggio dell'emoglobina viene effettuato secondo il principio della cianometemoglobina, grazie alla presenza di un fotometro con filtro a 546 nm.

MCV (Mean Corpuscular Volume): indica il volume medio degli eritrociti e può essere calcolato moltiplicando il PCV (misura della colonna di RBC ottenuta per centrifugazione del campione tramite microcentrifuga) per 10 e dividendo per il numero degli eritrociti in milioni/mcL. Il contaglobuli invece, registra l'ampiezza di ciascun impulso, che è proporzionale al volume cellulare e dividendo la somma dei volumi individuali delle emazie per il loro numero si ottiene un MCV medio.

Hct (Hematocrit): è chiamato anche PCV (Packed Cell Volume), ma nella strumentazione elettronica questo parametro viene calcolato a partire dall'MCV, che viene moltiplicato per il numero di eritrociti contati.

MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration): questo parametro è calcolato moltiplicando il valore dell'Hgb per 100 diviso il valore dell'Hct in %, e dà una stima della concentrazione emoglobinica della massa eritrocitaria circolante.

MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin): si ottiene moltiplicando il valore dell'Hgb per 10 diviso il numero di eritrociti espressi in milioni/mcL, così da avere la concen-

trazione emoglobinica media di un eritrocita.

RDW (Red blood cells Distribution Width): l'ampiezza o larghezza di distribuzione eritrocitaria (RDW) è calcolata come il rapporto tra le deviazioni standard dei volumi eritrocitari e la media dei volumi eritrocitari, ovvero l'MCV. L'RDW esprime cioè il Coefficiente di Variazione dei volumi eritrocitari ed è quindi un parametro che informa circa la presenza di anisocitosi.

Istogramma degli eritrociti: è un grafico che visualizza la distribuzione degli eritrociti in base al loro volume (asse x) e numero (asse y). In un campione standard, la distribuzione assume all'incirca un andamento a campana, intorno a un valore medio (Fig. 1).

Plt (Platelet): normalmente le piastrine sono contate nel sangue intero, con la stessa diluizione degli eritrociti, discriminando i tipi cellulari in base al loro volume. Può essere adoperato anche Plasma Ricco di Piastrine (PRP), ottenuto per sedimentazione o centrifugazione a bassa velocità.

MPV (Mean Platelet Volume): è il volume medio delle piastrine (MPV) ed è determinato in modo simile all'MCV eritrocitario. Ha normalmente un andamento inverso rispetto alla conta. La sua interpretazione è controversa dal momento che i trombociti si alterano per forma e volume con una relativa facilità; ad esempio, durante le prime due ore di contatto del sangue con EDTA, le piastrine aumentano il loro volume dal 15 al 25%.

Pct (Plateletcrit): il piastrinocrito rappresenta la frazione percentuale della massa del sangue intero occupata dalle piastrine. È calcolato, come l'Hct, in base all'MPV, direttamente misurato dallo strumento, moltiplicato per il numero di piastrine contate.

PDW (Platelet Distribution Width): l'ampiezza di distribuzione piastrinica è calcolata come il rapporto tra le deviazioni standard dei volumi piastrinici e la media dei volumi piastrinici, ovvero l'MPV, ed è indicativa del grado di anisocitosi piastrinica. Il PDW ha un significato meno attendibile rispetto all'RDW, dal momento che le piastrine sono più facilmente modificate dalla permanenza a contatto con l'anticoagulante.

Istogramma delle piastrine: l'istogramma delle piastrine riporta sull'asse delle ascisse il volume piastrinico e su quella delle ordinate la quantità di piastrine contate. In questo modo è possibile valutare la situazione morfologica della popolazione piastrinica (Fig. 2).

WBC (White Blood Cells): il conteggio dei leucociti viene effettuato dopo che il campione ha subito una diluizione e che i globuli rossi sono stati lisati, in seguito all'ag-

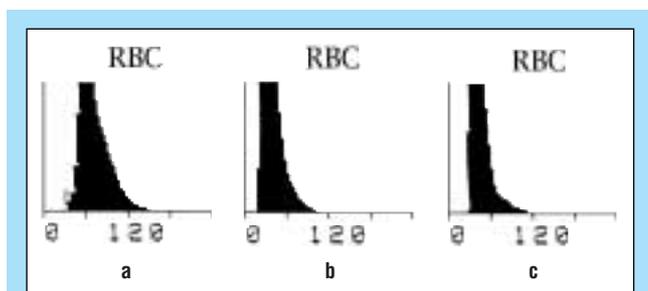


Figura 1 - Istogramma degli eritrociti del cane (a), gatto (b) e cavallo (c).

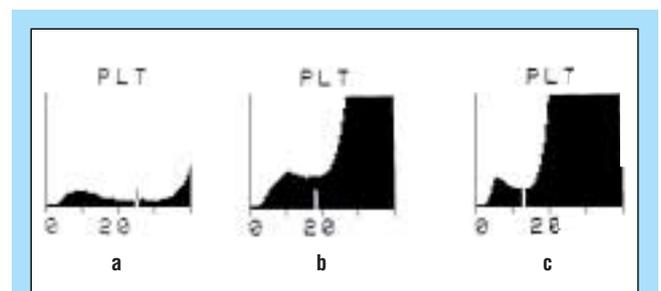


Figura 2 - Istogramma delle piastrine del cane (a), gatto (b) e cavallo (c).

giunta di un agente lisante. Si sottolinea comunque la fondamentale importanza che riveste tuttora la visione al microscopio ottico dello striscio ematico, che rimane l'insostituibile conclusione di una completa analisi ematologica, anche quando si ricorra all'uso delle macchine più moderne e sofisticate.

Istogramma dei leucociti: si distribuiscono in questo grafico tutte le cellule della serie bianca, secondo il volume (asse x) ed il numero (asse y) (Fig. 3). Solo nel cavallo si assiste ad una suddivisione dell'istogramma dei leucociti, per cui la prima parte della curva è ascrivibile ai linfociti che sono gli elementi cellulari con volume più ridotto.

CONTROLLO DI QUALITÀ

È l'insieme delle procedure necessarie per una valutazione continua dell'attendibilità del processo analitico svolto e quindi dei risultati ottenuti all'interno di un laboratorio. Il controllo di qualità viene diviso in esterno ed interno. Il primo serve a garantire una omogeneità di risultati tra i diversi laboratori e viene in genere realizzato attraverso l'invio di campioni a valore noto ai partecipanti. Il secondo viene programmato con cadenza variabile all'interno del laboratorio ed è quello che ogni struttura dovrebbe adottare per ottenere dati analitici di qualità^{1,2,3,13}.

Il **Controllo di qualità interno** si divide, a sua volta, in continuo ed a lungo termine.

Il **Controllo di qualità continuo** in ematologia riguarda i singoli campioni e consiste in:

- confronto diretto tra un campione di controllo a valore noto e il campione da esaminare;
- impiego di un campione a valore noto il cui emogramma è stato eseguito con la stessa strumentazione nella giornata di lavoro precedente;
- determinazione del PCV (Packed Cell Volume) tramite microcentrifuga da confrontare con l'Hct determinato dallo strumento; stima approssimativa della conta dei WBC attraverso l'esame del "buffy coat" del capillare della microcentrifuga;
- verifica della correlazione esistente tra i risultati di ciascun campione (per es. Hgb e MCHC; n° RBC, MCV e Hct);
- verifica dell'assenza di carry-over;
- esecuzione delle analisi entro i limiti di linearità fissati per lo strumento.

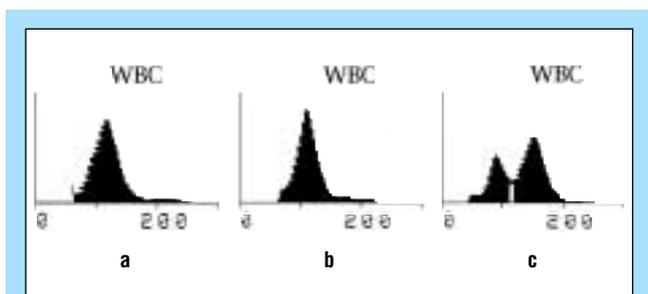


Figura 3 - Istogramma dei leucociti del cane (a), gatto (b) e cavallo (c).

Il **Controllo di qualità a lungo termine** riguarda gruppi di campioni e considera:

- la precisione delle analisi intrasaggio e intersaggio;
- l'accuratezza delle analisi;
- l'andamento dei risultati delle analisi ottenuto calcolando Media (M), Deviazione Standard (DS) e Coefficiente di Variazione (CV) ad intervalli regolari di tempo.

CONVALIDA O VALIDAZIONE DI UNO STRUMENTO IN EMATOLOGIA

Precisione

È la capacità dello strumento di riprodurre in modo costante un certo risultato. Può essere calcolata mediante il CV tra due letture consecutive di uno stesso campione, per più campioni, all'interno della stessa sessione di lavoro oppure leggendo per dieci volte consecutivamente lo stesso campione (Precisione intrasaggio). È possibile calcolare anche la Precisione intersaggio valutando la variabilità riscontrata esaminando lo stesso campione in giorni diversi e consecutivi. Sarebbe opportuno utilizzare oltre a campioni normali anche quelli con concentrazioni di analita più alte e più basse del normale. Il metodo è tanto più preciso quanto più basso è il CV ($DS/M \times 100$) che si ottiene dividendo la Deviazione Standard per la Media e moltiplicando per 100. In ematologia un valore di CV accettabile deve essere al di sotto di 3^{3,15}.

Accuratezza

È la capacità dello strumento di misurare correttamente il vero valore di un parametro nel campione. È ottenuta calcolando il Coefficiente di Regressione (R) tra i valori misurati dallo strumento in esame su un certo campione e quelli di un metodo di riferimento, in genere manuale, denominato standard aureo. Tale metodo di riferimento è spesso troppo complesso per poter essere utilizzato in piccoli ambulatori per cui sarebbe opportuno inviare, per il confronto, il campione in esame presso laboratori che utilizzino a loro volta strumenti validati con metodi standard^{3,15}.

Linearità

È la capacità dello strumento di valutare una serie di campioni che presentano diluizioni seriali progressive per il composto analizzato. Il grado di linearità si valuta tramite il Coefficiente di Regressione (R) che in ematologia deve risultare entro 0,9-1 per essere considerato ottimo, tra 0,9 e 0,75 buono e sotto 0,75 mediocre. Ogni strumento ha, per ciascun elemento analizzato, un intervallo di concentrazione massimo e minimo entro cui garantisce precisione ed accuratezza^{3,15}.

Carry-over

Si intende la valutazione del cosiddetto "effetto trasci-

namento" dell'analisi di un campione su quello che segue. Consiste nell'eseguire la determinazione su un campione ad elevato valore per l'elemento analizzato seguito da due determinazioni su un campione a bassa concentrazione. Il carry over si valuta attraverso il seguente calcolo: $(L1-L2)/(H1-L2) \times 100$ dove L1 è la lettura del primo campione a bassa concentrazione, L2 la lettura del secondo campione a bassa concentrazione ed H1 è la lettura ad alta concentrazione. È possibile effettuare il test sostituendo alle due letture dei campioni a bassa concentrazione due letture con soluzione isotonica. Il valore trovato, per essere considerato accettabile, deve essere dell'1% circa^{3,15}.

Specificità

È la capacità dello strumento o della metodica di rilevare unicamente il parametro ricercato^{3,15}.

Sensibilità

È la capacità dello strumento o della metodica di rilevare con precisione piccole quantità del parametro ricercato (livello di rilevamento)^{3,15}.

ESEMPIO DI VALIDAZIONE DEL CONTAGLOBULI SEAC h5•m

Riportiamo di seguito, a titolo esemplificativo, l'esecuzione della convalida di un contaglobuli a impedenza elettrica a 5 parametri (RBC, Hct, MCV, WBC, Hgb), denominato h5•m (SEAC, Calenzano, FI). Sono stati presi in esame la precisione, l'accuratezza, la linearità ed il carry-over di ciascun parametro analizzato. Le modalità con cui è stata effettuata la valutazione di questi elementi sono alla portata di qualsiasi laboratorio^{4,5,6}.

Precisione

La precisione intrasaggio è stata calcolata come la media dei CV calcolati tra due letture consecutive del SEAC h5•m di 105 campioni di sangue con EDTA: 56 di cane, 25 di gatto e 24 di cavallo (vedi Tab. 1).

La precisione intersaggio è stata esaminata valutando il CV tra 10 letture del SEAC h5•m di uno stesso campione analizzato in giorni consecutivi, all'inizio del lavoro quotidiano consistente nell'esecuzione di circa 20 emogrammi. Per ovvi motivi di conservazione è stato utilizzato un campione di controllo di sangue umano, TRI CHECK 10 (SEAC, Calenzano, FI) (vedi Tab. 1).

Accuratezza

La media dei due valori di ogni parametro è stata poi confrontata con due determinazioni dello stesso campione eseguite con metodi standard. In particolare, il conteggio dei WBC è stato eseguito in camera di Burkner; l'Hgb è stata determinata con il fotometro "LKB Ultrospec 4050" impostato a 546 nm; l'Hct è stato misurato (come mHct) usando la microcentrifuga "ALC haematocrit centrifugette 4203"; il numero di RBC e l'MCV sono stati indirettamente valutati sulla base del mHct. Quindi, è stato eseguito il calcolo del Coefficiente di Regressione R tra le determinazioni del SEAC h5•m e quelle dei metodi standard per ogni parametro considerato (vedi Tab. 1).

Linearità

Sono stati raccolti 10 mL di sangue addizionati di EDTA rispettivamente di cane, di gatto e di cavallo. Ogni campione è stato poi centrifugato a circa 2.500 rpm per 10 minuti in modo da separare la parte corpuscolata dal plasma. Sono stati aspirati 5 mL di plasma e la frazione cellu-

Tabella 1
Risultati ottenuti nella validazione dello strumento SEAC h5•m, impiegando 105 campioni di sangue di cui 56 di cane, 25 di gatto e 24 di cavallo

Precisione intrasaggio CV						Linearità R			
	RBC	Hct	MCV	WBC	Hgb	RBC	Hct	WBC	Hgb
Cane	1,98	2,89	1,90	2,22	1,48	0,99	0,98	0,98	0,99
Gatto	2,11	2,76	1,58	2,69	1,78	1,00	1,00	0,98	1,00
Cavallo	2,29	2,79	1,23	1,77	1,61	0,99	1,00	0,99	0,99
Precisione intersaggio CV									
Campione di controllo	1,12	2,14	1,98	1,64	2,14				
Accuratezza R						Carry-over %			
	WBC	Hgb	Hct	RBC	WBC	Hct	Hgb	RBC	Hgb
Cane	0,98	0,96	0,97	0,55	0,00	0,54	0,95	0,55	0,95
Gatto	0,98	0,95	0,95	0,40	0,00	0,35	0,97	0,40	0,97
Cavallo	0,99	1,00	0,93	0,33	0,23	0,22	1,03	0,33	1,03

lare è stata risospesa per inversione. Sono state quindi eseguite diluizioni scalari di 50 mcL della parte corpuscolata nel proprio plasma a partire da 0 fino a 500 mcL. Gli 11 campioni così ottenuti sono stati analizzati dallo strumento SEAC h5•m ed i valori letti sono stati confrontati, tramite il Coefficiente di Regressione R, con il valore risultante dalle diluizioni così preparate (vedi Tab. 1).

Carry-over

Il carry-over è stato determinato analizzando per 5 volte consecutive dallo strumento SEAC h5•m un campione di sangue concentrato (H_1) e, di seguito, due "campioni in bianco", costituiti cioè da soluzione isotonica (L_1 ed L_2). Per ogni determinazione è stata poi applicata la formula: $(L_1 L_2)/(H_1 L_2) \times 100$ ed è stata eseguita la media dei cinque valori ottenuti per ciascun parametro (vedi Tab. 1).

Per quanto riguarda la specificità e la sensibilità non sono state effettuate prove mirate ad esaminare direttamente questi parametri, anche se le prove svolte sono comunque in grado di darne una valutazione indiretta. La ripetibilità delle letture di uno stesso strumento e l'accuratezza delle varie determinazioni da parte di metodi diversi sono un indiretto indice di specificità, mentre la sensibilità è valutabile con i campioni a bassa concentrazione della prova della linearità.

Come è possibile osservare in Tabella 1, i valori della precisione intrasaggio e intersaggio di tutte le specie analizzate, rientrano nell'intervallo del Coefficiente di Variazione ritenuto accettabile in ematologia; lo stesso può dirsi riguardo alla linearità ed all'accuratezza dove i valori del Coefficiente di Regressione possono considerarsi tutti ottimi; il carry-over risulta accettabile in tutti i parametri e particolarmente buono per quanto riguarda i WBC di cane e gatto.

CONCLUSIONI

Questa nota intende presentare una chiave pratica per il medico veterinario che, dedicandosi agli animali d'affezione, e tra questi anche il cavallo, sceglie di completare la sua attrezzatura professionale. Infatti il contaglobuli insieme al fotometro, alla centrifuga ed al refrattometro rappresenta la strumentazione che il professionista tende sempre più spesso ad impiegare per la raccolta dei dati di base del paziente che completano i reperti fisici della visita clinica.

Il contaglobuli ad impedenza elettrica è lo strumento ideale per affrontare uno studio ematologico unitamente alla lettura ed interpretazione dello striscio ematico, ma come tutte le strumentazioni richiede che sia ben tarato e calibrato per fornire valori reali. La condizione per ottenere questi risultati è l'applicazione di un buon programma di controllo di qualità all'interno del proprio laboratorio al fine di avere risultati che possano essere adeguatamente interpretati.

Purtroppo spesso accade nella pratica quotidiana della Clinica Universitaria, di ricevere per consulto pazienti con emogrammi eseguiti sia da laboratori che presso ambulatori senza una indicazione circa la strumentazione impie-

gata, senza l'indicazione degli intervalli di riferimento utilizzati e talora con evidenti incongruenze nei risultati (ad es. valori di MCHC superiori a 40 g/dL, senza segni di emolisi o lipemia, oppure valori di PLT molto bassi senza un adeguato riscontro nello striscio periferico). Ciò segnala una pericolosa imprecisione nell'esecuzione dell'analisi, che si riflette nell'emissione di referti ematologici inutili e fuorvianti, dal momento che possono indurre errori nella diagnosi.

È importante segnalare che qualsiasi strumentazione sperimentata per il settore veterinario, deve essere corredata da un'adeguata relazione che ne convalidi il suo impiego in questo ambito e che ne attesti la conformità alle normative di settore applicabili tramite la marcatura CE apposta sullo strumento stesso. Questo strumento, dal punto di vista normativo, è considerato un "Dispositivo medico diagnostico in vitro" ed è interessato da due direttive "orizzontali" della U.E.: 89/336/CEE - Direttiva sulla compatibilità elettromagnetica e 72/73/CEE - Direttiva sulla bassa tensione. Talora il falso risparmio ottenuto dall'acquisto di strumenti non validati in veterinaria e senza l'adeguata etichettatura per la normativa CE, si traduce in una perdita poiché essi non sono in grado di adattarsi alla complessità ematologica delle diverse specie animali e potrebbero essere potenziale fonte di problemi in caso di visita ispettiva da parte dell'ENPI, l'ente preposto alla salvaguardia contro gli infortuni. La succitata normativa prevede, infatti, che la ditta produttrice di dispositivi medici ottemperi le adeguate norme di costruzione a tutela della sicurezza dell'operatore.

Infine in questa nota è stata presentata la validazione esemplificativa di uno strumento per ematologia "di base": il contaglobuli SEAC h5•m è stato saggiato per il cane, il gatto ed il cavallo ottenendo buoni risultati per quanto riguarda la precisione, l'accuratezza, la linearità ed il carry-over.

Ringraziamenti

Alle Dott.sse Lucia Cioni e Celestina Caserta della ditta SEAC, Calenzano, FI, per l'assistenza tecnica, il prezioso aiuto nella conduzione delle indagini e per la revisione e la correzione del presente lavoro.

Parole chiave

Ematologia, contaglobuli, controllo di qualità, validazione.

Key words

Hematology, cell counter, quality control, validation.

Bibliografia

1. Abbott Diagnostics Division - Manuali d'uso: Cell-Dyn 3000, Cell-Dyn 3500.
2. Baraghini G.F., Baraldi E., Bolelli G.F., Castellucci C., Di Marco F., Grisolia C., Motta R., Poggioli S., Roli L., Seghedoni S., Capelli M. -

- Un nuovo approccio al controllo di processo in un laboratorio di analisi - *Bioch. Clini.*, 17, 6, 547-556, 1993.
3. Caldini M., Pasquinelli F. - Il controllo di qualità - in Pasquinelli F. Parte prima, 321-340, Rosini Ed., Firenze, 1992.
 4. Cornbleet P.J., Myrick D., Levy R. - Evaluation of the Coulter STKS five-part differential - *Hematopathology, Am. J. of Clin. Path.*, 99, 72-81, 1993.
 5. Davies D.T., Fisher G.V. - The validation and application of the H*1 for the complete automated evaluation of laboratory animal haematology - *Comp. Haem. Int.*, 1, 91-105, 1991.
 6. Gavazza A., Demi S., Lubas G. - Valutazione di un moderno contaglobuli a 5 parametri appositamente preparato per l'impiego in ematologia veterinaria - *Atti S. I. S. Vet. XLVII*, 1487-1491, 1993.
 7. Jain N.C. - *Essentials of Veterinary Hematology* - Lea & Febiger, Philadelphia, 1993
 8. Johnson C.L., Gerson B., Nunez M., Allam C. - Field evaluation of the Nova Celltrak 12 hematology analyzer - *Hematopathology, Am. J. of Clin. Path.* 102, 3, 306-309, 1994.
 9. Lubas G. - *Appunti di ematologia clinica comparata* - Servizio Editoriale Universitario di Pisa, 3a Ed., 1997.
 10. Lubas G. - Determinazione dell'emogramma mediante strumentazione elettronica - *Ob. e Doc. Vet.* 10, 17-22, 1991.
 11. Lubas G., Corazza M., Delgadillo A.J., Demi S. - Usefulness and interpretation of electronic cell counter data in routine small animal hematology - *Proc. Vth Congress Int. Soc. Anim. Clin. Bioch.* - Aug. 2-6 1994, Guelph, Canada, 165.
 12. Lubas G., Gugliucci B., Delgadillo A.J., Gavazza A., Diaz M.L. - Determinazione dell'emogramma mediante un moderno contaglobuli nella specie equina: interpretazione dei diversi parametri ottenuti - *Ippologia*, 6, 2, 73-80, 1995.
 13. Malvano R., Chiecchio A., Rota G., Signorini C., Vignati G. - Il controllo di qualità nel laboratorio: strumenti, prestazioni, aspetti critici - *Bioch. Clini.*, 18, 4, 257-289, 1994.
 14. Morris M.W., Williams W.J., Nelson D.A. - Automated blood cell counting - in Betler E., Lichtman M.A., Collier B.S., Kipps T. J., *Hematology*, 5th ed., Mc Graw-Hill, Inc., New York, L3-L11, 1995.
 15. Murray W., Peter A.T., Teclaw R.F. - La rilevanza clinica della convalida dei test - *Large Anim. Rev.* 1, 7-15, 1995.
 16. SEAC - *Manuali d'uso: hema 1, h5•m, hemacomp 10, hemat 8* - Firenze.
 17. Simson E. - Il sistema Technicon H*1 - in Simson E., Ross D.W., Kocher W.D., *Atlante di Citoematologia e Automazione*, 1988.
 18. Tvedten H. - Advanced hematology analyzers. Interpretation of results - *Vet. Clin. Path.* 22, 72-80, 1993.
 19. Tvedten H., Haines C. - Canine automated differential leukocyte count: study using a hematology analyzer system - *Vet. Clin. Path.* 23, 90-96, 1994.
 20. Weiser M.G. - Modification and evaluation of a multichannel blood cell counting system for blood analysis in veterinary hematology - *J. A. V. M. A.* 190, 411-415, 1987.
 21. Willard M.D., Tvedten H., Turnwald G.H. - *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* - W.B. Saunders Co., Philadelphia 1994.
 22. Williams W.J., Morris M.W., Nelson D.A. - Examination of the blood - in Beytler E., Lichtman M.A., Collier B.S., Kipps T.J. *Hematology*, 5th ed., McGraw-Hill, Inc., New York, 8-14, 1995.