

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione Patologia Clinica

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

Valutazione dell'analizzatore ematologico Sysmex XN-9000 in modalità fluido biologico (BF) per il controllo della contaminazione leucocitaria degli emocomponenti leucodepleti

Candidata

Dott.ssa Grazia Lombardi

Relatore

Prof. A. Paolicchi

Dott. M. Fabbri

Anno accademico 2014-2015

RIASSUNTO

La contaminazione leucocitaria degli emocomponenti piastrinici ed eritrocitari destinati alla terapia trasfusionale è stata associata negli anni passati a reazioni di varia gravità insorte nei riceventi (reazioni febbrili non emolitiche, alloimmunizzazione HLA, trasmissione di agenti infettivi). La quantità dei leucociti residui nelle unità da trasfondere è stata ridotta nel tempo mediante sempre più efficienti metodi di leucodeplezione. La normativa vigente indica che un numero di leucociti residui $< 1 \times 10^6$ per unità sottoposta a leucodeplezione ($< 3,3$ leucociti/ μl per una unità di volume medio di 300 ml) possa essere sufficiente a prevenire tali eventi avversi.

Presso la S.C di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia dell'Azienda USL Toscana Nordovest - presidio di Lucca il controllo della contaminazione da leucociti delle unità leucodeplete è eseguito in citofluorimetria mediante kit diagnostico Leucocount. Il conteggio assoluto con Leucocount è molto sensibile, ma richiede una piattaforma analitica dedicata e personale addestrato.

In questo studio abbiamo voluto valutare il nuovo analizzatore ematologico Sysmex XN-9000, automatizzato, rapido ed economico, come metodo alternativo al Leucocount per il controllo delle unità leucodeplete. L'analizzatore Sysmex XN-9000 è dotato di un modulo di analisi per i fluidi biologici (XN-BF), sviluppato per il conteggio accurato dei leucociti nei fluidi biologici al di sotto del limite di sensibilità degli usuali analizzatori ematologici.

La performance del Sysmex XN-9000 in modalità BF è stata valutata in campioni con un numero di leucociti compresi tra 80 e 1 leucocita/ μl . Il coefficiente di variazione in campioni con conteggi intorno a 2 leucociti/ μl è di circa il 20%. I conteggi effettuati risultano lineari in questo range ($R^2=0,99$).

Il numero dei leucociti residui/ μl è stato conteggiato con Leucocount (metodo in uso) e con Sysmex XN-900 in modalità BF (metodo in prova), in un totale di 89 emocomponenti

leucodepleti (54 concentrati piastrinici da pool di *buffy-coat* (BC), 15 concentrati piastrinici da aferesi e 20 concentrati di emazie da eritroplasmaferesi). La comparazione tra i metodi eseguita mediante l'analisi di regressione di Passing e Bablok mostra la presenza di un errore sistematico proporzionale del metodo in prova. La differenza (bias) tra i metodi risulta significativa (secondo il metodo di Bland-Altman). Quando i metodi sono confrontati separatamente sui conteggi da ciascun gruppo di emocomponente i risultati sono comparabili all'analisi combinata. Si osserva uno scostamento maggiore del metodo in prova rispetto a quello in uso sui conteggi dei concentrati piastrinici da pool di BC (bias medio = 7,3). Il bias medio derivante dai conteggi sulle unità da aferesi è inferiore: 1,5 per i concentrati piastrinici, 1,22 per quelli eritrocitari.

In generale i conteggi dei leucociti totali mediante metodo in prova sovrastimano quelli del metodo in uso. In modalità BF il numero dei leucociti/ μl ottenuti su tutti i concentrati piastrinici da pool di BC è più elevato, da 1,4 a 356 volte rispetto al Leucocount (mediana e deviazione standard: $7 \pm 7,15$ vs $0,19 \pm 2,49$), su 11/15 concentrati piastrinici da aferesi è da 1,12 a 40 volte maggiore (mediana e deviazione standard: $2 \pm 1,5$ vs $0,11 \pm 0,81$), e su 17/20 concentrati eritrocitari da 1,35 a 38 volte in più (mediana e deviazione standard: $1,5 \pm 0,77$ vs $0,09 \pm 0,18$).

La contaminazione da leucociti residui secondo il conteggio Leucocount è $<1 \times 10^6$ in tutte le unità da aferesi (100% delle unità conformi) e in 48/54 (89%) concentrati piastrinici da pool di BC. In 6/54 (11%) unità piastriniche da pool di BC è $>1 \times 10^6$. Il metodo in prova classifica correttamente 20/20 (100%) unità di emazie da aferesi, 13/15 (87%) unità di piastrine da aferesi e 31/54 (57%) unità di piastrine da pool di BC. Attribuisce solo false non conformità ai concentrati piastrinici, 23/54 (43%) da pool di BC e a 2/15 (13%) da aferesi.

I nostri dati indicano che i conteggi con il modulo XN-BF di campioni con un numero molto basso di leucociti (fino a 2 leucociti/ μl) sono precisi e lineari. L'analisi indica una mancanza di correlazione tra i due metodi e una sistematica sovrastima dei conteggi del metodo in prova. Possiamo ipotizzare che essa possa essere legata a vari fattori come la

diversa sensibilità e/o specificità del metodo. Anche la complessa matrice degli emocomponenti potrebbe aver generato interferenze positive. Il Sysmex potrebbe aver classificato come leucociti eventi fluorescenti aspecifici, associati per esempio all'elevato numero di piastrine nei concentrati (fino a 3×10^{11}) ed alle condizioni di conservazione delle unità (attivazione ed aggregazione piastrinica). Nonostante il metodo non sia accurato, i conteggi in modo BF hanno comunque permesso di classificare correttamente tutti i concentrati eritrocitari da aferesi, e il 64% dei concentrati piastrinici. La modalità BF potrebbe essere impiegata come metodo di screening per selezionare quei concentrati piastrinici che non necessitano di una rivalutazione col Leucocount. Uno studio più ampio è richiesto per confermare la sua specificità sui concentrati eritrocitari. L'utilizzo dell'analizzatore Sysmex in modalità BF per il controllo della contaminazione da leucociti residui negli emocomponenti leucodepleti sarebbe molto attraente, ma richiederebbe modifiche per ottimizzare le qualità analitiche per livelli così bassi di leucociti in matrici biologiche complesse.

Indice generale

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1. ASPETTI NORMATIVI DELLE ATTIVITÀ TRASFUSIONALI pag. 7
2. EVENTI AVVERSI ASSOCIATI ALLA CONTAMINAZIONE LEUCOCITARIA DEGLI EMOCOMPONENTI ERITROCITARI E PIASTRINICI pag.10
 - 2.1 *Benefici associati alla leucodeplezione di rilevanza clinica* pag.10
 - 2.2 *Benefici associati alla leucodeplezione di rilevanza clinica probabile o non accertata* pag.13
 - 2.3 *Benefici associati alla leucodeplezione pre-storage* pag.15
3. METODI DI CONTEGGIO PER IL CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DELLE UNITÀ LEUCODEPLETE pag.18
4. IL MODULO XN-BF NELL'ANALIZZATORE EMATOLOGICO SYSMEX XN-9000 pag.20

CAPITOLO 2

- SCOPO DELLA TESI pag.21

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

1. EMOCOMPONENTI IN STUDIO pag.22
 - 1.1. *Produzione dei concentrati piastrinici da pool di buffy-coat (BC)* pag.22
 - 1.2. *Produzione dei concentrati piastrinici da aferesi* pag.23
 - 1.3. *Produzione dei concentrati di globuli rossi da aferesi* pag. 24
2. CONTROLLO DI QUALITÀ pag.24
 - 2.1. *Valutazione del volume* pag.25
 - 2.2. *Concentrazioni cellulari degli emocomponenti* pag.25
 - 2.2.1. *Campionamento dell'unità* pag.25
 - 2.2.2. *Esame emocromocitometrico* pag.25
3. CONTEGGIO DEI LEUCOCITI RESIDUI DOPO LEUCODEPLEZIONE MEDIANTE METODO CITOFLUORIMETRICO LEUCOCOUNT (METODO IN USO) pag.26
4. VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ ANALITICA DEL SYSMEX XN-9000 IN MODALITÀ DI ANALISI FLUIDO BIOLOGICO (XN-BF) (metodo in prova) pag.28

<i>4.1. Determinazione della precisione e linearità</i>	pag.30
<i>4.2. Determinazione dei leucociti residui negli emocomponenti</i>	pag.30
<i>4.3. Verifica dell'effetto matrice dei concentrati piastrinici sulle prestazioni analitiche dell'XN-BF</i>	pag.30

5. ANALISI STATISTICA	pag.31
6. VERIFICA DELL'ACCETTABILITA' DEL METODO IN PROVA	pag.32

CAPITOLO 4

RISULTATI

1. VALUTAZIONE DELLA QUALITA' ANALITICA DEL SYSMEX XN-9000 XN-BF	pag.33
2. ANALISI DELL'ACCURATEZZA DEL METODO IN PROVA XN-BF MEDIANTE COMPARAZIONE CON IL METODO IN USO LEUCOCOUNT	pag.36
3. EFFETTO DELLA MATRICE DEI CONCENTRATI PIASTRINICI SULLE QUALITÀ ANALITICHE DELL'XN-BF	pag.40
4. VALUTAZIONE DELL'ACCETTABILITA' DEL NUOVO METODO	pag.42

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE	pag.45
-------------	--------

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	pag.49
---------------------------	--------

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1. ASPETTI NORMATIVI DELLE ATTIVITA' TRASFUSIONALI

Le attività trasfusionali sono oggetto di specifico ed elevato controllo da parte della legislazione europea e nazionale degli stati membri. Questa attenzione deriva dai numerosi eventi avversi gravi verificatisi in passato, che hanno coinvolto tutti gli stati membri.

La trasmissione di agenti infettivi attraverso la trasfusione di prodotti ematici e gli effetti immunomodulanti, conseguenti alla stimolazione esercitata dagli alloantigeni delle cellule ematiche, sono tra i principali problemi connessi alla terapia trasfusionale.

Dall'anno 2002, ed in particolare nel triennio 2005-2007, si è verificata la più intensa ed importante produzione legislativa (1,2) in materia di attività trasfusionali, e attività ad esse associate. Questa corposa e dettagliata normativa a tutela della sicurezza dei cittadini, finalizzata a garantire la terapia trasfusionale mediante l'introduzione di misure di sicurezza sempre più avanzate e restrittive, ha oggi drasticamente ridotto il rischio collegato all'utilizzo del prodotto. Per disposizione di legge (2) il Centro nazionale sangue (CNS) ha inoltre il mandato istituzionale di aggiornare le direttive relative alla qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti sulla base dei progressi scientifici e tecnologici.

Un ruolo fondamentale negli anni è stato svolto dalla Raccomandazione Europea R (95) N° 15 (Strasburgo giugno 1996) diretta ai governi degli stati membri. Questa raccomandazione ha lo scopo di sostenere i governi nel prendere le misure e fare i passi necessari per assicurare ai cittadini che raccolta, preparazione, uso e controllo degli emocomponenti siano condotti in accordo con gli orientamenti della raccomandazione stessa. Essa prende in considerazione l'importanza degli emocomponenti nella medicina moderna, la necessità di assicurare qualità ed efficacia insieme alla massima riduzione dei rischi, nonché sottolinea l'origine umana di tali prodotti, i loro specifici principi etici e tecnici e la necessità di armonizzare tali principi in tutti gli stati membri. La raccomandazione comprende inoltre un'importante appendice a contenuto tecnico-pratico che ha lo scopo di

indicare una serie di principi e linee guida per la preparazione, la sicurezza e l'uso degli emocomponenti. Descrive infatti più dettagliatamente gli standard di processo e di qualità che un emocomponente deve possedere per essere considerato di sicura efficacia terapeutica. Queste linee guida sono costantemente implementate sulla base dei progressi scientifici (3). La raccomandazione riguarda tutti i normali componenti del sangue che possono essere preparati, routinariamente, dai Servizi Trasfusionali, mentre non contempla i prodotti ottenuti dal plasma umano per frazionamento. Quest'ultimo aspetto è sotto la responsabilità della Farmacopea Europea e della Commissione delle Comunità Europee. La guida è separata in due sezioni principali che enucleano rispettivamente i principi e i requisiti "minimi" (gli standard) relativi a selezione del donatore, raccolta del sangue, lavorazione conservazione e trasporto del sangue, produzione di ciascuna componente (monografia), immunoematologia, test di screening per marcatori di infezione, emovigilanza, e uso clinico di ciascun emocomponente.

La normativa vigente a livello italiano è rappresentata dal Decreto del Ministero della Salute 2 Novembre 2015 "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti" (4). Il nuovo decreto nasce dall'esigenza di adeguare le disposizioni normative sulla qualità e la sicurezza del sangue e dei suoi prodotti al progresso in ambito scientifico e tecnologico che la medicina trasfusionale ha compiuto nell'ultimo decennio. Infatti, il Decreto del 2 novembre sostituisce i precedenti Decreti Ministeriali del 3 marzo 2005, recanti "Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti" e "Caratteristiche e modalità per la donazione del sangue e di emocomponenti". Il nuovo disposto normativo in materia trasfusionale si basa sia sulle raccomandazioni europee che su le linee guida e standard operativi nazionali. Esso descrive la gestione delle attività trasfusionali, dalle fasi di selezione del donatore, al buon uso degli emocomponenti, alla loro sicurezza biologica ed efficacia terapeutica, con precisi e dettagliati standard richiesti per tutte le attività, dalla raccolta, produzione e analisi di laboratorio all'organizzazione, esecuzione e documentazione del controllo di qualità interno su tutte queste fasi. Esso si applica non solo al sangue e agli emocomponenti raccolti da donazioni volontarie e non remunerate, ma anche agli emocomponenti per uso non trasfusionale, a quelli per uso autologo per i quali vengono fortemente limitate le indicazioni, in conformità alle più recenti evidenze scientifiche, alla raccolta di cellule staminali ematopoietiche del sangue periferico (allogene e autologhe) e del sangue cordonale nonché alla raccolta di linfociti. Completano l'articolato dodici allegati tecnici che, spaziando in tutto l'ambito di riferimento normativo della medicina trasfusionale, raccomandano l'esecuzione di alcune attività necessarie per garantire qualità e sicurezza al processo trasfusionale, tutelando donatori e pazienti.

Riguardo la preparazione degli emocomponenti l'articolo 21 di suddetto decreto (4), ed in particolare il relativo allegato quinto, introducono le seguenti norme:

- i requisiti minimi obbligatori per i concentrati eritrocitari ottenuti dalla scomposizione del sangue intero e da aferesi sono: la rimozione del *buffy-coat* o la leucoriduzione, unitamente alla rimozione della massima quantità di plasma e alla risospensione in soluzione additiva.
- non è più consentita la produzione di concentrati piastrinici da unità di sangue intero attraverso la separazione intermedia di plasma ricco in piastrine, in ragione della esigenza clinica e di sicurezza di disporre sistematicamente di concentrati eritrocitari con minimo contenuto di plasma residuo, nonché di migliorare la resa quantitativa media di plasma da scomposizione del sangue intero.
- tutti gli emocomponenti eritrocitari e piastrinici dovranno essere prodotti con leucodeplezione mediante filtrazione *pre-storage* (già ampiamente adottata in molti stati, non solo europei) con il duplice obiettivo di migliorare la qualità degli emocomponenti e di ridurre i possibili eventi avversi associati alla trasfusione, inclusa l'immunizzazione verso gli antigeni leucocitari. Dovrà essere eseguita con metodi tali da garantire l'ottenimento, prima della conservazione, di un residuo leucocitario per unità inferiore a 1×10^6 .

Nelle tabelle n° 1A, B e C sono indicati i requisiti imposti dal nuovo decreto ministeriale e descritti nell'allegato V dell'art 21 (4) riguardo le tipologie di emocomponenti oggetti di questo studio: concentrato eritrocitario leucodepleto da aferesi, concentrato piastrinico da pool di *buffy-coat* (BC) leucodepleto e concentrato piastrinico da aferesi leucodepleto.

Tabella 1A. Requisiti del concentrato eritrocitario leucodepleto da aferesi.

Parametro da verificare	Requisito
Volume	Definito sulla base del sistema utilizzato
Emoglobina	Minimo 40 g per unità (leucodepleto)
Ematocrito	0,5-0,7
Leucociti residui (leucodepleto)	$< 1 \times 10^6$ per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	$< 0,8\%$ della massa eritrocitaria
Conservazione	$4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$

Tabella 1B. Requisiti del concentrato piastrinico da pool di *buffy-coat* leucodepleto.

Parametro da verificare	Requisito
Volume	>40 mL per 60 x 10 ⁹ piastrine per singola unità che costituisce il pool
Piastrine nel prodotto leucodepleto	Minimo 2 x 10 ¹¹
Leucociti residui	< 1 x 10 ⁶ per singolo pool
pH misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	>6,4
Conservazione	22 °C ± 2

Tabella 1C. Requisiti del concentrato piastrinico da aferesi leucodepleto.

Parametro da verificare	Requisito
Volume	>40 mL per 60 x 10 ⁹ piastrine per unità
Piastrine	3 x 10 ¹¹ (minimo 2 x 10 ¹¹ se ottenuto da aferesi multicomponent)
Leucociti residui	< 1 x 10 ⁶ per singola unità
pH misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	>6,4
Conservazione	22 °C ± 2

2. EVENTI AVVERSI ASSOCIATI ALLA CONTAMINAZIONE LEUCOCITARIA DEGLI EMOCOMPONENTI ERITROCITARI E PIASTRINICI

La trasfusione di emocomponenti contenenti leucociti del donatore e i loro mediatori solubili biologici come le citochine è associata ad effetti di varia entità (5). La struttura antigenica dei globuli bianchi, con gli antigeni di superficie HLA di classe I e II, li rende i principali bersagli della risposta immune del ricevente, determinando reazioni febbrili e scatenando alloimmunizzazione con refrattarietà piastrinica, e rigetto della donazione. Inoltre esistono alcuni virus a tropismo leucocitario (es. CMV, HHV-8, EBV, e HTLV-I/II), la cui eventuale presenza nei leucociti contaminanti i componenti da trasfondere costituirebbe un potenziale rischio infettivo per il ricevente. Un altro effetto, la cui fisiopatologia ancora oggi non è stata ben compresa (40), è l'effetto immunomodulante delle trasfusioni (*transfusion associated immunomodulation, TRIM*). È stato osservato infatti in pazienti sottoposti a chirurgia e a terapia trasfusionale una maggiore suscettibilità alle infezioni, e in pazienti oncologici, spesso politrasfusi, aumento della frequenza di recidiva.

2.1 Benefici associati alla leucodeplezione di rilevanza clinica

Le principali indicazioni cliniche a sostegno della somministrazione di prodotti leucodepleti sono riportate in tabella 2 (6). Esse riguardano il controllo delle reazioni febbrili

post-trasfusionali di natura non emolitica, del rischio di alloimmunizzazione legato agli antigeni HLA e di refrattarietà piastrinica in pazienti politrasfusi, e del rischio di trasmissione del citomegalovirus (CMV). Diversi e accurati studi clinici randomizzati (retrospettivi e prospettici) hanno dimostrato come la presenza di leucociti negli emocomponenti si associ ad un aumento della frequenza e della severità di tali eventi. Inoltre è stato osservato in pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca o in pazienti compromessi come trasfondere emocomponenti leucodepleti si associ ad una ridotta mortalità (7, 8).

Le reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche (FNHTR, Febrile Non-Haemolytic Transfusion Reactions) insorgono durante l'infusione, ma a volte anche nelle successive 4-6 ore. La frequenza della reazione per concentrati eritrocitari (CE) non leucodepleti è stimata tra 0.5-6.8%. Per i concentrati piastrinici (CP) le frequenze si innalzano ad un 30% di tutte le unità trasfuse. La patogenesi delle FNHTR sembrerebbe multifattoriale, con la comune elaborazione di citochine infiammatorie (Interleuchina-6, Interleuchina-8, etc.) che reagiscono con recettori del centro cerebrale di termoregolazione. I meccanismi proposti contemplano: anticorpi del ricevente che reagiscono con i leucociti del donatore; rilascio di citochine infiammatorie da parte di cellule del ricevente in risposta a complessi antigene-anticorpo che si formano fra gli anticorpi del ricevente e materiale antigenico del donatore (10, 11); trasferimento passivo di citochine infiammatorie che si accumulano nei concentrati piastrinici durante la conservazione (12, 13).

La filtrazione dei concentrati eritrocitari (CE) si è dimostrata efficace nel prevenire FNHTR in pazienti politrasfusi. La prevenzione di FNHTR legata alle trasfusioni di concentrati piastrinici (CP) si è dimostrata molto più ardua (13), facendo ipotizzare che il fattore scatenante fosse in larga misura l'accumulo di citochine durante la conservazione a temperatura ambiente e prima della filtrazione. La leucodeplezione *pre-storage* dei CP sembrerebbe attenuare infatti l'aumento della concentrazione di citochine che avviene durante la conservazione (14). La rimozione dei leucociti nella fase precedente alla conservazione (*pre-storage*) oltre a prevenire l'accumulo di citochine durante la conservazione rimuove anche target antigenici, determinando una riduzione significativa delle reazioni febbrili. Alcuni studi dimostrano una riduzione del 50%, da uno 0,35% allo 0,18%, del numero di FNHTR conseguente alla trasfusione di globuli rossi leucodepleti *pre-storage* (15, 16). Similarmente è stata vista una riduzione significativa delle reazioni febbrili per i concentrati piastrinici leucodepleti *pre-storage* (17, 18).

Il Citomegalovirus (CMV), detto anche virus erpetico umano 5 (HHV 5), ha un tropismo per i leucociti umani. Il CMV è in grado di determinare severe complicazioni in soggetti immunocompromessi. La leucodeplezione rappresenta una strategia di efficacia

dimostrata per ridurre il rischio di trasmissione del citomegalovirus (CMV), con un decremento significativo, da un 30% in pazienti suscettibili allo 0-2,5%. CMV può essere trasmesso dai leucociti presenti negli emocomponenti in corso di trasfusione. Per infettarsi con una donazione di sangue, è necessario che il ricevente entri in contatto con leucociti del donatore con CMV allo stato latente. CMV poi si deve riattivare e le cellule virali devono sopravvivere abbastanza a lungo nell'ospite per poter rilasciare particelle virali infette (19). Categorie di pazienti a rischio di infezioni da CMV trasfusione-associato sono i neonati prematuri, pazienti oncologici, trapiantati di midollo allogenico, e più in generale pazienti immunocompromessi. La frequenza di infezione da CMV trasfusione associata è del 30% in questi gruppi (20).

Emocomponenti sieronegativi per CMV sono richiesti per la terapia trasfusionale in pazienti a rischio (21). Il numero crescente di pazienti immunocompromessi, che potrebbero beneficiare dell'uso di tali componenti, l'elevata prevalenza di anticorpi per CMV nella popolazione, ha spinto a esplorare l'uso di emocomponenti leucodepleti come strategia alternativa per l'approvvigionamento di unità sicure dal punto di vista infettivo per CMV (22). In un ampio studio Bowden et al. (23), hanno esaminato pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo, che avevano ricevuto a caso o emocomponenti sieronegativi per CMV o emocomponenti leucodepleti. Gli autori non notarono nessuna differenza significativa nei due gruppi studiati sia per la probabilità di infezione che per la sopravvivenza. Negli anni si sono susseguite ulteriori osservazioni, da cui risulta che la leucodeplezione pre-storage sia sufficientemente sicura nel ridurre il rischio di trasmissione del CMV. Nonostante questo per i pazienti a rischio sono tuttora selezionati prodotti sieronegativi per CMV da trasfondere.

La trasfusione del sangue è una delle più comuni sorgenti di esposizione allogenica, dato che i riceventi di emocomponenti sono esposti a numerosi alloantigeni espressi sulla superficie di leucociti, emazie e piastrine donate. Molti riceventi diventano alloimmunizzati agli antigeni leucocitari umani (HLA) espressi sulla superficie di globuli bianchi e piastrine, riducendo le possibilità di trasfondere tali componenti. A seguito della trasfusione di emazie, i pazienti possono generare alloanticorpi contro gli antigeni presenti sulle emazie e sui leucociti contaminanti il prodotto. Le prove di compatibilità tra donatore e ricevente sono eseguite per i maggiori gruppi antigenici espressi dai globuli rossi, mentre sono impraticabili routinariamente per gli antigeni dei leucociti contaminanti, soprattutto gli HLA. Anche a seguito della trasfusione di piastrine la risposta alloimmune è indotta da antigeni espressi dai leucociti contaminanti oltre che dalle stesse piastrine, includendo antigeni HLA di classe I, e altri antigeni piastrinici. La risposta anticorpale contro questi antigeni può essere altamente problematica, determinando refrattarietà alle successive trasfusioni piastriniche.

Le frequenze di generazione di anticorpi anti-HLA sono alte, tra 7-64%, con le frequenze maggiori derivate da studi su gruppi con donne in gravidanza o pazienti politrasfusi. È stato dimostrato in vari studi che la frequenza globale di immunizzazione HLA si riduce con l'introduzione della leucodeplezione, dato che viene drasticamente ridotta una quota di elementi altamente immunoallogeni, pur senza eliminarla (38, 39).

Tabella 2. Potenziali benefici associati alla leucodeplezione. Si distinguono in tre categorie a seconda della rilevanza degli studi clinici in cui l'effetto benefico è stato descritto: accertato, probabile, non accertato (6). *NHFRT*, *Non Haemolytic Febrile Transfusion Reactions*; *TRIM*, *Trasfusion Associated Immunomodulation*; *vCJD*, *variant Creutzfeldt-Jacob disease*; *TRALI*, *Transfusion related acute lung injury*; *GVHD*, *Graft versus Host Disease*.

Rilevanza clinica accertata

- Ridotta frequenza e severità di FNHTR
- Ridotto rischio di trasmissione di CMV
- Ridotto rischio di alloimmunizzazione-HLA e refrattarietà piastrinica
- Ridotta mortalità e disfunzioni di organo in pazienti sottoposti a chirurgia cardiovascolare

Rilevanza clinica probabile

- Ridotto rischio infettivo associato all'immunomodulazione (TRIM)
- Ridotto rischio di trasmissione batterica associata alla trasfusione

Rilevanza clinica non accertata

- Eliminazione della trasmissione di vCJD
 - Eliminazione della trasmissione di HTLV/II, EBV, etc.
 - Ridotto rischio di TRALI
 - Ridotto rischio di GVHD
-

2.2 Benefici associati alla leucodeplezione di rilevanza clinica probabile o non accertata

Le evidenze scientifiche fino ad ora prodotte non sono invece ancora sufficienti a stabilire un'associazione causale tra la diminuzione del rischio infettivo indotto dalla trasfusione, per trasmissione batterica o per gli effetti immunomodulanti (TRIM), e la minor presenza di leucociti contaminanti le unità leucodeplete.

La contaminazione batterica degli emocomponenti può determinare complicazioni serie nei riceventi. Il rischio di trasfusione di concentrati piastrinici contaminati è del 2% (da donatori asintomatici). La temperatura ambiente a cui sono conservati per preservare vitalità e funzione può facilitare la crescita batterica (27). La più comune seria contaminazione batterica associata alla trasfusione delle emazie è quella da *Yersinia enterocolitica*, per le sue caratteristiche di crescita a bassa temperatura ed in ambiente ricco in ferro (28). Diversi studi hanno dimostrato che la crescita di *Y. enterocolitica* inoculata in emocomponenti in condizioni sperimentali è diminuita o evitata da una leucodeplezione *pre-storage* dopo un periodo di incubazione a temperatura ambiente (28, 29). La filtrazione non previene la crescita batterica, ma piuttosto riduce il livello di contaminazione batterica per alcuni microorganismi. Questo processo non è efficace per alcune specie di batteri (es. *S. epidermidis*). La procedura non provvede a una completa protezione riguardo la contaminazione batterica, ma è stato dimostrato che riduce significativamente il rischio di sepsi associato alla trasfusione (30, 31). Il meccanismo mediante cui la leucodeplezione rimuove i batteri è complesso e sono state proposte varie ipotesi. I batteri potrebbero essere fagocitati dai leucociti durante le 8 ore proposte di conservazione dell'emocomponente a temperatura ambiente e poi rimossi con i leucociti per leucodeplezione. Oppure i batteri potrebbero essere assorbiti direttamente dalla matrice del filtro o indirettamente dal legame a leucociti e piastrine o da componenti del complemento attivati, e rimossi dai filtri carichi negativamente (32).

Le trasfusioni sembrerebbero avere importanti effetti immunomodulatori sui riceventi. Questi effetti includono: deregolazione delle risposte infiammatorie e dell'immunità innata che porta ad una maggiore suscettibilità alle infezioni microbiche, inibizione delle difese cellulari dell'ospite (cellule T e NK) contro i tumori, incremento delle funzioni delle cellule B che determina maggiore aumento degli eventi di alloimmunizzazione verso gli antigeni di gruppo, del complesso di istocompatibilità e di altri antigeni trasfusi (40 41).

Ricerche di base, in vitro o su modelli animali, o la sola esperienza indicano come appropriata la leucodeplezione per prevenire eventi molto gravi, quali la trasmissione trasfusionale del prione agente eziologico della variante umana dell'encefalopatia spongiforme bovina (malattia di Crutzfeldt-Jacob, vCJD), dei virus HHV-8, HTLV I/II, EBV, etc., il rischio di danno polmonare acuto (*transfusion related acute lung injury*, TRALI), e il rischio, seppur infrequente, dello sviluppo di una risposta immune da parte dei linfociti T del donatore contro il ricevente (*Graft Versus Host Disease*, GVHD) (6, 9).

La trasmissione all'uomo dell'Encelofalopatia Spongiforme Bovina (variante umana detta malattia di Creutzfeldt-Jacob, vCJD) mediante un prione che può risiedere nei linfociti B (33) ha allertato la comunità europea riguardo il potenziale rischio trasfusionale associato. Sono stati descritti alcuni casi di probabile trasmissione di vCJD associata alla trasfusione (34). Alcuni dati suggeriscono inoltre che la leucodeplezione potrebbe ridurre il rischio trasfusionale di trasmissione della variante prevenendo il passaggio al ricevente dei leucociti associati al prione (35, 36). Per questo motivo nazioni dove erano emersi i focolai infettivi come l'Inghilterra ed il Portogallo hanno aderito per primi ai programmi di implementazione della leucodeplezione degli emocomponenti, come sforzo per cercare di debellare il rischio teorico della trasmissione associata alla trasfusione della vCJD. La decisione è stata presa sulla base del principio precauzionale per l'evidenza che il prione patogeno, agente eziologico della vCJD, era associato ai linfociti B (37).

Il virus di Epstein-Barr (EBV) e il virus linfotropico delle cellule T umane (HTLV-I/II) risiedono nei leucociti e infettano le persone. L'HTLV-I/II pone seri problemi, ma le misure di screening hanno minimizzato il rischio di una sua trasmissione trasfusionale. Il virus di Epstein-Barr ha un'alta prevalenza nella popolazione, ma la malattia trasmessa per via trasfusionale non è particolarmente significativa. Esistono altri virus erpetici leucotropici (EBV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8) che possono infettare l'uomo e che per questo potrebbero essere trasmessi per trasfusione (24, 25, 26). Malgrado per essi non esistano studi conclusivi riguardo l'efficacia della leucodeplezione, come per CMV, è ragionevole assumere che la leucodeplezione possa prevenirne la trasmissione.

Sulla base di queste evidenze scientifiche tutti i paesi della comunità europea si stanno allineando riguardo la leucodeplezione di tutti i concentrati piastrinici e eritrocitari (universale). Il principio precauzionale è prevalso ed è stato applicato da vari paesi per ridurre i potenziali severi rischi di salute pubblica anche a quelle situazioni in cui le relazioni causali tra la presenza dei leucociti nell'emocomponente e l'effetto avverso non è stato ancora dimostrato clinicamente. L'Italia si è aggiunta a questa politica di sicurezza sulle donazioni con il decreto 2 novembre 2015 (4), in cui indica come unica modalità la leucodeplezione *pre-storage*.

2.3 Benefici associati alla leucodeplezione pre-storage

Un altro aspetto rilevante dal punto di vista di rischio clinico per il ricevente è rappresentato dal momento in cui l'emocomponente è sottoposto a leucodeplezione. Può

essere eseguita durante la raccolta e la lavorazione del prodotto (*pre-storage*), oppure dopo la lavorazione, in laboratorio o direttamente al letto del paziente (*post-storage*). Soltanto la leucodeplezione *pre-storage* è stata indicata dall'ultimo decreto, ed è il sistema attualmente ampiamente accettato dal mondo occidentale, per i suoi dimostrati benefici (9, 42).

I vantaggi sono:

- prevenzione dell'accumulo di mediatori pro-infiammatori e pro-trombotici (citochine come interleuchina 1, 6, fattore di necrosi tumorale, CD40 ligando prodotte dai leucociti e piastrine durante il periodo di conservazione dell'emocomponente (40, 43) e che contribuiscono alla "lesione da conservazione" (tabella 3). Per questo risulta efficace nel prevenire le *FNHTR* (44, 45).
- riduzione del rischio di alloimmunizzazione-HLA nei pazienti politrasfusi, dato che precocemente rimuove leucociti integri, rispetto ad una filtrazione al letto del paziente dove frammenti leucocitari accumulati durante il periodo di conservazione possono attraversare il filtro e alloimmunizzare il ricevente.
- riduzione del rischio di trasmissione di virus leucotropici dato che il leucocita a 72h di conservazione tende a degradarsi e a rilasciare gli organismi intracellulari.
- maggiore semplicità ad eseguire i controlli di qualità sul processo di leucodeplezione eseguito in laboratorio, piuttosto che al letto del paziente.
- Assenza di reazioni ipotensive dopo trasfusione nel ricevente. Queste reazioni sono state descritte a seguito di trasfusione di emocomponenti filtrati al letto del paziente, ma non a seguito di leucodeplezione *pre-storage*. Queste reazioni sembrerebbero legate alla generazione di bradichinina e possibilmente altri vasodilatatori al momento in cui il plasma passa dal filtro (46).

Tabella 3. Mediatori biologici dannosi che si accumulano durante la conservazione del sangue.

Leucociti, piastrine ed emazie producono mediatori solubili durante la conservazione che possono arrecare effetti avversi al ricevente la trasfusione. Alcune di queste reazioni possono essere mitigate, almeno in parte, attraverso leucodeplezione pre-storage e/o lavaggio post-storage delle cellule, prima della trasfusione. Microparticelle e invecchiamento delle componenti cellulari indotto dalla conservazione possono anche esse contribuire agli avversi effetti immunologici avversi, reologici e vascolari osservabili a seguito della trasfusione (47).

Emazie danneggiate dalla conservazione	Microparticelle	Emoglobina cellulare libera	Mediatori Lipidici	sCD40L	MCP-1	IL-8	IL-6	Mediatore
Emazie	Leucociti, Emazie, Piastrine	Emazie	Leucociti, Emazie, Piastrine	Piastrine	Leucociti	Leucociti	Leucociti	Origine cellulare
Alterazione del 2,3 BPG, ossido nitrico; alterazione delle proprietà adesive e reologiche	Attivazione cellule endoteliali, piastrine e cellule immunitarie dell'ospite; trasferimento del contenuto cellulare all'ospite	Generazione di radicali liberi; trasporto di ferro; attivazione piastrinica	Attivazione neutrofili e piastrine	Attivazione dei neutrofili, piastrine, cellule B e cellule endoteliali	Reclutamento di monociti, cellule T e cellule dendritiche	Reclutamento dei neutrofili	Mediatore nelle risposte della fase acuta; attivazione piastrinica	Meccanismo di azione suggerito
Deregolato rilascio dell'ossigeno, disfunzione vascolare, trombosi	Trombosi; infiammazione	Altera lo stato redox; infezione di Fosters e disfunzione vascolare	Infiammazione; TRALI	Infiammazione; TRALI	Infiammazione; media i sintomi delle reazioni emolitiche trasfusionali	Infiammazione	Infiammazione; febbre	Potenziali effetti clinici
Riduzione del tempo di conservazione	Leucodeplezione Lavaggio	Lavaggio Riduzione del tempo di conservazione	Leucodeplezione Lavaggio	Leucodeplezione Lavaggio	Leucodeplezione Lavaggio	Leucodeplezione Lavaggio	Leucodeplezione Lavaggio	Strategia preventiva

3. METODI DI CONTEGGIO PER IL CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DELLE UNITA' LEUCODEPLETE

Gli emocomponenti cellulari contengono un notevole numero di leucociti residui provenienti dal donatore (Tabella 4). Il grado al quale un emocomponente si può considerare adeguatamente leucoridotto è variato negli anni: il livello di 5×10^6 globuli bianchi (GB) per unità di concentrato eritrocitario (CE), stabilito per la prima volta nel 1991 dall'*American Association of Blood Banks* (AABB) ed esteso, poi, ai concentrati piastrinici (CP) nel 1996, è stato implementato a 1×10^6 per unità e in via di estensione a tutti i CE e CP secondo le ultime raccomandazioni europea (3) e italiana (4).

Tabella 4. Numero approssimativo di globuli bianchi (GB) negli emocomponenti

Emocomponente	N° approssimato di GB/unità
Sangue intero (fresco)	10^9
Concentrato eritrocitario (CE)	10^8 - 10^9
CE deprivato di buffy-coat	10^8
CE lavato	10^7
CE congelato e deglicerolizzato	10^6 - 10^7
Concentrato piastrinico (CP)	10^7 - 10^8
CP da aferesi	10^5 - 10^8
Plasma fresco congelato (PFC)	$<10^4$

Nell'ultima decade, una maggiore consapevolezza degli effetti sfavorevoli ha costituito la spinta a migliorare i differenti metodi di leucoriduzione ed a permettere una riduzione dei leucociti di 3-4 logaritmi.

È importante, per motivi normativi, clinici, finanziari e tecnici riguardanti gli emocomponenti leucodepleti, verificare se il prodotto finale risponde alle attese per quanto riguarda il contenuto in leucociti. Per una unità di circa 300 ml di volume il limite massimo accettabile di contaminazione dei leucociti risulta essere di circa 3,3 cellule/ μ l. La bassa concentrazione di leucociti che si ottiene è dunque sotto la soglia degli usuali metodi di

conteggio. L'esame emocromocitometrico è inadeguato, perché la soglia minima accuratamente rilevabile di conteggio è già ampiamente superiore (100 cellule/ μ L).

In qualche circostanza può essere sufficiente assicurarsi che il prodotto "ha superato" o "non ha superato" gli standard accettati di leucoriduzione. Tuttavia, non è stato ancora precisato il più basso limite di leucodeplezione al quale possono intervenire tutte le reazioni avverse dovute ai globuli bianchi trasfusi.

Per contare i leucociti residui sono stati utilizzati diversi metodi: microscopia ottica e a fluorescenza; test radioimmunologici; citometria a flusso; citometria volumetrica capillare (48); reazione polimerasica a catena (PCR) (49). Il metodo più largamente impiegato in passato è stato l'emocitometro ad ampia camera (da 50 μ L) di Nageotte. Il campione da contare veniva mescolato con una soluzione che lisa eritrociti e piastrine e con un colorante nucleare, veniva lasciato riposare nella camera di conteggio e poi esaminato a ingrandimenti 200 x. Se letto da un esaminatore esperto, il metodo risultava semplice e in grado di contare, approssimativamente, 1 leucocita per μ L (50). Mediante la concentrazione di un campione più ampio, il limite inferiore di individuazione del metodo basato sulla camera di Nageotte poteva essere ulteriormente abbassato (51). Il metodo del conteggio in microscopia presentava però una variabilità intrinseca operatore dipendente ed era un procedimento lungo.

La prima tecnica di conteggio in citometria a flusso è stata introdotta da Dzik (52). La citometria a flusso, con le nuove piattaforme, permette di esaminare campioni di volume maggiore, e più rapidamente, raggiungendo un livello inferiore di accuratezza pari a 0,1 leucocita per μ L (53). Nella maggior parte dei metodi citometrici un detergente permeabilizza i leucociti residui nell'emocomponente e lisa i globuli rossi, mentre un colorante nucleare fluorescente (DAPI, ioduro di propidio, TO-PRO-3) colora i leucociti. L'emissione di luce generata viene analizzata e da essa è ricavato il numero dei leucociti. Sono stati introdotti conteggi su singola piattaforma che utilizzano microsferi come riferimento interno per una quantificazione assoluta (Leucocount, Becton Dickinson Biosciences) (54) o tecniche volumetriche con sistemi che aspirano precisi volumi (55). Lo svantaggio più grande di questi sistemi risiede nei costi dei reagenti e nella necessità di una apparecchiatura costosa. La citometria volumetrica capillare, insieme ad altri metodi, come le tecnologie in PCR, non hanno avuto larga diffusione. Le metodiche basate sulla PCR hanno un limite inferiore di individuazione accettabile ma hanno lo svantaggio di un impegno pesante, di apparecchiature e materiale di consumo costosi e della possibile contaminazione del campione.

4. IL MODULO XN-BF NELL'ANALIZZATORE EMATOLOGICO SYSMEX XN-9000

L'analizzatore ematologico Sysmex XN-9000 è un analizzatore multi-parametrico in grado di analizzare campioni da sangue intero in anticoagulante (K_2 o K_3 EDTA) e analizzare fluidi biologici (pleurico, peritoneale, da dialisi peritoneale (CAPD) e sinoviale) raccolti in provette con anticoagulante. Può anche eseguire analisi su campioni di liquido cefalorachidiano in provetta senza anticoagulante. L'analizzatore è dotato di due modalità dedicate a conteggi di campioni a bassissima cellularità: LOW WBC per conteggi su sangue a basso contenuto di bianchi (minimo valore identificabile 10 cellule/ μ L) e la modalità fluido biologico (XN-BF mode), dedicata alla lettura dei fluidi corporei tra cui il liquor (minimo valore identificabile 1 cellula/ μ L) (56). Il modulo XN-BF è stato sviluppato e validato per conteggi molto accurati di fluidi biologici e liquidi cefalorachidiani contenenti un numero veramente basso di leucociti (57, 58, 59, 65). I parametri refertabili in questa modalità sono il conteggio totale dei bianchi, la differenziazione leucocitaria in cellule mononucleate e polimorfonucleate, il conteggio di cellule nucleate non leucocitarie e il conteggio dei globuli rossi.

Il conteggio e la differenziazione delle cellule nucleate avviene nel canale differenziale della formula leucocitaria mediante citometria a flusso in fluorescenza, utilizzando gli stessi reagenti previsti per la formula leucocitaria su sangue intero, ma usando algoritmi dedicati ai liquidi biologici. Non sono refertabili al momento il conteggio di neutrofili, linfociti, monociti e eosinofili, ma sono ricavabili solo come parametri di ricerca. I globuli rossi sono rilevati mediante metodo resistivo con focalizzazione idrodinamica.

La maggiore sensibilità riguardo ai bassi conteggi cellulari è resa possibile dall'esecuzione automatica di una procedura di background che automaticamente viene eseguita quando allo strumento si chiede di passare dalla modalità sangue intero a fluido biologico. Essa consiste di un lavaggio della camera di reazione, per rimuovere cellule residue da letture precedenti, e di una lettura del bianco. Fino a che il conteggio dei leucociti non scende a ≤ 1 cellula/ μ L e quello dei globuli rossi a $\leq 3 \times 10^9$ / μ L vengono eseguiti cicli di background, fino ad un massimo di tre. Questo procedimento minimizza l'effetto dovuto al trascinarsi causato da sangue intero ad elevata cellularità assicurando misure accurate del conteggio totale e differenziale dei bianchi in situazioni di conteggi estremamente bassi. In aggiunta viene analizzato un volume del campione 10 volte maggiore rispetto a quello in modalità sangue intero (56).

Non esistono evidenze circa il suo utilizzo per il conteggio dei leucociti residui negli emocomponenti leucodepleti.

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Presso la S.C di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia dell'Azienda USL Toscana Nordovest - presidio di Lucca il controllo di qualità interno (CQI) per la contaminazione da leucociti delle unità leucodeplete è eseguito mediante metodo citofluorimetrico BD Leucocount (BD Biosciences).

Per esigenze organizzative, al fine di semplificare e velocizzare questo aspetto del CQI, in questo studio abbiamo voluto valutare il nuovo analizzatore ematologico Sysmex XN-9000 (Dasit), come metodo alternativo al Leucocount per l'esecuzione del controllo delle unità leucodeplete. L'analizzatore Sysmex XN-9000 è dotato di un modulo di analisi per i fluidi biologici (XN-BF), sviluppato per il conteggio accurato dei leucociti nei fluidi biologici al di sotto del limite di misura degli usuali analizzatori ematologici. La piattaforma automatizzata Sysmex è sempre operativa, i conteggi sono rapidi, non richiedono pre-trattamento dei campioni e i costi a determinazione sono ridotti rispetto al metodo citofluorimetrico.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

1. EMOCOMPONENTI IN STUDIO

Tutti gli emocomponenti in studio sono stati prodotti, in accordo alla normativa nazionale vigente e alle raccomandazioni europee (3, 4), dalla S.C. Medicina Trasfusionale e Immunoematologia dell'Azienda USL Toscana Nordovest - presidio di Lucca, nel periodo compreso tra ottobre 2015 e giugno 2016.

Sono state analizzate 89 unità totali, sottoposte a leucodeplezione *pre-storage* in corso di produzione. Il repertorio delle unità comprendeva 54 concentrati piastrinici da pool di *buffy-coat* (BC), 15 concentrati piastrinici da aferesi e 20 concentrati di globuli rossi da aferesi.

1.1 Produzione dei concentrati piastrinici da pool di buffy-coat (BC)

I concentrati piastrinici da pool di BC sono prodotti dalla lavorazione di donazioni di sangue intero. Una dose terapeuticamente efficace è costituita da cinque unità di BC derivanti da cinque donatori diversi, selezionate per compatibilità di gruppo sanguigno.

Ogni unità di sangue intero entro tre ore dalla raccolta viene frazionata in globuli rossi, plasma, e pellet leucocito-piastrinico ("*buffy-coat*"). Il metodo di separazione nelle tre componenti è basato su una centrifugazione dell'unità di sangue intero, prelevato in apposite sacche (CompoFlow, Fresenius Kabi) e raccolta delle frazioni in sacche satellite.

I BC, diluiti in una quantità variabile di plasma (30-50 ml), sono conservati in agitatore termostato a $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per un periodo massimo di 72 ore dalla raccolta.

Il pool da BC è ottenuto riunendo in una sacca madre (COMPOSTOP CS, Fresenius Kabi) le cinque unità di BC, mediante saldatura sterile dei tubi efferenti da ciascuna sacca di BC su sistema CompoDock (Fresenius Hemocare), e con successiva aggiunta di 300-350 ml di soluzione conservante per piastrine Composol PS (Fresenius Kabi). La relativa quota di plasma in cui sono sospesi viene così ridotta. Il pool ottenuto è centrifugato a 2000 giri per 15 minuti, a 22 °C (centrifuga refrigerata Jouan). Il sopranatante, che costituisce il concentrato piastrinico, è separato dalla componente leucocitaria per spremitura meccanica dall'alto della sacca madre, successiva filtrazione in linea su COMPOMAT G4 (Fresenius Hemocore) e raccolta in una sacca satellite. I concentrati piastrinici sono conservati in agitatore termostato a $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ fino a 120 ore dalla raccolta dei *buffy-coat* che lo compongono.

1.2. Produzione dei concentrati piastrinici da aferesi

I concentrati piastrinici sono ottenuti da singole donazioni effettuate in "aferesi" mediante separatori cellulari.

Due sono le tipologie di separatori cellulari utilizzati presso la S.C. Medicina Trasfusionale e Immunoematologia: Trima (Accel Gambro) e Haemonetics (MCS 3p). Su entrambi i separatori si possono eseguire prelievi selettivi di una o più emocomponenti (aferesi selettiva o aferesi multi-component). Queste ultime possono essere così composte: eritroplasmaferesi, plasmapiastrinoafèresi o eritropiastrinoafèresi.

La leucodeplezione è effettuata sul separatore cellulare in corso di produzione. Il sistema Haemonetics (MCS 3p) utilizza il principio della filtrazione post-raccolta con l'uso di un filtro in linea. Negli apparecchi TRIMA (Accel Gambro), è stato invece integrato un sistema LRS (Leukocyte Reduction System) basato sul principio della separazione su letto di particelle fluide. Una camera di raccolta a forma conica è stata aggiunta al set di raccolta delle piastrine. Il concentrato piastrinico entra nel punto più stretto della camera conica. Il flusso che si sviluppa nella parte più larga della camera determina un rallentamento della velocità delle particelle. La decelerazione è maggiore per le particelle più pesanti, quali i leucociti, mentre le particelle più leggere, quali le piastrine, avanzano al livello più alto della camera e successivamente sfuggono nella sacca di raccolta. L'ampiezza della camera conica favorisce la gradualità della raccolta. Il modello è così concepito che ogni globulo bianco che si porti a un livello più alto viene respinto indietro al centro della camera e allontanato dalla via di uscita dalle forze centrifughe. La camera conica si restringe verso l'alto, determinando una maggior accelerazione delle piastrine verso la via d'uscita (principio dell'elutrazione) (46)

I concentrati piastrinici sono risospesi in un liquido composto per il 30% circa da plasma e per il 70% circa da soluzione conservante per piastrine (SSP, MacoPharma). Sono conservabili fino a 5 giorni dalla raccolta in agitatore termostato a $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

1.3. Produzione dei concentrati di globuli rossi da aferesi

Sono ottenuti mediante procedura di aferesi come descritto nel paragrafo precedente. Il 95% circa di plasma è rimosso ed i globuli rossi sono sospesi in 80-100 ml di soluzione "additiva" composta da soluzione fisiologica, adenina, glucosio, mannitolo (SAGM). Tale soluzione consente di ridurre al minimo la quantità di plasma, di disporre di emazie ad un valore di ematocrito elevato di circa 65%-75% ed inoltre consente il prolungamento del periodo di conservazione. I concentrati di globuli rossi sono conservati in frigoemoteche a temperatura controllata di $+2-6^{\circ}\text{C}$ fino a 35 giorni dalla raccolta.

2. CONTROLLO DI QUALITÀ

Tutte le categorie di emocomponenti afferenti alla S.C. Medicina Trasfusionale e Immunoematologia sono sottoposte a controllo di qualità in conformità alle disposizioni di legge vigenti ed alle raccomandazione europee (3, 4).

Il controllo di qualità garantisce che il prodotto finale sia sicuro ed efficace dal punto di vista terapeutico per il ricevente. Inoltre, qualora il prodotto non risulti conforme ai requisiti prestabiliti, consente di adottare tempestivamente azioni correttive. L'emocomponente da trasfondere deve avere un volume ed una cellularità adeguata alla sua finalità terapeutica. È fondamentale che durante le fasi di produzione e conservazione le componenti cellulari rimangano vitali e funzionali, nonché biologicamente sicure.

Pertanto per le unità prodotte sono valutati parametri come il volume, la concentrazione delle componenti cellulari, la presenza di leucociti dopo la leucodeplezione e lo stato di conservazione (sterilità, emolisi, presenza di coaguli, pH per i concentrati piastrinici). I controlli di qualità sono effettuati, secondo dei criteri di randomizzazione, su un numero di emocomponenti appropriato, ai fini della significatività statistica dei controlli stessi, rispetto alle quantità prodotte.

La conformità o non conformità delle unità sono registrate su report informatizzati del sistema gestionale informatico del Servizio Trasfusionale (TMM).

Gli standard qualitativi e i controlli richiesti per le unità oggetto dello studio sono descritti nel Manuale della Qualità della S.C. Medicina Trasfusionale e Immunoematologia e nel Doc SIT 11 “Emocomponenti: repertorio, standard qualitativi e controlli di qualità”. Questi standard sono riportati sinteticamente nella tabella 1 “Standard qualitativi emocomponenti e controlli di qualità”. I risultati dei controlli di qualità sono inoltre documentati mensilmente in un report redatto utilizzando il Mod SIT 18 “Registro Controlli di Qualità Emocomponenti” (secondo la Procedura PG SIT 15 “Controllo di Qualità Emocomponenti”).

2.1 Valutazione del volume

I concentrati piastrinici da pool di BC sono pesati su bilancia analitica. Dopo la pesatura della sacca il volume netto dell’unità è calcolato secondo la formula:

$$\text{Volume in ml} = \frac{\text{Peso lordo (gr)} - \text{tara sacca (gr)}}{\text{*Fattore di conversione}}$$

** Il fattore di conversione permette la trasformazione dei grammi (gr) in millilitri (mL) e dipende dall’emocomponente e le sue caratteristiche; per esempio il fattore per una unità di concentrato piastrinico è 1,03*

Per le unità da aferesi il volume è rilevato direttamente sul separatore cellulare. Il controllo è eseguito giornalmente su tutte le unità.

2.2 Concentrazioni cellulari degli emocomponenti

La cellularità delle unità prodotte è verificata su un campione dall’unità mediante esame emocromocitometrico.

2.2.1 Campionamento dell’unità

E’ importante che il campione che viene analizzato sia completamente rappresentativo dell’unità. Di ciascuna unità viene utilizzato il tubo apposito per la campionatura della sacca, detto “codino”. Prima del campionamento l’unità è miscelata almeno cinque volte previa svuotamento per spremitura del “codino”. Il contenuto è raccolto in una provetta senza anticoagulante e conservato alla temperatura indicata per la conservazione di quel determinato emocomponente (per esempio +22°C in agitazione se viene campionato una unità di concentrato piastrinico). Prima dell’esecuzione dell’esame emocromocitometrico, il campione è portato a temperatura ambiente (TA) e miscelato.

2.2.2 Esame emocromocitometrico

Il conteggio delle cellule presenti negli emocomponenti (leucociti in unità non leucodeplete, globuli rossi e piastrine), la determinazione dell'ematocrito ed emoglobina sono eseguiti su analizzatore di ematologia (Beckman Coulter) presente nella S.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale. Data l'elevata cellularità nei concentrati (per i concentrati piastrinici si arriva a 3×10^{11} piastrine per unità in media) il campione è opportunamente diluito in soluzione fisiologica: 1:5 per il conteggio delle piastrine nei concentrati piastrinici, 1:2 per il conteggio dei globuli rossi nei concentrati eritrocitari. Entrambe le popolazioni sono conteggiate secondo il principio impedenziometrico.

Dai dati dell'esame e con riferimento al volume dell'unità viene calcolato il contenuto totale delle varie componenti a seconda del tipo di unità.

Per quanto riguarda il conteggio dei globuli bianchi residui negli emocomponenti leucodepleti, l'esame emocromocitometrico è inadeguato, perché la soglia minima rilevabile di conteggio è già ampiamente superiore al valore atteso dal controllo di qualità interno (CQI).

3 CONTEGGIO DEI LEUCOCITI RESIDUI DOPO LEUCODEPLEZIONE MEDIANTE METODO CITOFUORIMETRICO LEUCOCOUNT (METODO IN USO)

Presso la S.C. Medicina Trasfusionale e Immunoematologia il conteggio è eseguito mediante kit diagnostico BD Leucocount (BD Biosciences) su citofluorimetro BD FACSCanto (BD Biosciences). Il conteggio dei leucociti totali è eseguito in singolo su tutti gli emocomponenti utilizzando lo stesso prelievo dell'unità utilizzato per l'esame emocromocitometrico.

La metodologia è basata sulla fluorescenza nucleare con ioduro di propidio e conta assoluta in singola piattaforma con microsferi fluorescenti a concentrazione nota. La reazione ed il protocollo di analisi su citofluorimetro è eseguito secondo le indicazioni della ditta produttrice. Si utilizzano tubi BD Trucount contenenti biglie liofile a concentrazione nota marcate con un fluoroforo. Questa tecnologia permette la conta assoluta dei globuli bianchi. Nel tubo sono stati aggiunti 100 μ l per ciascun campione e 400 μ l di reagente BD Leucocount, che contiene una soluzione di Sodio Citrato (0.1%), NP-40 (0.5%), RNAasi (0.1mg/ml), e la soluzione colorante di ioduro di propidio (50 mg/ml). La soluzione Sodio Citrato 0.1% è una soluzione ipotonica che ha la funzione di lisare i globuli rossi. Il detergente (NP40) ha lo scopo di permeabilizzare le membrane dei globuli bianchi per consentire

l'ingresso del colorante degli acidi nucleici. L'RNasi ha la funzione di digerire enzimaticamente l'RNA presente nel campione allo scopo di ridurre le colorazioni aspecifiche dovute all'RNA cellulare. Lo ioduro di propidio è un colorante specifico per DNA/RNA che colora tutte le cellule nucleate. Viene eccitato a 488 nm ed ha un picco di emissione a 617 nm, che viene analizzato sul canale FL-2 del citofluorimetro. La brillante fluorescenza dei leucociti consente una buona separazione dagli elementi non nucleati come gli eritrociti e le piastrine, che non legano il colorante.

Prima dell'analisi ogni tubo è stato mescolato nuovamente su agitatore Vortex con cura e successivamente acquisito al citofluorimetro mediante software BD FacsDiva (BD Biosciences).

L'analisi dei campioni è stata effettuata creando una serie di grafici di tipo "Dot Plot" sul cui asse delle ascisse (x) è riportata la fluorescenza FL-1 e sull'asse delle ordinate (y) la fluorescenza FL-2 (figura 1). Agli eventi legati alla fluorescenza delle fluorosfere presenti nel tubo Trucount è stato realizzato il gate P1 e il conteggio viene interrotto al raggiungimento di almeno 10.000 eventi nella regione P1. Agli eventi risultati sopra un certo livello di fluorescenza aspecifica è stato creato il gate P2. Il numero degli eventi all'interno dei due gate è stato conteggiato dal software.

Il calcolo dei leucociti residui in ciascun campione è stato ottenuto dalla formula:

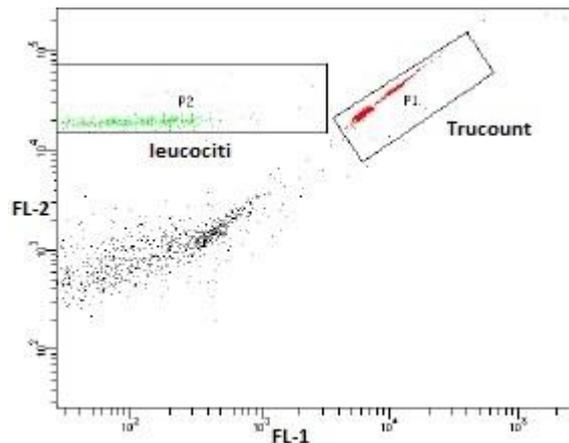
$$\text{leucociti residui} / \mu\text{l} = \frac{\text{n}^\circ \text{ eventi in P2} \times \text{n}^\circ \text{ fluorosfere per tubo}}{\text{n}^\circ \text{ eventi in P1} \times \text{volume del campione} (\mu\text{l})}$$

Il n° di fluorosfere per tubo è indicato dalla ditta produttrice e varia da un lotto all'altro di reattivo. Il n° eventi in P1 è 10.000, e il volume del campione è 100 µl.

La conta assoluta dei leucociti residui per unità di emocomponente, espressa x 10⁶, è stata ottenuta dalla formula:

$$\text{leucociti residui} / \text{unità} = \frac{\text{n}^\circ \text{ leucociti residui} / \mu\text{l} \times \text{volume unità} (\mu\text{l})}{10^6}$$

Figura 1. Report strumentale dell'analisi Leucocount. E' riportato il plot con la distribuzione degli eventi fluorescenti. Il gate P2 è stato disegnato attorno agli eventi relativi alla fluorescenza generata dal colorante ioduro di propidio intercalato al DNA dei leucociti. Nel gate P1 si localizzano gli eventi delle biglie marcate con fluoroforo a fluorescenza maggiore presenti nei tubi di reazione Trucount. Il conteggio viene interrotto quando nel gate P1 sono raggiunti 10.000 eventi.



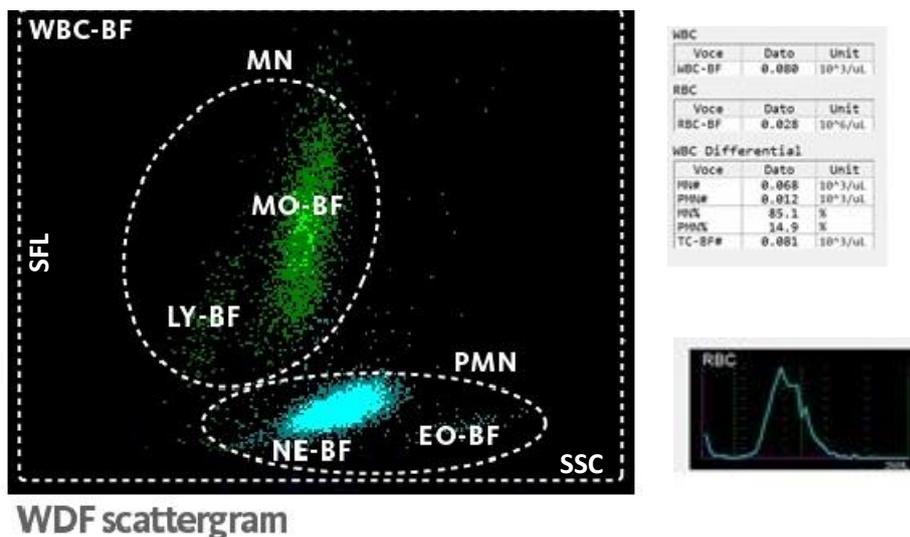
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	11,720	100.0	100.0
P1	10,000	85.3	85.3
P2	595	5.1	5.1

4. VALUTAZIONE DELLA QUALITA' ANALITICA DEL SYSMEX XN-9000 IN MODALITA' DI ANALISI FLUIDO BIOLOGICO (XN-BF) (METODO IN PROVA)

L'analizzatore ematologico Sysmex XN-9000 esegue in automatico il conteggio sui fluidi biologici, selezionando sullo strumento la modalità Body Fluid (BF). In breve, 88 µl di campione sono aspirati e miscelati in camera di reazione con 1 ml di una soluzione (Lysercell WDF, Dasit) che lisa gli eritrociti e 20 µl di colorante polimetinico (Fluorocell-WDF, Dasit) per acidi nucleici cellulari (DNA/RNA). La miscela è opportunamente diluita e immessa nella cella di flusso (FCM detector block), mediante meccanismo di focalizzazione idrodinamica in modo che le cellule passino allineate al centro della cella di flusso. Le cellule che attraversano la cella di flusso sono colpite dal raggio emesso da un laser a semiconduttori (lunghezza d'onda $\lambda = 633$ nm). La luce dispersa anteriormente e lateralmente viene catturata dal fotodiodo, mentre la luce fluorescente laterale è catturata dal fotodiodo a valanga. La luce dispersa anteriormente (forward scatter-FCS) fornisce informazioni sulle dimensioni delle cellule, la luce dispersa lateralmente (side scatter-SSC) fornisce informazioni sull'interno delle cellule (cioè dimensioni del nucleo, etc.). La luce concentrata sulle cellule ematiche

colorate (fluorescent) produce luce a lunghezza d'onda superiore alla luce originaria. Misurando l'intensità della fluorescenza emessa si possono ottenere informazioni sul grado di colorazione delle particelle ematiche e quindi sulla quantità di acidi nucleici presenti nel nucleo o negli organuli citoplasmatici. La luce fluorescente viene emessa in tutte le direzioni; lo strumento rileva la luce fluorescente emessa lateralmente (side fluorescent light-SFL). Queste luci convertite in impulsi elettrici permettono di ottenere informazioni sulle cellule ematiche. L'analizzatore in automatico caratterizza e classifica le particelle contenute nel campione in analisi combinando le informazioni provenienti da scatter frontale (dimensioni cellulari), scatter laterale (complessità interna della cellula) e intensità di fluorescenza (contenuto di DNA/RNA) (62). L'analizzatore usa uno scattergramm 4DIFF per calcolare e mostrare il conteggio di tutte le cellule nucleate, il conteggio dei leucociti totali, i valori in percentuale e in assoluto delle cellule mononucleate e polimorfonucleate. In un canale separato con metodo impedenziometrico vengono conteggiati i globuli rossi e mostrato il diagramma di distribuzione (figura 2).

Figura 2. Citogramma del canale dei globuli bianchi (WDF) su Sysmex XN-9000 in modalità fluido biologico (BF). Si possono visualizzare i leucociti, distribuiti nelle due nuvole corrispondenti ai polimorfonucleati PMN (a maggiore Side Scatter, SSC) e mononucleati MN. Sono indicate anche le differenti popolazioni leucocitarie: linfociti (LY), monociti (MO), neutrofili (NE) e eosinofili (EO). A destra la distribuzione dei globuli rossi (RBC) conteggiati mediante metodo impedenziometrico e la tabella che riporta direttamente il conteggio assoluto dei leucociti ($10^3/\mu\text{l}$) nel fluido biologico (WBC-BF), dei RBC-BF ($10^6/\mu\text{l}$), e il conteggio differenziale in assoluto (#) e percentuale (%) dei mononucleati (MN) e dei polimorfonucleati (PM).



4.1. Determinazione della precisione e linearità

Per determinare la precisione ed il profilo di precisione è stato utilizzato il livello 1 del controllo di qualità interno per fluidi biologici (BF XN-check, Dasit). Il BF XN-check livello 1 ha un valore atteso di 83/ μ l leucociti circa. È stato diluito con il diluente per analizzatore Sysmex Cell Pack DCL (Dasit) 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:64 al fine di ottenere campioni contenenti rispettivamente 40, 20, 10, 5 e 2,5 leucociti/ μ l. Il BF XN-check e le diluizioni sono state conteggiate in triplicato. Sono stati condotti due esperimenti indipendenti. Il valore medio del conteggio dei leucociti per ciascuna diluizione (6 misure in tutto) è stato riportato in grafico verso il rispettivo coefficiente di variazione (CV %).

I valori ottenuti dai conteggi sono stati riportati in grafico (asse y) verso il valore atteso (asse x). La linearità è stata valutata dall'equazione della retta di regressione ($y = ax + b$) e dal suo coefficiente di correlazione (R^2).

4.2. Determinazione dei leucociti residui negli emocomponenti

Negli 89 campioni in studio oltre ai controlli di qualità precedentemente descritti, sono stati conteggiati i globuli bianchi residui utilizzando il Sysmex XN-9000 in modalità fluido biologico (XN-BF). Il numero dei leucociti residui per μ l è riportato direttamente nel report strumentale (figura 2). Il numero dei globuli bianchi per unità è stato calcolato come precedentemente riportato.

4.2 Verifica dell'effetto matrice dei concentrati piastrinici sulle prestazioni analitiche dell'XN-BF

Un'aliquota di un campione di sangue intero, raccolto in provetta contenente anticoagulante Na-Citrato, a concentrazione nota di leucociti è stata diluita in soluzioni differenti (matrici). Sono state usate la soluzione diluente Cell Pack DCL (Dasit) specifica per l'analizzatore Sysmex e la sostanza nutritiva di risospensione dei pool da BC (Composol PS). La terza matrice che consisteva in un concentrato piastrinico di pool di BC con conteggio di leucociti effettuato con il leucocount inferiore al limite di sensibilità 0,1/ μ l. Sono stati ottenuti campioni con concentrazioni attese di 3.000, 300, 30 e 3 globuli bianchi per μ l. Ciascuna diluizione è stata conteggiata in triplicato sull'XN-BF e confrontata con il valore atteso. I campioni ottenuti dalle diluizioni in concentrato piastrinico sono stati conteggiati anche con metodo Leucocount, verso cui sono stati comparati i risultati dei conteggi in XN-BF ottenuti nelle diverse matrici.

5. ANALISI STATISTICA

I risultati dei conteggi dei globuli bianchi residui negli 89 emocomponenti determinati sia con metodo in uso Leucocount che con metodo in prova XN-BF non seguivano una distribuzione gaussiana. Per questo stati descritti mediante il valore mediano e il range. L'accuratezza del metodo in prova rispetto a quello in uso è stata valutata mediante analisi di regressione e determinazione del bias secondo il "Protocollo operativo per la comparazione tra due metodi analitici nei laboratori clinici" redatto dal Gruppo di Studio SIBioC "Statistica per il Laboratorio".

Le coppie di valori generati dai due metodi sono state comparate mediante l'analisi di regressione di Passing-Bablok. Il modello di regressione non parametrico di Passing Bablok richiede il minor numero di assunzioni. Infatti, nella regressione di Passing Bablok i valori estremi possono essere inclusi, è consentita l'imprecisione in entrambi i metodi e non è necessario né che l'errore sia normalmente distribuito né che sia costante lungo l'intervallo di concentrazioni (63). Il numero dei leucociti residui/ μl ottenuti con il metodo Leucocount è stato riportato in un grafico xy sull'asse x, mentre il numero ottenuto per lo stesso campione con il metodo in prova XN-BF sull'asse y. Nel grafico è stata disegnata la linea di regressione ($y = ax+b$), le linee tratteggiate che delineano gli intervalli di confidenza (IC) e la linea di identità ($x=y$).

La presenza di un errore proporzionale del metodo in prova rispetto a quello in uso è stabilito quando l'intervallo di confidenza (IC) della pendenza a della retta di regressione non comprende il valore 1. La presenza di un bias costante è stabilito quando l'IC dell'intercetta b non comprende lo 0.

La valutazione dell'errore è stata eseguita mediante il grafico di Bland-Altman e determinazione del bias. Il numero dei leucociti residui espressi come media dei conteggi ottenuti dai dei due metodi sono riportati in grafico sull'asse delle ascisse (x) verso la loro differenza (asse y delle ordinate). Il bias rappresenta il valore medio della differenza dei conteggi. Un bias significativo è stabilito quando l'intervallo di confidenza (IC) al 95% del bias non comprende lo 0.

Per l'analisi statistica dei dati è stato usato il software Excel 2016 (Microsoft) e il software MedCalc.

6. VERIFICA DELL'ACCETTABILITA' DEL METODO IN PROVA

Il *cut-off* stabilito dalla normativa vigente per la contaminazione da leucociti residui negli emocomponenti leucodepleti è 1×10^6 leucociti per unità trasfusa.

Gli emocomponenti con un contenuto di leucociti per unità $< 1 \times 10^6$ stabilito con il metodo di riferimento in uso Leucocount sono stati classificati conformi, in caso contrario come non conformi.

La classificazione delle unità ottenute con il metodo in prova è stata confrontata con quella di riferimento.

La sensibilità del metodo in prova è stata calcolata secondo la formula: $VP/(VP+FN)$

VP = Vere conformi (leucociti/unità per il metodo in prova $< 1 \times 10^6$)

FN = False non conformi (leucociti/unità per il metodo in prova $> 1 \times 10^6$)

La specificità del metodo in prova è stata calcolata secondo la formula: $VN/(VN+FP)$

VN = Vere non conformi (leucociti/unità per il metodo in prova $> 1 \times 10^6$)

FP = False conformi (leucociti/unità per il metodo in prova $< 1 \times 10^6$)

Tabella 1. STANDARD QUALITATIVI EMOCOMPONENTI E CONTROLLI DI QUALITA'

Prodotto	Parametro	Standard	Tipo di controllo		Frequenza controllo	Numerosità campione e sue caratteristiche	Parametri di accettabilità
Globuli Rossi (da sangue intero e da aferesi)	Volume	280 mL ± 20%	1	Rilevazione da report informatizzato	Giornaliero	Tutte le unità	85% delle unità prodotte
	Ematocrito	0.50 – 0.70	2	Esame emocromocitometrico	Settimanale	4(*)	90% delle unità controllate
	Emoglobina	> 43 g	3	Esame emocromocitometrico	Settimanale	4(*)	90% delle unità controllate
	Leucociti residui / unità	≤ 1.2 x 10⁹	4	Esame emocromocitometrico	Settimanale	4(*)	90% delle unità controllate
	(*) Randomizzazione: 2 unità prodotte ogni lunedì e giovedì (ove applicabile, 3 da Donatore di sesso maschile e 1 da Donatore di sesso femminile)						
	Sterilità	Assenza di contaminazione batterica	5	Coltura / Test Bac T Alert	Mensile	Tutte le unità in scadenza	100% delle unità controllate
Emolisi al termine del periodo di conservazione	< 0.8% della massa eritrocitaria	6	Esame emocromocitometrico (su campione e su supernatante)	Mensile	4 Al termine del periodo di conservazione	95% delle unità controllate	

Prodotto	Parametro	Standard		Tipo di controllo	Frequenza controllo	Numerosità campione e sue caratteristiche	Parametri di accettabilità
Concentrato Piastrinico da pool di buffy coat e Concentrato Piastrinico da aferesi	Volume	> 40 mL x 60 x 10 ⁹ piastrine per pool e per aferesi	13	Rilevazione manuale da separatore cellulare, Rilevazione da Report informatizzato	Giornaliera	Tutte le unità prodotte in routine	90% delle unità prodotte in routine
	Conta piastrinica	Da pool > 2,5 x 10 ¹¹ / pool	14	Esame emocromocitometrico	Giornaliera	Tutte le unità prodotte in routine	85% delle unità prodotte
		Da aferesi > 2,5 x 10 ¹¹ / unità					
	Conta leucocitaria	Leucodepleto < 1 x 10 ⁶ / pool / aferesi	15	Conteggio leucociti totali in citofluorimetria	Mensile	10	85% delle unità controllate
	pH	>6.4	16	Rilevazione pH con test rapido	Mensile	4 unità in scadenza	90% delle unità controllate
	Sterilità	Assenza di contaminazione batterica	17	Coltura / Test Bact Alert	Mensile	Tutte le unità in scadenza	100% delle unità controllate

Prodotto	Parametro	Standard	Tipo di controllo		Frequenza controllo	Numerosità campione e sue caratteristiche	Parametri di accettabilità
Globuli Rossi Leucodepleti (con filtro bedside)	Emoglobina	> 40 g	18	Esame emocromocitometrico	Mensile	4	90% delle unità controllate
	Ematocrito	0.50 – 0.70	19	Esame emocromocitometrico	Mensile	4	90% delle unità controllate
	Leucociti residui / unità	< 1 x 10⁶	20	Conteggio leucociti totali in citofluorimetria	Mensile	10	90% delle unità controllate
Globuli Rossi Leucodepleti (filtrazione pre-storage)	Emoglobina	> 40 g	21	Esame emocromocitometrico	Mensile	4	90% delle unità controllate
	Ematocrito	0.50 – 0.70	22	Esame emocromocitometrico	Mensile	4	90% delle unità controllate
	Leucociti residui / unità	< 1 x 10⁶	23	Conteggio leucociti totali in citofluorimetria	Mensile	10	90% delle unità controllate
Nota. Ai prodotti si applicano gli stessi standard previsti per i Globuli Rossi con le eccezioni riportate nella presente tabella.							

CAPITOLO 3

RISULTATI

1. VALUTAZIONE DELLA QUALITA' ANALITICA DEL SYSMEX XN-9000 XN-BF

Abbiamo voluto verificare precisione e linearità dei conteggi dell'analizzatore in modalità fluido biologico su campioni che contenevano un numero di leucociti vicino al *cut off* di 3,3 globuli bianchi/ μl stabilito dalla normativa vigente per la contaminazione leucocitaria per una unità di volume medio di 300 ml, corrispondente ad un valore $<1 \times 10^6$ leucociti in totale per unità trasfusa.

La precisione è stata determinata sul BF XN-check e sue diluizioni seriali, contenenti un numero atteso di leucociti/ μl tra 80 e 1. In tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti. Per ogni campione è indicata la media, la deviazione standard e il coefficiente di variazione (%) ottenuti da due esperimenti indipendenti.

Il profilo di precisione è rappresentato graficamente in figura 1. Il CV (%) risulta $<10\%$ fino al conteggio di 5,5 leucociti/ μl (diluizione 1:16), mentre incrementa nei campioni a diluizione maggiore. Un CV del 21,3% è stato ottenuto per campioni contenenti circa 2 leucociti/ μl (diluizione 1:32).

La linearità è stata valutata in un intervallo compreso tra 80 e 1 leucocita/ μl circa. I conteggi ottenuti sul BF XN-check e sulle diluizione sono riportati in figura 2 (6 misure per campione). La linearità ($R^2 = 0,99$) è risultata ottima in questo intervallo.

Tabella 1. Precisione dei conteggi in modalità fluido biologico su BF XN-check e sue diluizioni seriali. È riportata la media, la deviazione standard (DS) ed il coefficiente di variazione CV (%).

	LEUCOCITI/ μ l		
	MEDIA	DS	CV (%)
BF-XN check	81,7	2,8	3,4
diluizione 1:2	40,7	1,1	2,7
diluizione 1:4	21,0	1,1	5,2
diluizione 1:8	10,5	1,0	10,0
diluizione 1:16	5,5	0,5	10,0
diluizione 1:32	2,3	0,5	21,3
diluizione 1:64	1,7	0,5	31,0

Figura 1. Curva di precisione per il conteggio dei leucociti totali usando diluizioni seriali del BF XN-check. Ciascun punto rappresenta il CV (%) relativo alla media dei 6 conteggi eseguiti per ogni campione.

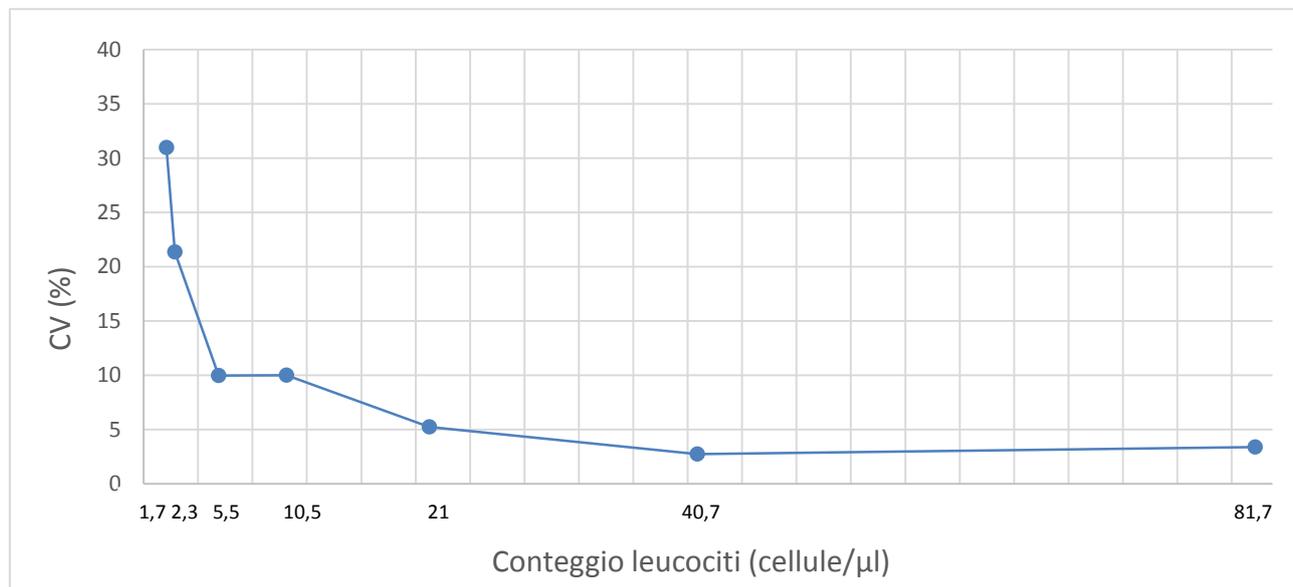
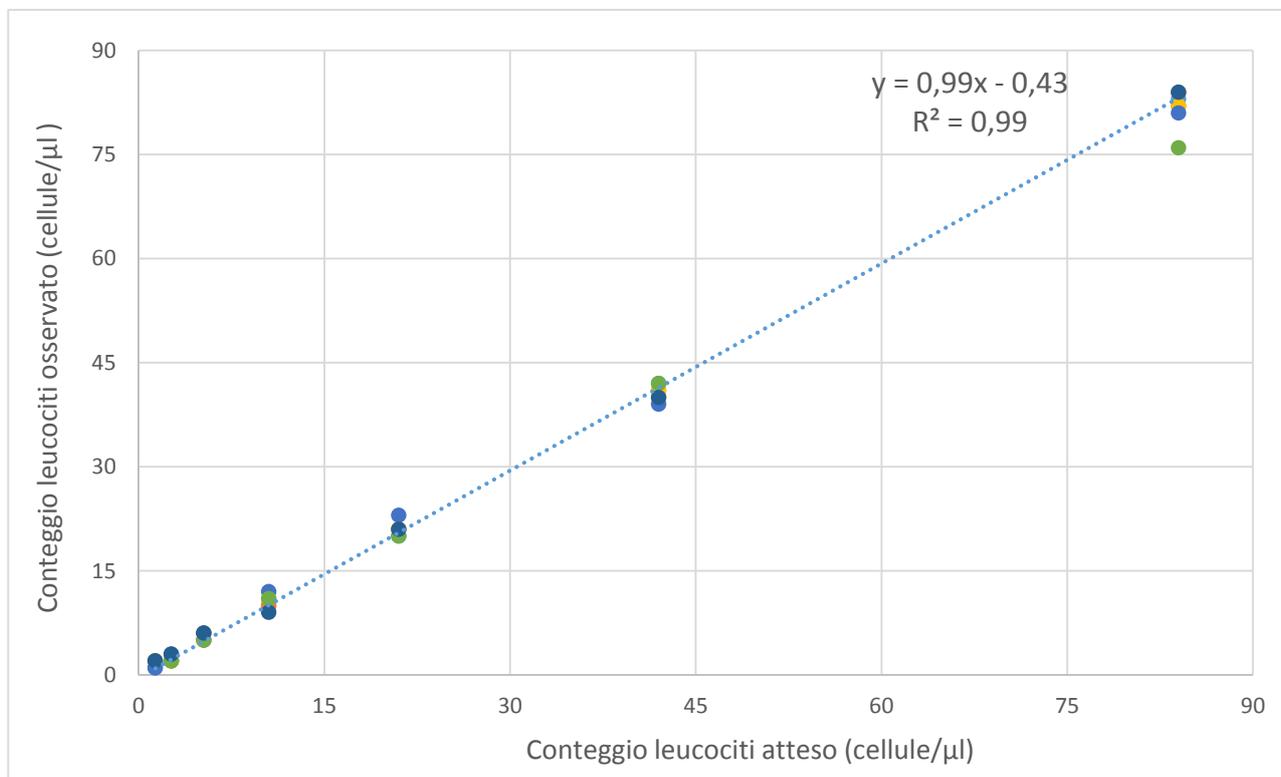


Figura 2. Linearità del Sysmex XN-9000 in modalità fluido biologico su diluizioni del controllo BF XN-check (a) e di un campione di sangue intero (b). E' riportata la retta di identità ($x=y$), la sua equazione ed il coefficiente di correlazione (R^2).



2. ANALISI DELL'ACCURATEZZA DEL METODO IN PROVA XN-BF MEDIANTE COMPARAZIONE CON IL METODO IN USO LEUCOCOUNT

Il numero di leucociti residui/ μl è stato conteggiato sulla stessa unità di campionamento prelevata da ciascun emocomponente leucodepleto con il metodo di riferimento Leucocount e con il metodo in prova XN-BF.

In figura 3 sono riportati i risultati dei due metodi di conteggio suddivisi per le tre tipologie di emocomponenti in studio: concentrati eritrocitari da aferesi, concentrati piastrinici da aferesi e concentrati piastrinici da pool di BC. In generale i conteggi mediante metodo in prova sono più elevati di quelli del metodo in uso. Il numero dei leucociti ottenuti in modalità XN-BF è più elevato rispetto al Leucocount su tutti i concentrati piastrinici da pool di BC e risulta essere da 1,4 a 356 volte maggiore. Su 11/15 concentrati piastrinici da aferesi è tra 1,12 e 40 volte maggiore rispetto al Leucocount mentre è comparabile per i restanti 4/15. Su 17/20 concentrati eritrocitari è incrementato da 1,35 a 38 volte rispetto al Leucocount e comparabile per 3/20. La dispersione dei conteggi ottenuti dalle due modalità di conteggio, rappresentata da valore mediano e range, è riportata in tabella 2.

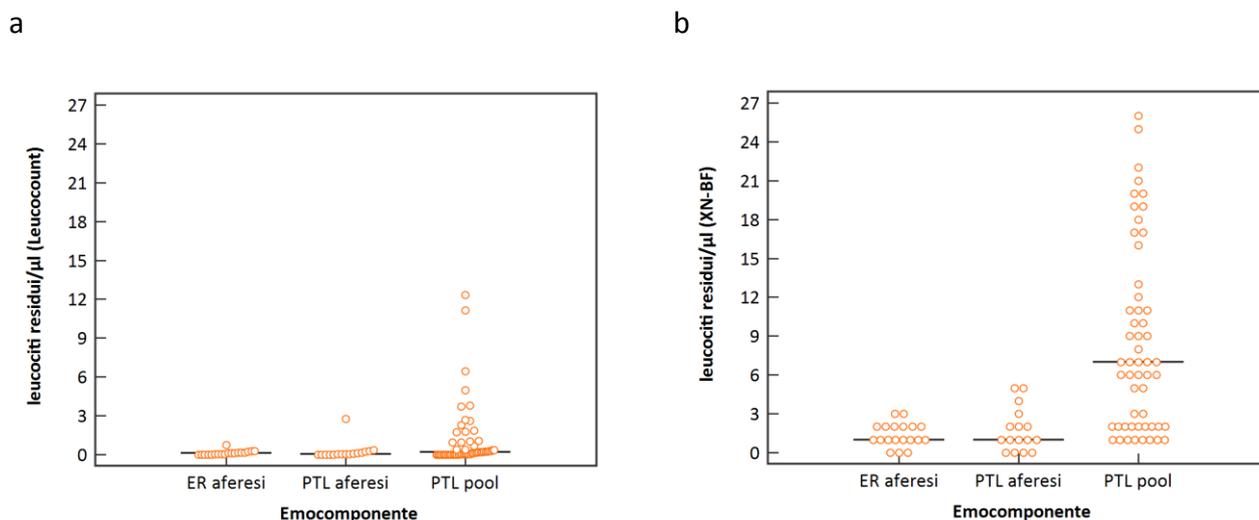
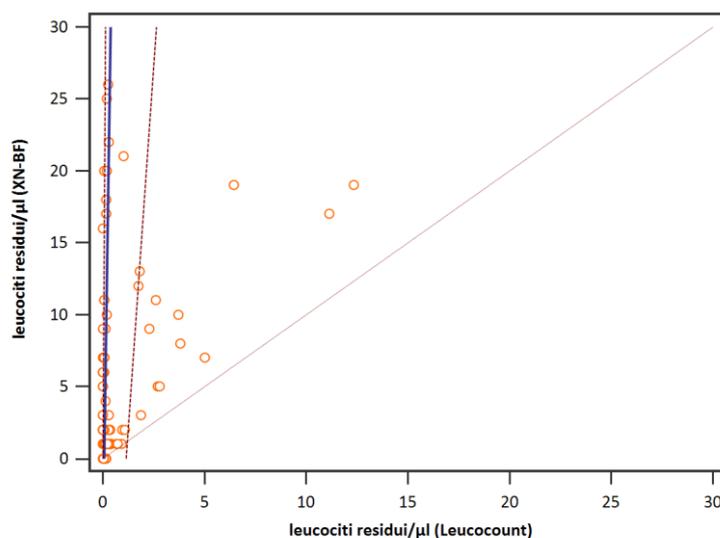


Figura 3. Numero di leucociti residui in 20 concentrati eritrocitari da aferesi (ER aferesi), 15 concentrati piastrinici da aferesi (PTL aferesi) e in 54 concentrati piastrinici da pool di BC (pool) conteggiati con Leucocount (a) e XN-BF (b). Il numero di leucociti residui è espresso per μl . La barra orizzontale indica il valore mediano dei leucociti residui/ μl .

Tabella 2. Valore mediano e range dei conteggi in Leucocount e XN-BF sulle unità leucodeplete

Emocomponente	N°	LEUCOUNT (leucociti/ μ l)		XN-BF (leucociti/ μ l)	
		Valore mediano	Range	Valore mediano	Range
Tutte le unità	89	0,11	0,0-12,3	2,0	0,0-26,0
Concentrato piastrinico da pool di BC	54	0,19	0,0-12,3	7,0	1,0-26,0
Concentrato piastrinico da aferesi	15	0,11	0,0-2,8	2,0	0,0-5,0
Concentrato eritrocitario da aferesi	20	0,10	0,0-0,7	1,0	0,0-3,0

Le coppie di valori ottenuti dai due conteggi, espresse in leucociti/ μ l sono state confrontate mediante l'analisi di regressione di Passing e Bablok (63). I dati di regressione mostrano la presenza di un errore sistematico proporzionale (indicato dalla pendenza della retta di regressione) tra i due metodi. Infatti la pendenza è >1 e 1 non è compreso nell'intervallo di confidenza (IC) 95% (figura 4).



Emocomponente	N° (coppie di valori)	Pendenza (95% IC)	Intercetta (95% IC)
Tutte le unità	89	89 (19,8-234,5)	-5 (-22,3-0)

Figura 4. Confronto dei conteggi dei leucociti residui con Leucocount e Sysmex XN-9000 in modalità fluido biologico (BF) in una serie di 89 emocomponenti. Il numero dei leucociti residui/ μ l ottenuti con il metodo Leucocount (asse x) è riportato verso il numero ottenuto per lo stesso campione con il metodo in prova XN-BF (asse y). In blu è disegnata la linea di regressione, le linee tratteggiate spesse delineano gli intervalli di confidenza (IC) e la linea tratteggiata fine la retta di identità ($x=y$). In tabella sono riportate la pendenza e l'intercetta della retta di regressione con i relativi intervalli di confidenza (IC).

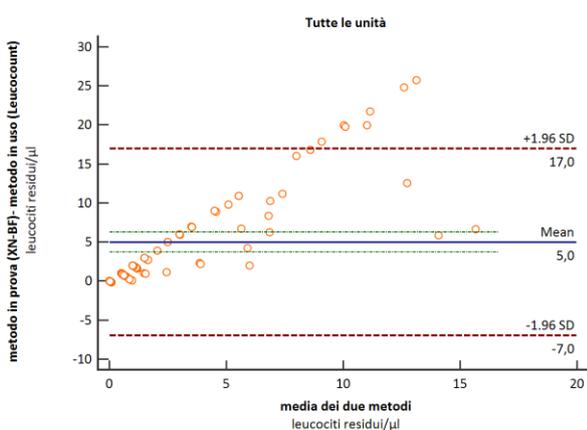
L'entità dell'errore è stata accertata mediante grafico di Bland-Altman e calcolo del bias (63). I risultati sono riportati in figura 5. La media delle differenze tra i due metodi su tutti i campioni (bias) è 5 leucociti/ μl . Il bias risulta significativo, dato che l'intervallo di confidenza al 95% del bias (delimitato dalle due linee tratteggiate in verdi) non comprende lo zero, ma è ampiamente al di sopra. Il 95% delle differenze dei due metodi è compreso nell'intervallo 17 e -7. Questo intervallo permette di identificare l'entità della maggior parte (95%) delle differenze riscontrate. È possibile osservare la presenza di una dipendenza tra il numero dei leucociti residui conteggiati (x) e le differenze (y). Ai più alti conteggi corrisponde una differenza da parte del metodo in prova maggiore.

Gli emocomponenti presentano differenze riguardo modalità di produzione, componente e numerosità della componente cellulare e per la sostanza nutritiva conservante. Abbiamo voluto comparare le coppie di valori ottenuti da ciascuna tipologia di emocomponente. L'analisi del bias mediante grafico di Bland-Altman conferma il risultato ottenuto all'analisi combinata: la presenza di un bias significativo (figura 5 b, c, d) per tutte le tipologie.

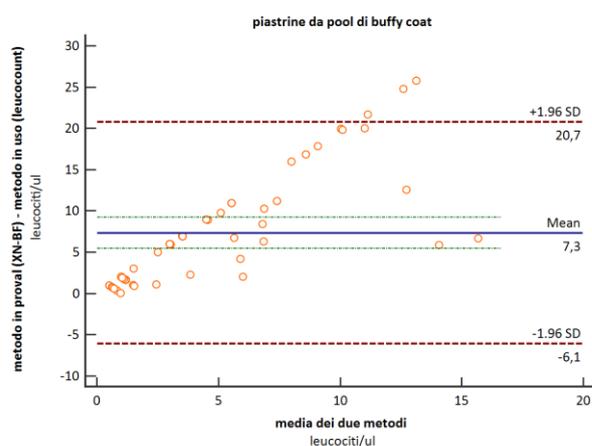
Sui conteggi dei concentrati piastrinici da pool di BC si osservano differenze maggiori del metodo in prova rispetto a quello in uso (bias medio = 7,3). Il 95% delle differenze è compreso nell'intervallo tra 20,7 e -6,1. Sui conteggi sulle unità da aferesi il bias medio che si ottiene è inferiore: 1,5 per i concentrati piastrinici, 1,22 per quelli eritrocitari. Il 95% delle differenze sono comprese in un intervallo di 4,5 e -1,4 per i concentrati piastrinici da aferesi e tra 3,03 e -0,59 per i concentrati eritrocitari.

Figura 5. Valutazione del bias mediante il confronto tra metodi secondo Bland e Altman. Nel grafico, la media dei conteggi ottenuti per ciascun campione da entrambi i metodi (media dei due metodi) è riportata sull'asse ascisse, e le differenze tra i due conteggi sull'asse y (metodo in prova (XN-BF) metodo in uso Leucocount). È rappresentata la differenza media o bias (*mean*) ed il relativo intervallo di confidenza (linee tratteggiate in verde), e l'intervallo che comprende il 95% di tali differenze, calcolato utilizzando $\text{media} \pm 1,96 \times \text{DS}$, dove la media e DS sono rispettivamente il bias e la deviazione standard delle differenze trovate (linee tratteggiate rosse). I risultati sono riportati per tutte le unità (a) e separatamente sui concentrati piastrinici da pool di BC (b), sui concentrati piastrinici da aferesi (c) e sui concentrati eritrocitari (d).

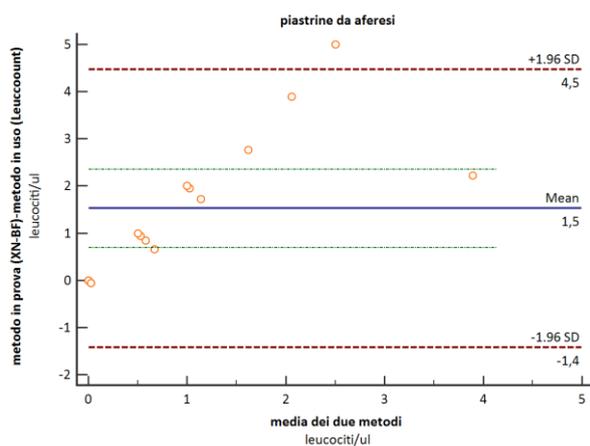
a



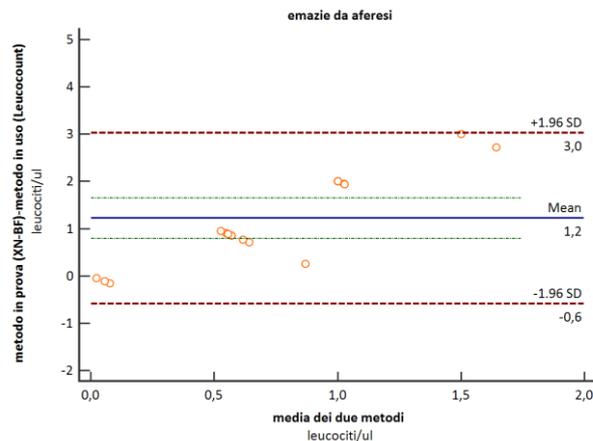
b



c



d



Emocomponente	N	Bias	IC (95%)	DS delle differenze	Intervallo delle differenze (IC 95%)
Tutte le unità	89	5	(4; 6)	8,6	(-7; 17)
Concentrato piastrinico da pool di BC	54	7,3	(5; 9)	7,3	(-6,1; 20,7)
Concentrato piastrinico da aferesi	15	1,5	(2,4; 0,7)	1,5	(-1,4; 4,5)
Concentrato eritrocitario da aferesi	20	1,22	(1,7-0,8)	1,22	(-0,59; 3,03)

3.EFFETTO DELLA MATRICE DEI CONCENTRATI PIASTRINICI SULLE QUALITÀ ANALITICHE DELL'XN-BF

Partendo da un campione a concentrazione nota di globuli bianchi, sono state allestite quattro diluizioni utilizzando tre differenti tipi di matrice: diluente Cell Pack DCL, soluzione nutritiva Composol PS, pool da BC (vedi paragrafo 4.2 Materiali e Metodi).

I risultati dei conteggi sono riportati in tabella 3. Il coefficiente di variazione si mantiene buono (< 20%) fino a conteggi intorno a 20-40 leucociti/ μ l (diluizioni 1:100) in tutte le matrici. Per conteggi intorno a 4-2 leucociti/ μ l (diluizione 1:1000) si eleva fino a 30% circa per le diluizioni in matrice Composol PS e in pool di BC.

Come atteso il coefficiente di variazione per tutti i conteggi con la metodica Leucocount si mantiene < 10% e in particolare per i campioni contenenti circa 3 leucociti/ μ l (diluizione 1:1000).

La linearità risulta eccellente ($R^2 = 1,00$) in tutte e 3 le matrici (tabella 4) sia con metodica XN-BF che Leucocount.

Tabella 3. Precisione dei conteggi in modalità fluido biologico (BF) nelle varie matrici. DS, deviazione standard; CV, coefficiente di variazione.

	Cell Pack DCL			Composol PS			Pool da BC			Pool da BC		
	Leucociti/ μ l (BF)			Leucociti / μ l (BF)			Leucociti / μ l (BF)			Leucociti / μ l (Leucocount)		
	media	DS	CV (%)	media	DS	CV (%)	media	DS.	CV (%)	media	DS	CV (%)
1:2	3153	51	1,6	3067	15	0,5	3207	11	0,3	2707	84	3,1
1:10	296	12	4,0	304	10	3,1	322	14	4,4	256	23	8,9
1:100	28	2	5,4	20	1	2,8	43	7	15,4	27	3	11,3
1:1000	4	1	15,7	2	1	34,6	7	2	28	3	0	8,7
matrice	0	0		0	0		0	0		0	0	

Tabella 4. Valutazione della linearità dei conteggi in XN-BF nelle 3 matrici e con Leucocount nel pool da BC.

Matrice (modalità di conteggio)	Pendenza	Intercetta	R ²
Cell Pack DCL (BF)	1,00	-5,15	1,00
Composol PS (BF)	0,98	-3,61	1,00
Pool da BC (BF)	1,02	4,28	1,00
Pool da BC (Leucocount)	0,86	-3,36	1,00

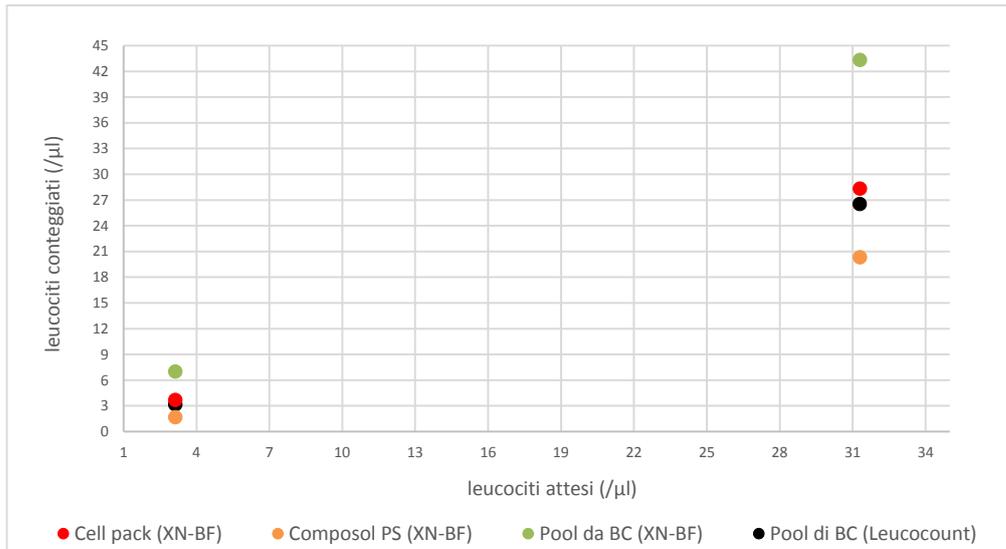


Figura 6. Confronto tra i conteggi eseguiti su campioni diluiti nelle varie matrici. Sull'asse delle X è riportato il valore atteso, sull'asse delle Y il valore medio del conteggio con XN-BF e Leucocount.

Il grafico in figura 6 mostra il valore medio dei conteggi ottenuti sui campioni diluiti nelle varie matrici, nell'intervallo di interesse tra 3 e 30 leucociti. I valori ottenuti sulle diluizioni in pool di BC eseguiti con l'XN-BF sono più elevati rispetto alle diluizioni corrispondenti in Cell pack DCL e in Composol PS. Diversamente i valori ottenuti con metodica Leucocount sulle diluizioni da pool di BC sono invece comparabili con le stesse ottenute nella matrice Cell Pack DCL e Composol PS, ma conteggiate con metodo XN-BF.

4. VALUTAZIONE DELL'ACCETTABILITÀ DEL NUOVO METODO

Abbiamo voluto valutare se il metodo in prova pur non allineato con quello in uso fosse accettabile nel classificare gli emocomponenti in prodotti conformi oppure non conformi. Un'unità di emocomponente leucodepleto risulta conforme agli standard normativi se contiene $< 1 \times 10^6$ leucociti.

Il CQI della contaminazione da leucociti delle unità dopo leucodeplezione prevede di calcolare la quantità di leucociti residui totale in ogni unità moltiplicando il numero dei leucociti/ μl determinati con il Leucocount per il volume (ml) del rispettivo emocomponente ed esprimerlo $\times 10^6$. In tabella 6a sono riportati i risultati del CQI. La contaminazione da leucociti residui è $< 1 \times 10^6$ in tutte le unità di piastrine e di emazie da aferesi e in 48/54 (89%) concentrati piastrinici da pool di BC. In 6/54 (11%) unità piastriniche da pool di BC è $> 1 \times 10^6$.

In tabella 6b è riportato il numero delle unità conformi e non conformi risultate dai conteggi con il metodo in prova (XN-BF). Tutte le unità di emazie concentrate sono conformi anche per il metodo in prova, mentre il numero dei concentrati piastrinici conformi scende a 25/54 (46%) per i pool di BC e a 13/15 (87%) per quelli da aferesi. L'incremento delle non conformità interessa i soli concentrati piastrinici: 29/54 (54%) unità da pool di BC e 2/15 (13%) da aferesi.

In confronto al metodo di riferimento Leucocount, il metodo in prova riesce a classificare correttamente 20/20 (100%) unità di emazie da aferesi, 13/15 (87%) unità di piastrine da aferesi e 31/54 (57%) unità di piastrine da pool di BC. Delle 31/54 unità da pool di BC 25 erano conformi e 6 non conformi. D'altra parte attribuisce erroneamente solo false non conformità (FN) a 25/69 (36%) concentrati piastrinici (23/54 pool di BC e 2/15 da aferesi). Il metodo in prova non classifica nessuna unità falsamente conforme (FP).

In tabella 7 e figura 7 è riassunta la valutazione dell'accettabilità del metodo in prova. Il metodo XN-BF mostra una sensibilità del 100% per l'identificazione dei concentrati eritrocitari. Attribuisce invece ad un elevato numero di concentrati piastrinici la non conformità (25/69) mostrando una sensibilità del 60%. Non identificando invece false conformità (FP=0), la probabilità che una unità risulti conforme mentre non lo è (specificità del metodo) diventerebbe nulla (tabella 7, figura 7).

Tabella 6. In a sono riportati i risultati del controllo di qualità sugli emocomponenti in studio (Leucocount). E'riportato il numero totale (N) analizzato per ciascuna emocomponente, il numero con relativa percentuale (%) delle unità conformi ($< 1 \times 10^6$ leucociti) e delle non conformi ($> 1 \times 10^6$). In tabella b sono riportati i risultati ottenuti dai conteggi in modalità XN-BF per le stesse unità.

a

EMOCOMPONTE	N	$< 1 \times 10^6$ leucociti (Leucocount)	%	$> 1 \times 10^6$ (Leucocount)	%
Concentrati piastrinici da pool di BC	54	48	89	6	11
Concentrati piastrinici da aferesi	15	15	100	0	0
Concentrati eritrocitari da aferesi	20	20	100	0	0

b

EMOCOMPONTE	N	$< 1 \times 10^6$ leucociti (XN-BF)	%	$> 1 \times 10^6$ (XN-BF)	%
Concentrati piastrinici da pool di BC	54	25	46	29	54
Concentrati piastrinici da aferesi	15	13	87	2	13
Concentrati eritrocitari da aferesi	20	20	100	0	0

Figura 7. Sono rappresentate le unità piastriniche classificate dal modo BF come vere conformi (VP), false conformi (FP), vere non conformi (VN), false non conformi (FN). Per ciascun gruppo è indicato il numero di unità.

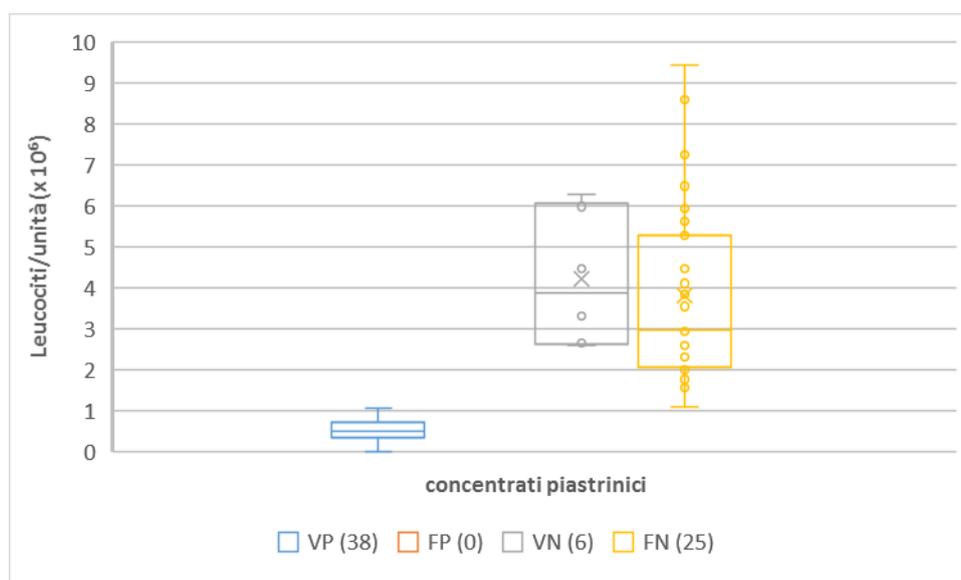


Tabella 7. Valutazione dell'accettabilità del Sysmex XN-9000 in modalità fluido biologico (XN-BF) per il controllo della conformità delle unità leucodeplete.

Sysmex XN-9000 modalità fluido biologico (XN-BF)		
	Concentrati eritrocitari	Concentrati piastrinici
Vere conformi (VP) ($<1 \times 10^6$)	20	38
False non conformi (FN)	0	25
Vere non conformi (VN) ($>1 \times 10^6$)	0	6
False conformi (FP)	0	0
Sensibilità (VP/(VP+FN))	100%	60%
Specificità (VN/(VN+FP))	100%	100%

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

Le linee guida europee e la normativa vigente a livello nazionale (3, 4) indicano che un numero di leucociti residui $< 1 \times 10^6$ per unità sottoposta a leucodeplezione ($< 3,3$ leucociti/ μl per una unità di volume medio di 300 ml) possa essere sufficiente a prevenire nei riceventi reazioni trasfusionali associate alla presenza di leucociti contaminanti. Il metodo manuale in camera di conta di Nageotte e i metodi citofluorimetrici hanno dimostrato di avere una sensibilità tale da poter conteggiare in maniera accurata il numero sempre più basso di leucociti residui negli emocomponenti (10^4 - 10^5 /unità). I metodi citofluorimetrici per la migliore standardizzazione e velocità di esecuzione, sono stati preferiti all'esame manuale in microscopia, che comunque continua a costituire il gold standard per i conteggi dei leucociti negli emocomponenti, così come nei fluidi biologici (61).

Presso la S.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale dell'Estar Nord-Ovest presidio di Lucca il CQI del processo di leucodeplezione è eseguito in citofluorimetria, conteggiando il numero assoluto di leucociti mediante kit diagnostico certificato, Leucocount, secondo le indicazioni del produttore.

Tecniche più semplici e a basso costo, come quelle automatizzate di emocitometria, potrebbero essere prese in considerazione, soprattutto in situazioni di numerosità di campioni e di ridotte risorse economiche.

Da pochi anni gli analizzatori automatizzati di ematologia sono stati implementati per conteggiare le cellule in liquidi biologici di varia origine (liquido cefalorachidiano, pleurico, ascitico, sinoviale, pericardico e peritoneale) in modo rapido ed economico (62).

Il nuovo analizzatore di ematologia Sysmex XN-9000 è dotato di un modulo dedicato ai conteggi cellulari sui fluidi biologici (XN-BF). I Sysmex della serie XN hanno dimostrato di essere accurati e sensibili per processare varie tipologie di liquidi biologici, dal liquido cefalorachidiano ai liquidi cavitari e sierosi (57, 58, 59).

Il conteggio su XN-BF è stato anche proposto come metodo alternativo a quelli manuali in microscopia per monitorare il basso numero di leucociti (tra 0 e 5 leucociti/ μl) dopo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (56).

In questo studio abbiamo voluto valutare l'XN-9000 BF come potenziale nuovo metodo, alternativo al Leucocount in uso di routine, per il controllo della contaminazione leucocitaria nelle unità leucodeplete.

In via preliminare abbiamo valutato la qualità analitica dell'XN-9000 BF. Il limite di sensibilità degli analizzatori della serie XN in modalità BF descritto in letteratura è 1 cellula/ μl (56). Utilizzando il controllo di qualità interno per fluidi biologici XN BF-check la linearità dei conteggi è assicurata tra 0 e 12.000 leucociti, e il limite di quantificazione (LoQ) con un coefficiente di variazione del 20% è 5 cellule/ μl (60). L'XN-9000 BF in particolare sarebbe in grado di raggiungere performances migliori, con un coefficiente di variazione del 22,94% in campioni contenenti 5 cellule/ μl o meno, e un LoQ di 3 cellule/ μl (coefficiente di variazione <20%) (64). I nostri dati concordano con quest'ultima osservazione: i conteggi di 2,3 cellule/ μl hanno un coefficiente di variazione del 21,3%, del 31% intorno a 1,7 leucociti/ μl . La linearità si mantiene ottima nei conteggi tra 1,7 e 10 cellule/ μl ($R^2=0,99$).

Nelle nostre condizioni sperimentali l'XN-9000 BF potrebbe dare quindi conteggi affidabili per unità contenenti almeno 2 leucociti/ μl . Le raccomandazioni hanno stabilito per il plasma fresco un limite di 100 leucociti/ μl , mentre per i concentrati piastrinici ed eritrocitari di 3,3 leucociti/ μl . I nostri dati dimostrano che il metodo potrebbe essere ottimo per il conteggio dei leucociti su campioni di plasma e sufficientemente adeguato sia sui concentrati piastrinici, che costituiscono la maggior parte dei campioni sottoposti al CQI presso la S.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, che su quelli eritrocitari. Naturalmente, a seconda del contenuto iniziale di leucociti per unità e dell'efficienza della leucodeplezione, è atteso che molti di questi campioni contengano quantità nettamente inferiori a 3,3 leucociti/ μl . Il conteggio in XN-BF non sarebbe in grado di distinguere campioni contenenti <1 leucocita/ μl dal rumore di fondo (0 strumentale)

Le finalità del CQI nel monitorare la leucodeplezione negli emocomponenti è stabilire se l'unità presenta una contaminazione leucocitaria superiore o inferiore alla soglia raccomandata (1×10^6). L'accuratezza del conteggio potrebbe essere anche un requisito non necessario. Abbiamo stabilito di valutare l'accettabilità del nuovo metodo sulla base delle capacità di classificare le unità in contaminate ($> 1 \times 10^6$ leucociti) o non contaminate ($< 1 \times 10^6$) e quindi conformi agli standard richiesti.

In base a questi presupposti abbiamo direttamente confrontato i risultati dei conteggi nei concentrati piastrinici ed eritrocitari ottenuti con l'XN-9000 BF con quelli ottenuti con il Leucocount.

L'analisi di regressione di Passing e Bablok di 89 emocomponenti totali indica un errore sistematico proporzionale dei conteggi in modalità BF rispetto al Leucocount. L'analisi del bias, con il metodo di Bland Altman, mostra che i conteggi in XN-BF appaiono sovrastimare in modo significativo il conteggio Leucocount nella maggior parte delle unità. L'analisi separata sulle tre tipologie di emocomponenti evidenzia un errore elevato (bias significativo) con un errore medio di 7 leucociti/ μl ed un intervallo delle differenze molto ampio sui concentrati piastrinici da pool di BC. I conteggi sui prodotti di aferesi, pur presentando anch'essi un bias significativo, mostrano un errore più piccolo, differendo in media di solo 1,5 leucociti/ μl le piastrine e 1,22 leucociti/ μl le emazie, con intervalli delle differenze in queste ultime al di sotto del limite di contaminazione leucocitaria del prodotto.

In letteratura non ci sono dati riguardo l'impiego dell'XN-9000 BF sugli emocomponenti, ma i nostri risultati accorderebbero con dati preliminari effettuati da un altro gruppo italiano sui concentrati piastrinici (comunicazione privata).

La comparazione tra metodi indicherebbe quindi la presenza di una differente specificità dell'XN-BF sul conteggio dei leucociti in particolare sui concentrati piastrinici.

I leucociti residui sono misurati in una matrice complessa, costituita da una soluzione elettrolitica nutritiva, e da elevate quantità di piastrine.

Quando abbiamo confrontato i conteggi su campioni ottenuti diluendo quantità note di leucociti in una matrice costituita dalla sola sostanza nutritiva o dalla sostanza nutritiva in cui era stato risospeso un pool di piastrine leucodepleto si osserva su quest'ultimo una sovrastima per tutti i valori. Questo effetto matrice non si osserva quando le stesse diluizioni nel pool sono conteggiate con Leucocount. La matrice sembrerebbe comunque non influenzare la linearità e precisione dei conteggi.

L'interferenza positiva sul conteggio sembrerebbe quindi attribuibile più che alla composizione elettrolitica della sostanza nutritiva, alle caratteristiche della componente biologica nel concentrato. L'aggregazione piastrinica, insieme alla presenza di piastrine giganti, è una delle interferenze positive dichiarate dalla ditta produttrice sui conteggi nel canale dei leucociti (65). È plausibile pensare che fenomeni di attivazione ed aggregazione piastrinica, intercorse durante conservazione dell'unità, possano aver generato eventi fluorescenti aspecifici conteggiati dall'analizzatore nel cluster dei leucociti. Anche le fasi di

produzione del pool potrebbero avere indotto questi eventi, dato che sembrerebbero interessare maggiormente i pool piuttosto che i concentrati da aferesi.

Non possiamo escludere comunque un seppur debole effetto matrice anche per i conteggi sui concentrati eritrocitari, dato che sono risposesi in una sospensione praticamente priva di plasma e ricca di molecole organiche (SAGM).

Nonostante i conteggi del metodo in prova non siano accurati su queste tipologie di campioni, gli scostamenti dal metodo considerato di riferimento, sebbene elevati e significativi a questi bassi valori di concentrazioni, potrebbero non avere effetto riguardo la classificazione delle unità.

Il metodo XN-BF sembrerebbe infatti presentare una ottima attitudine ad identificare le unità conformi per i concentrati eritrocitari (sensibilità 100%), risulta invece mediocre nell'identificare i concentrati piastrinici (sensibilità 60%). In questo contesto è importante notare che il metodo BF non identificherebbe false conformità e potrebbe quindi essere impiegato in una fase di screening.

Questi risultati permettono di concludere che il nuovo metodo non è allineato con quello di riferimento e richiederebbe modifiche per ottimizzare le qualità analitiche per la valutazione di livelli così bassi di leucociti in matrici complesse come i concentrati piastrini ed eritrocitari.

In conclusione questo metodo risulterebbe accettabile nel classificare i concentrati eritrocitari, mentre potrebbe essere impiegato come metodo di screening sui concentrati piastrinici per selezionare quelli che non necessitano di una rivalutazione col Leucocount. Naturalmente sarebbe necessario uno studio su un numero maggiore di unità per confermare queste osservazioni.

L'utilizzo di un sistema automatico per il monitoraggio della leucodeplezione negli emocomponenti con l'utilizzo di una piattaforma analitica come il Sysmex XN-9000 sempre attiva permetterebbe di snellire questa fase del CQI. L'analisi non richiedendo particolari fasi di pre-trattamento del campione e calcolo dei risultati potrebbe essere gestita da qualunque operatore fornendo risultati rapidamente. I campioni risultati non conformi (34% per il nostro studio) necessiterebbero comunque di una rivalutazione successiva con il Leucocount.

I vantaggi sarebbero rappresentati da una riduzione dei costi complessivi e dalla possibilità di avere la maggioranza delle unità già controllate prima del loro impiego.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Decreto Ministero Sanità 3 Marzo 2005. Caratteristiche e modalità per la donazione del sangue e di emocomponenti. Gazzetta Ufficiale n. 85 13/04/2005.
2. Legge 21 ottobre 2005, n.219. Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati. Gazzetta Ufficiale n. 251 27/10/2005.
3. Guide to preparation, use and quality assurance of blood components, recommendation No R (95) 15, 18th edition, 2015.
4. Decreto Ministero Sanità 2 novembre 2015. Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti. Gazzetta Ufficiale n. 300 28/12/2015.
5. Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA. Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):1703-21.
6. Bassuni WY, Blajchman MA, Al-Moshary MA. Why implement universal leukoreduction? *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2008 Apr-Jun;1(2):106-23.
7. van de Watering LM, Hermans J, Houbiers JG, van den Broek PJ, Bouter H, Boer F, Harvey MS, Huysmans HA, Brand A. Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation*. 1998 Feb 17;97(6):562-8.
8. Bilgin YM1, van de Watering LM, Eijssman L, Versteegh MI, Brand R, van Oers MH, Brand A. Double-blind, randomized controlled trial on the effect of leukocyte-depleted erythrocyte transfusions in cardiac valve surgery. *Circulation*. 2004 Jun 8;109(22):2755-60. Epub 2004 May 17.
9. Sharma RR, Marwaha N. Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries. *Asian J Transfus Sci*. 2010 Jan;4(1):3-8.
10. Dzik WH. Is the febrile response to transfusion due to donor or recipient cytokine? *Transfusion*. 1992 Jul-Aug;32(6):594.
11. Triulzi DJ et al. Principles of Transfusion Medicine USA: Wiley-Blackwell, 2009. Leukocyte-reduced blood complement. Laboratory and clinical aspects, pp 228-46.
12. Heddle NM, Klama L, Singer J, Richards C, Fedak P, Walker I, Kelton JG. The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N Engl J Med*. 1994 Sep 8;331(10):625-8.
13. Goodnough LT, Riddell J 4th, Lazarus H, Chafel TL, Prince G, Hendrix D, Yomtovian R. Prevalence of platelet transfusion reactions before and after implementation of leukocyte-depleted platelet concentrates by filtration. *Vox Sang*. 1993;65(2):103-7.

14. Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, Hashemi S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion*. 1995 Feb;35(2):117-24.
15. King KE, Shirey RS, Thoman SK, Bensen-Kennedy D, Tanz WS, Ness PM. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions to RBCs. *Transfusion*. 2004 Jan;44(1):25-9.
16. Rajesh K, Harsh S1, Amarjit K. Effects of Prestorage Leukoreduction on the Rate of Febrile Nonhemolytic Transfusion Reactions to Red Blood Cells in a Tertiary Care Hospital. *Ann Med Health Sci Res*. 2015 May-Jun;5(3):185-8. doi: 10.4103/2141-9248.157498.
17. Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion*. 2004 Jan;44(1):16-24.
18. Yazer MH1, Podlosky L, Clarke G, Nahirniak SM. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion*. 2004 Jan;44(1):10-5.
19. Blajchman MA, Goldman M, Freedman JJ, Sher GD. Proceedings of a consensus conference: prevention of post-transfusion CMV in the era of universal leukoreduction. *Transfus Med Rev*. 2001 Jan;15(1):1-20.
20. Tegtmeier GE. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch Pathol Lab Med*. 1989 Mar;113(3):236-45. Review
21. Preiksaitis JK. *Transfus Med Rev*. 1991 Jan;5(1):1-17. Indications for the use of cytomegalovirus-seronegative blood products.
22. Preiksaitis JK. The cytomegalovirus-"safe" blood product: is leukoreduction equivalent to antibody screening? *Transfus Med Rev*. 2000 Apr;14(2):112-36.
23. Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, Banaji M, Haake R, Welk K, Fisher L, McCullough J, Miller W. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood*. 1995 Nov 1;86(9):3598-603.
24. Cannon MJ, Operskalski EA, Mosley JW, Radford K, Dollard SC. Lack of evidence for human herpesvirus-8 transmission via blood transfusion in a historical US cohort. *J Infect Dis*. 2009 Jun 1;199(11):1592-8. doi: 10.1086/598859.
25. Blajchman MA1, Vamvakas EC. The continuing risk of transfusion-transmitted infections. *N Engl J Med*. 2006 Sep 28;355(13):1303-5.
26. Césaire R, Kérob-Bauchet B, Bourdonné O, Maier H, Amar KO, Halbout P, Dehée A, Désiré N, Dantin F, Béra O, Lézin A. Evaluation of HTLV-I removal by filtration of blood cell components in a routine setting. *Transfusion*. 2004 Jan;44(1):42-8.

27. Pietersz RN, et al. Bacterial contamination in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2014 Apr;106(3):256-83. doi: 10.1111/vox.12098. Review.
28. Dzik W. Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. *Immunol Invest*. 1995 Jan-Feb;24(1-2):95-115.
29. Siblini L, Lafeuillade B, Ros A, Garraud O, Pozzetto B. Influence of blood prestorage conditions and white blood cell filtration on the bacterial load of blood deliberately inoculated with Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Vox Sang*. 2004 Nov;87(4):241-9.
30. Cervia JS, Wenz B, Ortolano GA. Leukocyte reduction's role in the attenuation of infection risks among transfusion recipients. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 15;45(8):1008-13. Epub 2007 Sep 6. Review.
31. Blajchman MA, Goldman M, Baeza F. Improving the bacteriological safety of platelet transfusions. *Transfus Med Rev*. 2004 Jan;18(1):11-24.
32. Vasconcelos E, Seghatchian J. Bacterial contamination in blood components and preventative strategies: an overview. *Transfus Apher Sci*. 2004 Oct;31(2):155-63.
33. Aguzzi A. Prion diseases, blood and the immune system: concerns and reality. *Haematologica*. 2000 Jan;85(1):3-10.
34. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*. 2004 Feb 7;363(9407):417-21.
35. Gregori L, McCombie N, Palmer D, Birch P, Sowemimo-Coker SO, Giulivi A, Rohwer RG. Effectiveness of leucoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet*. 2004 Aug 7-13;364(9433):529-31.
36. Cervia JS, Sowemimo-Coker SO, Ortolano GA, Wilkins K, Schaffer J, Wortham ST. An overview of prion biology and the role of blood filtration in reducing the risk of transfusion-transmitted variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Transfus Med Rev*. 2006 Jul;20(3):190-206.
37. Wilson K, Wilson M, Hébert PC, Graham I. The application of the precautionary principle to the blood system: the Canadian blood system's vCJD donor deferral policy. *Transfus Med Rev*. 2003 Apr;17(2):89-94.
38. Jackman RP1, Deng X, Bolgiano D, Utter GH, Schechterly C, Lebedeva M, Operskalski E, Luban NL, Alter H, Busch MP, Slichter SJ, Norris PJ. Leukoreduction and ultraviolet treatment reduce both the magnitude and the duration of the HLA antibody response. *Transfusion*. 2014 Mar;54(3):672-80. doi: 10.1111/trf.12317. Epub 2013 Jun 30.
39. Seftel MD, Growe GH, Petraszko T, Benny WB, Le A, Lee CY, Spinelli JJ, Sutherland HJ, Tsang P, Hogge DE. Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):333-9. Epub 2003 Sep 4.

40. Lannan KL, Sahler J, Spinelli SL, Phipps RP, Blumberg N. Transfusion immunomodulation- the case for leukoreduced and (perhaps) washed transfusions. *Blood Cells Mol Dis.* 2013 Jan;50(1):61-8. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.08.009. Epub 2012 Sep 13.
41. Hébert PC et al. (Leukoreduction Study Investigators). Clinical outcomes following institution of the Canadian universal leukoreduction program for red blood cell transfusions. *JAMA.* 2003 Apr 16;289(15):1941-9.
42. Anne B McDonald, Walter H Dzik. Leucodeplezione. *LA TRASFUSIONE DEL SANGUE* vol. 46 - num. 6 novembre-dicembre 2001 (347-361).
43. Wadhwa M, Seghatchian MJ, Dilger P, Sands D, Krailadisiri P, Contreras M, Thorpe R. Cytokines in WBC-reduced apheresis PCs during storage: a comparison of two WBC-reduction methods. *Transfusion.* 2000 Sep;40(9):1118-26.
44. Phelan HA, Gonzalez RP, Patel HD, Caudill JB, Traylor RK, Yancey LR, Sperry JL, Friese RS, Nakonezny PA. Prestorage leukoreduction ameliorates the effects of aging on banked blood. *J Trauma.* 2010 Aug;69(2):330-7. doi: 10.1097/TA.0b013e3181e0b253.
45. Phelan HA¹, Eastman AL, Aldy K, Carroll EA, Nakonezny PA, Jan T, Howard JL, Chen Y, Friese RS, Minei JP. Prestorage leukoreduction abrogates the detrimental effect of aging on packed red cells transfused after trauma: a prospective cohort study. *Am J Surg.* 2012 Feb;203(2):198-204. Epub 2011 Sep 14.
46. Takahashi TA, Abe H, Hosoda M, Nakai K, Sekiguchi S. Bradykinin generation during filtration of platelet concentrates with a white cell-reduction filter. *Transfusion.* 1995 Nov-Dec;35(11):967.
47. Blumberg N, Heal JM, Gettings KF, Phipps RP, Masel D, Refaai MA, Kirkley SA, Fialkow LB. An association between decreased cardiopulmonary complications (transfusion-related acute lung injury and transfusion-associated circulatory overload) and implementation of universal leukoreduction of blood transfusions. *Transfusion.* 2010 Dec;50(12):2738-44.
48. Adams MR, Johnson DK, Busch MP, Schembri CT, Hartz TP, Heaton WA. Automatic volumetric capillary cytometry for counting white cells in white cell-reduced platelet apheresis components. *Transfusion.* 1997 Jan;37(1):29-37.
49. Dzik S. Principles of counting low numbers of leukocytes in leukoreduced blood components. *Transfus Med Rev.* 1997 Jan;11(1):44-55.
50. Rebullá P, Dzik WH. Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leukocyte-depleted red blood cells. The Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Vox Sang.* 1994;66(1):25-32.
51. Sadoff BJ, Dooley DC, Kapoor V, Law P, Friedman LI, Stromberg RR. Methods for measuring a 6 log₁₀ white cell depletion in red cells. *Transfusion.* 1991 Feb;31(2):150-5.

52. Dzik WH, Ragosta A, Cusack WF. Flow-cytometric method for counting very low numbers of leukocytes in platelet products. *Vox Sang.* 1990;59(3):153-9.
53. Dijkstra-Tiekstra MJ, van der Meer PF, Pietersz RN, de Wildt-Eggen J. Multicenter evaluation of two flow cytometric methods for counting low levels of white blood cells. *Transfusion.* 2004 Sep;44(9):1319-24.
54. Barclay R, Walker B, Allan R, Reid C, Duffin E, Kane E, Turner M. Flow cytometric determination of residual leucocytes in filter-depleted blood products: an evaluation of Becton-Dickinson's LeucoCOUNT system. *Transfus Sci.* 1998 Dec;19(4):399-403.
55. Krailadsiri P, Seghatchian MJ. III-7 evaluation of IMAGN 2000: a new system for absolute leucocyte count. *Transfus Sci.* 1998 Dec;19(4):405-7.
56. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Miyachi H. Evaluation of the body fluid mode of automated hematology analyzer XN-series for extremely low peripheral white blood cell counts. *Int J Lab Hematol.* 2014 Feb;36(1):e3-7. Epub 2013 May 30.
57. Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, de Jonge R. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med.* 2012 Oct 1;50(10):1791-8.
58. C Briggs, I Longair, P Kumar & SJ Machin Sysmex XN Analysers – A Novel Modular Blood Cell Counting System. *Journal of clinical pathology* 65(11):1024-30, July 2012.
59. Buoro S, Mecca T, Azzarà G, Seghezzi M, Dominoni P, Crippa A, Ottomano C, Lippi G. Cell Population Data and reflex testing rules of cell analysis in pleural and ascitic fluids using body fluid mode on Sysmex XN-9000. *Clin Chim Acta.* 2016 Jan 15; 452:92-8.
60. J. Linssen, V. Jennissen, J. Hildmann, E. Reisinger, J. Schindler, G. Malchau, A. Nierhaus, and K. Wielckens. Identification and Quantification of HighFluorescence-Stained Lymphocytes as Antibody Synthesizing/Secreting Cells Using the Automated Routine Hematology Analyzer XE-2100. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 72B:157–166 (2007).
- 61 Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, Schmitz G, Kunkl A, Chianese R, Papa S, Gratama JW. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry.* 2000 Dec 15;42(6):327-46
- 62 Fleming C, Russcher H, Lindemans J, de Jonge R. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Oct;53(11):1689-706.
63. Matteo Vidali, Michele Tronchin, Ruggero Dittadi per il Gruppo di Studio SIBioC "Statistica per il Laboratorio". **PROTOCOLLO OPERATIVO PER LA COMPARAZIONE DI DUE METODI ANALITICI NEI LABORATORI CLINICI.**

64. Kazuaki Yamamoto, Yuichi Domae, Shomi Koyama, Michio Hagihara, Shuji Tohda, Naoko Tojo. Evaluation of analytical performance of XN-9000. Atti congressuali da Japanese Association of Medical Technologists.
65. XN series per il Sistema XN-9000. Istruzioni per l'uso. Sysmex Corporation KOBE Giappone.