

H20-A2 January 2007

**Reference Leukocyte (WBC) Differential Count
(Proportional) and Evaluation of Instrumental
Methods; Approved Standard—Second Edition**

林口長庚紀念醫院 檢驗醫學部

王鈞毅 醫檢師

2021.12.04

大綱

- ① Reference WBC Differential Count
- ② Evaluation of Instrumental Methods

前言

前言

- 自動化白血球分類計數能夠緩解實驗室的人力需求, 且相較人工分類計數更具有結果再現性; 血球分析儀且因分析的細胞數較多, 一般也有更好的 precision。
- 如何評估自動化或半自動化血球分析儀, 對於白血球分類計數的能力是否合乎標準, 為 CLSI H20 的重點。
- 以 CLSI H20 作為實驗室認證條文的指引。

前言

白血球分類計數相關的 CAP 條文

- 自動化白血球分類計數

HEM.34100 白血球分類計數的允許範圍

使用手工法血片估算或商業化品管液去定義出白血球分類計數的品管允許範圍。

HEM.34200 白血球分類的驗證

針對臨床有意義的白血球自動分類計數，檢驗室要建立自動分類計數、儀器 histogram、血片等，檢查或再審閱的標準。

前言

白血球分類計數相關的 CAP 條文

- 人工閱片

HEM.34300 血片的品質

令人滿意的血片品質包括適當的染色、沒有染色沉渣、血球分佈均勻。

HEM.34320 染劑的活性

每天都要確認所有染劑是具有染色的活性。

HEM.34400 型態觀察評估 - 全血細胞計數

實驗室至少每年評估一次人員使用顯微鏡觀察血球形態之一致性。

前言

白血球分類計數相關的 CAP 條文

- 人工閱片

HEM.34450 血片的保留

血片要保留至少一個星期，以確保期間可調閱和參考。

HEM.34500 血小板/紅血球形態觀察的評定

對於需要人工白血球分類和需要再審閱的血片，醫檢師要一併觀察其紅血球和血小板的形態，以確保報告的正確性。

HEM.34600 血片留單標準

文件定義異常血片需留單給病理科醫生、管理人或其他血液形態學技術專家重新閱片的標準，並留有再審閱的證據紀錄。

Scope

- 白血球分類計數的檢測方法, 正常檢體 (nondiseased) 必須要能辨識 neutrophils (segmented), neutrophils (band forms), lymphocytes (normal), lymphocytes (variant forms), monocytes, eosinophils, and basophils)。
- 不能分類的細胞要有適當的 flag。

Tests of performance

評估檢測方法的表現, 須包含

- Comparison: 和reference method 比較
- Imprecision: 包含 repeatability, between-run precision, between-day precision, within-laboratory precision
- Establishing Reference Intervals: 可能和 reference method 不同
- Clinical Sensitivity: 用建立好的 reference Intervals 來測試對於 abnormal sample 的 sensitivity 是否和製造商宣稱的一樣

Tests of performance

評估檢測方法的表現, 須包含

- Safety and Effectiveness: 是否符合適用範圍
- Cell-by-Cell Performance Evaluation: 廠商如果有宣稱, 則須評估 (多指 cell image)
- Tabulated Data vs. Manufacturer's Claims: 分析所得的資料列表須和廠商宣稱的相符 (例如廠商宣稱偵測到 blast 系統會有 flag 提示, 實測所得的 data 就是要有 flag)

Reference WBC Differential Count

Reference WBC Differential Count

在評估任何檢測方法前, 須先定義一個用來比較的參考方法。

- **Specimen Collection**

- ✓ 檢體條件
- ✓ 血片製備

- **Romanowsky Staining**

- **血球分類項目**

- **血片鏡檢流程**

- ✓ 鏡檢
- ✓ 計數步驟
- ✓ 鏡檢人員的資格
- ✓ 驗證資格的血片
- ✓ 資格驗證程序

Reference WBC Differential Count

Specimen Collection

靜脈採檢, 使用鉀離子抗凝劑 (K_2EDTA or K_3EDTA)。如果經過評估, 亦可採用皮膚穿刺採檢。

✓ 檢體條件

1. 目視可見clot檢體不適合分析。
2. 顯微鏡可見的 PLT clumping 檢體, 可用來評估機台PLT clumps 的 flag。
3. 記錄檢體血漿的狀況: 脂血, 黃疸, 溶血, 但不建議在分析前以細胞沉降或離心的方式來觀察。

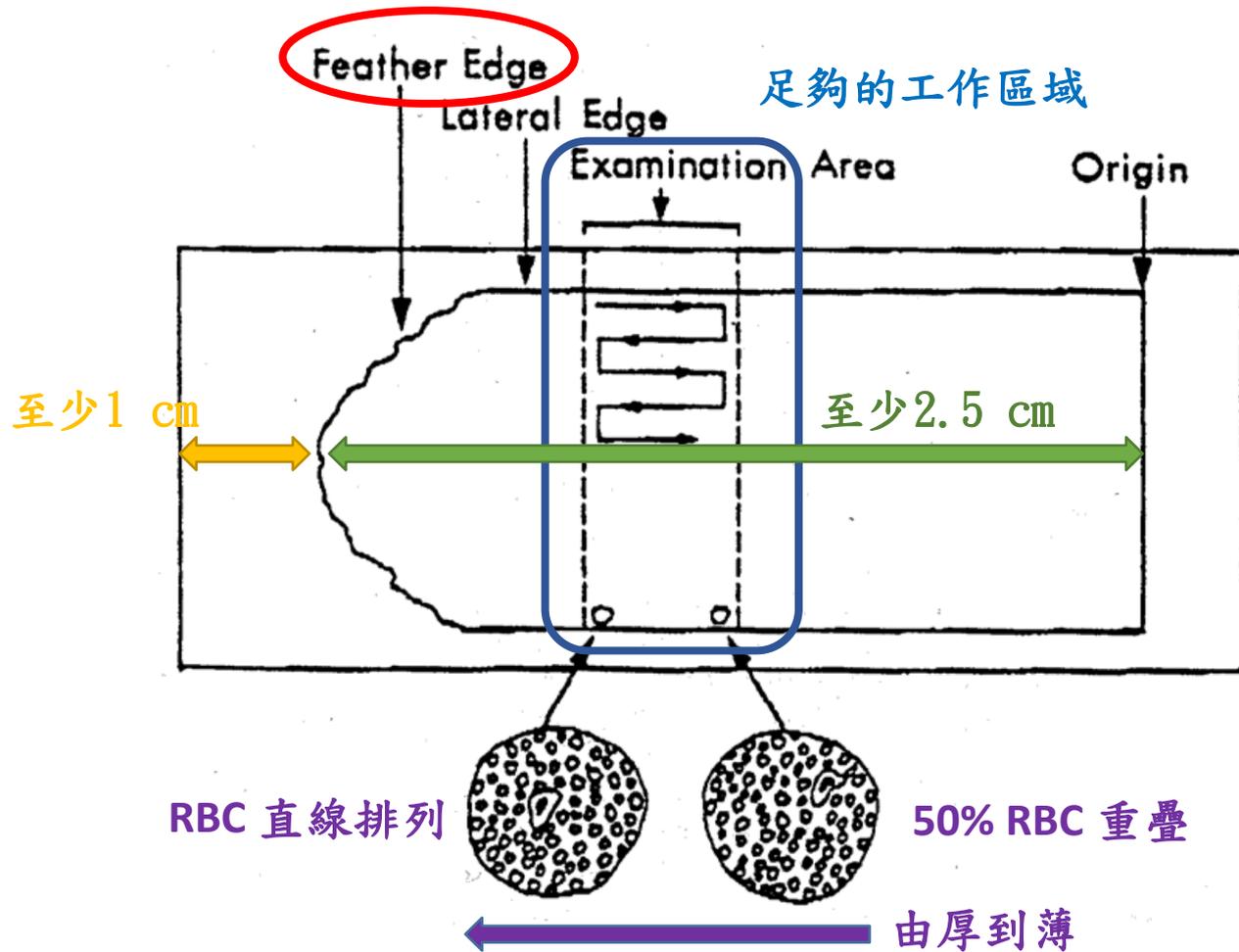
Reference WBC Differential Count

Specimen Collection

✓ 血片製備

1. 以乾淨無塵 25x75 mm 大小, 0.8-1.2 mm 厚的玻片製作血片。
2. 血片必須在採檢 4 小時內製作。期間檢體不可冷藏, 製作血片前要以手, 上下倒置檢體 20 次混合。
3. 手工推片或機台推片皆可。
4. 在製作血片一小時內以 Romanowsky stain 染色, 或以無水 (水<3%) 甲醇固定再進行染色。
5. 可接受的血片: 沒有 artifact, 在較薄處也沒有 streaks, troughs, ridges 而造成 WBC 分布不均。

可接受的血片



Reference WBC Differential Count

Romanowsky Staining

- ✓ 包含 methylene blue 和/或其氧化物 (azure B), 和鹵素螢光染色劑 (eosin B or Y)。諸如 Wright's, Wright-Giemsa, 與 May-Grünwald stains 即為此類。
- ✓ 需在合適的 pH 6.4-7.0 才能有理想的 Romanowsky effect。
- ✓ WBC 必須被妥善的保存, 避免過多的空泡及細胞核型態改變等抗凝劑效應。
- ✓ 染色結果要是可以重現的, 要能清楚區分細胞核、細胞質, 染色質型態, 細胞質顏色。

Reference WBC Differential Count

白血球分類項目

✓ 常見有核細胞：

- Neutrophils, segmented forms (polymorphonuclear WBC)
- Immature granulocytes, including band or stab forms
- Lymphocytes, normal forms
- Lymphocytes, variant forms
- Monocytes
- Eosinophils
- Basophils

✓ 其他有核細胞：

- Nucleated red blood cells (normoblasts)
- Blast cells, including, myeloblasts, lymphoblasts, monoblasts, etc.
- Promyelocytes, myelocytes, and metamyelocytes

Reference WBC Differential Count

血片鏡檢流程

✓ 鏡檢

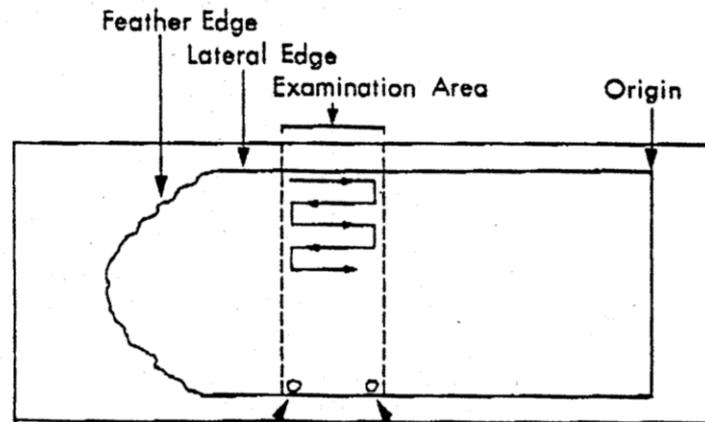
1. 先以低倍 (10X 到40X 物鏡) 篩檢是否有異常細胞並找尋合適的細胞分布位置。100X 油鏡可以細分細胞 granules 和 neutrophilic filaments。
2. 在工作區域至少要有300 顆以上 WBC, 如果 WBC < 4000/uL 則該檢體不列入評估。
3. 在鏡檢範圍 neutrophil, monocyte, lymphocyte 應均勻分佈。
4. 若非特定病理狀況 (例如: chronic lymphocytic leukemia), 破碎或無法辨識的 WBC 應 < 2%。破碎細胞如果還可以辨識 (例如 eosinophil), 則列入分類計數。

Reference WBC Differential Count

血片鏡檢流程

✓ 計數步驟

1. 以“battlement”的軌跡鏡檢, 每個觀察到的細胞 (包含可辨認的變形細胞) 都應被歸類。
2. 每一血片計數 200 顆 WBC, 如果是 leukopenic 檢體, 則需增加血片數量。
3. 以分數的形式來表示分類計數結果 (例如百分比)。
4. 計數 NRBC 並以每 100 顆 WBC 多少 NRBC 來表示。



Reference WBC Differential Count

血片鏡檢流程

✓ 鏡檢人員的資格

1. 鏡檢人員的經驗:

具有辨識不成熟及異常細胞型態的訓練及經驗。

2. 鏡檢人員的態度:

實驗室環境及工作量皆會影響人員表現, 人員每天不應檢閱超過25片血片 (200-cell)。

經驗分享

人員白血球分類計數訓練

• 初階

- ✓ 對象：新進人員
- ✓ 訓練時程：2 個月
- ✓ 訓練內容：顯微照片，數位教案，專家醫檢師每日一小時閱片訓練。
- ✓ 考核辦法：一次顯微照片考試，一次實際閱片考試。

• 中階

- ✓ 對象：除新進人員外其他所有人員
- ✓ 訓練內容：部門醫師每個月異常案例教學
- ✓ 考核辦法：每年一次實際閱片考試，一年兩次 CAP 人員一致性測驗。

經驗分享

人員白血球分類計數訓練

- 進階
 - ✓ 對象：具中階資格, 想自我挑戰者
 - ✓ 訓練內容：部門醫師每個月異常案例教學
 - ✓ 考核辦法：每年一次實際閱片考試。

Reference WBC Differential Count

血片鏡檢流程

✓ 鏡檢人員的資格

1. 鏡檢人員的經驗:

具有辨識不成熟及異常細胞型態的訓練及經驗。

2. 鏡檢人員的態度:

實驗室環境及工作量皆會影響人員表現, 人員每天不應檢閱超過25片血片 (200-cell)。

經驗分享

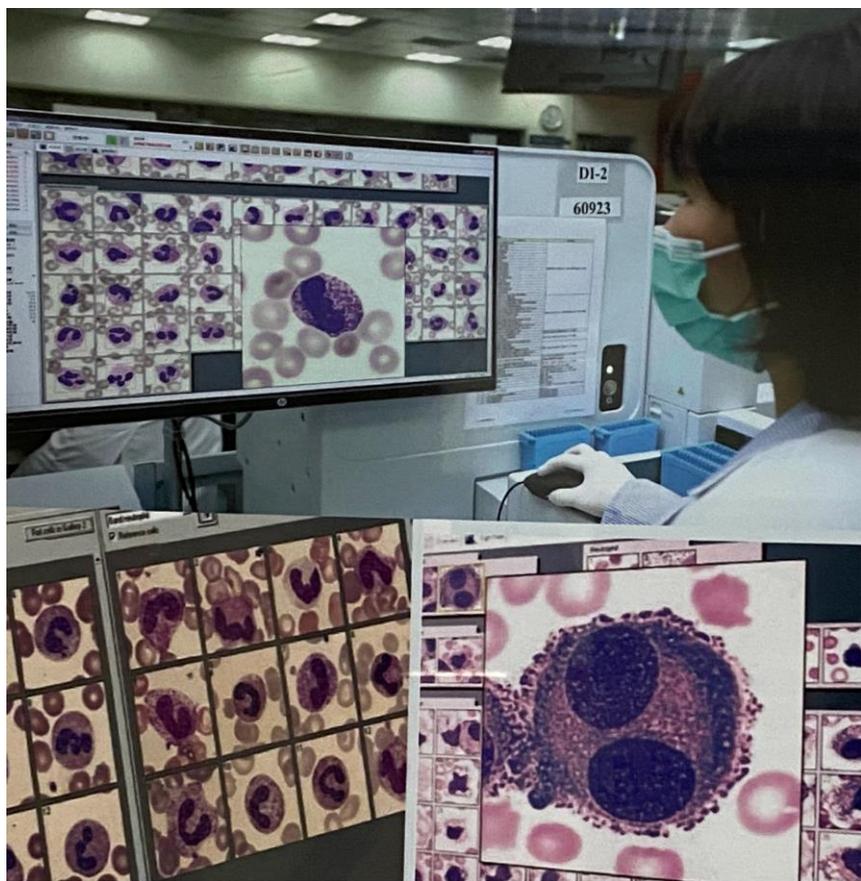
硬體配置



XN-9000 series

經驗分享

硬體配置



DI-60

✓ 優勢

- 大幅節省人員閱片時間
- 可多台電腦同時編輯
- 醫師可即時登入檢視
- 影像保存容易
- 可應用於教學

✓ 待加強

- 預分類的準確度
- 易受染色品質影響

Reference WBC Differential Count

血片鏡檢流程

✓ 驗證資格的血片：

1. 10 個捐贈者檢體，應包含全部 7 種細胞 (segmented neutrophils, band neutrophils, normal lymphocytes, variant lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils)，其中至少有一個檢體包含少部分 NRBC，及不成熟白血球。
2. 每個檢體製作 5 個血片，並將所有血片分成 5 組，每組每個檢體都有一個血片。

Reference WBC Differential Count

血片鏡檢流程

✓ 資格驗證程序：

1. 血球型態辨識：

以一組至少 50 張顯微照相來評估受試者的鏡檢能力。圖像來源以 proficiency-testing providers 為佳, 其中應包含正常與不正常的 WBC, 正確辨識比率落在 80-90% 之間。

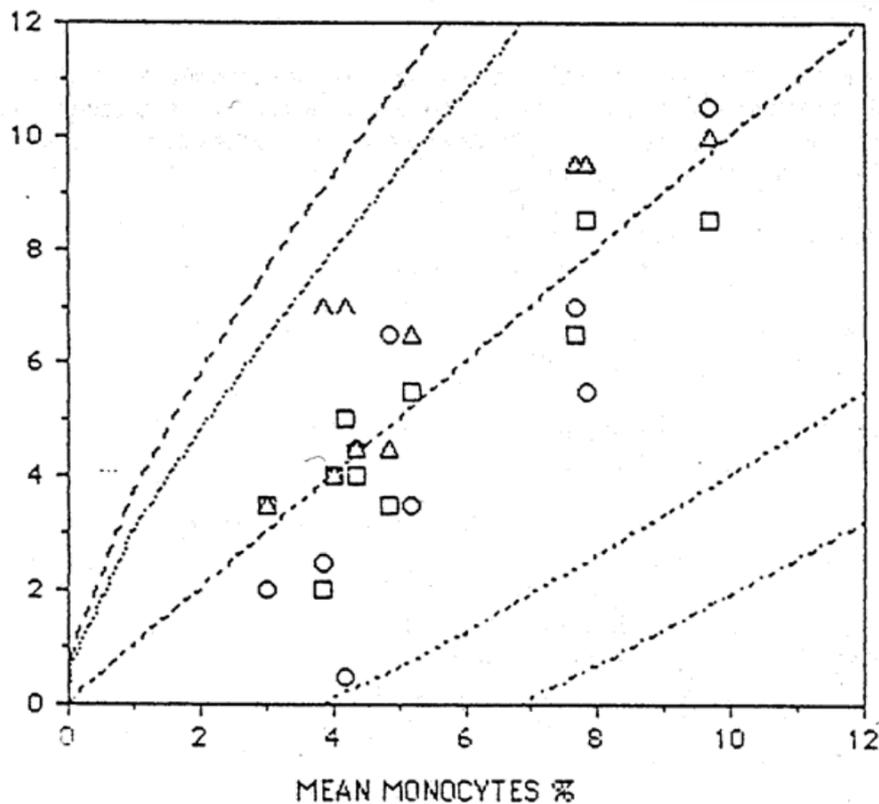
2. 血球分類計數: 一組 qualification blood films 分給每個參與試驗者 (至少 5 位), 進行 200-cell 的分類計數, 並依 coding number 填答。

血球分類計數

GRAPH OF QUALIFYING COUNTS FOR MONOCYTES

每種細胞一張圖

單一受試者結果



EXAMINER 1
EXAMINER 2
EXAMINER 3

不同的受試者

所有受試者的平均

信賴區間

Table 1. Work Table for Generation of Confidence Bands

% Cells	p	q	SEp	95% SEp	99% SEp	Low 95%	High 95%	Low 99%	High 99%
4	4	96	1	3	4	1	7	0	8
6	6	94	2	3	5	3	9	1	11
8	8	92	2	4	5	4	12	3	13
10	10	90	2	4	6	6	14	4	16
12	12	88	2	5	6	7	17	6	18
14	14	86	2	5	7	9	19	7	21
16	16	84	3	5	7	11	21	9	23
18	18	82	3	5	7	13	23	11	25
20	20	80	3	6	8	14	26	12	28
25	25	75	3	6	8	19	31	17	33
30	30	70	3	6	9	24	36	21	39
35	35	65	3	7	9	28	42	26	44
40	40	60	3	7	9	33	47	31	49
45	45	55	4	7	9	38	52	36	54
50	50	50	4	7	10	43	57	40	60
55	55	45	4	7	9	48	62	46	64
60	60	40	3	7	9	53	67	51	69
65	65	35	3	7	9	58	72	56	74
70	70	30	3	6	9	64	76	61	79
75	75	25	3	6	8	69	81	67	83
80	80	20	3	6	8	74	86	72	88
85	85	15	3	5	7	80	90	78	92
90	90	10	2	4	6	86	94	84	96
95	95	5	2	3	4	92	98	91	99

- 95% 信賴區間

$$p \pm 1.96 \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

- 99% 信賴區間

$$p \pm 2.57 \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

n = 200 (計數細胞數)

p = 全體平均值

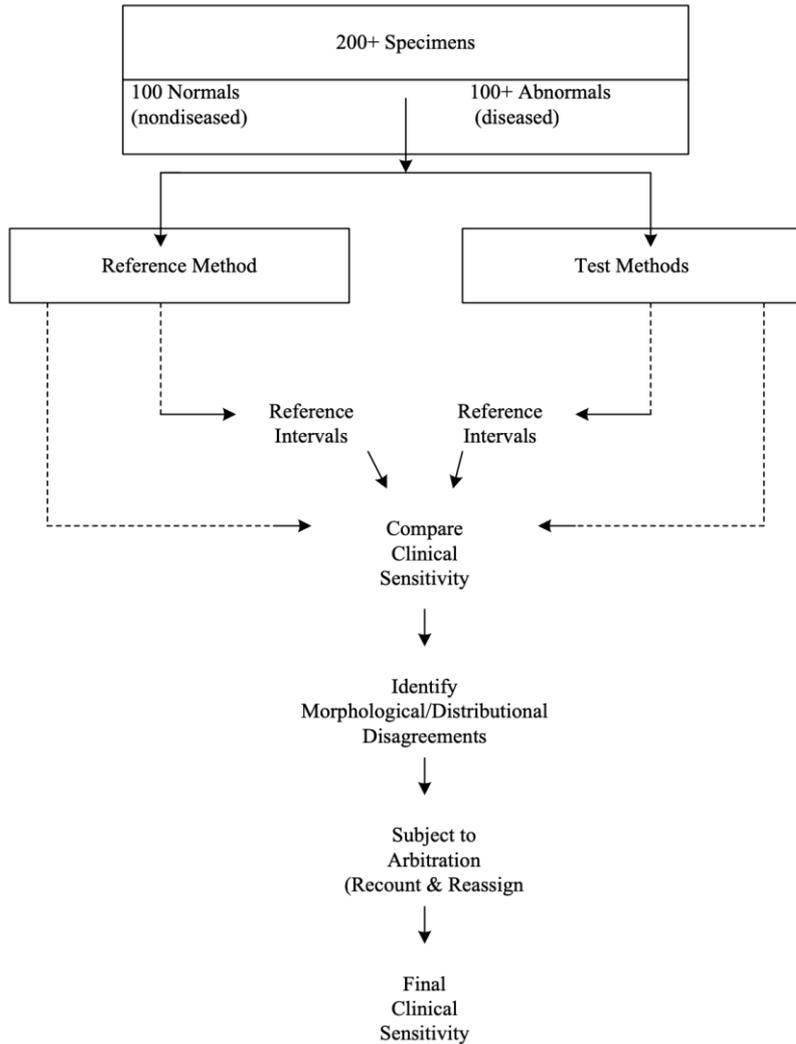
q = 100 - p

結果判讀

- 根據 Gaussain distribution, 有 5% 受試者其結果可能會超出 95% 的範圍, 但理論上不應超過 99% 的區間。
- 依據經驗, 不合格的數據可能是因程序上或操作上的失誤所造成 (例如檢體辨識錯誤, 血片製備不佳, 未在合適的閱片區域計數, 細胞分類錯誤), 需在找出問題後重新進行驗證。

Evaluation of Instrumental Methods

實驗設計



- 整個評估至少需要 200 個檢體，其中有 100 個正常 (nondiseased) 檢體，以及 100 個涵蓋各種異常情形的檢體。

實驗設計

- 各種異常皆須有 5-10 個檢體。必要時應增加檢體數，以符合標準。

Table 2. Illustrative Specimen Types for Clinical Sensitivity Study

Clinical Condition	Characteristic WBC Differential Count Finding	Cell Concentration (X 10 ⁹ /L)	Proportional Cell Count*
Acute inflammation Bacterial infection	Granulocytosis and/or left shift [†] (band-forms)	≥ 9.0	> 80%
Chronic inflammation	Monocytosis	≥ 0.8	> 10%
Parasitic infection Allergic reaction	Eosinophilia	≥ 0.5	> 7%
Viral infections	Lymphocytosis and/or	≥ 3.5	> 50%
	Lymphocytes, variant forms [†]	≥ 0.7	
Aplastic anemia Chemotherapy	Granulocytopenia	≤ 1.5	< 10%
HIV infection	Lymphopenia	≤ 1.0	< 7%
Acute leukemia	Immature cells, including blasts [†]	≥ 0.1	> 2%
Severe anemia Myeloproliferative disorders	NRBC [‡]	≥ 0.01	> 1%

檢體準備

- 在實驗室的工作流程中, 隨機挑選檢體, 並依據 reference method 及製造商的規範來準備檢體。檢體挑選至少持續 2 週, 以包含實驗室大部分的檢體來源。
- 重新標示檢體, 讓受試者不知道檢體來源。

執行檢驗

- 每日完成校正程序後進行 test method 。
- 品管紀錄應留存, 作為評估的一部分 。
- 檢體來源及 CBC 數據應予以保存 。
- Reference method 必須要由符合資格的人員進行 。
- 每個檢體製備三片: A, B, 備用 。
- Reference method slides A, B 應由不同人員檢閱 。
- 一天不能執行超過整體評估 25% 的檢體量 。

數據收集

Table 3. Log of Data for Comparing Distributional Inaccuracy*

	Specimen #	Total WBC Concentration	Reference Lymphocyte Count (x)		$\frac{X_A + X_B^\dagger}{4}$	Test Lymphocyte Count (y)‡		$\frac{Y_C + Y_D}{2}$
			Slide A	Slide B	Mean (x)	C	D	Mean (y)
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
98								
99								
100								

* Construct a similar table for each cell type evaluated.

† 200 cell counts for X_A and X_B

‡ If the test method is a flow system and a sample has been analyzed only once, enter the same result in both C and D.

臨床敏感度

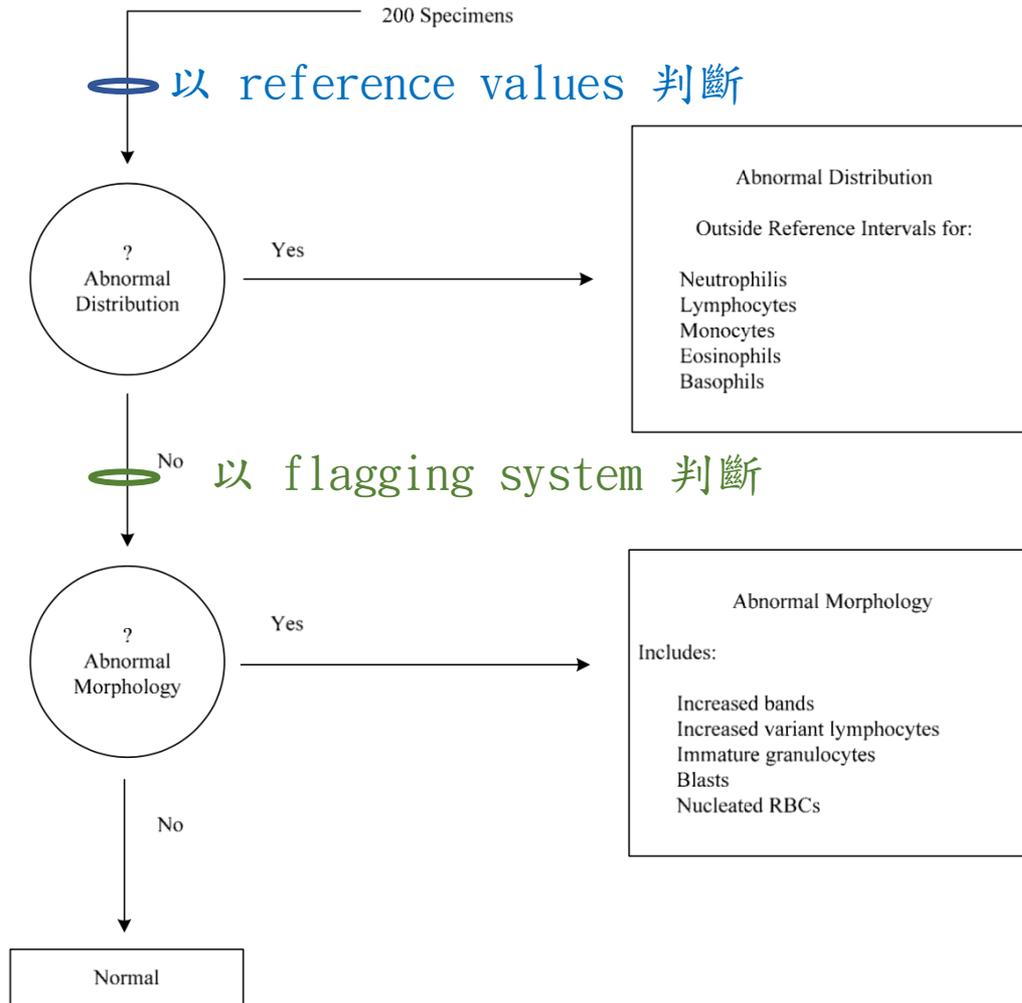


Figure 4. Outline of Clinical Sensitivity Study

臨床敏感度

Reference values

- Test method 和 reference method 分開建立參考值。
- 需要由 100 個正常 (nondiseased) 檢體來建立。

正常檢體：

1. 沒有會影響到白血球分類計數的疾病
2. 近期沒有上呼吸道感染
3. CBC 其他項目包含 WBC count, 落在參考範圍。生化項目沒有明顯異常。

臨床敏感度

Table 4. Hematology Reference Ranges. Fifth to 95th percentile range for hemoglobin concentration, packed cell volume (microhematocrit method), and RBC and WBC concentration by age and sex. Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1998-1994 (Hollowell JG, Van Assendelft OW, Gunter EW, et al. Hematological and iron-related analytes – Reference data for persons aged 1 year and over: United States, 1988-94. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat 11. 2005; (247). DHHS Publication No. (PHS) 2005-1967. PHS, Washington, U.S. Government Printing Office.)

Females [†]	Hemoglobin (g/L) [*] Percentile			PCV (fraction) Percentile			Red cells (x10 ¹² /L) Percentile			WBC (x10 ⁹ /L) Percentile		
	5 th	50 th	95 th	5 th	50 th	95 th	5 th	50 th	95 th	5 th	50 th	95 th
1-5 yrs	109.9	122.5	135.0	0.326	0.366	0.400	4.01	4.48	5.05	4.86	7.97	12.25
6-11 yrs	116.8	130.1	142.2	0.345	0.385	0.420	4.11	4.59	5.09	4.64	7.26	10.87
12-19 yrs [‡]	115.5	132.3	147.6	0.344	0.390	0.434	3.97	4.50	5.09	4.60	7.19	11.19
20-69 yrs	114.2	133.4	150.0	0.343	0.393	0.440	3.85	4.396	4.99	4.33	6.96	11.34
70 yrs and over	113.6	134.2	152.1	0.34	0.40	0.45	3.77	4.40	5.06	4.41	6.95	10.75

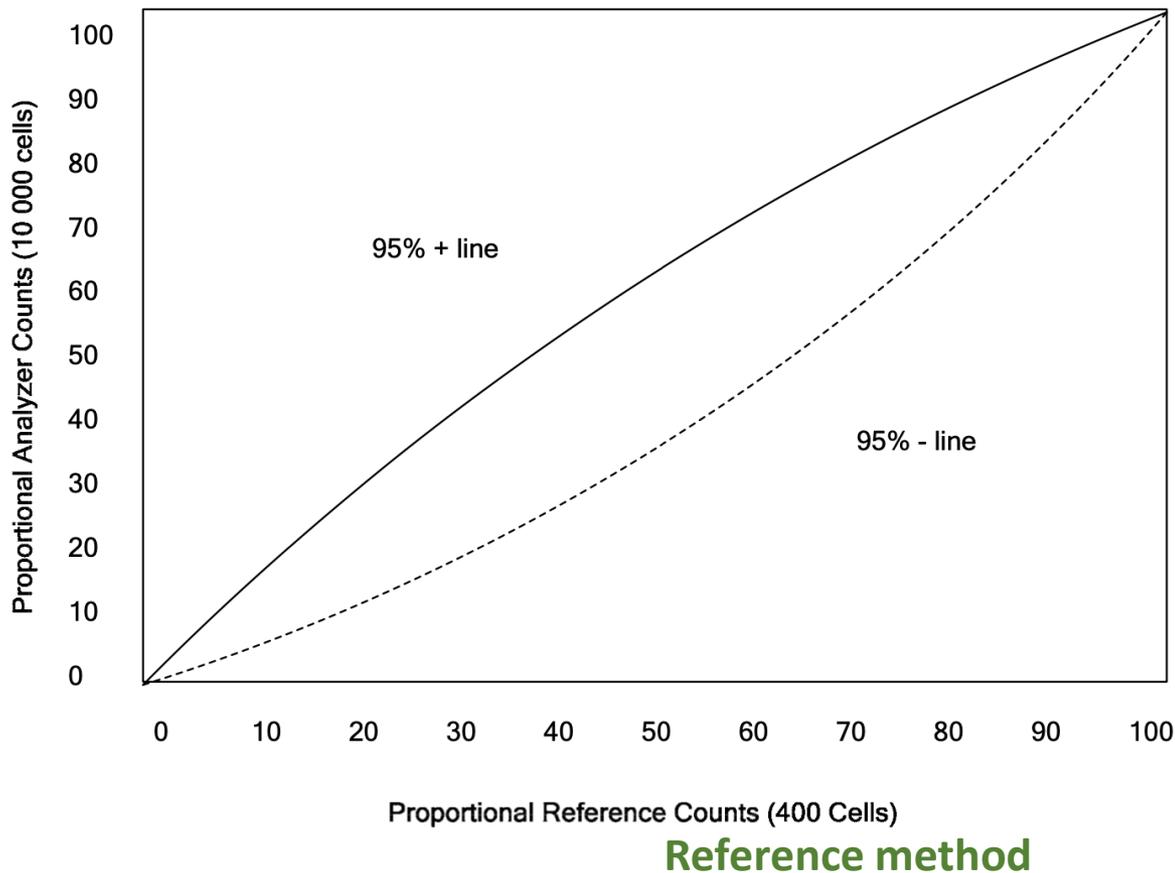
臨床敏感度

Flagging system

- 目標：flagging system 能夠辨識異常，並交由人工鏡檢。
- 以實驗室曾遇到嚴重的異常，來測試 test method。必要時以搜尋的方式查找，之後再隨機加到受測試的檢體之中。

數據分析

- 繪製 x-y scatterplot, reference value 應在 $\pm S_f \cdot SE$ 的範圍內



- SE (standard error)

$$SE = \sqrt{\left(\frac{T}{n_t}\right) + \left(\frac{R}{n_r}\right)} \cdot S_f \cdot 100$$

- S_f (Student factor)

95% 的信賴水準下為 1.96

數據分析

- SE (standard error)

$$SE = \sqrt{\left(\frac{T}{n_t}\right) + \left(\frac{R}{n_r}\right)} \cdot S_f \cdot 100$$

test method 的變異數 reference method 的變異數

n_t = (兩次) 分析的總細胞數

n_r = 400 (slide A 和 B 的計數細胞數)

$$T = p_t \cdot q_t \quad \left(p_t = \frac{\text{mean value of } y_i}{100}, q_t = 1 - p_t \right)$$

$$R = p_r \cdot q_r \quad \left(p_r = \frac{\text{mean value of } x_i}{100}, q_r = 1 - p_r \right)$$

分析誤差

分析誤差的來源可能有：

- 檢體的差異 (biologic variation)
- 方法間的 bias (兩種方法的每種細胞平均值差異)
- 非隨機的干擾

已知的非隨機干擾必須要排除在統計資料中 (例如Pelger-Huet anomaly)。

預測值表現

Reference Intervals

- 當儀器出現細胞 distribution flags, 該筆資料不可列入可接受分佈的研究 (acceptability for distribution)。
- 建構每種細胞的直方圖, 將距離平均值 $>3SD$ 的數據視為 outliers。
- 將 outliers 從統計結果中移除, 包含其他細胞種類。
- 將中央 95% 的區間定義為 reference range。

預測值表現

Predictive value tables

$$\text{Efficiency (Agreement)} = \left(\frac{TP + TN}{TP + FN + FP + TN} \right) 100 = \%$$

$$\text{Sensitivity} = \left(\frac{TP}{TP + FN} \right) 100 = \%$$

$$\text{Specificity} = \left(\frac{TN}{TN + FP} \right) 100 = \%$$

$$\text{Positive predictive value} = \left(\frac{TP}{TP + FP} \right) 100 = \%$$

$$\text{Negative predictive value} = \left(\frac{TN}{TN + FN} \right) 100 = \%$$

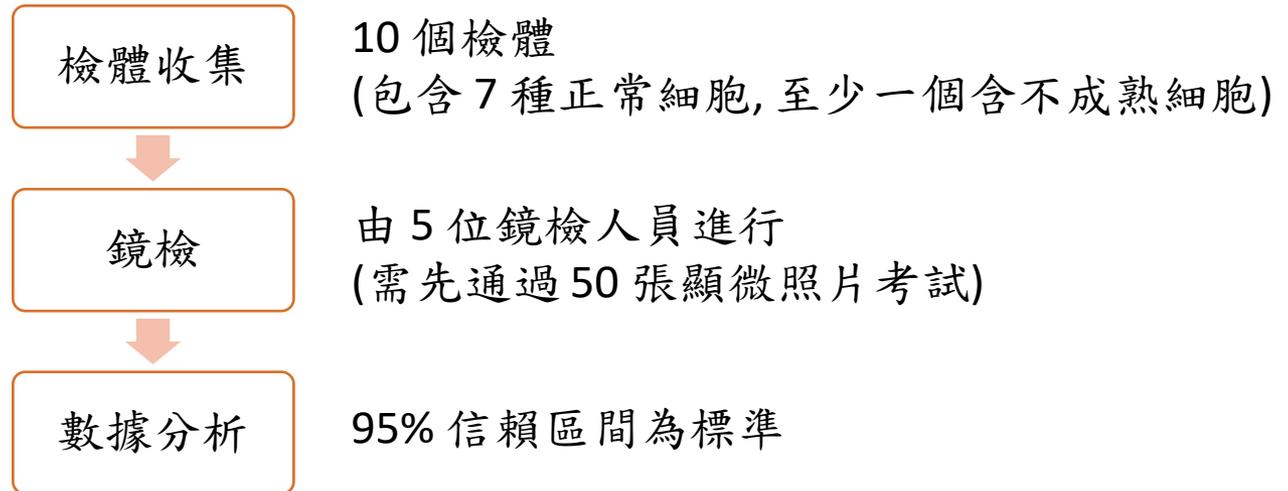
		Results of Test Method	
		Positive (Abnormal)	Negative (Normal)
Reference Method	Positive (Abnormal)	TP (True Positive)	FN (False Negative)
	Negative (Normal)	FP (False Positive)	TN (True Negative)

總結

總結

- 評估流程：

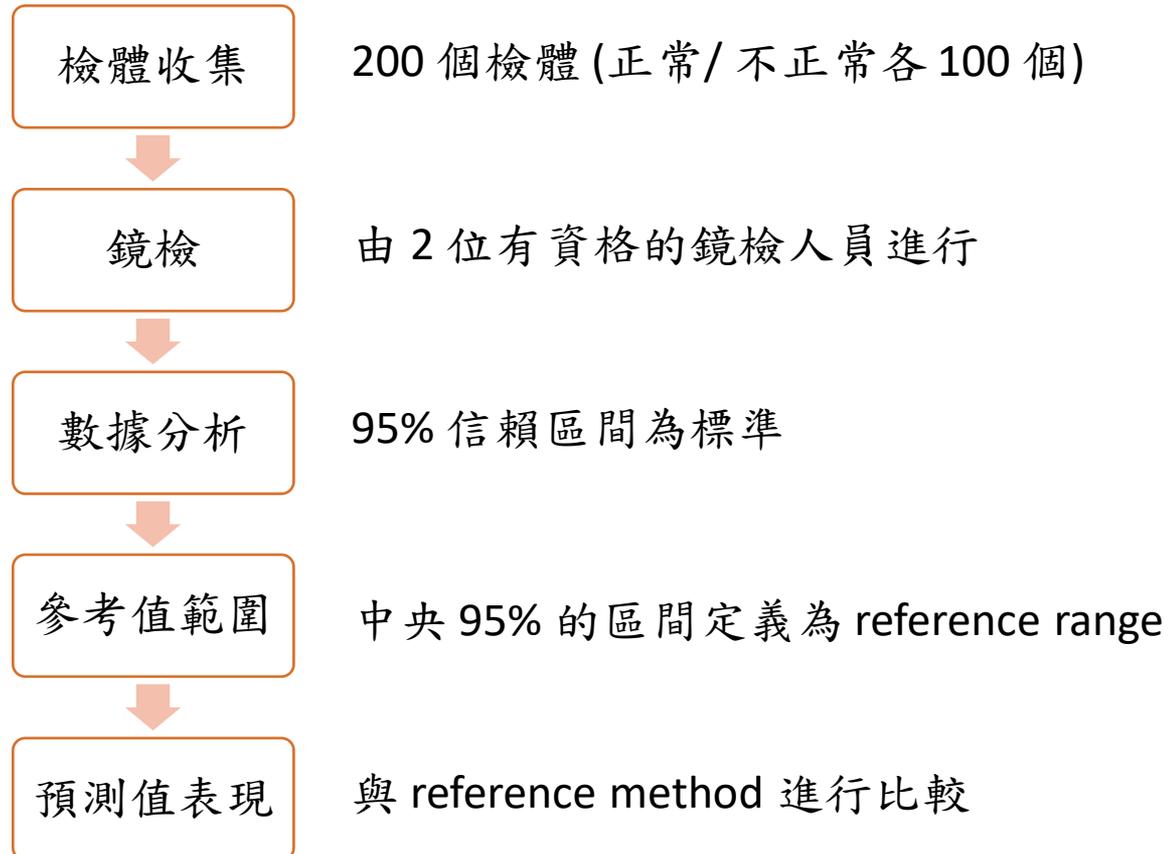
Reference WBC Differential Count



總結

- 評估流程：

Evaluation of Instrumental Methods



總結

- H20-A2 認為 multicolor flow cytometric immunophenotyping 更適合用於檢測低頻率及形態上較難分辨的細胞。一旦發展出 consensus method, 下版 H20 將以此為 true reference method。

謝謝聆聽
