

L'esame emocromocitometrico: considerazioni critiche su alcuni parametri "maggiori" in medicina dello sport

M. Buttarello

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico, Padova

Introduzione

Il doping ematico ha come obiettivo dichiarato l'aumento della concentrazione dell'emoglobina circolante al fine di incrementare la capacità di trasporto dell'ossigeno e quindi migliorare le prestazioni nei test di lunga durata. E' stato stimato che 500 mL di sangue intero possono aumentare di 100 mL la capacità totale di trasporto dell'ossigeno (1). Si è anche dimostrato che sono necessari aumenti di almeno il 5% della concentrazione emoglobinica per migliorare le prestazioni (2) e che un aumento dell'ematocrito (Ht) da 0.45 a 0.50 aumenta "l'uptake di ossigeno" dell'8% (3).

Si conoscono tre modalità per aumentare i livelli di emoglobina circolante: 1) trasfusioni di sangue autologo ed omologo, 2) uso di eritropoietina (EPO ricombinante) per stimolare farmacologicamente il midollo a produrre globuli rossi in eccesso rispetto alla condizione basale, 3) somministrazione di trasportatori dell'ossigeno (HBOC).

Le prime due condizioni, caratterizzate da aumenti combinati dell'emoglobina e dell'ematocrito, possono essere indagate con i test tradizionali, mentre nel terzo caso sono necessarie indagini specifiche su siero o plasma mediante spettrofotometria o cromatografia HPL.

I provvedimenti delle istituzioni sportive

Pur non essendo stati condotti studi definitivi sul valore ottimale dell'ematocrito per atleti di gare di resistenza, esiste tuttavia un limite non superabile dovuto all'aumento della viscosità; questa peraltro si ritiene trascurabile per valori di ematocrito inferiore a 0.50 (1). Aumenti eccessivi dell'ematocrito possono essere causa di iperviscosità e trombosi (trombosi venosa profonda, embolia polmonare, trombosi coronarica, ecc.), e questa viene aggravata dalla disidratazione cui questi atleti possono essere soggetti. Con lo scopo di limitare i rischi per la salute ed evitare risultati inficiati dal doping, alcune importanti istituzioni sportive che si occupano di sport di resi-

stenza hanno stabilito dei valori soglia oltre i quali l'atleta viene escluso dalla competizione:

Unione ciclistica internazionale (UCI)

- Ht superiore a 0.50 per i maschi e 0.47 per le femmine

Federazione sciistica internazionale-specialità nordiche (FIS)

- Hb superiore a 18.5 g/dL per maschi
16.5 g/dL per le femmine

Comitato olimpico nazionale (CONI), campagna "io non rischio la salute" (2000)

- Ht superiore a 0.50 per i maschi
0.47 per le femmine
- Hb superiore a 17 g/dL per i maschi
16 g/dL per le femmine.

L'utilizzo di valori soglia si presta tuttavia a due tipi di critiche: da una parte la possibilità che ci siano atleti che per cause "naturali" possono avere valori fisiologici superiori a quelli massimi consentiti (circa il 5% degli atleti) (4), e dall'altra il rischio di indurre al doping quanti, partendo da valori inferiori, possono fermarsi sottosoglia.

Pertanto, più che utilizzare isolati livelli decisionali risulta molto più utile sottoporre gli atleti a controlli periodici. L'UCI (pur mantenendo le soglie decisionali) prevede ad esempio quattro controlli durante l'anno. Altri operatori internazionali raccolti sotto la sigla SIAB (Science and Industry against blood doping) auspicano l'adozione di un "passaporto ematologico" contenente i risultati delle indagini sequenziali (4). In tal modo l'atleta può obiettivamente dimostrare che i valori dei parametri ematologici non hanno subito significative variazioni nel tempo.

Il CONI con il suo programma prevede di escludere dalla competizione gli atleti che al controllo presentano valori per Ht e Hb superiori del 10% rispetto al "valore medio individuale". Quest'ultimo rappresenta la media di almeno due valori risalenti ad un periodo precedente non superiore all'anno. Questi dati per poter essere utilizzati debbono ricadere entro un intervallo prefissato (Ht, fra 0.39 e 0.46 per i maschi e fra 0.36 e 0.43 per le femmine; Hb, fra 13 e 16 g/dL per i maschi e fra 12 e 15 g/dL per le femmine).

Va notato che scostamenti verso l'alto superiori al 10% per entrambi i parametri escludono l'atleta dalla competizione anche se i valori risultano inferiori alle soglie massime di 0.50 (0.47) per Ht e 17 (16) g/dL per Hb (5).

Variazioni dell'ematocrito e della concentrazione emoglobinica durante l'attività sportiva

Tralasciando le cause patologiche che si presume interessino marginalmente l'attività agonistica, sono peraltro note variazioni dei parametri connesse all'attività sportiva.

Diminuzione

- Pseudoanemia da diluizione: secondaria a espansione del volume plasmatico, è presente anche se la massa eritrocitaria risulta immoificata o addirittura aumentata (6, 7). In altri termini l'espansione del volume plasmatico è maggiore di quella della massa eritrocitaria. L'espansione del volume può essere del 6-25% rispetto al valore iniziale e compare nelle tre ore successive all'esercizio acuto (8). L'aumento risulta maggiore negli esercizi intensi e nelle gare di durata e persiste per i successivi 3-5 giorni (1).
- Emolisi: l'emolisi intravascolare è tipica dei maratoneti ma è stata descritta anche in nuotatori e danzatori. E' dovuta a frammentazione meccanica (9) ed è correlata alla durata e intensità dell'esercizio. L'anemia è tuttavia rara. L'elevata temperatura può contribuire alla fragilità eritrocitaria e i globuli rossi più vecchi (più piccoli e meno deformabili) sono risultati essere i più fragili. L'anemia correlata all'emolisi è macrocitica ed è accompagnata da un aumento dei reticolociti.
- Da carenza marziale: il deficit di ferro ha una prevalenza equivalente a quella della popolazione generale di pari età e sesso (10). Sporadiche segnalazioni indicano un possibile aumento di frequenza nei podisti di sesso femminile specie se a dieta prevalentemente vegetariana. La vera anemizzazione è comunque estremamente rara

(0.3% nei vari studi) e la prevalenza non differisce dalla popolazione generale (1, 10).

Aumento

dopo esercizi intensi e prolungati la disidratazione può causare aumento dell'ematocrito, soprattutto negli sport di durata. Tale aumento è comunque trascurabile, attorno a 0.01, e se presente, lo è solo immediatamente dopo la fine dell'esercizio. Dopo 24 ore si ha addirittura una riduzione media di 0.03 (11).

Altri Autori (12-14) hanno descritto aumenti più consistenti dell'ematocrito (0.03-0.04), riscontrati subito dopo esercizi brevi ma intensi (cicloergometro), oppure dopo maratone. Per contro, allenamenti di lunga durata o competizioni ripetute intervallate da riposo (es. gare ciclistiche a tappe) non hanno determinato aumenti ma addirittura diminuzioni dell'ematocrito. Ciò naturalmente vale solo se si studiano situazioni nelle quali sia sicura la non assunzione di sostanze atte ad incrementare il valore di Ht.

Le cause generali di variabilità dell'ematocrito e della concentrazione emoglobinica

Questa variabilità può essere suddivisa nelle sue componenti fondamentali: preanalitica, biologica intra e interindividuale ed analitica.

Variabilità preanalitica. Questa forma di variabilità dipende dal digiuno e dal livello di idratazione, dall'orario del prelievo, dalla postura e temperatura ambientale, dalla sede del prelievo e dalla durata dell'applicazione del laccio emostatico, dal diametro dell'ago ed infine dal rapporto sangue/anticoagulante. Nell'insieme si può dire che queste cause possono essere ridotte al minimo adottando modalità standardizzate di prelievo (ad esempio al mattino prima di colazione, per l'UCI).

Variabilità biologica inter ed intraindividuale. I dati di cui disponiamo derivano da ricerche eseguite su soggetti adulti sani o, più raramente su anziani. La Tabella I riporta gli intervalli di riferimento per l'adulto (variabilità interindividuale), pubblicati su la-

Tabella I. Intervalli di riferimento proposti per i parametri Hb e Ht sulla popolazione adulta.

Autori		Parametri	
		Hb (g/dL)	Ht (L/L)
Henry (15)	maschi	14.0-17.5	0.415-0.504
	femmine	12.3-15.3	0.359-0.446
Kjeldsberg (16)	maschi	13.0-18.0	0.400-0.520
	femmine	12.0-16.0	0.350-0.470
Williams (17)	maschi	14.0-17.5	0.420-0.500
	femmine	12.3-15.3	0.360-0.450
Saxena-Wong (18)	maschi	13.0-17.3	0.380-0.490
	femmine	11.4-15.5	0.340-0.450

Tabella II. Variabilità biologica intraindividuale espressa come CV%.

Autori	Intervallo Temporale	Parametri	
		Hb (CV%)	Ht (CV%)
Statland et al (21)	giorno/giorno	2.2	2.6
	settimana/settimana	2.7	2.6
Costongs et al (22)	giorno/giorno	4.1	4.9
	mese/mese	3.4	4.2
Fraser et al (23)	5 mesi	2.7	2.8
Dot et al (24)	1 anno	2.8	2.9
Richardson-Jones et al (25)	giorno/giorno	3.0	3.7

vori o manuali di recente pubblicazione (15-18). Da questa tabella si può vedere come alcuni Autori posizionino il limite superiore degli intervalli di riferimento oltre i valori soglia per l'esclusione degli atleti dalle competizioni. Spesso non vengono riportate le modalità di calcolo di questi intervalli, e per numerosità del campione e per procedure statistiche. Nel caso probabile che rappresentino i 95 percentili centrali della distribuzione si deve ritenere che un ulteriore 2.5% dei soggetti ritenuti normali abbia valori eccedenti quelli riportati. Questa è una delle critiche più frequenti all'utilizzo dei valori soglia.

Da un recente studio retrospettivo relativo a 523 determinazioni condotte su 92 ciclisti maschi in epoca antecedente la disponibilità dell'EPO (19) risulta che il 10.3% dei campioni presentava un valore di Ht superiore a 0.50 e con le regole attuali ciò avrebbe comportato un elevato numero di falsi positivi. Tuttavia, in un analogo studio (20) relativo ad analisi condotte su 353 campioni di sangue provenienti da 34 ciclisti professionisti i valori di Ht non hanno mai superato 0.48. Un ulteriore problema nasce dall'utilizzo di un parametro piuttosto che l'altro, ad esempio 18.5 g/dL di emoglobina in condizioni normali corrispondono ad un valore dell'Ht intorno a 0.55, ben oltre gli intervalli di riferimento. La Tabella I mostra infatti che il valore superiore dell'intervallo per i maschi normali è 18 g/dL. Ne consegue che alcune organizzazioni quali la FIS ritengono accettabili valori non ammessi da altri o, peggio al di fuori dell'intervallo di riferimento per i normali.

Una delle possibili soluzioni allo stato attuale è dunque il controllo sequenziale dell'atleta in modo da individuare variazioni eccessive e non giustificate. Un'alternativa potrebbe essere il calcolo di intervalli di riferimento specifici per le discipline sportive di resistenza, ma con la premessa di analizzare atleti sicuramente esenti da doping.

Gli studi sulla *variabilità biologica intraindividuale* sono abbastanza concordi sui risultati indipendentemente dal luogo, dall'età dei soggetti esaminati, e dall'intervallo di tempo considerato. La Tabella II riporta una sintesi di quanto disponibile (21-25).

Per l'ematocrito il CV è sempre inferiore al 5% (range 2.6-4.9) mentre per la concentrazione emo-

globinica non supera il 4.1% (range 2.2-4.1). *Variabilità analitica.* La variabilità analitica comprende l'errore sistematico e l'imprecisione e può essere stimata (come dato medio) dalle indagini di verifica esterna di qualità. I materiali utilizzati per queste indagini sono costituiti da sangue stabilizzato che può dare risultati diversi su analizzatori a differente filosofia analitica (con principio resistivo o a dispersione di luce). Per questo motivo i risultati ottenuti su 9 esercizi di VEQ della Regione Veneto (biennio 2000-2001 basati su materiale stabilizzato) sono stati confrontati con quelli di una precedente VEQ (Trentino Alto Adige 1991) che ha fatto uso di sangue fresco (Tab. III) (26).

Tabella III. Coefficienti di variazione percentuale ottenuti da esercizi di VEQ.

Materiale	Parametri	
	Hb (CV%) Intervallo	Ht (CV%) intervallo
VEQ Veneto 1999-2001 (Sangue stabilizzato)	1.40-2.50	4.85-6.79
VEQ Trentino Alto Adige 1991 (Sangue fresco)	0.99-3.02	1.66-4.89

Queste considerazioni sulla variabilità analitica sono necessarie poiché i moderni analizzatori ematologici eseguono misure dirette del volume corpuscolare sul singolo eritrocita e ricavano l'ematocrito per calcolo. La misura del volume cellulare fa riferimento a logiche analitiche differenti, e anche qualora si utilizzi lo stesso principio possono variare le modalità per la prevenzione degli errori di misura del volume (focalizzazione idrodinamica o sistemi più o meno sofisticati per la pulizia elettronica degli impulsi anomali).

Le esigenze di standardizzazione

Uno dei più importanti obiettivi della Medicina di Laboratorio è la comparabilità dei risultati ottenuti

Tabella IV. Materiali e metodi di riferimento per la determinazione della concentrazione emoglobinica e dell'ematocrito.

<i>Titolo</i>	<i>Autori</i>	<i>Pubblicazione</i>
Recommendations for reference methods for haemoglobinometry in human blood and specifications for international hemoglobin cyanide standard	ICSH expert panel on haemoglobinometry	J Clin Patol 1996;49:271-4
Recommendation for reference method for the packed cell volume (PCV)	ICSH expert panel on cytometry	Lab Hematol 2001;7:148-70

in luoghi e tempi diversi, con lo stesso o con differenti metodi. Per ottenere questo è necessario disporre di metodi e materiali di riferimento o standard a questi tracciabili.

Per i due parametri considerati disponiamo attualmente di metodi e/o materiali di riferimento (Tab. IV) (27, 28).

Discussione e Conclusioni

Come mostrato dai risultati sulle VEQ la variabilità interlaboratorio per la determinazione dell'Hb è sempre inferiore a quella per l'Ht. Ciò dipende sia dall'uso di un metodo fotometrico, intrinsecamente più semplice di una misura di volume cellulare, sia soprattutto, dal disporre da lungo tempo di materiali e metodi di riferimento ai quali sono "tracciati" i diversi standard secondari. Per l'ematocrito soltanto da alcuni mesi è disponibile un metodo di riferimento che non richiede l'uso di traccianti radioattivi per la correzione del plasma intrappolato, come prevedeva il precedente metodo proposto dall'ICSH. Il suo utilizzo pur essendo teoricamente alla portata di

ogni laboratorio è però prevalentemente rivolto ai produttori di standard secondari o di materiali per la calibrazione.

Che la calibrazione attuale degli analizzatori non sia ottimale per l'Ht lo dimostra un recentissimo studio che ha posto a confronto i valori ottenuti con il nuovo metodo di riferimento proposto dall'ICSH con quelli ottenuti con il metodo centrifugo tradizionale (29) o con analizzatori commerciali calibrati secondo le indicazioni dei rispettivi costruttori (Tab. V) (30). Come si può notare le pendenze sono sempre inferiori all'unità e ciò comporta sovrastima ai bassi valori e sottostima ai valori più elevati. Da un semplice calcolo si ottiene che per valori veri di Ht (PCV) di 0.51 cioè oltre la soglia di esclusione, 3 metodi (1 centrifugo e 2 automatici fornirebbero risultati inferiori a 0.5 (fra 0.486 e 0.495), alcuni quindi con differenze anche importanti. In conclusione è quindi necessario utilizzare metodi calibrati secondo il miglior stato dell'arte e a maggior ragione nel caso si applichino regole che prevedono l'uso di valori soglia.

Bibliografia

1. Shaskey DJ, Green GA. Sport haematology. Sports Med 2000;29:27-38.
2. Gledhill N. Blood doping and related issues: a brief review. Med Sci Sports Exer 1992;12:182-9.
3. Ekblom B, Berglund B. Effects of erythropoietin administration on maximal aerobic power. Scand J Med Sci Sports 1991;1:88-93.
4. Ashenden M. A strategy to deter blood doping in sport. Haematologica 2002;87:225-34.
5. CONI - Commissione scientifica antidoping. Io non rischio la salute. [Http://www.sportpro.it/doping/regolamenti/NONris20b.htm](http://www.sportpro.it/doping/regolamenti/NONris20b.htm)
6. Wells CL, Stern JR, Hecht LH. Hematological changes following a marathon race in male and female runners. Eur J Appl Physiol 1982;48:41-9.
7. Weight LM, Darge BL, Jacobs P. Athletes pseudoanemia. Eur J Appl Physiol 1991;6:358-62.
8. Balaban EP. Sports anemia. Clin Sports Med 1992; 11:313-25.
9. Davidson RJL. Exertional haemoglobinuria: a report on three cases with studies on the haemolytic mechanism. J Clin Pathol 1964;17:536-40.
10. Eichner RE. Sports anemia, iron supplements, and blood doping. Med Sci Sports Exerc 1992;24 (suppl 9):s315-8.
11. Neumayr G, Pfister R, Mitterbauer G, Gaenger H,

Tabella V. Confronto fra Ht (PCV) di riferimento e Ht ottenuto con microcentrifuga o con analizzatori ematologici automatizzati.

<i>Metodo</i>	<i>Slope</i>	<i>Intercetta</i>
Centrifugo (capillare Drummond)	0.9464	0.0123
Centrifugo (capillare BD)	0.9681	0.0149
Centrifugo (capillare Fisher)	0.9688	0.0143
Bayer ADVIA 120 (I)	0.919	0.0215
Bayer ADVIA 120 (II)	0.942	0.0251
Coulter STKS	0.966	0.0095
Sysmex NE 8000	0.9198	0.0174
Sysmex K 1000	0.910	0.036

- Joannidis M, Eibl G, et al. Short-term effects of prolonged strenuous endurance exercise on the level of haematocrit in amateur cyclists. *Int J Sports Med* 2002;23:58-61.
12. Schmidt W, Biermann B, Winchenbach P, Lison S, Böning D. How valid is the determination of hematocrit values to detect blood manipulations? *Int J Sports Med* 2000; 21:133-8.
 13. Van Beaumont W. Red cell volume with changes in plasma osmolarity during maximal exercise. *J Appl Physiol* 1973;35:55-61.
 14. Whiting PH, Maughan RJ, Miller JD. Dehydration and serum biochemical changes in marathon runners. *Eur J Appl Physiol* 1984;52:183-7.
 15. Henry JB, ed. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Philadelphia: Saunders; 2001.
 16. Kjeldsberg CR. *Practical diagnosis of hematologic disorders*. Chicago: ASCP press; 2000.
 17. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtmann MA, eds. *Hematology*. New York: McGraw Hill; 1990.
 18. Saxena S, Wong ET. Heterogeneity of common hematologic parameters among racial, ethnic and gender subgroups. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:715-9.
 19. Schumacher YO, Gratwohl D, Barturen IM, Wollenweber M, Heinrich L, Schmid A, et al. Haemoglobin, haematocrit and red blood cell indices in elite cyclists. Are the control values for blood testing valid? *Int J Sports Med* 2000; 21:380-5.
 20. Saris WHM, Senden JMG, Brouns F. What is a normal red-blood cell mass for professional cyclists? *Lancet* 1998;352:1785.
 21. Statland BE, Winkel P, Harris SC, Burdsall MJ, Saunders AM. Evaluation of biologic sources of variation of leukocyte counts and other hematologic quantities using very precise automated analyzers. *Am J Clin Pathol* 1977;69:48-54.
 22. Costongs GMPJ, Janson PCW, Bas BM, Hermans J, Brombacher PJ, Van Wersch JWJ. Short-term and long-term individual variations and critical differences of haematological laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:69-76.
 23. Fraser CG, Wilkinson SP, Neville RG, Knox JD, King JF, Mac Walter RS. Biologic variation of common hematologic laboratory quantities in elderly. *Am J Clin Pathol* 1989;92: 465-70.
 24. Dot D, Mirò J, Fuentes-Arderiu X. Within-subject biological variation of hematological quantities and analytical goals. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 825-6.
 25. Richardson Jones A, Twedt D, Swaim W, Gottfried E. Diurnal change of blood count analytes in normal subjects. *Am J Clin Pathol* 1996;106:723-7.
 26. Buttarello M, Cosio G, Gaspa U, Gentilini I, Lorenz C, Rizzotti P. External quality assessment in hematology: complete blood count and leukocyte differential count with use of fresh blood. *Eur J Lab Med* 1994; 2:101-8.
 27. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH). Expert panel on haemoglobinometry. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J Clin Pathol* 1996; 49:271-4.
 28. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH). Expert panel on cytometry. Recommendation for reference method for the packed cell volume. *Lab Hematol* 2001;7:148-70.
 29. Bull BS, Hay KL. Is the packed cell volume (PCV) reliable? *Lab Hematol* 2001;7:191-6.
 30. Bull BS, Cacho VPR, Hay KL. Control of analyzer slope and intercept in the measurement of packed red cell volume (PCV): part I. *Blood Cell Mol Dis* 2002; 28:1-8.