

# Performance strumentali ed obiettivi clinici in Ematologia di Laboratorio

P. Cappelletti

*Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio  
Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli di Pordenone*

## Riassunto

La sicurezza di un sistema efficace di screening dei patologici e l'aiuto di informazioni suggestive per la clinica del paziente sono gli obiettivi clinici generali dell'ematologo di laboratorio nell'utilizzo della tecnologia ematologica. L'era tecnologica dell'ematologia è caratterizzata dalla sofisticazione progressiva attraverso la scoperta di metodi analitici nuovi da un lato e dall'altro attraverso il sincretismo analitico e lo sviluppo di software raffinati per l'integrazione dei dati. Nel dialettico rapporto tra obiettivi clinici e metodologie analitiche, l'ematologia di laboratorio ha contaminato da sempre le esigenze di accuratezza e precisione dei metodi con quelle della sensibilità e specificità cliniche.

L'attenzione per conte e misure va scemando nel tempo nella convinzione che le performance strumentali siano oggi largamente e diffusamente ottimali, salvo le conte piastriniche e reticolocitarie in condizioni citopeniche. Viceversa l'attenzione per il riconoscimento cellulare è andato aumentando in rapporto all'identificazione e misura di popolazioni "difficili" o non presenti normalmente nel sangue periferico, con la speranza di una formula leucocitaria automatizzata estesa (EDC extended differential count). Da questo punto di vista è importante non solo la sensi-

bilità, ma anche e soprattutto la specificità degli allarmi strumentali.

La sperimentazione del GdS Ematologia (GdS-E) SI-MeL 2002-2003 ha dimostrato, per quanto attiene alle performance cliniche, un valore predittivo negativo (VPN) per gli allarmi generici oscillante tra il 98.3 e il 100% e un VPN cumulativo per gli allarmi specifici intorno al 99%. Tuttavia, il VPN per i singoli allarmi specifici è decisamente inferiore a quello generale.

In questo quadro nel 2008 il GdS-E ha effettuato una nuova valutazione comparata degli strumenti ematologici per esaminare i punti delicati della sensibilità/specificità clinica e delle informazioni funzionali e prognostiche, in relazione anche a situazioni cliniche della "ematologia non ematologica". Si affrontano, infatti, i problemi della sensibilità clinica nelle situazioni critiche, ai limiti inferiore e superiore della scala delle misure ematologiche, esemplificati dagli eritroblasti, e i problemi della specificità clinica di misure e riconoscimento, esemplificati da monociti ed immaturità mieloide. Infine, il rapporto forma/funzione/terapia viene esaltato dall'analisi dell'importanza della integrazione delle informazioni ematologiche in una specifica situazione clinica particolarmente critica, la sepsi.

## Summary

### Analytical Performances and Clinical Aims in Laboratory Haematology

The clinical aims of the haematological technology are a safe case finding and an efficient aid for the clinical condition of the patient. The present technological era of haematology developed by the discovery of new methods, the combination of methodologies in one instrument ("technological syncretism") and the integration of electronic data for suggestive information. On this way, laboratory haematology combined the needs of accuracy and preci-

sion of the methods with the hopes of clinical sensitivity and specificity.

Attention for counting and measuring is decreasing in last decades because the analytic performances are considered generally excellent, unless the platelets and reticulocytes counts at low concentrations. On the contrary interest for automated cellular recognition is growing because of the possibility of identifying "difficult" or abnormal cells in the blood, with the perspective of an electronic extended differential count (EDC).

For this goal it is essential the specificity of flags and/or

identification of the cells, beside their sensitivity. The evaluation promoted by Haematology Study Group of SI-MeL (GdS-E) in 2002-3 demonstrated Negative Predictive Values (NPV) between 98.3 and 100% for the general flags and a NPV ~ 99% for the combination of general and specific flags. But the Positive Predictive Values and NPVs of single specific flags are lower.

Therefore, in 2008 GdS-E re-evaluated the haematological analyzers with the aims of studying the critical points of clinical specificity/sensibility related to functional and prognostic information and the relationship among subjective (physician's senses and memory) and objective (automated instruments) viewpoints related to the clinical effectiveness of the haematological laboratory informa-

tion in the so called "non-haematological haematology". The attention is focused to the issues of the clinical sensitivity at the lower and upper ends of the scale of measuring, i.d. in the critical clinical conditions (example: NRBC); to the issues of the specificity or "quality" of measures and recognitions for linking shape and function (examples: monocytes and granulocytic immaturity); to the issues of technological syncretism and physicians' skills and culture for effective diagnostic, prognostic, therapeutic information in critical and complex clinical condition (example: sepsis).

*Key words:* haematology, instrumental evaluation, clinical sensitivity.

Gli obiettivi clinici dell'ematologia che hanno da sempre appassionato maggiormente gli ematologi di laboratorio, ancora dai tempi della nascita dell'ematologia morfologica e clinica, sono quelli riferibili alle malattie ematologiche neoplastiche. Tuttavia nel mondo reale, le alterazioni ematologiche più frequenti sono le anemie, le variazioni leucocitarie nelle malattie infiammatorie ed infettive e nelle immunodeficienze, le alterazioni numeriche delle piastrine, le patologie emorragiche e trombofiliche. Esse rappresentano quella che è stata definita "ematologia non ematologica", principale campo di attività dell'ematologo di laboratorio.

Mentre nella "ematologia ematologica" predominano l'aspetto diagnostico specialistico e il monitoraggio dell'efficacia della terapia e della ripresa della malattia, nella "ematologia non ematologica" il campo d'azione è rappresentato dalla individuazione del caso patologico nella popolazione sana, dall'interpretazione transpecialistica e dal monitoraggio delle alterazioni ematologiche secondarie<sup>1</sup>.

L'era tecnologica dell'ematologia<sup>2</sup> è stata caratterizzata dalla sofisticazione progressiva di tecnologie che hanno consentito performance strumentali sempre più utili ai fini clinici della disciplina.

I percorsi seguiti sono riassumibili in due traiettorie, rappresentate da un lato dalla precisione ed accuratezza delle conte e dei volumi e dall'altro dal riconoscimento cellulare vuoi dei citotipi normalmente rappresentati nel sangue e morfologicamente definiti nella loro "differenza" orizzontale vuoi della forme normalmente presenti nel midollo e morfologicamente definite nella loro "differenza" verticale.

Anche i modi attraverso i quali la maturazione tecnologica in ematologia si è attuata sono sostanzialmente due, da un lato la scoperta di metodi analitici - iniziata con la automazione della misura resistiva delle emazie e dei leucociti che ha determinato la storia delle conte e dei volumi delle particelle del sangue e delle loro applicazioni cliniche e continuata con il superamento del fattore forma e la applicazione al flusso continuo della citochimica automatizzata e delle altre metodologie di riconoscimento cellulare - e dall'altro il sincretismo analitico e lo sviluppo di software raffinati per l'integrazione dei dati analitici e la generazione di nuove informazioni aggiuntive.

Nel dialettico rapporto tra obiettivi clinici e metodolo-

gie analitiche, l'ematologia di laboratorio ha contaminato da sempre le esigenze di accuratezza e precisione dei metodi e di affidabilità strumentale con quelle della sensibilità e specificità cliniche, ispirate dapprima al grande sogno dell'ematologia a cavallo del secolo scorso di legare la forma alla funzione e più recentemente al grande sogno del millennio di legare la "forma" alla prognosi e alla terapia.

In un quadro di riferimento così complesso un problema centrale è stato quello della valutazione dei metodi e degli strumenti e del loro "riferimento". Si sono distinti in questo ambito l'International Committee for Standardization in Haematology (ICSH) e il National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) divenuto dal 1 gennaio 2005 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

ICSH<sup>3</sup> dalla sua nascita nel 1963 collegata all'obiettivo di migliorare e standardizzare la misura dell'emoglobina ha privilegiato gli aspetti quantitativi e "tradizionali" della standardizzazione ematologica con lo scopo di ottenere precisione, accuratezza, specificità ed armonizzazione di risultati tra i laboratori di tutto il mondo e tra i diversi strumenti e metodi dello stesso laboratorio, attraverso la classificazione dei materiali standard e dei metodi standardizzati e la collaborazione tra professionisti ed industria per la produzione di dati scientificamente corretti, posizioni di consenso e programmi educativi. Dai primitivi campi della standardizzazione dell'emoglobina e del metodo raccomandato per la misura della sideremia, ICSH si è occupato di definire il riferimento per la misura di RBC e WBC, ematocrito o PCV (Paked Cell Volume) ed altri aspetti delle misure in ematologia fino ad affrontare problemi scottanti come quelli delle determinazioni in POCT. Il suo Expert Panel on Cytometry si è occupato dei Protocolli valutativi delle strumentazioni ematologiche automatizzate nel 1984 esteso poi nel 1994 anche agli analizzatori per la conta differenziale ed i reticolociti.

Anche NCCLS-CLSI<sup>4</sup>, attivo dal 1967, si è occupato di standardizzare principi, materiali, metodi e procedure per la ematologia di routine dalla velocità di sedimentazione (standard H2-A4), ematocrito (H7-A3), emoglobina (H15-A3) alle procedure di gestione ed analisi dei campioni ematologici (H18-A3) e di calibrazione e controllo degli analizzatori (H26-A; H38-P) fino alle linee guida per l'analisi immunofenotipica dei subset linfocitari e dei precursori.

**Tabella I.** Sperimentazione strumentale GdS-E SIMeL 2002-2003. Sensibilità clinica degli allarmi globali (numerici + allarmi) delle strumentazioni esaminate secondo NCCLS H20-A.

	Abbott CD 4000	Abx Pentra 120	Bayer Advia 120	Coulter LH750	Sysmex XE 2100
VP	11	9	13	10	10
VN	151	173	133	144	164
FP	28	6	45	35	16
FN	1	3	0	2	1
Sensibilità	91.6	75.0	100	83.3	90.9
Specificità	84.3	96.6	74.7	80.4	91.1
VPP	28.2	60.0	22.4	22.2	38.4
<b>VPN</b>	<b>99.3</b>	<b>98.3</b>	<b>100</b>	<b>98.6</b>	<b>99.4</b>

ri ematopoietici (H42-A2) e per l'analisi citometrica delle cellule linfomatose (H43-A2). CLSI ha prodotto documenti utili alla valutazione degli aspetti stimolanti degli analizzatori ematologici relativamente alla conta differenziale del leucociti (H20-A2) e alla conta citometrica dei reticolociti in un lavoro congiunto NCCLS-ICSH (H44-A2).

All'automazione ematologica si è da sempre riconosciuta, accanto alla velocità di esecuzione, la precisione, altro non fosse che per motivi teorici statistici. L'accuratezza strumentale delle conte è stata provata contro la classica "camera di conta" secondo metodi standardizzati. L'ultimo protocollo di valutazione di conte e misure dei parametri di base è del 1994 e l'attenzione per questi aspetti degli analizzatori ematologici è andato scemando nella convinzione che le performance strumentali siano oggi largamente e diffusamente ottimali<sup>5</sup>. Tuttavia alcuni problemi permangono almeno per le piastrine anche con il metodo immunologico (CD41 e CD61) proposto come riferimento internazionale e per i reticolociti<sup>1,6</sup>.

Maggior attenzione è stata prestata, viceversa, per gli aspetti della conta differenziale, nonostante che il metodo di riferimento sia rimasto quello visivo, con tutti i limiti cognitivi e tecnici ben conosciuti, anche se nel tempo sono stati proposti metodi alternativi sulla base dei riconoscimenti immunofenotipici. Solo per i monociti si va affermando un metodo di riferimento citofluorimetrico<sup>7</sup>, che peraltro accentua le discrepanze tra i risultati dei metodi automatizzati calibrati sui diversi riferimenti (ottico vs immunologico) e non risolve tutte le problematiche diagnostiche inerenti i monociti circolanti. Lo stimolo all'attenzione per la conta differenziale viene da un lato dalla tradizionale sensibilità morfologica degli ematologi e dalla tensione alla ricerca dell'utilità clinica delle misure e dei riconoscimenti e dall'altro dalla ricchezza delle suggestioni strumentali di continuo rinnovate.

In effetti sono due gli obiettivi clinici generali che l'ematologo di laboratorio si pone nell'utilizzo della tecnologia per il riconoscimento dei citotipi del sangue circolante: da un lato la sicurezza di un sistema efficace di "case finding" e dall'altro la curiosità per informazioni aggiuntive e suggestive per la diagnosi e la clinica del paziente.

Dal primo punto di vista va ricordato che il riferimento sta nella capacità "tradizionale" di individuazione del caso patologico nel contesto della popolazione sana, esemplificato nel seppur datato lavoro di Koepke et al<sup>8</sup>. 73 tecnici esaminarono con una conta a 100 elementi 496 strisci di pazienti con anomalie distribuzionali presenti nel 34% dei

campioni: i falsi positivi furono pari al 1.6%, ma i falsi negativi il 14.1%.

La sperimentazione 2002-2003 del GdS Ematologia della SIMeL (GdS-E) eseguita secondo i protocolli internazionali NCCLS ed ICSH su 353-428 soggetti (completi 332; presentati 196: 133 normali e 63 patologici) e sulle strumentazioni allora disponibili (Abbott CD 4000, ABX Pentra 120, Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH, Sysmex XE2100) ha evidenziato che le performance strumentali per l'imprecisione si confermano migliori del miglior metodo microscopico e che sono mediamente migliorate rispetto le precedenti rispettive tecnologie esaminate 10 anni prima<sup>9</sup>, così come anche per l'accuratezza i risultati sono migliorativi rispetto le precedenti versioni strumentali<sup>9</sup>.

Inoltre la sperimentazione ha dimostrato, per quanto attiene alle performance cliniche, un valore predittivo negativo (VPN) per gli allarmi generici oscillante tra il 98.3 e il 100 % e un VPN cumulativo per gli allarmi specifici intorno al 99% (Tab. I).

Tuttavia una recente valutazione<sup>10</sup> di regole di selezione per lo striscio ematologico uscite da un Gruppo di Consenso internazionale ha rilevato un tasso di falsi negativi pari al 2.86% e di falsi positivi pari al 18.60% con un numero delle revisioni richieste del 29.80%, in 13.298 pazienti esaminati in 15 laboratori di 6 Nazioni con prevalenza di patologia dell'11.20%. E' interessante notare che nella ricerca di Krause<sup>11</sup> di 15 anni prima il tasso di falsi negativi è del 3%, simile ai dati americani dell'epoca (2-4%). Ciò parrebbe indicare una stabilità della "sensibilità clinica" strumentale nella distinzione tra normale e patologico, almeno per quel che riguarda gli aspetti inerenti la "formula leucocitaria".

Dall'altro versante, il dibattito verte sulla "qualità" delle informazioni aggiuntive ed in particolare della misura e riconoscimento di cellule "difficili" o non presenti normalmente nel sangue periferico e nel significato anche quantitativo degli "allarmi" o "flag". Se lo standard H20 di CLSI anche nella sua versione A2 del 2007<sup>12</sup> tiene conto solo dei neutrofili (segmentati e band), dei linfociti (normali o variant), dei monociti, degli eosinofili e dei basofili e della segnalazioni di "other" o "flag" delle cellule anomale o non classificate, ISLH<sup>13</sup> ha proposto la implementazione strumentale della conta differenziale estesa (*extended differential count*, EDC), comprendente come parte integrale della conta elettronica i granulociti immaturi e gli eritroblasti, i linfociti varianti, i blasti e le cellule progenitrici

**Tabella II.** Extended Differential Count<sup>13</sup>.

Traditional	Reference Intervals %	Extended	Limits %	Frequency
Neutrophils	38-68	Left shift	Var	NA
Lymphocytes	22-50	IG	>1	11%
Monocytes	5-11.4	NRBC	>1	2%
Eosinophils	0.8-5.3	Blasts	>1	0.7%
Basophils	0.2-1.0	Atypical L	>10	0.3%
		HPC		NA
		Other		0.2%

ematopoietiche ma non il *left shift* (Tab. II). Ci si aspetta che ciò sostituisca gradatamente la gran parte della routine ematologica, riservando l'esame morfologico a casi del tutto particolari.

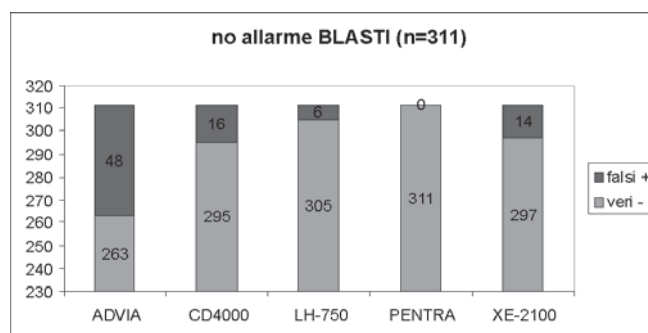
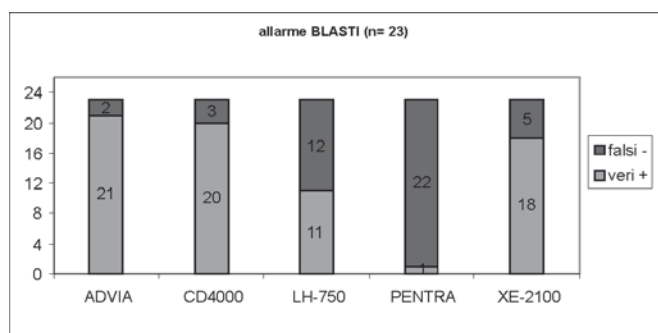
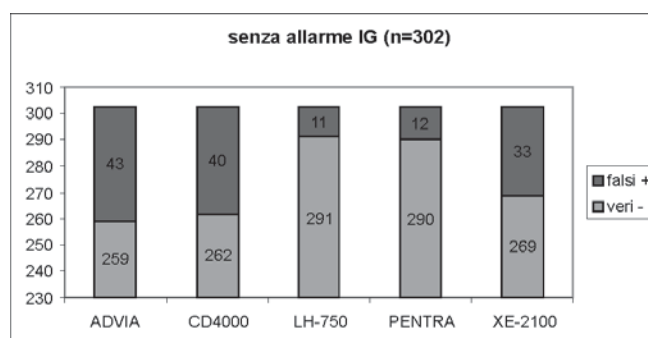
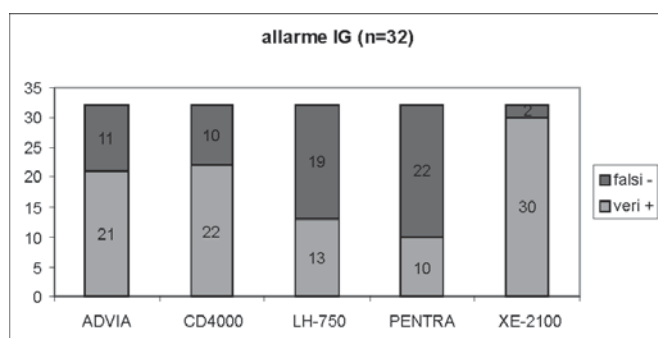
Il problema qui diventa allora la specificità dei singoli allarmi. Una ampia ed aggiornata sintesi della letteratura, che riprende concetti ed elaborazioni teoriche forgiatesi nell'ambito del GdS-E, è stata recentissimamente proposta da Mauro Buttarello<sup>6</sup>.

Tuttavia, in generale si può sostenere che il VPN per i singoli allarmi è decisamente inferiore a quello generale (per i blasti, ad esempio, tra il 91 e il 95%, anche a distanza di 10 anni<sup>9</sup>). La sperimentazione 2002-2003 del GdS-E ha, infatti, mostrato la diversità di performance nei singoli allarmi<sup>14</sup> della strumentazione esaminata. In particolare vi sono differenti performance per quanto attiene gli allarmi o quantificazione di blasti, IG (immature granulocytes), eritroblasti (NRBC) e linfociti "variant" (Fig. 1-4 a e b). Le conclusioni della sperimentazione GdS-E 2002-2003 sono state che filosofie e linguaggi strumentali differenti producono sensibilità e specificità differenti per allarmi e per strumenti, con VPP tendenzialmente bassi ma VPN costantemente elevati. Ciò corrisponde al primo obiettivo clinico dell'automazione (screening dei patologici) ma esalta la necessità, per una adeguata sensibilità e specificità, del-

l'analisi integrata di conteggi, allarmi e grafici strumentali presenti nel referto, nella loro complessità, e l'elevata preparazione tecnica e culturale richiesta all'ematologo di laboratorio ai fini del secondo obiettivo clinico della tecnologia ematologica, quello cioè dell'identificazione cellulare a fini diagnostici e prognostici.

In questo quadro di performance pratiche e di dibattito teorico, nel 2008 il GdS-E si è proposto di eseguire una nuova valutazione comparata degli strumenti ematologici presenti sul mercato italiano (Abbott Sapphire, ABX Pentra 120DX, Beckman Coulter LH serie 7xx, Siemens Advia 2120, Sysmex XE 2100-XE 5000) con l'obiettivo di affrontare i punti delicati della sensibilità/specificità clinica e delle informazioni funzionali e prognostiche, in relazione anche a situazioni cliniche definite dell'ematologia non ematologica.

Nelle presentazioni che costituiscono la Sessione Ematologica del 22° Congresso Nazionale SIMeL e del 1° Evento Nazionale Congiunto SiBioC-SIMeL si affrontano, infatti, i problemi della sensibilità clinica nelle situazioni critiche, ai limiti inferiore e superiore della scala delle misure ematologiche, esemplificate dalla valutazione dei sistemi di misura e riconoscimento degli eritroblasti e del valore del legame forma/prognosi che queste misure assumono nel mondo clinico. Di converso i problemi della specificità

**Figura 1a e 1b.** Sperimentazione strumentale GdS-E SIMeL 2002-2003. Sensibilità dell'allarme "blasti".**Figura 2a e 2b.** Sperimentazione strumentale GdS-E SIMeL 2002-2003. Sensibilità dell'allarme "IG".

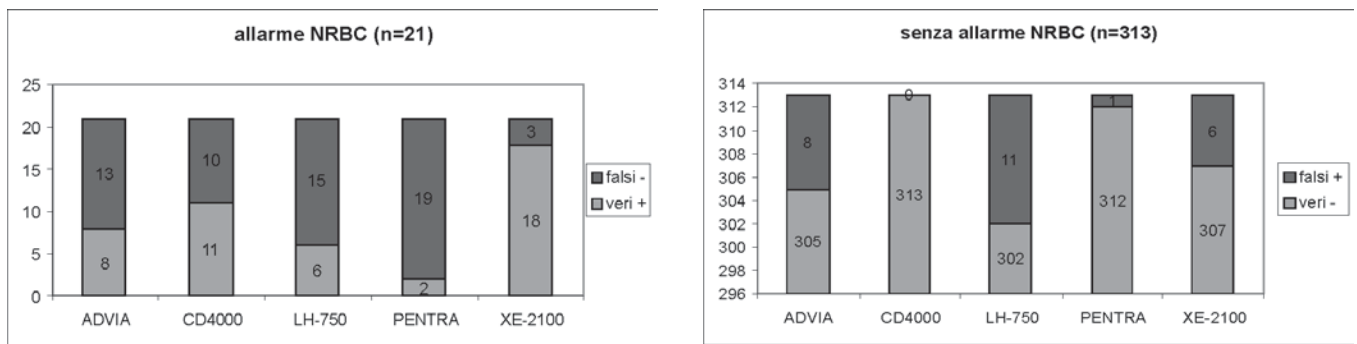


Figura 3a e 3b. Sperimentazione strumentale GdS-E SIMeL 2002-2003. Sensibilità dell'allarme "NRBC".

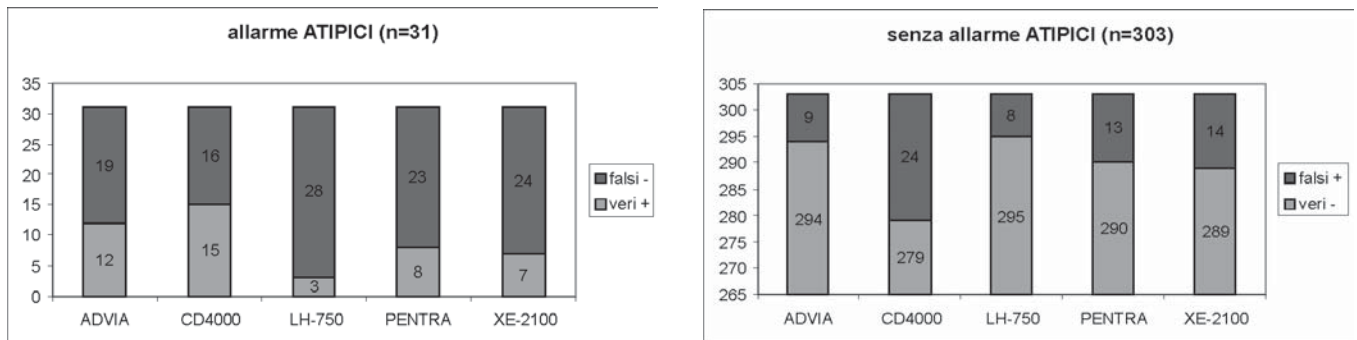


Figura 4a e 4b. Sperimentazione strumentale GdS-E SIMeL 2002-2003. Sensibilità dell'allarme "infociti variant".

clinica di misure e riconoscimento vengono affrontati relativamente ai monociti e alle cellule immature della serie mieloide, che rappresentano due banchi di prova classici del rapporto forma/funzione dai risvolti diagnostico-terapeutici di valore progressivamente maggiore. Infine il tema del rapporto forma/terapia viene esaltato dall'analisi dell'importanza delle informazioni ematologiche in una specifica situazione clinica, la sepsi, caratterizzata dalla complessità della sindrome clinica, dalla criticità delle condizioni del paziente e dalle difficoltà degli interventi terapeutici. In questo ambito il sincretismo strumentale e la capacità diagnostica dell'ematologo di laboratorio nell'integrazione di dati afferenti dal complesso armamentario di cui dispone ed in particolare degli allarmi strumentali di diversificata potenzialità consentono risposte rapide ed efficaci.

L'esame dei risultati della sperimentazione 2008 del GdS-E stimola, sotto il profilo teorico, il confronto con il dibattito avvenuto quasi 30 anni fa intorno al gruppo di *Blood Cells*, che Jean Bernard<sup>15</sup> riassumeva in termini di punti conflittuali: quantificazione vs specificità; soggettività (senso e memoria del medico) vs oggettività (strumento); morfologia vs funzione o, se si vuole, tanatociti vs cellule viventi; rigidità (intellettuale e pratica) vs fluidità. "Il futuro dell'ematologia dipenderà dal progresso dell'automazione e, in particolare, dall'adattamento dell'automazione ai principali obiettivi degli ematologi, cioè determinazione di specificità e funzione, e dalla capacità dell'automazione di fornire nuovi metodi di ricerca e di pratica per preparare la nuova ematologia del ventunesimo secolo".

## Bibliografia

- Cappelletti P. L'Ematologia di Laboratorio. RIMeL/IJLaM 2005; 4:247-58.
- Cappelletti P. Perché una storia dell'Ematologia di Laboratorio RIMeL/IJLaM 2006; 2:196-8.
- Lewis SM. Standardization and harmonization of the blood count: the role of International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Eur J Haematol Suppl 1990; 53:9-13.
- <http://www.clsi.org> (data di consultazione: 27.08.2008)
- Buttarelli M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. Clin Chim Acta 2004; 346: 45-54.
- Buttarelli M, Plebani M. Automated Blood Cell Counts. State of the Art. Am J Clin Pathol 2008; 130:104-16.
- Hubl W, Tlustos L, Erath A, Andert S, Bayer PM. Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labelled monoclonal antibodies. Cytometry 1996; 26:69-74.
- Koepke JA, Dotson MA, Shifman MA. A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method. Blood Cells 1985; 11:137-40.
- Buttarelli M, Gadotti M, Lorenz C, Toffalori E, Ceschini N, Valentini A, et al. Evaluation of four automated hematology analyzers. Am J Clin Pathol 1992; 97:345-52.
- Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international Consensus Group for Hematology Review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. Lab Hematol 2005; 11:83-90.
- Krause JR. Automated differential in the Hematology Laboratory. Am J Clin Pathol 1990; 93(Suppl 1):S11-S16.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard – Second Edition. Villanova (PA): CLSI, 2007; document H20-A2, Vol. 27 No. 4.
- Houwen B. The differential cell count. Lab Hematol 2001; 7:89-100.
- Bulian P, Cenci AM, Piccinini C, Miconi V, Piva E, Buttarelli M, et al. Sensibilità clinica degli allarmi leucocitari degli analizzatori ematologici: studio di 334 casi secondo protocollo NCCLS H20-A. Riv Med Lab – IJLaM 2004; 5(Suppl):175.
- Bernard J. Summing Up. Blood Cells 1980; 6:499-500.