

# La standardizzazione in ematologia

M. Buttarello

*Dipartimento Interaziendale di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Azienda USL16,  
Laboratorio Ospedale S. Antonio, Padova, Italia*

## Introduzione e concetti generali

Martin Rowan, all'epoca segretario esecutivo dell'International Council for Standardization in Haematology (ICSH), scrisse nel 1998, che il compito principale del laboratorio (clinico) è la produzione di test che supportino il Clinico nel prendere decisioni relativamente alla diagnosi, alla scelta della terapia e al suo controllo, e alla formulazione di una prognosi. Il risultato di un test deve pertanto fornire informazioni utilizzabili dal punto di vista clinico<sup>1</sup>.

Tutti i test di laboratorio sono peraltro soggetti ad incertezze ed errori che ne diminuiscono l'utilità. La possibilità di errore inizia già nel momento in cui l'esame viene richiesto, continua durante le fasi preanalitica, analitica propriamente detta, e postanalitica, per finire quando il Clinico assume una decisione in seguito all'informazione ricevuta sottoforma di referto<sup>2,3</sup>.

Tutte le azioni messe in atto per prevenire e identificare gli errori rientrano negli obiettivi della sicurezza di qualità.

All'interno del più ampio concetto di sicurezza di qualità rientra il processo di standardizzazione, definito, dal punto di vista del laboratorio, come "la descrizione di sistemi di misura uniformi e riproducibili al fine di assicurare precisione, accuratezza, specificità, e armonizzazione dei risultati"<sup>4</sup>.

L'ICSH elaborò nel 1991 una propria definizione di programma di sicurezza di qualità inteso "come l'insieme delle azioni intraprese dal direttore di un laboratorio al fine di assicurare l'attendibilità dei risultati, e di aumentare l'accuratezza, la riproducibilità e la comparabilità fra laboratori. Questo include la proficiency surveillance, l'uso costante di controlli interni, e la partecipazione a uno schema di valutazione esterna di qualità. Deve anche essere prevista la partecipazione a corsi di formazione e aggiornamento, a studi collaborativi su strumenti e metodi di laboratorio, nonché altre attività collaborative intese a migliorare le prestazioni di laboratorio. Un programma di sicu-

rezza di qualità in ematologia deve anche riguardare gli aspetti clinici dell'ematologia"<sup>5</sup>.

Come si può notare è particolarmente enfatizzato il controllo della parte analitica ed interpretativa, tuttavia, la consapevolezza che il maggior numero di errori avviene durante le fasi extra analitiche ha portato a meglio definire la proficiency surveillance come "la supervisione e l'azione tali da assicurare una buona pratica di laboratorio. Importanti aspetti sono il controllo di qualità interno e la valutazione esterna di qualità, ma devono anche prevedersi attenzione e controllo sulla raccolta ed etichettatura dei campioni, sulla consegna degli stessi al laboratorio, sugli effetti dovuti all'ambiente e alla conservazione, sull'interpretazione dei risultati e sulla rilevanza dei vari test rispetto alle informazioni cliniche richieste. Devono essere compresi anche il mantenimento e il controllo degli equipaggiamenti e degli apparecchi e la formazione, protezione e sicurezza del personale"<sup>5</sup>.

Queste definizioni sono alla fine riconducibili al "Sistema Qualità" dell'ISO definito come: "le strutture organizzative, le responsabilità, le procedure, i processi e le risorse per attuare la gestione della qualità"<sup>6</sup>.

## Storia e attualità

L'esigenza di procedure per la standardizzazione in ematologia iniziò con l'avvento dell'automazione dei conteggi cellulari. Inizialmente i conteggi erano eseguiti con metodi manuali (camere di conta previa diluizione/lisi del campione di sangue), ma, a partire dai primi tentativi ad opera di Moldavan del 1934, i metodi automatizzati sono diventati insostituibili. Due differenti metodologie si svilupparono: il metodo ad impedenza (a partire dal brevetto di Wallace Coulter presentato nel 1949), e il metodo a dispersione di luce che vide le prime applicazioni commerciali negli anni '60 principalmente ad opera della Technicon Corporation.

L'automazione oltre ad aumentare la velocità nell'esecuzione dei test comportava anche sensibili miglioramenti nell'accuratezza e nella precisione superando gli errori dovuti alla preparazione del campione. Con la diffusione dei metodi automatizzati cominciarono tuttavia ad emergere significative differenze di conteggio a seconda dello strumento e del principio su cui era basato.

Si vide inoltre che nel caso di differenze nei risultati era difficile se non impossibile stabilire quali analizzatori risultassero in errore e quali no.

Queste problematiche e la necessità di procedere alla standardizzazione in emocitometria furono discusse per la prima volta al Congresso della Società Europea di Ematologia tenutosi a Lisbona nel 1963 in un simposio dal titolo "Erythrocytometric methods and their standardization".

Iniziarono quindi i primi trial per verificare le differenze esistenti fra i vari laboratori. Una prima sorpresa negativa si ebbe quando uno stesso campione distribuito a 50 laboratori Europei di riferimento riportò una concentrazione di emoglobina compresa fra 11 e 18 g/dL. Le cose migliorarono sensibilmente nei controlli successivi dopo che i laboratori vennero dotati di linee-guida e di una preparazione di calibrazione. Analoghi problemi si manifestarono in un trial sul conteggio degli eritrociti che vedeva coinvolti 40 laboratori: i risultati erano compresi fra  $4.1$  e  $5.4 \times 10^{12}/L$ .

La dimostrazione della grande variabilità dei risultati e l'esigenza di trovare una soluzione furono lo stimolo per la costituzione dell'International Committee (oggi Council) for Standardization in Haematology (ICSH) che attraverso differenti gruppi di studio (Expert Panel on...), produsse, a partire dal 1965, numerosi documenti anche per conto dell'OMS, con lo scopo di identificare le cause della variabilità delle misure, di elaborare raccomandazioni (fino a veri e propri metodi di riferimento) e, ove possibile, produrre materiali di riferimento.

Qualche anno più tardi (1968), negli Stati Uniti, in risposta alle istanze presentate dal College of American Pathologists (CAP) si costituì il National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, oggi CLSI) come federazione fra tutte le parti interessate nel campo del laboratorio clinico (organizzazioni professionali, scientifiche, industriali e governative). L'NCCLS iniziò a produrre degli standard (intesi come documenti normativi) relativi anche alle determinazioni ematologiche utilizzando gruppi di lavoro e Sottocomitati di Esperti.

Alcuni documenti sono stati accettati trasversalmente dalle 2 organizzazioni, mentre altri sono stati prodotti congiuntamente.

I documenti più rilevanti per l'ematologia automatizzata tutt'ora considerati di attualità sono:

- The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters (ICSH, 1988).
- In Vitro Medical Devices. Measurement of quantities of Biological Origin – Metrological Traceability of values assigned to Calibrators and Control Materials (EN ISO 17511, 2001).
- Recommendation for reference method for haemoglobinometry in human blood and specification for international haemoglobinocyanide standard (ICSH, 1995).

- Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications (ICSH, 1994).
- Reference method for enumeration of erythrocytes and leucocytes (ICSH, 1994).
- Proposed reference method for reticulocyte counting based on determination of the reticulocyte to red cell ratio (ICSH, 1998).
- Platelet counting by the RBC/Platelet ratio method: a reference method (ICSH/ISLH, 2001).
- Recommendations for "surrogate reference" method for packed cell volume (ICSH, 2003).
- Methods for reticulocyte counting (flow cytometry and supravital dyes); approved guideline (NCCLS/ICSH H44-A2, 2004).
- Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods (NCCLS H20-A2, 2007).
- Calibration and Quality Control of automated hematology analyzers; proposed standard (NCCLS/ICSH, H38-P, 1999).
- Guidelines for organization and management of external quality assessment (EQA) using Proficiency testing (ICSH 1998).

### Problemi non risolti e ipotesi per il futuro

Alcuni dei documenti citati probabilmente necessitano di una revisione e altri aspetti dell'ematologia di laboratorio dovrebbero essere affrontati. Si va dalla necessità di elaborare criteri uniformi e maggiormente condivisi per l'organizzazione e l'interpretazione dei risultati dell'EQA, alla proposta di programmi relativi ad indagini morfologiche su striscio di sangue periferico e su aspirato midollare.

Opportuna sarà la revisione del protocollo per la valutazione degli analizzatori ematologici sia dal punto di vista statistico (modalità di comparazione differenti per parametri dotati di metodo di riferimento rispetto agli altri), che per l'esigenza di considerare l'extended differential count.

Sono necessarie raccomandazioni per l'analisi e la referenziazione dell'aspirato midollare.

E'auspicabile l'individuazione (con relativa validazione) di anticoagulanti alternativi al K2EDTA tali da aumentare la stabilità del campione nel tempo senza compromettere volume, forma e funzionalità cellulare.

Non da ultimo dovranno essere definiti criteri per fissare gli obiettivi di precisione e accuratezza (o di errore totale) per i parametri ematologici<sup>7</sup>.

Infine, saranno necessarie raccomandazioni per la standardizzazione del referto ematologico sul sangue periferico. In questo contesto va ribadito che la trasmissione dei soli dati numerici non opportunamente commentati (quando necessario) potrebbe mascherare informazioni utili. Al riguardo si può concordare con una affermazione di Maxwell Wintrobe scritta nel 1981: "there is danger as well as value in numbers. The physician must not permit himself to be mesmerized by the magic of numbers"<sup>8</sup>.

### Bibliografia

1. Rowan RM. The significance and issues of Quality Assurance.

1. Sysmex J Int 1998; 8:63-6.
2. Lundberg GD. How clinicians should use the diagnostic laboratory in a changing medical World. *Clin Chim Acta* 1999; 280: 3-11.
  3. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:750-9.
  4. Rowan RM. The standardization of calibration and control of instruments and kits. In: Lewis SM and Verwilghen RL, eds. *Quality assurance in haematology*. London: Bailliere Tindall; 1988.
  5. International Council for Standardization in Haematology (ICSH): *Rules and operating Procedures*. ICSH Secretariat, 1991.
  6. International Organization for Standardization (ISO): *Vocabulary*. ISO 8402. Geneva 1986.
  7. Buttarello M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. *Clin Chim Acta* 2004; 346:45-54.
  8. Wintrobe MM. To measure or not to measure? That too is the question. In: Ross DW, Brecher G, Bessis M, eds. *Automation in hematology: what to measure and why?* Berlin: Springer-Verlag; 1981.