

Obiettivi clinici dell'ematologia di laboratorio

A.M. Cenci^a, B. Biasioli^b, P. Cappelletti^c

^aDipartimento di Patologia Clinica, Nuovo Ospedale "S. Agostino-Estense", AUSL Modena, Baggiovara (MO)

^bDipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti", Trieste

^cDipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

Riassunto

Il presente lavoro ha l'obiettivo di mettere in evidenza il contributo che il laboratorio di ematologia porta alla diagnostica medica. Questa tesi viene esplicitata attraverso l'esame di diverse situazioni e segni clinici in cui l'apporto dei test di laboratorio si dimostra fondamentale e a volte dirimente. Il test di base dell'ematologia di laboratorio è l'esame emocromocitometrico, che si inserisce, di volta in volta, in cascate diagnostiche anche molto complesse. Questi profili trovano utilizzo comune in fase di diagnostica, nella stadiazione e nel controllo di patologie varie, e nell'impostazione e monitoraggio terapeutico delle stesse, siano esse ematologiche o non ematologiche, qualsiasi delle cellule ematiche circolanti possa essere coinvolta nella malattia. Come esempi del contributo citato, vengono esaminati, per gli eritrociti, i percorsi che hanno come obiettivo clinico lo studio dell'anemia, per le piastrine la definizione ed il controllo delle cause della emorragia, per i leucociti, le problematiche delle infezioni e il contributo nell'inquadramento e nel follow up delle malattie ematologiche.

Il ruolo giocato dall'ematologia di laboratorio viene valutato anche alla luce delle possibilità e del contributo, attuali e di sviluppo, offerti dall'utilizzo nel campo della diagnostica di laboratorio delle nuove tecnologie che, sempre più spesso, applicano sofisticate filosofie analitiche mutuata dalla ricerca alla realtà routinaria.

Summary

Clinical goals in laboratory haematology

The Authors evaluate the contribution and the remarkable usefulness of Haematology Laboratory in clinical medicine decision making.

The consistent benefits drawn from the laboratory diagnostic activity are highlighted examining the role played in providing test for the management of different signs and symptoms in several pathologies. In many clinical situations the diagnostic pathway starts from the blood cell count, and haemochromocytometric parameters are very important in supporting diagnosis, staging and grading pathologies and in evaluating the drug effects during therapy, both in haematological and non-haematological diseases. On these results, the simple or more complicated diagnostic sequential flow charts, actually used, are built and applied. In order to evaluate this issue, some common clinical situations, each involving the circulating blood cell, are explained as examples of clinical targets. So the anaemia definition is described in order to investigate the erythrocytes, the haemorrhage prevention is discussed for the platelets evaluation, the sepsis laboratory diagnostic aspects and the management of haematological malignancies are described from the point of view of leucocytes studying.

The today automation facilities applied to the haematological laboratory systems have changed the diagnostic scenario and help the role of Clinical Pathologist in improving test and supporting clinical decision. These results are achieved also applying the sophisticated analytic philosophies coming from the today advanced scientific research to the routine activity.

Key words: clinical goals, laboratory diagnostic aspects, blood cell counts, anaemia, haemorrhage, haematological malignancies, sepsis.

Introduzione

Gli obiettivi che l'ematologia di laboratorio si propone possono presentare aspetti correlati alla natura tecnica, più strettamente analitici e legati al test, o essere più squisitamente medici.

Così, partendo dalla misura che porta al risultato, espresso e messo a disposizione attraverso il referto, si arriva alla risposta per il quesito clinico. La validazione del dato ematologico consta di due parti sostanziali: quella tecnica, e cioè orientata al campione, che ne valuta la congruità e l'esecuzione del test, e quella medica, che, attraverso la conoscenza di quanto attiene al campione, è orientata alla gestione del paziente ed alla comprensione della patologia studiata.

L'espressione della risposta al quesito clinico avviene attraverso l'elaborazione del referto, "atto scritto, ufficiale e definitivo con cui vengono comunicati i risultati dell'esame"¹; in particolare, in ematologia di laboratorio, i risultati sono quelli dell'emocromo^{2,3}. Il referto ematologico è il prodotto di sintesi del lavoro tecnico e delle notizie strumentali sottoposti a revisione dello specialista di laboratorio ed è rilasciato con la sua validazione clinica. In questo modo vengono messe in stretta relazione, quali parti inscindibili del processo complessivo, le diverse aree di realizzazione della risposta al quesito analitico: la *tecnologica*, che attiene al livello tecnico e si occupa del risultato analitico, la *fisiologica*, che tende al confronto trasversale e longitudinale, guidando il passaggio che porta dal risultato al referto, la *nosologica* che, attraverso la revisione dello specialista, conduce e trasforma il referto in referto interpretativo. Scopo del referto è quello di affiancare e guidare il clinico, sia in fase diagnostica, che nel follow up.

Il referto è un "atto" medico che deve pertanto risultare corretto nella forma e nei contenuti tecnici, e fornire informazioni non ambigue, utili sul piano clinico e facilmente interpretabili. La standardizzazione della costruzione per forma e contenuti, la comunicazione ai clinici del significato delle informazioni fornite e del percorso diagnostico di laboratorio attuato per ottenerle, sono elementi essenziali per la espressività clinica del referto ematologico. Agli altri referti di medicina di laboratorio lo accomunano la necessità di contenere

tutte le informazioni di laboratorio atte a rispondere al quesito clinico, specifico o generico, espresse nel referto sotto forma di dati numerici e/o di commenti^{4,5}. Presenta, tuttavia, alcune peculiarità legate alla materia in esame e in oggetto, e alla tipologia e alle modalità delle risposte fornite dalle tecnologie impiegate nell'analisi. A tale proposito, ad esempio, il referto ematologico non deve riportare allarmi strumentali di alcun genere né deve contenere, integrati o in allegato, grafici ottenuti dai display delle apparecchiature emocitometriche utilizzate per eseguire l'esame e che si configurano come materiale grezzo ad uso esclusivo dell'operatore. Infatti, le caratteristiche del referto strumentale, grafici ed allarmi, specifiche di ciascun emocitometro e spesso legate alla filosofia analitica utilizzata, devono essere interpretate da personale esperto.

I quesiti clinici, espressi o impliciti nelle richieste che giungono al laboratorio, costituiscono gli obiettivi cui tendere per realizzare pienamente la "mission" dell'ematologia di laboratorio.

Gli esempi di seguito riportati si riferiscono ad alcuni dei principali argomenti nei quali il laboratorio contribuisce in maniera importante alla diagnosi ed all'inquadramento clinico di segni, sintomi e patologie.

A. Gli eritrociti: diagnosi e caratterizzazione dell'anemia

Si definisce anemia la diminuzione dei valori di **emoglobina** al di sotto del limite di riferimento proprio di razza, sesso ed età. E' questa una situazione di notevole impegno e di frequente riscontro in ambito clinico, sia in presenza di patologie ematologiche che in differenti contesti clinici, medici e chirurgici. In realtà tale stato, riconoscendo eziopatogenesi diverse, semplici o complesse, spesso variegata, oltre che con il valore della concentrazione emoglobinica, è definibile mediante l'utilizzo di più parametri relativi al globulo rosso, valutati nel loro insieme. In tale definizione il laboratorio entra attraverso conteggi, misure, parametri derivati e descrizioni morfologiche.

Definizione di anemia. Sono riportati in Tabella I i valori di concentrazione emoglobinica, proposti da diversi autori, per la definizione di anemia⁶⁻⁸.

Tabella I. Valori di concentrazione emoglobinica proposti per la definizione di anemia.

↓ 20% di Hb normale per sesso ed età <11g/dL pre-pubertà e ♀ fertili <12g/dL nei ♂ adulti e ♀ in menopausa	<i>Wintrobe's 1993</i> ⁶
<11g/dL <5 anni e ♀ gravide <11.5 g/dL 5-11 anni <12g/dL 12-14 anni e ♀ non gravide <13g/dL ♂	<i>WHO/NHD/01.3</i> ⁷
<10-11.5 g/dl ♀ <12.5-13.8 g/dl ♂	<i>Goddard et al. 2000</i> ⁸

↓ = diminuzione; ♀ = donne; ♂ = uomini.

Tabella II. Accuratezza richiesta nella determinazione dell'emoglobina.

COLLEGE of AMERICAN PATHOLOGISTS ⁹	± 0,4 g/dL ± 0,4-0,8 g/dL > ± 0,8 g/dL	buona accettabile non accettabile
AMERICAN SOCIETY of ANESTHESIOLOGY ¹⁰	± 0,5 g/dL	

Poiché tale definizione si basa su determinazioni di laboratorio risulta evidente come l'accuratezza analitica richiesta sia condizione indispensabile per l'inquadramento del paziente. Tale requisito diventa assolutamente ineludibile quanto più ci si avvicina a valori di concentrazione che richiedono interventi sia profilattici che terapeutici, anche alla luce delle possibili conseguenze degli stessi (infezioni, immunizzazione, ...).

L'accuratezza richiesta, nella determinazione dell'emoglobina, secondo alcune Società Scientifiche, è riportata in Tabella II^{9,10}. Tali requisiti vengono, ormai facilmente soddisfatti, anche grazie ai progressi tecnologici e strumentali verificatisi negli anni recenti¹¹⁻¹⁵.

Nell'interpretazione del dato di laboratorio e nella sua applicazione alla clinica gioca un ruolo importante la Differenza Critica. Questo valore, derivato dalla variabilità biologica ed analitica, definisce di quanto, in percentuale, due successive determinazioni di un parametro debbano differenziarsi perché tale differenza non risulti legata al caso. La Differenza Critica per i parametri ematologici è stata oggetto di studio da parte di diversi gruppi^{5,16-19}. In Tabella III si riportano i risultati ottenuti dal GdS-E SIMeL nella sperimentazione di emocitometri del 2002^{20,21}.

Da sempre i **parametri derivati**, o di Wintrobe, sono stati utilizzati nell'inquadramento e nel follow up della maggior parte delle anemie⁶. Un tempo calcolati e, più modernamente, misurati dai nuovi emocitometri con precisione ed accuratezza sempre crescenti, sono costituiti da MCV (Ht/RBC), MCH(Hb/RBC), MCHC (Hb/Ht)^{5,6}. In base al volume del globulo rosso ed alla concentrazione emoglobinica media, si possono definire le dimensioni delle emazie, con la conseguente classificazione delle anemie in micro, normo o macrociti-

che ed in ipo, normo o ipercromiche. Nel tempo, alcune caratteristiche di tali misure sono venute a cadere: ad esempio, oggi, MCV è misurato, mentre Ht viene ricavato applicando, in genere, algoritmi differenti. Anche la validità, non solo clinica, di quest'ultimo dato è sempre più messa in discussione, soprattutto per l'influenza della fase preanalitica sui risultati. Tutti i parametri sopra menzionati forniscono notizie interessanti sullo stato delle emazie che, insieme a conteggi, misure ed eventuali osservazioni microscopiche costituiscono utili elementi, per l'operatore, nell'interpretazione dei quadri di anemia¹¹⁻¹⁵.

Un discorso a parte merita **RDW** (Red Distribution Width), ricavato dall'istogramma RBC secondo la formula $RDW = SD/MCV \times 100$. In termini di utilizzo, questo indice ha avuto nel tempo alterna fortuna. In particolare, nel 1983 Bessman propose una classificazione delle anemie avente come cardini MCV ed RDW²². Attualmente, la scarsa confrontabilità e riproducibilità di RDW ha fatto sì che la classificazione sopra ricordata non sia più utilizzata nella pratica. Il parametro, infatti, è usabile nella classificazione solo se il CV% dei volumi eritrocitari è misurato alla base della gaussiana; risulta inoltre disomogeneo tra metodi e strumenti, anche dello stesso produttore¹⁴, e spesso soggetto ad interferenze. E', pertanto, di significato clinico incerto¹¹⁻¹⁵.

RDW: gli aspetti clinici. RDW può essere espresso in DS o in CV%, per alcune tecnologie questi risultati compaiono routinariamente copresenti per lo stesso campione. Da un punto di vista clinico, si dice che possa rivestire utilità nella diagnosi differenziale tra microcitosi ferrocarenziale e microcitemia, esprimendo nella prima una notevole ampiezza distribuzionale, che si riduce fortemente nella seconda. Tuttavia, l'indicazione risulta non specifica ed assume quindi il carattere di un suggerimento o di un allarme di attenzione nell'interpretazione di questi quadri ematologici.

RDW ed Intervalli di Riferimento. Una delle difficoltà maggiori nell'utilizzo del dato è rappresentata dalla necessità di definire intervalli di riferimento specifici per strumenti a filosofie analitiche differenti, anche se prodotte dalla stessa Casa¹⁴. Questo ulteriore problema, aggiunto a quelli di natura statistica, di scarsa standardizzazione e di limitata utilità clinica, porta a consigliare di non refertare il parametro, ma di utilizzarlo come valore base per commenti interpretativi, legati alla morfologia della popolazione eritroide, come segno di anisocitosi. Comunque, se refertato, RDW dovrà necessariamente essere presentato con intervalli di

Tabella III. Differenza Critica in ematologia.

Parametri	Media %
Eritrociti	6.15
Emoglobina	6.22
MCV	2.35
Leucociti	31.4
Piastrine	13.8
Neutrofili	51.4
Linfociti	32.5
Monociti	40.4
Eosinofili	60.8
Basofili	80.8
Reticolociti	41.7

GdS-E SIMeL (2002)^{20,21}

riferimento strumento-specifici^{20,21,23-27} (Fig. 1).

I reticolociti. I reticolociti sono globuli rossi contenenti due o più granuli di RNA ribosomiale, che assumono colore blu dopo trattamento con coloranti sopravitali quali il nuovo blu di metilene (metodo di riferimento per NCCLS, ora CLSI²⁸), il blu brillante di cresile e l'Azur blu. All'osservazione microscopica, le masserelle devono essere posizionate lontano dai margini ed essere visibili senza richiedere un fine aggiustamento del fuoco. La morfologia è alla base della classificazione di Heilmeyer (anno 1931) che divide le cellule in 5 categorie a seconda del contenuto in RNA²⁹⁻³¹. In passato il conteggio dei reticolociti è stato sempre gravato dalle note problematiche legate alla imprecisione analitica del metodo ottico. Tra queste, le cause principali, presenti sin dalla fase preanalitica (raccolta, conservazione e trasporto del campione), riguardavano la fase tecnico-analitica (tipologia dello striscio, utilizzo di coloranti diversi) e di lettura (variabilità inter-osservatore, tempo intercorrente tra preparazione e lettura del preparato, numero di cellule contate, interferenze con altre strutture citoplasmatiche). Il risultato, ottenuto contando 1000 globuli rossi, viene espresso in percentuale ed in numero assoluto ($n. \times 10^9/\mu\text{l}$), e non risulta migliore né con l'utilizzo della griglia di conteggio applicata all'oculare, oltretutto non sempre applicata nella pratica routinaria, né con l'espressione dei risultati in rapporto con Ht ^{23,25,32,33}. Per tali motivi, in passato, era limitato l'utilizzo del parametro. Il metodo microscopico, inoltre, risulta non conveniente anche sotto il profilo gestionale: infatti pure a fronte del basso costo del materiale necessario, è evidente l'alto costo in risorse umane qualificate utilizzate nella lettura microscopica ("time consuming"), il TAT elevato e la presenza di alti CV% intra ed inter operatore. Oggi, cambiato il metodo di riferimento e realizzate nuove filosofie analitiche automatizzate e dedicate all'esame, il valore del test ha risalito la china, rendendo disponibili anche nuovi parametri, con significato clinico per alcuni già dimostrato (es: IRF) e per altri in via di validazione clinica^{20,21,23,25,32,33}. Si configura, in questo modo, una nuova era, iniziata con l'applicazione della citofluorimetria con fluorocromi, che ha ridato dignità ad un parametro da sempre riconosciuto con un significato clinico importante ma sottoutilizzato, come già evidenziato, per la notevole imprecisione e la variabilità analitica grave. I vantaggi dei metodi automatizzati consistono principalmente nell'elevato numero di eventi rilevati, nell'esecuzione del conteggio su cellule in sospensione, assolutamente indipendente dall'esaminatore, e nella possibilità di fornire altri parametri. Tuttavia, anche nell'automazione del test, sono insiti alcuni problemi, legati alla diversa sensibilità dei coloranti o dei fluorocromi utilizzati per marcare l'RNA reticolocitario, alla diversa tecnologia utilizzata per identificare le cellule positive (fluorescenza, light scattering, assorbanza) ed ai software, più o meno precisi nel disegno dei gate di separazione tra reticolociti ed altre cellule, quali eritrociti,

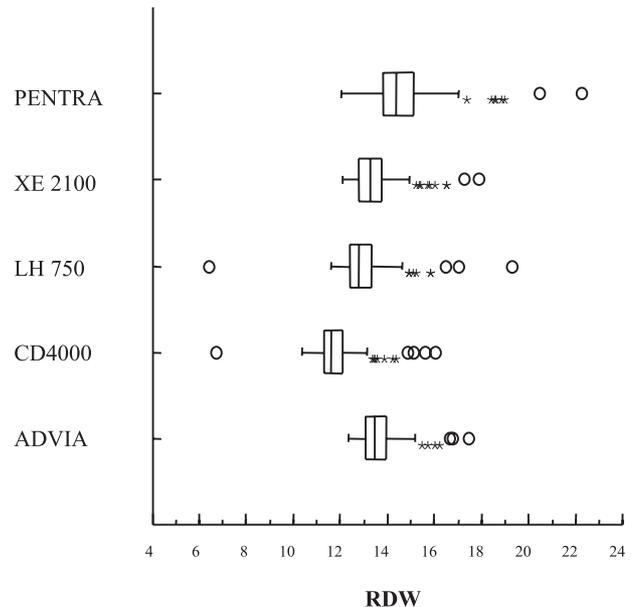


Figura 1. RDW, il problema degli intervalli di riferimento.

piastrine ed eritroblasti, popolazioni, queste, tutte di confine. Tali problemi, per la risoluzione dei quali si lamentano ancora la mancanza di materiale di calibrazione stabile che possa essere usato con tutti i metodi e di un metodo di riferimento universalmente accettato, sono tuttora in discussione. Di fondamentale importanza risulta disporre di analizzatori automatici in grado di eseguire conteggi accurati e precisi per un ampio intervallo di concentrazioni. Per i reticolociti, infatti, conteggi attendibili sono richiesti soprattutto alla basse concentrazioni, cioè quando è necessario diagnosticare e controllare nel tempo soggetti in aplasia midollare. Il GdSE-SIMeL, nella sperimentazione già citata^{20,21,23,25,32,33}, ha studiato l'accuratezza ai bassi livelli vs il conteggio microscopico, secondo il protocollo NCCLS H44-A³⁴ nelle leucemie ed in patologie che presentavano reticolocitopenie di vario grado, da severe a estreme (Leucemia Acuta, Leucemia Linfatica Cronica, Aplasia midollare, Chemioterapia, Mielodisplasia). I risultati mostrano una buona concordanza tra gli strumenti ed una discordanza con il metodo di riferimento microscopico che, a quei livelli, è poco performante, presentando, infatti, alti CV%^{20,21,23,25,32,33,35}.

Sottopopolazioni reticolocitarie. Nel cluster dei reticolociti si possono individuare, per contenuto in RNA, varie sottopopolazioni: queste, poiché riconosciute inizialmente negli strumenti in fluorescenza, hanno preso il nome di reticolociti ad alta, media e bassa intensità di fluorescenza (HFR, MFR, LFR). In seguito tale terminologia è stata adottata anche dalle altre tecnologie ed oggi questa suddivisione è di valore clinico riconosciuto e comunemente utilizzata¹¹⁻¹⁵. Il valore clinico principale è dato dal fatto che l'aumento in circolo delle frazioni più immature precede quello del numero totale nelle riprese midollari post trapianto e post che-

mioterapie, situazioni nelle quali assume valore prognostico positivo³⁶.

Indici reticolocitari. IRF (Immature Reticulocyte Fraction) costituisce la frazione immatura dei reticolociti e corrisponde agli elementi con elevato contenuto in RNA, assume valore variabile da 0.0 a 1.0 ed esprime l'attività eritropoietica midollare precoce.

Le principali applicazioni cliniche e diagnostiche degli indici di immaturità reticolocitaria si riconoscono nella diagnosi differenziale delle anemie, nella risposta eritropoietica alle terapie anti-anemiche, nella valutazione dell'attecchimento dei trapianti di midollo e nel follow-up dei trattamenti terapeutici con eritropoietina umana ricombinante³⁷⁻⁴⁰.

Altri parametri reticolocitari si riferiscono al volume ed al contenuto emoglobinico ed organulare del reticolocita. La valutazione del volume reticolocitario è disponibile su più strumenti, ad es. MRV e MCVr (Volume Reticolocitario Medio), mentre CHr (Contenuto Emoglobinico Reticolocitario Medio) risulta dosabile per un solo strumento, anche se parametri simili dal punto di vista del significato e correlabili con l'andamento clinico sono stati messi a disposizione sul mercato, ad es. RET-Y e RET-He (equivalente emoglobinico reticolocitario) e MSCV (Volume Medio Eritrociti Sfericizzati)^{11-15,41}. Come applicazioni cliniche e diagnostiche viene suggerito l'utilizzo di MRV nel follow-up di pazienti anemici in terapia con ferro o con Vitamina B12, in quanto parametro molto sensibile nel valutare l'efficacia del trattamento, e di MSCV in quanto in grado di evidenziare patologie di membrana eritrocitaria, congenite o acquisite.

Tuttavia, la reale possibilità di servirsi con soddisfazione dei parametri reticolocitari è tuttora in discussione. Lo stesso IRF, che pure ha dimostrato una valenza clinica, presenta problemi legati ai differenti risultati forniti dalle diverse tecnologie. Per questo fatto, è raccomandabile refertare il parametro, se il Laboratorio lo considera opportuno, purchè sempre accompagnato da intervalli di riferimento strumento-specifici. Per quanto riguarda MCVr e CHr, che pure sembrano avere una utilità clinica dimostrata, sono anch'essi dipendenti dalla tecnologia utilizzata e disponibili solo con alcuni emocitometri. Anche per questi dati l'even-

tuale refertazione va accompagnata da intervalli di riferimento strumento-specifici.

Altri parametri reticolocitari non sono disponibili con tutte le tecnologie, non sono comparabili e non sempre hanno un significato clinico dimostrato. Essi, pertanto, non devono comparire sul referto standard, ma possono essere esplicitati all'interno di una specifica consulenza fornita al clinico¹⁻³. La conclusione è che si ravvede la necessità di una "strategia globale" nel proporre e nell'interpretare parametri già conosciuti o nuovi alla luce di appropriatezza e di reale interesse clinico dei dati forniti.

Gli eritroblasti. A fronte della riconosciuta importanza clinica del dato, nella pratica di laboratorio il riconoscimento degli eritroblasti, quando ricercato in automazione, si presenta problematico e gravato, principalmente, da imprecisione analitica, con fonti di interferenza di vario grado da parte e sulle popolazioni limitrofe, a seconda delle filosofie analitiche adottate. Quando eseguito al microscopio, esso è soggetto alle diverse fonti di inaccuratezza comuni in tali rilevazioni. Ancora oggi, la presenza viene in genere segnalata dai sistemi con l'elaborazione di un allarme legato a segnali nella zona in basso e/o a sinistra dei linfociti. Il valore prognostico e la corrispondenza delle flag "NRBC" con la rilevazione microscopica elaborata nel corso della sperimentazione GdS-E SIMeL per tutti gli strumenti sono mostrati in Tabella IV⁴².

L'allarme ha, in generale, maggiore sensibilità rispetto alla specificità analitica. Oggi il parametro risulta decisamente migliorato ed i contaglobuli di ultima generazione propongono conteggi, mediante canali dedicati, con trattamenti con reattivi o coloranti specifici, con elaborazioni software, con accuratezza e precisione in via di verifica ormai avanzata. Ad un impatto economico non sempre trascurabile sembra comunque corrispondere un utilizzo clinico sicuramente più soddisfacente, anche per la disponibilità immediata del dato e per i suggerimenti sullo stadio maturativo degli elementi. Un problema legato a questa nuova determinazione è la sensibilità clinica, in genere considerata dell'1/100 globuli bianchi (GB), rispetto a quella analitica^{28,43} del 2/100 GB, in genere accettata dai produttori di sistemi ematologici. Il problema "eritroblasti",

Tabella IV. Allarme eritroblasti.

	Abbott CD4000	Abx Pentra 120	Bayer Advia 120	Coulter LH750	Sysmex XE2100
VP	1	0	1	1	3
VN	187	187	181	180	182
FP	0	0	6	7	5
FN	3	4	3	3	1
Sensibilità	25.0	0.0	25.0	25.0	75.0
Specificità	100	100	96.7	96.2	97.3
VPP	100	—	14.3	12.5	37.5
VPN	98.4	97.9	98.3	98.3	99.5

GdS-E SIMeL (2004)⁴²

Tabella V. Evoluzione della tecnologia nel conteggio piastrinico.**Metodi per il conteggio delle piastrine**

Manuale	Indiretto (striscio colorato con MGG)	Metodo Fonio (1912) Metodo Demasheck (1932)	
	Diretto (camera emocitometrica)	In microscopia a luce bianca (Rees-Ecker 1923) In microscopia a contrasto di fase (Breker-Cronkite 1950) ⁵⁶	
Automatico	Diretto semiautomatico monocanale su plasma arricchito di piastrine (PRP)		
	Diretto automatico multiparametrico su sangue intero	Su canale specifico Su canale dei globuli rossi	Principio impedenziometrico monodimensionale Principio ottico bidimensionale Principio citofluorimetrico con anticorpi monoclonali (CD61)

quindi, pur migliorato e modificato rispetto al passato, rimane ancora oggetto di discussione. Da un punto di vista clinico i progenitori eritroidi rivestono un ruolo importante nella diagnostica di laboratorio sia in patologie di origine extra che intra ematologiche, rappresentando non solamente, ma principalmente, un segno di ipossia tissutale o di eritropoiesi inefficace. Con questo senso la loro comparsa accompagna gradi e tipi diversi di anemia⁴⁴, costituendo di fatto lo specchio della risposta alla richiesta periferica di ossigenazione e la capacità centrale di soddisfarla. In letteratura è ormai acquisito che, trascorso il periodo neonatale, la presenza di eritroblasti nel sangue periferico è sempre indicativa di una condizione patologica⁴⁵ e che la loro quantificazione nel sangue periferico è fondamentale per la diagnosi e la prognosi di molte malattie ematologiche⁴⁶. È questo il caso riconosciuto in cui il ritrovamento anche di un solo di elemento su preparato di sangue periferico costituisce un evento anomalo di cui tenere conto e cercare motivazione clinica, riconoscendo alla base un serio stress midollare che può accompagnare situazioni differenti e, in genere, complesse "dall'anemia emolitica alla neoplasia"⁴⁷. Nella la terapia trasfusionale del morbo di Cooley e delle talassemie intermedie l'utilizzo del parametro assume il duplice scopo di prevenire l'anemia e di mantenere livelli di emoglobina sufficienti a sopprimere l'eritropoiesi endogena, altamente inefficace^{48,49}. Nei pazienti affetti da morbo di Cooley si evidenzia chiaramente un calo del numero di eritroblasti circolanti al crescere dei valori di emoglobina⁴⁶. L'utilità clinica del riconoscimento degli eritroblasti si ritrova in diverse patologie che rivestono interesse in numerosi campi della medicina e della chirurgia, anche con significato differente dalla valutazione dell'anemia strettamente intesa. Un esempio è l'interesse attuale rivestito dalla loro presenza nel monitoraggio in gravidanza, dove il ritrovamento di conteggi elevati nel sangue materno può indicare la presenza di situazioni patologiche, quali stati preeclamptici, mentre un incremento della conta nello screening di campioni neonatali può suggerire ipossia o asfissia fetale o aiuta-

re nella valutazione di una acidosi metabolica. Infine, Stachon et al. nel 2002⁵⁰ hanno evidenziato prognosi peggiori in pazienti di terapie intensive e rianimazioni se con presenza di eritroblasti in circolo⁴¹.

B. Le piastrine: prognosi dell'emorragia

La determinazione delle piastrine nella proposizione della prognosi dell'emorragia è un'altra delle dimostrazioni dell'importanza del contributo del laboratorio di ematologia nell'assistenza al paziente. Qui determinante si rivela la definizione del valore soglia, sia di rischio emorragico che profilattico trasfusionale; esiste, infatti, una documentata correlazione quantitativa tra gli episodi emorragici e la conta piastrinica⁵¹. La soglia emorragipara, non ben facilmente determinabile, è dipendente da fattori costituzionali, endoteliali, microvascolari, immunologici e patogenetici. Inoltre, i progressi avvenuti nelle conoscenze scientifiche, sulla funzione e sulla funzionalità piastrinica da una parte e sull'aumentata precisione analitica nelle determinazioni dall'altra, hanno già influito sui comportamenti clinici, soprattutto per quanto riguarda le trasfusioni profilattiche. Questi fatti hanno portato alla ridefinizione delle linee guida in questo ambito, anche alla luce dei costi economici e dei rischi trasfusionali (reazioni trasfusionali, alloimmunizzazioni, infezioni virali), rivedendo il valore soglia delle piastrine ai fini di una terapia trasfusionale profilattica.

Nel 2000 le linee guida hanno spostato la soglia per la trasfusione piastrinica profilattica da ≤ 20000 plt/ μ L⁵¹ a ≤ 10000 plt/ μ L⁵²⁻⁵⁴.

Le linee guida dell'American Society of Clinical Oncology per la trasfusione piastrinica profilattica nei pazienti oncologici⁵⁴ raccomandano che, in presenza di trombocitopenia cronica, stabile, severa la maggior parte dei pazienti non venga sottoposto a trasfusioni a scopo profilattico; nei tumori solidi le soglie possono arrivare anche a valori inferiori a $10 \times 10^9/L$, tranne che in pazienti sottoposti a chemioterapie aggressive per neoplasie della vescica o in caso di tumori necrotici. Nella Leucemie Acute la soglia è di $10 \times 10^9/L$, un valore maggiore viene richiesto in caso di sanguinamen-

to, febbre, iperleucocitosi, coagulopatie ed attuazione di procedure invasive. Linee guida simili vengono proposte in occasione di chemioterapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali: in questi pazienti, in occasione di interventi chirurgici o procedure invasive, un conteggio di $40-50 \times 10^9/L$ viene ritenuto sufficiente per la maggior parte delle procedure, in assenza di coagulopatie, mentre conteggi pari a $20 \times 10^9/L$ sono richiesti in caso di esecuzione di aspirati midollari e biopsie. In tutti questi pazienti gli episodi emorragici di incidenza più frequente sono: sanguinamenti gastrointestinali, ematuria, epistassi, emorragie cerebrali di media ed alta entità. L'abbassamento della soglia per la trasfusione piastrinica profilattica, ottenuta grazie alla maggiore precisione ed accuratezza dei metodi di conteggio, ha portato notevoli vantaggi come la riduzione della ricerca dei donatori, la diminuzione delle situazioni di alloimmunizzazione ed il contenimento dei costi⁵⁵.

I metodi di conteggio automatizzati, non più gravati dalle problematiche delle determinazioni manuali, presentano dei CV notevolmente inferiori (Tab. V)⁵⁶⁻⁵⁸.

Accuratezza analitica. Nel 1988 ICSH prevedeva un conteggio microscopico a contrasto di fase dopo diluizione con ammonio ossalato e determinazione RBC/Plt con analizzatore impedenziometrico monocanale con focalizzazione idrodinamica (CV: 10-25%).

Dal 2001 ICSH prevede un conteggio piastrinico indiretto immunologico con anticorpo monoclonale specifico fluorescente e determinazione con citofluorimetro del RBC/Plt e calcolo delle piastrine dopo accurato conteggio dei RBC con analizzatore semiautomatico monocanale non focalizzato (CV: < 5%)⁵⁷.

Le piastrine costituiscono da sempre una "popolazione difficile" da studiare in automazione.

Il conteggio piastrinico automatizzato risente di alcune limitazioni tecnologiche che possono inficiare accuratezza e precisione. Tali limitazioni possono essere fondamentalmente riportate alla necessità di identificare correttamente le grandi piastrine e di discriminare in maniera corretta le piastrine da altri elementi dello stesso volume come microciti, frammenti di eritrociti, ombre leucocitarie, fibrina, artefatti (aggregati e satellitismo), eritroblasti.

I principali problemi analitici che gravano la determinazione automatizzata delle piastrine e ne influenzano accuratezza e precisione sono quelli legati alla diluizione, alla coincidenza ed alla finestra piastrinica⁵⁹:

- 1) l'errore di diluizione si presenta in modo rilevante nei contatori non dotati di focalizzazione idrodinamica. La prediluizione nei contatori (elevata e necessaria per ridurre gli errori di coincidenza) aumenta l'imprecisione analitica per i piccoli numeri in gioco. La diluizione rappresenta un compromesso tra l'esigenza di minimizzare gli errori di coincidenza e la necessaria precisione dei conteggi
- 2) l'errore di coincidenza è legato ad interferenza tra eritrociti e piastrine che si susseguono, essendo maggiore l'impulso legato al globulo rosso, o tra piastrine

coincidenti fra loro. Questi fatti si traducono in false riduzioni di conta piastrinica

- 3) il problema della finestra piastrinica, cioè della zona di conteggio piastrinico, dove vengono valutate le popolazioni di confine divise da soglie (soglia a volume inferiore per discriminare tra rumore di fondo, frammenti eritrocitari e particelle contaminanti; soglia di volume superiore per discriminare i globuli rossi microcitici dalle grandi piastrine).

Cruciali divengono i rapporti con le popolazioni di confine e la regolarità, l'ampiezza e la linea di base dell'istogramma di distribuzione piastrinica, legati anche al numero di eventi contati.

Il rapporto tra le performance tecnologiche e le necessità cliniche è stato recentemente rivisitato⁶⁰ sia per quanto attiene la precisione ai livelli critici ($10-20.000/\mu L$) che l'accuratezza: senza un generale miglioramento dei metodi routinari la proposta di abbassare ulteriormente le soglie di trasfusione ($10-5.000/\mu L$) è improponibile.

I correttivi attuali sono rappresentati da riconteggi in automatico, valutazione statistica delle differenze, algoritmi di controllo con differenti metodologie successive, sincretismo tecnologico.

Le interferenze nel conteggio piastrinico causano conteggi aumentati o diminuiti, a seconda della causa interferente. Aumentano il numero delle piastrine il rumore di fondo dato dalle particelle contaminanti, da frammenti leucocitari o eritrocitari (schistociti), emazie microcitiche, crioglobuline, parassiti e miceti. Sostengono conteggi falsamente diminuiti la presenza di piastrine giganti, microcoaguli, microaggregati, satellitismi, aggregazione da anticoagulanti⁶¹.

Indici piastrinici. I parametri noti come indici piastrinici sono messi a disposizione da tutti gli strumenti ma sono diversi. Calcolati, misurati o derivati attraverso algoritmi, soffrono, per essere utilizzati in clinica, di limitazioni legate al fatto che sono per lo più strumenti specifici. Il **volume piastrinico medio** (MPV) presenta una relazione inversa non lineare con la conta piastrinica. Il teorico potenziale di utilizzo nello studio dell'emorragia viene indicato sia per aumento rispetto al riferimento (iperdistruzione piastrinica, distrombocitopenia, infiltrazione midollare, macrotrombocitosi mediterranea, ...), che per diminuzione (aplasia midollare parziale o terapeutica, ipersplenismo). L'**indice di dispersione piastrinica**, rispetto alla media (PDW) risulta in alcuni casi più efficiente nel rilevare anomalie di volume, specialmente nelle malattie mieloproliferative, mentre è di scarsa utilità nelle situazioni emorragiche. Il **piastrinocrito** (Pct), riflette l'intera massa piastrinica biologicamente attiva e potrebbe predire il rischio emorragico.

Infine vengono proposti alcuni indici che individuerrebbero in modo reale, attraverso il contenuto in RNA, le piastrine neoformate (IPF e nuovi indici per le piastrine reticolate, con RNA, appena rilasciate, verosimilmente utili nel follow up dopo aplasie o ipoprodu-

Tabella VI. Comparazione tra i metodi con il metodo di riferimento (valori delle differenze dalla media del riferimento).

	Diff neu	Diff linfo	Diff mono	Diff eos	Diff baso
Abbott	- 1,55 ± 3,65	- 0,28 ± 3,52	1,89 ± 2,05	0,24 ± 0,80	- 0,20 ± 0,53
Abx	- 0,64 ± 5,66	- 2,15 ± 5,44	2,22 ± 2,35	0,44 ± 0,97	0,21 ± 0,37
Bayer	1,93 ± 4,11	- 2,08 ± 4,03	-0,26 ± 1,59	0,35 ± 0,82	0,12 ± 0,38
Coulter	0,41 ± 3,67	- 2,51 ± 3,48	2,14 ± 1,66	- 0,04 ± 0,83	0,06 ± 0,43
Sysmex	- 1,50 ± 3,9	- 1,26 ± 3,96	2,66 ± 2,41	0,17 ± 0,73	7,53e-4 ± 0,41

GdS-E SIMeL 2002

Tabella VII. Intervalli di riferimento per i leucociti.

	Riferimento 2,5-97,5 pc	Abbott CD 4000 2,5-97,5 pc	ABX Pentra120 2,5-97,5 pc	Bayer Advia120 2,5-97,5 pc	Beckman Coulter LH 750 2,5-97,5 pc	Sysmex XE 2100 2,5-97,5 pc
Neutrofili	41,41- 69,03	41.39-70.01	43.08-71.32	42.24- 72.97	43.54-72.01	40.50-70.45
Linfociti	22.88-49.41	21.71-48.73	20.33-45.43	20.03-46.65	19.09-46.25	20.92-47.78
Monociti	3.84-8.94	5.27-11.58	4.60-10.25	3.56-8.72	5.41-12.76	5.36-12.49
Eosinofili	0.77-5.59	0.88-6.04	1.40-6.59	0.96-6.17	0.73-5.89	0.86-6.38
Basofili	0- 1,25	0-0.60	0.30-1.30	0.25-1.11	0.28-0.99	0.16-0.90

GdS-E SIMeL 2003

zione, e, quindi, potenzialmente anche nelle emorragie). La validità degli Indici Piastrinici è messa in discussione dalle notevoli variabili cui è sottoposta; tra queste, le più importanti sono la dipendenza dal metodo strumentale, dalla preanalitica (tempo, temperatura) e, in particolare, dal trattamento del campione (anticoagulante). Quest'ultima fonte di variabilità non sembra, al momento, risolta in modo completo dall'utilizzo di anticoagulanti alternativi. La raccomandazione del GdSE-SIMeL, per quanto riguarda questi parametri è di non repertarli come tali, ma, di utilizzarli nella formulazione di commenti interpretativi¹¹⁻¹⁵.

C. I leucociti: diagnosi e monitoraggio delle infezioni e delle malattie ematologiche

Gli anni '70 hanno visto il grande contributo dell'automazione nel riconoscimento cellulare, configurando una nuova morfologia. Tale contributo ha avuto la sua maggior espressione nello studio dei leucociti. Infatti, precisione e accuratezza di rilevazione hanno segnato un notevole progresso in due applicazioni cliniche di importanza fondamentale quali lo studio delle infezioni e quello delle patologie maligne, ematologiche e non ematologiche. Oltre a ciò, il contributo della accuratezza e della precisione delle conte⁶², soprattutto a livelli bassi, è risultata importante anche nel monitoraggio di pazienti in chemioterapia; la linearità, per valori alti, ha contribuito, invece, soprattutto alla definizione ed allo studio delle citosi leucemiche.

Non va, comunque, dimenticato il problema di fondo della valutazione dei risultati dell'emocitometria automatizzata costituito dal metodo di riferimento⁶³; questo, in attesa degli auspicati cambiamenti (applicazione dell'immunofenotipo), è attualmente, secondo

NCCLS, ancora morfologico (H20-A)⁴³ e, per questo, gravato dai noti problemi della lettura microscopica. Comunque l'imprecisione degli emocitometri risulta, in letteratura, più bassa rispetto al metodo microscopico di riferimento ed è diversa per analizzatore e per tipo cellulare⁶³ (Tab. VI).

Tutti i sistemi analitici di ultima generazione forniscono screening a 5 popolazioni, discriminano le popolazioni normali, sono in grado di allarmare e di rilevare gli impulsi dati da elementi e/o situazioni anomale, segnalano elementi diversi, quali gli immaturi, ed evidenziano le alterazioni displastiche, rilevate attraverso il comportamento nei confronti dei principi analitici utilizzati nella rilevazione, sulla base di dimensioni, complessità cellulare, presenza di granuli e organuli, rapporto nucleo citoplasmatico^{14,41,64-66}. I quadri che ne risultano sono spesso costanti e all'interno delle singole filosofie analitiche forniscono "immagini marker" di popolazioni cellulari normali o patologiche.

Il GdS-E SIMeL nel 2004 ha valutato le performance analitiche, riguardo alle popolazioni normali ed agli allarmi distribuzionali e morfologici²¹.

Il lavoro del gruppo conferma la difficoltà, tuttora presente per tutti gli analizzatori, nella valutazione di alcune popolazioni tale per cui non riesce soddisfacente il risultato in termini di precisione ed accuratezza analitica, rispetto all'importanza clinica rivestita. Tipico è l'esempio dei monociti, cellule alla base di patologie reattive, neoplastiche e displastiche, il cui conteggio è ancora gravato da discreta imprecisione.

L'osservazione della differenza critica, calcolata nel corso dello stesso studio (Tab. III), dimostra per i parametri leucocitari la necessità di un'ampia differenza tra le determinazioni per potere affermare la non

Tabella VIII. Anomalie distribuzionali dei granulociti neutrofilici.

Neutrofili*	Abbott CD4000	Abx Pentra 120	Bayer Advia 120	Coulter LH750	Sysmex XE2100
Sensibilità	86.7	81.8	87.5	80.0	86.7
Specificità	88.1	87.0	89.8	97.9	88.1
FP	11.9	13.0	10.2	2.1	11.9
FN	13.3	18.2	12.5	20.0	13.3
Efficienza	87.7	86.0	89.5	94.7	87.7
VPP	68.3	54.0	54.6	86.0	68.3
VPN	95.7	96.2	98.1	96.8	95.7

*N° campioni: 57 (29 normali, 28 patologici), non allarmati

GdS-E SIMeL 2003

Tabella IX. Allarme Granulociti Immaturi.

	Abbott CD4000	Abx Pentra 120	Bayer Advia 120	Coulter LH750	Sysmex XE2100
VP	5	3	6	4	5
VN	160	179	162	170	171
FP	24	6	23	15	14
FN	1	3	0	2	1
Sensibilità	83.3	50.0	100	66.7	83.3
Specificità	91.9	96.7	87.5	91.9	92.4
VPP	17.2	33.3	20.6	21.0	26.3
VPN	99.3	98.3	100	98.8	99.4

GdS-E SIMeL 2003

casualità del cambiamento. Anche questo rilievo conferma lo scarso interesse rivestito, per i globuli bianchi, dall'utilizzo di intervalli di riferimento nella valutazione clinica dei risultati; esso non sembra particolarmente dirimente, in quanto appena significativo solo per neutrofilici ed eosinofili (Tab. VII).

In generale i metodi di valutazione degli emocitometri prendono in esame diversi aspetti fondamentali:

- la sensibilità clinica, intesa come capacità di distinguere i campioni patologici dai normali:
 - a) per anomalie morfologiche, quali la presenza di cellule immature e/o atipiche,
 - b) per anomalie distribuzionali, come il superamento degli intervalli di riferimento per le diverse popolazioni;
- l'accuratezza, in confronto con il metodo microscopico, e l'imprecisione nei conteggi con la valutazione della variabilità entro la serie e fra le serie;
- l'accuratezza nel riconoscimento di cellule anomale attraverso l'apporto degli allarmi strumentali, particolarmente utile per valutare la sensibilità clinica degli strumenti.

L'insieme di queste caratteristiche sta alla base della definizione dei livelli di performance strumentale e di sensibilità clinica degli analizzatori (Tab. VIII e IX).

Diagnosi e monitoraggio delle infezioni. La sepsi, risposta dell'ospite all'infezione, è caratterizzata dal rilascio in

circolo di numerosi mediatori chimici e da numerosi sintomi e segni clinici e di laboratorio, purtroppo quasi tutti aspecifici. In particolare, tra i segni a carico dei globuli bianchi si riscontrano la leucocitosi ($>12.000/\text{mm}^3$), la leucopenia ($<4.000/\text{mm}^3$) e la presenza di forme immature in circolo (anche più del 10%). La sepsi è una patologia relativamente frequente con una mortalità che aumenta con la progressione dalla forma grave allo shock settico e con l'aumento di insufficienze d'organo.

Date l'incidenza e la letalità elevate, la sepsi rappresenta la causa più frequente di morte nei pazienti delle terapie intensive ed il rischio di sepsi appare aumentato in corso di infezione soprattutto in neonati, anziani, immunodepressi⁵⁰. La sintomatologia clinica è data dai prodotti tossici dei microrganismi e dalla risposta dell'ospite a questi. L'esame emocromocitometrico, ed in particolare la determinazione dei globuli bianchi, fornisce indicazioni sia per la diagnosi di sepsi, mostrando in genere una leucocitosi neutrofilica, reattiva e di entità varia, sia per la prognosi, segnalando una leucopenia, anche marcata, nei casi con esito sfavorevole. Negli ultimi anni il contributo strumentale si è arricchito con la possibilità di evidenziare, nel contesto dell'emocromo, antigeni di attivazione granulocitaria, come il CD64¹¹ e con il riconoscimento/conteggio delle cellule immature^{67,68}.

Diagnosi delle malattie ematologiche. Le cellule protagoniste di questi quadri risultano immature, dismature, con gradi di asincronie e dismorfismi da lievi a molto notevoli. Il riconoscimento e la descrizione della loro morfologia suggerisce, a volte, e contribuisce, comunque, a diagnosi, stadiazione e monitoraggio clinico-terapeutico di patologie ematologiche primitive e secondarie. Attualmente i contaglobuli, pur essendo in genere tutti in grado di riconoscere le cellule atipiche, non ne riportano i conteggi, almeno nelle loro pagine principali, mentre questo dato potrebbe risultare importante nella valutazione del decorso clinico di tali malattie. La sensibilità clinica, cioè la sopra ricordata capacità dell'analizzatore di distinguere i campioni patologici dai normali, appare in stretto rapporto con la filosofia analitica utilizzata.

Tutti gli emocitometri forniscono allarmi morfologici per segnalare la presenza di categorie anomale di cellule (granulociti immaturi, blasti, elementi in apoptosi e reattivi, ecc...) utilizzando un proprio linguaggio: alcuni identificano popolazioni non perfettamente definite che non hanno un reale corrispettivo citologico^{12,15,41,66}. Queste cellule, senza corrispondenza morfologica univoca, dovranno essere definite al microscopio ottico (M.O.) Per quanto riguarda le corrispondenze morfologiche degli allarmi strumentali di immaturità mieloide, l'allarme "left shift" indica comunemente la presenza di granulociti a bastoncino (band cell) e metamielociti; "immature granulocytes" suggerisce quella di metamielociti, mielociti, e promielociti, mentre blasti e promielociti fanno in genere scattare l'allarme "blasts". A tutt'oggi nessuna tecnologia presente sul mercato risulta in grado di fornire il conteggio dei blasti, dato di notevole rilevanza clinica. Tutte le strumentazioni, pertanto, riconoscono le situazioni patologiche che implicano la presenza di cellule atipiche identificandole con un proprio linguaggio, che, quando correttamente conosciuto, sta alla base di una successiva revisione microscopica orientata. L'analisi integrata delle informazioni strumentali e della morfologia tradizionale migliora l'abilità interpretativa dell'ematologo di laboratorio. Questa nuova morfologia, costituita da segnali strumentali e da rilevazioni al M.O., si integra perfettamente con le altre tecnologie (citochimica, immunofenotipizzazione, citogenetica, biologia molecolare) a disposizione del moderno laboratorio di ematologia.

Bibliografia

- Cappelletti P. Il 'referto' in Medicina di Laboratorio. Riv Med Lab - JLM 2004; 5(3):197-208.
- Cappelletti P, GdSE-SIMeL. Linee guida per il referto ematologico. Riv Med Lab - JLM 2002; 3(2-S1):87-93.
- Cappelletti P, Biasioli B, Bulian P, Buttarello M, Cenci AM, Da Rin G, et al. Guidelines for the interpretative hematology report. International Society for Laboratory Hematology 2003. XVIth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, Orlando, Florida (U.S.A.), 14-18/05/2003, Abstracts.
- Burlina A. Introduzione alla Medicina di Laboratorio. Torino: CG Edizioni Medico Scientifiche; 1982.
- Burlina A. Medicina di Laboratorio. Fondamenti di diagnostica. Torino: CG Edizioni Medico-Scientifiche; 1992.
- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Wintrobe's Clinical Hematology. 9th edition. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
- WHO/UNICEF/UNU. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. Geneva, World Health Organization, 2001 (WHO/NHD/01.3). http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf (data di consultazione: 6.1.2008).
- Goddard AF, McIntyre AS, Scott BB. Guidelines for the management of iron deficiency anemia. British Society of Gastroenterology. Gut 2000; 46(S 3-4):IV1-IV5. Erratum in: Gut 2000; 47(6):872.
- http://www.cap.org/apps/cap.portal?_nfpb=true&_pageLabel=home (data di consultazione: 6.1.2008).
- <http://www.asahq.org/index.htm> (data di consultazione: 6.1.2008).
- http://www.abbottdiagnostics.com/Your_Lab/default.cfm?syscat=Hematology (data di consultazione: 6.1.2008).
- <http://www.abx.horiba.com/corporate/gb/1-Hematology/> (data di consultazione: 6.1.2008).
- <http://www.dasit.it/web/index.asp> (data di consultazione: 6.1.2008).
- <http://www.il-italia.it/businessline/ematologia/ematologia0.htm> (data di consultazione: 6.1.2008).
- http://diagnostics.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay~q_catalogId~e_111~a_categoryId~e_10001~a_catTree~e_10001~a_langId~e_111~a_storeId~e_10001.htm (data di consultazione: 6.1.2008).
- Fraser CG, Wilkinson SP, Neville RG, Knox JD, King JF, Mac Walter RS. Biologic variation of common hematologic laboratory quantities in the elderly. Am J Clin Pathol 1989; 92:464-70.
- Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, Ricos C. Proposal for setting generally applicable quality goals solely based on biology. Ann Clin Biochem 1997; 34:8-12.
- Costongs GMPJ, Janson PCW, Bas BM, Hermans J, Brombacher PJ, Van Wersch JWJ. Short-term and long-term intraindividual variations and critical difference of haematological laboratory parameters. J Clin Chem Clin Biochem 1985; 23:69-76.
- Groner W, Simson E. Practical guide to modern hematology analyzers. Chichester: John Wiley&Sons; 1995.
- Buttarelli M, GdSE-SIMeL. Variabilità biologica dei parametri ematologici. Riv Med Lab - JLM 2003; 4(S.1):88-91.
- Buttarelli M., GdSE-SIMeL. Risultati della sperimentazione multistrumentale in ematologia automatizzata: lo stato dell'arte. Riv Med Lab - JLM 2004; 5(3-S1):136-41.
- Bessman JD, Gilmer PR Jr, Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. Am J Clin Pathol 1983; 80(3):322-6.
- Cappelletti P, Biasioli B, Buttarello M, Bulian P, Casolari B, Cenci AM, et al. Within and between subject biologic variability in complete blood cell count (CBC), leucocyte dif-

- ferential count (LDC), and reticulocyte. International Society for Laboratory Hematology 2006. XIX^o International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, Amsterdam (NL), 25-28/04/06, Abstracts.
24. Buttarello M, Cenci AM, Miconi V, Piccinini C, Piva E, Bulian P, et al. Conteggio leucocitario differenziale al microscopio: relazione fra variabilità analitica e numero di eventi analizzati. *Riv Med Lab - JLM* 2003; 4(S.1):120.
 25. Bulian P, Buttarello M, Biasioli B, Casolari B, Cenci A, Da Rin G, et al. Stima delle componenti della variabilità biologica ed analitica dei parametri ematologici (emocromo completo e reticolociti) misurati su ADVIA 120, CD 4000, LH-750, PENTRA RETIC ed XE 2100. *Riv Med Lab - JLM* 2003; 4(S.1):120.
 26. Cesana BM, Maiolo AT, Gidiuli R, Damilano I, Massaro P, Polli EE. Relevance of red cell distribution width (RDW) in the differential diagnosis of microcytic anaemias. *Clin Lab Haematol* 1991; 13(2):141-51.
 27. Bain BJ. Morphology in the diagnosis of red cell disorders. *Hematology* 2005; 10(S1):178-81.
 28. <http://www.clsi.org/> (data di consultazione: 6.1.2008).
 29. Heilmeyer L. Blutfarbstoffwechselstudien. *Deutsch Archiv fur Klinik Medizin* 1931, 171:123-53.
 30. Begemann H, Rastetter J. Atlante di Ematologia Clinica. Fondato da Heilmeyer L e Begemann H. II ed italiana. Padova: Piccin Ed.; 1980.
 31. Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM. Le cellule del sangue: funzioni e patologia. Atlante. Milano: Edi Ermes Edizioni; 1981.
 32. Doretto P, Biasioli B, Casolari B, Pasini L, Bulian P, Buttarello M, et al. Conteggio reticolocitario automatizzato: valutazione NCCLS H-44 ed ICSH su 5 strumenti. *Riv Med Lab - JLM* 2004; 5(Suppl.):170.
 33. Cappelletti P, Biasioli B, Buttarello M, Bulian P, Casolari B, Cenci AM, et al. Mean reticulocyte volume (MCVR): reference intervals and the need for standardization. International Society for Laboratory Hematology 2006. XIX^o International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, Amsterdam (NL), 25-28/04/2006, Abstracts.
 34. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline. NCCLS Document H44-A, Villanova, Pennsylvania, 1997.
 35. Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuo E, Rizzotti P. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(1):100-11.
 36. D'Onofrio G, Zini G. *Morfologia del sangue*. Roma: Verduci Editore; 1997.
 37. Briggs C, Rogers R, Thompson B, Machin S. New Red Cell Parameters on the Sysmex XE-2100 as Potential Markers of Functional Iron Deficiency. *Sysmex Journal International* 2001; 11(2):63-8.
 38. Buttarello M, Temporin V, Ceravolo R, Farina G, Bulian P. The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of post-treatment sideropenic anemia. *Am J Clin Pathol* 2004; 121(4):489-95.
 39. Kickler TS, Borowitz MJ, Thompson RE, Charintranont N, Law R. Ret-Y a measure of reticulocyte size: a sensitive indicator of iron deficiency anemia. *Clin Lab Haematol* 2004; 26(6):423-7.
 40. Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica*. 2003; 88(5):570-81.
 41. <http://www.ematologiainfluorescenza.it/> (data di consultazione: 6.1.2008).
 42. Bulian P, Cenci AM, Piccinini C, Miconi V, Piva E, Buttarello M, et al. Sensibilità clinica degli allarmi leucocitari degli analizzatori ematologici: studio di 334 casi secondo protocollo NCCLS H20-A. *Riv Med Lab - JLM* 2004; 5(Suppl.):175.
 43. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline. NCCLS Document H20-A, Villanova, Pennsylvania, 1992.
 44. Wang FS, Itose Y, Tsuji T, Hamaguchi Y, Hirai K, Sakata T. Development and clinical application of nucleated red blood cell counting and staging on the automated haematology analyser XE-2100TM. *Clin Lab Haematol* 2003; 25(1):17-23.
 45. Kim YR, Yee M, Metha S, Chupp V, Kendall R, Scott CS. Simultaneous differentiation and quantitation of erythroblasts and white blood cells on a high throughput clinical haematology analyser. *Clin Lab Haematol* 1998; 20(1):21-9.
 46. Beutler E. *Williams' Hematology*. 5th Ed. New York: McGraw-Hill Inc.; 1990.
 47. Uthman E. *Understanding Anemia*. University of Mississippi Press; 1998. Chapter 1.
 48. Fosburg MT, Nathan DG. Treatment of Cooley's anemia. *Blood* 1990; 76(3):435-44.
 49. Piomelli S, Danoff SJ, Becker MH, Lipera MJ, Travis SF. Prevention of bone malformations and cardiomegaly in Cooley's anemia by early hypertransfusion regimen. *Ann N Y Acad Sci* 1969; 165(1):427-36.
 50. Stachon A, Sondermann N, Imohl M, Krieg M. Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. *J Lab Clin Med* 2002; 140(6):407-12.
 51. Gaydos LA, Freireich EJ, Mantel N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *N Engl J Med* 1962; 266:905-9.
 52. Rebullà P, Finazzi G, Marangoni F, Avvisati G, Gugliotta L, Barbui T, et al. The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1997; 337:1870-5.
 53. Ancliff PJ, Machin SJ. Trigger factors for prophylactic platelet transfusion. *Blood Rev* 1998; 12(4):234-8.
 54. Schiffer CA, Anderson KC, Bennett CL, Bernstein S, Elting LS, Goldsmith M, et al. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001; 19(5):1519-38.
 55. Gmür J, Burger J, Schanz U, Fehr J, Schaffner A. Safety of stringent prophylactic platelet transfusion policy for patients with acute leukaemia. *Lancet*. 1991; 338(8777):1223-6.
 56. Brecher G, Cronkite EP. Morphology and enumeration of human blood platelets. *J Appl Physiol* 1950; 3(6):365-77.

57. International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry; International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting. Platelet counting by the RBC/platelet ratio method. A reference method. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(3):460-4.
58. Harrison P, Horton A, Grant D, Briggs C, MacHin S. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol* 2000; 108(2):228-35.
59. Buttarello M, Gadotti M, Lorenz C, Toffalori E, Ceschini N, Valentini A et al. Evaluation of four automated hematology analyzers. A comparative study of differential counts (imprecision and inaccuracy). *Am J Clin Pathol* 1992; 97(3):345-52.
60. Doretto P, Cappelletti P. Piastrinopenie: il punto di vista del Laboratorio. *RIMeL/IJLaM* 2007; 3(Suppl.):112-9.
61. Gowland E, Kay HE, Spillman JC, Williamson JR. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. *J Clin Pathol* 1969; 22(4):460-4.
62. Harrison P, Ault KA, Chapman S, Charie L, Davis B, Fujimoto K, et al. International Society of Laboratory Hematology Task Force for the Reference Platelet Count. An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(3):448-59.
63. Buttarello M, Lorenz C, Gadotti M, Toffalori E, Valentini A, Rizzotti P. Diagnostic performance: a comparative study of the leukocyte differential count on four automated haematology analysers. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31(4):251-8.
64. Biasioli B, Cenci AM. La sicurezza del paziente e la Medicina di Laboratorio. Le applicazioni. Il caso dell'Ematologia. *RIMeL/IJLaM* 2006; 2(Suppl.):122-7.
65. Cenci AM, Biasioli B, Golato M. Neutropenie: il punto di vista del Laboratorio. *RIMeL/IJLaM* 2007; 3(Suppl.):96-106.
66. Cenci AM, Maconi M, Casolari B. Evaluation of the diagnostic performance of the Sysmex XT-2000i automated haematology analyser in the detection of immature granulocytes. *Sysmex J Int* 2005; 15(1):16.
67. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005; 353(5):498-507.
68. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* 2007; 335(7625):879-83.