

Conta reticolocitaria e parametri derivati

M. Carta

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

La crescente diffusione dell'uso di sostanze dopanti, ha investito il laboratorio del ruolo cruciale di monitoraggio dei parametri biochimici dello sportivo professionista. Questo è particolarmente vero per l'utilizzo dell'eritropoietina ricombinante (Epo), che presenta una struttura identica a quella endogena e quindi non può essere da questa distinta. Inoltre l'eritropoietina ricombinante ha una emivita di circa 42 h nel siero e quindi la sua concentrazione ematica ritorna nella norma in 7 giorni, ma i suoi effetti possono prolungarsi fino a 4 settimane dall'ultima dose (1).

Per tali motivi la ricerca dell'assunzione di questa sostanza si deve basare su indici che possano riflettere in maniera indiretta, l'azione dell'eritropoietina su alcuni parametri dell'emopoiesi.

Questo fa sì che il ruolo del laboratorista diventi anche quello di definire la plausibilità o artificiosità di tali parametri indiretti.

L'eritropoietina agisce stimolando la produzione di globuli rossi da parte del midollo osseo per aumentare il numero assoluto nel sangue circolante e incrementare il trasporto di ossigeno.

Questa abnorme accelerazione dell'eritropoiesi porta a modificazioni quantitative e qualitative dei reticolociti.

Nei pazienti in terapia con Epo già dopo 24 h dalla somministrazione, si assiste ad un lieve aumento del numero reticolocitario assoluto che raggiunge il suo massimo dopo 4-6 giorni e torna alla norma dopo 8-10 giorni (2).

La somministrazione di Epo, tuttavia, determina modificazioni non solo quantitative, ma anche qualitative a carico dei reticolociti. Infatti, in condizioni di aumentata attività eritropoietica (eritropoiesi da stress) il midollo osseo produce reticolociti immaturi, più grandi e con un contenuto più elevato di RNA (3). Tali riscontri erano noti già da parecchi anni, ma fino ad ora erano anche difficilmente quantificabili. Oggi invece grazie all'avvento delle nuove tecnologie, molti sistemi automatizzati sono in grado di fornire dati relativi al grado di maturità ed altri parametri reticolocitari. Ad esempio l'analizzatore Advia 120 (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY) consente la

misurazione simultanea del volume e della concentrazione emoglobinica sia dei globuli rossi maturi, che dei reticolociti (MCVr e CHCMr). Da questi parametri viene poi calcolato il contenuto emoglobinico di ogni cellula (CHR). Moltiplicando il CHR per il conteggio assoluto reticolocitario si ottiene il contenuto di emoglobina dell'intero compartimento reticolocitario (retHb), che può essere rapportato al contenuto di emoglobina del pool eritrocitario per ottenere una stima della sopravvivenza eritrocitaria (rbcHb/retHb ratio).

La somministrazione di eritropoietina si associa quindi ad una diminuzione significativa del CHR, ad un incremento del ret-Hb e ad una diminuzione del rbcHb/retHb ratio, anche se tra tutti questi parametri quello che sembra associarsi alla miglior capacità di discriminare tra utilizzatori di Epo e non utilizzatori è il conteggio assoluto reticolocitario (4).

Si deve però considerare che i parametri reticolocitari risentono della concomitante somministrazione di ferro, necessario per sostenere l'aumentata eritropoiesi (5) e quindi mostrano modificazioni più evidenti se la terapia con eritropoietina è affiancata dalla somministrazione di ferro sia per *os* che per iniezioni IM (6). Inoltre non sono ancora stati studiati in utilizzatori cronici di eritropoietina.

Stabilito quindi che la somministrazione di eritropoietina induce modificazioni significative del conteggio reticolocitario e alterazioni qualitative dei reticolociti, quello che dobbiamo stabilire è se queste modificazioni ci consentono dal punto di vista pratico di identificare chi fa uso illecito di eritropoietina. Parisotto et al. (6) propongono un approccio combinato che tiene conto di più marcatori (ematocrito (Hct), ematocrito reticolocitario (RetHct), globuli rossi ipocromici, Epo sierica, recettore solubile della transferrina (sTfr)) e che sembra riuscire ad identificare il 94-100% di utilizzatori di eritropoietina durante le ultime 2 settimane della fase di somministrazione di Epo con 1 falso positivo. L'obiettivo ora è quello di riuscire ad eliminare il falso positivo.

Attualmente però le varie associazioni sportive si stanno orientando maggiormente verso un approccio diverso, che comprende anche strategie di preven-

zione del doping. Tale approccio include la definizione di un profilo ematologico individuale, il cosiddetto "passaporto ematologico" (7). Anche l'Italia è in linea con questo atteggiamento.

Il CONI (Comitato Olimpico Nazionale Italiano) e la FIGC (Federazione Italiana Giuoco Calcio) hanno lanciato la campagna "Io non rischio la salute" che si prefigge lo scopo di tutelare la salute degli atleti mediante la prevenzione, la diagnosi precoce e la terapia di disordini ematologici che possano derivare dall'attività sportiva stessa o da pratiche illecite ad essa collegate. Gli atleti quindi, secondo questo programma, devono sottoporsi ad esami del sangue con cadenza diversa a seconda del grado di qualifica (3 volte l'anno per gli atleti di elevata qualificazione). Il protocollo prevede, anche in questo caso, il dosaggio di più parametri: reticolociti, ematocrito, emoglobina, recettore solubile della transferrina e ferritina sierica. Se almeno 2 parametri su 5 sono patologici l'atleta sospende temporaneamente l'attività agonistica e viene monitorato, se uno dei 5 parametri è patologico l'atleta prosegue l'allenamento ma viene ugualmente sottoposto a monitoraggio.

Il problema è però stabilire i criteri che ci portano a definire correttamente un dato come patologico. Il dato di per sé stesso non può essere correttamente valutato se non si considerano le variabili pre-analitiche ed analitiche.

L'esercizio fisico e il soggiorno in altura inducono fisiologicamente un aumento della produzione di eritropoietina endogena. L'effetto però sui parametri reticolocitari di queste variabili sembra essere meno importante che non per altri parametri dell'eritropoiesi (6).

Importante da considerare è invece il trasporto del campione: il conteggio reticolocitario va eseguito entro 6 h dal prelievo, poi a causa della breve emivita reticolocitaria si assiste ad un decremento del numero dei reticolociti presenti intorno al 20% ogni 24 h (8).

Per quanto riguarda la variabilità analitica, il protocollo del CONI raccomanda che il dosaggio reticolocitario venga eseguito con metodi automatizzati. Tuttavia se i moderni autoanalizzatori hanno permesso di superare gran parte dei problemi che affliggevano il conteggio manuale dei reticolociti, come la soggettività dell'operatore nell'identificare i reticolociti stessi e il limite legato al conteggio totale dei globuli rossi, tuttavia permangono alcuni problemi legati in particolare alla mancanza di standardizzazione tra i metodi. Confrontando tra loro 5 diversi analizzatori automatici (9) possiamo notare intervalli di riferimento, costruiti secondo i medesimi criteri, diversi. Ciò è legato all'utilizzo di diverse tecnologie (fluorescenza, assorbanza, diffrazione luminosa) e diversi marcatori dell'RNA reticolocitario (NBM, oxazina, auramina O, arancio di tiazolo, CD4k 530). Lo stesso documento redatto dal comitato NCCLS (8) raccomanda che gli intervalli di riferimento dei reticolociti devono

essere strettamente metodo-dipendenti. Inoltre come accennavo, la mancanza di standardizzazione fa sì che i dati ottenuti in un laboratorio non siano sovrapponibili a quelli ottenuti in altri laboratori. Lascia quindi perplessi il chiaro riferimento ad un preciso intervallo di riferimento contenuto nel programma del CONI. Nella prospettiva di una valutazione longitudinale della funzione emopoietica degli atleti, dovrebbe invece essere presa in considerazione la differenza critica (DC) che stabilisce quale differenza tra 2 valori consecutivi di un test possa essere considerata significativa di una effettiva variazione, a livelli di probabilità statistici prefissati. Nel caso del conteggio reticolocitario, fissando un coefficiente di variazione analitico medio tra vari strumenti automatizzati nell'ambito di valori normali di reticolociti (6.5%-10.7%) (9) pari all'8% ed un coefficiente di variazione biologico medio del 15% desunto dai dati di letteratura che oscillano tra 11% e 20% (9), si ottiene una DC pari al 48%. Quindi variazioni del dosaggio dei reticolociti possono essere considerate significative biologicamente solo quando il risultato di una analisi estemporanea si discosti di almeno il 48% dalla precedente.

Nel caso dei dosaggi estemporanei, si deve anche considerare la breve emivita dei reticolociti che comporta necessariamente tempi di analisi ristretti (10), mentre sappiamo che gli effetti indotti dall'eritropoietina e ancor più dai nuovi peptidi modificati, si possono far sentire per un tempo più lungo.

Per quanto riguarda i parametri reticolocitari derivati, alcuni di essi come il CHr, sono al momento effettuabili con un unico strumento, e questo di fatto non può che limitare la loro diffusione. Recentemente è stata riscontrata tuttavia una correlazione tra un parametro (ret-Y) presente in Sysmex XE-2100 (Toa, Kobe, Japan) e il CHr dell'Advia 120. Altri parametri invece come il volume reticolocitario medio, sono disponibili anche in altri analizzatori, quali ABX Pentra 120 Retic (ABX, Montpellier, France), LH700 (Coulter-Beckman, Hialeah, FL). Tuttavia per tali parametri i problemi di standardizzazione sono ancora maggiori ed i risultati poco confrontabili tra loro.

Concludendo quindi, anche se la somministrazione di eritropoietina determina variazioni qualitative e quantitative a carico dei reticolociti, questo al momento attuale non può consentire di riconoscere l'utilizzatore di eritropoietina, perlomeno nel prelievo estemporaneo. Diverso può essere il ruolo di questo dosaggio nell'ambito di un follow-up dell'atleta, a patto che gli esami vengano eseguiti sempre nello stesso strumento, considerando gli intervalli di riferimento specifici di quello strumento e tenendo conto delle variabili biologiche del dosaggio. In pratica, soprattutto per un parametro di tipo indiretto, è necessario stabilire precisi limiti decisionali di significato forse più burocratico che medico.

Bibliografia

1. Ekblom B, Berglund B. Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power. *Scand J Med Sci Sports* 1991; 1:88-93.
2. Lippi G. Medicina di laboratorio e doping. *Biochimica Clinica* 1999;23:216-26.
3. Brugnara C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *Int J Clin Lab Res* 1998;28:1-11.
4. Parisotto R, Gore CJ, Hahn AG, et al. Reticulocyte parameters as potential discriminators as recombinant human erythropoietin abuse in elite athletes. *Int J Sports Med* 2000;21:471-9.
5. Major A, Mathez-Loic F, Rohling R, Gautschi K, Brugnara C. The effect of intravenous iron on the reticulocyte response to recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 1997; 98:292-4.
6. Parisotto R, Gore CJ, Emlie KR, et al. A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2000;85:564-72.
7. Cazzola M. A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. *Haematologica* 2000;85:561-3.
8. NCCLS. Methods for reticulocyte counting (Flow cytometry and supravital dyes); approved guideline. NCCLS document H44-A.
9. Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuio E, Rizzotti P. Flow cytometric reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol* 2001;115:100-11.
10. Lippi G, Guidi G. Laboratory screening for erythropoietin abuse in sport: an emerging challenge. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:13-9.