Standardizzazione ematologica in medicina dello sport

G. Guidi
Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi, Ospedale Policlinico, Verona

CISMEL – Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi Ematologici e di Laboratorio

Introduzione

La principale funzione del laboratorio di ematologia consiste nella produzione di specifiche informazioni che assistano il clinico nei processi di decisione clinica, nella formulazione di prognosi e nel monitoraggio e cura dei pazienti ematologici.
Per garantire accuratezza, coerenza e comparabilità nel tempo dei dati prodotti da laboratori di una stessa organizzazione sanitaria e ancor più da laboratori di differenti nazioni, sono attive organizzazioni che propongono la messa in atto di procedure di standardizzazione che riguardano processi, strumenti e materiali.
Secondo la definizione di ISO/IEC (1) la standardizzazione è *"the activity of establishing, with regard to actual or potential problems, provisions for common and repeated use, aimed at the achievement of the optimum degree of order in a given context"*. Da ciò deriva che il processo di standardizzazione attivo in un contesto di laboratorio è la descrizione di sistemi uniformi e riproducibili di misura, atti a garantire precisione, accuratezza, specificità ed armonizzazione di risultati di test e riguarda sia standard scritti che materiali standard.
Uno standard rappresenta dunque un requisito ben fissato, essenziale e specifico che deve essere soddisfatto. Ciò lo mette in una posizione diversa dalle "linee guida", le quali sono invece suscettibili, almeno entro certi limiti, di modificazione.
Il processo di standardizzazione può essere realizzato in più modi, che vanno dall'imposizione normativa al consenso fra esperti di una determinata branca. Quest'ultima modalità, che trova la sua base nella metodologia scientifico-sperimentale, è quella attualmente più diffusa e si estrinseca tramite l'emissione di documenti preparati da appositi organismi. Tali organismi godono del principio di autorità che viene ad essi riconosciuto non in quanto suffragato da cooptazione politicamente espressa, bensì in quanto sostenuto dalla autorevolezza scientifica e dalla indipendenza intellettuale dei componenti.
Da ciò deriva l'ulteriore definizione proposta dal NCCLS di standard ottenuto per consenso come *"a unique carefully designed process that is open to all affected interests; actively involves these affected constituencies: is unbiased, neutral and devoid of undue influences; and gives careful consideration to all views"* (2).
Uno standard di consenso è il prodotto dello sforzo combinato di varie componenti che operano nell'ambito professionale specifico (Università, Ospedali, Industrie, ecc.).
Non era facilmente immaginabile da parte degli estensori della definizione di standardizzazione ISO/IEC la situazione che si sarebbe presentata anni dopo a proposito delle indagini di laboratorio di ematologia per esigenze di medicina sportiva. Essi avevano tuttavia previsto la possibilità di *"… potential problems"* che il processo di standardizzazione avrebbe dovuto affrontare e risolvere. Per tale motivo la definizione conserva pienamente il suo valore quando si tratta di raggiungere *"… the achievement of the optimum degree of order in a given context"*.

Standardizzazione in medicina dello sport

Qual'è dunque la situazione che si è venuta a creare in questi ultimi anni nell'ambito della medicina sportiva e perché essa necessita di ulteriori precisazioni in tema di standardizzazione?
Appare pur vero che si tratta di attività di laboratorio di ematologia largamente corrispondente a quella che viene prestata per la popolazione generale. La gran parte dei test che vengono richiesti a quanti praticano sport rientra nella routine quotidiana. Ma la necessità di definire nuovi standard, in aggiunta o come evoluzione di quelli precedenti, emerse quando si riscontrò che in alcuni insiemi della popolazione sportiva, rappresentati da atleti dediti a determinate discipline, esistevano delle particolarità quali:

- I valori osservati erano spesso al limite dei e/o oltre ai valori di riferimento della popolazione generale.
- Venivano alla luce pratiche illecite volte ad alterare la fisiologia dell'atleta a scopo di migliorare la prestazione. Ciò si rifletteva sui dati di laboratorio, alcuni dei quali suscettibili di svelare la frode.
- Poteva osservarsi sovrapposizione fra dati derivanti da variabilità biologica individuale e dati dovuti a pratiche fraudolente.
- Sussistevano specifici, oggettivi problemi di standardizzazione della fase pre-analitica.

La conoscenza di queste specificità ha portato a sviluppare procedure di standardizzazione che hanno visto negli ultimi anni notevoli progressi, soprattutto nel settore dell'emocitometria. Difficilmente anni fa si sarebbe ipotizzata una stringente necessità di procedere a standardizzare la misura dell'ematocrito nei termini in cui questa è ora disponibile. D'altra parte il clamore suscitato dai dati di ematocrito in atleti che verosimilmente avevano fatto uso di sostanze eritropoietiche e l'esigenza di accentuare la accuratezza delle misure al massimo grado possibile, hanno portato alle recenti "Recommendations for Reference Method for the Packed Cell Volume" ICSH Standard 2001, preparato da Expert Panel on Cytometry of ICSH (3).

Conviene esaminare in dettaglio la raccomandazione dal momento che essa contiene molti spunti, concettuali e procedurali, che possono essere considerati segnali della particolare attenzione che viene ora rivolta ai punti sopra elencati.

Ematocrito (Ht), denominato anche PCV (Packed Cell Volume) è definito “misura chiave dell’emocitometria”, cui in qualche modo possono essere ricondotte le calibrazioni di tutti gli analizzatori ematologici. I range di riferimento per Ht e per gli indici eritrocitari dipendono dalla validità della calibrazione di Ht, come pure i valori attesi per i calibratori stessi e per i controlli, e l’assegnazione di valori target per i programmi statistici di controllo di qualità basati sulla popolazione”.

Il precedente Ht di riferimento, basato sulla centrifugazione, risente di una serie di variabili negative ben note, quali: il plasma che resta intrappolato fra le cellule, la non prevedibile contaminazione da parte di elementi circolanti di altre serie, la impossibilità di delimitare esattamente dopo centrifugazione gli strati, la non sempre piatta ed orizzontale chiusura dei tubi di centrifugazione, la disidratazione degli eritrociti oltre che il loro stato di ossigenazione. Benché in genere l’errore totale sia ridotto, quando considerato su base individuale, può diventare inaccettabile quando sia considerato sui grandi numeri.

La proposta è di adottare il metodo basato su emoglobina/MCHC (4), in quanto ritenuto in grado di eliminare le variabili negative.

L’anticoagulante di scelta per il campione di sangue è EDTA K2, preferibile rispetto ad EDTA K3 in quanto l’effetto osmotico osservabile nel tempo con entrambi gli anticoagulanti si presenta molto più rapidamente con il secondo.

La procedura analitica si basa su comune attrezzatura di laboratorio (vetreria, capillari, pipette, siringhe, filtri a membrana) e sul ben noto reagente per la cianmetaemoglobina.

Su ciascun campione di sangue si eseguono in duplicato due misure di emoglobina, la prima sul sangue intero e la seconda sui globuli rossi impaccati dopo centrifugazione. Il valore Ht di riferimento è dato dal rapporto fra le due misure di emoglobina.

La lettura di Hb viene effettuata a 540 nm (picco), a 504 nm (valle) e a 750 nm (torbidità). I rapporti sono confrontati a limiti definiti di accettabilità per quanto riguarda purezza e torbidità.

Lo standard di riferimento in tal modo individuato viene applicato per la fabbricazione e per la certificazione di tubi capillari per micro-ematocrito e per la taratura delle apparecchiature automatiche per analisi ematologiche.

Per un uso più generalizzato nei laboratori clinici, una volta che un particolare lotto sia stato certificato con la procedura di riferimento, si raccomanda di usare tale lotto come standard secondario.

Nel complesso il nuovo standard viene incontro alle più stringenti esigenze di accuratezza analitica che si sono venute a creare negli ultimi tempi, in particolare riguardo alle analisi ematologiche rivolte allo sport. Il vantaggio è evidentemente quello di attenuare, se non di eliminare, le possibili cause di contestazione cui la precedente metodologia poteva essere soggetta.

Anche la fase pre-analitica ha visto affermarsi l’esigenza di maggiore garanzia, a vantaggio sia del soggetto (il laboratorio) che dell’oggetto (l’atleta) del/dei test di laboratorio.

Come noto, uno dei momenti più delicati dell'intera procedura di indagine di laboratorio è quello della raccolta ed identificazione del campione (es.: ricerca di rHu-EPO o simili). Gli errori compiuti in questa fase possono avere importanti conseguenze soprattutto per l'atleta che si sottopone all'indagine. Poiché questo è un compito che avviene sotto la supervisione di funzionari delegati dalle autorità sportive, è opportuno descriverne le fasi, individuandone le criticità. Il procedimento standardizzato è quello praticato in ambito internazionale (5).

- L’atleta cui viene notificato il controllo deve presentarsi entro 60 minuti, se desidera accompagnato da persona di fiducia/ interprete, alla postazione di raccolta dei campioni di urina. Troverà a disposizione eventuali bevande sigillate per facilitare la diuresi.
- L’atleta sceglie un contenitore sigillato per la raccolta e si reca al bagno accompagnato da un responsabile del controllo anti-doping, dello stesso sesso.
- L’atleta si scopre dalla cintola al ginocchio e, mantenendosi in vista del responsabile del con-

trollo, compie la raccolta nel contenitore dopo averlo aperto. Tutte le operazioni devono essere compiute sotto la vista del responsabile. La raccolta deve fornire una quantità di almeno 75 ml di urina. Solamente l'atleta maneggia il campione raccolto. Al termine l'atleta porta il campione alla postazione di raccolta, accompagnato dal responsabile del controllo.

- L'atleta viene richiesto di scegliere un kit di campionamento dell'urina, controllandone preventivamente l'integrità.
- Dopo aver aperto il kit, l'atleta suddivide il campione raccolto in due contenitori etichettati con le lettere A e B (almeno 30 ml per ciascuno), avendo cura di lasciare poche gocce di urina nel contenitore di raccolta iniziale per il controllo della idoneità del campione da parte del responsabile del controllo.
- L'atleta chiude ermeticamente i due contenitori A e B e si assicura che non vi siano fuoriuscite di campione.
- Sul residuo della raccolta iniziale il responsabile del controllo rileva pH e peso specifico con apposita metodica rapida. Se i valori sono inferiori a quelli raccomandati, l'atleta è invitato a fornire un ulteriore campione con le stesse modalità.
- Il responsabile del controllo anti-doping rileva e trascrive i numeri dei campioni A e B sull'apposito Modulo di raccolta dei campioni. L'atleta verifica la correttezza della trascrizione e dichiara l'eventuale assunzione di qualsiasi tipo di farmaco/medicazione nei 7 giorni precedenti. L'atleta può anche annotare sul Modulo eventuali commenti sull'intera procedura del test.
- Alla fine il responsabile del controllo anti-doping invita l'atleta ed il suo eventuale accompagnatore a controllare tutte le informazioni raccolte sul Modulo ed a firmare se quanto riportato è corretto. A sua volta lo stesso responsabile controlla e firma il Modulo, una copia del quale viene rilasciata all'atleta.

Dopo la raccolta il campione viene messo in un contenitore di trasporto sigillato ed inviato ad un laboratorio accreditato. Il laboratorio riceve copia del Modulo di raccolta che riporta solo i codici di identificazione e non il nome dell'atleta corrispondente. Prima di procedere con l'analisi vengono fatti altri controlli di integrità del contenitore e viene verificata la corrispondenza fra i codici di identificazione dei contenitori e del Modulo. Il laboratorio quindi procede con l'analisi del campione A per ricercare la presenza di sostanze proibite. Se il campione risulta positivo, l'atleta ha il diritto di ottenere una conferma del risultato sul campione B. In caso di negatività l'atleta ha diritto a rinunciare all'analisi sul campione B.

Eventuali contestazioni riguardanti il risultato dell'analisi devono pervenire entro 7 giorni. La recente immissione di sostanze che, come rHu-EPO, hanno la proprietà di aumentare il trasporto di ossigeno ma che praticamente non sono individuabili con i metodi correnti (ARANESP), fornisce un'idea della sfida cui sono chiamati quanti desiderano che nello sport prevalgano onestà e correttezza a tutti i livelli. Anche in questo caso sono presenti esigenze che non possono prescindere da una corretta standardizzazione dei metodi e dei materiali. Il solo fatto che spesso la sostanza in questione non possa essere individuata, e quindi si debba ricorrere ad indagini indirette, accresce ancor più la necessità di ottenere risultati da metodi correttamente standardizzati, tali da poter costituire insieme indice incontestabile di frode. Per tali motivi gli sforzi dei ricercatori e degli organismi internazionali sono rivolti a individuare le procedure, le tecniche ed i materiali più adatti per garantire la correttezza della pratica sportiva e la tutela degli atleti onesti.

Bibliografia

1. ISO/IEC Guide 2. General terms and their definitions concerning standardization and related activities. 1986.
2. International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM:1993). 2nd ed. Geneva: ISO, 1993. pp. 59.
3. ICSH - Expert Panel on Cytometry. Recommendations for reference method for the packed cell volume. Lab Haematol 2001; 7: 148-70.
4. Bull BS, Rittenbach JD. A proposed reference haematocrit derived from multiple MCHC determinations via hemoglobin measurements. Clin Lab Haematol 1990;12: 43-53.
5. WADA-AMA. World anti-doping program and the Code. 2002 (in preparation).