

Variabilità biologica dei parametri ematologici

M. Buttarello

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Geriatrico, Padova

GdS Ematologia – SIMeL

P. Cappelletti (Coordinatore), B. Biasioli (Vice-coordinatore), P. Bulian, M. Buttarello, A. Cenci, G. Da Rin, P. Doretto, V. Miconi, L. Pasini, C. Piccinini, E. Piva

Introduzione

Lo studio della variabilità biologica intra ed interindividuale dei vari analiti misurati in laboratorio ha ricevuto negli ultimi decenni una crescente attenzione. I motivi di questo interesse sono connessi alle potenziali utilizzazioni di tali conoscenze, essenzialmente riconducibili a:

- calcolo delle prestazioni analitiche desiderabili, i cosiddetti "obiettivi analitici", sia come imprecisione che come bias.
- verifica dell'utilità degli intervalli di riferimento comunemente utilizzati, mediante il calcolo dell'"indice di individualità",
- calcolo della significatività clinica delle differenze in caso di indagini ripetute sullo stesso individuo, la cosiddetta "differenza critica".

Accanto a queste applicazioni principali ne esistono altre, ad esempio nel caso di studi clinici la conoscenza della variabilità intraindividuale serve a calcolare il numero di campioni necessari per stimare al meglio il punto omeostatico di un analita ad elevata variabilità; oppure l'individuazione del momento migliore della giornata per eseguire il prelievo per un determinato dosaggio. Un'altra applicazione consiste nella possibilità di eseguire comparazioni tra diversi test disponibili, favorendo quelli a minor variabilità individuale. La maggioranza degli studi è indirizzata alle applicazioni in chimica clinica, ciò è dipeso dall'appartenenza a questa disciplina degli esperti che nel corso degli anni si sono dedicati all'argomento e dalla possibilità di gestire con maggior semplicità la variabilità analitica che interviene nelle misure. Nonostante ciò non mancano gli studi riferiti all'ematologia(1-7). Questi studi hanno indagato la variabilità biologica intraindividuale nel breve, medio e lungo periodo per gli otto parametri tradizionali dell'esame emocromocitometrico, per la leucocitometria differenziale o, più recentemente, anche per il conteggio dei reticolociti.

Anche il Gruppo di Studio in Ematologia della SIMeL (GdSE-SIMeL), nel 2002 ha deciso di occu-

parsi di questo argomento, calcolando la variabilità biologica inter ed intraindividuale su un gruppo di 20 soggetti sani. In questa relazione saranno presentati alcuni dei risultati ottenuti in questo studio.

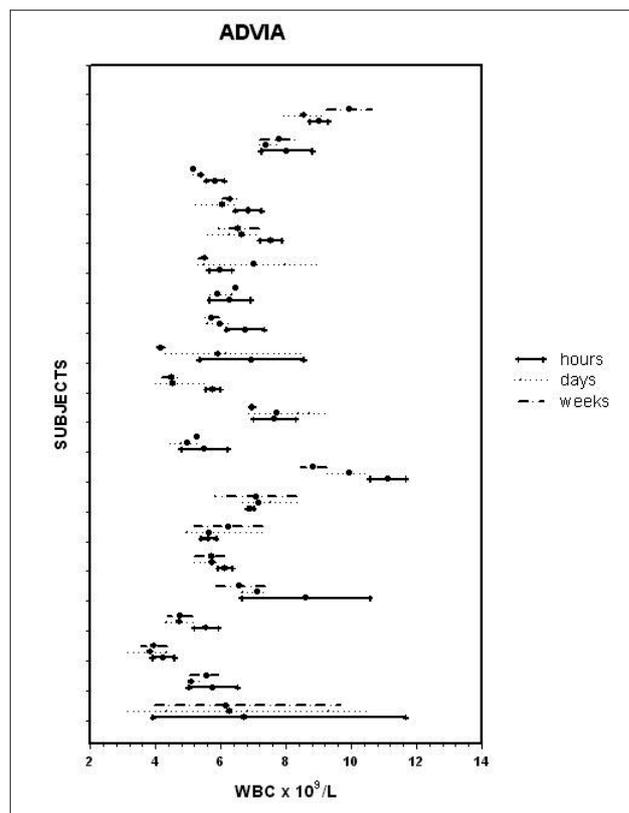
La variabilità biologica intraindividuale

Gli eventi patologici possono determinare variazioni quantitative di un analita sia rispetto ai controlli precedenti, sia per confronto con l'intervallo di riferimento calcolato su una popolazione di soggetti sani. Oltre a queste variazioni esistono quelle che avvengono in soggetti esenti da patologia. La più conosciuta è quella dipendente dall'età. Per molti analiti, quali gli ormoni, sono noti dei comportamenti ciclici (circadiani, mensili...), ed è per minimizzare alcune di queste influenze che sono state standardizzate le modalità di raccolta del campione. Per la gran parte degli analiti (compresa la maggioranza dei parametri ematologici) non sono note oscillazioni cicliche e le variazioni biologiche vengono considerate casuali. Le ipotesi formulate sulla variabilità biologica intraindividuale partono dal presupposto che rappresenti delle fluttuazioni casuali attorno ad un punto omeostatico. La figura 1 riporta una delle modalità suggerite per evidenziare le oscillazioni di uno o più soggetti con la presentazione della media e dell'intervallo di oscillazione del parametro studiato. Come si può notare, l'intervallo di valori per ciascun soggetto comprende solo una parte dell'intervallo complessivo (variabilità interindividuale), ne consegue che alcuni soggetti possono avere importanti scostamenti rispetto al proprio punto omeostatico senza che questi vengano evidenziati perché ricadono sempre all'interno dell'intervallo di riferimento.

Variabilità biologica ed obiettivi analitici

L'assunto fondamentale che sta alla base del modello basato sulla variabilità biologica è che l'effetto

Figura 1. Rappresentazione grafica della variabilità biologica intraindividuale (tra ore, tra giorni e nell'arco di due settimane), per i leucociti totali, ottenuta con l'analizzatore ematologico ADVIA 120. Le linee orizzontali ed il punto rappresentano rispettivamente l'ampiezza di oscillazione nel singolo soggetto ed il valore medio.



dovuto alla variabilità analitica (CV_a) sulla variazione complessiva di un determinato analita deve essere il più basso possibile.

La prima proposta di obiettivo per l'imprecisione analitica si deve a Cotlove(8) che la propose nel 1970, questa venne ripresa anche dal College of American Pathologists nel 1976 (Consensus Conference di Aspen)(9). La proposta prevede che la variabilità analitica sia inferiore a 0.5 volte la variabilità biologica intraindividuale (CV_i), in tal caso contribuisce al massimo per l'11.8% alla variabilità complessiva. Questo deve ritenersi l'obiettivo per i controlli ripetuti sul singolo soggetto e quindi per

l'imprecisione a breve termine. La tabella I riporta i risultati di alcuni studi relativamente alla variabilità biologica intraindividuale in ematologia. I vantaggi del modello basato su questo tipo di variabilità sono riassumibili in:

- semplicità di calcolo
- correlazione dell'obiettivo ad una precisa indicazione clinica quale il controllo seriale,
- buona documentazione in merito alle variabili considerate,
- i risultati sono relativamente indipendenti dall'epoca in cui lo studio è stato condotto, dall'area geografica, dall'età e dalla condizione di salute, purchè stabilizzata.

Questo modello non è tuttavia esente da critiche:

- la frazione scelta (0.5) è comunque arbitraria,
- l'obiettivo è limitato all'imprecisione analitica e non considera il bias,
- alcuni analiti mostrano su individui differenti notevole diversità nelle oscillazioni attorno al punto omeostatico.
- il valore scelto (CV_i) rappresenta la media o la mediana delle variazioni individuali,
- la variazione intraindividuale è maggiore nella malattia acuta che non nei sani,
- per alcune quantità il controllo omeostatico è strettissimo, con variabilità biologica molto bassa e quindi gli obiettivi analitici potrebbero non essere raggiungibili.

La Consensus Conference del 1976 ha anche proposto gli obiettivi analitici dell'imprecisione per le indagini di screening (individuazione di un soggetto affetto all'interno di una popolazione generale). In questo caso $CV_a \leq 0.5 (CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$, dove CV_g rappresenta la variabilità biologica interindividuale. Come si può notare l'obiettivo analitico per lo screening è meno restrittivo di quello relativo al controllo seriale. La tabella II riporta i dati relativi alla variabilità interindividuale sui parametri ematologici ottenuta da due diversi gruppi di studio, nel 1995(6) e nel 2002.

Nel 1978 all'International Meeting del sottocomitato sugli obiettivi analitici della WASP(10) venne ritenuto necessario considerare anche il bias.

Tra le varie proposte fatte per includere il bias, una

Tabella I. Variabilità biologica intraindividuale (day to day) in ematologia, dati percentuali.

PARAMETRI	Statland (1977)	Costongs (1985)	Richardson-Jones (1996)	GdSE-SIMel* (2002)
Leucociti x 10 ⁹ /L	15.5	19.9	14.0	12.3
Eritrociti x 10 ¹² /L	-	4.4	3.5	1.8
Emoglobina g/dL	2.6	4.3	3.0	1.9
MCV fl	-	-	0.5	0.6
Piastrine x 10 ⁹ /L	3.6	6.7	5.0	3.8
Neutrofili x 10 ⁹ /L	23.2	15.1	22.0	18.3
Linfociti x 10 ⁹ /L	9.7	23.6	14.0	11.1
Monociti x 10 ⁹ /L	13.0	24.8	15.0	10.6
Eosinofili x 10 ⁹ /L	14.1	28.8	20.0	11.8
Basofili x 10 ⁹ /L	9.8	41.3	-	9.1
Reticolociti x 10 ⁹ /L	-	-	20.0	5.8

*media dei risultati ottenuta con 4 diversi analizzatori

Tabella II. Variabilità biologica interindividuale in ematologia, dati percentuali.

PARAMETRI	Simson/Groner (1995)	GdSE-SIMel* (2002)
Leucociti x 10 ⁹ /L	22.3	22.3
Eritrociti x 10 ¹² /L	9.0	8.9
Emoglobina g/dL	8.4	9.8
MCV fl	4.8	3.5
Piastrine x 10 ⁹ /L	20.9	12.2
Neutrofili x 10 ⁹ /L	30.8	27.9
Linfociti x 10 ⁹ /L	31.1	20.5
Monociti x 10 ⁹ /L	29.5	21.8
Eosinofili x 10 ⁹ /L	70.1	64.0
Basofili x 10 ⁹ /L	46.6	31.4
Reticolociti x 10 ⁹ /L	-	32.4

*media dei risultati ottenuta con 4 diversi analizzatori

Tabella III. Indici di individualità (CVi/CVg) in ematologia.

PARAMETRI	Fraser (1989)	Simson/Groner (1995)	GdSE-SIMel* (2002)
Leucociti x 10 ⁹ /L	0.58	0.58	0.55
Eritrociti x 10 ¹² /L	0.31	0.35	0.20
Emoglobina g/dL	0.43	0.30	0.19
MCV fl	0.27	0.21	0.17
Piastrine x 10 ⁹ /L	0.39	0.28	0.31
Neutrofili x 10 ⁹ /L	0.67	0.48	0.65
Linfociti x 10 ⁹ /L	0.49	0.37	0.54
Monociti x 10 ⁹ /L	0.49	0.52	0.49
Eosinofili x 10 ⁹ /L	-	0.31	0.18
Basofili x 10 ⁹ /L	-	0.27	0.29
Reticolociti x 10 ⁹ /L	-	-	0.18

*media dei risultati ottenuta con 4 diversi analizzatori

delle più accreditate è quella di Gowans e coll.(11) del 1988. Si tratta del modello basato sulla esportabilità degli intervalli di riferimento. Questo modello studia l'influenza del bias e dell'imprecisione (separatamente o congiuntamente) nel collocare erroneamente fuori degli intervalli di riferimento una certa quota di popolazione che ne sarebbe stata inclusa in assenza di errori. Gli obiettivi analitici che ne derivano sono:

- CVa (in assenza di bias) $\leq 0.58 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$,
- Bias (in assenza di imprecisione) $\leq 0.25 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$.

In questo modo il 4.6% della popolazione verrebbe a cadere fuori di ciascun limite dell'intervallo (contro il 2.5% nel caso che imprecisione e bias fossero entrambe nulle). Anche questo modello presenta vantaggi e svantaggi. Tra i primi:

- la relativa semplicità di applicazione
- comprende sia l'imprecisione che il bias
- gli obiettivi sono correlati agli intervalli di riferimento che sono disponibili per quasi tutti gli analiti e che, a parità di altre condizioni, sono simili in aree geografiche diverse.

Gli svantaggi principali consistono:

- nella teoria piuttosto elaborata
- nella necessità di usare curve o nomogrammi per valutare gli effetti combinati dell'imprecisione e del bias.

Proposte recenti basate sulla variabilità biologica

Nel 1995 alcuni esperti riuniti nell'External Quality Assessment (EQA) Working Group on Analytical Goals in Laboratory Medicine(12) rividero gli studi precedenti e proposero le seguenti raccomandazioni circa gli obiettivi analitici da utilizzarsi limitatamente alle seguenti situazioni cliniche:

- per indagini seriali $CVa \leq 0.5 CVi$ (in assenza di bias), $Bias \leq 0.33 CVi$ (in assenza di imprecisione),
- per indagini diagnostiche $CVa \leq 0.58 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$ (in assenza di bias), $Bias \leq 0.25 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$ (in assenza di imprecisione).

Per il calcolo delle varie combinazioni tra i due tipi di errore, il gruppo di lavoro ha proposto l'uso di apposite curve.

Nel 1997 lo stesso gruppo di autori(13) propose tre diversi livelli per l'imprecisione analitica ($CVa \leq x CVi$, dove x assume valori di 0.25 per il cosiddetto "livello ottimale", 0.50 per il livello "desiderabile" e 0.75 per il livello "minimo". La stessa cosa è stata proposta per il bias [$Bias \leq y (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$], dove y assume valori crescenti da 0.125 a 0.250 a 0.375. La giustificazione dei tre livelli è connessa da una parte all'esigenza di un miglioramento continuo delle prestazioni e quindi alla ricerca tendenziale del livello "ottimale" e dall'altra alla realtà delle tecnologie correnti che non sempre consentono di raggiungere l'obiettivo più stringente.

Intervalli di riferimento ed indice di individualità

Harris nel 1974(14) introdusse l'indice di individualità definendolo come il rapporto tra l'insieme della variabilità biologica intraindividuale e di quella analitica e quella interindividuale: $(CVi^2 + CVa^2)^{1/2}/CVg$. Attualmente si ricorre spesso alla semplificazione CVi/CVg ipotizzando un basso apporto della variabilità analitica. Questo indice è stato utilizzato per valutare l'utilità clinica degli intervalli di riferimento che risulterebbe limitata quando l'indice di individualità è basso. In questo caso infatti la variazione di un analita in un soggetto malato deve superare di molte volte la variabilità intraindividuale per poter uscire dai limiti dell'intervallo di riferimento. Harris ha dimostrato che quando l'indice di individualità è superiore a 1.4 gli intervalli di riferimento sono utili, mentre perdono di utilità quando è inferiore a 0.6. La tabella III riporta gli indici di individualità ricavati dalle pubblicazioni disponibili e dallo studio GdSE - SIMeL e mostra che, nonostante le diverse aree geografiche e le diverse epoche degli studi, i risultati sono sostanzialmente simili e indicano, con la sola eccezione dei neutrofili e un valore al limite per i leucociti totali, che gli intervalli di riferimento in ematologia sono di modesta utilità. In altri termini ciascun soggetto, a seguito di un evento patologico,

potrebbe raggiungere per quasi tutti i parametri dei livelli per lui molto insoliti ma ancora compresi entro l'intervallo di riferimento.

Le analisi seriali ed il calcolo della differenza critica

La differenza critica viene definita come la variazione necessaria affinché i risultati di indagini seriali condotte su un determinato soggetto siano significativamente diversi l'uno dall'altro(3). Questo dipende dalla variabilità analitica e da quella biologica intraindividuale, oltre che dal livello di probabilità prescelto. Per un livello di probabilità di 0.05, assumendo che le misure in serie siano indipendenti e che l'errore di misura abbia una distribuzione normale, la differenza che consente di rigettare l'ipotesi che nessun cambiamento sia avvenuto è pari a: $\Delta \geq 1.96\sqrt{2} (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$, il che equivale: $\Delta \geq 2.77 (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$.

Da questa formula si comprende come sia opportuno mantenere bassa la variabilità analitica rispetto a quella biologica al fine di contenere il più possibile la differenza critica.

Poiché la variabilità biologica intraindividuale può variare in modo consistente da un soggetto all'altro (vedi figura 1 per i leucociti), il valore utilizzato nella formula dovrebbe idealmente essere personalizzato.

Un modo per valutare se la variabilità intraindividuale mostra eterogeneità consiste nel calcolo dell' "indice di eterogeneità"(15). Quando questo indice approssima al valore teorico di 1 si può concludere che non è presente una eterogeneità significativa e quindi per il calcolo della differenza critica si può utilizzare la mediana dei valori della variabilità intraindividuale. Una possibile ulteriore utilizzazione della differenza critica consiste nel calcolare degli obiettivi analitici specifici per una determinata condizione clinica, a partire dalla differenza ritenuta clinicamente significativa. Una volta fissata questa differenza Δ (ottenuta ad es. con questionari rivolti ai clinici) e deciso il livello di probabilità (0.05), è possibile calcolare il CVa, che deve risultare $\leq (D^2/2.77^2 - CV_i^2)^{1/2}$.

Bibliografia

1. Statland BE, Winkel P, Harris SC, Burdsall MJ, Saunders AM. Evaluation of biologic sources of variation of leukocyte counts and other hematologic quantities using very precise automated analyzer. *Am J Clin Pathol* 1977; 69:48-54.
2. Winkel P, Statland BE, Saunders AM, Osborn H, Kupperman H. Within-day physiologic variation of leukocyte types in healthy subjects as assayed by two automated leukocyte differential analyzers. *Am J Clin Pathol* 1981; 75:693-700.
3. 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.
4. 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.
5. Dot D, Mirò J, Fuentes-Arderiu X. Within-subject biological variation of hematological quantities and analytical goals. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 825-6.
6. Groner W, Simson E. Practical guide to modern hematology analyzers. Chichester, John Wiley&Sons, 1995.
7. Richardson Jones A, Twedt D, Swaim W, Gottfried E. Diurnal change of blood count analytes in normal subjects. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 723-7.
8. Cotlove E, Harris EK, Williams GZ. Components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. III. Physiological and medical implications. *Clin Chem* 1970; 16: 1028-32.
9. Elevitch R. Ed. College of American Pathologists conference Report. Conference on analytical goals in clinical chemistry at Aspen, Colorado. Skokie, IL: CAP, 1976.
10. Proceedings of subcommittee on analytical goals in clinical chemistry, WASP, Ciba foundation; 1978. Analytical goals in clinical chemistry; their relationship to medical care. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 624-30.
11. Gowans EMS, Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, Hørder M. Analytical goals for acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 757-64.
12. Stockl D, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Libeer JC, Hyltoft Petersen P, Ricos C. Desirable routine analytical goals for quantities assayed in serum. Discussion paper from the members of the external quality assessment (EQA) working group A on analytical goals in laboratory medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 157-69.
13. 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.
14. Harris EK. Some theory of reference values. II. Comparison of some statistical models of intraindividual variation in blood constituents. *Clin Chem* 1976; 22: 1343-50.
15. Harris EK, Brown SS. Temporal changes in the concentrations of serum constituents in healthy men. Distributions of within-person variances and their relevance to the interpretation of differences between successive measurements. *Ann Clin Biochem* 1979; 16: 169-76.