

## Misura automatizzata della VES: metodi a confronto

Caro Direttore,

la speranza di un "risveglio della Bella addormentata nel bosco" (il dosaggio della VES), che avevamo profetizzato rispondendo alle critiche iniziali al nostro lavoro su un nuovo metodo automatizzato per la determinazione di questo parametro (1), si è avverata.

Vediamo e salutiamo con piacere lavori sull'importanza dei materiali di controllo (2) di una determinazione che finora era esente da pratiche di controllo interno ed esterno di qualità, e nuovi lavori sul confronto fra metodi (3).

In questa sede, a commento dell'ultimo lavoro già citato di Fiorucci e collaboratori, desideriamo ribadire alcuni elementi fondamentali che dovrebbero, comunque, guidare il dibattito, sempre positivo, e non portare fuori strada.

a) L'automazione della determinazione della VES rappresenta un'esigenza ineludibile a fronte dell'aumento del carico di lavoro, anche in funzione di progetti di consolidamento e accorpamento dei laboratori, dei crescenti problemi che riguardano la sicurezza e la prevenzione del rischio biologico nel personale dei laboratori clinici e dell'importanza della tempestività di risposta. Ma c'è di più: il metodo di Westergren rappresenta il metodo di riferimento, ma come tutti i metodi di riferimento e non "definitivi", presenta limiti ben conosciuti e rilevabili. Sono limiti intrinseci la soggettività della misura, unica e ad un solo punto di un parametro definito "velocità" e quindi caratterizzato sicuramente da cinetiche diverse a seconda della presenza o meno di una patologia infiammatoria ed a seconda delle patologie stesse.

Tanto è vero che il mitico indice di Katz, ossia l'indice che teneva conto anche della velocità di eritrosedimentazione nella seconda ora, è stato abolito per l'evidenza di una deviazione significativa dalla linearità delle cinetiche di campioni provenienti da pazienti con reazione infiammatoria importante e perciò con VES molto elevata. Anche nella prima ora si osservano importanti deviazioni dalla linearità dei campioni con VES elevata, e certamente la lettura a punti multipli si presta meglio a determinare la "velocità" di eritrosedimentazione, anche segnalando le cinetiche anomale (e questo è un sicuro vantaggio offerto dal Test 1).

b) Secondo tutti gli Organismi internazionali di standardizzazione, il campione di riferimento è rappresentato dal sangue raccolto in EDTA (4,5). Il campione suggerito nel "metodo di lavoro" è, invece, il campione in citrato perché non vi erano, finora, metodi affidabili per la determinazione della VES in campioni raccolti in EDTA. Anzi, dal punto di vista fisiopatologico, sarebbe "di riferimento" il campione senza alcun anticoagulante, campione che il MicroTest 1, di recente proposizione, è in grado di analizzare.

I vantaggi del campione anticoagulato in EDTA sono di tipo concettuale e pratico: concettualmente, la riduzione dell'effetto di diluizione, dell'interferenza nelle cinetiche di reazione e dei problemi di conservazione del campione sono elementi degni di considerazione; dal punto di vista pratico, l'abolizione di una provetta "dedicata" con semplificazione del flusso operativo, riduzione dei costi e, almeno nella nostra realtà, riduzione dei campioni oggetto di rigetto pre-analitico per presenza di microcoaguli ed inaccuratezza del volume finale (sopra o sotto il menisco della provetta) non solo ha semplificato, ma ha migliorato l'efficacia dell'esame. Inoltre, la scomparsa della provetta "dedicata" e la possibilità di eseguire la VES sulla provetta "ematologica" permette di rivedere i flussi operativi, configurando una stazione di lavoro ematologica che opera su un'unica provetta contribuendo, nel contempo, al risparmio di sangue prelevato al Paziente.

c) Quando si valutano e si confrontano metodi diversi è bene porre in condizioni di "pari opportunità" i diversi metodi oggetto della valutazione stessa. Nel lavoro di Fiorucci e Colleghi, desidero segnalare molti problemi che i revisori, evidentemente, non hanno

ritenuto di mettere in evidenza, ma che ci sembrano importanti per una corretta interpretazione dei risultati.

Primo, non vi è evidenza di studi sulla precisione dei diversi metodi, che sono importanti non solo per documentare una delle caratteristiche essenziali di tutti i metodi di laboratorio, ma anche per sottolineare i vantaggi delle tecniche automatizzate rispetto ad una metodica a lettura soggettiva. Secondo, la correlazione si basa su un metodo di Westergren con campioni raccolti in citrato, e non vi è alcun accenno alla problematica del campione anticoagulato in EDTA. Questo è invece un elemento cruciale sia a livello concettuale che pratico, come sottolineato in precedenza. Terzo, non viene riportata la correlazione fra i due metodi automatici che potrebbe indicare una correlazione più stretta fra questi piuttosto che fra questi ed il Westergren.

Quarto, ed ancor più grave, vengono assunti gli stessi limiti di riferimento per il normale per tutti i metodi in spregio alle evidenze di bias segnalate dagli Autori stessi. Arrivare alla conclusione di un supposto "falso negativo o falso positivo" con questa metodologia, significa alterare profondamente i risultati. Quinto, non vi è evidenza di valutazioni su variabili, quali l'ematocrito, che potrebbero spiegare alcune differenze fra metodi.

d) Desideriamo ritornare sul problema dei valori di riferimento per il normale. Certamente il Test 1, soprattutto per il fatto di lavorare su un campione non diluito, determina la necessità di rivedere questi valori, con le ovvie implicazioni pratiche che ne derivano. Dai nostri dati, comunque, emerge che anche l'adozione nella routine clinica del Ves-Matic comporta l'esigenza di "ritoccare" i valori descritti nella letteratura per il Westergren ed anche nel lavoro di Fiorucci vi è evidenza di un bias non trascurabile (slope=1,09) del Ves-Matic rispetto al metodo di riferimento.

e) La definizione di "accettabilità" della correlazione fra metodi non può essere affidata al giudizio del singolo. Nel nostro caso, il giudizio di accettabilità si è basato sui criteri dell'NCCLS, cioè sullo stato-dell'arte e solo in base a questo criterio si è giudicata la correlazione fra metodi. I commenti su questi criteri di accettabilità sono non solo leciti, ma anche auspicabili purché diretti verso chi li ha responsabilmente proposti e non verso chi li ha adottati nel corso di una valutazione metodologica.

f) Un ultimo commento sul problema dei materiali di controllo. Uno dei principali requisiti di questi materiali è la commutabilità con i campioni dei pazienti ed è questo il problema che per molto tempo ha reso difficile la messa in pratica del controllo e dell'assicurazione di qualità della VES. I materiali attualmente oggetto di valutazione e sperimentazione sono sicuramente utili e validi con alcune tecniche di determinazione, ma non sono assolutamente sovrapponibili per caratteristiche reologiche e di matrice ai materiali umani.

Non resta, per il momento, che adottare l'unica raccomandazione proveniente da organismi internazionali e che si basa sulla valutazione del mantenimento nel tempo del rapporto fra metodo in uso/metodo di riferimento, anche se i singoli laboratori possono, sulla base della tecnica in uso utilizzare altri protocolli di controllo di qualità purché nelle procedure operative si indichino i limiti intrinseci e si trovino modalità per verificare, a scadenze prefissate, la comparabilità con il metodo di riferimento su campioni di sangue "freschi".

g) Vediamo con soddisfazione apparire lavori di conferma del nostro punto di vista, anche su giornali accreditati come *Clinical Chemistry* (6) e ciò ci conforta perché il nostro lavoro non solo ha fatto conoscere un ulteriore metodo automatico per l'esecuzione di uno dei più diffusi e vecchi esami di laboratorio con semplificazione e miglioramento della gestione della routine clinica, ma ci ha portato a riflettere ed approfondire aspetti ancora oscuri dell'esame stesso.

1. Plebani M, De Toni S, Sanzari M,C, Bernardi D, Stockreiter E. The TEST 1 automated system. A new method for measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Am J Clin Pathol* 1999; 110: 334-340.
2. Luraschi P, Morelli AM, Brambilla S, Franzini C. Valutazione di un nuovo materiale per il controllo di qualità della velocità di eritrosedimentazione. *Bioch Clin* 1999; 23: 398-403.
3. Fiorucci GC, Camogliano L, Massacane R. Confronto di due sistemi automatici per la misura della velocità di eritrosedimentazione: Ves-Matic e Test 1. *Bioch Clin* 2000; 24: 175-9.

4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Test: approved standard. 3rd ed. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1993. NCCLS document H2-A3.
5. International Council for Standardization in Haematology. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. *J Clin Pathol* 1993;103:257-274.
6. de Jonge N, Sewkaransing I, Slinger J, Rijdsdijk JJM. Erythrocyte sedimentation rate by the Test-1 analyzer. *Clin Chem* 2000; 46: 881-2.

Mario Plebani - Elisa Piva  
Servizio di Medicina di Laboratorio  
Azienda Ospedaliera di Padova  
Via Giustiniani, 1  
35128 Padova  
Phone: 0039 049 821 2792  
Fax: 0039 049 663240  
e-mail: pad08821@pd.nettuno.it

### Gli Autori rispondono

Mi fa piacere che il nostro breve articolo abbia destato interesse, tanto da indurre i Colleghi Plebani e Piva a scrivere la lettera qui pubblicata.

Prima di entrare nel merito delle singole specifiche considerazioni, ne vorremmo fare alcune di carattere generale. Credo che le basi di partenza siano sostanzialmente due. La prima è che la velocità di eritrosedimentazione (VES) è una misura del tutto empirica di una grandezza (proprietà misurabile) di un sistema (sangue), nella cui definizione (anch'essa appunto "empirica", cioè legata al dispositivo sperimentale) deve includere il sistema di osservazione (o sperimentale) adottato perché la proprietà medesima si manifesti rendendosi di conseguenza misurabile. Non per ricalcare il pragmatismo empirico cui gli Americani fanno frequentemente ricorso nella loro visione della standardizzazione clinica della misura (vedi per esempio colesterolo oppure HbA<sub>1c</sub>), ma, e questa è la seconda considerazione, non si può assolutamente prescindere dal rammentare che l'enorme corpo di evidenza riguardante il significato clinico della VES è stato ottenuto con il metodo di Westergren. Se si vuole conservare il significato clinico della misura si deve quindi usare il metodo di Westergren, oppure metodi alternativi che, pur in condizioni sperimentali differenti (tempo, lunghezza e diametro del capillare, eccetera), misurino la stessa proprietà (caduta libera degli eritrociti in un campione di sangue diluito), e che si siano dimostrati capaci di fornire, su un gruppo-campione statisticamente e clinicamente significativo di campioni di sangue, risultati bene correlati al metodo di Westergren.

Per quanto concerne le puntuali osservazioni specifiche del gentile Collega Plebani, vorremmo sottoporre all'attenzione dei lettori i seguenti commenti.

a. - Che la misura della VES non sia una misura di velocità ma una misura di lunghezza (osservata in una serie di condizioni sperimentali fisse, incluso il tempo di caduta) è stato fatto rimarcare dalla IFCC alcuni anni fa, ed è (pensiamo) accettato da tutti. Tale accettazione è esplicitamente ammessa dall'uso di una unità SI di lunghezza (millimetri) e non di velocità, come è mm/h o meglio l'unità derivata non coerente SI "micrometri al secondo" (mm/s). Per motivi di praticità e di "suono" si è conservato "VES" (in inglese "ESR") per la denominazione "familiare" dell'esame, come peraltro si è conservato (o fatica a scomparire), per esempio, "azotemia", "BUN", e fortunatamente poche altre denominazioni. IFCC suggerisce in realtà di eliminare il termine *velocità* dalla denominazione dell'esame, ma i termini suggeriti "suonano male". Misurare la "vera" velocità trovando il modo di esprimerla in una maniera che, pur sintetica, tenesse conto delle sue variazioni nel tempo (derivata prima?) potrebbe essere un progresso, tuttavia devono

essere chiari due punti: 1) si misurerebbe in tal caso una proprietà differente dalla lunghezza, e quindi la sua trasformazione in un'altra grandezza (lunghezza di caduta) non è autorizzabile, qualsivoglia il grado di correlazione tra le due misure; 2) come già accennato, sarebbe necessario in ogni caso rivedere approfonditamente il comportamento di tale nuova grandezza nelle differenti patologie.

b. - Purtroppo, anche se non lo si dovrebbe dire, alcuni degli interventi di Organismi di Standardizzazione non sono stati tra i più felici in relazione alla VES, generando una confusione di cui sembra essere illustre vittima anche Plebani, che pure è notoriamente attento a questi problemi, quando nella sua lettera afferma al punto a) che "... il metodo di Westergren (nota: che notoriamente utilizza un campione diluito) rappresenta il metodo di riferimento ... " e nel punto b) sottolinea che "... il campione di riferimento è rappresentato dal sangue raccolto in EDTA ...". Non saremmo del tutto sicuri che la distinzione dei metodi in "ICSH reference method", "ICSH standardized method" e "ICSH selected method" (J Clin Pathol 1993;46:198-203), di cui i primi due comprendono una contaminazione tra pipetta Westergren e campione non-Westergren, sia destinata ad allontanare qualsiasi ambiguità. Non appare inoltre completamente condivisibile (anche se accettabile in base al principio dell'Autorità) la scelta di un sistema "di riferimento" che è più soggetto alla nota interferenza di un fattore esterno caratterizzato da variabilità non infrequente (valore dell'ematocrito) di quanto non lo siano sistemi analitici includenti la diluizione. Anche la scelta di un metodo di riferimento che comporta l'aggiustamento preliminare del valore ematocrito del campione (NCCLS, 1993) desta qualche perplessità.

Di conseguenza, la scelta di confrontare i metodi automatici con il metodo di Westergren, sul quale è basata la esperienza clinica della misura empirica, appare basata sulla logica anche se contravvenente, entro certi limiti, il principio dell'Autorità. Del possibile effetto "diluizione" nel condizionare le differenze osservate si è tenuto conto applicando i limiti non-lineari (in realtà, descritti da equazioni polinomiali di secondo grado) riportati da ICSH.

c. - Anche il problema di corretti intervalli di riferimento deve essere considerato attentamente per i differenti metodi, e con particolare attenzione nel caso di misure "empiriche", che generano, per definizione, risultati metodo-dipendenti. Tuttavia stare sopra i 20 mm significa stare "on the safe side". Nonostante le molte e puntuali osservazioni critiche di Plebani e Piva crediamo che (vedi figure V e VI) difficilmente si possa negare la nostra conclusione che **due metodi studiati forniscono risultati in differente misura corrispondenti a quelli del metodo di Westergren**. Non abbiamo riportato ulteriori dati di confronto statistico (confronto "diretto" dei due metodi automatici), che pure abbiamo eseguito, perché nella aggiungeva o toglieva alle considerazioni conclusive. Lo stesso dicasi per la imprecisione analitica dei metodi, per i quali erano disponibili solo valori di precisione entro-la-serie (ripetibilità), di scarso rilievo nei confronti di misure eseguite per necessità in giorni differenti.

Nonostante lo si osservi di frequente anche nella letteratura internazionale recensita, non crediamo che i risultati di un disegno sperimentale non ottimale (come il presente, necessariamente basato su misure empiriche) siano sostanzialmente modificabili mediante l'utilizzo di statistiche approfondite o "stirate" a sostenere una piuttosto che un'altra ipotesi (*comment corriger la fortune*).

d. - Anche il punto che Plebani e Piva sollevano in relazione alla commutabilità dei materiali di controllo è puntuale ed interessante. La non-commutabilità dei materiali in coppie definite di metodi è assai più frequente di quanto normalmente si pensi, anche per analiti "insospettabili". Le conseguenze del fenomeno devono essere considerate con attenzione: possono essere differenti nei diversi contesti di utilizzo del materiale incriminato, e si possono adottare soluzioni per minimizzarle.

Per quanto concerne i programmi cooperativi di valutazione esterna della qualità, nei quali il medesimo materiale viene analizzato con metodi differenti, la variabilità interlaboratori osservata per il materiale non-commutabile può risultare sostanzialmente differente (in genere più elevata) di quella riscontrata o riscontrabile per la misura delle medesime grandezze in campioni da paziente: l'informazione fornita pertanto non è corretta. In più, qualche partecipante disattento può essere tentato di modulare la risposta dei propri

sistemi analitici per ottenere risultati apparentemente migliori per il campioni di controllo, peggiorando purtroppo contemporaneamente la qualità dei risultati per i campioni da paziente. In questi casi è necessario sapere che il materiale non è commutabile ed elaborare i risultati per gruppi omogenei di metodi ovvero, il che è equivalente, usare come valori attesi valori metodo-specifici. Questo ultimo approccio è spesso criticato dal punto di vista della correttezza analitica, tuttavia si deve tenere considerare attentamente quanto segue. Esistono protocolli basati su considerazioni matematico-statistico, oltre che analitiche, assolutamente corrette per assegnare ai materiali valori metodo-dipendenti in maniera tale che se nell'analisi con un metodo specificato si approssima in maniera statisticamente accettabile il valore assegnato metodo-specifico si ha la garanzia che il metodo fornisce nell'analisi dei campioni da paziente valori accettabilmente (ossia con probabilità statistica predefinita) corrispondenti a quelli che fornirebbe il metodo di riferimento precedentemente selezionato ed utilizzato nel protocollo. Lo so che questo approccio è criticato dai puri, ma tuttavia, con buona pace dei puri, funziona.

Molti lettori sapranno che questo tipo di approccio è proficuamente e in maniera del tutto trasparente usato da industrie importanti non solo per il controllo di qualità ma anche per la taratura (o calibrazione) dei propri sistemi. In tal modo viene garantita la riferibilità dei valori ottenuti nell'analisi dei campioni da paziente ai valori ottenibili con metodi di riferimento specificati.

Per quanto concerne invece la pratica del controllo di qualità interno, se questo è utilizzato correttamente, ossia per stabilire la stabilità nel tempo delle caratteristiche di attendibilità analitica del sistema analitico, la eventuale non-commutabilità del materiale ha scarso o nullo rilievo. La disponibilità di un materiale la cui caratteristica fondamentale è rappresentata dalla sua stabilità acquista pertanto un valore di primo piano.

A questo punto abbiamo scritto a più mani (quelle di Plebani e Piva e, più modestamente, le nostre) quasi un intero trattato di Biochimica Clinica teorica, e quindi ci compiacciamo nuovamente per l'iniziativa dei Colleghi di Padova, che ha dato inizio a questa discussione che speriamo possa essere di qualche interesse.

e. - I Colleghi Plebani e Piva ci consentiranno una ultima osservazione di carattere assolutamente formale.

L'analisi biochimica clinica è, come tutte le altre analisi, la stima mediante misura di una grandezza (definita come proprietà misurabile) di un "sistema" (per esempio di un campione di materiale biologico). Orbene, le grandezze vengono "*misurate*", non "*dosate*". Se prima ci siamo schierati contro l'Autorità, adesso mc schieriamo contro la Democrazia ("ma per chi vota?", si chiederanno i lettori). E' vero che i termini "*dosare*", "*dosaggio*", eccetera sono frequentemente usati dai più nella letteratura e nel linguaggio colloquiale, ma è pur vero che i più commettono un errore linguistico, o quanto meno una inappropriatezza. Tanto più se si considerano alcune costruzioni orribili ma non infrequenti come "*dosare un dosato*", per intendere la misura di una proprietà del siero. Mi sembra che i termini derivati da "*dose*" siano assai più propriamente utilizzabili in riferimento a qualcosa (un farmaco, per esempio) che si somministra ad un paziente, del quale la quantità (volume, massa, altro) rappresenta appunto la dose.

L'improprietà del termine dosaggio salta brutalmente all'occhio in riferimento alla VES. Credo che nessuno tenterebbe di "*dosare*" una lunghezza od una velocità, neanche le famigerate Ferrovie dello Stato. Dobbiamo farlo noi? Oppure vogliamo abitarci a "*misurare*", od almeno a "*determinare*" la VES e le altre grandezze che ci competono?

Giancarlo Fiorucci  
Luisa Camogliano  
Roberto Massacane