

Serie di Ematologia di Laboratorio - a cura del GdS-E SIMeL

## Perchè una storia dell'Ematologia di Laboratorio

P. Cappelletti

Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio  
Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli di Pordenone

### Summary

#### Why a history of Laboratory Hematology

The blood has always fascinated mankind, and its history is “a story of discovery, of people, and of ideas” according to MM Wintrobe. After the early beginnings, where the observation of clotting and clot retraction might have induced the birth of the doctrine of the four humors, the introduction of quantitation was the milestone of the history of Hematology. Since its slow dawn, taking about two centuries, Hematology knew the morphologic era after the introduction of Ehrlich's staining procedure for blood cells; the physiologic revolution depending on Whipple and Minot demonstration of the connection between liver and its contents, and pernicious anemia; and the technological revolution of the explosion of instrumentation after the World War II.

In the present technological era of hematology, the history of Laboratory Hematology might be divided in several steps, according to the vision of SIMeL Hematology Study Group (GdS-E): the milestones are, without doubt, the invention and application of impedance principle for blood particles counting and measuring (1949-1956), and successively the automatic cytochemical cellular recognition in the 70s. During the 80s the progress of technology followed two ways: solu-

tion of the problems connected to the “shape factor”, and the combination of multiple technologies in one instrument for a better clinical performance. In the 90s, the main goal was the identification of “difficult” cell populations: reticulocytes, erythroblasts, platelets, immature granulocytes, and apoptotic cells. Now, a progressive technological syncretism and the integration, by the capabilities of the information technology, of a large variety of information are the tools for the clinical, both diagnostic and therapeutic, scope of Laboratory Hematology

Today, in a time of dramatic structural, organizational, and professional changing, it is essential for the laboratory hematologists a profound reflection about the historical and technological bases of the discipline. The outstanding contributions, full of original data, technological explanations and perspectives, of Mauro Buttarello, in this issue of the IJLaM - *Hematology flow analyzers: history of a continuously evolving technology. Part I: the impedance method* - and in the next issue - *Part II: the optical method* - show the story of the hematological technology as a model of scientific research evolution and offer to the laboratory hematologists the opportunity of appreciating their privileged role among basic and applied scientific research, routine technological applications, and clinical outcomes.

Il sangue ha sempre affascinato il genere umano e la storia dello studio del sangue si interseca con la storia stessa dell'umanità, come Maxwell Wintrobe esplicita nel titolo del suo libro *Blood, Pure and Eloquent: a story of discovery, of people, and of ideas*<sup>1</sup>.

Secondo l'interpretazione di Robin Fahraeus<sup>2</sup>, il medico svedese “scopritore” della sedimentazione del sangue, l'osservazione dei fenomeni di formazione e retrazione del coagulo avrebbero originato l'antica teoria degli umori. Durante questo processo, infatti, il sangue fluido si separa in quattro componenti: al fon-

do il coagulo rosso scuro, quasi nero (la bile nera degli Antichi), sopra un sottile strato di liquido chiaro contenente eritrociti intatti ed emoglobina (il sangue propriamente detto), ancora sopra uno strato grigio o biancastro di fibrina e leucociti, particolarmente abbondante nelle malattie acute (flegma, poi crusta phlogistica) ed infine il siero (la bile gialla). L'idea che la dissoluzione dell'armonica combinazione degli umori (discrasia) fosse la base della malattia e che il salasso potesse favorire il ritorno alla eucrasia dominò, nella versione galeniana, tutta l'età antica e di mezzo.

Il passaggio alla modernità, l'alba dell'ematologia è posta nel momento in cui si inventa il microscopio e si passa dalla descrizione qualitativa del sangue alla sua misura quantitativa. Polis e Paterakis<sup>3</sup> descrivono dettagliatamente la lunga fase (circa due secoli) che passa dalle prime disponibilità tecnologiche del microscopio nel 1642 per opera di Leeuwenhook all'affermarsi della mentalità quantitativa alla metà dell'ottocento. Maxwell M Wintrobe<sup>1</sup> delinea i momenti storici salienti dello studio del sangue: nel 1877 Paul Ehrlich introduce i coloranti di anilina per il riconoscimento delle cellule sanguigne dando inizio all'era morfologica dell'ematologia; nel 1926 con gli studi di Whipple e Minot sulla anemia perniziosa si apre la fase fisiologica dell'ematologia; nel secondo dopoguerra e in particolare dagli anni 60 in poi esplose la rivoluzione tecnologica che dura tuttora.

Secondo W. Groner e E. Simson<sup>4</sup>, la storia della tecnologia ematologica si sviluppa in quattro fasi che nella loro periodizzazione si intersecano con la temporizzazione di Wintrobe: la scoperta (1642-1881) che parte dalla invenzione del microscopio e comprende i decisivi passi ottocenteschi dei primi conteggi di cellule sanguigne e dell'introduzione dei coloranti di anilina; la applicazione (1881-1950) che comprende gli effetti della quantificazione cellulare in rapporto a fenomeni clinici (individuazione e significato dei neutrofilii non segmentati, classificazione delle anemie secondo gli indici di Wintrobe, comprensione della funzione delle piastrine, classificazione morfologica delle leucemie); il consolidamento (1951-1965) caratterizzato dalla automazione delle conte complete degli elementi del sangue e quindi dalla messa a punto di strumenti veloci e a basso costo; la riscoperta (1965- oggi) che ristabilisce il fecondo rapporto tra gli aspetti analitici (specifici enzimi leucocitari, recettori di superficie, caratteristiche nucleari e cromosomiche) e la clinica.

Tuttavia, nella visione del GdS Ematologia di SIMeL, l'inizio dell'era tecnologica dell'ematologia si fa risalire alla prima automazione delle conte cellulari brevettata da Wallace Coulter nel 1949 e commercializzata nel 1956: la misura resistiva, in realtà, ha determinato la storia delle conte e del volume delle particelle del sangue e delle loro applicazioni cliniche. La possibilità di valutare i volumi delle cellule una per una e di costruire un istogramma dei volumi ha condotto alla determinazione dell'ampiezza di questa distribuzione, che rappresenta un indice naturale della eterogeneità dei globuli rossi (anisocitosi). Sulla base dei dati clinici di un aumentato RDW nelle alterazioni nutrizionali dell'eritrono, precipuamente nella carenza di ferro, e nelle aumentate distruzioni di RBC, e, d'altra parte, della normalità di RDW nelle anemie ipoproliferative, in particolare nelle anemie da malattia cronica, e nelle emoglobinopatie non complicate, Besman et al suggerirono nel 1983 una "migliore classificazione delle anemie sulla base di MCV e RDW".

La conta di cellule con metodo elettro-ottico si af-

fermò solo alla fine degli anni 60.

Il secondo atto della rivoluzione tecnologica in Ematologia fu il riconoscimento cellulare in automazione. In questo campo il sistema rivoluzionario fu la citochimica automatizzata, abbinata alla misura volumetrica. La possibilità di riconoscimento cellulare su numeri altissimi di cellule con elevata precisione e adeguata specificità rivoluzionò l'ematologia quotidiana con l'individuazione di corretti intervalli di riferimento, di minime variazioni significative di citotipi cellulari, di alterazioni funzionali fino ad allora sconosciute nella loro reale incidenza e significato fisiopatologico. L'utilizzo estensivo della citochimica automatizzata ha fornito importanti mezzi di sospetto diagnostico o addirittura di definizione diagnostica nel campo delle malattie neoplastiche del sangue consentendo l'affermarsi di una *Hematology beyond microscopy*.

Negli anni 80 il miglioramento tecnologico proseguì sostanzialmente lungo due vie: il superamento del "fattore forma" (il rapporto tra l'impulso elettrico prodotto da una particella ed il minimo impulso prodotto da una particella di egual volume e diversa forma, particolarmente importante nella misura dei globuli rossi), attuato con la focalizzazione idrodinamica o con la sfericizzazione isovolumetrica (quest'ultima scoperta consentì il riemergere dall'oblio degli indici di Wintrobe e in particolare il recupero di significato clinico alle variazioni ipo e iper della cromia) e la combinazione di diverse filosofie strumentali per una più rigorosa e dettagliata definizione delle caratteristiche cellulari.

Negli anni 90 il progresso dell'ematologia tecnologica si caratterizzò per i sempre più sofisticati metodi automatici di individuazione delle popolazioni cellulari analiticamente definite e per la capacità di riconoscimento specifico di popolazioni sanguigne rare o "difficili". La prima popolazione "difficile" individuata dagli analizzatori automatici fu quella dei reticolociti che aprì la strada da un lato a conte precise, particolarmente importanti nella valutazione delle fasi di recupero dell'attività midollare, e dall'altro allo studio delle frazioni reticolocitarie e dei parametri reticolocitari, oggi essenziali per la diagnosi dei disordini del metabolismo del ferro. Anche gli eritroblasti, prima solo sospettati da allarmi derivanti da algoritmi strumentali vennero poi direttamente individuati. Il conteggio delle piastrine ha una lunga storia fatta di luci (la precisione delle conte, le speranze nella accuratezza e nel significato clinico della loro valutazione dimensionale) e di ombre (i problemi legati alla definizione di una adeguata "finestra" di conta analitica, la delusione degli indici piastrinici). Alle misure integrate di parametri diversi, dipendenti dagli angoli di misura adottati, o di metodi diversi, resistivo e ottico, si aggiunse la possibilità di una accurata e precisa conta piastrinica per riconoscimento citofluorimetrico dell'antigene di superficie specifico CD61. Il progredire del riconoscimento specifico della immaturità cellulare e la identificazione delle funzionalità cellulari rappresentano le più recenti scoperte.

Nel nuovo millennio, il progressivo consolidamento di metodi e principi strumentali diversi in un unico apparecchio rappresenta la continuazione di un percorso iniziato con i primi strumenti multiparametrici, passato attraverso il sincretismo analitico per il riconoscimento cellulare e approdato alla contemporanea determinazione di caratteristiche ottiche, resistive, citofluorimetriche, prima e dopo lisi selettive o altre separazioni cellulari, al fine di conte, misure dimensionali, rivelazione di caratteristiche di superficie, citoplasmatiche o nucleari, integrate poi con raffinati *gating* informatici in informazioni analiticamente affidabili e clinicamente suggestive. Proprio la valutazione integrata delle informazioni analitiche e il diffuso utilizzo di algoritmi informatizzati consentono il proliferare di informazioni aggiuntive che individuano discrepanze nei riconoscimenti cellulari secondo i pattern interiorizzati o che segnalano caratteristiche cellulari al fine di estendere la formula leucocitaria automatizzata e di offrire spunti nuovi di interesse clinico<sup>5</sup>.

Oggi Mauro Buttarello ci offre nei lavori *Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione. Parte I: il metodo ad impedenza*<sup>6</sup> e *Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione. Parte II: il metodo ottico*<sup>7</sup> una preziosa testimonianza dell'evoluzione storica degli analizzatori ematologici, ricca di dati di prima mano e di riflessioni tecniche e di prospettiva, da parte di chi ha vissuto in prima persona l'esaltante maturare della tecnologia ematologica negli ultimi decenni e ne ha contribuito alla comprensione e alla diffusione. Gli scritti sono il risultato di un pesante lavoro di revisione documentale: per la sola *Parte I* sono stati esaminati circa 100 brevetti, caratterizzati da un complicato linguaggio formale, e oltre 150 fra lavori originali, rassegne, capitoli di testo.

Nel testo si enfatizzano le tappe fondamentali dell'evoluzione, accompagnandole con puntuali considerazioni tecniche. Nell'insieme emergono linee di riflessione importanti: da un lato, oltre all'apporto degli Autori dei vari brevetti (*inventors*), è impressionante la mole di contributi, anche teorici, della Scuola tedesca e del centro di Los Alamos, più conosciuto per il suo

ruolo predominante durante la Seconda Guerra Mondiale e la Guerra Fredda nella ricerca sulle applicazioni belliche dell'energia nucleare, nella definizione dei principi e delle tecniche oggi comunemente utilizzate. Dall'altro lato, il percorso tracciato da Buttarello mostra con evidenza il continuo maturare di esperienze e nuovi contributi nella storia dell'ematologia tecnologica, che fanno di questa un esempio di come operi nel concreto la ricerca scientifica. La riflessione storica e l'approfondimento scientifico delle basi sulle quali sono costruiti ancora oggi gli strumenti del lavoro quotidiano offrono agli ematologi di laboratorio l'occasione per apprezzare compiutamente la loro collocazione privilegiata tra ricerca, misure di routine e clinica e i compiti che mantengono, anche nelle riorganizzazioni strutturali, nei confronti della tecnologia: applicare al meglio gli strumenti per diagnosticare e monitorare i pazienti ematologici, validando sul campo i vantaggi strumentali teorici; approfondire i suggerimenti strumentali per tirarne fuori tutte le possibilità, con la scoperta anche di nuove indicazioni; segnalare limiti e problemi delle apparecchiature all'industria, per uno sviluppo sempre mirato alle necessità, non solo produttive ma cliniche, della tecnologia ematologica.

## Bibliografia

1. Wintrobe MM. Blood pure and eloquent: a story of discovery, of people, and of ideas. New York: McGraw-Hill;1980.
2. Fahraeus R. The suspension stability of the blood. *Physiol Rev* 1929;9:241-71.
3. Poulis S, Paterakis G. The dawn of blood. First seeing and then measuring. *Haema* 2005;8:360-80.
4. Groner W, Simons E. Practical guide to modern hematology analyzers. Hoboken, NJ: John Wiley & sons;1995.
5. Cappelletti P. L'Ematologia di Laboratorio. *RIMeL/IJLaM* 2005;4:247-58.
6. Buttarello M. Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione. Parte I: il metodo ad impedenza. *RIMeL/IJLaM* 2006;3:199-205.
7. Buttarello M. Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione. Parte II: il metodo ottico. *RIMeL/IJLaM* 2006;4 (in press).