

Teoria e pratica degli intervalli di riferimento riferibili

Ferruccio Ceriotti¹, Ilenia Infusino², Mauro Panteghini²

¹Diagnostica e Ricerca S. Raffaele, Istituto Scientifico Universitario S. Raffaele, Milano

²Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Theory and practice of traceable reference intervals. An issue associated with standardization efforts is the need to develop useful reference intervals. Lack of proper reference intervals may indeed hamper the implementation of standardization in Laboratory Medicine as standardization can modify analyte results and, without adequate reference intervals, this can impair the result interpretation. Once defined, reference intervals obtained with analytical procedures that produce results traceable to the corresponding reference system can be transferred among laboratories, providing that they use commercial assays that produce results traceable to the same reference system and populations have the same characteristics. Multicenter studies are needed for a robust definition of traceable reference intervals, using experimental protocols that include well defined prerequisites. Particularly, employed methods must produce results that are traceable to the reference system for that specific analyte. Thus, the trueness of laboratories producing reference values should be verified and, if necessary, experimental results corrected in accordance with correlation results with the selected reference. If requirements in the adoption of traceable reference intervals are fulfilled, the possibility of providing reference intervals that are applicable to any laboratory, able to produce results traceable to the reference system, is realistic. The definition of traceable reference intervals should hopefully cause the disappearance of different reference intervals employed for the same analyte, providing more effective information to clinicians.

INTRODUZIONE

La standardizzazione in Medicina di Laboratorio rappresenta una priorità per la salute pubblica, in quanto gli utenti del laboratorio, siano essi medici o pazienti, si aspettano dal laboratorio risultati accurati, confrontabili e interpretabili in modo affidabile e coerente (1, 2). La strategia raccomandata per ottenere risultati accurati e tra loro confrontabili passa attraverso l'implementazione della riferibilità metrologica dei risultati ottenuti sui campioni biologici a riferimenti (materiali e metodi) di ordine superiore mediante una gerarchia di calibrazione (3-5). Tuttavia, un risultato di laboratorio ha senso solo se interpretato in un contesto corretto (6). E' già stato detto in altre sedi che ottenere risultati accurati e poi confrontarli con intervalli di riferimento inadeguati può seriamente invalidarne l'utilità (7-9). Dal momento che l'implementazione della standardizzazione può modificare significativamente i risultati dell'analita, senza adeguati intervalli di riferimento e/o livelli decisionali tale situazione può compromettere l'interpretazione dei risultati e, paradossalmente, peggiorare il trattamento del paziente. Purtroppo, il singolo laboratorio non ha normalmente i mezzi

sufficienti per definire intervalli di riferimento adeguati e anche le ditte produttrici di diagnostici possono avere grandi difficoltà. Indagini conoscitive effettuate negli ultimi anni su entrambe le sponde dell'Atlantico hanno mostrato che gli intervalli di riferimento utilizzati sono spesso significativamente differenti tra i diversi laboratori, anche se, nella maggior parte dei casi, tali differenze non hanno evidenti giustificazioni (7, 10, 11). In particolare, la fonte degli intervalli di riferimento può essere molto diversa ed eterogenea, rappresentata di volta in volta da raccomandazioni del produttore, libri di testo e letteratura scientifica, studi interni su volontari sani, dati di altri laboratori, ecc. (10, 11). Per cercare di minimizzare queste differenze tra i laboratori, i risultati sono a volte espressi come multipli del limite superiore di riferimento (LSR). Questo approccio, spesso utilizzato in linee guida internazionali (12), è stato in passato accolto da alcuni autori come un modo che liberava il clinico da vincoli analitici di difficile comprensione ("physician liberation units") (13). Anche recentemente è stata proposta una versione più sofisticata di questo approccio, chiamata "quoziente di quantità" (14). Vari lavori hanno tuttavia dimostrato che l'espressione dei risultati come multipli di LSR paradossalmente aumenta

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano. Tel. 0226432282, Fax 02 26432640, E-mail ceriotti.ferruccio@hsr.it

Ricevuto: 08.03.2012

Revisionato: 09.03.2012

Accettato: 10.03.2012

la dispersione dei risultati invece di ridurla, perché alla variabilità intermetodi si sommano le differenze sopra citate fra gli intervalli di riferimento utilizzati nei vari laboratori per la normalizzazione (15). L'uso di questa modalità di espressione dei risultati è quindi da scoraggiare (16).

INTERVALLI DI RIFERIMENTO RIFERIBILI COME QUARTO PILASTRO DEL SISTEMA DI RIFERIMENTO DELLE MISURE

Il sistema di riferimento della misura rappresenta un approccio basato sull'esattezza, con il quale tutti i metodi commerciali in grado di produrre risultati riferibili ("traceable") a esso diventano in grado di fornire risultati tra loro confrontabili, entro un certo ambito di incertezza (17). In queste condizioni, se la popolazione servita dai laboratori ha caratteristiche simili (e questo, se si parla di ambiti territoriali limitati, è quasi sempre vero), i diversi laboratori non solo potrebbero, ma dovrebbero utilizzare gli stessi intervalli di riferimento (18). In definitiva, se sistemi analitici differenti forniscono risultati confrontabili, perché entrambi riferibili a un sistema di riferimento comune, non c'è ragione per cui non si possano/debba-no adottare gli stessi intervalli di riferimento (19). Infatti, quando il livello di standardizzazione è buono, solo differenze di popolazione giustificano intervalli di riferimento differenti.

Per potere applicare il concetto di intervallo di riferimento riferibile ci sono due aspetti fondamentali da rispettare: uno analitico e uno biologico. L'aspetto analitico riguarda la verifica e la correttezza dell'implementazione della riferibilità metrologica al sistema di riferimento; quello biologico riguarda le possibili differenze tra le popolazioni (dovute all'etnia, alla genetica o a fattori ambientali, piuttosto che a tradizioni o abitudini di vita). Quest'ultimo aspetto è particolarmente complesso e richiede la valutazione di un sufficiente numero di individui, comprendente possibilmente diverse popolazioni e gruppi etnici.

Come ottenere intervalli di riferimento riferibili

Ci sono sostanzialmente due modi per ottenere intervalli di riferimento riferibili: tramite verifica, in accordo con la teoria descritta in questo articolo, dei dati esistenti in letteratura, per decidere quali possano essere accettati e raccomandati (almeno per un determinato gruppo etnico), o tramite pianificazione di appropriati esperimenti per definire, tra gli intervalli di riferimento riferibili non disponibili, quelli più urgentemente necessari.

Un esempio di un approccio teorico per la validazione e l'approvazione di intervalli di riferimento riferibili già esistenti è rappresentato da uno studio pubblicato nel 2008, riguardante la determinazione degli intervalli di riferimento riferibili per le concentrazioni di creatinina sierica (20). In particolare, nel lavoro sono stati utilizzati i seguenti criteri di selezione degli studi da includere:

- a) selezione *a priori* degli individui di riferimento;
- b) descrizione chiara delle condizioni pre-analitiche;
- c) correttezza analitica e dimostrazione della riferibilità dei risultati prodotti al metodo di riferimento (nel caso specifico della misura della creatinemia rappresentato dalla spettrometria di massa con diluizione isotopica);
- d) adeguato trattamento statistico dei dati (selezione di un numero adeguato di soggetti e uso di metodi statistici non-parametrici, con partizione corretta degli individui nelle varie classi) (20).

Rispetto agli studi classici per la definizione degli intervalli di riferimento, il criterio che rappresenta la novità da enfatizzare è rappresentato dalla necessità di una dimostrazione incontrovertibile della correttezza analitica (cioè della riferibilità dei risultati) degli studi sperimentali selezionati. Usando questo approccio, gli autori sono stati in grado di raccomandare intervalli di riferimento riferibili, universalmente validi per adulti e bambini di origine caucasica (Tabella 1) (21).

I prerequisiti generali per l'organizzazione di studi (possibilmente multicentrici) per la definizione di intervalli di riferimento riferibili sono stati precedentemente descritti su questa rivista (8). Ci sono due possibili approcci: a) ogni centro partecipante, opportunamente standardizzato, analizza i propri campioni di riferimento freschi oppure b) i campioni di riferimento sono raccolti in diversi centri, congelati e spediti a un unico laboratorio dove vengono centralizzate tutte le misurazioni. Il primo approccio richiede una fase preliminare piuttosto complessa per la verifica della riferibilità delle misure, ma d'altro canto utilizza campioni nativi esattamente come nella pratica clinica; la seconda opzione è più semplice, permette un miglior controllo della fase analitica, ma utilizza campioni congelati, introducendo

Tabella 1

Limiti di riferimento riferibili per la concentrazione di creatinina plasmatica. Modificato da rif. 20

Età (sesso)	Percentile, mg/dL	
	2,5°	97,5°
Sangue del cordone	0,52	0,97
Neonati pretermine 0–21 giorni	0,32	0,98
Neonati a termine 0–14 giorni	0,31	0,92
2 mesi - <1 anno	0,16	0,39
1 anno - <3 anni	0,17	0,35
3 anni - <5 anni	0,26	0,42
5 anni - <7 anni	0,29	0,48
7 anni - <9 anni	0,34	0,55
9 anni - <11 anni	0,32	0,64
11 anni - <13 anni	0,42	0,71
13 anni - <15 anni	0,46	0,81
Adulti (maschi)	0,72	1,18
Adulti (femmine)	0,55	1,02

così una variabile non tipica dei laboratori di routine (8).

Uno studio pubblicato di recente ha utilizzato una combinazione di entrambi questi approcci per ricavare intervalli di riferimento riferibili per aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e γ -glutamilttransferasi (GGT) (22). Tre laboratori ospedalieri sono stati inizialmente coinvolti nella raccolta e nella misura dei campioni di riferimento. Campioni supplementari sono stati poi ottenuti congelati dalla banca biologica del "Nordic reference interval project" (NORIP) e da un ulteriore laboratorio; questi campioni sono stati poi analizzati in uno dei 3 laboratori che avevano raccolto i campioni. La riferibilità dei risultati dei tre enzimi ai sistemi di riferimento era verificata con l'impiego di materiali di controllo con valori e incertezza assegnati con le procedure di riferimento

IFCC da tre laboratori di riferimento. Dai risultati ottenuti, sembra senz'altro possibile l'implementazione di un unico intervallo di riferimento globale per entrambe le transaminasi AST e ALT, perché non era osservata alcuna differenza clinicamente rilevante tra i risultati ottenuti dai vari centri partecipanti allo studio (Tabella 2) (22). Al contrario, le concentrazioni di GGT nel siero sembravano essere molto diverse nella popolazione di riferimento scandinava rispetto alle popolazioni arruolate in altre regioni (Sud Europa, Turchia e Cina) e questo era valido sia per i maschi che per le femmine (Figura 1) (22).

Più recentemente, è stata effettuato uno studio analogo con lo scopo di ricavare gli intervalli di riferimento per la fosfatasi alcalina (ALP) nei maschi adulti e nelle donne in età fertile, che fossero riferibili al

Tabella 2

Limiti di riferimento riferibili per le concentrazioni di attività catalitica di aspartato aminotransferasi (AST) e alanina aminotransferasi (ALT) nel siero. Modificato da rif. 22

	Femmine		Maschi		Cumulativo	
	2,5° percentile	97,5° percentile	2,5° percentile	97,5° percentile	2,5° percentile	97,5° percentile
AST, U/L	11,0	33,4	13,9	35,1	11,0	34,0
ALT, U/L	7,8	41,0	9,0	59,0	-	-

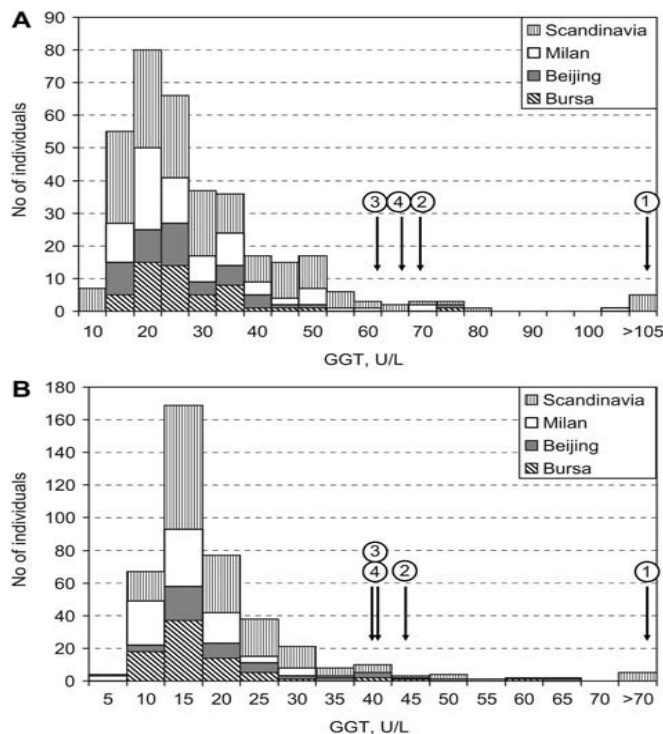


Figura 1

Distribuzione dei risultati relativi ai valori di riferimento riferibili per la γ -glutamilttransferasi (GGT) in 4 diverse regioni. Da rif. 22.

A) Distribuzione dei valori della GGT nei maschi. Le frecce indicano il 97,5° percentile, calcolato come segue: 1) Scandinavia: 114 U/L, 2) Milano: 69 U/L, 3) Pechino: 64 U/L e 4) Bursa (Turchia): 66 U/L. B) Distribuzione dei valori della GGT nelle femmine. Le frecce indicano il 97,5° percentile, calcolato come segue: 1) Scandinavia: 69 U/L, 2) Milano: 44 U/L, 3) Pechino: 39 U/L e 4) Bursa: 41 U/L.

metodo di riferimento recentemente raccomandato dall'IFCC (23). La raccolta dei campioni di riferimento era eseguita in 4 diversi centri Europei. Le aliquote congelate erano poi inviate al laboratorio di riferimento in Germania, dove erano effettuate tutte le misurazioni. La calibrazione del metodo impiegato era eseguita utilizzando una serie di pool di sieri con valori "target" assegnati per la ALP, ottenuti da misure eseguite con la procedura di riferimento IFCC. La Tabella 3 riassume i risultati ottenuti. E' lecito attendersi che tali limiti possano essere ampiamente adottati ora che la nuova procedura di riferimento IFCC per l'ALP è stata approvata dal "Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine" (JTLM) e quindi, nel prossimo futuro, si spera utilizzata per standardizzare i metodi commerciali (5).

CAUTELE NECESSARIE NELL'ADOZIONE DI INTERVALLI DI RIFERIMENTO RIFERIBILI

In un editoriale scritto qualche anno fa, Boyd metteva in guardia il lettore contro l'uso acritico degli intervalli di riferimento "comuni", sottolineando la necessità di documentare appieno la possibile presenza di differenze tra le popolazioni dovute a fattori biologici e ambientali (24). Fino a quando non potrà essere ragionevolmente dimostrato che non esistono differenze per i risultati di un certo esame tra la popolazione servita da singoli laboratori e quella utilizzata nella definizione degli intervalli di riferimento riferibili, la loro adozione dovrebbe infatti essere scoraggiata.

Tabella 3

Limiti di riferimento riferibili per le concentrazioni di attività catalitica di fosfatasi alcalina nel siero. Modificato da rif. 23

	Femmine (età 18-49 anni)	Maschi (età ≥20 anni)
2,5° percentile	33 U/L	43 U/L
97,5° percentile	98 U/L	115 U/L

E' noto che la selezione degli individui per la produzione di valori di riferimento ha bisogno di molta attenzione (25). La selezione dei soggetti "normali" di riferimento costituisce da molti anni un punto chiave in tutte le raccomandazioni per la definizione di intervalli di riferimento (26). Infatti, l'applicazione di modelli diversi per la selezione degli individui può portare a una grande variabilità nei limiti di riferimento ottenuti. Abbiamo già menzionato la differenza trovata tra gli intervalli di riferimento riferibili per la GGT nei soggetti provenienti dai paesi del Nord Europa rispetto a quelli di altre parti del mondo (Figura 1) (22). In una sottoanalisi del NORIP, Alatalo et al. hanno spiegato questa peculiarità relativa alle popolazioni nord europee con fattori rispecchianti lo stile di vita, come l'assunzione di alcolici o il peso corporeo (27). Nello studio di questi autori, mediante l'applicazione di criteri di inclusione molto stringenti, il LSR della GGT nei maschi NORIP di età ≥40 anni risultava pari a 69 U/L, davvero molto simile a quello trovato nello studio multicentrico dell'IFCC (68 U/L) dopo l'esclusione dei campioni ottenuti dal gruppo NORIP. E' chiaro quindi che, anche nell'era dei valori di riferimento riferibili, i criteri utilizzati per definire la popolazione di riferimento mantengono sempre un ruolo centrale.

VALIDAZIONE DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO RIFERIBILI GIA' DISPONIBILI

A condizione che non ci siano differenze significative nella popolazione servita da un laboratorio, gli intervalli di riferimento riferibili già disponibili in letteratura, e dei quali abbiamo qui riportato alcuni esempi, possono essere applicati senza ulteriori studi. Come descritto precedentemente, ci sono tuttavia importanti fattori biologici, differenti in base ai diversi analiti, che possono influenzare gli intervalli di riferimento. Qualora sussistano dubbi sulla possibilità che, per esempio, abitudini di vita diverse possano influenzare gli intervalli di riferimento, gli stessi dovrebbero essere validati prima del loro impiego clinico (Figura 2). La validazione va eseguita in accordo a quanto raccomandato nel documento CLSI C28-A3c

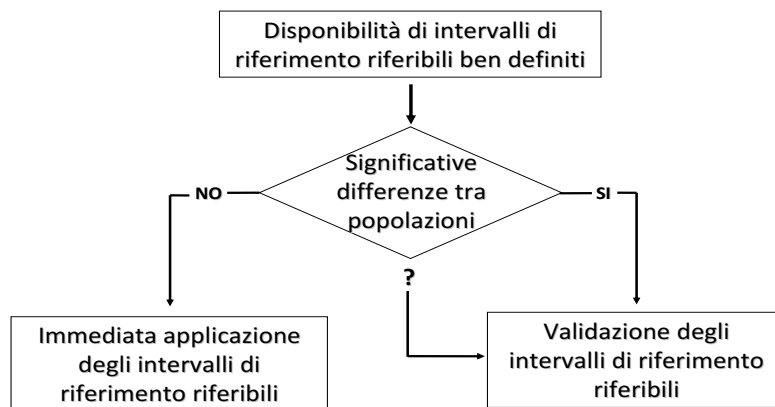


Figura 2

Fasi relative all'implementazione di intervalli di riferimento riferibili nella pratica clinica.

Tabella 4

Sommario dei requisiti analitici e biologici necessari per l'adozione di intervalli di riferimento riferibili

Requisito	Responsabilità
<i>Requisiti analitici</i>	
• Esistenza di un sistema di riferimento della misura	• IFCC, JCTLM, istituti metrologici nazionali
• Disponibilità di metodi commerciali che producono risultati riferibili	• Produttori di diagnostici <i>in vitro</i>
• Corretta implementazione dei metodi riferibili in ambito clinico	• Laboratori clinici
• Controllo delle prestazioni dei metodi commerciali entro limiti di incertezza definiti	• Laboratori clinici, organizzatori di VEQ
• Presidio delle condizioni preanalitiche	• Laboratori clinici
<i>Requisiti biologici</i>	
• Accurata definizione di intervalli di riferimento riferibili, fornendo informazioni riguardo la possibile influenza di fattori biologici e ambientali	• Sforzo congiunto dei professionisti di laboratorio e dei produttori di diagnostici <i>in vitro</i>
• Validazione dell'applicabilità degli intervalli di riferimento riferibili alla popolazione del proprio laboratorio	• Laboratori clinici

JCTLM, Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine.

al paragrafo 11.2, esaminando 20 individui di riferimento selezionati dalla popolazione afferente allo specifico laboratorio che voglia implementare gli intervalli di riferimento riferibili già disponibili (28). In questo caso, se non più di 2 (10%) dei 20 valori misurati cadono al di fuori dell'intervallo di riferimento riferibile disponibile, questo può essere adottato anche dal singolo laboratorio.

CONCLUSIONI

La Tabella 4 riassume i requisiti analitici e biologici necessari all'adozione di intervalli di riferimento riferibili. A condizione che tali prerequisiti siano soddisfatti, appare realistica la possibilità di ottenere intervalli di riferimento che siano applicabili da qualsiasi laboratorio, purché questo sia in grado di produrre risultati riferibili ai sistemi di riferimento. Da quanto detto in questa rassegna, appare anche chiaro che la definizione di intervalli di riferimento riferibili richiede sforzi coordinati a diversi livelli e tra le varie parti interessate. L'IFCC e il suo "Committee on reference intervals and decision limits" stanno compiendo molti sforzi per portare a termine il compito di fornire intervalli di riferimento riferibili robusti. Anche i produttori di diagnostici dovrebbero contribuire a questo sforzo, adottando gli intervalli di riferimento riferibili proposti al momento della standardizzazione dei loro sistemi analitici. Da ultimo, i laboratori clinici dovrebbero utilizzare senza ulteriori indugi gli intervalli di riferimento riferibili una volta disponibili ed eventualmente validati. E' solo con l'applicazione del concetto di intervalli di riferimento riferibili che sarà possibile la definitiva implementazione dei progetti di standardizzazione, colmando il divario tra la produzione di risultati riferibili e il loro impiego corretto al fine di fornire ai clinici informazioni più efficaci per la cura del paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Ceriotti F, Panteghini M. "I risultati dei miei esami sono normali?": considerazioni su intervalli di riferimento e livelli decisionali. *Biochim Clin* 2009;33:229-33.
2. McLawhon RW. Patient safety and clinical effectiveness as imperatives for achieving harmonization inside and outside the clinical laboratory. *Clin Chem* 2011;57:936-8.
3. Panteghini M. Traceability, reference systems and result comparability. *Biochim Clin* 2007;31:247-53.
4. Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem* 2009;42:236-40.
5. Infusino I, Braga F, Paleari R, Mosca A, Panteghini M. Il "Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine" (JCTLM): una cooperazione internazionale per promuovere la standardizzazione dei risultati in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2011;35:377-81.
6. Spandrio L, Pagani F, Panteghini M. Criteri interpretativi per l'utilizzo ottimale degli esami di laboratorio. In: Panteghini M, ed. Interpretazione degli esami di laboratorio. Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio. Vol. VII. Padova: Piccin, 2008:25-45.
7. Ceriotti F. Gli intervalli di riferimento nel nuovo millennio. *Biochim Clin* 2007;31:254-66.
8. Infusino I, Ceriotti F, Panteghini M. Standardizzazione in enzimologia clinica: una sfida per la teoria della riferibilità metrologica. *Biochim Clin* 2010;34:96-102.
9. Panteghini M. Implementation of standardization in clinical practice: not always an easy task. *Clin Chem Lab Med* 2012; DOI 10.1515/CCLM.2011.791.
10. Dutta A, Saha C, Johnson CS, et al. Variability in the upper limit of normal for serum alanine aminotransferase levels: a statewide study. *Hepatology* 2009;50:1957-62.
11. Friedberg RC, Souers R, Wagar EA, et al. The origin of reference intervals. A College of American Pathologists Q-Probes study of "normal ranges" used in 163 clinical laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:348-57.
12. AGA Institute Medical Position Statement on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2007;132:2019-21.
13. Langdon DE, Leeper CK. Physician liberation units system. *N Engl J Med* 1970;283:1413.
14. Haeckel R, Wosniok W. Quantity quotient reporting. A proposal for a standardized presentation of laboratory results. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1203-6.

15. Férard G, Imbert-Bismut F, Messous D, et al. A reference material for traceability of aspartate aminotransferase (AST) results. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:549-53.
16. Ceriotti F. Quantity quotient reporting. Counterpoint. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1207-8.
17. Panteghini M. Application of traceability concepts to analytical quality control may reconcile total error with uncertainty of measurement. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:7-10.
18. Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009;46:8-17.
19. Ceriotti F. Prerequisites for use of common reference intervals. *Clin Biochem Rev* 2007;28:115-21.
20. Ceriotti F, Boyd JC, Klein G, et al. on behalf of the IFCC Committee on Reference Intervals Decision Limits (C-RIDL). Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. *Clin Chem* 2008;54:559-66.
21. Panteghini M on behalf of the IFCC Scientific Division. Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Biochim Clin* 2008;32:203-8.
22. Ceriotti F, Henny J, Queraltó J, et al. Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1593-601.
23. Schumann G, Klauke R, Canalias F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1439-46.
24. Boyd JC. Cautions in the adoption of common reference intervals. *Clin Chem* 2008;54:238-9.
25. Panteghini M. A critical appraisal of experimental factors influencing the definition of the 99th percentile limit for cardiac troponins. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1179-82.
26. PetitClerc C, Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:639-44.
27. Alatalo P, Koivisto H, Kultti J, et al. Evaluation of reference intervals for biomarkers sensitive to alcohol consumption, excess body weight and oxidative stress. *Scand J Clin Lab Invest* 2010;70:104-11.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline, 3rd ed. CLSI document C28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.