

Intervalli di riferimento standardizzati della fosfatasi alcalina sierica in soggetti pediatrici

Ferruccio Ceriotti¹, Mauro Panteghini², Elena Guerra¹, Roberto Leoncini^{3,4}, Gabriele Cevenini³

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

²Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi, Milano

³Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena

⁴UOC Laboratorio di Patologia Clinica - AOU Senese, Siena

ABSTRACT

Traceable reference intervals for alkaline phosphatase in serum of pediatrics. The definition of pediatric reference intervals for alkaline phosphatase (ALP) in serum represents a challenging task due to the high and variable concentrations of this enzyme in children compared to adults. Aim of this work was the establishment of ALP pediatric reference intervals in an Italian population using an indirect method and traceable assays for ALP measurements. A data mining approach involving 12 centers was applied. To verify the analytical quality of the participating centers, 3 pools with ALP target values established by the reference procedure were distributed and analyzed by the centers at the beginning and at regular intervals during the data collection period (May-September 2016). When needed (deviation from target >2%), the results obtained on the 3 pools were used to recalculate ALP results of reference individuals, thus making them traceable to the reference procedure. Each center selected from its database the ALP results of outpatients, aged 0-20 years, excluding those from oncological or orthopedic clinics and the results from subjects that repeated the test more than once. Very high and very low ALP values were investigated for excluding liver, kidney or bone disease. The results were elaborated with a modification of the algorithm proposed by Concordet et al. 4824 ALP values were collected (2372 from females and 2452 from males, respectively). The lower reference limit was the same for boys and girls <12 years old (140 U/L), reaching down the adult concentrations at 16 years for females and 18 years for males. The pubertal peak was at 9-11 years for females (430 U/L) and 12-14 years for males (465 U/L).

INTRODUZIONE

La definizione degli intervalli di riferimento (IR) in pediatria rappresenta uno dei compiti più difficili per la medicina di laboratorio (1) e, fra tutti gli analiti, quello che pone più problemi è forse la fosfatasi alcalina (ALP). ALP è presente in molti organi, ma in particolare è associata alle superfici cellulari localizzate nella mucosa del piccolo intestino e nei tubuli convoluti prossimali del rene, nell'osso (osteoblasti), nel fegato e nella placenta, ancorata sulla membrana cellulare da glicosilfosfatidilinositolo (2). Nel siero si possono ritrovare forme multiple di ALP, alcune delle quali sono veri isoenzimi, codificati da separati *loci* genetici, mentre le forme di ALP ossea, epatica e renale presentano una struttura primaria comune, codificata dallo stesso *locus* genetico (ALP tessuto-specifica), ma differiscono nel

contenuto di carboidrati (3). Mentre nei sieri di adulti apparentemente sani ALP proviene principalmente dal fegato e in parte minore dall'osso, nei bambini l'attività dell'enzima proviene principalmente dall'osso ed è legata al processo della sua mineralizzazione, particolarmente attivo fino al raggiungimento dell'età adulta. I valori di ALP in età pediatrica variano quindi in base allo sviluppo, raggiungendo il picco in occasione della pubertà. Dato che la pubertà si manifesta nelle femmine con ~2 anni di anticipo rispetto ai maschi, dai 9-10 anni in poi gli IR si differenziano tra i sessi. Questa continua variazione delle concentrazioni di ALP e la differenziazione tra i sessi costringe all'arruolamento di un gran numero di soggetti per la definizione accurata degli IR. Alla difficoltà oggettiva di definire corretti IR si aggiunge il fatto che ancora oggi in Italia, in base ai dati raccolti dal programma di VEQ gestito dal Centro di Careggi a

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano. Tel. 0226432282, Fax 0226432640, E-mail ceriotti.ferruccio@hsr.it

Ricevuto: 15.03.2017

Revisionato: 10.04.2017

Accettato: 27.04.2017

Publicato on-line: 08.05.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.016

Firenze e confermati da Cattozzo (4), ~20% dei laboratori non utilizza metodi che forniscono risultati riferibili al metodo di riferimento IFCC (5).

L'insieme di questi fattori ha generato l'estrema eterogeneità degli IR pediatrici per l'ALP utilizzati oggi in Italia. Un grande progetto canadese (CALIPER – "Canadian Laboratory Initiative in Pediatric Reference Intervals") ha fornito dati molto interessanti su questo argomento (6), che però fanno riferimento alla popolazione pediatrica canadese e a uno specifico sistema analitico di cui non è stata dimostrata sperimentalmente la standardizzazione. Si pone quindi il problema di quanto questi IR siano applicabili nel nostro Paese. Purtroppo, la possibilità di replicare un esperimento simile al CALIPER sulla popolazione italiana non era realistica e quindi in questo studio ci siamo orientati verso un approccio basato sul "data mining". Questo approccio per la definizione degli IR, chiamato anche approccio "indiretto", consiste nell'utilizzare i dati già presenti negli archivi elaborandoli con specifici "software" statistici per estrarre dall'insieme dei dati quelli verosimilmente appartenenti a soggetti sani e su questi costruire gli IR. Il principio su cui si basa questo metodo è che comunque la maggior parte dei dati presenti negli archivi appartengano a soggetti che non sono affetti da patologia. Molti autori hanno proposto metodi di calcolo (7-11), anche se questo approccio conserva alcuni limiti importanti. Innanzitutto, se la distribuzione dei dati non è nota *a priori* è impossibile derivarla da dati in cui la percentuale di abnormi è ignota, in particolare se, come spesso accade, la distribuzione non è gaussiana. In genere, poi, non si hanno informazioni sulla qualità analitica con cui i dati sono stati ottenuti e quindi i risultati dell'elaborazione statistica ottenuti in un centro difficilmente sono trasferibili ad altri. Per questi motivi, il documento CLSI EP28-A3 chiarisce che questi metodi "indiretti" possono solo dare una stima approssimativa degli IR (12).

Scopo di questo lavoro è stato quello di definire IR pediatrici per ALP utilizzando un metodo indiretto, ma cercando di superare, almeno in parte, i limiti sopra indicati attraverso una verifica accurata della riferibilità dei dati prodotti dai laboratori che hanno determinato l'ALP e la selezione di una popolazione a bassa prevalenza di soggetti affetti da patologie che comportino alterazione delle concentrazioni ematiche di ALP.

MATERIALI E METODI

Schema del progetto

Il progetto ha inteso:

1. verificare, in via preliminare, la standardizzazione della misura dell'ALP nei laboratori dei centri candidati a partecipare allo studio, mediante la distribuzione di appositi campioni biologici con valore assegnato con la procedura di riferimento IFCC e monitorare poi, mediante gli stessi materiali, la qualità dei dati forniti dai centri selezionati durante la fase di raccolta dati, utilizzando eventualmente i dati ottenuti

sui materiali suddetti per correggere i risultati forniti dai vari centri rendendoli equivalenti dal punto di vista analitico (standardizzati) e direttamente riferibili al sistema di riferimento per l'ALP (13, 14);

2. ottenere un numero elevato di risultati di ALP da una popolazione pediatrica non selezionata a priori, ma in cui la prevalenza dei soggetti affetti da patologie che comportino variazione delle concentrazioni sieriche di ALP fosse bassa, coinvolgendo un numero elevato di centri pediatrici;
3. usare approcci statistici adeguati per rielaborare i dati e ottenere gli IR.

Materiali di controllo

Utilizzando i sieri residui di campioni a cui era stata richiesta la misura dell'ALP sono stati preparati 3 pool con concentrazioni di attività catalitica di ALP di circa 50, 150 e 350 U/L. I pool sono stati suddivisi in aliquote e conservati a -80 °C. 12 aliquote di ciascun pool sono state inviate in ghiaccio secco ai centri partecipanti. A questi 3 pool è stato assegnato il valore mediante la procedura di riferimento IFCC presso il laboratorio di riferimento del Centro di Ricerca per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME) dell'Università di Milano (13). Il valore è stato assegnato mediante analisi ripetute (misure in triplicato per 3 diverse serie analitiche).

I laboratori partecipanti hanno analizzato questi pool in triplicato per 3 giorni consecutivi prima di avviare la raccolta dei dati dei pazienti e poi, almeno in duplicato, una volta a settimana, per le prime 8 settimane di raccolta dati. In 8 centri la raccolta dati è proseguita per altre 10 settimane durante le quali la stabilità del sistema è stata monitorata mediante il programma CQI in uso.

Soggetti

Sono stati arruolati 12 centri, ma solo 11 hanno inviato dati. Ciascun centro ha raccolto tutti i dati di ALP di soggetti ambulatoriali di età da zero a 20 anni, con i seguenti criteri di esclusione: soggetti che hanno effettuato esami ripetuti oppure che provengono da ambulatori di Ortopedia o Oncologia. Nel caso di neonati, sono stati raccolti solo i dati di soggetti del Nido di ciascun centro. In caso di dati aberranti (rilevati visivamente dopo aver posto in grafico i dati) sono state raccolte informazioni che ne spiegassero l'origine e, di conseguenza, giustificassero l'eventuale eliminazione, come la presenza di concentrazioni plasmatiche di transaminasi oltre 2 volte il limite superiore di riferimento, la positività sierologica (IgM) che indicasse la presenza di infezioni da virus causa di epatopatie acute (epatite B, citomegalovirus, Epstein-Barr) o la presenza di malattia renale glomerulare (creatininemia oltre il doppio del limite superiore di riferimento ripartito per l'età).

Elaborazione statistica

L'elaborazione dei dati è stata eseguita in due fasi:

- 1) applicazione del metodo proposto da Concordet et al.

(11) per separare la popolazione supposta apparentemente sana dal resto dei dati (anomali); il metodo utilizza l'algoritmo iterativo di aspettativa-massimizzazione per la stima dei parametri di entrambe le distribuzioni gaussiane dei dati Box-Cox trasformati; 2) applicazione del metodo di Cole e Green (15) alla popolazione selezionata come sana per definire i percentili età-dipendenti; il metodo utilizza una trasformazione Box-Cox per descrivere le asimmetrie di distribuzione dei dati e fornisce risultati sufficientemente accurati anche in presenza di un basso numero di osservazioni disponibili. Poiché nella sua formulazione originaria il metodo di Concordet et al. (11) non tiene conto della dipendenza dall'età degli IR, a esso è stata adattata una rete neurale artificiale, capace di effettuare una stima smussata dell'andamento degli IR con l'età.

Aspetti etici

I risultati sono stati inviati al centro di elaborazione in modo anonimo (erano riportati solo sesso, data di nascita e data del prelievo) e l'elaborazione di tipo cumulativo non consentiva alcuna identificazione del singolo soggetto.

RISULTATI

Verifica delle prestazioni dei laboratori partecipanti

I risultati dell'esperimento preliminare sono stati recentemente pubblicati (16). Nella Tabella 1 sono

riportati i risultati ottenuti sui 3 pool durante le 8 settimane di raccolta dati. I risultati, come atteso, non differivano da quelli ottenuti nella prima fase e dimostravano l'ottima stabilità delle prestazioni della maggior parte dei partecipanti, questo anche nelle 12 settimane successive per gli 8 centri che hanno inviato una seconda serie di dati (dati non presentati).

Il valore della pendenza (calcolata con il metodo dei minimi quadrati) ottenuta dalla correlazione dei dati sui 3 pool con valore certificato (media complessiva del periodo di 8 settimane) è stato utilizzato per correggere tutti i dati, riferendoli a quelli che si sarebbero ottenuti con la procedura di riferimento. Dato che l'intercetta non è risultata in nessun caso significativamente diversa da zero, il suo valore non è stato utilizzato per la correzione.

Dati dei soggetti

Sono stati raccolti 4824 valori di ALP per soggetti tra zero e 20 anni (2372 femmine e 2452 maschi). La distribuzione del numero di soggetti per fasce di età è mostrata nella Figura 1, in cui si osserva un dato abbastanza omogeneo nelle varie classi di età fino ai 14 anni, senza particolari differenze fra maschi e femmine se non nel primo anno di età (rapporto femmine/maschi compreso tra un minimo di 0,66 nel primo anno di età e un massimo di 1,22 nella fascia tra 19 e 20 anni). Sfortunatamente, neonati e lattanti sono risultati molto pochi e non ci hanno permesso di definire dati robusti nei primi 15 giorni di vita.

Tabella 1

Risultati ottenuti dai laboratori partecipanti nella fase di raccolta dati sui 3 pool di sieri con valori di fosfatasi alcalina (ALP) assegnati con procedura di riferimento. I 3 pool sono stati analizzati per 8 settimane, all'inizio di ogni settimana, sui sistemi analitici su cui veniva eseguita la misura dell'ALP

Procedura di riferimento IFCC	n	Pool L		Pool M		Pool H		Confronto con procedura di riferimento		
		Media (U/L)	CV	Media (U/L)	CV	Media (U/L)	CV	Pendenza	Intercetta	r ²
		59,9 U/L (3,7%) ^a		186,9 U/L (2,8%) ^a		401,5 U/L (2,5%) ^a				
Roche Cobas 6000 ^b	16	56,3	0,5%	174,8	0,9%	368,4	1,1%	0,9127 ^c	2,6 U/L	0,9999
Beckman AU 5822 ^b	16	61,3	2,7%	189,9	2,4%	405,9	2,1%	1,0086	1,0 U/L	1,0000
Roche Cobas 8000 ^b	16	54,9	2,1%	170,9	2,5%	361,9	1,9%	0,8978 ^c	1,9 U/L	1,0000
Roche Cobas 6000/8000 ^b	32	57,5	0,9%	176,6	0,7%	373,2	0,9%	0,9232 ^c	2,9 U/L	1,0000
Beckman AU 680 ^b	54	62,5	1,3%	195,8	1,0%	413,3	1,6%	1,0256 ^c	2,2 U/L	0,9999
Beckman AU 6800 ^b	16	61,8	3,7%	191,1	2,3%	406,8	2,5%	1,0095	1,8 U/L	1,0000
Beckman AU 5800	16	59,7	6,3%	187,9	7,4%	399,3	6,3%	0,9933	1,0 U/L	1,0000
Siemens Advia 2400 ^b	24	58,6	0,9%	180,4	0,9%	385,9	1,0%	0,9580 ^c	1,3 U/L	1,0000
Roche Cobas 8000	16	57,8	2,4%	179,5	1,6%	382,3	1,7%	0,9496 ^c	1,3 U/L	1,0000
Roche Cobas 8000 ^b	32	56,5	1,8%	173,4	2,0%	369,8	1,8%	0,9172 ^c	1,7 U/L	1,0000
Beckman DxCi 600	14	51,6	2,2%	158,0	1,7%	343,3	3,4%	0,8548 ^c	-0,4 U/L	0,9999

^aValore medio (incertezza espansa, k=2).

^bCentri che hanno proseguito la raccolta per altre 12 settimane.

^cValore utilizzato per la correzione dei dati.

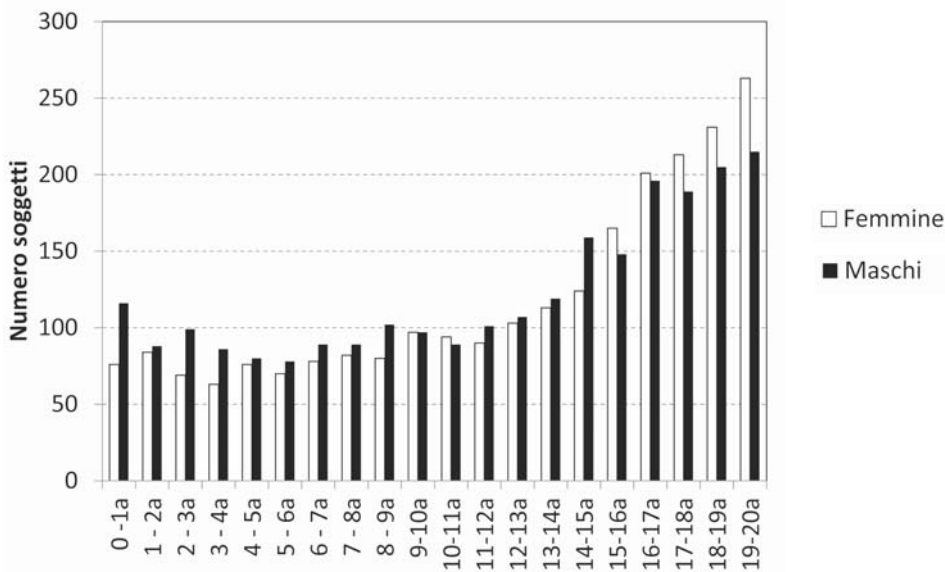


Figura 1
Numerosità dei soggetti nelle varie classi di età.

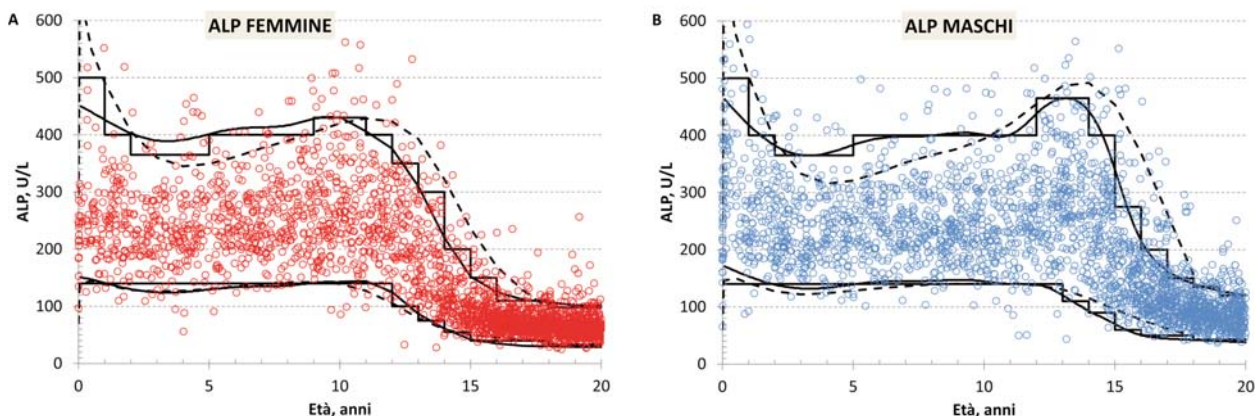


Figura 2
Distribuzione dei risultati. Le linee continue definiscono i limiti di riferimento, rispettivamente, superiore e inferiore definiti con le elaborazioni descritte nel testo. La linea spezzata rappresenta la proposta di suddivisione in classi, derivata empiricamente in base alla distribuzione precedente. La linea tratteggiata rappresenta i dati ottenuti da Zierk et al. (17) su una popolazione tedesca.

La Figura 2 mostra i dati dei soggetti suddivisi per sesso, confrontati con i dati recentemente pubblicati da Zierk et al. (17). Dato che i risultati di questi autori erano ottenuti con sistemi analitici Roche Diagnostics e che, nella nostra valutazione, questi sistemi mostravano una sottostima media del 8% (pendenza calcolata sulla media dei pool misurati nelle due fasi del lavoro dai 5 laboratori che utilizzavano sistemi Roche = 0,92), i risultati sono stati corretti di conseguenza.

La Tabella 2 riporta i valori degli IR dell'ALP suddivisi per classi di età.

DISCUSSIONE

La definizione di IR basati su approcci indiretti presenta una serie di limiti, come riassunto in (18), ma il

progetto messo in atto ha cercato di superarne almeno alcuni attraverso un controllo attento della fase analitica (per mezzo dell'uso di materiali commutabili con valore assegnato mediante la procedura di riferimento al fine di assicurare la riferibilità al sistema di riferimento della misura), il coinvolgimento di numerosi centri per ottenere uno spaccato rappresentativo della popolazione pediatrica italiana e l'applicazione di criteri di selezione tali da permettere di limitare significativamente la prevalenza di risultati da soggetti "non sani" nella popolazione selezionata. In particolare, l'applicazione del metodo proposto da Concordet et al. (11) ha scartato solo una piccola percentuale dei dati raccolti.

Come mostrato nella Figura 2, la distribuzione dei valori descritta da Zierk et al. (17) (corretta per la sottostima mostrata dal metodo Roche) si sovrappone in

Tabella 2

Limiti di riferimento standardizzati per l'attività della fosfatasi alcalina del siero ottenuti nel presente studio

Femmine			Maschi		
Età (anni)	Limite inferiore (U/L)	Limite superiore (U/L)	Età (anni)	Limite inferiore (U/L)	Limite superiore (U/L)
<1	140	500	<1	140	500
1-<2	140	400	1-<2	140	400
2-<5	140	365	2-<5	140	365
5-<9	140	400	5-<12	140	400
9-<11	140	430	12-<13	140	465
11-<12	140	400	13-<14	110	465
12-<13	100	350	14-<15	90	400
13-<14	75	300	15-<16	65	275
14-<15	55	200	16-<17	50	200
15-<16	40	150	17-<18	50	150
16-<18	40	110	18-<19	43	135
			19-<20	43	120
≥18 ^a	33	98	≥20 ^a	43	115

^aDati per la popolazione adulta da rif. (5), riportati per confronto.

larghi tratti a quella calcolata in base ai nostri dati, soprattutto per quanto riguarda il limite inferiore di riferimento. Questo limite è stato spesso trascurato in passato, tanto è vero che, per esempio, Roche Diagnostics fino a ~1 anno fa non lo riportava nei foglietti illustrativi del proprio metodo. Il limite inferiore di riferimento è però importante in quanto valori al di sotto di esso costituiscono l'elemento diagnostico di base dell'ipofosfatasi, una rara patologia genetica (19, 20). Questa patologia ossea, che può essere letale nel neonato, deriva da una carenza congenita dell'isoenzima ALP tessuto-aspecifico e può presentare un ampio spettro di sintomi (fratture spontanee, convulsioni, dolori ossei, perdita prematura dei denti) e di quadri clinici, che la rendono difficile da diagnosticare (19). La mancanza del supporto del laboratorio può notevolmente complicare la situazione e ritardare o impedire la diagnosi; si sospetta infatti che, soprattutto nella popolazione pediatrica, possano esistere un certo numero di forme non diagnosticate (21), ponendo molta enfasi sulla necessità di disporre di IR pediatrici corretti.

I risultati da noi ottenuti si confrontano piuttosto bene sia con i dati dello studio CALIPER (6) che con quelli dello studio di Zierk et al. (17), che però, come detto in precedenza, necessitano di essere rielaborati per essere resi riferibili alla procedura di riferimento IFCC. La Tabella 3 presenta un confronto tra i dati ottenuti in questo studio e quelli dei due lavori citati e con altri di pubblicazione relativamente recente (22-25). Altri dati presenti nella letteratura più datata non possono infatti essere utilizzati perché ottenuti con metodi di misura non riferibili alla procedura di riferimento. Una difficoltà ulteriore nel confronto è legata alla diversa suddivisione

in classi di età operata dai vari autori. Per fare fronte a questo problema e rendere i risultati confrontabili, tutti i dati sono stati rappresentati suddivisi in classi di un anno. Dalla Tabella 3 si può osservare come il limite inferiore di riferimento in età <10 anni non sia mai <104 U/L in tutti gli studi e come tutti gli autori riportino valori identici per maschi e femmine fino a ~10 anni di età. Maggiore variabilità si nota per quanto riguarda il limite superiore di riferimento, sia in termini di valori assoluti che di presumibile picco puberale. Rispetto ai dati CALIPER (6) e a quelli di Zierk et al. (17), che rappresentano sicuramente la fonte più affidabile di informazioni, i nostri indicano un picco puberale di ~1 anno più precoce, sia per i maschi che per le femmine. Questo dato è in accordo con quanto si ritrova in letteratura relativamente all'età media del menarca, che in Italia risulta essere di ~6 mesi più precoce rispetto che in Germania (26). In termini di attività al picco puberale, i valori da noi ottenuti si confrontano meglio con quelli (corretti) di Zierk et al. rispetto a quelli CALIPER.

Il limite principale del nostro lavoro è costituito dalla bassa numerosità dei dati raccolti. Per l'applicazione dei "software" statistici di "data mining", soprattutto su casistiche complesse come questa, sarebbe stato necessario raccogliere un numero di dati 10 volte maggiore per un'elaborazione con un basso livello di incertezza. Il fatto che la popolazione selezionata abbia una bassa prevalenza di patologia e l'applicazione di modalità raffinate di elaborazione dati possono compensare in parte questo limite; tuttavia, rimane un discreto livello di arbitrarietà nei valori riportati in Tabella 2, soprattutto per quanto riguarda il limite superiore di riferimento. Per quanto riguarda i limiti inferiori invece i risultati ottenuti appaiono molto più robusti e la loro affidabilità è confortata dalla ottima sovrapposibilità con i risultati CALIPER, Zierk et al. corretti e "Canadian Health Measures Survey" (CHMS, vedi Tabella 3). Un altro limite è costituito dall'impossibilità di definire con precisione valori per il periodo neonatale e perinatale, dato il numero troppo basso di casi registrati. Per questo periodo, data la buona sovrapposibilità con i risultati ottenuti da Zierk et al. (17) nella restante popolazione, una possibile soluzione per i centri che trattano un numero rilevante di neonati, è quella di adottare i valori proposti nel lavoro di questi autori, eventualmente corretti per il fattore indicato (+8%). Anche in campo neonatale comunque l'utilizzo dei limiti da noi riportati costituisce un'indicazione sufficientemente valida, soprattutto per quanto riguarda il limite inferiore di riferimento, dato molto rilevante per porre un sospetto di ipofosfatasi in un neonato sintomatico.

Dal punto di vista analitico, infine, i risultati di questo studio non fanno che confermare quelli ottenuti nella fase preliminare precedentemente pubblicati (13, 16), indicando uno stato dell'arte della misura dell'ALP ancora lontano dall'ottimale. In particolare, è da notare, come già rilevato da Braga et al. (13), il fatto che Roche Diagnostics continui a riferire il suo metodo a quello pubblicato da Tietz et al. nel 1983 (27) e non al sistema di riferimento IFCC adottato a partire dal 2011, con il

Tabella 3
Confronto fra gli intervalli di riferimento per la fosfatasi alcalina sierica in pediatria (risultati in U/L) presenti in letteratura. In grigio, per ciascun studio sono evidenziati i gruppi di età con i valori più elevati (che dovrebbero corrispondere al picco puberale)

Metodo analitico	Vari		Abbott Diagnostics		Roche Diagnostics		Ortho Clinical Diagnostics		Roche Diagnostics		Non definito		Abbott Diagnostics	
	LIR	LSR	Indiretto	Diretto	Indiretto	Diretto	Diretto ^a	Diretto	Diretto	Diretto ^a	LIR	LSR	LIR	LSR
Tipo di selezione	140	500	Italia	Canada	Germania	Canada	Canada	Danimarca	Corea	Svezia				
Origine dei soggetti	4824	1213	361.405	5032	6203	2474	699							
No. soggetti	Presente studio	CALIPER (6)	Zierk et al. - dati originali (17) ^b	Zierk et al. - dati corretti ^b	Hilsted et al. (23)	Cho et al. (24)	Ridefelt et al. (25)							
Riferimento														
Genere ed età	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR
0-14 gg	140	500	90	273	65	589	71	640	-	-	-	-	-	-
15gg-<1 anno	140	500	134	518	133	504	145	548	-	-	-	-	104	455
1-<2 anni	140	400	156	369	121	408	132	443	-	-	-	-	104	455
2-<3 anni	140	365	156	369	116	348	126	378	-	-	-	-	111	277
3-<4 anni	140	365	156	369	116	321	126	349	144	327	117	261	111	277
4-<5 anni	140	365	156	369	118	317	128	345	144	327	117	261	111	277
5-<6 anni	140	400	156	369	122	326	133	354	144	327	117	261	111	277
6-<7 anni	140	400	156	369	125	339	136	368	153	367	123	330	111	277
7-<8 anni	140	400	156	369	129	352	140	383	153	367	123	330	111	277
8-<9 anni	140	400	156	369	131	365	142	397	153	367	123	330	111	277
9-<10 anni	140	430	156	369	130	379	141	412	153	367	123	330	76	479
10-<11 anni	140	430	141	460	124	391	135	425	153	367	123	330	76	479
11-<12 anni	140	400	141	460	108	394	117	428	64	359	123	330	76	479
12-<13 anni	100	350	141	460	85	379	92	412	64	359	123	330	76	479
13-<14 anni	75	300	62	280	63	332	68	361	64	359	61	399	76	479
14-<15 anni	55	200	62	280	50	255	54	277	64	359	61	399	76	479
15-<16 anni	50	150	54	128	44	183	48	199	64	359	-	-	37	222
16-<17 anni	40	110	54	128	40	135	43	147	44	107	-	-	37	222
17-<18 anni	40	110	48	95	38	102	41	111	44	107	-	-	37	222
18-<19 anni	33	98	48	95	36	88	39	96	44	107	-	-	37	222
19-<20 anni	33	98	-	-	-	-	-	-	44	107	-	-	-	-

Femmine

Tabella 3. *Continua*

0-14 gg	140	500	90	273	57	639	62	695	-	-	-	-	104	455
15gg-<1 anno	140	500	134	518	138	531	150	577	-	-	-	-	104	455
1-<2 anni	140	400	156	369	122	404	133	439	-	-	-	-	111	277
2-<3 anni	140	365	156	369	114	327	124	355	-	-	106	261	111	277
3-<4 anni	140	365	156	369	113	294	123	320	144	327	-	106	111	277
4-<5 anni	140	365	156	369	116	290	126	315	144	327	-	106	111	277
5-<6 anni	140	400	156	369	120	301	130	327	144	327	127	370	111	277
6-<7 anni	140	400	156	369	124	316	135	343	153	367	127	370	111	277
7-<8 anni	140	400	156	369	127	330	138	359	153	367	149	345	111	277
8-<9 anni	140	400	156	369	129	341	140	371	153	367	149	345	76	479
9-<10 anni	140	400	156	369	129	353	140	384	153	367	159	365	76	479
10-<11 anni	140	400	141	460	130	373	141	405	153	367	159	365	76	479
11-<12 anni	140	400	141	460	129	401	140	436	113	438	159	365	76	479
12-<13 anni	140	465	141	460	124	434	135	472	113	438	150	492	76	479
13-<14 anni	110	465	127	517	113	454	123	493	113	438	150	492	76	479
14-<15 anni	90	400	127	517	97	440	105	478	113	438	100	402	64	310
15-<16 anni	65	275	89	365	79	382	86	415	113	438	100	402	64	310
16-<17 anni	50	200	89	365	63	291	68	316	56	167	100	402	64	310
17-<18 anni	50	150	59	164	51	193	55	210	56	167	55	242	64	310
18-<19 anni	43	135	59	164	45	144	49	157	56	167	55	242	-	-
19-<20 anni	43	120	-	-	-	-	-	-	56	167	55	242	-	-

Maschi

CALIPER, "Canadian Laboratory Initiative in Pediatric Reference Intervals"; CHMS, "Canadian Health Measures Survey"; LIR, limite inferiore di riferimento; LSR, limite superiore di riferimento.
 a) Criteri di selezione dei soggetti molto blandi.
 b) Il dato riportato rappresenta il valore centrale della classe (ad es., 1,5 anni per la classe 1-<2 anni).

risultato che i valori ottenuti con i sistemi analitici Roche presentano un significativo scostamento negativo rispetto a quelli ottenuti con la procedura di riferimento.

In conclusione, anche se con qualche limite, riteniamo che i risultati ottenuti costituiscano un importante contributo alla definizione di IR per l'ALP sierica nella popolazione pediatrica italiana. Il fatto che i risultati siano stati ottenuti da una popolazione distribuita su buona parte del territorio nazionale, anche se con una prevalenza dell'Emilia Romagna che ha fornito ~2/3 dei dati, consente di considerare gli IR applicabili su tutto il territorio nazionale. La riferibilità metrologica dei dati ottenuti fa sì che essi possano essere usati indipendentemente dal sistema analitico impiegato nel singolo laboratorio, a patto che questo utilizzi sistemi standardizzati al sistema di riferimento (13). Gli utilizzatori dei sistemi Roche Diagnostics, fino al momento in cui il produttore non deciderà di modificare la sua calibrazione per riferirsi al sistema internazionale di riferimento, possono considerare l'opzione di "trasferire" questi IR, riducendoli del 8%. L'adozione dell'informazione da noi fornita da parte di tutti i laboratori che oggi non includono il limite inferiore di riferimento dell'intervallo pediatrico nel referto o, peggio, utilizzano come limite inferiore di riferimento quello dell'adulto, è auspicabile possa contribuire a migliorare l'individuazione o confermare il sospetto diagnostico di ipofosfatasia.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano tutti i Colleghi dei centri che hanno contribuito alla raccolta dei dati: D. Patrono (Bologna); L. Germagnoli (Castenedolo, BS); M. Boffardi (Cava dei Tirreni, NA); M. Mussap, L. Delfino, G.B. Oliveri (Genova); T. Trenti (Modena); M. Zaninotto (Padova); R. Aloe (Parma); R. Dorizzi, P. Maltoni (Pievesestina di Cesena, FC); C. Zuppi, M. Antenucci (Roma); C. Grillo, G. Mengozzi (Torino); G. Lippi, G. Salvagno, G. Brocco (Verona). Si ringraziano inoltre Valerio Vallerignani e Eva Milletti (Siena) per il supporto nell'elaborazione dei dati.

Il lavoro è stato patrocinato da SIBioC - Medicina di Laboratorio e si è avvalso di un finanziamento a SIBioC - Medicina di Laboratorio da parte della ditta Alexion.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Ceriotti F. Establishing pediatric reference intervals: A challenging task. *Clin Chem* 2012;58:808–10.
- Panteghini M, Bais R. Serum enzymes. In: Rifai N, ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry & Molecular Diagnostics*, 6th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2017.
- Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 1992;38:2486–92.
- Cattozzo G. Indagine sui metodi di determinazione e sulle modalità di refertazione dell'attività catalitica degli enzimi nel siero. *Biochim Clin* 2015;39:575–84.
- 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.
- Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem* 2012;58:854–68.
- Hoffmann H. Statistics in the practice of medicine. *J Am Med Assoc* 1963;185:864–873.
- Haeckel R, Wosniok W, Arzideh F. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1033–42.
- Kairisto V, Hänninen KP, Leino A, et al. Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:789–96.
- Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. *Biometrics* 1967;23:115–35.
- Concordet D, Geffré A, Braun JP, et al. A new approach for the determination of reference intervals from hospital-based data. *Clin Chim Acta* 2009;405:43–8.
- CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline - Third edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- Braga F, Frusciante E, Infusino I, et al. Valutazione dell'esattezza della misura della fosfatasi alcalina sierica in un gruppo di laboratori italiani. *Biochim Clin* 2017;41:64–71.
- Infusino I, Frusciante E, Braga F, et al. Progress and impact of enzyme measurement standardization. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:334–40.
- Cole TJ, Green PJ. Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med* 1992;11:1305–19.
- Braga F, Frusciante E, Infusino I, et al. Evaluation of the trueness of serum alkaline phosphatase measurement in a group of Italian laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:47–50.
- Zierk J, Arzideh F, Haeckel R, et al. Pediatric reference intervals for alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:102–10.
- Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009;46:8–17.
- Bianchi ML. Hypophosphatasia: an overview of the disease and its treatment. *Osteoporos Int* 2015;26:2743–57.
- Linglart A, Biosse-Duplan M. Hypophosphatasia. *Curr Osteoporos Rep* 2016;14:95–105.
- McKiernan FE, Berg RL, Fuehrer J. Clinical and radiographic findings in adults with persistent hypophosphatasemia. *J Bone Miner Res* 2014;29:1651–60.
- Adeli K, Higgins V, Nieuwesteeg M, et al. Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem* 2015;61:1049–62.
- Hilsted L, Rustad P, Aksglæde L, et al. Recommended Nordic paediatric reference intervals for 21 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;73:1–9.

24. Cho SM, Lee SG, Kim HS, et al. Establishing pediatric reference intervals for 13 biochemical analytes derived from normal subjects in a pediatric endocrinology clinic in Korea. *Clin Biochem* 2014;47:268–71.
25. Ridefelt P, Gustafsson J, Aldrimer M, et al. Alkaline phosphatase in healthy children: Reference intervals and prevalence of elevated levels. *Horm Res Paediatr* 2014;82:399–404.
26. de Muinck Keizer-Schrama SMPF, Mul D. Trends in pubertal development in Europe. *Hum Reprod Update* 2001;7:287–91.
27. Tietz NW, Rinker A, Shaw L. International Federation of Clinical Chemistry. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). IFCC Document. *Clin Chim Acta* 1983;135:339F–67F.