

Riferibilità metrologica e standardizzazione: report dal 7th CIRME International Scientific Meeting

Dominika Szöke

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco", Milano

Si è tenuto il 24 maggio 2013 nella magnifica cornice di Stresa sul lago Maggiore, come evento satellite del 20° IFCC–EFLM EuroMedLab di Milano, il 7° simposio internazionale organizzato dal Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME) dell'Università degli Studi di Milano, avente come tema la riferibilità metrologica e la standardizzazione delle misure in Medicina di Laboratorio. Il simposio, presieduto da Mathias Mueller, Mauro Panteghini, Heinz Schimmel e Linda Thienpont, tra i maggiori esperti mondiali del settore, è stato organizzato sotto gli auspici del "Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine" (JCTLM) di cui Mueller è attualmente il Chairman (1). L'evento è stato suddiviso in due sessioni: quella della mattina, con presentazioni che hanno brillantemente riassunto le basi della teoria della riferibilità metrologica, e quella del pomeriggio, che ha trattato alcune applicazioni pratiche della stessa teoria.

La prima sessione si è aperta con una magistrale introduzione alla riferibilità metrologica in Medicina di Laboratorio da parte di Linda Thienpont (Università di Ghent), che ha sottolineato quanto ancora la terminologia specifica necessiti profonda conoscenza, raccomandando l'impiego del Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) (2), definito come "la Bibbia dei metrologi", e sottolineando spiritosamente la differenza fra metrologia e meteorologia. La relatrice ha riassunto brevemente il contesto normativo (Direttiva 98/79/EC, standard ISO 17511, 18513, 15193, 15194 e 15195) e il ruolo del JCTLM, descrivendo poi il concetto del sistema di riferimento della misura e i diversi modelli di riferibilità per gli analiti riferibili al Sistema Internazionale di misura (SI) e per quelli non riferibili al SI (3).

Il tema della procedura di riferimento ["reference measurement procedure" (RMP)] di ordine metrologico superiore è stato trattato da David Bunk, ricercatore del "National Institute of Standards and Technology" (NIST) statunitense. Egli ha presentato i requisiti definiti dallo standard ISO 15193, ai quali una RMP deve rispondere, sottolineando come però in tale documento manchino del tutto raccomandazioni su come valutare il "bias", compresa la definizione dei traguardi per le prestazioni analitiche (4). Usando alcuni esempi, ha illustrato le principali problematiche, che fanno di questo argomento uno dei più ardui da affrontare nei progetti di standardizzazione.

Heinz Schimmel, del "Joint Research Centre – Institute for Reference Materials and Measurements" (JRC-IRMM), ha riassunto il ruolo dei materiali di riferimento primari e secondari e il loro posto nella catena di riferibilità. Il relatore ha molto enfatizzato la necessità della verifica della commutabilità, passando in rassegna i vari problemi che spesso devono essere affrontati, come liofilizzazione, presenza di isoforme e oligomeri delle proteine, interazioni della matrice, e portando esempi recentemente pubblicati relativi a materiali per ceruloplasmina (5), proteina C reattiva (6) e ormone della crescita (7). Il problema della eterogeneità delle molecole è quindi tornato in primo piano con la possibilità che, almeno in alcuni casi, RMP che si basino sulla determinazione della massa molecolare possano non essere le più adatte a implementare la riferibilità di dosaggi clinici basati su metodiche "immunoassay", mentre una metodologia immunologica con caratteristiche ben definite potrebbe mostrarsi una valida alternativa per l'assegnazione dei valori ai materiali di riferimento secondari, in quanto quest'ultima potrebbe mostrare selettività uguale o molto simile rispetto al misurando determinato con i metodi commerciali.

La standardizzazione degli obiettivi delle prestazioni analitiche da utilizzare in ambito clinico è stata trattata da Dietmar Stöckl (Università di Ghent). Come noto, sia l'imprecisione che il "bias" possono significativamente influenzare le decisioni cliniche, in quanto possono aumentare la percentuale di risultati falsi positivi/negativi provocando errori diagnostici. Mediante il concetto ASAP ("as simple as possible"), il relatore ha proposto di adottare i traguardi analitici che si associano a un aumento massimo del 30% di false decisioni, raccomandando che la frazione di questi traguardi legata alla calibrazione dei prodotti diagnostici non superi il 50% dei traguardi ottimali definiti per i laboratori utilizzatori finali dei sistemi analitici (8). Questo sarebbe d'aiuto nel superare l'approccio ormai di uso comune di derivare semplicemente i traguardi dalla variabilità biologica dell'analita, spostandosi al livello gerarchicamente più elevato che è quello di definire degli obiettivi della misurazione in base all'impatto sull'"outcome" clinico delle misure. Gli esempi riportati dimostrano che per analiti come colesterolo, acido urico, trigliceridi o proteine totali misurati nel siero esistono sistemi analitici con eccellenti prestazioni, mentre altri, come magnesio, calcio o albumina, necessitano ancora di significativi miglioramenti (9).

Nella presentazione seguente, Graham Jones (St. Vincent's Hospital di Sydney) ha parlato del ruolo fondamentale

The implementation of standardization in clinical practice needs first the availability of the three main pillars:

- Reference measurement procedures
- Reference materials
- Accredited reference laboratories

Then, it needs to define a fourth pillar:

- Traceable reference intervals/decision limits

And, finally, an appropriately organized analytical quality control should become the fifth pillar.

4th CIRME International Scientific Meeting
 RETHINKING QUALITY CONTROL IN THE TRACEABILITY ERA
 Milano - 30 November 2010

Figura 1

degli Esteri di Parigi venne firmata la Convenzione del Metro. Questa diede vita al "Bureau International des Poids et Mèures" (BIPM) e definì l'ambito per una collaborazione globale nella scienza della misura e nelle sue applicazioni. Il relatore ha in particolare citato due gravi accadimenti avvenuti entrambi nel 1999 (un incidente aereo e l'accidentale distruzione di un satellite in rotta su Marte) causati dall'uso di unità di misura diverse per lo stesso parametro, stressando l'importanza, ove possibile, dell'uso delle unità di misura SI in ambito scientifico.

La sessione pomeridiana, come detto dedicata ad alcuni esempi relativi a programmi di standardizzazione in Medicina di Laboratorio, si è aperta con la presentazione di Gary Myers ("American Association for Clinical Chemistry"), che ha trattato la standardizzazione della misurazione della creatinemia. Il relatore ci ha rammentato che per migliorare la qualità della misura della creatinina nel siero i produttori di diagnostici dovrebbero assicurare prestazioni ottimali dei metodi a concentrazioni intorno a 1,00 mg/dL e assicurare che inesattezza e imprecisione siano costanti per tutto l'intervallo di misura analitica. Un traguardo di errore totale desiderabile per la misura della creatinina dovrebbe essere quello associato a un errore massimo del 10% nella stima della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) mediante equazioni, come la formula MDRD ("Modification of Diet in Renal Disease study"). Una combinazione di "bias" (se valutato rispetto al metodo di riferimento) <5% e imprecisione totale (CV) <8% alla concentrazione di 1,00 mg/dL di creatinina soddisferebbero questo traguardo (12). La buona notizia è che la misura della creatinina negli ultimi anni è senz'altro migliorata in termini di accuratezza e che oggi tutti i produttori più importanti dei saggi per la misura della creatinina utilizzano una calibrazione riferibile al sistema di riferimento definito a livello internazionale (13), mentre la cattiva notizia riporta la persistenza sul mercato di saggi che forniscono risultati inaccurati, anche se teoricamente riferibili alla RMP (per la situazione italiana, vedere rif. 14). Il messaggio finale è che la standardizzazione globale della misura della creatinemia non è purtroppo ancora completa e che, in ogni caso, la standardizzazione non risolve i problemi derivanti dalla non-specificità di alcuni metodi di misura, che devono essere affrontati dai laboratoristi mediante la scelta di metodi adeguati.

Lo stato attuale della standardizzazione nel campo dell'enzimologia clinica è stato sintetizzato da Ferruccio Ceriotti (Ospedale S. Raffaele di Milano), che, citando un articolo del 2001 nel quale si posero le basi teoriche di questa attività (15), ha riferito quanto in questi ultimi 12 anni è stato fatto in proposito, con la definizione dei sistemi di riferimento per la misura degli enzimi clinicamente più importanti, come alanina e aspartato aminotransferasi, amilasi, creatinichinasi, fosfatasi alcalina (ALP), γ -glutamilttransferasi e lattato deidrogenasi, mentre il lavoro relativo alla lipasi pancreatica è ancora in corso. Il relatore ha sottolineato il fatto che laboratori di riferimento per la misura delle attività enzimatiche esistono per ora solo in Europa, risultando quindi di difficile impiego da parte degli utenti non europei, discutendo poi i fattori che contribuiscono al fatto che ancora una notevole percentuale di laboratori italiani non usa metodi chiaramente riferibili ai sistemi di riferimento proposti dall'IFCC (si va da solamente un 10% per le transaminasi a ~65% per la ALP – dato 2012 VEQ Prolarit), fra i quali spicca la mancanza di atteggiamento proattivo da parte dei professionisti di Medicina di Laboratorio con richiesta di specifici cambiamenti nell'offerta da parte dell'industria. Come conclusione, Ceriotti ha individuato come passo successivo fondamentale la necessità di dimostrare come l'approccio di standardizzazione della misura degli enzimi si possa trasformare in un vantaggio dimostrabile nella cura dei pazienti.

La standardizzazione della misura dell'emoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) è stata trattata da Andrea Mosca, il quale ha evidenziato che, al contrario degli enzimi, per questo analita esistono laboratori di riferimento anche fuori del vecchio continente, in Giappone, Cina e Stati Uniti. Da un sondaggio recente fra i laboratori italiani emerge inoltre un'altra differenza essenziale tra questo analita e gli enzimi precedentemente citati: la grande maggioranza dei laboratori italiani usa un metodo standardizzato al sistema di riferimento IFCC per la determinazione dell'HbA_{1c} e referta i valori usando l'unità SI (mmol/mol). Ci sono naturalmente ancora margini di miglioramento sia da parte dei produttori di

dei programmi di VEQ nell'era della riferibilità metrologica. Il relatore ha ricordato come sia stato per la prima volta durante un meeting CIRME nel 2010 che Mauro Panteghini ha definito il controllo di qualità analitica (se organizzato in maniera adeguata) come il quinto pilastro della riferibilità metrologica, dopo RMP, materiali di riferimento, laboratori di riferimento accreditati e intervalli di riferimento/livelli decisionali riferibili (Figura 1) (10). L'equivalenza dei risultati è la base per poter valutare l'utilità clinica delle informazioni fornite dal laboratorio e i programmi di VEQ hanno il ruolo fondamentale di verificarla e confermarla in pratica, valutando e comparando i risultati che derivano da laboratori e metodi differenti (11).

A chiusura della mattinata, Andrea Mosca (Università degli Studi di Milano) ha presentato una breve, ma molto interessante storia dei sistemi di misurazione, ricordando la data del 20 maggio come la giornata mondiale della metrologia. Infatti, il 20 maggio 1875 presso il Ministero

sistemi commerciali (ad es., migliorare l'imprecisione dei metodi, sviluppare materiali di controllo più adeguati, ecc.), che da parte dei fornitori di programmi di VEQ (assegnazione dei valori, commutabilità dei materiali, ecc.) (16).

Lo stato attuale del progetto di standardizzazione della misura della troponina I cardiaca (cTnI) è stato illustrato da Jill Tate (Pathology Queensland di Brisbane). Il problema di base per la standardizzazione di molti analiti di natura proteica, compresa la cTnI, è la definizione accurata del misurando e la diversa specificità degli anticorpi utilizzati nei vari sistemi commerciali. Per chiarire questo secondo aspetto, un importante studio pilota organizzato dal gruppo di lavoro dell'IFCC ha recentemente valutato, fra le altre cose, lo stato attuale di comparabilità dei metodi commerciali per la determinazione della cTnI. In aggiunta, è stata studiata la commutabilità e la stabilità di pool di siero umani da proporre come materiale di riferimento candidato a sostituire il materiale NIST SRM 2921, che, contenendo il complesso delle troponine I-C-T in forma purificata, non è commutabile per la maggior parte dei saggi commerciali. Lo studio ha trovato i pool di sieri perfettamente commutabili con tutti i metodi commerciali testati, consentendo di programmare come ulteriori fasi: a) la preparazione di un materiale di riferimento candidato (NIST SRM 2922) con le medesime caratteristiche dei pool valutati, b) l'assegnazione del valore certificato riferibile al SRM 2921 a questo materiale con associato l'intervallo di incertezza, c) la definizione di un protocollo di trasferimento del valore ai calibratori dei sistemi commerciali e d) la verifica finale dell'avvenuta armonizzazione.

L'ultima presentazione della giornata ha fornito il punto di vista dell'industria; Dave Armbruster (Abbott Diagnostics) ha prima riassunto gli obblighi dei produttori relativamente all'implementazione della riferibilità metrologica, definiti dalla Direttiva IVD dell'Unione Europea e dai vari standard ISO, per poi sottolineare la necessità di un cambiamento paradigmatico per i produttori IVD, che devono abbandonare l'idea tradizionale della competizione commerciale attraverso la produzione di prodotti che obbligatoriamente li diversifichino per concentrarsi sulla produzione di valori comparabili. Attraverso alcuni esempi, il relatore ha concluso che l'industria IVD in certi casi riesce oggi a rispettare pienamente gli obblighi richiesti per l'implementazione della riferibilità metrologica, mentre in altri casi ciò non avviene o avviene solo parzialmente.

In conclusione, si può certamente affermare che, attraverso la notevole qualità delle presentazioni, gli scopi educazionali alla base del meeting sono stati pienamente raggiunti. I partecipanti (Figura 2), provenienti da ogni parte del Mondo, hanno contribuito attivamente all'interessante discussione che si è focalizzata sui problemi che sorgono al momento dell'implementazione dei progetti di standardizzazione e sulle proposte per affrontarli e risolverli. Tutte le presentazioni sono disponibili sul sito web del CIRME, al link "Eventi".



Figura 2

BIBLIOGRAFIA

1. Infusino I, Braga F, Paleari R, et al. 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.
2. JCGM 200:2008. International Vocabulary of Metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd ed. 2008.
3. Vesper HW, Thienpont LM. Traceability in laboratory medicine. *Clin Chem* 2009;55:1067-75.
4. ISO 15193:2009. In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in samples of biological origin - Requirements for content and presentation of reference measurement procedures. Geneva, Switzerland, 2009.
5. Zegers I, Beetham R, Keller T, et al. The importance of commutability of reference materials used as calibrators: the example of ceruloplasmin. *Clin Chem* 2013;59:1322-9.
6. Rzychon M, Zegers I, Schimmel H. Analysis of the physicochemical state of C-reactive protein in different preparations including 2 certified reference materials. *Clin Chem* 2010;56:1475-82.
7. Boulo S, Hanisch K, Bidlingmaier M, et al. Gaps in the traceability chain of human growth hormone measurements. *Clin Chem*

- 2013;59:1074-82.
8. Stepman HC, Stöckl D, Twomey PJ, et al. A fresh look at analytical performance specifications from biological variation. *Clin Chim Acta* 2013;421:191-2.
 9. Van Houcke SK, Rustad P, Stepman HC, et al. Calcium, magnesium, albumin, and total protein measurement in serum as assessed with 20 fresh-frozen single-donation sera. *Clin Chem* 2012;58:1597-9.
 10. Panteghini M. Implementation of standardization in clinical practice: not always an easy task. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1237-41.
 11. Miller WG, Jones GRD, Horowitz GL, et al. VEQ: sfide attuali e prospettive future. *Biochim Clin* 2013;37:229-40.
 12. Myers GL, Miller WG, Coresh J, et al., for the National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group. Recommendations for improving serum creatinine measurement: A report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem* 2006;52:5-18.
 13. Infusino I, Panteghini M. Riferibilità metrologica e validità della determinazione della creatinina come indice di funzionalità renale. *Biochim Clin* 2007;31:13-8.
 14. Carobene A, Ceriotti F, Infusino I, et al. Valutazione dell'impatto del processo di standardizzazione sulla qualità della misura della creatininemia nei laboratori italiani. *Biochim Clin* 2012;36:414-24.
 15. Panteghini M, Ceriotti F, Schumann G, Siekmann L. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:795-800.
 16. Braga F, Panteghini M. Standardizzazione della misura e traguardi analitici per l'emoglobina glicata. *Biochim Clin* 2013;37:100-7.