

Linee guida per la produzione di intervalli di riferimento

D. Giavarina^a, R. M. Dorizzi^b, G. Guerra^c

^aLaboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

^bLaboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera, Verona

^cLaboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Ospedale "S. Anna", Ferrara

Introduzione

Recentemente Buttner ha ripercorso le tappe della nascita del concetto di normalità in medicina di laboratorio. È stato all'inizio del secolo scorso che il concetto "ontologico" della malattia ("la malattia esiste ed origina in se stessa") è stato sostituito dal concetto di un "continuum" tra stato di salute e stato di malattia. Broussals all'inizio del XIX secolo affermava che "la malattia fa allontanare lo stato fisiologico dal normale". Da questa rivoluzione origina la necessità di riconoscere non tanto le "stimmate" della malattia ma riconoscere quanto la quantità o la concentrazione di una sostanza è compatibile più con lo stato di malattia che con quello di salute. Quetelet propose per primo metodi matematico-statistici per riconoscere le caratteristiche "normali" ovvero quelle che sono osservate più frequentemente. Nel 1920 questo corpus dottrinale era ben definito ma pressoché sconosciuto al laboratorio clinico ed ancora più alla clinica (1). Il concetto "gaussiano" dell'intervallo di riferimento andò in crisi negli anni 60 quando venne dimostrato che, per esempio, la distribuzione di molti costituenti del siero è "skewed" (deviata) e la concentrazione "normale" dei lipidi nel siero non è necessariamente quella desiderabile. Questa crisi portò alla memorabile discussione che si svolse nell'autunno del 1968 davanti al caminetto in una sauna in un'isoletta nei pressi di Helsinki tra Grasbeck e Saris che videro per la prima volta, come ci raccontano, il bagliore intensissimo prodotto dall'idea degli intervalli di riferimento. Con questo aneddoto, così simile a quello associato alla scoperta della struttura ad anello del benzene di Friedrich August Kekulé nel 1855 (2), inizia un nuovo capitolo, che a nostro avviso comincia a chiudersi in questi anni, della storia del "riferirsi" in Medicina.

L'importanza di "riferirsi"

Interpretare gli esami di laboratorio significa confrontare i risultati dei test con "riferimenti" che permettano un giudizio e di conseguenza un'azione.

L'interpretazione si basa raramente sul confronto con un unico livello. Diverse condizioni patologiche possono essere riferite a concentrazioni più o meno elevate del costituente. Esiste inoltre il carattere dinamico della valutazione: si ricerca la variazione rispetto al risultato precedente.

Teoricamente oggi noi possiamo trovare sui referti di laboratorio almeno cinque strumenti diversi di comparazione dei valori misurati (3):

- Valutazioni biodinamiche: integrano e confrontano i risultati con modelli fisiopatologici, per consentire previsioni sulle condizioni del paziente.
- Valori di riferimento individuali: di fatto impossibili da ottenersi.
- Differenza critica: esprime se la differenza tra un risultato ed il precedente è significativa o se rientra nell'ambito della variabilità prevedibile di quel costituente.
- Livelli decisionali: molto diffusi e, molto spesso, non chiaramente differenziati dagli intervalli di riferimento. Di derivazione empirica, indicano la concentrazione al di sopra, o al di sotto della quale, viene presa una decisione medica. Facili da definire e da usare, hanno il limite della trasferibilità ad altre situazioni, diverse da quelle dove sono originariamente stati applicati.
- Valori di riferimento collettivi: sono i riferimenti più usati, anche se forse i meno informativi. Di fatto, permettono una valutazione "descrittiva" di una misurazione, un termine di distribuzione statistica.

Quando si introduce un nuovo esame i valori di riferimento collettivi sono gli strumenti più facilmente standardizzabili e, almeno teoricamente, più facilmente ottenibili. Teoria, pratica e standardizzazione della costruzione degli intervalli di riferimento sono state e sono tuttora oggetto di studio, dibattito e raccomandazioni. Tuttavia è esperienza comune nell'attività della grande maggioranza dei laboratori del nostro paese e del resto del mondo una scarsa aderenza alle raccomandazioni. È ripetutamente segnalata l'eterogeneità degli intervalli adottati da laboratori diversi senza che questo sia giustificato da differenze nella strumentazione impiegata e nella popolazione consi-

derata (4,5). Inoltre i limiti ottenuti in modo empirico o ricavati direttamente dagli inserti commerciali vengono frequentemente impiegati e denominati in modo indifferente “Valori normali”, “Limiti decisionali” o “Intervalli di riferimento”, mentre quest’ultima definizione dovrebbe essere riservata strettamente agli intervalli determinati sulla base delle raccomandazioni IFCC (6-11) o NCCLS (12).

Lo scopo del lavoro del nostro gruppo è stato quello di passare in rassegna le raccomandazioni più autorevoli sull’argomento e di sintetizzarne il contenuto e l’applicabilità. Inoltre, poiché è condivisibile l’opinione secondo cui gli approcci raccomandati, corretti ed eleganti dal punto di vista formale, risultano molto difficilmente implementabili nei laboratori clinici grandi e piccoli, accademici o rurali (13), verranno anche presentate le nostre esperienze più recenti in tema di produzione di intervalli di “riferimento” e la nostra proposta operativa.

Gli standard IFCC, ICSH e NCCLS

Lo standard C28-A2 del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) costituisce la più recente raccomandazione autorevole per la costruzione degli intervalli di riferimento. La teoria degli intervalli di riferimento, che fornisce le definizioni, i principi e le procedure per la determinazione e l’uso dei valori di riferimento è stata sviluppata dall’*Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV)* dell’*International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* e dallo *Standing Committee on Reference Values* dell’*International Council for Standardization in Hematology (ICSH)*.

La base su cui sono costruite le raccomandazioni per la definizione degli intervalli di riferimento è che, non essendo possibile standardizzare la “normalità”, essi hanno solo un valore descrittivo. I valori di riferimento descrivono la variabilità di un costituente in un campione di riferimento, ottenuto da una popolazione di riferimento. I valori di riferimento possono essere associati con lo stato di buona salute o con altre condizioni fisiologiche o patologiche e possono essere utilizzati con motivazioni differenti. In ogni caso, i valori di riferimento permettono di confrontare i dati ottenuti in un paziente con dati di riferimento derivati da una popolazione di riferimento. Questo confronto quindi diviene parte del processo di *decision-making*, per quanto riguarda il significato dei valori osservati e le condizioni del soggetto in cui viene raccolto il campione biologico. Tuttavia, da un punto di vista formale, e molto spesso anche sostanziale, essi non sono livelli decisionali, se non incidentalmente.

I valori di riferimento sono valori ottenuti sempre e solo dalla osservazione o dalla misura su individui di riferimento, appartenenti ad un campione di riferimento. L’intervallo di riferimento è normalmente l’intervallo centrale di valori delimitato dai limiti di riferimento a certi predefiniti percentili (di solito si con-

sidera il 95% centrale, ed i limiti sono il 2.5° ed il 97.5° percentile). I limiti di riferimento descrivono il campione di riferimento e sono strettamente dipendenti dalle caratteristiche della popolazione considerata.

Una terminologia rigorosa permette una migliore comprensione delle procedure standard di produzione degli intervalli di riferimento ed evita equivoci.

Individuo di riferimento: un soggetto selezionato sulla base di ben definiti criteri. Di solito è importante definire lo stato di salute della persona. Tuttavia va considerato che le caratteristiche del gruppo di soggetti di riferimento necessari dipendono dallo scopo per il quale noi produciamo l’intervallo di riferimento. Il gruppo di riferimento ideale per valutare la salute di un soggetto è diverso da quello ideale per classificare una malattia o per stimare la prognosi di una malattia ad un determinato stadio.

Popolazione di riferimento: un gruppo costituito da tutti gli individui di riferimento. Normalmente questa è una entità ipotetica, poiché non è dato sapere il numero di tutti i soggetti di riferimento. Teoricamente potrebbe essere definita anche da un solo soggetto (se stesso riferimento di se stesso), o da pochi individui (ad esempio, tutti i soggetti affetti da un particolare malattia rara).

Gruppo campione di riferimento: un numero adeguato di persone selezionate dalla popolazione di riferimento.

Valore di riferimento: il valore (il risultato) ottenuto dalla osservazione o dalla misura di un particolare tipo di quantità su un individuo di riferimento.

Distribuzione di riferimento: la distribuzione dei valori di riferimento. I parametri della ipotetica distribuzione della popolazione di riferimento possono essere stimati con opportuni metodi statistici.

Limiti di riferimento: derivati dalla distribuzione di riferimento ed utilizzati per scopi descrittivi senza alcuna relazione con limiti decisionali. Normalmente si definiscono dei limiti per cui una frazione dei valori di riferimento è inferiore o uguale al limite inferiore, oppure superiore o uguale al limite superiore.

Intervalli di riferimento: l’intervallo compreso tra i due limiti di riferimento. È davvero difficile da comprendere come nell’uso corrente (e, invero, anche in numerosi trattati, articoli, inserti di prodotti commerciali) sia frequente l’uso della parola range come sinonimo di intervallo. I documenti IFCC raccomandano di non usare il termine range come sinonimo di intervallo in quanto in alcuni contesti indica la differenza tra due valori e quindi vi potrebbero essere equivoci.

Valore osservato (risultato): è il valore di una particolare quantità, ottenuto mediante osservazione o misura in un soggetto, per essere comparata con valori, distribuzioni, limiti, intervalli di riferimento (Tab. I). La definizione dell’individuo, e quindi della popolazione, di riferimento dipende dallo scopo che ci si propone. In alcuni casi può essere utile “riferirsi” a soggetti “sani”, ma in altri è utile “riferirsi” a condizioni fisiologiche particolari (gravidanza, crescita, ecc.) o

a particolari aree geografiche o ambientali (medicina del lavoro, ecc.), ecc. Anche nel caso più comune e più diffuso, del confronto con soggetti “sani”, è raccomandata una definizione accurata dell’individuo di riferimento. Il termine “sano e in buona salute” è ambiguo e difficile da dimostrare. La definizione delle caratteristiche del riferimento permette invece una selezione indipendente da giudizi ambigui.

Si possono utilizzare due metodi per la selezione degli individui di riferimento:

a posteriori: prevede la selezione di un numero elevato di individui, comunque non inferiore a 2000, da una vasta popolazione, e quindi l’applicazione di criteri di ripartizione o stratificazione ed esclusione;

a priori: prevede la selezione di individui dalla popolazione utilizzando subito i criteri di ripartizione.

Gli standard propongono degli esempi di criteri di esclusione (alcolismo, malattia recente, allattamento, obesità, tossicodipendenza, fumo, trasfusioni e donazioni di sangue recenti, terapie farmacologiche, gravidanza, ecc.) e di ripartizione (razza, età, sesso, fase del ciclo mestruale, settimana di gravidanza, fumo, esercizio fisico, ecc.). I criteri di esclusione e ripartizione possono essere implementati mediante la somministrazione di un questionario accurato che può seguire il modello proposto dallo standard NCCLS C28-A2 (12) ed alcune semplici misurazioni (come peso e pressione arteriosa).

I risultati analitici ottenuti nella popolazione di riferimento devono riflettere tutte le variabili analitiche e preanalitiche che possono influenzare i risultati dell’analisi. Quindi, tutti i fattori preanalitici e le variabili analitiche devono essere chiaramente definiti e usati sia nella popolazione di riferimento che nella popolazione generale (14). Lo standard NCCLS fa riferimento a numerosi altri standard preparati dallo stesso organismo, sia per la parte preanalitica sia per la parte analitica (15-20).

Elaborazione statistica

L’elaborazione statistica dei valori di riferimento si attua in sei fasi distinte:

- raccolta
- ripartizione
- distribuzione
- identificazione dei valori aberranti o outlier
- stima dei limiti di riferimento
- stima dell’intervallo di confidenza dei limiti di riferimento.

La ripartizione ha lo scopo di ridurre le variazioni e quindi restringere gli intervalli. Alcune partizioni possono essere intuitive (sesso), mentre i limiti per altre, per esempio l’età sono complessi da definire. Test statistici sulle medie (test T di Student, analisi della varianza) o meglio test di confronto di variabilità (test F di Fischer, test di Bartlett, ecc.) possono aiutare a decidere se due gruppi sono diversi e quindi da ripartire o meno.

Recentemente in ambito laboratoristico ha trovato estimatori il test di Harris e Boyd (21,22) che, soprattutto nella “riscrittura” di Fuentes-Arderiu, è molto pratico (23). È necessario che, dopo la ripartizione, ogni sottogruppo mantenga una numerosità sufficiente.

La rappresentazione della distribuzione dei dati raccolti permette l’ispezione per l’eventuale presenza di curtosi, asimmetrie, outlier, bi o polimodalità. Questa ultima evenienza può suggerire la necessità di rivedere i criteri di inclusione/esclusione per la definizione della popolazione di riferimento o i limiti per le ripartizioni. I valori aberranti o outlier possono essere riconosciuti visivamente, come fuori curva di distribuzione, o valutati con criteri matematico – statistici (10).

La stima dei limiti di riferimento può essere ottenuta per via intuitiva, quando, ad esempio, il campione è poco numeroso. Questo metodo non ha ovviamente regole generali per la sua applicazione, ed è da evitare se metodi parametrici o non parametrici sono appli-

Tabella I. Relazione tra i diversi termini definiti dai documenti IFCC.

Azione	Fase di costruzione di un Intervallo di riferimento	Azione
Paziente Valore osservato (risultato) Comparazione	Individuo di riferimento	<i>Definizione</i>
	Compreso nella	
	Popolazione di riferimento	<i>Selezione</i>
	Da cui si seleziona	
	Gruppo campione di riferimento	<i>Determinazione</i>
	sul quale sono determinati i	
}	Valori di riferimento	<i>Descrizione</i>
	dai quali si può osservare una	
	Distribuzione di riferimento	<i>Calcolo</i>
	dalla quale sono calcolati i	
	Limiti di riferimento	<i>Definizione</i>
	che definiscono gli	
	Intervalli di riferimento	

cabili. Il metodo non parametrico consiste nel calcolare il 2.5° ed il 97.5° percentile della distribuzione dei valori di riferimento ottenuti. Poiché un α -frattile (ossia un valore x per il quale una frazione α della distribuzione è composta da valori inferiori a x) di un campione è ottenibile solamente se α è maggiore di $1/N$ (dove N è la numerosità del campione), risulta che per calcolare il 2.5° ed il 97.5° percentile occorre almeno una numerosità di 40 ($2.5/100 = 1/40$). L'intervallo di riferimento stimato da un campione di una popolazione potrebbe essere diverso da quello calcolato su un campione differente, per una semplice variabilità casuale di campionamento. Più grande è il campione, minore è questa possibilità di errore. Questo tipo di errore può essere misurato calcolando l'intervallo di confidenza del limite stimato, usando informazioni fornite dal campione stesso. L'intervallo di confidenza comprende il vero percentile che si vuole calcolare, con una specificata probabilità, di solito del 90 o 95%. Una numerosità di 120 valori permette una confidenza nel 2.5° percentile compreso tra il primo ed il settimo valore ottenuto, e del 97.5° percentile tra il 114° ed il 120° valore, con un livello di confidenza del 90%. Questa numerosità è considerata la minima accettabile per i metodi non parametrici.

Se il campione è distribuito, eventualmente dopo trasformazione logaritmica dei dati, in *maniera normale (gaussiana)* i limiti possono essere calcolati con metodi parametrici e non parametrici. Mentre i documenti IFCC dedicano ampio spazio al riconoscimento della distribuzione Gaussiana o meno ed al calcolo con metodo parametrico, lo standard NCCLS di fatto unifica le procedure nella sola stima non parametrica.

Lo stesso C28-A2 conviene che è poco realistico aspettarsi che ogni laboratorio, grande o piccolo, produca i suoi propri intervalli di riferimento seguendo una procedura così complessa, laboriosa e costosa. Conseguentemente lo stesso standard affronta la problematica della trasferibilità di intervalli di riferimento.

Trasferibilità

I requisiti per accettare il trasferimento dei valori di riferimento sono diversi a seconda che si trasferiscano intervalli per esami ottenuti con lo stesso metodo e strumentazione, nello stesso o da altri laboratori, nella stessa popolazione e in popolazioni di aree geografiche diverse.

L'adozione di intervalli prodotti da altri laboratori o dalle aziende produttrici è subordinata alla valutazione della comparabilità dei sistemi analitici e delle popolazioni in cui sono state eseguite le determinazioni. Se esiste già un intervallo di riferimento definito per il metodo precedente si può valutare il bias tra i due metodi usando lo standard EP9-T (24). Nel caso che la comparabilità non sia sufficiente, dovranno essere calcolati nuovi intervalli di riferimento.

Anche nel caso di metodi uguali, l'accettazione di intervalli prodotti da altri (come nel caso più frequente

degli intervalli proposti dai produttori dei metodi) è subordinata alla verifica che le popolazioni da cui sono ricavate siano uguali o simili e che le variabili preanalitiche siano ininfluenti o uguali.

È possibile "collaudare" gli intervalli proposti con un piccolo campione (20 soggetti sani che accedono al laboratorio e soddisfano tutti i criteri di esclusione e ripartizione) (12). Secondo il documento dell'NCCLS i limiti possono essere accettati se non più di 2 dei venti soggetti presentano valori non compresi all'intervallo proposto. Se 3 sono "fuori intervallo", dovranno essere analizzati altri 20 campioni. Questo sistema ha una probabilità del 5-7% di errore di rigetto dei limiti proposti. Altra soluzione proposta è il calcolo della distribuzione di riferimento biologica "vera", mediante la correzione della distribuzione per i bias metodologici locali e l'imprecisione (25).

Nonostante il tentativo dello standard NCCLS di trovare una soluzione alla difficoltà di produrre propri valori di riferimento, i laboratori non possono applicare facilmente le raccomandazioni sia per la produzione degli intervalli che per il loro semplice trasferimento. La realtà consolidata è che gran parte dei referti di tutti i laboratori del mondo riportano i limiti di riferimento derivati dalla letteratura e dal produttore del metodo. Altrettanto certo è che alcuni di questi intervalli sono molto diversi da quelli "veri".

Sia per trovare soluzioni maggiormente praticabili nella produzione degli intervalli di riferimento, sia per rendere più oggettiva l'osservazione, superando le problematiche di inclusione e ripartizione che i metodi classici hanno (difficoltà nella definizione della popolazione di riferimento), sono stati proposti metodi che si basano su tutti i risultati che il laboratorio produce per una determinata analisi.

Questi metodi cosiddetti oggettivi si basano sull'assunto che la maggior parte dei risultati prodotti dal laboratorio si riferisce a soggetti non affetti da malattia. Tra questi metodi possiamo citare la procedura di Bhattacharya (26), il metodo di Martin (27) ed il metodo di Kairisto (28-29). I primi due metodi presuppongono che la distribuzione di frequenza dei risultati sia di tipo gaussiano e comunque operano per normalizzare le distribuzioni di frequenza. La terza procedura ipotizza che la moda della distribuzione di frequenza di tutti i dati sia la stessa della eventuale popolazione di riferimento. In questa procedura, ciascun lato della distribuzione di frequenza è considerato come mezza distribuzione gaussiana, con la stessa moda e la stessa frequenza di moda, ma con differente deviazione standard. Questo metodo ha il vantaggio di essere incluso in un programma statistico per Windows (30) ed è stato impiegato negli ultimi 5 anni dal nostro gruppo in numerosi studi (31-35).

I vantaggi della stima degli intervalli di riferimento sulla base dei risultati dei pazienti sono numerosi:

- la procedura è semplice
- la procedura è economica
- i limiti sono derivati da valori ottenuti nelle stesse condizioni preanalitiche, con le stesse modalità ana-

litiche e nella stessa popolazione in cui saranno utilizzati

- è possibile ripartire, quando necessario, i risultati dei pazienti sulla base di variazioni biologiche (età, sesso, gravidanza, ecc.).

I tre metodi sopra citati sembrano avere performance simili tra loro (36) e comparabili con i documenti IFCC quando l'asimmetria e la curtosi delle distribuzioni di frequenza non sono molto ampie.

Il nostro gruppo ha studiato in modo sistematico impiegando il metodo di Kairisto gli "intervalli di riferimento" di numerosi costituenti di chimica clinica, ematologia, endocrinologia ed oncologia in tre laboratori diversi che impiegano analizzatori e sistemi in alcuni casi uguali ed in altri diversi.

Sono immediate almeno tre considerazioni (Tab. II):

- la tecnica statistica appare ripetibile
- i risultati ottenuti dai diversi laboratori sono comparabili
- in alcuni casi si evidenziano notevoli differenze con gli intervalli di riferimento impiegati dai tre laboratori. Il limite inferiore per l'emoglobina nella donne (da 9.9 a 10.5 g/dL) è sicuramente lontano da quello di 12 g/dL comunemente adottato; il limite superiore per l'ALT conferma la marcata differenza tra maschi e femmine; il limite superiore della glicemia è molto più vicino ai 126 mg/dL, oggi considerati il livello decisionale principale a digiuno, rispetto al classico 110 mg/dL; la concentrazione di TSH non sembra aumentata nell'anziano.

Conclusioni

La produzione di intervalli di riferimento è una procedura oggi rigorosamente e necessariamente standardizzata. L'aderenza a questi standard non è prescindibile, ma è sicuramente complessa, difficile, costosa ed il più delle volte non applicabile. Lo scarso impatto che questi standard hanno sull'attività di laboratorio è dimostrato anche da come questi documenti siano di fatto poco conosciuti nel contenuto. Inoltre, quando ci si cimenta in queste imprese, molte volte si trovano difficoltà oggettive non superabili. A solo

titolo di esempio, basti pensare cosa significhi produrre intervalli di riferimento per pazienti pediatrici: ottenere numerosità sufficiente, ottenere il consenso al prelievo non finalizzato alla cura del soggetto, valutare correttamente i criteri di inclusione, ecc.

Eppure tutti i laboratori sono quotidianamente impegnati nel dare dei riferimenti per l'interpretazione dei loro risultati. Le possibilità alternative che si hanno sono tre:

- adottare limiti di riferimento prodotti da altri laboratori dopo la verifica della loro trasferibilità;
- produrre valori di riferimento in attività multicentriche (22);
- usare i risultati dei pazienti per "stimare" l'intervallo di riferimento, mediante sistemi diretti o indiretti.

Tutti i laboratori hanno archiviati, in formati oggi trattabili informaticamente, molte centinaia di migliaia di risultati. In linea teorica, su questi database sono già registrati tutti i dati necessari per produrre sia valori di riferimento relativi alla condizione di salute che alla condizione di malattia (28) e, se solo avessimo la possibilità di una corretta classificazione in differenti categorie diagnostiche, potremmo utilizzare metodi diretti. Questo potrebbe essere attuabile se le informazioni di laboratorio fossero collegate ad informazioni contenute in cartelle cliniche informatizzate.

Poiché molto spesso un gran numero di analisi è eseguito su soggetti non affetti dalle patologie indagate, l'analisi di un grande numero di risultati dovrebbe permettere di discriminare, con metodi statistici appropriati, i risultati dei soggetti affetti dalla patologia, rispetto a tutti gli altri.

I metodi indiretti hanno sicuramente bisogno di minore standardizzazione, poiché eliminano alla fonte le problematiche soggettive di identificazione della popolazione di riferimento e perché riproducono tutte le condizioni pre-analitiche ed analitiche in gioco (metodi oggettivi). Per la loro semplicità e rapidità d'uso andrebbero almeno tentati, prima di arrendersi alla impossibilità di dare un qualsiasi solido riferimento. Di contro, non sono applicabili se troppi risultati provengono da soggetti "malati". Hanno inoltre problemi quando le distribuzioni ottenute non sono sufficientemente simmetriche o presentano curtosi elevate.

Tabella II. Intervalli di riferimento ottenuti nei 3 diversi laboratori (tra parentesi è indicato il numero dei soggetti selezionati).

Costituente	Sesso, classe di età	Ferrara	Verona	Vicenza
ALT (U/L - 37°C)	M, 13-70a	10-44 (13176)	7-46 (22129)	11-53 (8928)
ALT (U/L - 37°C)	F, 13-70a	7-30 (18911)	6-35 (13901)	7-31(15408)
GGT (U/L - 37°C)	M, 13-70a	5-60 (5011)	7-56 (18758)	7-56 (7967)
GGT (U/L - 37°C)	F, 13-70a	1-27 (7374)	4-28 (18954)	4-25 (10960)
Glicemia (mg/dL)	M, 13-70a	81-122 (12187)	83-122 (15052)	76-122 (16935)
Glicemia (mg/dL)	F, 13-70a	75-111 (22364)	79-113 (27239)	70-108 (28141)
Emoglobina (g/dL)	M, 13-70a	11.5-16.7 (49113)	12.0-16.6 (18952)	12.0-16.9 (14296)
Emoglobina (g/dL)	F, 13-70a	9.9-14.8 (63464)	10.6-15.2 (16734)	10.5-15.3 (20792)
TSH (mUI/L)	M+F, 13-70a	0.39-4.11 (6078)	0.22-3.6 (26001)	0.28-3.50 (40095)
TSH (mUI/L)	M+F, >70a	0.26-4.00 (2240)	0.20-3.61 (9337)	0.21-3.29 (9992)

Alcuni mesi fa un editoriale di alcuni degli estensori dei documenti dell'IFCC dedicati alla produzione degli intervalli di riferimento auspicava l'impiego delle nuove risorse della tecnologia per la produzione e l'impiego degli intervalli di riferimento (13).

Nei sei mesi successivi, sullo stesso giornale sono stati pubblicati studi che sperimentavano tecniche, analisi, analizzatori e sistemi diversi per ottenere questo risultato in paesi come Regno Unito (4), Svezia (37,38), Spagna (39) e Giappone (40). Ciò dimostra che l'appello è stato raccolto ed il "concetto degli intervalli di riferimento viene rivisitato".

Se le informazioni mediche diventeranno disponibili, in formati "trattabili", non solo dal laboratorio, ma anche al laboratorio, potremmo utilizzare metodi diretti sugli stessi dati per i quali oggi si possono utilizzare solo metodi indiretti. Leggere gli standard per la definizione degli intervalli di riferimento con questa possibilità tecnica, sarà allora meno angosciante. Avremo addirittura nuove e più sofisticate armi per svolgere un ruolo rilevante nella diagnosi, nel monitoraggio e nella prognosi delle malattie.

Bibliografia

- Büttner J. Biological variation and quantification in health: the emergence of the concept of normality. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:69-73.
- Rothenberg A. Creative homospital and janusian processes in Kekulé's discovery of the structure of the benzene molecule. In: Wotiz JH, Ed. *The Kekulé riddle*. Clearwater, FL: Cache River Press, 1993;285-313.
- Pradella M, Dorizzi RM. Il problema dei valori di riferimento. In: Burlina A, ed. *Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio*. Padova: Piccin ed., 1995; Vol. I, Sez. I, Cap 6.
- Andrew CE, Hanning I, McBain AM, Moody D, Price A. A model for multicentre approach to the derivation of reference intervals for thyroid hormones and testosterone for laboratories using identical analysers. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1013-9.
- Zardo L, Secchiero S, Sciacovelli L, Bonvicini P, Plebani M. Reference intervals: are interlaboratory differences appropriate? *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1131-3.
- Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25:337-42.
- PetitClerc C, Solberg HE. 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;25:639-644.
- Solberg HE, PetitClerc C. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26:593-8.
- Solberg HE, Stamm D. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer, and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29:531-5.
- Solberg HE. Approved recommendations (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:645-56.
- Dybkaer R, Solberg HE. Approved recommendations (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:657-62.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline. NCCLS document C28-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2000; Vol. 20, n. 13.
- Henny J, Petitclerc C, Fuentes-Arderiu X, Hyltoft Petersen P, Queralto JM, Schiele F, et al. Need for revisiting the concept of reference values. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:589-95.
- Statland BE, Winkel P. Selected pre-analytical sources of variation in reference values. In: Grasbeck R, Alstrom T, eds. *Reference values in laboratory medicine*. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd., 1981; 127-37.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; Approved Standard-Fourth Edition. NCCLS document H3-A4. Villanova, PA: NCCLS, 1998; Vol. 18, n.7.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by skin puncture - third edition; Approved Standard. NCCLS document H4-A3. Villanova, PA: NCCLS, 1991; Vol. 11, n. 11.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Percutaneous collection of arterial blood for laboratory analysis-Second Edition; Approved Standard. NCCLS document H11-A2. Villanova, PA: NCCLS, 1992; Vol. 11, n.8.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays; Approved Guideline-Third Edition. NCCLS document H21-A3. Villanova, PA: NCCLS, 1998; Vol. 18, n.20.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the handling and processing of blood specimens; Approved Guideline. NCCLS document H18-A. Villanova, PA: NCCLS, 1990; Vol. 10, n.12.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control: principles and definitions; Approved Guideline, NCCLS document C24-A. Villanova, PA: NCCLS, 1991; Vol. 11, n.6.
- Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem* 1990;36:265-70.
- Ferre-Masferrer M, Fuentes-Arderiu X, Alvarez-Funes V, Guell-Mirò R, Castineiras-Lacaambra MJ. Multicentric reference values: shared reference limits. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:715-8.

23. Fuentes-Arderiu X, Ferre-Masferrer M, Alvarez-Funes V. Harris & Boyd's test for partitioning the reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:733.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples; Approved Guideline. NCCLS document EP9-A. Villanova, PA: NCCLS, 1995;Vol 15, n.17.
25. PetitClerc C, Kelly A. Transferability of reference data. In: Grasback R, Alstrom T, eds. Reference values in laboratory medicine. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., 1981.
26. Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. *Biometrics* 1967;23:115-35.
27. Martin HF, Hologgitas JV, Driscoll J, Fanger H, Gudzinowicz BJ, Barnett R. Reference values based on population accessible to hospitals. In: Gräsbeck R, Alström T, eds. Reference values in laboratory medicine. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1981;233-62.
28. Kouri T, Kairisto V, Virtanen A, Uusipaikka E, Rajamaki A, Finneman H, et al. Reference intervals developed from data for hospitalized patients: computerized method based on combination of laboratory and diagnostic data. *Clin Chem* 1994;40:2209-15.
29. Kairisto V, Hanninen KP, Leino A, Pulkki K, Peltola O, Nanto V, et al. Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:789-96.
30. Kairisto V, Poola A. Software for illustrative presentation of basic clinical characteristics of laboratory tests: GraphROC for Windows. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55:43-60.
31. Dorizzi RM, Guzzo P, Franceschini S, Caputo M. GraphRocTM: un versatile ed efficace strumento per la manutenzione degli intervalli di riferimento. *Med Lab* 1996;4:411.
32. Dorizzi RM, Ferrari F, Caputo M, Pigoli G. Verifica degli intervalli di riferimento per gli esami di chimica clinica in un laboratorio di patologia clinica. *Med Lab* 1997; 5:518.
33. Dorizzi RM, Giavarina D. Intervalli di riferimento in ematologia: una tecnica del passato per uno strumento del futuro. *Med Lab* 1999;7:399.
34. Dorizzi RM, Schinella M, Pupillo A. Reference values of biochemical tests calculated using data from routine laboratory data. *Clin Chem* 1999;45: A99.
35. Dorizzi RM, Schinella M, Pupillo A, Endrizzi L. Hematological health-related intervals estimated using an in direct method in order to satisfy the accreditation standards. *Accred Qual Assur* 2000; 5:367-70.
36. Ferre-Masferrer M, Fuentes-Arderiu X, Puchal-Ane R. Indirect reference limits estimated from patients' results by three mathematical procedures. *Clin Chim Acta* 1999;279:97-105.
37. Kallner A, Gustavsson E, Hending E. Can age and sex related reference intervals be derived for non-healthy and non-diseased individuals from results of measurements in primary health care? *Clin Chem Lab Med* 2000;38:633-54.
38. Back S-E, Nilsson J-E, Fex G, Jeppson J-O, Rosen U, Tryding N, et al Towards common reference intervals in clinical Chemistry. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:573-92.
39. Ferre-Masferrer M, Fuentes-Arderiu X, Gomà-Llongueras M, Alumà-Trullas A, Aramendi-Ramos M et al. Regional reference values for some quantities measured with the ADVIA Centaur analyser. A model of co-operation between the in vitro diagnostic industries and clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:166-9.
40. Kinoshita S, Toyofuku M, Iida H, Wakiyama M, Kurihara M, Nakahara M. Standardization of laboratory data and establishment of reference intervals in the Fukuoka prefecture: a japanese perspective. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:256-62.