

Stima dell'incertezza della misura della concentrazione di attività catalitica dell'alanina amminotransferasi (ALT) nel siero mediante il metodo di riferimento IFCC

Erika Frusciante, Ilenia Infusino, Mauro Panteghini

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

ABSTRACT

Calculation of uncertainty of measurement of the catalytic activity concentration of alanine aminotransferase (ALT) in serum by the IFCC reference procedure. The goal of standardization of measurements in Laboratory Medicine is to achieve comparable results in human samples, independent of the laboratory and/or the method used. This can be achieved by the adoption of the "reference system" approach, based on the concept of metrological traceability and a hierarchy of measurement procedures. The reference system requires reference procedures, reference materials and reference laboratories, which are able to produce results within defined limits of uncertainty. The model used by the reference laboratories to estimate the measurement uncertainty is the "bottom-up" approach proposed by the Guide to the expression of uncertainty of measurement (GUM). The purpose of this study was to estimate the uncertainty associated with the measurement of the catalytic activity concentration of the enzyme ALT by the IFCC reference procedure using this approach. All the sources of uncertainty were identified and their contribution to the final expanded uncertainty was calculated using literature data or *ad hoc* experiments. We obtained an expanded uncertainty of 2.36%, comparable to that already calculated and published by other accredited reference laboratories. The uncertainty budget was built showing that concentrations and lot of reagents and measurement repeatability are the main components of the expanded uncertainty of the ALT measurements.

INTRODUZIONE

L'importanza della determinazione degli enzimi in clinica come indicatori sensibili di numerosi stati patologici e la frequente determinazione di alcuni di essi nei laboratori clinici sottolinea l'importanza di produrre risultati standardizzati (1). L'obiettivo primario della standardizzazione della misura dell'attività catalitica degli enzimi è quello di ottenere risultati attendibili dal punto di vista analitico e confrontabili indipendentemente dal laboratorio e/o dal metodo utilizzato per produrli. Questo è reso possibile grazie all'adozione del concetto di "sistema di riferimento", basato sulle nozioni di riferibilità metrologica e di gerarchia delle procedure di riferimento (2-4). Nell'applicazione della teoria del sistema di riferimento, gli enzimi rappresentano una classe particolare di analiti (5, 6). Essi sono definiti in termini della cosiddetta "attività catalitica", che rappresenta la quantità di un determinato substrato convertita in prodotto in un determinato sistema di misura. I risultati delle misure di attività catalitica dipendono interamente dalle condizioni sperimentali in cui tali misure sono effettuate. Pertanto, in enzimologia la procedura di

riferimento, che definisce le condizioni ottimali alle quali una determinata attività enzimatica è misurata, occupa il livello più alto nella catena della riferibilità (7). In aggiunta alla procedura di riferimento, il sistema necessita anche di materiali di riferimento, per il trasferimento dell'esattezza dalla procedura di riferimento ai metodi commerciali di laboratorio, e di laboratori di riferimento, che sono in grado di fornire un servizio di misura secondo i requisiti analitici specificati nelle procedure di riferimento per la misura dell'attività catalitica enzimatica, producendo in tal modo risultati entro limiti di incertezza ristretti e definiti (1, 5).

Il concetto di incertezza ("uncertainty") fu introdotto negli anni '90 in seguito alla mancanza di consenso sul modo in cui esprimere la qualità dei risultati delle misure. Sebbene si possa facilmente comprenderne il significato, la sua stima può tuttavia essere difficile da ottenere nella pratica quotidiana (8). Nell'"International Vocabulary of Metrology" (VIM) l'incertezza della misura è definita come il "parametro associato al risultato caratterizzante la dispersione del valore, che può ragionevolmente essere attribuita al misurando" (9). Un apposito documento ["Evaluation of measurement data - Guide to

Corrispondenza a: Ilenia Infusino, Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Via Giovanbattista Grassi 74, 20100 Milano. Tel. 0239042290, Fax 0239042896, E-mail infusino.ilenia@hsacco.it

Ricevuto: 02.11.2010

Revisionato: 02.11.2010

Accettato: 03.11.2010

the expression of uncertainty in measurement" (GUM)] descrive le modalità con cui calcolare l'incertezza della misura, il cui modello è definito "bottom-up" (10). Tale modello prevede la definizione del misurando, l'identificazione delle fonti di incertezza, la quantificazione dei contributi di incertezza di tipo A, dovute alla stima statistica di componenti casuali, e di tipo B, dovuta alle componenti stimate grazie a informazioni specifiche (certificato di analisi dei reagenti, dati di operazioni di taratura, specifiche del fabbricante, ecc.) ed, infine, il calcolo dell'incertezza estesa, che fornisce un intervallo all'interno del quale si può ritenere si trovi il valore del misurando con un più elevato livello di fiducia (10-13).

Nel presente lavoro abbiamo sperimentalmente stimato l'incertezza associata alla misura della concentrazione di attività catalitica dell'enzima ALT eseguita mediante il metodo di riferimento IFCC, utilizzando l'approccio della GUM.

MATERIALI E METODI

La procedura di riferimento per la determinazione dell'ALT era eseguita in accordo con quanto pubblicato da Schumann et al. (14). Le misure erano eseguite su spettrofotometro Lambda 25 (Perkin Elmer).

In aggiunta all'incertezza di tipo A, rappresentata dalla ripetibilità della misurazione, tra le possibili fonti di incertezza di tipo B che influenzano una misura enzimatica (15), quelle che teoricamente contribuiscono in maniera non trascurabile all'incertezza estesa globale della misura dell'attività catalitica dell'ALT eseguita

mediante la procedura di riferimento sono elencate nella Tabella 1. I dati di incertezza massima accettabile relativi a queste componenti sono stati ricavati dalle specifiche dei produttori, dal documento IFCC (14), da periodiche operazioni di taratura o da dati di riferimento ottenuti da banche dati (13). Ogni dato di incertezza massima accettabile deve essere convertito in scarto tipo, che, supponendo una distribuzione dei valori di tipo rettangolare, si ottiene dividendo il valore di incertezza massima accettabile per radice quadrata di 3, e le rispettive incertezze standard relative sono ottenute dopo moltiplicazione dello scarto tipo per i coefficienti di sensibilità (10). Tali coefficienti rappresentano dei fattori moltiplicativi, che indicano il peso dell'influenza di quella particolare variabile sul risultato finale.

In questo lavoro, i coefficienti di sensibilità relativi ad assorbanza, lotto dei reagenti, frazione di volume del campione, durata della misura, evaporazione e invecchiamento del campione sono stati posti uguali a 1 (12), mentre i coefficienti di sensibilità relativi a lunghezza d'onda, pH, temperatura e concentrazione reagenti sono stati ricavati sperimentalmente, analizzando in triplicato per 3 giorni consecutivi tre pool di sieri umani (pool H, M e L, con attività catalitica di circa 160 U/L, 120 U/L e 50 U/L, rispettivamente), modificando di volta in volta le condizioni sperimentali relative ai singoli aspetti rispetto a quelle specificate nella procedura di riferimento per la misura della ALT. Le condizioni di misura del metodo di riferimento IFCC e quelle applicate nel protocollo sperimentale sono riportate nella Tabella 2. I coefficienti di sensibilità sono calcolati come la massima differenza tra la media

Tabella 1

Fonti di incertezza di tipo B, incertezza massima accettabile e origine del suo valore

Componente	Incetezza massima accettabile	Origine
Lunghezza d'onda	0,1 nm	Specifiche del produttore
Assorbanza	0,3%	Specifiche del produttore
pH	0,05 unità pH	Documento IFCC
Temperatura	0,1 °C	Documento IFCC
Concentrazione dei reagenti	1,5%	Documento IFCC
Lotto dei reagenti	1,5%	Banche dati
Frazione di volume del campione	0,4%	Periodiche operazioni di taratura
Durata della misura	0,03%	Banche dati
Evaporazione	0,1%	Banche dati
Invecchiamento del campione	0,5%	Banche dati

Tabella 2

Condizioni di misura del metodo di riferimento IFCC e del protocollo sperimentale applicato per la valutazione dell'entità dell'incertezza

Parametro	Metodo di riferimento	Ambito di variazione previsto dal protocollo sperimentale
Lunghezza d'onda	339±1 nm	338–340 nm
pH	7,15±0,05 unità pH	7,072–7,241 unità pH
Temperatura	37±0,1 °C	36–38 °C
Concentrazione dei reagenti	100%	97,5–102,5%

dell'attività catalitica dell'ALT misurata sui 3 campioni utilizzati secondo le condizioni della procedura di riferimento, intesa come attività catalitica pari al 100%, e quelle ottenute in seguito alle variazioni previste dal protocollo sperimentale. Per quanto riguarda il pH, i coefficienti di sensibilità sono stati calcolati come differenza tra l'attività catalitica a pH 7,15, pari al 100%, e quelle a pH di 7,10 e 7,20, ottenute interpolando i dati di attività catalitica dei 3 campioni utilizzati ai diversi pH con una regressione polinomiale di terzo grado. Allo stesso modo, i coefficienti di sensibilità associati alla variazione della concentrazione dei reagenti sono stati ricavati interpolando i dati alle concentrazioni pari al 99% e al 101%.

La ripetibilità della misura, classificata come incertezza di tipo A, è stata ricavata misurando la concentrazione di attività catalitica dell'ALT di un materiale liofilo (Calibrator for automated systems CFAS, cod. 10759350, lotto 150887, Roche Diagnostics) per 3 giorni consecutivi in triplicato. Ogni giorno un flacone di materiale liofilo era ricostituito con 3 mL di acqua distillata, secondo le indicazioni del produttore.

RISULTATI

I risultati relativi alla stima dell'incertezza di tipo A (ripetibilità) sono riportati nella Tabella 3. La DS della media delle medie (0,65 U/L) rappresenta l'incertezza

massima accettabile della ripetibilità e lo scarto tipo sperimentale della media (0,38 U/L) è calcolato dividendo tale valore per la radice quadrata del numero di determinazioni ($n=3$).

Per quanto riguarda l'incertezza di tipo B, gli effetti, rispettivamente, della variazione della temperatura, della lunghezza d'onda, della concentrazione dei reagenti e del pH sull'attività catalitica dell'ALT (% di attività) dei 3 pool misurati sono riportati nella Figura 1. I risultati riguardanti i coefficienti di sensibilità ottenuti sperimentalmente sono riportati nella Tabella 4.

La Tabella 5 riporta tutti i dati utilizzati per il calcolo dell'incertezza estesa secondo la GUM. A parte il dato

Tabella 3

Stima dell'incertezza di tipo A (ripetibilità della misurazione)

Giorno	Attività catalitica, U/L			Media, U/L
	Replicato 1	Replicato 2	Replicato 3	
1	84,87	87,36	85,23	85,82
2	85,68	86,13	84,63	85,48
3	84,60	83,10	86,00	84,57
	Media delle medie			85,29 U/L
	DS della media delle medie			0,65 U/L
	Scarto tipo sperimentale della media			0,38 U/L

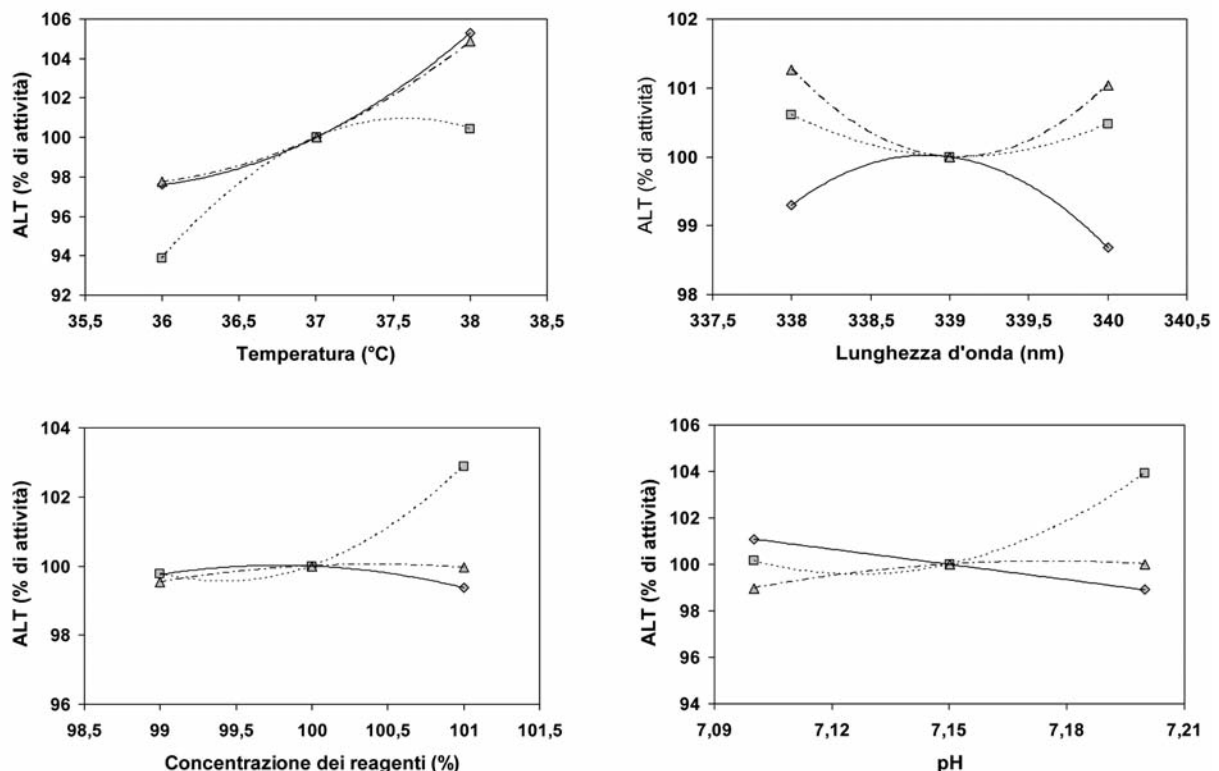


Figura 1

Misura dell'attività catalitica dell'alanina amminotrasferasi (ALT) mediante procedura di riferimento: effetto della variazione di temperatura, lunghezza d'onda, concentrazione dei reagenti e pH sulle concentrazioni dei 3 pool di siero misurati (rombo, pool L; quadrato, pool M; triangolo, pool H). Ciascun punto rappresenta la media di 3 replicati.

Tabella 4*Coefficienti di sensibilità ottenuti sperimentalmente*

Parametro	Valore	Attività catalitica relativa, %	Coefficiente di sensibilità
Lunghezza d'onda	339 nm	100,00	0,39 (per 1 nm)
	338 nm	100,39	
	340 nm	100,07	
Temperatura	37 °C	100,00	3,60 (per 1 °C)
	36 °C	96,40	
	38 °C	103,54	
Concentrazione dei reagenti	100%	100,00	0,56 (per 1% di variazione)
	99%	99,53	
	101%	100,56	
pH	7,15	100,00	0,34 (per 0,05 unità pH)
	7,20	99,66	
	7,10	100,15	

Tabella 5*Risultati utilizzati per il calcolo dell'incertezza estesa secondo GUM nella misurazione dell'attività catalitica dell'alanina amminotransferasi (ALT) con procedura di riferimento*

Componente	Incertezza massima accettabile	Scarto tipo	Coefficiente di sensibilità	Incertezza standard relativa	Varianza
Lunghezza d'onda	0,1 nm	0,06 nm	0,39	0,02%	0,001%
Assorbanza	0,3%	0,17%	1	0,17%	0,030%
pH	0,05 U	0,03 U	0,34	0,20%	0,039%
Temperatura	0,1 °C	0,06 °C	3,60	0,21%	0,043%
Concentrazione reagenti	1,5%	0,87%	0,56	0,48%	0,235%
Lotto reagenti	1,5%	0,87%	1	0,87%	0,760%
Frazione di volume del campione	0,4%	0,23%	1	0,23%	0,053%
Durata della misura	0,03%	0,02%	1	0,02%	0,000%
Evaporazione	0,1%	0,06%	1	0,06%	0,004%
Invecchiamento del campione	0,5%	0,29%	1	0,29%	0,084%
Ripetibilità	0,65 U/L	0,38 U/L	1	0,38%	0,144%
					Totale 1,393%

riguardante la ripetibilità, espresso in termini di scarto tipo sperimentale della media, tutti gli altri dati sono stati trasformati in termini di scarto tipo supponendo una distribuzione dei valori di tipo rettangolare e quindi dividendo il valore di incertezza massima accettabile per radice quadrata di 3. Il quadrato delle incertezze standard relative, ottenute dopo la moltiplicazione dello scarto tipo per i coefficienti di sensibilità, costituisce la varianza. Dalla radice quadrata della somma delle varianze (1,393%) si è ottenuta l'incertezza tipo composta, che è pari a 1,18%, che moltiplicata per il fattore di copertura $k=2$ (livello di confidenza 95%) dà un'incertezza estesa di 2,36%, che rappresenta la stima dell'incertezza media della misura dell'enzima ALT utilizzando il metodo di riferimento IFCC nelle nostre

condizioni sperimentali.

Dai dati di varianza dei parametri fonte di incertezza esaminati si è costruito il budget di incertezza, dal quale risulta che concentrazione e lotto dei reagenti e ripetibilità della misura rappresentano le principali componenti della incertezza estesa della misura dell'ALT con il metodo di riferimento (Figura 2).

DISCUSSIONE

Per il calcolo dell'incertezza, il modello utilizzato dai laboratori accreditati che eseguono le procedure di riferimento è quello proposto dalla GUM, il quale richiede l'identificazione di tutte le cause che contribuiscono in modo significativo all'incertezza associata a una determinata misura, la loro quantificazione, il calcolo di

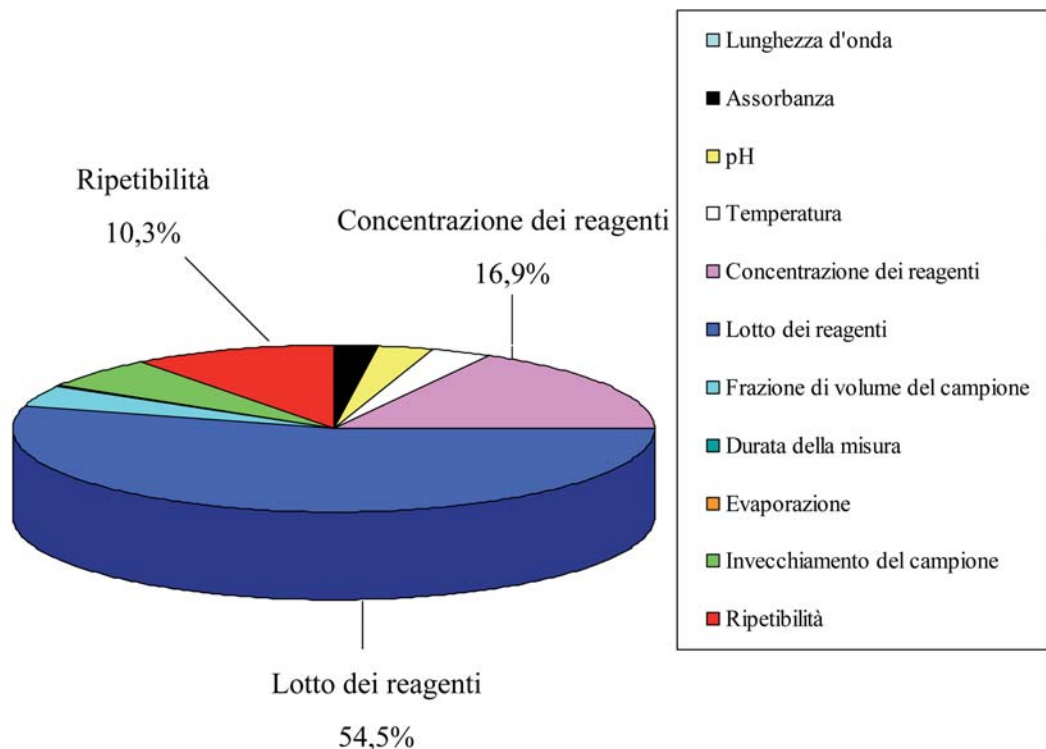


Figura 2

Budget dell'incertezza della misura dell'alanina amminotrasferasi con la procedura di riferimento IFCC.

coefficienti di sensibilità per definirne l'impatto sul risultato finale e, infine, la loro somma per ottenere l'incertezza tipo composta (10). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di stimare sperimentalmente l'incertezza associata alla misura della concentrazione di attività catalitica dell'enzima ALT mediante il metodo di riferimento IFCC utilizzando questo approccio.

Dai risultati ottenuti, si è evidenziato che concentrazione e lotto dei reagenti e ripetibilità della misura costituiscono i parametri che influenzano maggiormente l'incertezza della misura dell'ALT. Tale risultato è in perfetto accordo con quanto ottenuto da Klauke e Schumann nel laboratorio di riferimento della Società Tedesca di Biochimica Clinica e di Medicina di Laboratorio (DGKL) (13). Inoltre, il risultato di incertezza estesa ottenuto nel presente lavoro (2,36%) si può confrontare con l'incertezza estesa dichiarata dai laboratori di riferimento accreditati per l'esecuzione del metodo di riferimento dell'ALT presenti nel "database" del "Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine" (JCTLM) (Tabella 6) (16). Da questo confronto si evidenzia come l'incertezza estesa della misura dell'enzima ALT con il metodo di riferimento IFCC ottenuta dal presente lavoro risulti simile a quelle dichiarate dai 4 laboratori di riferimento accreditati. Il risultato, in particolare, rispecchia quello ufficialmente dichiarato dal laboratorio di riferimento del CIRME (Centro di Taratura Accreditato SIT 217), centro in cui è stato svolto il presente lavoro, ed è anche sovrapponibile a quello dichiarato dal laboratorio tedesco del DGKL, noto per la grande esperienza nel campo dell'enzimologia (13).

Tabella 6

Incetenza estesa dichiarata dai laboratori di riferimento accreditati per l'esecuzione del metodo di riferimento dell'alanina amminotrasferasi nel siero, riconosciuti dal "Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine" (JCTLM)

Laboratorio	Nazione	Incetenza estesa dichiarata
Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME)	Italia	2,3%
Società Tedesca di Biochimica Clinica e di Medicina di Laboratorio (DGKL)	Germania	2,2%
Società per la Promozione della Assicurazione della Qualità nei Laboratori Biomedici (Instand e.V.)	Germania	3,0%
Laboratorio di Riferimento in Enzimologia Clinica (LREC)	Spagna	3,3%

GLOSSARIO

Fattore di copertura (k) ("Coverage factor") - Fattore numerico utilizzato come moltiplicatore dell'incertezza tipo composta per ottenere un'incertezza estesa.

Incetenza di misura ("Uncertainty of measurement") - Parametro associato al risultato di una misurazione, che

caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando.

Incertezza tipo ("Standard uncertainty") - Incertezza del risultato di una misurazione espressa come scarto tipo.

Incertezza tipo composta ("Combined standard uncertainty") - Incertezza tipo del risultato di una misurazione allorché il risultato è ottenuto mediante i valori di un certo numero di altre grandezze; essa è uguale alla radice quadrata positiva di una somma di termini, che sono le varianze o le covarianze di quelle grandezze pesate secondo la variazione del risultato della misurazione al variare di esse.

Incertezza estesa ("Expanded uncertainty") - Grandezza che definisce, intorno al risultato di una misurazione, un intervallo che ci si aspetta comprendere una frazione rilevante della distribuzione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando.

Riferibilità ("Traceability") - Proprietà del risultato di una misurazione o del valore di un campione tale che esso possa essere collegato a riferimenti determinati, generalmente standard nazionali o internazionali, attraverso una catena ininterrotta di confronti tutti con incertezza dichiarata.

Scarto tipo campionario (s) ("Sample standard deviation") - Stima dello scarto tipo della popolazione ottenuta da un campione di n risultati.

Scarto tipo sperimentale della media (s_x) ("Standard deviation of the mean") - Lo scarto tipo sperimentale della media \bar{x} di n valori presi da una popolazione è dato dallo scarto tipo campionario diviso la radice quadrata di n .

BIBLIOGRAFIA

1. Infusino I, Bonora R, Panteghini M. Traceability in clinical enzymology. *Clin Biochem Rev* 2007;28:155-61.
2. Panteghini M. Traceability, reference systems and result comparability. *Biochim Clin* 2007;31:247-53.
3. Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem* 2009;42:236-40.
4. Vesper HW, Thienpont LM. Traceability in laboratory medicine. *Clin Chem* 2009;55:1067-75.
5. Panteghini M, Ceriotti F. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Biochim Clin* 2000;24:499-508.
6. Thienpont LM, Van Uytendaele K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2002;323:73-87.
7. ISO 18153:2003. In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned to calibrators and control materials. ISO, Geneva, Switzerland.
8. Infusino I, Panteghini M. Stima dell'incertezza di una misurazione: la riferibilità metrologica ci salverà? *Biochim Clin* 2010;34:245-6.
9. JCGM 200:2008. International Vocabulary of Metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd ed. 2008.
10. JCGM 100:2008. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. 1st ed. 2008.
11. Guerra E, Ceriotti F. Calcolo dell'incertezza nella determinazione dell'attività catalitica della γ -glutamilttransferasi: confronto fra tre approcci. *Biochim Clin* 2010;34:259-64.
12. Ellison SLR, Roesslein M, Williams A, eds. Eurachem Guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement, Eurachem, 2000, 2nd ed.
13. Klauke R, Schumann G. Uncertainty sources of reference measurement procedures for enzymes. http://users.unimi.it/cirme/public/UploadAttach/2_Schumann_new.pdf
14. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:718-24.
15. Infusino I, Ceriotti F, Panteghini M. Standardizzazione in enzimologia clinica: una sfida per la teoria della riferibilità metrologica. *Biochim Clin* 2010;34:96-102.
16. <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/jctlm-db>