

“I risultati dei miei esami sono normali?”: considerazioni su intervalli di riferimento e livelli decisionali

Ferruccio Ceriotti¹, Mauro Panteghini²

¹Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A., IRCCS San Raffaele, Milano

²Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Cliniche ‘Luigi Sacco’, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

“Are my laboratory results normal?”: considerations on reference intervals and decision limits. In this editorial, we look at the topic of reference intervals from the point of view of the patient or the clinician, discussing differences between the concept of reference intervals (a biological characteristic of a well defined population) and the various types of decision limits. Decision limits can be defined in different ways, e.g. based on Bayesian approach, on pathophysiological studies or on clinical experience (i.e. by consensus), but always they differ from reference intervals, because, while the latter deal with biology, decision limits are related to some kind of clinical decision and defined behaviour by clinicians.

“I risultati dei miei esami sono normali?”. Questa semplice e apparentemente banale domanda, posta quotidianamente sia ai clinici che ai laboratoristi, potrebbe non avere una risposta altrettanto facile. Come rilevato da Arky (1), il concetto di “normalità” dei dati di laboratorio si è evoluto nel tempo, poiché l’aumento delle conoscenze degli effetti di età, sesso, etnia, ecc. sui risultati degli esami di laboratorio, ma anche gli esiti di studi clinici che hanno permesso di comprendere il significato associato a determinati risultati hanno modificato il modo di leggere ed interpretare un referto di laboratorio.

Un primo aspetto è dato dall’ambiguità del termine “normale”. Cosa significa “avere dei risultati normali”? Il termine, usato in questo contesto, non è scientificamente corretto¹. Numerosi lavori, ormai di valore storico, hanno contribuito a chiarire questo concetto (2, 3). Dobbiamo perciò rileggere correttamente la domanda e interpretarla nel suo reale significato: “sono sano o sono malato?” oppure, in altri termini, “i miei esami indicano la presenza di qualche malattia?”. In questi termini, la domanda appare immediatamente molto più complessa e ci si rende conto del perché il laboratorio, ma anche il clinico, ha frequentemente difficoltà nel dare una risposta univoca, con indicazioni che spesso possono invece apparire elusive o addirittura contraddittorie. Ciò dipende dal contesto e sostanzialmente dal motivo che ha generato la richiesta di esami (screening, controlli periodici, diagnosi, monitoraggio di una patologia nota, valutazione degli effetti di una terapia, valutazione di fattori di rischio di sviluppare una malattia). Tra l’altro la situazione del laboratorista è più difficile di quella del clinico, perché il laboratorio quasi mai è a conoscenza

della situazione clinica del paziente e molto spesso (nonostante le recenti disposizioni in merito da parte di alcune aziende sanitarie locali) neppure del quesito clinico alla base della richiesta di esami.

Il risultato di un esame di laboratorio può essere interpretato solo per confronto, ma differenti quesiti clinici implicano più riferimenti a cui confrontarsi. Ad esempio, nel caso di esami eseguiti “per controllo” si possono utilizzare i valori ottenuti su un gruppo di soggetti ritenuti sani (intervalli di riferimento); per valutare la probabilità di presenza di una particolare malattia possiamo confrontarci con limiti definiti in base al livello di probabilità di presenza/assenza della malattia stessa che vogliamo accertare (limiti decisionali); infine, nel caso del monitoraggio, il riferimento migliore è rappresentato dal confronto con i valori precedenti dello stesso individuo e la differenza che ne consegue (differenza critica).

In base alle considerazioni esposte, si scopre quindi che la domanda posta in precedenza non è unica, ma rappresenta l’insieme di più domande: “i risultati sono entro l’ambito dei limiti di riferimento?”, “sono al di sotto della soglia indicativa di malattia?”, “sono significativamente diversi dai precedenti?”. E’ intuibile quindi che lo stesso risultato, se confrontato con riferimenti diversi, potrà associarsi ad informazioni differenti. Seppur formalmente esse possano essere considerate tutte corrette, in realtà solo la specifica risposta al quesito clinico per il quale l’esame è stato richiesto sarà quella attesa.

La risposta alla prima domanda (“i risultati dei miei esami sono all’interno dei limiti di riferimento?”) è certamente la più semplice. Può essere solo “sì” o “no”

¹“Prova fin che vuoi, ma non è possibile arrivare a nulla di simile ad una definizione assoluta di ‘normale’ dal punto di vista scientifico” (EA Murphy, 1966).

ed il paziente tende a darsela da solo, confrontando il risultato del suo esame con i limiti riportati sul referto di laboratorio, talvolta aiutato da specifiche simbologie (es. asterischi). Tuttavia, anche in questo caso il medico dovrà fare molta attenzione prima di rispondere. L'intervallo di riferimento è quello definito da, e che include, i due limiti di riferimento, limiti che sono derivati dalla distribuzione dei risultati ottenuti su un campione di individui estratto dalla popolazione di riferimento (4, 5). La popolazione di riferimento è un'entità ipotetica che comprende un numero sconosciuto di individui di riferimento. L'individuo di riferimento è una persona che è stata selezionata secondo caratteristiche ben specificate. Nel caso di intervalli di riferimento "fisiologici", altrimenti detti "biologici", i criteri di selezione sono volti ad escludere la presenza delle più comuni patologie che possono influenzare la concentrazione dell'analita in esame. Importante rilevare che i limiti di riferimento non sono definiti in modo tale da comprendere tutti i risultati ottenuti dagli individui di riferimento del campione estratto, ma, per convenzione, identificano solitamente una porzione pari al 95% centrale dei risultati dei soggetti analizzati, con la conseguenza che il 2,5% dei soggetti del campione utilizzato avrà risultati superiori al limite superiore dell'intervallo ed il 2,5% avrà valori inferiori al limite inferiore. Un'altra considerazione importante è che, nel caso sia selezionato un altro gruppo di soggetti dalla stessa popolazione di riferimento, non si otterranno esattamente gli stessi limiti di riferimento. Ciò implica che limiti di questo tipo possono variare entro un ambito più o meno grande con un certo grado di probabilità. L'ampiezza di questa variazione dipende dal numero di soggetti selezionati (più grande è il numero, più piccola è la variazione), dalla forma della curva di distribuzione [l'ampiezza è maggiore se la distribuzione è scodata al modo asimmetrico ("skewed")] e dalla cura con cui sono stati selezionati gli individui di riferimento (percentuale di soggetti non sani erroneamente inclusi nel gruppo di riferimento). Tutti questi aspetti "tecnici", di difficile comprensione per il clinico ed ancor più per il paziente, hanno un'importante conseguenza pratica: esiste una "zona grigia" attorno ai limiti che definiscono gli intervalli di riferimento ed i risultati che cadono vicino al limite di riferimento (sia all'interno che all'esterno di esso) sono quindi più difficili da classificare e interpretare. Ci sono poi altri fattori di cui tenere conto, quali la variabilità analitica del metodo in uso e la presenza di un errore sistematico e/o casuale, che determinano l'incertezza associata al risultato ottenuto, la variabilità biologica intraindividuale dell'analita nel soggetto in esame e la correttezza dell'intervallo di riferimento applicato.

Come detto in precedenza, la posizione del risultato del soggetto rispetto ai limiti di riferimento è importante. Se il risultato cade nella zona centrale dell'intervallo, la

probabilità che l'individuo in questione abbia valori sovrapponibili a quelli della popolazione di riferimento è molto alta, ammesso che l'intervallo in uso sia corretto, cosa non sempre vera (vedi oltre). Se invece il risultato cade vicino ad un limite di riferimento (sia all'interno che all'esterno dell'intervallo) sarebbe più prudente evitare una risposta univoca, dando invece un'indicazione sulla probabilità che l'individuo faccia o no parte del gruppo dei soggetti di riferimento (abbastanza elevata se il risultato cade entro i limiti o piuttosto bassa se esso cade al di fuori). Queste considerazioni non assumono tuttavia significato pratico per il paziente e spesso è quindi necessario prendere in esame anche gli aspetti relativi al confronto con i risultati precedenti dello stesso individuo. In particolare, per gli analiti con basso indice di individualità (6), se il risultato attuale è simile a quelli ottenuti precedentemente nello stesso soggetto, esso, anche se al di fuori dei corrispondenti limiti di riferimento, può essere considerato clinicamente accettabile; al contrario, se il risultato attuale è significativamente diverso (vale a dire supera il valore stimato di differenza critica), ciò deve mettere in allarme anche se, in valore assoluto, cade all'interno dell'intervallo di riferimento. Proprio per questo, l'uso di simbologie che evidenziano sul referto i risultati che cadono al di fuori degli intervalli di riferimento (es. asterischi o simboli come "<" o ">"), pur se raccomandato anche a livello internazionale (5), è considerato da alcuni fuorviante. Nonostante questi indicatori siano senz'altro utili quando mettono in evidenza risultati marcatamente anomali, il rischio è infatti quello di focalizzare l'attenzione solo su alcuni analiti, rischiando di trascurarne altri, con valori nei limiti dell'intervallo di riferimento, ma magari più significativi in quello specifico contesto clinico. Inoltre, la presenza di allarmi può rappresentare una fonte di preoccupazione del paziente, che non conosce il reale significato degli intervalli di riferimento e l'approccio probabilistico su cui deve essere basato il loro uso².

In questo contesto, quindi, assume ancora maggiore importanza la correttezza degli intervalli di riferimento utilizzati dal laboratorio, aspetto che assume massimo rilievo quando si ha a che fare con l'interpretazione, per es. in bambini o anziani, di analiti che hanno intervalli di riferimento dipendenti dall'età o dal sesso (es. creatinina, fosfatasi alcalina, ormoni, minerali come calcio e fosfato inorganico). Ad esempio, se una concentrazione di 0,80 mg/dL di creatininemia indica una velocità di filtrazione glomerulare fisiologica in un soggetto adulto di sesso maschile, la stessa concentrazione può indicare una funzionalità glomerulare già significativamente diminuita in un ragazzino di 5 anni. La definizione di un intervallo di riferimento corretto è anche difficile per vitamine o indicatori dello stato marziale, come ad es. la ferritinemia. In questi casi, infatti, la difficoltà sta nel

²L'argomento è aperto alla discussione, ma se la teoria vorrebbe il clinico come attento valutatore dei risultati degli esami di laboratorio, e quindi riterrebbe superflui i sistemi di evidenziazione dei risultati anormali, la pratica lo vede invece alle prese con un grandissimo numero di dati e poco tempo per valutarli, e quindi con la necessità di un supporto che ne semplifichi il lavoro.

definire correttamente le caratteristiche del gruppo dei soggetti di riferimento. L'impressione soggettiva di benessere ed alcuni indicatori generici di buona salute, come ad es. la concentrazione di emoglobina (Hb) nel sangue, non sono sufficienti ad escludere carenze subcliniche. Questo può spiegare le significative differenze fra i dati sperimentali riportati in lavori della letteratura e quelli riportati in pubblicazioni molto conosciute e utilizzate (7, 8).

In definitiva, l'impiego degli intervalli di riferimento ha senz'altro un valore di guida interpretativa, ma proprio per le loro caratteristiche e limitazioni, essi non devono essere considerati alla guisa di spartiacque che dividono lo stato di salute dalla malattia.

"I risultati dei miei esami sono al di sopra (o al di sotto) della soglia indicativa di malattia?". Apparentemente, questa sembra una domanda molto simile alla precedente; in realtà, è sostanzialmente diversa perché, mentre gli intervalli di riferimento sono caratteristiche biologiche che dipendono dalla fisiologia, la definizione dei limiti (o livelli) decisionali, che aiutano a definire la probabilità di avere/non avere una malattia, dipende dalla patologia con cui si ha a che fare e dal tipo di decisione clinica da prendere (9). Inoltre, per lo stesso esame ci possono essere più livelli decisionali: uno per decidere se iniziare la terapia, uno per il traguardo da raggiungere con la terapia stessa, ecc. Murphy and Abbey li hanno definiti come "le migliori linee in grado di separare i "normali" dai "malati" o selezionare coloro per i quali è necessario proseguire negli accertamenti da quelli che non lo richiedono" (10).

La scelta dei livelli decisionali si può basare su diversi criteri, quali il calcolo delle probabilità (teorema di Bayes, curve ROC), criteri empirici (es. su base fisiopatologica) oppure il semplice consenso tra esperti. Nel 1975, Sunderman, per definire quelli che allora chiamava "valori discriminatori", indicava la necessità dei seguenti requisiti: a) definizione della malattia ricercata, b) definizione dello stadio nella patogenesi della malattia oggetto della diagnosi per mezzo dell'esame in questione, c) conoscenza della sensibilità e della specificità clinica (diagnostica) dell'esame, d) conoscenza della prevalenza della malattia nella popolazione in cui l'esame è eseguito, e e) conoscenza delle conseguenze (costi clinici) di una diagnosi errata (11). In base ad essi, il limite decisionale è "un valore di un risultato di un esame diagnostico che serve da criterio per distinguere tra due popolazioni in esame" (11). Questo approccio probabilistico nella definizione di un livello decisionale è forse quello più oggettivo, che ben si integra con l'approccio medico basato sulle prove di efficacia ("evidence-based") (12).

I cosiddetti "limiti critici" o "valori di panico" rappresentano un esempio di approccio empirico nella definizione dei limiti decisionali. Questi definiscono risultati che indicano la presenza di una situazione di alterazione fisiopatologica così grave da mettere in pericolo la vita del paziente a meno di un intervento correttivo immediato (13). Il concetto originale, espresso da Lundberg, è stato poi allargato a quello di "valori di

allarme", includendo anche situazioni che non mettono immediatamente a rischio la vita del paziente (14). Per definizione, questi limiti sono del tutto arbitrari, basati sull'esperienza clinica, di solito senza alcun tipo di supporto statistico o sperimentale (15).

Infine, la definizione di un livello decisionale si può basare su un consenso più o meno allargato di esperti, di solito derivato dai risultati di studi di popolazione. Livelli decisionali di questo tipo sono, per esempio, quello applicato alla determinazione della glicemia per la diagnosi di diabete mellito o quelli applicati all'emoglobina glicata per il monitoraggio del controllo glicemico nel soggetto diabetico. Il razionale è basato su studi prospettici che dimostrano una diversa sopravvivenza o una diversa incidenza di complicanze nei due gruppi di pazienti al di sotto e al di sopra del limite identificato. Un esempio di questo approccio applicato ai peptidi natriuretici di tipo B è stato recentemente fornito da Alehagen et al. (16).

Nel caso dell'ultima domanda ("i risultati dei miei esami di oggi sono diversi da quelli ottenuti in passato?") è importante valutare se la differenza critica (la differenza massima tra due misure dello stesso analita nello stesso soggetto dovuta esclusivamente all'effetto delle variabilità analitica e biologica) è stata o meno superata. Specialmente nel caso si debbano valutare più di due risultati, la rappresentazione grafica dei dati può essere molto utile per verificare la presenza di un "trend" di variazione che sia significativo, anche senza alcun tipo di elaborazione statistica. Questo approccio è particolarmente indicato per la valutazione degli indicatori biochimici di neoplasia ed, in genere, per tutti i parametri con basso indice di individualità (es. creatininemia).

Vediamo ora, in conclusione, alcune situazioni paradigmatiche il cui il clinico può essere messo di fronte alla domanda che dà il titolo a questo editoriale. Per l'interpretazione di un valore di Hb ematica in un soggetto adulto, in un primo momento il clinico confronta il risultato con l'intervallo di riferimento (maschi: 14,0-17,5 g/dL, femmine: 12,3-15,3 g/dL). Se il risultato è all'interno dell'intervallo, egli verificherà l'eventuale significatività di una differenza con risultati precedenti per identificare la possibile presenza di una tendenziale modifica nelle concentrazioni del parametro, impiegando la sua differenza critica (~9%). Se invece la concentrazione di Hb è inferiore rispetto al limite inferiore di riferimento, egli confronterà il risultato con i limiti decisionali per la diagnosi di anemia [<13 g/dL nel maschio e <12 g/dL nella femmina (17)] o per la necessità di trasfusione [<7.0 g/dL (18)]. In definitiva, per l'interpretazione di un risultato di Hb ematica l'intervallo di riferimento costituisce la base per la decisione medica solo nel caso in cui il soggetto mostri valori entro tale intervallo, mentre se la concentrazione di Hb del paziente cade al di fuori di esso sono i livelli decisionali a svolgere il ruolo principale.

Nell'interpretazione di un valore di glicemia a digiuno, l'intervallo di riferimento (70-115 mg/dL) ha scarso valore, in quanto il livello decisionale (100 mg/dL)

proposto per discriminare i soggetti con un'alterata glicemia a digiuno è al suo interno, mentre il livello decisionale per la diagnosi di diabete mellito (126 mg/dL) è ben al di fuori (19). Per calcio e potassio plasmatici la situazione è simile: di solito i clinici non si attivano per valori ai limiti dell'intervallo di riferimento, ma tendono a reagire solo quando sono superati livelli decisionali o limiti critici (Tabella 1).

Negli esempi fatti, il contributo degli intervalli di riferimento all'interpretazione dell'esame biochimico appare modesto. Ciò significa che, quando disponibili ed universalmente applicabili, i livelli decisionali devono, di fatto, sostituirli, a cominciare con la loro esplicitazione sul referto del laboratorio. I limiti di riferimento sono, tuttavia, ancora destinati a svolgere un ruolo importante come guida nell'interpretazione dei risultati per la maggior parte degli analiti, ancora privi di livelli decisionali. Comunque sia, il laboratorio è atteso a dare un supporto fondamentale al clinico, fornendo informazioni corrette sugli intervalli di riferimento (suddivisi, quando necessario, per età, sesso ed eventualmente altri criteri di ripartizione), sui livelli decisionali (quando disponibili, specificando a quale situazione clinica applicarli ed il valore predittivo a loro associato) e sulla presenza di un'eventuale differenza statisticamente significativa rispetto ai risultati precedenti dello stesso individuo.

BIBLIOGRAFIA

- Arky RA. "Doctor, is my sugar normal?". N Engl J Med 2005;353:1511-3.
- Gräsbeck R, Saris NE. Establishment and use of normal values. Scand J Clin Lab Invest 1969;26(suppl 110):62-3.
- Dybkaer R. Concepts and nomenclature in theory of reference values. Scand J Clin Lab Invest 1972;29(suppl 126):19-21.
- 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.
- CLSI document C28-A3. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline — 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- Harris EK. Effects of intra- and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. Clin Chem 1974;20:1535-42.
- Dorizzi RM, Fortunato A, Marchi G, et al. Reference interval of ferritin in premenopausal women calculated in four laboratories using three different analyzers. Clin Biochem 2000;33:75-7.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed., St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 2006:1191.
- Cerotti F. Gli intervalli di riferimento nel nuovo millennio. Biochim Clin 2007;31:254-66.
- Murphy EA, Abbey H. The normal range - a common misuse. J Chronic Dis 1967;20:79-88.
- Sunderman FW Jr. Current concepts of "normal values", "reference values", and "discrimination values" in clinical chemistry. Clin Chem 1975;21:1873-7.
- Canali C, Trenti T. La Medicina di Laboratorio basata sull'evidenza: gli strumenti utili nella valutazione razionale degli esami di laboratorio. Biochim Clin 2008;32:243-50.
- Lundberg GD. When to panic over abnormal values. Med Lab Observ 1972;4:47-54.
- Howanitz PJ, Steindel SJ, Heard NV. Laboratory critical values policies and procedures: a college of American Pathologists Q-Probes study in 623 institutions. Arch Pathol Lab Med 2002;126:663-9.
- Lippi G, Caputo M, Banfi G, et al. Raccomandazioni per

Tabella 1

Rapporto tra intervalli di riferimento e livelli decisionali per calcemia totale e potassiemia

Calcemia totale*

Intervallo di riferimento (adulti)	8,8-10,6 mg/dL	
Livelli decisionali	<8,0 mg/dL	Ipocalcemia lieve (associata al rischio di convulsioni)
	<7,0 mg/dL	Ipocalcemia grave (associata a tetano ipocalcémico)
	>11,0 mg/dL	Ipercalcemia lieve
	>12,0 mg/dL	Ipercalcemia grave (associata a crisi ipercalcemiche e coma)

Potassiemia**

Intervallo di riferimento (adulti)	3,6-4,8 mmol/L	
Livelli decisionali	<3,5 mmol/L	Ipotassiemia lieve (se la funzionalità cardiaca è normale, non comporta problemi cardiaci)
	<3,0 mmol/L	Ipotassiemia grave (sintomi clinici associati ad aritmia cardiaca)
	>5,0 mmol/L	Iperpotassiemia lieve (indica che i meccanismi di regolazione del potassio si stanno alterando)
	>6,0 mmol/L	Iperpotassiemia grave (associata a sintomi neuromuscolari e cardiovascolari)

*I valori di calcemia (Ca) devono essere corretti in base alle concentrazioni di albuminemia (Alb): $Ca\text{ corretto} = Ca\text{ misurato} + (40 - Alb) \times 0,025$.

**Campione di plasma eparinato.

- l'identificazione e la gestione dei valori critici nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2008;32:209-16.
16. Alehagen U, Goetze JP, Dahlström U. Reference intervals and decision limits for B-type natriuretic peptide (BNP) and its precursor (NT-proBNP) in the elderly. *Clin Chim Acta* 2007;382:8-14.
 17. World Health Organisation. Nutritional anemia. Report of a WHO scientific group. Geneva, Switzerland: WHO, 1968.
 18. Corwin HL, Gettinger A, Pearl RG, et al. The CRIT Study: anemia and blood transfusion in the critically ill - current clinical practice in the United States. *Crit Care Med* 2004;32:39-52.
 19. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:3160-7.