

Analisi della distribuzione dei valori di TSH su dried-spot nello screening neonatale per ipotiroidismo congenito

Marco B.L. Rocchi*, Renzo Ciatti^o, Giulia Burroni*, Silvia Bellagamba*, Vera Stoppioni^o, Massimo Burroni^o

*Istituto di Biomatematica, Facoltà di Farmacia, Università di Urbino "Carlo Bo"

^oU.O. di Neuropsichiatria Infantile, Centro Screening Neonatale Regione Marche, Ospedale di Fano

ABSTRACT

Distribution analysis of TSH values on dried-spot in neonatal screening for congenital hypothyroidism

In this paper, some different statistical methods for the identification of the cut-off value of TSH on dried-spot, for the recall of the newborns in the neonatal screening for Congenital Hypothyroidism are evaluated and compared. Data were obtained from the Neonatal Screening Register of Regione Marche, Italy, set at the U.O. Neuropsichiatria Infantile of the Fano Hospital. The results indicate that, at the present, the non parametric method of Lee Herrera, based on the percentiles, appears the most reasonable approach in order to deal with this problem.

RIASSUNTO

In questo lavoro vengono valutati e confrontati alcuni metodi statistici per l'identificazione del valore di cut-off del TSH su dried-spot, per il richiamo dei neonati nelle procedure di screening neonatale per Ipotiroidismo Congenito. I dati provengono dal Registro dello Screening Neonatale della Regione Marche, Italia, localizzato presso l'U.O. di Neuropsichiatria Infantile dell'Ospedale di Fano. I risultati indicano che, allo stato attuale, il metodo non parametrico di Lee Herrera, basato sui percentili, appare l'approccio più ragionevole nell'affrontare tale problema.

INTRODUZIONE

Negli ultimi 25 anni i paesi più sviluppati hanno messo in atto programmi di screening neonatale dell'Ipotiroidismo Congenito (IC) basati sulla analisi dei valori di Tiroxina Totale (Total Thyroxine, TT4) o dell'ormone tireotropo (Thyroid Stimulating Hormone, TSH) misurati su gocce di sangue prelevate dal tallone del neonato e fatte seccare su apposita carta da filtro; differenti linee guida in tal senso sono state pubblicate separatamente dall'American Academy of Pediatrics (1) e dall'European Society for Pediatric Endocrinology (2, 3).

Mentre gli Stati Uniti hanno scelto il procedimento di screening basato sulla quantificazione del TT4, i paesi Europei, e l'Italia in particolare, hanno optato per la misurazione del TSH.

Sebbene sia del tutto chiaro che le misure ottenute dalle gocce secche (dried-spot) su carta da filtro non abbiano di per sé valore diagnostico, e che i valori ottenuti siano meramente semi-quantitativi e servano solo come primo passo per l'identificazione dei soggetti affetti da IC (4), il problema pratico di identificare il valore di cut-off del TSH su dried-spot - oltre il quale effettuare un riesame ed un eventuale richiamo del paziente per la valutazione su siero - appare di primaria importanza nell'ambito dello screening neonatale per IC.

Prioritariamente, tale cut-off deve garantire che nessun soggetto affetto da IC sfugga allo screening (opzione di massima sensibilità), mentre secondariamente, per ov-

vii motivi di ordine economico in senso lato (economia di tempo, denaro e risorse umane) deve limitare al minimo il numero di richiami che risulteranno negativi all'analisi del siero e quindi, in ultima istanza, inutili (opzione di massima specificità).

L'obiettivo della presente ricerca è dunque quello di studiare la distribuzione statistica dei valori di TSH su dried-spot, al duplice scopo di: (a) verificare se la scelta dei valori di riferimento effettuata sull'ipotesi di normalità possa essere considerata valida; (b) ricercare la forma vera della distribuzione dei valori di TSH su dried-spot da cui ricavare coerentemente i valori di cut-off.

Va tuttavia sottolineato che ogni laboratorio impegnato nello screening dovrebbe stabilire propri livelli di cut-off, specificamente in accordo con le metodiche usate (4). Pertanto lo scopo di questo lavoro non può e non vuole essere quello pratico di stabilire ideali valori di cut-off, ma quello teorico di affrontare il problema della scelta del metodo statistico con cui stabilire tali valori.

MATERIALI E METODI

Dati:

In questo lavoro sono stati considerati i valori di TSH di tutti i neonati della regione Marche (il cui centro screening di riferimento è situato presso l'U.O. di Neuropsichiatria Infantile dell'Ospedale di Fano) sottoposti a screening nel biennio 1997-1998 (n = 24197), mediante analisi di dried-spots con tecnica immunofluorimetrica (sistema Del-

fia). I risultati delle misure erano espressi come concentrazione di TSH nel sangue, in $\mu\text{UI mL}^{-1}$

Metodi Statistici:

Vengono confrontati i valori di riferimento (code al 95%, 99% e 99,5%) ottenuti mediante i seguenti metodi statistici:

1. Ipotesi di normalità: consiste nel supporre in prima approssimazione la distribuzione come una normale gaussiana, i cui parametri sono stimati dai dati campionari.

2. Trasformazione logaritmica: consiste nell'ipotizzare una distribuzione con spiccata asimmetria positiva e nel trasformare logaritmicamente i dati al fine di ottenere una distribuzione gaussiana o quanto meno simmetrica;

3. Trasformazione potenza di Box e Cox (5): consiste nell'applicare ai dati la trasformazione

$$x' = \begin{cases} \frac{x^\lambda - 1}{\lambda} & \lambda \neq 0 \\ \ln x & \lambda = 0 \end{cases}$$

dove il valore di λ viene stimato iterativamente dalla relazione

$$x^\lambda = \frac{x^\lambda - 1}{\lambda G^{\lambda-1}}$$

con G media geometrica dei dati. Tale metodo, basato sull'analisi della varianza, parte dal presupposto che la trasformazione migliore è quella che rende minima la devianza d'errore rispetto alla devianza spiegata. E' previsto inoltre un fattore di correzione, proposto da Harris e Boyd (6).

4. Metodo (non parametrico) dei quantili di Lee Herrera (7): consiste nel non supporre alcuna forma specifica per la distribuzione (e quindi non si basa su una trasformazione dei dati), ma solo nell'ordinare i dati in ordine crescente ed andando a identificare i percentili di interesse.

L'ipotesi di Normalità prima e dopo le trasformazioni è stata verificata mediante differenti modalità:

a. metodi grafici (normal probability plot): consiste nel riportare, in un diagramma cartesiano, in ascissa i valori osservati e in ordinata i corrispondenti quantili di una gaussiana. Nel caso di normalità della distribuzione, i punti tendono ad allinearsi lungo la bisettrice del grafico.

b. metodi basati sui momenti centrali di terzo e quarto ordine (indici di asimmetria e curtosi): consistono essenzialmente sul calcolo dell'indice di asimmetria λ_1 e sull'indice di curtosi λ_2 (entrambi proposti da Fisher):

$$\lambda_1 = \frac{\mu_3}{\sigma^3}; \quad \lambda_2 = \frac{\mu_4}{\sigma^4} - 3$$

dove:

σ è la deviazione standard;

$\mu_3 = \frac{\sum (X_i - \bar{x})^3}{n}$ è il momento centrale di ordine 3;

$\mu_4 = \frac{\sum (X_i - \bar{x})^4}{n}$ è il momento centrale di ordine 4;

Gli indici λ_1 e λ_2 hanno la caratteristica di valere 0 quando la distribuzione è normale, e di scostarsi da tale

valore quanto più i dati differiscono da una normale; in particolare valori positivi e negativi di λ_1 indicano rispettivamente asimmetria positiva e negativa, mentre valori positivi e negativi di λ_2 indicano rispettivamente leptocurtosi e platicurtosi. Sono inoltre stati calcolati gli errori standard (ES) per tali indici.

c. test statistici: è stato impiegato il classico test di Kolmogorov-Smirnov per verificare l'ipotesi di normalità della distribuzione; anche altri test sono stati utilizzati (Shapiro-Wilk, Michael, D'Agostino, Cramer-Von Mises, Anderson-Darling), ottenendo comunque sempre risultati ampiamente sovrapponibili con quelli ottenuti col primo; si è pertanto optato per la presentazione dei risultati di questo test, per la sua ampia diffusione nei pacchetti statistici più comunemente utilizzati.

L'eventuale presenza di più sottopopolazioni gaussiane è stata verificata e scartata con l'ausilio del metodo per la risoluzione in componenti gaussiane di Bhattacharya (8). Esso si basa sulla osservazione che i logaritmi delle differenze fra le frequenze osservate si distribuiscono su una retta, nella ipotesi di normalità della distribuzione.

RISULTATI

Ipotesi di normalità:

L'ipotesi di normalità dei dati non trasformati è respinta in modo molto evidente con ognuna delle tecniche a disposizione (figura 1). La distribuzione dei valori osservati presenta una forte asimmetria positiva (figura 2), ($\lambda_1 = 34,92$; ES = 0,02). La distribuzione è inoltre fortemente leptocurtica ($\lambda_2 = 1744,81$; ES = 0,03).

Tali osservazioni sono confermate dal test di Kolmogorov-Smirnov che mostra uno scostamento altamente significativo da una distribuzione gaussiana ($IDI = 0,33$; $p < 0,005$).

Trasformazione logaritmica:

Vengono sfruttate le proprietà normalizzanti della trasformazione logaritmica per distribuzioni con asimmetria

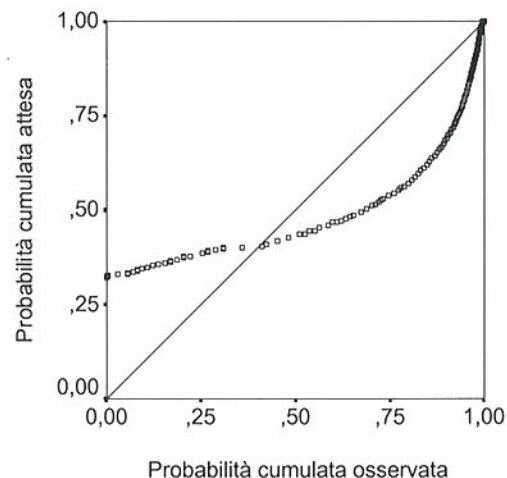


Figura 1
Normal Probability Plot dei dati senza trasformazioni

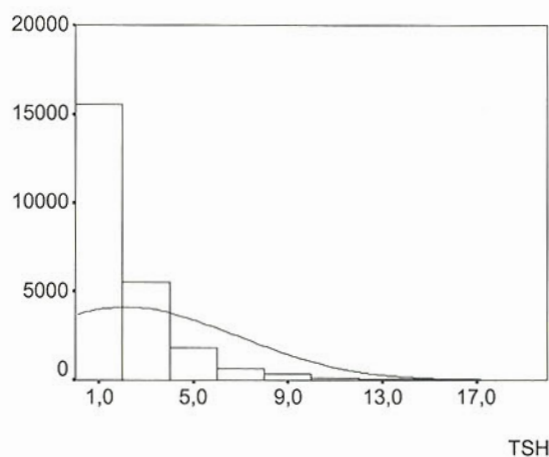


Figura 2
Istogramma e curva gaussiana stimata dei dati senza trasformazioni

positiva. I risultati di tale trasformazione sono incoraggianti, nel senso che mostrano un forte avvicinamento della distribuzione alla normalità: ciò si evince sia dal Normal Probability Plot (figura 3), sia dal confronto tra istogramma e relativa gaussiana di riferimento (figura 4).

La distribuzione così trasformata fornisce indici di asimmetria e curtosi decisamente più prossimi ai valori di riferimento di una gaussiana ($\lambda_1 = -0,54$; ES = 0,02 e $\lambda_2 = 0,87$; ES = 0,03).

Il test di Kolmogorov-Smirnov mostra comunque uno scostamento altamente significativo da una distribuzione gaussiana (ID= 0,10; $p < 0,005$).

Trasformazione potenza (Box-Cox):

Vengono sfruttate le proprietà normalizzanti della trasformazione potenza di Box e Cox, nella forma $x' = \frac{x^\lambda - 1}{\lambda}$, che fornisce, attraverso l'algoritmo di Harris e Boyd, un valore $\lambda = 0,2838549$.

Si è proceduto anche alla correzione (sempre proposta da Box e Cox) che prevede la trasformazione nella forma $x' = \frac{(x + C)^\lambda - 1}{\lambda}$, ma il bassissimo valore ottenuto per C mediante l'algoritmo di Harris e Boyd ($C = -9,936102 \cdot 10^{-7}$) la rende trascurabile.

La trasformazione di Box e Cox ottiene un effetto analogo sulla distribuzione a quello sortito dalla semplice trasformazione logaritmica (figura 5, 6).

Gli indici di asimmetria e curtosi sono leggermente più scostati rispetto ai valori di riferimento di una gaussiana ($\lambda_1 = 0,87$; ES = 0,02 e $\lambda_2 = 5,16$; ES = 0,03) di quelli ottenuti mediante trasformazione logaritmica.

Il test di Kolmogorov-Smirnov mostra ancora uno scostamento altamente significativo da una distribuzione gaussiana (ID= 0,06; $p < 0,005$).

Metodo dei quantili:

Il metodo dei quantili, proposto da Lee Herrera, trascu-

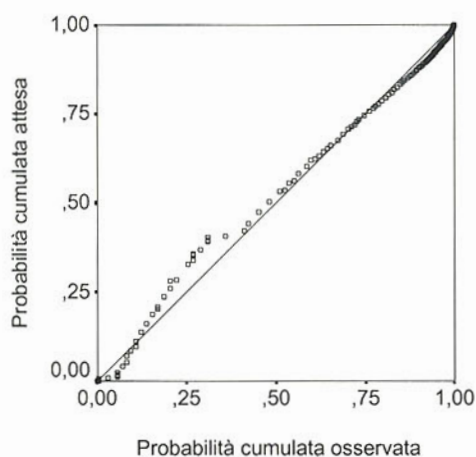


Figura 3
Normal Probability Plot dei dati trasformati mediante logaritmo naturale

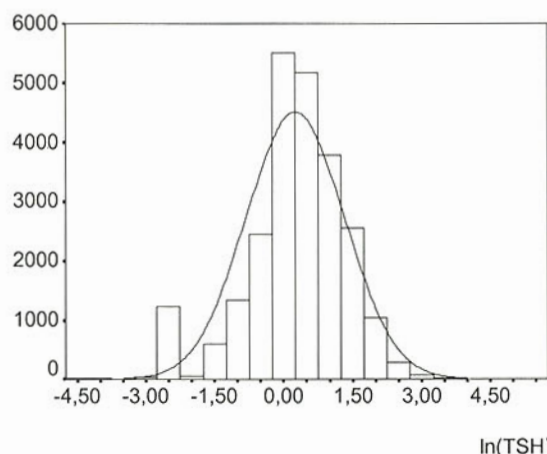


Figura 4
Istogramma e curva gaussiana stimata dei dati trasformati mediante logaritmo naturale

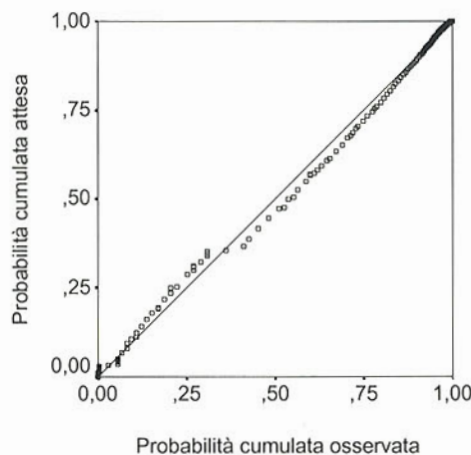
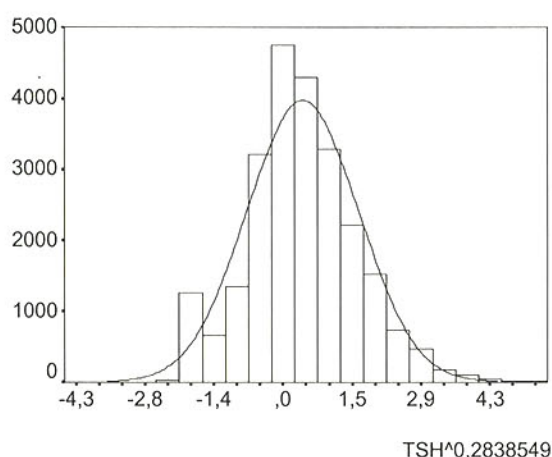


Figura 5
Normal Probability Plot dei dati trasformati mediante metodo di Box e Cox

Tabella 1

Code al 90°, 95°, 99,5° percentile del valore di TSH nei dried-spot ($\mu\text{UI mL}^{-1}$; riferito al sangue intero) ottenute coi vari approcci statistici

Metodo	Coda 95%	Coda 99%	Coda 99,5%
Normalità	11,25	13,08	14,23
Trasformazione Logaritmica	7,46	15,43	20,14
Trasformazione Box-Cox	5,98	9,32	10,83
Quantili	6,2	11,12	14,5

**Figura 6**

Istogramma e curva gaussiana stimata dei dati trasformati mediante metodo di Box e Cox

ra tutti gli aspetti parametrici della distribuzione, per descrivere non parametricamente i percentili osservati nella casistica campionaria. Esso non fornisce quindi risultati né in termini di indici di asimmetria e curtosi, né in termini di test statistici.

Confronto complessivo tra i vari metodi:

E' possibile, per concludere, mettere a confronto i valori di riferimento ottenuti coi vari metodi. La tabella 1, in particolare, mostra per ognuno dei metodi il 95°, il 99° e il 99,5° percentile.

CONCLUSIONI

Dall'insieme delle procedure statistiche adottate, si evince un netto e progressivo avvicinamento ai valori ottenuti col metodo dei quantili quando si passi dai dati originali a quelli trasformati logaritmicamente a quelli ottenuti mediante trasformazione potenza.

Sebbene il test di Kolmogorov Smirnov mostri forse un

eccessiva sensibilità alla elevata dimensione del campione, e quindi i risultati di una cattiva bontà di adattamento dei dati a una normale gaussiana vadano interpretati con una certa cautela, tuttavia emerge anche che l'effetto delle trasformazioni è comunque insufficiente a garantire una ottimale "goodness-of-fit" rispetto a una distribuzione normale, così che la scelta del metodo dei percentili di Lee Herrera appare per il momento la via statisticamente meno rischiosa.

Conseguentemente, il limite attualmente scelto dal Centro Screening Neonatale della Regione Marche per il richiamo, viene fissato sulla base del 99° percentile della casistica dei neonati dell'anno precedente, eventualmente arrotondato per difetto. A titolo di esempio, nel 2002 il 99° percentile risultava essere di $10,3 \mu\text{UI mL}^{-1}$ (riferito al sangue intero); in conseguenza di tale valore, per il 2003 il valore soglia è stato fissato al livello di $10 \mu\text{UI mL}^{-1}$.

BIBLIOGRAFIA

1. La Franchi SH, Dussault JH, Fisher DA, Foley TP, Mitchell ML. Newborn screening for congenital hypothyroidism: Recommended guidelines. *Pediatrics* 1993;91:1203-1209.
2. Gruters A, Delange F, Giovanelli G, Klett M, et al. Guidelines for neonatal screening programmes for congenital hypothyroidism. *Pediatr* 1993;152:974-975.
3. Toublanc JE. Guidelines for neonatal screening programs for congenital hypothyroidism. *Acta Paediatr* 1999;88 Suppl 432:13-14.
4. Demers LM, Spencer CA. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. 2002. http://www.nacb.org/Impg/thyroid/3i_thyroid.doc (6 March 2003).
5. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations. *J R Stat Soc B* 1964;26:211-252.
6. Harris EK, Boyd JC. Statistical bases of reference values in laboratory medicine. Lausanne: Dekker, 1995;46-48.
7. Lee Herrera BS. The precision of percentiles in establishing normal limits in medicine. *J Lab Clin Med* 1958;52:34-42.
8. Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. *Biometrics* 1967;23: 115-135.