

Confrontabilità dei risultati di due metodi per la determinazione della lattato deidrogenasi del siero dopo ricalibrazione al sistema di riferimento: impatto della commutabilità del calibratore

Giampaolo Cattozzo¹, Elena Guerra², Ferruccio Ceriotti², Carlo Franzini³ per il Gruppo di Studio Enzimi SIBioC

¹Azienda Ospedaliera Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

²Diagnostica e Ricerca S. Raffaele S.p.A., IRCCS S. Raffaele, Milano

³Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Comparability of results by two methods for measuring lactate dehydrogenase activity concentrations in serum after recalibration to the reference system: impact of commutability of calibration materials. Two main methodological principles are currently used in clinical laboratories to measure lactate dehydrogenase (LDH) activity concentrations in serum. They are based on measuring the LDH-catalyzed rate of transformation either of lactate into pyruvate (method LP) or of pyruvate into lactate (method PL). An IFCC reference procedure is also available, based on the former principle. When applied to patient sera, results from the LP method are about one half of those from the PL method. Scope of this work was to verify if recalibration with a commutable calibrator with value assigned by the reference method lead to comparability of the results from these two methods. The study included 109 serum samples and 26 candidate calibrator materials (22 stabilized materials and 4 serum pools); 5 additional serum pools surrogated patient sera in assessing the commutability of the candidate calibrators in the LP/IFCC, PL/IFCC and PL/LP pairs of methods. The frequencies of non-commutability of candidate calibrators were 0/26, 7/26 and 24/26 in the methods' pair LP/IFCC, PL/IFCC and PL/LP, respectively. Recalibration with a commutable material greatly improved the median PL-LP difference and median PL/LP ratio in the assay of 109 patient sera; with a non-commutable calibrator the improvement was less marked. In conclusion, commutable calibrators are useful in harmonizing LDH results from different methods. As the lack of commutability is an unpredictable event, it must be checked for every calibrator material.

INTRODUZIONE

La concentrazione degli enzimi nel siero è determinata tramite misurazione della velocità di trasformazione di uno specifico substrato catalizzata dall'enzima, che dipende dalla concentrazione dell'enzima e dalle condizioni sperimentali adottate (1). Queste ultime concorrono a definire il metodo analitico. Come conseguenza della metodo-dipendenza dell'attività catalitica misurabile, i risultati forniti da metodi differenti possono essere poco confrontabili: questo rende difficoltosa l'interpretazione dei risultati, impedisce la definizione di livelli decisionali condivisi e complica l'interpretazione dei risultati dei programmi di VEQ.

Il grande impiego della determinazione degli enzimi nel siero a scopo clinico richiede quindi la necessità di adottare un sistema di standardizzazione delle misurazioni. Constatata l'impossibilità di adottare un modello di standardizzazione basato sull'impiego universale di un unico metodo di misura, è stata proposta l'implementazione di un sistema metrologico di riferimento, che preveda il trasferimento dell'esattezza analitica del metodo di rango metrologico superiore, assunto come riferimento, ai metodi di uguale specificità analitica impiegati ordina-

riamente (2). L'implementazione dell'intero sistema può, tuttavia, essere difficoltosa (3, 4); in particolare, un punto critico è rappresentato dalla commutabilità dei materiali di calibrazione utilizzati per il trasferimento dell'esattezza analitica (5). La non-commutabilità dei materiali di calibrazione e di controllo è un evento frequente ed imprevedibile (6), sia con riferimento alla misura degli enzimi (7, 8) che per altri analiti (6, 9-11). E' oggi ben noto che materiali non-commutabili non possono essere utilizzati come calibratori per il trasferimento dell'esattezza analitica (12-14).

La lattato deidrogenasi (LDH) è un enzima tetramericco di cui esistono cinque diverse forme molecolari (isoenzimi); in conseguenza della sua distribuzione ubiquitaria, se ne osservano aumenti della concentrazione nel sangue in numerose patologie (15). Recentemente è stata evidenziata e/o confermata l'utilità della determinazione della LDH del siero nella sindrome da insufficienza respiratoria acuta grave (SARS) (16), nelle anemie emolitiche (17), nella leucemia linfatica cronica (18), nel neuroblastoma (19), nel melanoma (20) e in altre malattie neoplastiche (21, 22).

I metodi analitici per la determinazione della LDH sono basati sul monitoraggio della reazione reversibile di

ossidazione del lattato a piruvato, in cui il NAD⁺ funge da accettore di equivalenti riducenti (15). A seconda del metodo, la reazione può decorrere da lattato a piruvato (metodi LP) oppure da piruvato a lattato (metodi PL). Il metodo raccomandato ed il procedimento analitico di riferimento IFCC sono del tipo LP (23, 24). Tuttavia, metodi PL sono largamente utilizzati nel nostro Paese: a titolo di esempio, dai dati del programma di VEQ della Direzione Generale Sanità della Regione Lombardia per il biennio 2005-06, risulta che dei 256 Laboratori accreditati dal Servizio Sanitario Regionale, 33 (13%) utilizzano metodi LP, mentre i rimanenti 223 (87%) impiegano metodi PL.

Scopo di questo lavoro è verificare la possibilità di armonizzare i risultati forniti dai metodi LP e PL implementando il modello basato sull'applicazione del principio della riferibilità, ossia sul trasferimento dell'esattezza analitica dal procedimento analitico di riferimento ai metodi commerciali di impiego ordinario, mediante l'impiego di calibratori di provata commutabilità con valore assegnato con metodologia di riferimento. Inoltre, si è verificato l'impatto della commutabilità dei materiali di calibrazione sull'efficacia di questo modello di standardizzazione.

MATERIALI E METODI

Materiali

La concentrazione di attività catalitica della LDH è stata misurata in 109 sieri umani, resi opportunamente anonimi, con valori distribuiti in un ampio intervallo di concentrazione, 5 pool di sieri con normale composizione isoenzimatica (PN) e 26 materiali di calibrazione candidati (CCM), rappresentati da 4 pool congelati di sieri con composizione isoenzimatica anormale per aumento dell'isoenzima 1, dell'isoenzima 3, dell'isoenzima 4 e dell'isoenzima 5, rispettivamente, e da 22 materiali stabilizzati, distribuiti da BioRad Laboratories (materiali 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18 e 19), Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (materiale 22), Olympus Diagnostica (materiali 7, 12 e 23), Roche Diagnostics (materiale 17) e Siemens Medical Solutions Diagnostics (materiali 1, 9 e 20). Il materiale 22 è un materiale di riferimento (ERM-AD453/IFCC) certificato dall'IRMM, proposto come materiale idoneo "to control and optimise the performance of enzyme measurements, verify the comparability of results from different laboratories and to be used as a reference material for manufacturers of reagents and diagnostic kits" (25).

Si sono infine considerati i dati del programma di VEQ della Regione Lombardia nel biennio 2005-2006. Durante questo ciclo 24 materiali di controllo erano analizzati mediamente da 25 Laboratori con metodo LP e da 214 Laboratori con metodo PL, entrambi i metodi in fase liquida, utilizzando un'ampia gamma di sistemi analitici; i risultati erano elaborati separatamente per ciascuno dei due gruppi metodologici.

Metodi analitici

La concentrazione di attività catalitica della LDH è

stata misurata, limitatamente ai campioni PN e CCM, con il procedimento analitico di riferimento a 37 °C raccomandato dall'IFCC (24, 26), utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio Uvikon 940. Gli stessi campioni, insieme ai sieri da paziente, sono stati analizzati con due metodi commerciali, rispettivamente LP (LDH IFCC, cod. OSR6128) e PL (LDH SCE, cod. OSR6126) sul medesimo analizzatore automatico Olympus AU640 (Olympus Diagnostica), utilizzando esattamente le specifiche fornite dal produttore. Secondo quanto dichiarato, i risultati del metodo LP sono riferibili al procedimento di riferimento IFCC, mentre i risultati del metodo PL sono riferibili ad un calibratore "master" preparato dalla stessa azienda. Le analisi sui sieri da pazienti sono state eseguite in doppio, mentre le analisi su PN e CCM sono state eseguite in triplicato; per le valutazioni statistiche si sono utilizzate le medie dei replicati.

La composizione isoenzimatica dei pool di sieri è stata determinata mediante elettroforesi su gel di agarosio associata a valutazione densitometrica (Interlab).

Valutazione della commutabilità

Per valutare la commutabilità dei CCM con i sieri umani, CCM e PN sono stati analizzati con il procedimento analitico IFCC e con i metodi LP e PL. In questa valutazione i PN sono stati considerati come surrogati dei sieri da paziente, assumendo che i PN riproducano la variabilità inter-metodi caratteristica dei sieri di cui sono miscele. Per ciascuna delle due coppie di metodi LP/IFCC e PL/IFCC le differenze tra metodi osservate per i CCM sono state confrontate con le differenze ottenute per i PN. La relazione tra i valori forniti dai due metodi di ciascuna coppia nell'analisi dei PN è stata valutata statisticamente come regressione lineare non-parametrica (27); si è quindi calcolato il residuo di ciascuno dei PN (distanza dalla retta di regressione lungo l'ordinata) e la DS dei residui ($S_{y/x}$). Si è quindi calcolato il residuo di ciascun CCM rispetto alla medesima retta di regressione, che diviso per $S_{y/x}$ ha fornito il residuo normalizzato. Il residuo normalizzato è stato utilizzato come indicatore del grado di commutabilità, considerando commutabili i CCM con residuo normalizzato compreso tra -3 e 3 (6, 28).

Effetto della calibrazione con materiale commutabile e non

Per valutare l'effetto della ricalibrazione sulla confrontabilità dei valori generati dai metodi LP e PL, i risultati forniti da questi due metodi nell'analisi di 109 sieri umani sono stati ricalcolati, utilizzando come calibratore un CCM commutabile con valore di calibrazione assegnato mediante analisi con il procedimento analitico IFCC. I risultati sono stati valutati statisticamente, verificando la distribuzione delle differenze (9) e dei rapporti tra valori PL e LP prima e dopo ricalibrazione, nonché la regressione lineare (modello non-parametrico) e la correlazione tra le due serie di misurazioni. Un analogo procedimento di ricalibrazione è stato eseguito utilizzando un CCM non-commutabile.

RISULTATI

La Figura 1 mostra che nel confronto tra metodo LP e procedimento analitico IFCC tutti i 26 CCM sono risultati commutabili con i PN rappresentativi dei sieri da pazienti. Nella Figura 2 è mostrato il differente comportamento dei medesimi CCM in relazione ai PN nella coppia di metodi analitici PL/IFCC: 7 materiali su 26 (27%) risultano non commutabili, osservando una tendenza a correlare tra concentrazione di attività di LDH nei CCM e grado di non-commutabilità. Per una più completa valutazione del grado di commutabilità dei diversi materiali, nelle differenti coppie di metodi, i valori assunti dai residui normalizzati sono tabulati nella Tabella 1, in ordine di crescente concentrazione di attività catalitica di LDH. In Tabella 1 sono anche tabulati i valori dei residui normalizzati dei differenti materiali nella comparazione diretta dei due metodi commerciali (LP e PL): in questo ultimo caso 24 materiali su 26 (92%) risultano non commutabili, mostrando che il grado di non-commutabilità è, seppur grossolanamente, correlato con la concentrazione enzimatica dei materiali. I dati raccolti in questi esperimenti non hanno evidenziato relazione tra la non-commutabilità dei materiali ed il loro stato fisico (liquido o liofilizzato).

La Figura 3 illustra l'effetto di due CCM, uno commutabile ed uno non commutabile, utilizzati a scopo di ricalibrazione, sulle differenze tra risultati forniti dai metodi PL e LP. Come CCM commutabile era utilizzato il materiale 2 (BioRad Prolarit A), che sulla base dei valori di residuo normalizzato risultava essere il materiale "più commutabile" con i PN nelle coppie di metodi LP/IFCC e PL/IFCC (Tabella 1). In seguito a ricalibrazione dei due metodi con questo materiale si osservano differenze tra metodi più piccole di quelle originali e di quelle osservate in seguito a ricalibrazione con un CCM non commutabile (materiale 20 Bayer Control P). I parametri della distribuzione delle differenze tra metodi osservabili in seguito a ricalibrazione con un CCM commutabile e con un CCM non commutabile sono riportati nella Tabella 2. Dopo ricalibrazione con il CCM commutabile, la mediana delle differenze assolute era più contenuta, anche se non azzerata. Si osserva inoltre che dopo ricalibrazione con il CCM commutabile il rapporto tra i valori di LDH ottenuti con i due metodi commerciali, originariamente vicino a 2, assumeva un valore prossimo a 1. Se, invece, i metodi LP e PL erano ricalibrati con un CCM non commutabile, il rapporto tra i valori di LDH forniti dai due metodi risultava essere intorno a 0,8.

La Figura 4 illustra il confronto tra i risultati di LDH dei 109 sieri umani ottenuti con i metodi PL e LP, entrambi ricalibrati con il CCM no. 2 con valore di LDH assegnato con il metodo di riferimento. L'analisi della regressione lineare indicava il permanere di un'intercetta negativa (-9,7 U/L; intervallo di confidenza (CI): -11,4 - -8,3 U/L), significativamente diversa da 0, e di una pendenza (1,108; CI: 1,101 - 1,116), significativamente diversa da 1.

Il rapporto tra valori di LDH ottenuti con i metodi PL e LP nell'analisi dei materiali utilizzati nel programma di VEQ della Regione Lombardia con vari sistemi analitici

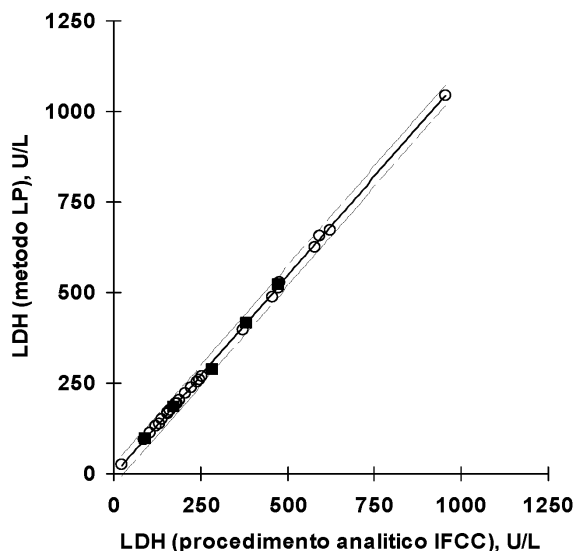


Figura 1

Valutazione della commutabilità dei materiali di calibrazione candidati (tondi bianchi) con i pool di sieri a normale composizione isoenzimatica (PN) (quadrati neri) nella coppia analitica metodo con reazione lattato-piruvato (LP)/procedimento analitico IFCC per la determinazione della lattato deidrogenasi (LDH). La retta di regressione dei valori misurati nell'analisi dei PN è tracciata con tratto più spesso; le linee più sottili delimitano l'intervallo retta di regressione $\pm 3 S_{y/x}$. L'equazione della retta di regressione è $y = 1,10x - 4,2$; $S_{y/x} = 9,4$ U/L.

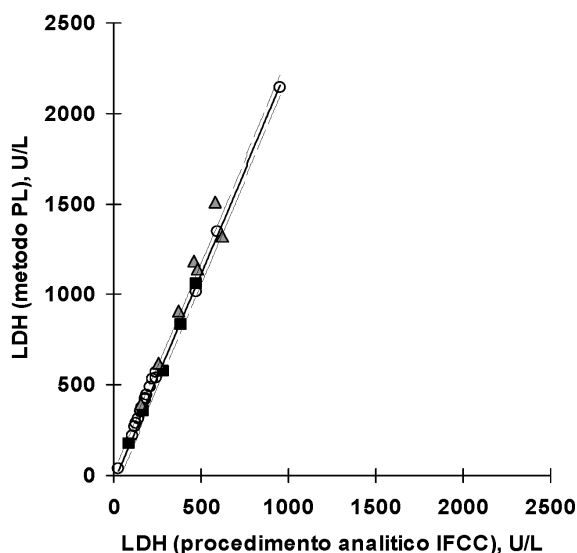


Figura 2

Valutazione della commutabilità dei materiali di calibrazione candidati (CCM) con i pool di sieri a normale composizione isoenzimatica (PN) (quadrati neri) nella coppia analitica metodo con reazione piruvato-lattato (PL)/procedimento analitico IFCC per la determinazione della lattato deidrogenasi (LDH). I tondi bianchi rappresentano i CCM commutabili, i triangoli grigi rappresentano i CCM non commutabili. La retta di regressione dei valori misurati nell'analisi dei PN è tracciata con tratto più spesso; le linee più sottili delimitano l'intervallo retta di regressione $\pm 3 S_{y/x}$. L'equazione della retta di regressione è $y = 2,30x - 34,8$; $S_{y/x} = 19,2$ U/L.

Tabella 1

Valutazione della commutabilità di 26 materiali candidati di calibrazione in tre coppie di metodi nei confronti di 5 pool di sieri con normale composizione isoenzimatica della lattato deidrogenasi (LDH)

No.	Materiale		Attività LDH U/L ^a	Residui normalizzati nella coppia di metodi		
	Nome	Stato		LP/IFCC	PL/IFCC	PL/LP
1	Bayer calibrator	Liofilizzato	25 ± 0,6	0,2	0,7	5,1 ^b
2	Prolarit A	Liofilizzato	89 ± 1,1	0,1	0,3	1,9
3	Prolarit B	Liofilizzato	106 ± 0,8	0,0	0,7	7,2 ^b
4	Prolarit C	Liofilizzato	122 ± 1,6	0,2	1,1	10,1 ^b
5	Liquichek 1	Liquido	131 ± 0,9	-0,3	1,3	18,1 ^b
6	Prolarit D	Liofilizzato	140 ± 0,6	0,0	1,4	16,5 ^b
7	Olympus calibrator	Liofilizzato	155 ± 0,6	-0,2	1,8	22,6 ^b
8	Prolarit E	Liofilizzato	157 ± 1,0	0,0	1,6	18,3 ^b
9	Bayer Control N	Liofilizzato	157 ± 2,0	-0,3	3,5 ^b	43,5 ^b
10	Prolarit F	Liofilizzato	164 ± 1,9	-0,2	1,7	22,5 ^b
11	Prolarit G	Liofilizzato	181 ± 1,1	-0,1	2,1	25,0 ^b
12	Control serum 1	Liofilizzato	184 ± 1,0	-0,3	2,1	28,6 ^b
13	Prolarit H	Liofilizzato	190 ± 1,2	-0,2	2,1	27,2 ^b
14	Prolarit I	Liofilizzato	208 ± 1,9	-0,3	2,2	30,2 ^b
15	Prolarit J	Liofilizzato	222 ± 1,4	-0,5	2,9	38,9 ^b
16	Prolarit K	Liofilizzato	240 ± 1,2	-0,8	2,8	41,1 ^b
17	Roche C.f.a.s.	Liofilizzato	246 ± 1,8	-0,9	0,6	17,3 ^b
18	Prolarit L	Liofilizzato	255 ± 1,9	-0,6	3,6 ^b	48,9 ^b
19	Liquichek 2	Liquido	371 ± 2,3	-0,7	4,8 ^b	64,9 ^b
20	Bayer Control P	Liofilizzato	458 ± 2,2	-1,3	8,8 ^b	119,3 ^b
21	Pool LDH5 aumentato	Liquido	475 ± 6,4	-0,7	-2,0	-12,7 ^b
22	ERM-AD453	Liofilizzato	479 ± 1,1	0,6	3,9 ^b	41,2 ^b
23	Control serum 2	Liofilizzato	580 ± 2,1	-0,9	10,9 ^b	138,6 ^b
24	Pool LDH1 aumentato	Liquido	593 ± 3,8	0,9	1,2	5,7 ^b
25	Pool LDH4 aumentato	Liquido	622 ± 6,3	-0,9	-3,7 ^b	-28,7 ^b
26	Pool LDH3 aumentato	Liquido	954 ± 18,7	-0,2	-0,7	-0,7

^amisurata con il procedimento analitico di riferimento IFCC (media ± DS).

^bmateriale non-commutabile.

LP, metodo con reazione lattato-piruvato; PL, metodo con reazione piruvato-lattato.

(media ± DS: 2,21 ± 0,12) è risultato in discreto accordo con il rapporto tra valori di LDH misurati con i metodi PL e LP nell'analisi dei sieri umani prima della ricalibrazione (1,97 ± 0,03).

DISCUSSIONE

Nonostante l'indiscussa necessità di standardizzare i risultati delle determinazioni degli enzimi nel siero, si è spesso registrato un fallimento o, comunque, un risultato non del tutto soddisfacente di approcci basati sull'adozione di un unico metodo e/o sull'impiego di un calibratore non appartenente ad un sistema metrologico di riferimento completo (29). D'altra parte, la soluzione rappresentata dall'impiego di sieri freschi da pazienti da impie-

gare come calibratori non è praticabile su vasta scala (30). L'approccio accreditato di maggiore efficacia è oggi rappresentato dall'implementazione di un sistema metrologico di riferimento completo (2, 31): in questo modello, la commutabilità dei materiali di calibrazione rappresenta un'importante criticità (32-34).

Nel caso della LDH sono disponibili tutti i componenti del sistema di riferimento (29). In particolare, il procedimento analitico di riferimento è basato sulla reazione di ossidazione del lattato a piruvato (metodo LP) (24). Nei laboratori clinici, almeno in alcune nazioni tra cui l'Italia, è tuttavia più utilizzato il metodo PL. In questo lavoro abbiamo verificato l'efficacia di un modello di standardizzazione basato sull'applicazione del principio della riferibilità, trasferendo ai metodi di routine LP e PL l'esattezza

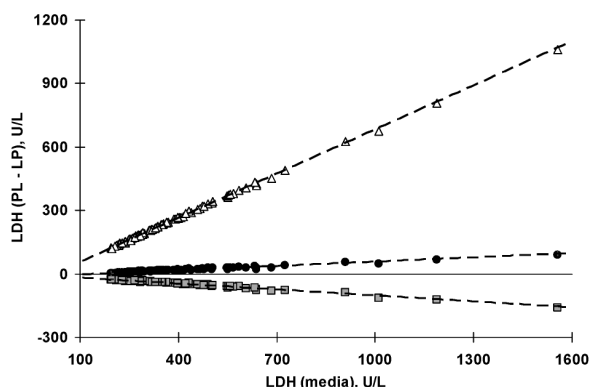


Figura 3
Differenze tra valori di lattato deidrogenasi (LDH) misurati con i metodi con reazione piruvato-lattato (PL) e lattato-piruvato (LP) nell'analisi di 109 sieri umani prima (triangoli bianchi) e dopo ricalibrazione di entrambi i metodi con un materiale di calibrazione candidato commutabile (tondi neri) e con uno non commutabile (quadrati grigi). Per ciascuna serie di dati, la retta di regressione è tracciata con tratto discontinuo. Il valore di LDH dei materiali di calibrazione era assegnato mediante procedimento analitico di riferimento.

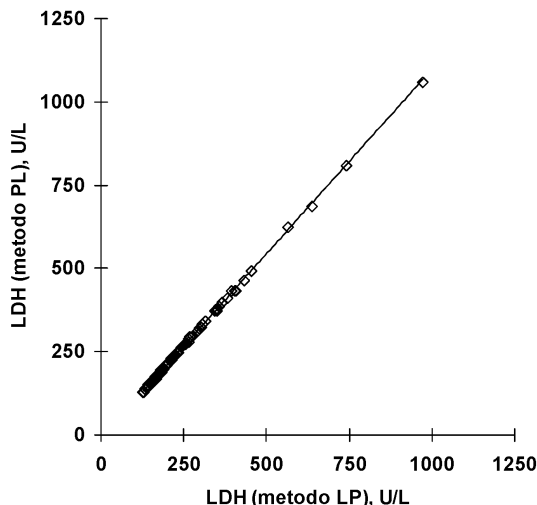


Figura 4
Analisi della regressione/correlazione dei valori di lattato deidrogenasi (LDH) misurati in 109 sieri umani con i metodi con reazione piruvato-lattato (PL) e lattato-piruvato (LP) dopo ricalibrazione con un materiale commutabile con valore di LDH assegnato mediante procedimento analitico di riferimento. Retta di regressione: $y = 1,108x - 9,7$; coefficiente di correlazione, 0,999.

Tabella 2

Parametri della distribuzione delle differenze assolute e dei rapporti tra valori di lattato deidrogenasi (LDH) forniti dal metodo con reazione piruvato-lattato (PL) e valori forniti dal metodo con reazione lattato-piruvato (LP) nell'analisi di 109 sieri umani

Parametro	Differenza assoluta PL - LP			Rapporto PL/LP		
	Calibrazioni originali	Dopo ricalibrazione con materiale commutabile ^a	Dopo ricalibrazione con materiale non commutabile ^b	Calibrazioni originali	Dopo ricalibrazione con materiale commutabile ^a	Dopo ricalibrazione con materiale non commutabile ^b
Mediana	206 U/L	13 U/L	37 U/L	1,98	1,06	0,81
Intervallo 5°-95° frattile	139-444	4-36	29-78	1,91-2,03	1,03-1,09	0,79-0,83

^aMateriale BioRad Prolarit A.

^bMateriale Bayer Control P.

za analitica del procedimento analitico di riferimento mediante l'impiego di un materiale di calibrazione commutabile. A questo scopo abbiamo in primo luogo verificato la commutabilità di un certo numero di CCM. I 26 CCM studiati sono risultati tutti commutabili in una coppia di metodi basati sul medesimo principio analitico (metodo LP, sia commerciale che eseguito come procedimento di riferimento), mentre si è rilevata un'abbastanza frequente non commutabilità (7 materiali su 26) quando la valutazione ha coinvolto una coppia di metodi (procedimento analitico di riferimento IFCC e metodo PL) basati su principi differenti.

La ricalibrazione dei due metodi commerciali LP e PL con un CCM commutabile con valore assegnato mediante analisi con il procedimento analitico di riferimento ha marcatamente migliorato la confrontabilità dei risultati ottenuti con i due metodi nell'analisi di sieri da pazienti. La differenza assoluta tra valori di LDH misurati con i

due metodi (PL - LP) è scesa da 206 U/L a 13 U/L dopo ricalibrazione, mentre il rapporto tra i valori forniti dai due metodi (PL/LP) si è avvicinato significativamente ad 1. Bisogna, tuttavia, rilevare che i risultati ottenuti con i due metodi anche dopo ricalibrazione non sono tra loro del tutto comparabili permanendo un significativo scostamento probabilmente dovuto alla diversa specificità dei due principi metodologici.

Dal punto di vista dell'applicazione clinica, lo scostamento tra i valori generati da metodi differenti può assumere particolare rilevanza in corrispondenza dei livelli decisionali. Per la LDH, un livello di importanza critica è rappresentato dal limite superiore di riferimento, che per i metodi standardizzati è prossimo a 250 U/L (35). Dall'analisi della regressione dei valori misurati con il metodo PL sui valori misurati con il metodo LP dopo adeguata ricalibrazione, si ricava che al valore di 250 U/L misurato con il metodo LP corrisponde un valore di

267 U/L misurato con il metodo PL, con uno scostamento pari al 6,8 %, in accordo con il valore mediano del rapporto tra i risultati ottenuti con il metodo PL e quelli ottenuti con il metodo LP. Tale scostamento è superiore all'obiettivo analitico desiderabile per lo scostamento sistematico ($\pm 4,3\%$) derivato dalla variabilità biologica dell'enzima (36), ma è inferiore al limite interinale (7,8%) proposto come specifica di qualità per l'inesattezza della misura della LDH (37). Una migliore confrontabilità tra valori di LDH misurati con metodi basati su principi differenti, ma tra loro armonizzati con corretti procedimenti di ricalibrazione, ne permette un migliore utilizzo clinico in relazione alla possibilità di impiegare limiti di riferimento e livelli decisionali comuni, semplificando altresì l'interpretazione dei risultati nei programmi di VEQ.

BIBLIOGRAFIA

- Bais R, Panteghini M. Principles of clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2006:191-218.
- Panteghini M, Ceriotti F. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Biochim Clin* 2000;24:499-508.
- Thienpont LM, Van Uytendaele K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2002;323:73-87.
- Jansen R, Schumann G, Badenhuysen H, et al. Trueness verification and traceability assessment of results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum. An international study in the EC4 framework of Calibration 2000 project. *Clin Chim Acta* 2006;368:160-7.
- Fasce CF Jr, Rej R, Copeland WH, et al. A discussion of enzyme reference materials: applications and specifications. *Clin Chem* 1973;19:5-9.
- Franzini C. Commutability of reference materials in clinical chemistry. *J Int Fed Clin Chem* 1993;5:169-73.
- Rej R. Accurate enzyme activity measurements. Two decades of development in the commutability of enzyme quality control materials. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:352-64.
- Brion E, Lessinger J-M, Gould N, et al. Evaluation of commutability of control materials. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:625-30.
- Cattozzo G, Franzini C, Melzi d'Eril GV. Myoglobin and creatine kinase MB mass assays: intermethod variability of patient sera and commercially available control materials. *Clin Chim Acta* 2001;303:55-60.
- Cattozzo G, Fabi A, Franzini C. Intermethod variability of sodium and potassium results: patients' sera and commercially available control sera. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:387-92.
- Cattozzo G, Scarsi G, Franzini C. Normalizing intermethod free triiodothyronine patient results: need for commutable materials. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:777-80.
- Franzini C, Ceriotti F. Impact of reference materials on accuracy in clinical chemistry. *Clin Biochem* 1998;31:449-57.
- Miller WG. Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes. *Clin Chim Acta* 2003;327:25-37.
- Cattozzo G, Franzini C, Melzi d'Eril G. Commutability of calibration and control materials for serum lipase. *Clin Chem* 2001;47:2108-13.
- Panteghini M, Bais R, van Solinge WW. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2006:601-3.
- Hui DS, Chan MC, Wu AK, et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS): epidemiology and clinical features. *Postgrad Med J* 2004;80:373-81.
- Dhaliwai G, Cornett PA, Tierney LM. Hemolytic anemia. *Am Fam Physician* 2004;69:2599-606.
- Montillo M, Hamblin T, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005;90:391-9.
- Riley RD, Heney D, Jones RD, et al. A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:4-12.
- Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, et al. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin* 2004;54:131-49.
- Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem* 2002;48:1151-9.
- Suh SY, Ahn HY. Lactate dehydrogenase as a prognostic factor for survival time of terminally ill cancer patients: a preliminary study. *Eur J Cancer* 2007;43:1051-9.
- Bais R, Philcox M. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase (L-Lactate: NAD+Oxidoreductase, EC 1.1.1.27). International Federation of Clinical Chemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:639-55.
- 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 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:643-8.
- Institute for Reference Materials and Measurements. Certification report - Catalytic concentration of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 (LD1) determined by the IFCC method at 37 °C. Certified Reference Material ERM-AD453/IFCC.
- Siekmann L, Bonora R, Burtis CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 1. The concept of reference procedure for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:631-4.
- Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Applications of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
- van Helden WC, Visser RW, Van den Bergh FA, et al. Comparison of intermethod analytical variability of patient sera and commercial quality control sera. *Clin Chim Acta* 1979;93:335-47.
- Infusino I, Bonora R, Panteghini M. Traceability in clinical enzymology. *Clin Biochem Rev* 2007;28:155-61.
- Franck PF, Steen G, Lombarts AJ, et al. Multicenter harmonization of common enzyme results by fresh patient-pool sera. *Clin Chem* 1998;44:614-21.
- Muller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine. *Clin Chem* 2000;46:1907-9.
- Baadenhuysen H, Kuypers A, Weykamp C, et al. External quality assessment in The Netherlands: time to introduce commutable survey specimens. Lessons from the Dutch "Calibration 2000" project. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:304-7.
- Baadenhuysen H, Steigstra H, Cobbaert C, et al. Commutability assessment of potential reference mate-

- rials using a multicenter split-patient-sample between-field-methods (twin-study) design: study within the framework of the Dutch project "Calibration 2000". *Clin Chem* 2002;48:1520-5.
34. Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Towards standardization of cardiac troponin I measurement. Part II: assessing commutability of candidate reference materials and harmonization of cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2006;52:1685-92.
 35. Schumann G, Klauke R. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentration of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects. *Clin Chim Acta* 2003;327:69-79.
 36. Ricòs C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
 37. Westgard QC: clinical quality requirements. European biologic goals and calculated biologic allowable total errors. <http://www.westgard.com/europe.htm>