

KETRIN GOETZ MÜLLER

**INTERVALOS DE REFERÊNCIA POR MÉTODO INDIRETO PARA
MARCADORES SÉRICOS HEPÁTICOS EM CRIANÇAS BRASILEIRAS**

JOINVILLE

2020

KETRIN GOETZ MÜLLER

**INTERVALOS DE REFERÊNCIA POR MÉTODO INDIRETO PARA
MARCADORES SÉRICOS HEPÁTICOS EM CRIANÇAS BRASILEIRAS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. Coorientador: Prof. Dr. Marco Fabio Mastroeni.

JOINVILLE

2020

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

M958i Müller, Ketrin Goetz
Intervalos de referência por método indireto para marcadores séricos hepáticos em crianças brasileiras / Ketrin Goetz Müller; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França; coorientador Dr. Marco Fabio Mastroeni. – Joinville: UNIVILLE, 2020.

110 p.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Valores de referência (Medicina). 2. Crianças. 3. Marcadores biológicos. 4. Enzimas. I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Mastroeni, Marco Fabio (coorient.). III. Título.

CDD 616.0756

Termo de Aprovação

“Intervalos de Referência por Método Indireto para Marcadores Séricos Hepáticos em Crianças Brasileiras”

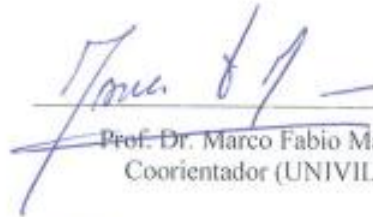
por

Ketrin Goetz Müller

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Marco Fabio Mastroeni
Coorientador (UNIVILLE)



Profa. Dra. Marta Jussara Cremer
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Marco Fabio Mastroeni
Coorientador (UNIVILLE)



Profa. Dra. Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre
(CATÓLICA/SC)



Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
(UNIVILLE)

Joinville, 04 de maio de 2020

“E, tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor e não aos homens.”

Colossenses 3:23

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, por sempre dar-me forças quando acredito, na minha pequenez, estarem esgotadas. Por ser minha rocha, minha fortaleza e minha paz. Obrigada Senhor!

Agradeço a minha família por apoiar-me de tantas maneiras: ao meu marido Jean, por ser o maior incentivador a inscrever-me no Mestrado; a minha mãe Ade e ao meu pai Alexandre, por cuidarem da minha pequena Helena durante as minhas vastas horas de estudos; a minha sogra Marcia, por cuidar da nossa casa enquanto meu foco estava totalmente direcionado a pesquisa; ao meu irmão Gabriel, por ser mente pensante em uma fase importante da minha dissertação; a minha filha Teresa, que sente minhas emoções tão aguçadas nesta fase; e a minha filha Helena, que aguarda ansiosamente o término deste ciclo de estudos para que possamos aproveitar melhor nossos momentos de mãe e filha. Amo vocês família!

Agradeço ao meu orientador Dr. Paulo e ao meu coorientador Dr. Marco, por oportunizarem-me trilhar o caminho da pesquisa acadêmica, mesmo depois de tanto tempo afastada desta área. Certamente, vocês foram excelentes professores nesta jornada. Sinto-me honrada!

Também sou grata aos meus colegas de trabalho e de estudos por facilitarem este projeto: a Dra. Myrna, que me oportunizou realizar este estudo com dados da DASA; a Dra. Dalva, assim como a Maria Augusta, Guta, que dedicaram algumas horas de seu tempo para apoiar a minha pesquisa; ao colega Paulo, que sempre prontamente ajudava-me com o envio de informações e com esclarecimento de dúvidas; ao meu líder Manfred, que me concedeu folgas no trabalho para que eu pudesse dedicar-me a pesquisa; aos meus liderados Juliana, Romulo e Thaís que seguiram firmes no trabalho nos dias que precisei ausentar-me; e aos colegas de turma, em especial, Emily, Ariane e Cassio, por formarmos um quarteto fantástico!

RESUMO

Tema: Uma das condições para que os exames laboratoriais forneçam informações fidedignas ao corpo clínico é a determinação adequada dos intervalos de referência, que é complexa e dependente da seleção de uma população de referência apropriada. Na população infantil os desafios são maiores e a utilização de abordagens indiretas para este público tem ganhado espaço. Até o desenvolvimento desta pesquisa, nenhum estudo foi publicado sobre a determinação de intervalos de referência por método indireto para os marcadores séricos hepáticos alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e gama glutamiltransferase, envolvendo crianças brasileiras.

Métodos: Recuperaram-se os dados de janeiro de 2017 a dezembro de 2018 do sistema de informação laboratorial de uma empresa de medicina diagnóstica com várias marcas distribuídas no Brasil. O grupo amostral inicial englobou 26.718 crianças de 0 a 12 anos incompletos que realizaram pelo menos a dosagem de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase na plataforma Roche Cobas. Aplicaram-se os critérios de exclusão de indivíduos com base na realização de mais de uma dosagem do mesmo marcador sérico hepático durante o período do estudo e ausência de qualquer anormalidade nos exames laboratoriais correlatos. Os dados do grupo amostral final foram utilizados para a determinação dos intervalos de referência utilizando-se os percentis de 2,5 a 97,5.

Resultados: O grupo amostral inicial foi reduzido gradualmente pelos critérios de seleção a 12.326 indivíduos, que constituiu o grupo de referência utilizado para calcular intervalos de referência específicos por sexo e faixa etária. Todas as enzimas exibiram atividades séricas mais elevadas na categoria <1 ano que eventualmente diminuiriam na categoria subsequente (1 a <5 anos). Para AST, em ambos os sexos, e GGT no sexo feminino, o percentil 97,5 demonstrou uma tendência contínua de queda com o aumento da idade, o que difere dos padrões mostrados pelos níveis séricos de ALT e FAL, em ambos os sexos, e GGT no sexo masculino. No percentil 97,5, as atividades séricas foram mais elevadas no sexo masculino, com exceção da AST e GGT na categoria <1 ano e FAL nas categorias 1 a <5 anos e 5 a <10 anos que apresentaram níveis séricos mais elevados para o sexo feminino.

Conclusões: Este é o primeiro estudo que determina intervalos de referência por abordagem indireta para marcadores séricos hepáticos com amostras de crianças das cinco regiões do Brasil. Embora o comportamento das atividades séricas das enzimas pesquisadas seja semelhante a outros estudos internacionais por abordagem direta ou indireta com população infantil e adulta, os valores encontrados nesta pesquisa diferem destas populações, o que reforça a importância de se estabelecer intervalos de referência específicos para a população infantil brasileira. Os resultados deste estudo são clinicamente úteis e podem permitir aos profissionais de saúde requisitantes destes exames laboratoriais interpretar de forma mais adequada os resultados emitidos e decidir por condutas clínicas mais eficazes, e poderão, ainda, ser utilizados para o planejamento de pesquisas similares para outros analitos importantes na pediatria.

Palavras Chave: Intervalos de referência, Método Indireto, Criança, Marcadores séricos hepáticos, Aspartato aminotransferase, Alanina aminotransferase, Gama glutamiltransferase, Fosfatase alcalina

ABSTRACT

Background: One of the conditions for laboratory tests to provide reliable information to the clinical staff is the appropriate determination of the reference intervals, which is complex and depends on the selection of an appropriate reference population. In the child population, the challenges are greater and the use of indirect approaches for this audience has gained space. Until the development of this research, no study was published on the determination of reference intervals by indirect method for the serum liver markers alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and gamma glutamyltransferase, involving Brazilian children.

Methods: Data from January 2017 to December 2018 were retrieved from the laboratory information system of a diagnostic medicine company with several brands distributed in Brazil. The initial sample group included 26,718 children aged 0 to 12 years old who underwent at least the measurement of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase on the Roche Cobas platform. The exclusion criteria for individuals were applied based on the performance of more than one measurement of the same hepatic serum marker during the study period and the absence of any abnormality in the related laboratory exams. The data from the final sample group were used to determine the reference intervals using the 2.5 to 97.5 percentiles.

Results: The initial sample group was gradually reduced by the selection criteria to 12,326 individuals, which constituted the reference group used to calculate specific reference intervals by sex and age group. All enzymes exhibited higher serum activities in the <1 year category, which eventually decreased in the subsequent category (1 to <5 years). For AST, in both sexes, and GGT in the female sex, the 97.5 percentile demonstrated a continuous downward trend with increasing age, which differs from the patterns shown by the serum levels of ALT and FAL, in both sexes, and GGT in males. In the 97.5 percentile, serum activities were higher in males, with the exception of AST and GGT in the category <1 year and FAL in the categories 1 to <5 years and 5 to <10 years, which showed higher serum levels for the women.

Conclusions: This is the first study to determine reference intervals by indirect approach for serum hepatic markers with samples from children in the five regions of Brazil. Although the behavior of the serum activities of the researched enzymes is similar to other international studies by direct or indirect approach with children and adults, the values found in this research differ from these populations, which reinforces the importance of establishing specific reference intervals for the population Brazilian children's. The results of this study are clinically useful and may allow physicians requesting these laboratory tests to more appropriately interpret the results issued and decide on more effective clinical procedures, and may also be used to plan similar research for other important analytes in pediatrics.

Key words: Reference intervals, Indirect Method, Child, Serum hepatic markers, Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase, Gamma-glutamyltransferase, Alkaline phosphatase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALT – alanina aminotransferase
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST – aspartato aminotransferase
CALIPER - *Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals*
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*
DASA - Diagnósticos da América S. A.
FAL – fosfatase alcalina
FEM - feminino
GGT – gama glutamiltransferase
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry*
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
ISO - *International Organization for Standardization*
KIGGS - *Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland*
MASC - Masculino
OMS - Organização Mundial da Saúde
PALC – Programa de Acreditação em Laboratório Clínico
PPGMS – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RFC - força centrífuga relativa
TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido
TCUD - termo de consentimento de uso de dados
TGO - transaminase glutâmico-oxalacética
TGP – transaminase glutâmico-pirúvica
UNIVILLE - Universidade da Região de Joinville

SUMÁRIO

CATALOGAÇÃO	
TERMO DE APROVAÇÃO	
EPÍGRAFE	
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Fisiologia Hepática	14
3.2 Principais testes de função hepática ou marcadores séricos hepáticos	15
3.2.1 Aspartato aminotransferase	16
3.2.2 Alanina aminotransferase	17
3.2.3 Razão AST/ALT ou Razão de Ritis	17
3.2.4 Fosfatase alcalina	17
3.2.5 Gama glutamiltransferase	18
3.3 Outros marcadores hepáticos de importância clínica	19
3.4 Intervalos de referência	19
3.4.1 Breve história sobre intervalos de referência	19
3.4.1.1 Intervalos de referência no âmbito regulatório	21
3.4.1.2 Métodos diretos e indiretos para a determinação de intervalos de referência	21
3.4.2 Definições sobre intervalos de referência	23
3.4.3 Métodos diretos para determinação de intervalos de referência	26
3.4.4 Métodos indiretos para determinação de intervalos de referência	28
3.4.5 Intervalos de referência para marcadores séricos hepáticos em crianças	30
3.5 Empresa DASA	32
4 METODOLOGIA	34
4.1 Aspectos éticos	34

4.2 Desenho, período e local de estudo	35
4.3 Participantes do estudo	36
4.3.1 Critérios de inclusão	37
4.3.2 Critérios de exclusão	37
4.4 Coleta de dados	38
4.5 Análise de dados	41
4.5.1 Organização dos dados.....	41
4.5.2 Análise estatística	42
5 INTERDISCIPLINARIEDADE	43
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICES.....	51
APÊNDICE A – Termo de compromisso de utilização de dados (TCUD)	52
APÊNDICE B – Declaração de instituição co-participante	54
APÊNDICE C – Análise de Erro Total dos testes laboratoriais da pesquisa	56
APÊNDICE D – Intervalos de referência para exames correlacionados aos exames da pesquisa	61
APÊNDICE E – Estrutura base orientada a objeto utilizada na linguagem de programação Python 3.7.7	64
APÊNDICE F – Artigo Científico.....	68
APÊNDICE G – Submissão do artigo científico à revista Clinical Chemistry	104
APÊNDICE H – Autorização para cópias da dissertação	107

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o diagnóstico das doenças hepáticas ainda é realizado por meio da correlação entre manifestações clínicas, resultados de métodos de imagem e exames laboratoriais complementares. Os exames laboratoriais solicitados na prática clínica para avaliação hepática são geralmente requisitados como testes de exclusão em pacientes com sintomas inespecíficos ou como parte de exames de rotina para avaliar o estado geral de saúde do paciente (1).

Um grande número de doenças hepáticas pode acometer qualquer indivíduo, incluindo as crianças. Nas últimas décadas, a doença hepática gordurosa não alcoólica tornou-se altamente prevalente na população infantil, com aumento de 2,7 vezes do final da década de 1980 até 2010 (2). O aumento considerável da doença hepática gordurosa não alcoólica está diretamente relacionado à alta prevalência mundial da obesidade infantil e, embora seja raro que desenvolvam doença hepática terminal decorrente da doença hepática gordurosa não alcoólica, as crianças podem se tornar cirróticas quando adultas (3).

Em maio de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a segunda edição da lista de exames laboratoriais essenciais, em que são destacados os exames necessários para direcionar prioridades em saúde (4). Entre os exames mencionados pela OMS encontram-se a determinação da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL) e gama glutamil transferase (GGT), tendo como um dos propósitos avaliar o sistema hepatobiliar (4).

A realização destes exames laboratoriais essenciais somente tem o impacto desejado quando o laboratório clínico que os realiza garante informações fidedignas que sejam úteis para o diagnóstico ou monitoramento da doença hepática. Uma destas condições é o estabelecimento de intervalos de referência do exame laboratorial, os quais devem ser específicos para a população atendida (5,6).

O estabelecimento de intervalos de referência é complexo e dependente da seleção de uma população de referência apropriada (7). A diretriz mais recente do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sobre definição, estabelecimento e verificação de intervalos de referência no laboratório clínico tem enfoque principalmente na população adulta e reconhece os desafios de se determinar intervalos de referência pediátricos (5). O recrutamento de um grande número de participantes saudáveis, as dificuldades na coleta de volumes sanguíneos adequados,

além do próprio desenvolvimento infantil, são alguns dos importantes desafios para a determinação de intervalos de referência pediátricos confiáveis e precisos para muitos analitos (8). Devido a tais questões, a maioria dos laboratórios adota os valores relatados pelo fabricante do teste de diagnóstico adquirido ou pela literatura médica que, muitas vezes, são desatualizados e, por vezes, não representativos da sua população atendida (8,9).

Embora o desenvolvimento de intervalos de referência seja laborioso, há iniciativas em algumas partes do mundo que estão esforçando-se para estabelecer intervalos de referência pediátricos, como o Projeto “Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals” (CALIPER) no Canadá e o estudo de base populacional KIGGS na Alemanha (10,11). No entanto, existem poucos estudos para a população brasileira e, até o desenvolvimento desta pesquisa, nenhum estudo foi publicado sobre a determinação de intervalos de referência por método indireto para marcadores séricos hepáticos, envolvendo crianças brasileiras.

A determinação de intervalos de referência para marcadores séricos hepáticos em crianças brasileiras permitirá aos profissionais de saúde requisitantes destes exames interpretarem adequadamente os resultados emitidos e decidir por condutas clínicas eficazes. Os resultados deste estudo poderão ser úteis para o planejamento de pesquisas similares para outros analitos importantes na pediatria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar intervalos de referência para os marcadores séricos hepáticos ALT, AST, FAL e GGT em crianças brasileiras através de método indireto.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as medianas, intervalos interquartil, médias e desvios-padrões de acordo com sexo e faixa etária.
- Avaliar se as medianas das concentrações enzimáticas estão associadas ao sexo e a faixa etária.
- Estabelecer intervalos de referência para ALT, AST, GGT e FAL em crianças brasileiras segundo o sexo e a faixa etária.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fisiologia Hepática

O fígado é a maior glândula do corpo e desempenha inúmeras funções metabólicas e excretoras vitais (12). Relaciona-se com a maioria dos sistemas orgânicos do corpo, como o sistema gastrointestinal e endócrino, com atuação na digestão e no metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas, além de realizar a detoxificação do organismo, armazenar substâncias como as vitaminas e o ferro, auxiliar na resposta imune e na hemostasia, entre outras funções (12–14).

O fígado desempenha papel fundamental na manutenção adequada dos níveis glicêmicos no organismo (12). Para tal, sintetiza e armazena glicogênio, quando o aporte de glicose se encontra elevado na corrente sanguínea, bem como promove a glicogenólise quando os níveis glicêmicos baixam (12). Ainda, é no fígado que ocorre a chamada gliconeogênese, processo de formação de glicose a partir de outras fontes energéticas (12).

O fígado também contribui de modo significativo para o metabolismo dos lipídeos; embora a maioria das células corporais metabolizem gordura, algumas etapas do metabolismo lipídico ocorrem apenas no fígado (12). Este, é responsável pela oxidação de ácidos graxos para suprir energia para outras funções corporais, pela síntese de colesterol, fosfolipídios e lipoproteínas (12).

Em relação ao metabolismo proteico, pode-se citar como funções hepáticas mais importantes a desaminação de aminoácidos, a formação de ureia para remoção da amônia (composto tóxico para o organismo) da circulação, a formação de proteínas plasmáticas – cerca de 90% de todas as proteínas plasmáticas são formadas pelas células hepáticas – e a síntese de aminoácidos, assim como a síntese de outros compostos químicos importantes a partir dos aminoácidos (12).

O fígado também serve como um importante compartimento de armazenamento de ferro e vitaminas, especialmente as vitaminas A, D e B12 (15,16). Essas vitaminas podem ser estocadas em quantidade suficiente para prevenir sua deficiência durante meses (15,16). O ferro, por sua vez, é estocado na forma de ferritina nas células hepáticas, até que se torne necessário em alguma outra parte do organismo (14).

Adicionalmente, diversos hormônios secretados pelas glândulas endócrinas são quimicamente alterados ou excretados pelo fígado, incluindo a tiroxina e os hormônios esteroides, como estrogênio, cortisol e aldosterona (13). A lesão hepática pode levar ao acúmulo de um ou mais desses hormônios na circulação, o que provoca alteração na atividade dos sistemas hormonais envolvidos (13).

Por fim, o fígado atua na detoxificação do sangue de substâncias tóxicas para o corpo, através da eliminação destas na bile (13). Os hepatócitos expressam um grande número de enzimas do citocromo P450 e outras enzimas que podem converter xenobióticos, incluindo fármacos e toxinas, em metabólitos menos lipofílicos, inativos e atóxicos, possibilitando a sua eliminação (13).

O conhecimento da fisiologia hepática permite a maior compreensão das principais patologias que acometem o órgão e a forma como estas se manifestam. A maioria das doenças hepáticas se desenvolve de forma silenciosa, podendo não apresentar sintomas até que ocorram outras complicações (17). Portanto, entender quais os recursos existentes para diagnóstico e acompanhamento das patologias hepáticas, os denominados marcadores séricos hepáticos, faz-se necessário.

3.2 Principais testes de função hepática ou marcadores séricos hepáticos

Os atuais testes sanguíneos utilizados como marcadores séricos foram desenvolvidos na década de 1950 e, ainda, são amplamente utilizados para a identificação de pacientes com doença hepática, ou mesmo na tentativa de exclusão das mesmas, em pacientes com sintomas inespecíficos (17).

Os chamados “testes de função hepática”, como são historicamente conhecidos, estão disponíveis em qualquer laboratório clínico e, o protocolo padrão de quais exames são contemplados pode variar dependendo do hospital ou unidade de atendimento médico (17). Alguns autores ainda denominam os marcadores hepáticos como “testes de função hepática” (18), entretanto, este termo parece não ser o mais adequado, visto que a maioria dos exames contemplados não está relacionado à função hepática em si, mas às dosagens de enzimas hepatobiliares, cuja elevação condiz com a provável origem da doença, se hepática ou colestática, mas que também podem ocorrer em diversas situações fisiológicas ou patológicas envolvendo outros órgãos (17,19).

Deste modo, os exames de ALT, AST, FAL e GGT devem preferencialmente ser denominados como “marcadores séricos hepáticos”. Os exames que podem ser referenciados como “testes de função hepática” são as dosagens de bilirrubina e albumina, já que estes tratam-se de substâncias produzidas pelo próprio fígado e, portanto, sua mensuração traria informações sobre a capacidade funcional deste órgão (17,19).

Os marcadores séricos hepáticos são muito utilizados no atendimento primário de pacientes com sintomas inespecíficos e não é incomum apresentarem resultados alterados (17). Resultados anormais devem ser criteriosamente interpretados após revisão dos resultados obtidos em testes anteriores, avaliação do histórico médico, do uso de medicamentos e de plantas medicinais ou chás de ervas medicinais (17,20).

Segundo alguns autores, a investigação inicial de uma potencial doença hepática deve incluir dosagens de bilirrubina, albumina, ALT, FAL e GGT (17). No entanto, a OMS determina que os testes para avaliação da saúde hepática e biliar, tanto para o diagnóstico quanto para o monitoramento, são: bilirrubinas, albumina, ALT, AST, FAL e GGT (4).

3.2.1 Aspartato aminotransferase

A AST, também conhecida como transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), é uma enzima encontrada no coração, fígado, músculo esquelético e rins (18,21). Existem duas isoformas da AST, uma mitocondrial e outra citoplasmática; a maior parte da atividade da AST se dá pela forma mitocondrial, enquanto a atividade da AST sérica circulante ocorre pela isoforma citoplasmática (21). O aumento dos níveis séricos da AST mitocondrial ocorre em lesões teciduais extensas, como em doenças crônicas do fígado (21).

Em caso de dano hepatocelular, a AST é liberada na circulação logo após a ALT, em grande quantidade, sendo um marcador hepático bastante sensível (18). Entretanto, se os níveis de AST se encontram aumentados sem aumento da ALT, há indicativo de um evento cardíaco ou muscular, e não hepático (18). Em crianças, a dosagem de creatina quinase pode ser útil para diferenciar a origem muscular da AST, como por exemplo em um caso de distrofia muscular (17).

3.2.2 Alanina aminotransferase

A ALT, também conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), é uma enzima encontrada em pequena quantidade nos rins, coração, músculos e, em maior concentração, no fígado (21). É considerada uma enzima hepática mais específica que a AST, sendo por isso muito utilizada no acompanhamento laboratorial de diversas condições patológicas do fígado (17,18,21). Qualquer tipo de dano celular hepático pode aumentar razoavelmente os níveis de ALT. Por se tratar de uma enzima citoplasmática, é a primeira enzima a ser liberada na circulação e, portanto, encontra-se mais elevada em doenças agudas do fígado (18,21). Entretanto, apesar da associação entre níveis aumentados de ALT e sua especificidade para doenças hepatocelulares, o pico de elevação da ALT não corresponde com a extensão do dano celular hepático (21).

3.2.3 Razão AST/ALT ou Razão de Ritis

A razão AST/ALT, também conhecida como razão de Ritis, geralmente apresenta maior utilidade clínica que a medida destas enzimas individualmente (18,21). Ambas as enzimas costumam ter suas concentrações séricas em proporção similar nas doenças hepáticas, mas o aumento maior de uma ou de outra enzima pode ser importante para o diagnóstico diferencial (21). A ALT é liberada primeiro na circulação, sendo seguida da AST. Desta forma, em doenças agudas, como hepatite viral aguda, percebe-se um aumento maior da ALT em relação à AST, e o valor da razão entre as enzimas é inferior a 1 (18,19). Já na hepatite crônica, é a atividade da AST que se encontra mais elevada, sendo o valor da razão maior que 1, mas inferior a 2 (18). Razões muito aumentadas da relação AST/ALT refletem na severidade da doença hepática; valores maiores que 2 são encontrados, por exemplo, na doença alcoólica hepática, na esteatose hepática e na cirrose (18,19).

3.2.4 Fosfatase alcalina

A FAL é uma enzima que está presente em maior quantidade no fígado e nos ossos, mas também é encontrada, em menor quantidade, no intestino, rins, leucócitos e placenta, na forma de diferentes isoenzimas (17,18,21). A atividade sérica da FAL é

basicamente dividida entre a fração hepática e a fração óssea, sendo que para diferenciar a origem da patologia responsável pelo aumento da FAL, mensura-se as demais enzimas hepáticas, como por exemplo a GGT ou a 5'nucleotidase, ou se opta pelo exame de eletroforese para separar as diferentes isoenzimas (17,18,21).

Na gravidez a FAL atinge valores significativamente maiores devido ao aumento da isoenzima placentária, bem como nas crianças em fase de crescimento em virtude do aumento da fração óssea (17,19,21). Nos casos em que há uma patologia no organismo, a FAL é a principal enzima liberada, como na colestase hepática, que é a condição clínica onde há obstrução do fluxo da bile, e também nas doenças ósseas, como fraturas, tumores e metástases ósseas (17,18). Hepatites virais agudas, por sua vez, geralmente elevam muito pouco os valores da FAL; mas doenças como a cirrose ou doenças infiltrativas do fígado, por exemplo, costumam aumentar consideravelmente as concentrações séricas desta enzima (21). Alguns tumores secretam FAL diretamente no plasma, assim como metástases hepáticas e ósseas, fazendo com que os níveis desta enzima subam consideravelmente nestes casos (21). Algumas doenças, como a hipofosfatase congênita, entretanto, diminuem os níveis séricos da FAL (21).

3.2.5 Gama glutamiltransferase

A GGT é uma enzima microssomal presente no fígado, rins, pâncreas, intestino e próstata (17,19). A GGT normal é um indicativo de ausência de doenças ósseas, já que a enzima não está presente no tecido ósseo. Portanto, o seu uso combinado com a FAL possibilita o diagnóstico diferencial de uma patologia hepática de uma óssea (17,21). Um aumento da atividade da GGT combinado com o aumento da atividade da FAL, é um quadro sugestivo de obstrução biliar, também conhecido como colestase (19).

A atividade sérica da GGT está majoritariamente relacionada ao sistema hepatobiliar e, pode-se dizer, que é uma enzima sensível para apontar uma doença hepática, porém pouco específica (18,19). A atividade da GGT encontra-se elevada principalmente nas hepatites virais, principalmente, mas também no diabetes mellitus, pancreatite aguda, infarto do miocárdio, síndrome de Guillain-Barré, hipertireoidismo

e obesidade, além do alcoolismo, sendo que neste último, a GGT pode encontrar-se aumentada cerca de dez vezes em relação ao seu valor normal (18,19).

3.3 Outros marcadores hepáticos de importância clínica

A busca constante por marcadores hepáticos mais sensíveis e mais específicos faz com que existam várias opções disponíveis atualmente. São diversas as substâncias que podem ser dosadas para avaliar de forma direta ou indireta a saúde do sistema hepático e biliar, além das já citadas.

Como exemplo, podemos citar a 5'Nucleotidase, uma glicoproteína de membrana que atua como enzima em vários tecidos do corpo (21). Esta enzima é um marcador precoce bastante preciso de tumores hepáticos primários ou secundários (21).

A ceruloplasmina também é uma proteína de fase aguda, sintetizada no fígado. Atua como principal transportador do cobre no sangue. Os níveis séricos da ceruloplasmina encontram-se elevados na doença crônica ativa do fígado, e diminuídos na doença de Wilson, o que torna a ceruloplasmina um dos marcadores bioquímicos mais confiáveis para diferenciar estas patologias (19).

A disponibilidade de vários marcadores séricos hepáticos requisitados pelo corpo clínico como exames laboratoriais somente têm o impacto desejado quando o laboratório que os realiza garante informações fidedignas que sejam úteis para o diagnóstico ou monitoramento da doença hepática. Uma parte vital destas informações é o intervalo de referência de cada exame laboratorial, fornecido pelos laboratórios para apoiar na interpretação dos resultados (22).

3.4 Intervalos de referência

3.4.1 Breve história sobre intervalos de referência

A teoria sobre intervalos de referência continua em elaboração (23). Desde 1963, quando Hoffmann descreveu um método simples e promissor de calcular intervalos de referência utilizando dados de pacientes existentes em um banco de dados de laboratório, discute-se sobre suas aplicações e melhores ferramentas para sua determinação (6,24,25). Hoffmann (1963) já declarava que “nenhum intervalo

provavelmente será totalmente certo ou errado”.

Até a década de 60, o termo "valores normais" era usualmente utilizado (24). Com o passar dos anos, este termo tornou-se inapropriado, pois o mesmo pressupõe resultados fora do intervalo de referência serem "anormais". No entanto, dependendo do método estatístico utilizado para o cálculo, esta pressuposição pode se tornar uma inverdade. Sendo assim, em 1969, a partir da apresentação do trabalho publicado por Gräsbeck e Saris em um Congresso da Sociedade Escandinava, iniciaram-se novas discussões sobre o termo “valores normais”, que culminaram, vinte anos após, na publicação do primeiro documento oficial do painel de especialistas do International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) sobre a teoria dos valores de referência (26,27).

De 1987 a 1991, o IFCC publicou uma série de seis artigos orientativos referentes a procedimentos para produção de intervalos de referência pelos laboratórios clínicos (27–32). Neste período, o assunto deixou de ser filosófico, sendo aceito universalmente como uma das ferramentas de auxílio no processo de tomada de decisão clínica mais importantes da medicina laboratorial (33,34). Entretanto, estas recomendações do IFCC foram por vezes consideradas demasiadamente complicadas para serem aplicadas na prática, sendo utilizadas de forma equivocada (35). Embora vários trabalhos importantes a respeito do assunto tenham sido publicados entre os anos de 1990 e 2008, essas dificuldades levaram à publicação da diretriz C28-A3, em 2008, pelo CLSI, constituindo-se na etapa mais significativa no desenvolvimento de intervalos de referência, sendo ainda utilizada nos dias atuais. (5,25,36–38).

Na diretriz C28-A3, intitulada como “Definir, Estabelecer e Verificar Intervalos de Referência no Laboratório Clínico”, os fundamentos da teoria dos valores de referência não são alterados e as recomendações prévias sobre determinação de intervalos de referência por método direto com a coleta de sangue de pelo menos 120 indivíduos de referência, utilizando o método estatístico de classificação não paramétrico, são corroboradas (5). Porém, o fato de o estabelecimento de intervalos de referência ser laborioso e oneroso torna difícil esperar que cada laboratório desenvolva seus próprios intervalos de referência (39). Deste modo, o novo documento permite que laboratórios realizem transferência e verificação de intervalos de referência estabelecidos em outros locais. Adicionalmente, também descreve sobre intervalos de referência multicêntricos e um método robusto para derivar

intervalos de referência de um pequeno número de sujeitos (5,23).

3.4.1.1 Intervalos de referência no âmbito regulatório

No âmbito regulatório, desde 1988, os Estados Unidos possuem normas que regulamentam a criação e a avaliação periódica dos intervalos de referência adotados pelos laboratórios clínicos (40). Nas últimas duas décadas, o interesse no assunto aumentou com a publicação da Diretiva Européia 98/79/CE sobre Dispositivos Médicos para Diagnóstico *in Vitro*, que exige dos fabricantes de kits de diagnóstico o fornecimento de intervalos de referência de acordo com suas plataformas e reagentes de ensaio; e da norma International Organization for Standardization (ISO) 15189 para acreditação de laboratórios clínicos de 2003, com sua última revisão em 2012, que estabelece a revisão periódica dos intervalos de referência adotados (41,42).

No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) revisou a ISO 15189, em 2015. A legislação do país, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 302/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que “dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos”, somente determina que os laboratórios clínicos devem disponibilizar valores de referência em seus laudos emitidos (43). Já o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC / ML), em 2016, acrescentou um novo item em sua norma revisada que tem como um de seus requisitos “verificar se os intervalos de referência informados pelo fabricante são adequados para a população atendida...” (44). Assim, foram nos últimos quatro anos que o Brasil começou a discutir mais sobre determinação de intervalos de referência, sendo um tema constante nos congressos nacionais da área de análises clínicas e medicina laboratorial.

3.4.1.2 Métodos diretos e indiretos para a determinação de intervalos de referência

Embora haja exigências regulatórias e a teoria seja claramente definida, ainda há uma grande lacuna entre a teoria e a prática na definição dos intervalos de referência pelos laboratórios clínicos (25,39). A determinação convencional por métodos diretos continua sendo trabalhosa, e para a população pediátrica as

dificuldades podem ser ainda maiores, devido às limitações éticas relacionadas à coleta de sangue em crianças, principalmente neonatos (23).

Assim sendo, entre alguns trabalhos importantes sobre determinação de intervalos de referência por método direto, como o estudo multicêntrico canadense CALIPER, o qual estabeleceu uma base de dados de intervalos pediátricos específicos por sexo e idade para 40 marcadores bioquímicos séricos, novas publicações surgem sobre a utilização de métodos indiretos (10,45). Um destes estudos por método indireto é o de Katayevi et al. (2015), o qual afirma que a utilização da tecnologia de forma adequada para definir intervalos de referência tendo como origem o banco de dados laboratorial não é mais um método de probabilidade, como Hoffmann descreveu em 1963, mas sim uma ferramenta estatística requintada que ajudará a melhorar a qualidade da tomada de decisão clínica e, por conseguinte, do atendimento ao paciente (10,24,45).

Métodos indiretos são utilizados como uma alternativa menos complexa e mais econômica à determinação direta de intervalos de referência e há publicações a respeito do tema desde a década de 60 (24). Com o desenvolvimento da saúde digital, a utilização da tecnologia da informação pelos laboratórios clínicos tem aumentado exponencialmente e o uso de banco de dados de resultados laboratoriais dos pacientes atendidos por laboratórios clínicos para determinar intervalos de referência tem ganhado cada vez mais espaço (46). Por conseguinte, várias pesquisas sobre a utilização de métodos indiretos para estabelecimento de intervalos de referência têm sido publicadas, como o projeto REALAB, que limitou os dados do estudo a um único resultado laboratorial por paciente e a exclusão de dados baseou-se em um algoritmo multivariado que identificava a correlação entre os resultados anormais de vários exames laboratoriais e os exames pesquisados (47).

Ainda não há consenso sobre a melhor abordagem indireta para produção de intervalos de referência, mas, em 2018, o IFCC criou um documento de revisão e parecer que descreve sobre “vários aspectos da abordagem indireta para estabelecer intervalos de referência, incluindo benefícios e riscos, métodos disponíveis e seus pontos fortes e fracos”, e encoraja os pesquisadores da era da saúde digital a utilizar essas técnicas e desenvolver ferramentas para serem aplicadas nesta área (6,48).

3.4.2 Definições sobre intervalos de referência

Toda solicitação de exame laboratorial tem um objetivo específico, sendo um deles identificar se o paciente está saudável (22). Para que o resultado do exame laboratorial gere informação clinicamente relevante e possa responder a este objetivo, é necessário, dentre outros aspectos, compará-lo com os intervalos de referência que descrevem a distribuição típica de resultados observados em uma população de referência aparentemente saudável (25). Para entender qual o significado de “distribuição típica” e “população de referência aparentemente saudável”, é necessário, primeiramente, revisitar o esquema clássico sobre o conceito de valores de referência publicada por Solberg, em 1987, conforme Figura 1.

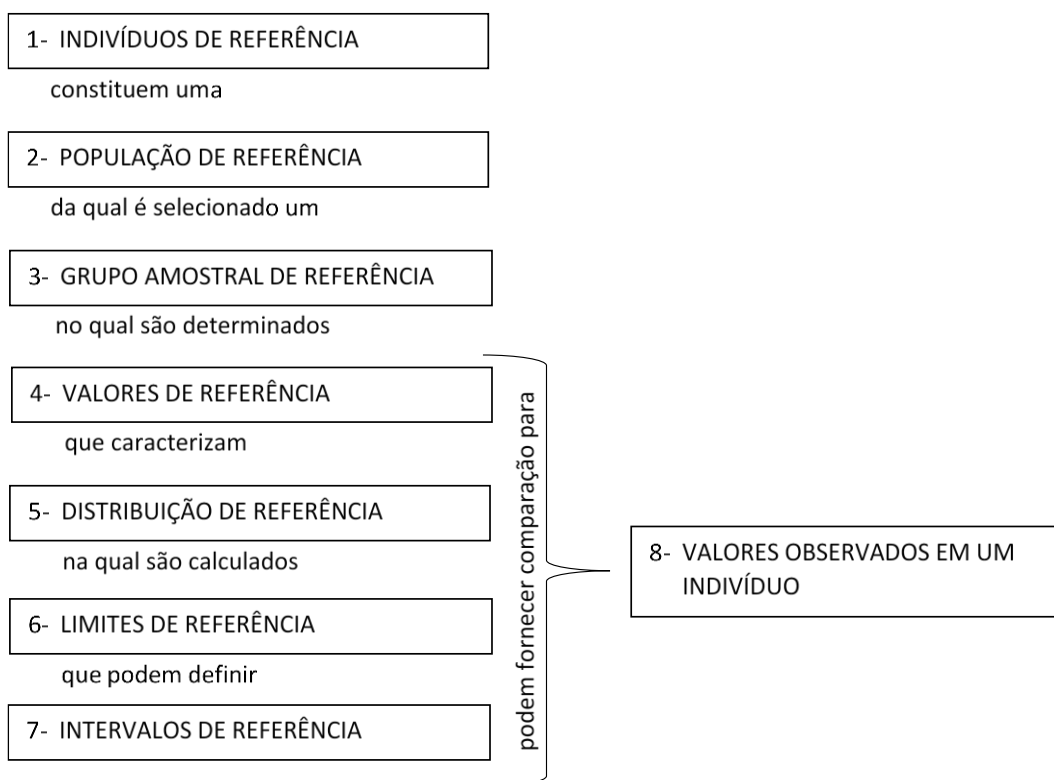
A Figura 1 demonstra a relação entre os vários termos aprovados pelo IFCC e CLSI (5,27), e são definidos da seguinte maneira:

- *Indivíduo de referência*: uma pessoa selecionada com base em critérios bem definidos.
- *População de referência*: um grupo constituído por todos os indivíduos de referência.
- *Grupo amostral de referência*: um adequado número de indivíduos selecionados para representar a população de referência.
- *Valores de referência*: o valor (resultado do teste) obtido por observação ou medição de uma quantidade definida em um indivíduo de referência.
- *Distribuição de referência*: a distribuição dos valores de referência.
- *Limites de referência*: um valor derivado da distribuição de referência e usado para fins descritivos.

A população de referência consiste em todos os indivíduos de referência que são selecionados com base em critérios bem definidos (5). Indivíduos de referência são, geralmente, considerados “saudáveis”, no entanto, isso levanta o problema de como selecioná-los (39). A OMS define saúde como “... um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não apenas a ausência de doença ou enfermidade” (49). Entretanto, esta definição é muito ampla quando se trata de selecionar indivíduos saudáveis para determinação de intervalos de referência. Neste caso, a saúde deve

ser julgada de forma mais estrita, como a ausência de sinais de doença especificamente relacionados ao analito a ser estudado (33). Os indivíduos excluídos dependerão do exame laboratorial específico avaliado e é necessário levar em consideração as variáveis fisiológicas como idade, sexo, etnia, estado de saúde, ambiente, etc, com vistas a excluir as condições patológicas que mais afetam a concentração ou atividade do analito sob investigação (5,39). Deste modo, pode-se afirmar apenas que a população utilizada para determinação de intervalos de referência é aparentemente saudável.

Figura 1: Esquema da relação entre os termos definidos a respeito de valores de referência.



Fonte: SOLBERG, 1987a (27).

A partir da população de referência é selecionado o grupo amostral de referência, do qual os valores de referência são obtidos (5). Os valores destas medições assumem uma certa distribuição, a distribuição de referência, e com a aplicação de métodos estatísticos apropriados, os limites de referência podem ser calculados, sendo que, tipicamente, são definidos para incluir 95% dos valores centrais mensurados (5,39).

Conforme diretriz C28-A3 do CLSI, o intervalo de referência é definido pelos

limites de referência e os inclui, sendo que esta definição depende de algumas condições, como:

- O intervalo de referência de um analito depende da variabilidade biológica intra e interindividual do grupo amostral de referência, e interfere na definição do número de indivíduos de referência selecionados e na sua partição em subgrupos (39). Os aspectos pré-analíticos precisam ser bem controlados, sendo definidos e descritos de forma precisa, pois a fase pré-analítica é conhecida por apresentar o maior número de erros quando comparado às fases analítica e pós-analítica do laboratório (5,49).
- Os aspectos analíticos também são essenciais (39). É necessário conhecer a acurácia e a especificidade analítica do método utilizado para determinação do intervalo de referência, para ser possível compará-los em diferentes grupos amostrais de referência (25). A acurácia é demonstrada pela rastreabilidade metrológica dos valores atribuídos aos calibradores e materiais de controle e, assim, vincula os resultados de diferentes métodos comerciais a uma referência metrológica (5).

O método pelo qual os limites de referência são calculados pode modificar significativamente os resultados obtidos (39). Há diferentes métodos de cálculo paramétricos e não paramétricos, detecção de valores extremos, particionamento e intervalos de confiança (25). Se modelos estatísticos inadequados forem aplicados, ou se a exclusão de valores discrepantes não for realizada corretamente, a determinação do intervalo de referência será prejudicada (39).

Para finalizar, é importante distinguir entre intervalos de referência e limites de decisão clínica. Enquanto os intervalos de referência respondem à pergunta “o paciente está sadio?”, os limites de decisão clínica respondem à pergunta “o paciente está doente, está piorando ou corre risco de desenvolver uma doença?” (22). Ao contrário dos intervalos de referência que possuem dois limites de referência, os limites de decisão clínica possuem apenas um limite, sendo geralmente, o limite superior do qual uma decisão médica é recomendada (22,23).

Na era da medicina baseada em evidências é priorizado o uso de limites de decisão clínica ao invés de intervalos de referência, mas, atualmente, são descritos os limites de decisão clínica de apenas alguns exames laboratoriais estabelecidos por

consenso nacional ou internacional, como de colesterol total, triglicerídeos e apolipoproteína A e B (50). No entanto, nos últimos anos, o Comitê do IFCC sobre Intervalos de Referência e Limites de Decisão tem apoiado a determinação de intervalos de referência para parâmetros que possuem limites de decisão clínica claramente definidos, uma vez que os intervalos de referência são específicos para as características da população (22).

O estabelecimento de intervalos de referência pode ser realizado por métodos diretos ou indiretos. Com o avanço da tecnologia da informação, o uso de métodos indiretos pelos laboratórios clínicos tem se tornado cada vez mais frequente, devido, principalmente, ao fácil acesso ao banco de dados do sistema de informação laboratorial.

3.4.3 Métodos diretos para determinação de intervalos de referência

Idealmente, os intervalos de referência são determinados por métodos diretos e, geralmente, os laboratórios clínicos são responsáveis por este trabalho (5,42). O documento laboratorial de referência que descreve esta abordagem tradicional é o CLSI EP28-A3C, que determina a seleção de indivíduos de referência por amostragem com base em critérios bem definidos e, então, amostras biológicas são coletadas para mensuração do analito em estudo (5).

Preferencialmente, a abordagem direta usa indivíduos selecionados aleatoriamente na população de referência, como a pesquisa realizada pelo Canadian Health Measures Survey em parceria com o CALIPER para determinar intervalos de referência pediátricos e adultos de marcadores hematológicos (51). No entanto, a seleção aleatória de indivíduos de referência raramente é alcançada com a população testada, geralmente fortemente influenciada por fatores de conveniência e custo (6). Normalmente, para os estudos de intervalos de referência, são utilizados como indivíduos de referência doadores de sangue, estudantes de medicina, funcionários de laboratórios ou de fábricas responsáveis pelas plataformas de testes diagnóstico, que não são um grupo de referência randomizado de forma que represente verdadeiramente a população de referência (23).

A abordagem direta requer uma série de etapas estruturadas descritas em detalhes no documento EP28-A3C do CLSI, sendo resumidas a seguir:

1. Listar os fatores de variações biológicas e analíticas, a partir de dados da literatura;
2. Determinar os critérios de exclusão e partição com base em questionário adaptado;
3. Aplicar um termo de consentimento por escrito para os indivíduos selecionados;
4. Categorizar possíveis indivíduos de referência com base em dados do questionário e de outras formas de avaliação do estado de saúde;
5. Excluir indivíduos da amostra de referência com base em critérios predeterminados;
6. Definir o número apropriado de indivíduos de referência;
7. Preparar indivíduos selecionados para a coleta de amostras, de acordo com os procedimentos normalmente usados para pacientes em laboratório;
8. Coletar e processar as amostras;
9. Coletar os valores de referência obtidos das amostras processadas;
10. Analisar a distribuição dos dados;
11. Identificar possíveis erros e/ou valores atípicos;
12. Selecionar um método estatístico e calcular os limites de referência e o intervalo de referência;
13. Documentar todas as etapas e procedimentos realizados.

Os métodos diretos são classificados como *a priori*, quando os critérios de exclusão são definidos antes da coleta de amostras, e *a posteriori*, quando os critérios de exclusão são definidos posteriormente à coleta de amostras (5). Os fatores que determinam a escolha por um ou outro método são o conhecimento da biologia do analito e os recursos disponíveis (39).

As etapas de identificação de indivíduos de referência, coleta e processamento das amostras são, no mínimo, demorados e caros e, em alguns casos, podem ser extremamente difíceis de serem realizadas, como por exemplo, em indivíduos com extremos de idade ou com amostras de difícil coleta, como o líquido (6). Devido a tais questões, é comum laboratórios determinarem intervalos de referência usando um número de indivíduos de referência menor que o recomendado ou adotarem intervalos de referência relatados por fontes de literatura que podem não ser aplicáveis aos métodos analíticos existentes e às populações testadas (6,8,9).

Também é raro que os estudos feitos com abordagem direta considerem todos os fatores que podem influenciar os resultados dos testes, sendo impossível excluir todos os indivíduos anormais da população de referência e, além disso, nenhuma técnica é perfeita (7,45).

3.4.4 Métodos indiretos para determinação de intervalos de referência

Uma abordagem alternativa para determinação de intervalos de referência é a utilização de métodos indiretos, em que os resultados dos exames laboratoriais obtidos do banco de dados do sistema de informação laboratorial são utilizados para estimar os intervalos de referência (5). O CLSI, embora descreva sucintamente sobre métodos indiretos em sua diretriz EP28-A3C, não recomenda a utilização desta abordagem, pois o conhecimento dos indivíduos por estes métodos é insuficiente, sendo totalmente dependente de métodos estatísticos para excluir indivíduos não saudáveis, além de não haver controle total das condições analíticas e pré-analíticas (5,39). No entanto, outros pesquisadores defendem o uso de métodos indiretos, pois as estimativas de intervalos de referência são mais simples e baratas de serem realizadas pelos laboratórios clínicos, e os resultados obtidos, utilizando um número amostral de milhares a milhões, são clinicamente relevantes (45,52). Em 2018, o Comitê do IFCC sobre Intervalos de Referência e Limites de Decisão publicou um artigo de opinião sobre a determinação de intervalos de referência por métodos indiretos, incentivando o uso desta abordagem para estimar intervalos de referência (6).

Esta abordagem, também conhecida como mineração de dados, é baseada no postulado de que, provavelmente, mais de 80% dos resultados laboratoriais provindos de pacientes ambulatoriais ou hospitalares são “normais” para o analito de interesse (6,48). Para assegurar esta maioria, há pesquisadores que utilizam alguns conceitos de pré-seleção de dados, como incluir apenas o primeiro valor de um paciente se várias dosagens do exame forem obtidos durante um período de tratamento, excluir pacientes que se repetem no período estudado, excluir pacientes de terapia intensiva e casos de emergência e preferir dados de pacientes ambulatoriais ao invés de hospitalares (6,48).

A determinação de intervalos de referência utilizando métodos indiretos está em desenvolvimento há mais de 50 anos, e até o presente não há diretriz que defina

o melhor método a ser utilizado (6,24). A maioria dos pesquisadores combina um processo de pré-seleção com um algoritmo de inclusão e exclusão e exclui os valores das bordas do padrão de distribuição (48). É importante considerar que o estabelecimento de intervalos de referência por mineração de dados não é apenas um “jogo estatístico”, mas requer, assim como na abordagem tradicional, compreensão dos fatores que influenciam as variações da concentração do analito em estudo, como a variabilidade intra e interindividual, variabilidade analítica e pré-analítica, fisiologia e patologia, e a tomada de decisão clínica (6).

A variabilidade analítica e pré-analítica requer especial atenção para estudos indiretos sobre intervalos de referência, devido ao longo período de tempo em que a pesquisa geralmente ocorre (53). Para garantir a estabilidade do método analítico e da população pode-se fazer uso de ferramentas qualitativas, como revisão histórica de alteração do método analítico ou da população atendida pelo laboratório e, também, quantitativas, como avaliação dos resultados de controle interno e avaliação externa da qualidade e dos resultados de médias móveis da população pesquisada (6,53). Quaisquer resultados de controle interno, avaliação externa ou média móvel fora das metas de desempenho de qualidade estabelecidas para os testes pesquisados devem ser investigados e os dados excluídos da pesquisa (6,53).

A abordagem indireta tem uma série de benefícios e vantagens significativas (6). Conforme é demonstrado no Quadro 1, a utilização de métodos indiretos para determinação de intervalos de referência pode ser considerada uma ferramenta poderosa, sendo incentivado seu uso, especialmente nos extremos de idade (6,48).

Assim como ocorre no método direto, na abordagem indireta, deve-se analisar a distribuição dos dados coletados, identificar possíveis erros e/ou valores atípicos, selecionar um método estatístico para o cálculo dos limites de referência e o intervalo de referência e, por fim, documentar todas as etapas e procedimentos realizados (6). Na etapa de seleção do método estatístico é importante considerar a necessidade de particionamento do intervalo de referência em diferentes grupos com a estratificação por idade e sexo, minimamente (25). Outros fatores de particionamento incluem hábitos nutricionais, raça e etnia, no entanto essas informações raramente estão disponíveis nas bases de dados laboratoriais (6,25).

Quadro 1: Comparação entre métodos diretos e indiretos para o estabelecimento de intervalos de referência.

Métodos Diretos	Métodos Indiretos
Dificuldades em distribuir os participantes por idade e sexo	A distribuição de idades e sexo corresponde ao uso clínico do teste
Difícil obter amostras biológicas incomuns	Dados para amostras biológicas incomuns estão disponíveis nos bancos de dados
Difícil e oneroso obter número de indivíduos estatisticamente significativo	Dados de indivíduos prontamente disponíveis
Difícil definir <i>status</i> “saudável”	Definição de “saúde” não é requerida
Condições pré-analíticas do estudo podem não corresponder às condições reais da rotina laboratorial	Condições pré-analíticas correspondem às condições reais da rotina laboratorial
Condições analíticas do estudo podem não corresponder às condições reais da rotina laboratorial	Condições analíticas correspondem às condições reais da rotina laboratorial
Custos elevados para realização do estudo	Custos muito baixos para realização do estudo
Difícil replicar em locais diferentes	Fácil replicar em locais diferentes
Difícil replicar com alterações analíticas	Fácil replicar com alterações analíticas
Pode ser difícil a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido	Não há necessidade de termo de consentimento livre e esclarecido
Fácil de executar estatisticamente	Requer conhecimento e experiência estatística. Algumas das análises estatísticas podem exigir avaliações subjetivas

Fonte: JONES et al., 2018 (6)

Em crianças, a determinação de intervalos de referência por meio de mineração de dados é útil, pois é eliminada a necessidade de coleta de sangue que geralmente é bastante difícil, devido às limitações éticas relacionadas a este público e ao número amostral necessário que deve respeitar o particionamento de acordo com o desenvolvimento infantil (6,23,54).

3.4.5 Intervalos de referência para marcadores séricos hepáticos em crianças

Atualmente, ainda há baixa disponibilidade de intervalos de referência para a população infantil, o que obriga a maioria dos laboratórios clínicos a relatar intervalos de referência de adultos em resultados de exames laboratoriais pediátricos (54). Ao contrário dos intervalos de referência para adultos que são fornecidos facilmente pelos fabricantes dos testes diagnósticos, os intervalos de referência pediátricos, quando disponíveis, são retirados da literatura médica que, muitas vezes, são desatualizados e, por vezes, não representativos da população atendida pelo laboratório clínico (8,9).

Preencher a lacuna de intervalos de referência pediátricos confiáveis e precisos é laborioso e caro para o laboratório clínico individualmente. As dificuldades no recrutamento de um grande número de participantes saudáveis e na coleta de volumes sanguíneos adequados, além do próprio desenvolvimento infantil que, muitas vezes, exige a necessidade de várias partições na faixa etária pediátrica, são alguns dos importantes desafios (54).

Entretanto, durante a última década houve várias iniciativas para coletar amostras de sangue em coortes saudáveis de base populacional infantil. Os principais projetos de determinação de intervalos de referência pediátricos por método direto que incluem marcadores séricos hepáticos são o CALIPER no Canadá, o KiGGS na Alemanha, além de estudos na Dinamarca e Suécia (10,11,55,56).

Para superar as limitações éticas relacionadas a necessidade de coleta de sangue de crianças saudáveis, têm surgido alguns estudos com mineração de dados de sistemas de informações de laboratório para a determinação de intervalos de referência pediátricos para marcadores séricos hepáticos. Um destes estudos é de Zierk et al (2015), que aplicaram uma mistura de amostras saudáveis e patológicas e uma abordagem estatística complexa para calcular os percentis de intervalo de referência, e outro de Tate et al (2014) que estabeleceram intervalos de referência comuns para crianças da região da Australásia (57,58).

A grande maioria dos estudos publicados particionam os intervalos de referência pediátricos por idade e sexo, embora outras variáveis possam influenciar a atividade de marcadores séricos hepáticos, como a etnia (54,59). O projeto CALIPER, em seu primeiro estudo publicado sobre intervalos de referência de base populacional infantil para 40 marcadores bioquímicos séricos, realizou uma análise preliminar sobre o efeito da etnia entre caucasianos, asiáticos orientais e asiáticos sulistas e, este último grupo, apresentava atividade de ALT significativamente mais baixa; entretanto, o significado clínico desta diferença não foi avaliado (10).

Todos os estudos mencionados por método direto ou indireto diferem em relação ao país de origem, faixas etárias aplicadas, critérios de inclusão e exclusão, tamanho da amostra, técnicas laboratoriais e métodos estatísticos, o que faz diferir os intervalos de referência para marcadores séricos hepáticos entre um estudo e outro. Além disso, são estudos realizados em países com populações bastante semelhantes.

Para a população infantil brasileira existem poucos estudos que determinam intervalos de referência de exames laboratoriais e até o momento, não há nenhum estudo publicado sobre a determinação de intervalos de referência por método indireto para marcadores séricos hepáticos que envolvam diferentes regiões do Brasil (60). Entretanto, empresas de medicina diagnóstica que possuem diferentes marcas localizadas em regiões distintas podem contribuir com estes estudos. No Brasil, a DASA é uma empresa que pode apoiar neste aspecto.

3.5 Empresa DASA

A Diagnósticos da América S. A. (DASA) é a maior empresa prestadora de serviços de medicina diagnóstica da América Latina, oferecendo mais de 5 mil tipos de exames de análises clínicas, diagnósticos por imagem e anatomia patológica (61). A empresa atua no mercado público e privado do Brasil como laboratório de apoio para laboratórios de menor porte, como prestador de serviço em hospitais ou como prestador de serviço para pacientes ambulatoriais por meio de suas 42 marcas que totalizam mais de 700 unidades de atendimento localizadas em várias regiões do país, conforme Figura 2 (61).

Independentemente do segmento da marca e da localização de suas unidades de atendimento, a qualidade dos serviços prestados é a mesma, devido à padronização de atendimento e centralização das análises das amostras em áreas técnicas, denominadas Núcleos Técnicos Operacionais, que processam as amostras colhidas em unidades de atendimento ambulatoriais das próprias marcas de laboratório da DASA ou de laboratórios terceiros, e Núcleos Técnicos Hospitalares, que processam as amostras colhidas em unidades hospitalares (62).

Figura 2. Localização da DASA, por meio de suas marcas, de acordo com cada região do país. Destacados em amarelo estão os Núcleos Técnicos Operacionais que servem como laboratório de apoio para outras marcas da empresa e para laboratórios terceiros do país.



Fonte: DASA, 2019 (61).

Os Núcleos Técnicos Operacionais das marcas Álvaro (Paraná), Delboni Auriemo (São Paulo) e Exame (Distrito Federal) (destacadas em amarelo na Figura 2) servem também como laboratório de apoio para outras marcas da empresa e para laboratórios terceiros do país. Ou seja, as amostras biológicas dos pacientes são colhidas por unidades de atendimento laboratoriais distribuídas pelo país e são encaminhadas para um dos três núcleos técnicos operacionais da DASA (Álvaro, Delboni ou Exame), onde são realizadas as análises de acordo com os exames laboratoriais solicitados para cada amostra biológica recebida.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O projeto referente a presente pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), sendo aprovado sob parecer número 3.032.043 de 22/11/2018.

Para seu desenvolvimento, foram atendidos os pressupostos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, em conformidade com a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (62). Os pesquisadores integrantes da equipe assinaram um Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD) (APÊNDICE A) em que se comprometeram com a confidencialidade dos dados e a privacidade dos participantes de pesquisa. A DASA foi abordada para esclarecer a pesquisa quanto aos objetivos, metodologia, riscos e benefícios do estudo. Ao concordar com sua participação na pesquisa, foi obtida a devida assinatura na Declaração de Instituição Co-participante pelo representante da companhia, em duas vias (APÊNDICE B). Não houve nenhuma exposição, por parte dos pesquisadores, aos dados identificadores dos indivíduos do estudo, sendo realizada a pesquisa de forma indireta, por meio da utilização do banco de dados da DASA, que foi transmitido aos pesquisadores já contendo informações codificadas.

Como não houve contato com os participantes da pesquisa, apenas a utilização de informações do banco de dados da empresa, de forma retrospectiva e anônima, foi dispensada pelo CEP a aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) nesta pesquisa.

Ao final de cinco anos após o término do estudo, todos os registros eletrônicos e impressos mantidos sob a posse e guarda da pesquisadora responsável serão indefinidamente mantidos ou apropriadamente destruídos, garantindo-se a continuidade do anonimato dos participantes. Toda publicação ou divulgação associada à pesquisa será realizada sem a identificação dos participantes, mantendo-se a identidade de cada indivíduo em sigilo absoluto.

4.2 Desenho, período e local de estudo

Trata-se de um estudo de característica observacional, descritivo e analítico que utilizou dados secundários do período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018 de cinco regiões do país. O estudo foi conduzido entre os meses de janeiro de 2019 a abril de 2020, e os dados foram obtidos de uma empresa privada de medicina diagnóstica para a determinação de intervalos de referência dos marcadores séricos hepáticos ALT, AST, FAL e GGT através de método indireto.

Todos os exames laboratoriais da pesquisa foram realizados em amostras de soro obtidas de sangue venoso colhido em tubos de soro com gel separador oriundo de pacientes com ou sem jejum prévio que se mantiveram sentados ou reclinados durante a colheita (63). Os tubos de soro, após colhidos, ficaram em repouso por 30 a 60 minutos e, em seguida, foram centrifugados com força centrífuga relativa (RFC) de 1.000 a 1.300 g por 10 minutos (63). Se não processados imediatamente, foram armazenados sob refrigeração de 2 a 8 °C e analisados dentro de até 12 horas.

As análises de possíveis interferentes nas amostras de soro, como hemólise e lipemia, foram realizadas de forma visual pelos profissionais da área técnica do laboratório e/ou através dos alertas emitidos pelos analisadores automatizados. Havendo detecção de interferência com potencial prejuízo à interpretação do resultado, a amostra foi rejeitada para o processamento dos marcadores séricos hepáticos.

Os exames laboratoriais foram realizados nos analisadores automatizados da Roche, modelo cobas c 702. Para cada analisador automatizado, os reagentes, controles e calibradores foram do mesmo fabricante (Roche), sendo a operação de controle de qualidade analítica realizada de acordo com as instruções do fabricante e RDC N° 302, de 13 de outubro de 2005, que regulamenta o funcionamento de laboratórios clínicos (43).

Os métodos de medição para os testes laboratoriais ALT, AST, FAL e GGT da Roche são padronizados de acordo com os procedimentos de referência primária para medição de concentrações de atividade catalítica de enzimas a 37°C do IFCC (64–67), e utilizam os seguintes princípios:

- ALT: oxirredução catalisada por lactato desidrogenase sem adição de fosfato piridoxal, com detecção por absorbância.

- AST: oxirredução catalisada por malato desidrogenase sem adição de fosfato piridoxal, com detecção por absorvância.

- FAL: ensaio colorimétrico enzimático que utiliza o substrato p-nitrofenil fosfato, com detecção por absorvância.

- GGT: ensaio colorimétrico enzimático que utiliza o substrato L-γ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, com detecção por absorvância.

Para o monitoramento do erro aleatório dos sistemas analíticos, o controle interno da qualidade foi realizado por controles comerciais da Roche em duas concentrações. Assim que liberados pelos analisadores automatizados, os resultados foram avaliados em tempo real, antes do processamento das amostras de pacientes, por regras múltiplas de Westgard para decidir se a corrida analítica estava ou não controlada (68).

Para o monitoramento do erro sistemático dos sistemas analíticos, a avaliação externa da qualidade foi realizada trimestralmente por meio do provedor ControlLab para todos os exames laboratoriais da pesquisa. Os resultados foram comparados com os valores esperados a cada ciclo do programa.

Para avaliar o desempenho e a estabilidade analítica ao longo do período da pesquisa, foram analisados trimestralmente os erros totais através da soma dos erros aleatórios e sistemáticos de cada teste laboratorial. Caso o erro total do trimestre obtivesse um resultado acima do erro total especificado (referencial do laboratório), os dados deste período da pesquisa não seriam utilizados. O APÊNDICE C detalha esta análise.

4.3 Participantes do estudo

O estudo foi realizado com a utilização de informações do banco de dados da DASA relacionadas às crianças com até 12 anos de idade incompletos que tiveram suas amostras de sangue colhidas em um dos 26 estados brasileiros ou Distrito Federal. As amostras biológicas foram provenientes de uma das 42 marcas da DASA ou de laboratórios terceiros que prestam serviço para pacientes ambulatoriais distribuídos em todo o território brasileiro. As amostras colhidas foram enviadas para análise laboratorial em um dos Núcleos Técnicos Operacionais das marcas Delboni Auriemo (São Paulo), Exame (Distrito Federal) e Álvaro (Paraná) (Figura 2). A forma

de participação configura-se como indireta e foram obtidos 26.718 participantes.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo:

- Crianças de 0 a 12 anos de idade incompletos, conforme artigo 2º da Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990, que dispõe sobre o Estatuto da Criança e Adolescente (69);
- Que realizaram a dosagem de marcadores séricos hepáticos entre janeiro de 2017 e dezembro de 2018;
- Que realizaram pelo menos a dosagem dos marcadores séricos ALT e AST em um dos Núcleos Técnicos Operacionais da DASA.

4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos que:

- Realizaram mais de uma dosagem do mesmo marcador sérico hepático no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018. Ou seja, indivíduos que se repetiram ao longo da pesquisa tiveram todas as suas dosagens excluídas, devido ao pressuposto de que estes indivíduos possuem maior probabilidade de ter doença (53);
- Possuíam resultados de marcadores séricos hepáticos obtidos a partir do Núcleo Técnico Operacional da marca Álvaro (Paraná) por não possuir o mesmo analisador automatizado, método analítico e reagente de ensaio quando comparado aos Núcleos Técnicos Operacionais das marcas Delboni Auriemo (São Paulo) e Exame (Distrito Federal).
- Possuíam resultados obtidos de analisadores automatizados que produziram erro total acima das especificações de qualidade da DASA, conforme APÊNDICE C;
- Possuíam resultados fora do intervalo de referência em uso em exames laboratoriais correlacionados aos utilizados na pesquisa obtidos entre janeiro de 2017 a dezembro de 2018. Caso não houvesse exames

correlacionados, foram excluídos indivíduos que possuíam o marcador sérico hepático do estudo com resultado fora do intervalo de referência em uso. No APÊNDICE D são apresentados os intervalos de referência de cada exame utilizado na correlação.

4.4 Coleta de dados

Os dados foram coletados a partir da área de manutenção dos sistemas de informação de produção da DASA, conforme carta de anuência autorizando a realização da pesquisa (Apêndice B). A área de manutenção dos sistemas de informação de produção é responsável por configurar, gerir e centralizar todas as informações necessárias nos sistemas de informação de produção que possibilitam o processamento dos exames laboratoriais pelos Núcleos Técnicos Operacionais da DASA.

Do sistema Labor da empresa DASA foi extraído um relatório em formato de planilha eletrônica Excel (Microsoft) contendo as seguintes variáveis:

- Codificação única do paciente;
- Data de nascimento;
- Sexo;
- Localidade de residência: apenas a cidade e estado, sem indicação do endereço residencial;
- Data da coleta: em formato DD/MM/AAAA;
- Resultado do marcador sérico hepático;
- Resultado do exame laboratorial correlacionado ao marcador sérico hepático.

Este relatório foi gerado a partir dos Núcleos Técnicos Operacionais das marcas Álvaro (Paraná), Delboni Auriemo (São Paulo) e Exame (Distrito Federal). Entretanto, a fim de garantir adequada estabilidade analítica durante o período da pesquisa, conforme preconiza o Comitê do IFCC sobre intervalos de referência e limites de decisão, utilizaram-se somente os dados dos Núcleos Técnicos Operacionais das marcas Delboni Auriemo (São Paulo) e Exame (Distrito Federal) por

estes núcleos possuírem os mesmos analisadores automatizados (Roche, modelo cobas c 702) (6).

Os dados sobre unidade de medida e intervalos de referência do marcador sérico hepático e exame correlacionado durante o período da pesquisa, assim como os dados sobre os analisadores automatizados utilizados para o processamentos dos exames laboratoriais do estudo, foram enviados por meio de planilha eletrônica Excel (Microsoft) pela área de manutenção dos sistemas de informação de produção da DASA à pesquisadora.

Já os dados sobre qualidade analítica dos exames laboratoriais da pesquisa utilizados para análise de erro total pela pesquisadora foram fornecidos pela qualidade integrada da DASA por meio de planilha eletrônica excel (Microsoft).

Os marcadores séricos hepáticos estudados nesta pesquisa foram:

- ALT;
- AST;
- FAL;
- GGT.

Os exames laboratoriais correlacionados aos marcadores séricos hepáticos são:

- Mioglobina, Creatina Quinase, Aldolase: exames relacionados ao músculo esquelético. Resultados elevados excluem indivíduos com dosagens de ALT e AST (70,71).
- Troponina I, Creatina quinase-MB: exames relacionados ao músculo esquelético cardíaco. Resultados elevados excluem indivíduos com dosagens de ALT e AST (71,72).
- Desidrogenase Láctica: exame relacionado ao eritrócito. Resultados elevados excluem indivíduos com dosagens de ALT e AST (73).
- Creatinina, Ureia, Estimativa de Filtração Glomerular: exames relacionados ao sistema renal. Resultados elevados excluem indivíduos com dosagens de ALT, AST, FAL e GGT (74,75).

- Amilase e Lipase: exames relacionados ao pâncreas. Resultados elevados excluem indivíduos com dosagens de ALT, AST e GGT (76).
- Epstein Baar IgG, Epstein Baar IgM: exames relacionados à mononucleose infecciosa. Resultados reagentes excluem indivíduos com dosagens de AST e ALT (77).
- Tempo de Protrombina: geralmente é requisitado em conjunto com outros testes para avaliação hepática ou é solicitado em conjunto com a determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial ativado e contagem de plaquetas para pacientes que realizarão cirurgia. Indivíduos que realizaram o Tempo de Protrombina foram excluídos da pesquisa (78).
- Ferro, Ferritina: exames relacionados, dentre outras doenças, com hemocromatose. Resultados elevados excluem indivíduos com dosagens de ALT e AST (79).
- Proteína C reativa: resultados elevados excluem indivíduos da pesquisa, pois alguns tipos de infecções ou inflamações provocam aumento de alguns dos parâmetros hepáticos. Por exemplo, infecções bacterianas intra-abdominais aumentam a atividade sérica de FAL (80).
- Vitamina D - 25 Hidroxi: a deficiência de vitamina D – 25 Hidroxi no raquitismo eleva FAL, portanto, resultados diminuídos de VITD - 25 Hidroxi excluem indivíduos com dosagens de FAL (81).
- Hormônio Paratireoideano: exame relacionado ao metabolismo ósseo. Resultado alterado exclui indivíduos com dosagens de FAL (81).
- Bilirrubina Totais e Frações: exames relacionados à função hepática. Resultados aumentados excluem indivíduos com dosagens de ALT, AST, FAL e GGT (17,18)
- Albumina: exame relacionado à função hepática. Resultados diminuídos excluem indivíduos com dosagens de ALT, AST, FAL e GGT (82).

A utilização dos exames laboratoriais correlacionados acima baseia-se no fato de que existem grupos de exames laboratoriais que possuem resultados correlatos por explorarem o mesmo sistema do corpo humano e, geralmente, são requisitados em conjunto pelos profissionais de saúde como apoio na decisão da conduta clínica para um determinado paciente (47).

4.5 Análise de dados

4.5.1 Organização dos dados

Com as planilhas eletrônicas em Excel (Microsoft) em posse da pesquisadora responsável, os dados foram agrupados e analisados, levando-se em consideração os critérios de inclusão e exclusão da pesquisa mediante linguagem de programação Python 3.7.7 orientada a objeto. Para cada etapa de inclusão e exclusão realizada pela linguagem de programação armazenavam-se os dados filtrados em planilhas eletrônicas em Excel (Microsoft). Desta maneira, foi possível desenvolver planilhas eletrônicas em Excel com indivíduos e exames laboratoriais para cada etapa do algoritmo de inclusão e exclusão, o que facilitou a compreensão do processo e verificação dos dados com o objetivo de averiguar se não houve erros por parte da programação desenvolvida em cada etapa. No APENDICE E encontra-se a estrutura base orientada a objeto utilizada na programação.

Após realização da última etapa do algoritmo de inclusão e exclusão por meio da linguagem de programação, obteve-se a planilha Excel que continha o conjunto de dados final da pesquisa. Este conjunto de dados final foi inspecionado visualmente com o objetivo de verificar se algum conjunto de exames laboratoriais disponíveis na mesma data para um determinado indivíduo apresentava uma correlação clínica baixa, como por exemplo, baixo número de exames laboratoriais correlacionados ou uma combinação incomum de exames. Neste caso, se a correlação clínica era baixa e o resultado do marcador sérico hepático estivesse fora do intervalo de referência em uso, o valor foi excluído do conjunto de dados final.

Por exemplo, suponha que um indivíduo da pesquisa em uma determinada data demonstrou correlação apenas entre AST e creatinina por serem os únicos exames laboratoriais requisitados para este indivíduo. O resultado de AST apresentou-se aumentado de acordo com o intervalo de referência atual e permaneceu como um dos dados finais da pesquisa pelo fato do resultado da creatinina estar dentro do seu intervalo de referência. Neste caso, o resultado aumentado de AST não exime a possibilidade de ser devido a uma disfunção hepática, pois houve um baixo número de exames correlacionados (somente AST e creatinina) e, portanto, preferiu-se excluir este indivíduo da pesquisa.

Após esta inspeção visual, obteve-se o grupo amostral de referência com 12.326 indivíduos que foi utilizado para determinar os intervalos de referência dos marcadores séricos hepáticos.

4.5.2 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa IBM® Statistical Package for the Social Science (SPSS)®, versão 26.0. Foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) para as variáveis quantitativas, e distribuição de frequência para as variáveis categóricas.

A normalidade foi verificada utilizando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação estatística entre as medianas das enzimas segundo o sexo (masculino, feminino) foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney, e segundo os cinco grupos etários avaliados (<1, 1 - <5, 5 - <10, 10 - 11 anos) utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Todos os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Como o número amostral no grupo de referência não foi suficientemente grande para particionar os grupos etários por métodos estatísticos, a definição de categorizar em <1, 1 - <5, 5 - <10, 10 - 11 anos baseou-se na estratificação realizada em estudo anterior sobre a saúde infantil brasileira realizada pelo Ministério da Saúde (83).

A identificação dos intervalos de referência para cada enzima foi determinada utilizando-se os percentis de 2,5 a 97,5.

5 INTERDISCIPLINARIEDADE

O diagnóstico correto de doença é o primeiro passo para se definir o tratamento apropriado, pois diagnósticos tardios ou inadequados aumentam o risco de disseminação e complicações, o que tornam o tratamento mais difícil e oneroso. Um dos fatores que contribuem ao diagnóstico apropriado é o estabelecimento de intervalos de referência de exames laboratoriais que sejam adequados para a população atendida (5,6). Intervalos de referência fidedignos permitem aos profissionais requisitantes de exames laboratoriais interpretar adequadamente os resultados emitidos e decidir por condutas clínicas eficazes com consequente redução no consumo de medicamentos pelos pacientes e, por conseguinte, na promoção da qualidade de vida dos mesmos.

De acordo com a OMS (1997), qualidade de vida é definida como a percepção que o indivíduo possui quanto a sua inserção na vida, no contexto dos sistemas de cultura e valores nos quais ele vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações (84). Neste contexto, a determinação de intervalos de referência pediátricos adequados promove melhoria da qualidade de vida, pois contribui com a redução de consumo de medicamentos e, por conseguinte, com a redução de produção e descarte dos mesmos, o que resulta em menos prejuízo ao meio ambiente e na melhoria das condições sociais onde este indivíduo está inserido.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Univille, este capítulo é apresentado na forma de artigo científico que será submetido para publicação posteriormente (APENDICE F). Ressalta-se que, em conformidade com o permitido pelo Regimento Interno do PPGSMA, as tabelas e figuras que integram o artigo já se encontram em língua inglesa.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo decidiu-se realizar a pesquisa sobre a determinação de intervalos de referência para os marcadores séricos hepáticos ALT, AST, FAL e GGT em crianças brasileiras através de método indireto com a utilização dos percentis de 2,5 a 97,5.

Verificaram-se que as medianas de todas as enzimas séricas diferiram significativamente entre os grupos etários para ambos os sexos e entre os sexos para um mesmo grupo etário em algumas categorias de idade. As diferenças encontradas podem refletir o desenvolvimento variável do fígado em uma população e podem ser parcialmente causadas pelos mecanismos homeostáticos imaturos entre crianças menores e/ou pelo aumento do fígado, aumento da massa muscular ou aumento da massa óssea com a idade e destacam a importância de estabelecer intervalos de referência pediátricos específicos por idade e sexo.

Todas as enzimas exibiram atividades séricas mais elevadas na categoria <1 ano que eventualmente diminuiriam na categoria subsequente (1 a <5 anos), semelhantemente ao que ocorreu em outros estudos internacionais com população infantil por método direto e indireto. Para AST, em ambos os sexos, e GGT no sexo feminino, o percentil 97,5 demonstrou uma tendência contínua de queda com o aumento da idade, o que difere dos padrões mostrados pelos níveis séricos de ALT e FAL, em ambos os sexos, e GGT no sexo masculino. No percentil 97,5, as atividades séricas foram mais elevadas no sexo masculino, com exceção da AST e GGT na categoria <1 ano e FAL nas categorias 1 a <5 anos e 5 a <10 anos que apresentaram níveis séricos mais elevados para o sexo feminino.

Embora o comportamento das atividades séricas das enzimas pesquisadas seja semelhante a outros estudos internacionais por abordagem direta ou indireta com população infantil e adulta, os valores encontrados nesta pesquisa diferem destas populações, o que reforça a importância de se estabelecer intervalos de referência específicos para a população infantil brasileira.

Considerando a inexistência de intervalos de referência pediátricos estabelecidos para os marcadores séricos hepáticos ALT, AST, FAL e GGT na população brasileira, este é o primeiro estudo que demonstra uma abordagem de mineração de dados alternativa especialmente interessante por utilizar amostras de crianças das cinco regiões do país. Os resultados deste estudo são clinicamente úteis

e podem permitir aos profissionais de saúde requisitantes destes exames laboratoriais interpretarem de forma mais adequada os resultados emitidos e decidir por condutas clínicas mais eficazes, e poderão, ainda, ser utilizados para o planejamento de pesquisas similares para outros analitos importantes na pediatria.

REFERÊNCIAS

1. Li X, Wang D, Yang C, Zhou Q, Zhouga S, Wang L, et al. Establishment of age - and gender - specific pediatric reference intervals for liver function tests in healthy Han children. *World J Pediatr.* 2018;14(2):151–9.
2. Welsh JA, Karpen S, Vos MB. Increasing prevalence of nonalcoholic fatty liver disease among united states adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. *J Pediatr [Internet].* 2013;162(3):496–500.
3. Goyal NP, Schwimmer JB. The Progression and Natural History of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):325–38.
4. World Health Organization. Second WHO Model List of Essential In Vitro Diagnostics [Internet]. Geneva: WHO; 2019. p. 49.
5. CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. CLSI document C28-A3. 3ed. USA: CLSI; 2008. 61 p.
6. Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, Sikaris K, Streichert T, Katayev A, et al. Indirect methods for reference interval determination - review and recommendations. *Clin Chem Lab Med.* 2018;57(1):20–9.
7. Ritchie RF, Palomaki G. Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):702–9.
8. Schabl K, Chan MK, Gong Y, Adeli K. Closing the gaps in paediatric reference intervals: the CALIPER initiative. *Clin Biochem Rev.* 2008;29(3):89–96.
9. Friedberg RC, Souers R, Wagar EA, Stankovic AK, Valenstein PN. The Origin of Reference Intervals: A College of American Pathologists Q-Probes Study of “Normal Ranges” Used in 163 Clinical Laboratories. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:348–57.
10. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: A CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem.* 2012;58(5):854–68.
11. Dortschy R, Rosario SA, Scheidt-Nave C, Thierfelder W, Thamm M, Gutsche J, et al. Bevölkerungsbezogene Verteilungswerte ausgewählter Laborparameter aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS). Robert Koch-Institut, editor. Berlin: Robert Koch-Institut; 2009. 132 p.
12. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol.* 2017;27(21):R1147–51.

13. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther.* 1992;53(3):275–354.
14. Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. *Lancet.* 2016;388(10045):706–16.
15. Keane JT, Elangovan H, Stokes RA, Gunton JE. Vitamin D and the liver—correlation or cause? *Nutrients.* 2018;10(4):1–19.
16. Gille D, Schmid A. Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutr Rev.* 2015;73(2):106–15.
17. Newsome PN, Cramb R, Davison SM, Dillon JF, Foulerton M, Godfrey EM, et al. Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut.* 2018;67(1):6–19.
18. McDaniel MJ. Hepatic Function Testing: The ABCs of the Liver Function Tests. *Physician Assist Clin.* 2019;4(3):541–50.
19. Hall P, Cash J. What is the real function of the liver “function” tests? *Ulster Med J.* 2012;81(1):30–6.
20. Thompson M, Jaiswal Y, Wang I, Williams L. Hepatotoxicity: Treatment, causes and applications of medicinal plants as therapeutic agents. *The Journal of Phytopharmacology.* 2017;6(3):186-93.
21. Gowda S, Desai PB, Hull V V, Math AAK, Sonal N, Kulkarni S. A review on laboratory liver function tests. *PanAfrican Med J.* 2009;17:1–11.
22. Ozarda Y, Sikaris K, Streichert T, Macri J. Distinguishing reference intervals and clinical decision limits—A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018;55(6):420–31.
23. Siest G, Henny J, Gräsbeck R, Wilding P, Petitclerc C, Queraltó JM, et al. The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(1):47–64.
24. Hoffmann RG. Statistics in the Practice of Medicine. *JAMA J Am Med Assoc.* 1963;185(11):864–73.
25. Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem Medica.* 2016;26(1):5–16.
26. Grasbeck R, Saris N-E. Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Lab Invest.* 1969;26(110):62–3.
27. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Recommendation: The Theory of Reference Values - Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1987;25:337–42.

28. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Recommendation: The theory of reference values - Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. Clin Chim Acta. 1987;170:S13–32.
29. PetitClerc, C.; Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Recommendation: The theory of reference values - Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. Clin Chim Acta. 1987;(170):S3–12.
30. Dybkøer R, Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Recommendation: The theory of reference values - Part 6. Presentation of observed values related to reference values. Clin Chim Acta. 1987;170:S33–42.
31. Solberg HE, PetitClerc C. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Recommendation: The theory of reference values - Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. Clin Chim Acta. 1988;177:S1-12.
32. Solberg HE, Stamm D. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Recommendation: Theory of Reference Values - Part 4. Control of Analytical Variation in the Production, Transfer and Application of Reference Values. Clin Chim Acta. 1991;S5–12.
33. Gräsbeck R. The evolution of the reference value concept. Clin Chem Lab Med. 2004;42(7):692–7.
34. Henny J, Petersen PH. Reference values: from philosophy to a tool for laboratory medicine. Clin Chem Lab Med. 2004;42(7):686–91.
35. Ceriotti F, Boyd JC, Klein G, Henny J, Queraltó J, Kairisto V, et al. Reference intervals for serum creatinine concentrations: Assessment of available data for global application. Clin Chem. 2008;54(3):559–66.
36. Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. Clin Chem. 1990;36(2):265–70.
37. Harris EK, Wong ET, Shaw ST. Statistical criteria for separate reference intervals: race and gender groups in creatine kinase. Clin Chem. 1991;37(9):1580–2.
38. Fuentes-Arderiu X. Biological reference intervals and ISO 15189. Clin Chim Acta. 2006;364(1–2):365–6.
39. Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. Ann Clin Biochem. 2009;46:8–17.
40. CLIA. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 - Public Law 100-578, 100th Congress An Act. 1988. p. 2903–15.

41. EUROPA. Directiva 98/79/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico in vitro. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia; 1998. p. 37.
42. International Organization for Standardization. ISO 15189:2012. Medical laboratories - Requirements for quality and competence. 3ed. 2012.
43. Brasil. Resolução RDC Nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. Brasília: Diário Oficial da União; 2005. p. 17.
44. PALC. Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos - Norma 2016. Rio de Janeiro: Grafitto Gráfica e Editora Ltda; 2016. p. 64.
45. Katayev A, Fleming JK, Luo D, Fisher AH, Sharp TM. Reference intervals data mining: No longer a probability paper method. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(1):134–42.
46. Ceriotti F. Is there a classical role for the clinical laboratory in digital health? *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(3):353–8.
47. Grossi E, Colombo R, Cavuto S, Franzini C. The REALAB project: A new method for the formulation of reference intervals based on current data. *Clin Chem*. 2005;51(7):1232–40.
48. Haeckel R, Wosniok W, Arzideh F, Zierk J, Gurr E, Streichert T. Critical comments to a recent EFLM recommendation for the review of reference intervals. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(3):341–7.
49. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, Chiozza ML. Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochem Medica*. 2014;24(1):105–13.
50. Henny J, Vassault A, Boursier G, Vukasovic I, Mesko Brguljan P, Lohmander M, et al. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(12):1893–900.
51. Adeli K, Higgins V, Nieuwesteeg M, Raizman JE, Chen Y, Wong SL, et al. Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: Establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian health measures survey. *Clin Chem*. 2015;61(8):1049–62.
52. Ilicol YO, Aslan D. Use of total patient data for indirect estimation of reference intervals for 40 clinical chemical analytes in Turkey. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(7):867–76.
53. Farrell CL, Nguyen L. Indirect Reference Intervals: Harnessing the Power of Stored Laboratory Data. *Clin Biochem Rev*. 2019;40(2):99–111.
54. Adeli K, Higgins V, Trajcevski K, Habeeb NW. The Canadian laboratory initiative on pediatric reference intervals : A CALIPER white paper. *Crit Rev Clin Lab Sci*.

- 2017;54(6):358–413.
55. Rödöö P, Ridefelt P, Aldrimer M, Niklasson F, Gustafsson J, Hellberg D. Population-based pediatric reference intervals for HbA1c, bilirubin, albumin, CRP, myoglobin and serum enzymes. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73:361–7.
 56. Hilsted L, Rustad P, Aksglaede L, Sorensen K, Juul A. Recommended Nordic paediatric reference intervals for 21 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Investig*. 2013;73:1–9.
 57. Zierk J, Arzideh F, Rechenauer T, Haeckel R, Rascher W, Metzler M, et al. Age- and Sex-Specific Dynamics in 22 Hematologic and Biochemical Analytes from Birth to Adolescence. *Clin Chem*. 2015;61(7):964–73.
 58. Tate JR, Sikaris KA, Jones GRD, Yen T, Koerbin G, Ryan J, et al. Harmonising Adult and Paediatric Reference Intervals in Australia and New Zealand: An Evidence-Based Approach for Establishing a First Panel of Chemistry Analytes. *Clin Biochem*. 2014;35(4):213–35.
 59. Lim E, Miyamura J, Chen JJ. Racial/Ethnic-Specific Reference Intervals for Common Laboratory Tests: A Comparison among Asians, Blacks, Hispanics, and White. *Hawaii J Med Public Health*. 2015;74(9):302–10.
 60. Shessarenko N, Jacob CM, Azevedo RS, Fontes CJ, Novak G V., Andriolo A. Serum lipids in Brazilian children and adolescents: Determining their reference intervals. *BMC Public Health*. 2015;15(18):1–8.
 61. DASA. Grupo DASA - Diagnósticos da América S/A. 2019. Disponível em: <http://www.dasa.com.br>
 62. Brasil. Resolução n. 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília: Diário Oficial da União; 2012.
 63. Andriolo A, Martins AR, Ballarati CAF, Barbosa IV, Mendes ME, Melo MR de, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso. 2ed. Barueri, SP: Manole; 2010. 130 p.
 64. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero C, Férard G, et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C – Part 6. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):734–8.
 65. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero C, Férard G, 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 Activity Concentration of Alanine Aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):718–24.

66. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero C, Férard G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37° C. - Part 9. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(9):1439–46.
67. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero C, Férard G, et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C – Part 5. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Aspartate Aminotransferase. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(7):725–33.
68. Westgard J. “Westgard Rules” and multirules. 2009. Disponível em: <https://www.westgard.com/mltirule.htm>
69. Brasil. Lei 8.069, de 13 de julho de 1990 - Dispõe sobre o ESTATUTO DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, e dá outras providências. Estatuto da Criança e do Adolescente. Brasília: Diário Oficial da União; 1990.
70. Isakov A, Shapira I, Burke M, Almog C. Serum Myoglobin Levels in Patients With Ischemic Myocardial Insult. *Arch Intern Med.* 1988;148(8):1762–5.
71. Panteghini M. Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes. *Clin Biochem.* 1988;21(4):211–8.
72. Martin A, Malhotra A, Sullivan B, Ramakrishna H. Troponin elevations in patients with chronic cardiovascular disease: An analysis of current evidence and significance. *Ann Card Anaesth.* 2016;19(2):321–7.
73. Vesell ES, Bearn AG. Variations in the lactic dehydrogenase of vertebrate erythrocytes. *J Gen Physiol.* 1962;45(9):553–65.
74. Prowle JR, Kolic I, Purdell-Lewis J, Taylor R, Pearse RM, Kirwan CJ. Serum creatinine changes associated with critical illness and detection of persistent renal dysfunction after AKI. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(6):1015–23.
75. Lau WL, Vaziri ND. Urea, a true uremic toxin: The empire strikes back. *Clin Sci.* 2017;131(1):3–12.
76. Matsuno WC, Huang CJ, Garcia NM, Roy LC, Davis J. Amylase and lipase measurements in paediatric patients with traumatic pancreatic injuries. *Injury.* 2009;40(1):66–71.
77. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am Fam Physician.* 2004;70(7).
78. Chen J, Phillips B, Chandler WL. Evaluation of prothrombin time and activated partial thromboplastin time mixing studies using an estimated factor correction method. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2016;27(1):90–6.

79. Salgia RJ, Brown K. Diagnosis and management of hereditary hemochromatosis. *Clin Liver Dis.* 2015;19(1):187–98.
80. Mwaigwisya S, Assiri RAM, O’Grady J. Emerging commercial molecular tests for the diagnosis of bloodstream infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(5):681–92.
81. Siller AF, Whyte MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res.* 2018;33(2):362–4.
82. Barle H, Nyberg B, Essen P, Andersson K, McNurlan MA, Wernerman J, et al. The synthesis rates of total liver protein and plasma albumin determined simultaneously in vivo in humans. *Hepatology.* 1997;25(1):154–8.
83. Brasil. Ministério da Saúde. *Saúde da Criança.* Brasília: Ministério da Saúde; 2012. 29 p.
84. World Health Organization. Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse. *WHOQOL : measuring quality of life.* Geneva: World Health Organization; 1997. p. 13.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de compromisso de utilização de dados (TCUD)

TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS (TCUD)

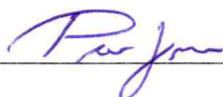
Nós, abaixo assinados, pesquisadores envolvidos no projeto “INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA TESTES DE AVALIAÇÃO HEPÁTICA EM CRIANÇAS BRASILEIRAS”, comprometemo-nos a manter o sigilo sobre os dados contidos nos arquivos dos Sistemas Gliese e Motion recebidos da Companhia de Medicina Diagnóstica DASA, bem como a privacidade dos pacientes correspondentes, como preconizam os documentos internacionais sobre ética em pesquisa envolvendo seres humanos e a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil.

Informamos que os dados a serem coletados dizem respeito a exames laboratoriais realizados entre Julho de 2017 e Dezembro de 2018.

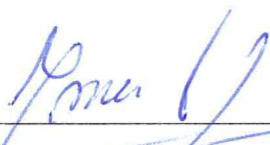
Joinville, 15 de outubro de 2018.



Ketrin Goetz Müller



Paulo Henrique Condeixa de França



Marco Fabio Mastroeni

APÊNDICE B – Declaração de instituição co-participante

DECLARAÇÃO DE INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE

Joinville, 11 de outubro de 2018.

Declaramos para os devidos fins que nós da DASA, sob CNPJ nº 61486650/0279-79, localizado em São Paulo, aqui representada por Myrna Perez Campagnoli, diretora médica de A/C Laboratório Ghanem, autorizamos o (a) pesquisador (a) responsável Ketrin Goetz Müller, discente da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, a realizar em nossas dependências a pesquisa com o título "Intervalos de referência para testes de avaliação hepática em crianças brasileiras", que tem por objetivo geral determinar intervalos de referência para exames laboratoriais utilizados na avaliação hepática em crianças brasileiras, tão logo o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVILLE, até o seu final previsto para o primeiro semestre de 2019. Será disponibilizado para o (a) pesquisador (a) informações do banco de dados da DASA a respeito dos exames utilizados para avaliação hepática, do período de julho de 2017 a dezembro de 2018, de pelo menos um laboratório central de cada região do país.


Estamos cientes que a identidade de cada indivíduo será mantida em absoluto sigilo e os pesquisadores seguirão as diretrizes contidas na resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e complementares.

Sabemos que nossa empresa poderá a qualquer fase desta pesquisa retirar essa anuência. Também foi, pela pesquisadora acima mencionada, garantido o sigilo e assegurada a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Concordamos que os resultados deste estudo poderão ser apresentados por escrito ou oralmente em congressos e/ou revistas científicas, de maneira totalmente anônima em relação aos nomes dos participantes.

Colocamo-nos à disposição para qualquer dúvida que se faça necessária.

Atenciosamente,


Dra. Myrna Perez Campagnoli
Endocrinologista Pediátrica
CRM - PR 22616

Myrna Perez Campagnoli
Diretora Médica
DASA
CPF 03509596765

APÊNDICE C – Análise de Erro Total dos testes laboratoriais da pesquisa

Tabela C-1: Análise de erro total dos testes ALT, AST, FAL e GGT processados no analisador automatizado Roche, modelo cobas c 702 localizado no núcleo técnico operacional da marca Exame (Distrito Federal), entre os anos de 2017 e 2018.

Exame - Roche c 702 Enzimas (U/L)	Erro Sistemático ControlLab				Erro Sistemático		Erro Aleatório 1,65*CV	Erro Total %	Erro Total Referencial %
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Média	CV %			
					janeiro, 2017				
ALT	1,248	2,533	1,357	1,7127	1,71	2,76	4,55	6,26	9,33
AST	-0,31	2,214	1,826	1,2439	1,24	2,91	4,80	6,04	13,48
FAL	-6,13	-7,18	-6,85	-6,72	6,72	3,38	5,57	12,29	13,44
GGT	-5,56	-5,2	-3,68	-4,813	4,81	2,25	3,71	8,53	8,32
					abril, 2017				
ALT	0,775	-2,11	0,112	-0,41	0,41	2,99	4,94	5,35	9,33
AST	-2,8	-1,47	-5,1	-3,12	3,12	2,98	4,91	8,04	13,48
FAL	0,765	-0,34	0,233	0,22	0,22	4,08	6,74	6,96	13,44
GGT	-6	-4,76	-2,55	-4,43	4,43	2,58	4,26	8,70	8,32
					julho, 2017				
ALT	-4,26	-1,34	-5,01	-3,53	3,53	2,78	4,58	8,12	9,33
AST	-5,16	-6,65	-8,48	-6,76	6,76	3,01	4,97	11,73	13,48
FAL	-0,83	0,091	-2,25	-1,00	1,00	3,76	6,20	7,20	13,44
GGT	3,988	2,297	3,136	3,14	3,14	2,19	3,61	6,75	8,32
					outubro, 2017				
ALT	-8,45	-25,8	-10,8	-15,02	15,02	2,36	3,89	18,91	9,33
AST	-13,6	-30,5	-18,8	-20,95	20,95	3,33	5,49	26,44	13,48
FAL	-11	-31	-18,7	-20,25	20,25	3,46	5,71	25,96	13,44
GGT	1,997	-22,1	-4,91	-8,324	8,32	2,04	3,37	11,69	8,32
					janeiro, 2018				
ALT	1,248	2,533	1,357	1,7127	1,71	2,76	4,55	6,26	11,81
AST	-0,31	2,214	1,826	1,2439	1,24	2,91	4,80	6,04	12,51
FAL	-6,13	-7,18	-6,85	-6,72	6,72	3,38	5,57	12,29	12,48
GGT	-5,56	-5,2	-3,68	-4,813	4,81	2,25	3,71	8,53	9,52
					abril, 2018				
ALT	-2,39	-2,55	-2,33	-2,419	2,42	2,89	4,76	7,18	11,81
AST	-3,74	-3,34	-2,86	-3,32	3,32	3,18	5,25	8,57	12,51
FAL	-0,39	-1,3	-1,48	-1,06	1,06	3,33	5,50	6,56	12,48
GGT	5,127	3,551	6,383	5,02	5,02	2,17	3,58	8,60	9,52
					julho, 2018				
ALT	1,01	-1,23	-2,17	-0,799	0,80	2,99	4,93	5,73	11,81
AST	-1,81	11,79	-3,35	2,28	2,28	3,00	4,95	7,23	12,51

Tabela C-1: Análise de erro total dos testes ALT, AST, FAL e GGT processados no analisador automatizado Roche, modelo cobas c 702 localizado no núcleo técnico operacional da marca Exame (Distrito Federal), entre os anos de 2017 e 2018.

continuação

Exame - Roche c 702	Erro Sistemático ControlLab				Erro Sistemático		Erro Aleatório 1,65*CV	Erro Total %	Erro Total Referencial %
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Média	CV %			
Enzimas (U/L)									
					julho, 2018				
FAL	-8,75	-10	-8,9	-9,21	9,21	3,54	5,84	15,06	12,48
GGT	-1,18	-4,34	2,595	-0,97	0,97	2,21	3,64	4,62	9,52
					outubro, 2018				
ALT	0,775	-4,37	0,877	-0,906	0,91	3,12	5,15	6,05	11,81
AST	-10,7	-6,32	-3,36	-6,799	6,80	2,87	4,73	11,53	12,51
FAL	-1,12	0,054	-0,28	-0,447	0,45	3,22	5,31	5,75	12,48
GGT	2,117	3,782	1,909	2,6026	2,60	1,83	3,03	5,63	9,52
					janeiro, 2019				
ALT	0,32	-0,23	-1,33	-0,413	0,41	2,53	4,18	4,59	11,81
AST	-6,22	-6,03	-4,55	-5,598	5,60	2,52	4,16	9,76	12,51
FAL	-5,48	1,996	-6,46	-3,313	3,31	2,56	4,23	7,54	12,48
GGT	-2,28	-0,56	2,994	0,049	0,05	1,44	2,37	2,42	9,52

Notas:

a) O erro total é a somatória do erro sistemático e do erro aleatório. O erro sistemático foi analisado pela avaliação externa da qualidade da ControlLab e o erro aleatório pelo coeficiente de variação (CV) do controle interno comercial Roche de cada teste.

b) O erro sistemático foi analisado a cada três meses (jan, abr, jul e out) e o erro aleatório mensalmente. Para que o erro total fosse analisado mensalmente houve a necessidade da seguinte definição:

- ControlLab mês de janeiro: contempla erro sistemático de novembro, dezembro e janeiro.
- ControlLab mês de abril: contempla erro sistemático de fevereiro, março, abril.
- ControlLab mês de julho: contempla erro sistemático de maio, junho, julho.
- ControlLab mês de outubro: contempla erro sistemático de agosto, setembro, outubro.

Sendo assim, o erro total foi analisado da seguinte forma:

- Erro total de janeiro: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de novembro, dezembro, janeiro.
- Erro total de abril: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de fevereiro, março, abril.
- Erro total de julho: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de maio, junho, julho.
- Erro total de outubro: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de agosto, setembro, outubro.

c) Valores de erro total destacados em negrito estão fora do erro total referencial especificado pelo laboratório para o exame pesquisado e, portanto, os dados relacionados ao período em questão foram excluídos da pesquisa.

d) Erro total referencial: média histórica do laboratório.

Referência: Westgard JO, Westgard SA. Total analytic error from concept to application. CLN. 2013: 1-5

Tabela C-2: Análise de erro total dos testes ALT, AST, FAL e GGT processados no analisador automatizado Roche, modelo cobas c 702 localizado no núcleo técnico operacional da marca Deubani Auriemo (São Paulo), entre os anos de 2017 e 2018.

Enzimas (U/L)	Erro sistemático ControlLab				Erro Sistemático		Erro Aleatório 1,65°CV	Erro Total %	Erro Total Referencial %
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Média	CV %			
abril, 2017									
ALT	-5,47	-3,85	-2,82	-4,048	4,05	3,02	4,98	9,03	13,57
AST	-9,96	-5,85	-6,03	-7,28	7,28	3,10	5,12	12,40	10,30
FAL	-5,49	-3,67	-4,94	-4,70	4,70	2,36	3,89	8,59	9,34
GGT	-2,87	-2,21	-4,76	-3,28	3,28	3,35	5,53	8,82	9,10
julho, 2017									
ALT	-3,81	-4,09	-5,01	-4,30	4,30	2,81	4,63	8,93	13,57
AST	-6,25	-6,2	-7,05	-6,50	6,50	3,04	5,02	11,52	10,3
FAL	1,739	2,979	2,44	2,39	2,39	2,55	4,20	6,59	9,34
GGT	-2,4	-3,16	-2,71	-2,76	2,76	3,24	5,34	8,09	9,10
outubro, 2017									
ALT	-7,02	-4,24	-0,64	-3,967	3,97	2,70	4,45	8,41	13,57
AST	-5,28	-0,07	2,663	-0,893	0,89	3,12	5,14	6,04	10,30
FAL	-6,32	-4,07	-4,23	-4,875	4,87	2,06	3,40	8,27	9,34
GGT	1,702	0,537	1,54	1,2599	1,26	5,04	8,32	9,58	9,10
janeiro, 2018									
ALT	-7,07	-4,7	-6,62	-6,134	6,13	2,38	3,92	10,05	13,57
AST	-9,56	-2,58	-6,53	-6,224	6,22	2,69	4,44	10,67	10,30
FAL	0,241	0,454	-2,1	-0,47	0,47	2,07	3,41	3,88	9,34
GGT	1,865	-0,07	1,12	0,9711	0,97	2,42	3,99	4,96	9,10
abril, 2018									
ALT	-2,39	5,356	6,977	3,3154	3,32	3,08	5,07	8,39	13,57
AST	-6,42	1,1	-0,15	-1,82	1,82	3,00	4,95	6,77	10,30
FAL	0,368	2,428	1,542	1,45	1,45	2,30	3,80	5,24	9,34
GGT	-2,42	1,387	1,82	0,26	0,26	2,75	4,54	4,80	9,10
julho, 2018									
ALT	-0,67	-8,64	0	-3,11	3,11	2,42	3,99	7,10	13,57
AST	-2,69	-1,58	-4,83	-3,03	3,03	2,51	4,14	7,17	10,30
FAL	1,723	4,232	0,094	2,02	2,02	2,90	4,79	6,80	9,34
GGT	-0,53	-2,73	-0,14	-1,13	-1,13	2,54	4,19	5,33	9,10
outubro, 2018									
ALT	-4,39	-6,19	-3,51	-4,698	4,70	2,33	3,84	8,53	13,57
AST	-1,19	-4,63	-4,2	-3,34	3,34	3,16	5,22	8,56	10,30

Tabela C-2: Análise de erro total dos testes ALT, AST, FAL e GGT processados no analisador automatizado Roche, modelo cobas c 702 localizado no núcleo técnico operacional da marca Deubani Auriemo (São Paulo), entre os anos de 2017 e 2018.

continuação

Deubani Auriemo - Roche c 702 Enzimas (U/L)	Erro sistemático ControlLab				Erro Sistemático		Erro Aleatório	Erro Total %	Erro Total Referencial %
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Média	CV %	1,65*CV		
FAL	0,356	0,08	2,314	0,9168	0,92	2,68	4,41	5,33	9,34
GGT	6,673	4,395	3,41	4,8257	4,83	2,87	4,73	9,55	9,10
					outubro, 2018				
ALT	-0,75	-4,76	-1,33	-2,281	2,28	2,89	4,77	7,06	13,57
AST	3,966	-0,84	3,219	2,1139	2,11	3,48	5,73	7,85	10,30
FAL	3,273	1,565	4,009	2,9489	2,95	2,45	4,04	6,99	9,34
GGT	1,18	1,478	10,02	4,2268	4,23	3,63	5,98	10,21	9,10

Notas:

a) Exames laboratoriais processados no Deubani Auriemo (SP) tiveram início das análises de erro total a partir de abril de 2017, devido ao analisador automatizado cobas c 702 entrar em operação a partir de fevereiro de 2017.

b) O erro total é a somatória do erro sistemático e do erro aleatório. O erro sistemático foi analisado pela avaliação externa da qualidade da ControlLab e o erro aleatório pelo coeficiente de variação (CV) do controle interno comercial Roche de cada teste.

c) O erro sistemático foi analisado a cada três meses (jan, abr, jul e out) e o erro aleatório mensalmente. Para que o erro total fosse analisado mensalmente houve a necessidade da seguinte definição:

- ControlLab mês de janeiro: contempla erro sistemático de novembro, dezembro e janeiro.
- ControlLab mês de abril: contempla erro sistemático de fevereiro, março, abril.
- ControlLab mês de julho: contempla erro sistemático de maio, junho, julho.
- ControlLab mês de outubro: contempla erro sistemático de agosto, setembro, outubro.

Sendo assim, o erro total foi analisado da seguinte forma:

- Erro total de janeiro: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de novembro, dezembro, janeiro.
- Erro total de abril: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de fevereiro, março, abril.
- Erro total de julho: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de maio, junho, julho.
- Erro total de outubro: contempla média de erro sistemático e média de CV dos meses de agosto, setembro, outubro.

d) Valores de erro total destacados em negrito estão fora do erro total referencial especificado pelo laboratório para o exame pesquisado e, portanto, os dados relacionados ao período em questão foram excluídos da pesquisa.

e) Erro total referencial: média histórica do laboratório.

Referência: Westgard JO, Westgard SA. Total analytic error from concept to application. CLN. 2013: 1-5

**APÊNDICE D – Intervalos de referência para exames correlacionados aos
exames da pesquisa**

Tabela D-1: Intervalos de referência dos exames correlacionados aos exames da pesquisa.

Exame	Intervalo de Referência	
	Feminino	Masculino
Alanina aminotransferase	inferior a 33,0 U/L	inferior a 41,0 U/L
Albumina ¹	0 - 3d: 2,8 - 4,4 g/dL 4d - 13a: 3,8 - 5,4 g/dL	
Aldolase	Inferior ou igual a 7,6 U/L	
Amilase	28 a 100 U/L	
Aspartato aminotransferase	inferior a 32,0 U/L	inferior a 40,0 U/L
Bilirrubina Total	0d: inferior a 5,8 mg/dL 1d: inferior a 8,2 mg/dL 2 - 4d: inferior a 11,7 mg/dL 5d - 11a: inferior a 1,2 mg/dL	
Creatina quinase-MB	Inferior a 25 U/L	
Creatinina	0 - 59d: 0,29 a 1,04 mg/dL 2 - 11m: 0,17 - 0,42 mg/dL 1 - 2a: 0,24 - 0,41 mg/dL 3 - 4a: 0,31 - 0,47 mg/dL 5 - 6a: 0,32 - 0,59 mg/dL 7 - 8a: 0,4 - 0,6 mg/dL 9 - 10a: 0,39 - 0,73 mg/dL 11a: 0,53 - 0,79 mg/dL	
Creatinofosfoquinase	33 a 211 U/L	32 a 294 U/L
Estimativa de Filtração Glomerular	Maior ou igual a 60 mL/min/1,73 m ²	
Desidrogenase Láctica	0 - 30d: 145 - 765 U/L 1 - 11m: 190 - 420 U/L 1 - 3a: 165 - 395 U/L 4 - 6a: 135 - 345 U/L 7 - 9a: 140 - 280 U/L 10 - 11a: 120 - 260 U/L	0 - 30d: 120 - 325 U/L 1 - 11m: 170 - 450 U/L 1 - 6a: 155 - 345 U/L 7 - 9a: 145 - 300 U/L 10 - 11a: 105 - 235 U/L
Epstein Baar IgG	Não Reagente: inferior a 20 U/mL	
Epstein Baar IgM	Não Reagente: inferior a 20 U/mL	
Ferritina	13 a 150 ng/mL	30 a 400 ng/mL
Ferro	33 a 193 µg/dL	
Fosfatase alcalina	0 - 14d: 83 - 248 U/L 15d - 11m: 122 - 469 U/L 1 - 9a: 149 - 301 U/L 10 - 11a: 127 - 326 U/L	

continua

Tabela D-1: Intervalos de referência dos exames correlacionados aos exames da pesquisa.
continuação

Exame	Intervalo de Referência	
	Feminino	Masculino
Gama glutamiltransferase	6,0 a 52,0 U/L	10,0 a 71,0 U/L
Globulina ¹	2,0 – 4,1 g/dL	
Hormônio Paratireoideano	15 a 65 pg/mL	
Lipase	13 a 60 U/L	
Mioglobina Sérica	25 – 58 ng/mL	28 – 72 ng/mL
Proteína C reativa	Inferior a 0,1 mg/dL	
Proteínas Totais	0 - 3a: 5,6 - 7,5 g/dL 4 - 18a: 6 - 8 g/dL	
Relação Albumina/Globulina ¹	2.0 - 4.1 g/dL	
Tempo de Protrombina - Atividade	70 a 100%	
Troponina I	Inferior a 0,16 ng/mL	
Ureia	16,6 – 48,5 mg/dL	
Vitamina D (25 Hidroxi)	Superior a 20 ng/mL	

Notas:

⁽¹⁾ Como parte do exame “Proteínas Totais e Frações”.

d – dias

m – meses

a – anos

APÊNDICE E – Estrutura base orientada a objeto utilizada na linguagem de programação Python 3.7.7

```

class Exam():
    def __init__(self, name, date, result):
        n = name.split()
        self.name = n[0]
        self.date = date
        self.result = result
        self.position = self.find_enum_type(self.name)
        self.test_ok = None

    def find_enum_type(self, name):
        value = None
        for exam in ExamTypeEnum:
            if str(exam.name).strip() == str(name).strip():
                value = exam.value - 1
        if value is None:
            print("EXAM {} POSITION NOT FOUND!".format(name))
            sys.exit()
        return value

class Patient():
    def __init__(self, name, idordem, b_date, e_date, sex, uf, city,
idamostra, idosdasa, age = None):
        self.name = name
        self.idordem = idordem
        self.b_date = b_date
        self.e_date = e_date
        self.sex = sex
        self.uf = uf
        self.city = city
        self.idamostra = idamostra
        self.idosdasa = idosdasa
        self.list_exam = [None] * 25
        if age is None:
            self.age = self.calculate_age()
        else:
            self.age = age
        self.repeat = False
        self.error = False

    def calculate_age(self):
        age = self.e_date - self.b_date
        return age.days

    def doxl():
        try:
            filename = ARQUIVO EM FORMATO DE TEXTO
            fp = open(filename, encoding="latin-1")
        except:
            print ('Failed to open {}'.format(filename))
            sys.exit(1)
        lines = fp.readlines()
        lines_size = len(lines)

        wb = Workbook()
        ws = wb.active
        ws.title = 'Pacientes 0 a 11 anos'
        headers = ['idordem', 'Paciente', 'Data de
Nasc', 'Idade', 'Sexo', 'UF', 'Cidade', 'Data Exam', 'Id Amostra', 'Id Dasa']
        i = 10
        for e in ExamTypeEnum:
            headers += [e.name]

```

```

ws.append(headers)
i = 0

datetimeFormat = "%Y-%m-%d %H:%M:%S"
Patient_list = []
k = 0
e_n_list = [0]*25
#READING DATA!
for j, line in enumerate(lines):
    if j > 0:
        x = line.split(';')
        idordem = x[0]
        name = x[1]
        b_date = datetime.strptime(x[2], datetimeFormat)
        age = x[3]
        sex = x[4]
        uf = x[5]
        city = x[6]
        e_date = datetime.strptime(x[7], datetimeFormat)
        id_sample = x[8]
        id_dasa = x[9]

        pct = Patient(name, idordem, b_date, e_date, sex, uf, city,
id_sample, id_dasa)

        for h in range(0,25):
            aux = x[h+10].split()
            if aux[0] != 'NONE':
                exam = Exam(y[h+10], e_date, aux[0])
                pct.add_exam_to_list(exam)

        if Patient_list:
            if Patient_list[-1].name == pct.name:
                pct.repeats()
                Patient_list[-1].repeats()
            Patient_list += [pct]

        loading = (j/lines_size)*100.
        if k != int(loading):
            print('#'*int(loading))
            k = int(loading)
    else:
        y = line.split(';')
k = 0
lines_size = len(Patient_list)

##### SAVE N DATA SHEET #####
wc = wb.create_sheet('N Data')
h = []
for e in ExamTypeEnum:
    h += [e.name]
wc.append(h)
pt_count = 0
for i, Patient in enumerate(Patient_list):
    if verify_exam_status_alt(Patient):
        pt_count += 1
        data =
[Patient.idordem, Patient.name, Patient.b_date, Patient.print_age(), Patient.se
x, Patient.uf, Patient.city, Patient.e_date, Patient.idamostra, Patient.idosdasa
]

        for j, e in enumerate(Patient.list_exam):

```

```

        if e is None:
            result = 'NONE'
        else:
            e_n_list[e.position] += 1
            result = e.result
            data += [result]
            ws.append(data)
            loading = (i/lines_size)*100.
            if k != int(loading):
                print('$'*int(loading))
                k = int(loading)
            d = ['N Paciente: ',pt_count]
            wc.append(e_n_list)
            wc.append(d)
            print('SAVING...')
            wb.save(ARQUIVO EM FORMATO EXCEL)
            print('SAVED!')

if __name__ == "__main__":
    doxl()

```

APÊNDICE F – Artigo Científico

Title

Reference intervals for liver serum markers in Brazilian children obtained by an indirect method

Running Title

Pediatric reference intervals in Brazil

Authors

Ketrin G Müller¹, Maria A A Prado¹, Marco F Mastroeni¹, Paulo H C de França¹.

Affiliations

¹Postgraduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Joinville, Santa Catarina, Brazil.

Corresponding author

Ketrin G Müller, Postgraduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region, Paulo Malschitzki St., 10, Joinville, Santa Catarina, Brazil, CEP 89.219-710.

Email: ketringoetz@gmail.com

Key words

Reference intervals, Analytes, Data processing, Pediatric Chemistry.

List of abbreviations:

ALT – alanine aminotransferase

AST – aspartate aminotransferase

ALP – alkaline phosphatase

GGT – gamma-glutamyl transferase

CALIPER - Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals

KiGGS - Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland

DASA – Diagnosticos da America S.A.

OTC – operational technical center

HTC – hospital technical center

ABSTRACT

BACKGROUND: The definition of reference intervals is complex and depends on the selection of an appropriate reference population. The challenges are even greater in the child population and indirect approaches have gained space in this population.

METHODS: Laboratory data comprising the period from January 2017 to December 2018 were recovered from a medical diagnostic company with several brands distributed in Brazil. After applying the inclusion and exclusion criteria, a final sample of 12,326 individuals aged 0 to 11 years was used to determine the reference intervals (2.5th to 97.5th percentiles) for alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma glutamyl transferase (GGT) using an indirect method.

RESULTS: All enzymes exhibited higher serum concentrations in the <1-year category, which decreased in the subsequent category (1 to <5 years). For serum AST levels in both sexes and for GGT in girls, the 97.5th percentile showed a continuous downward trend with increasing age, which differed from the patterns observed for ALT and ALP in both sexes and for GGT in boys. Considering the 97.5th percentile, serum concentrations were higher in boys for most age categories.

CONCLUSIONS: Although the serum concentration profile of the enzymes investigated is similar to that reported in international studies using direct or indirect approaches in children, the values found in this study differ from other populations. This fact reinforces the importance of establishing specific reference intervals for Brazilian children.

1 **Introduction**

2

3 The liver serum markers alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST),
4 alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl transferase (GGT) are essential laboratory
5 tests necessary to establish health priorities and one of the purposes of the serum measurement
6 of these enzymes is to evaluate the hepatobiliary system (1). These tests only have the desired
7 impact when the clinical laboratory that performs them ensures reliable information that is
8 useful for the diagnosis or monitoring of liver disease. One such condition is the establishment
9 of reference intervals of the laboratory test, which must be specific to the population
10 investigated (2, 3).

11 The establishment of reference intervals is complex and depends on the selection of an
12 appropriate reference population (4). Difficulties are even greater in the child population and
13 include the recruitment of a large number of healthy participants and the collection of adequate
14 blood volumes, as well as the child's development itself (5). In an attempt to overcome these
15 challenges, indirect approaches for the estimation of reference intervals have been encouraged,
16 especially in populations of extreme ages and those in which sample collection is difficult.
17 Indirect methods are simpler and less expensive, and eliminate the ethical issues of blood
18 collection (3).

19 Although the development of reference intervals is laborious, global initiatives have
20 undertaken the task to establish pediatric reference intervals, such as the Canadian Laboratory
21 Initiative on Pediatric Reference Intervals (CALIPER) Project in Canada and the KiGGS
22 population-based study in Germany (6, 7). However, few studies reporting general reference
23 intervals are available for the Brazilian population. In view of their importance, the objective
24 of this study was to determine reference intervals for liver serum markers (ALT, AST, ALP,
25 and GGT) in Brazilian children using an indirect method.

26 **Materials and Methods**

27

28 **STUDY DESIGN**

29 This is a retrospective study that used information from the database of the private medical
30 diagnostic company “Diagnósticos da America SA (DASA)”. DASA is the largest provider of
31 medical diagnostic services in Latin America. The company has 42 brands and more than 700
32 service units in various regions of Brazil and acts as a support laboratory for smaller laboratories
33 and as a service provider for hospitals and outpatients (Supplementary Figure 1). Patient care
34 is standardized among brands and sample analyses are centralized in technical areas, called
35 Operational Technical Centers (OTC) which process samples collected in outpatient care units
36 of DASA’s own laboratory brands or third-party laboratories, and Hospital Technical Centers
37 (HTC) which process samples collected in hospital units.

38 In this study, blood samples were collected between January 2017 and December 2018
39 from all children aged 0 to 12 incomplete years (8) during outpatient care in one of the 26
40 Brazilian states or the Federal District to measure at least serum ALT and AST levels. The
41 following individuals were excluded from the study: 1) children undergoing more than one
42 measurement of the same liver serum marker during the study period, following the same
43 criterion as reported in other studies (9, 10) because of the higher chance that these individuals
44 have some disease (11); 2) children with results of liver serum markers obtained from the OTC
45 of the Álvaro brand (Cascavel, Paraná) because this brand does not use the same automated
46 analyzer, analytical method and test reagent as the OTCs of Delboni Auriemo (São Paulo,
47 capital) and Exame (Brasília, Federal District); 3) children with results obtained with the
48 automated analyzers of Delboni Auriemo and Exame brands that produced a total error above
49 the quality specifications of DASA (Supplementary Table 1), and 4) children with results of
50 laboratory tests associated with liver serum markers outside the reference range, including tests

51 for renal, hepatic, pancreatic, bone and cardiac function, infection, and inflammation
52 (Supplementary Table 2). According to the scientific literature, individuals with some disease
53 can be identified based on abnormalities of other laboratory tests associated with liver serum
54 markers of the study (3, 11, 12). In cases in which none of laboratory tests was associated with
55 the investigated serum enzymes, the child whose liver serum marker was outside the reference
56 interval was excluded (Supplementary Table 3).

57 The study was approved by the Research Ethics Committee of the University of
58 Joinville, Santa Catarina, Brazil (Approval No. 3,032,043).

59

60 **DATA COLLECTION AND ANALYTICAL PROCEDURES**

61 For the laboratory tests, serum samples were obtained from venous blood collected into serum
62 tubes with separator gel. Blood was collected from seated children with or without previous
63 fasting. After collection, the serum tubes were left to stand for 30 to 60 minutes and then
64 centrifuged at 1,000 to 1,300 g for 10 minutes. Samples not processed immediately were stored
65 under refrigeration at 2 to 8 °C and were analyzed within 12 hours (13, 14).

66 Possible interfering factors in the serum samples such as hemolysis and lipemia were
67 detected visually by inspection of the tube or based on alerts issued by the Cobas c702
68 automated analyzers (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). If interference that could
69 potentially compromise interpretation of the result was detected, the sample was rejected for
70 the processing of liver serum markers.

71 The analyses of ALT (LDH-UV method without pyridoxal phosphate), AST (MDH-
72 UV method without pyridoxal phosphate), ALP (p-nitrophenyl phosphate method), and GGT
73 (L-gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanide method) were performed in Cobas c702
74 automated analyzers (Roche). For each automated analyzer, the reagents, controls, and
75 calibrators were from the same manufacturer (Roche) and the analytical quality control

76 procedure was carried out according to the manufacturer's instructions and current Brazilian
77 legislation (15).

78 For the evaluation of performance and analytical stability throughout the study period,
79 the total errors were determined quarterly as the sum of the random and systematic errors of
80 each laboratory test. When the total quarterly error was above the total error specified, the data
81 for the respective study period were excluded (Supplementary Table 1).

82

83 **STATISTICAL ANALYSES**

84 The data were grouped and analyzed taking into account the inclusion and exclusion criteria of
85 the study. The object-oriented Python 3.7.7 programming language was used. After
86 harmonization of the data and final structuring of the database, adverse results such as a small
87 number of associated laboratory tests and an unusual combination of tests on the same date for
88 a given individual were identified visually. Values with low clinical correlation and liver results
89 outside the reference range were excluded from the final database (Supplementary Figure 2).

90 Data were analyzed using the IBM® Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)®,
91 version 26.0. Measures of central tendency (mean, median, and quartile) and dispersion
92 (standard deviation and interquartile range) were calculated for the quantitative variables, and
93 frequency distributions for the categorical variables. Normality was verified using the
94 Kolmogorov-Smirnov test. The nonparametric Mann-Whitney test was used for the comparison
95 of median enzyme levels between sexes and the Kruskal-Wallis test for the comparison
96 according to age group. The children's age group (<1, 1 to <5, 5 to <10 and 10-11 years) was
97 classified according to the criteria of the Brazilian Ministry of Health (16).

98 The reference intervals for each enzyme were determined using the 2.5th to 97.5th
99 percentiles. The tests were considered significant when $p < 0.05$.

100

101 **Results**

102 Of the 26,718 individuals eligible for the study, 12,326 were included in the final database
103 (Supplementary Figure 2).

104 The Kruskal-Wallis test showed that the median ALT, AST, ALP and GGT levels
105 differed significantly between age categories in both sexes. However, the Mann-Whitney test
106 revealed a significant difference between sexes for median ALT and AST levels in the 1 to <5-
107 year age category; for ALT, AST and ALP in the 5 to <10-year age category, and for ALT,
108 AST and GGT in the 10–11-year age category (Table 1; Figure 1a and 1b).

109 The median serum concentrations of ALP increased slightly with advancing age in both
110 sexes (Figure 1a), while the median AST concentrations decreased sharply (Figure 1b). A
111 decrease in serum ALT and GGT levels was observed for the age categories of <1 and 1 to <5
112 years in both sexes; however, these concentrations seem to stabilize after the 5 to <10-year
113 category (Figure 1b).

114 Considering the 97.5th percentile, the serum levels of all enzymes were higher in the <1-
115 year age category and eventually decreased in the subsequent category (1 to <5 years) (Tables
116 2 and 3; Figure 2). A similar pattern was observed in boys and girls for the 97.5th percentile of
117 ALT, starting with a higher concentration in the <1-year category (47.0 and 36.6 U/L in boys
118 and girls, respectively) and decreasing in the 1 to <5-year category (28.0 and 24.0 U/L),
119 followed by increases in the categories of 5 to <10 years (31.9 and 26.2 U/L) and 10-11 years
120 (35.1 and 27.1 U/L) (Tables 2 and 3; Figure 2). Serum GGT concentrations showed a pattern
121 similar to that of ALT in boys, but the peak of the 97.5th percentile was more pronounced in the
122 <1-year category (160.4 U/L), decreasing thereafter to 37.5 U/L in the 1 to <5-year category
123 and to 31.9 U/L in the 5 to <10-year category (Tables 2 and 3; Figure 2). Unlike boys in whom
124 the values increased again after this decline, in girls GGT levels continued to decrease in the
125 category of 10 to 11 years (Tables 2 and 3; Figure 2).

126 As observed for GGT in girls, the 97.5th percentile for AST followed a continuous
127 downward trend with increasing age in both sexes, which differed from the patterns of serum
128 ALT levels in both sexes and of GGT in boys (Tables 2 and 3; Figure 2).

129 With regard to ALP in both sexes, the 97.5th percentiles were also higher in the <1-year
130 category (464.5 U/L for boys and 444.9 U/L for girls) (Tables 2 and 3; Figure 2). Thereafter,
131 serum concentrations decreased in the category of 1 to <5 years (366.2 U/L for boys and 373.4
132 U/L for girls), followed by an increase in the concentrations of this enzyme in the subsequent
133 categories (Tables 2 and 3; Figure 2).

134 Considering the 97.5th percentile, serum concentrations were higher in boys, with the
135 exception of AST and GGT in the <1-year category and ALP in the categories of 1 to <5 years
136 and 5 to <10 years, which were higher in girls (Tables 2 and 3; Figure 2).

137

138 **Discussion**

139 The present study revealed higher 97.5th percentiles for serum concentrations of ALT, AST,
140 ALP and GGT in children <1 year of age of both sexes. The wider range of the reference
141 intervals for the four enzymes investigated in the <1-year category corroborates the findings of
142 other studies (6, 17) and suggests variable development of the liver in a population or immature
143 homeostatic mechanisms among children of this age group (18).

144 In addition, the serum concentrations of the four enzymes differed between boys and
145 girls in some age groups (ALT and AST in the 1 to <5-year category; ALT, AST and ALP in
146 the 5 to <10-year category, and ALT, AST and GGT in the 10–11-year category). Using an
147 indirect method, a study involving samples of inpatients and outpatients from a pediatric care
148 center in Germany showed different continuous reference intervals for serum ALT, AST, ALP
149 and GGT between sexes (17). On the other hand, a Canadian study conducted on healthy and
150 apparently healthy children using a direct method reported reference intervals for ALT, AST,

151 ALP and GGT according to age group, but without considering sex (6). The differences found
152 may be partially explained by increases in liver mass, muscle mass, or bone mass with age (19),
153 highlighting the importance of establishing specific pediatric reference intervals for age and
154 sex.

155 Another important finding of our study is the upper limit of the serum levels of ALT,
156 AST and GGT, which were similar to those of adults for the same manufacturer of the
157 diagnostic kit used, and higher for males (cut-off values of 41.0 and 33.0 U/L for ALT; 40.0
158 and 32.0 U/L for AST; 71 and 42 U/L for GGT in men and women, respectively).

159 Although the 97.5th percentiles for ALT, AST and GGT found in our study are higher
160 among boys in most age categories (ALT in all categories; AST and GGT in all age categories
161 except for the <1-year category), they differ from the values provided by the manufacturer,
162 especially in the younger age categories (<1 year and 1 to <5 years), a finding reinforcing the
163 importance of establishing pediatric reference intervals.

164 For ALP, the manufacturer provides pediatric reference intervals obtained from the
165 CALIPER study, which used specific criteria to transfer the reference intervals established with
166 the Architect 8000 platform to Roche Cobas 6000 (2, 20). The pattern of the upper limits differs
167 between the age categories of our study and the CALIPER study (20), probably because of the
168 difference in the stratification of the age groups.

169 Although the profile of serum concentrations of the enzymes investigated in this study
170 is similar to that of other studies using direct or indirect approaches in the pediatric population
171 (6,17), the values found differ from American or European populations, a finding reinforcing
172 the importance of establishing specific reference intervals for the Brazilian pediatric population.
173 In Brazil, indirect approaches to determine pediatric reference intervals are still underutilized,
174 probably because the country's legislation does not require clinical laboratories to verify that
175 the reference intervals provided by the manufacturer are adequate for the population studied

176 (15). Thus, most laboratories in Brazil use reference intervals provided by the manufacturers of
177 diagnostic tests or scientific literature, which are mostly derived from American or European
178 populations. This is an important fact since the lack of reference intervals for the Brazilian
179 pediatric population influences the interpretation of laboratory test reports and hinders decision-
180 making regarding effective clinical management.

181 The cited studies that use direct or indirect methods differ in terms of country of origin,
182 age groups, inclusion and exclusion criteria, sample size, laboratory techniques, and statistical
183 methods (Supplementary Table 4). Consequently, the reference intervals for liver serum
184 markers also differ between one study and another (Supplementary Table 5).

185 This study has several strengths. First, it is the first study that uses an alternative data
186 mining approach as well as data from children from the five regions of Brazil. Second,
187 considering the lack of pediatric reference intervals for liver serum markers such as ALT, AST,
188 ALP and GGT in Brazil, these results will contribute to improve the diagnosis of problems
189 associated with liver function in children from 0 to 11 years of age. However, some limitations
190 must be mentioned. First, the exclusion of liver serum marker results of children obtained from
191 the Álvaro OTC considerably reduced the number of individuals from southern Brazil,
192 generating groups with fewer than 400 individuals, the minimum number recommended for
193 determining reliable reference intervals (21). Second, the data of this study are specific to the
194 Roche Cobas analytical platform and should be used in accordance with the EP28-A3 guideline
195 of the Clinical Laboratory Standards Institute (2).

196 In conclusion, this study used an indirect approach to determine reference intervals for
197 ALT, AST, FAL and GGT in Brazilian children. The results demonstrated a profile of serum
198 concentrations similar to that of other international studies using direct or indirect approaches
199 in children. However, the values found in this study differ from other populations, a fact that
200 makes the research clinically useful and allows appropriate interpretation of the analytical

201 results by the clinical staff.

202

203 **Author Contributions:** Müller KM, França PHC and Mastroeni MF conceived and designed
204 the study; Müller KM and Prado MAA collected and analyzed the data; Mastroeni MF
205 performed the statistical analyses; Müller KM, França PHC and Mastroeni MF wrote and
206 revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final version
207 of the manuscript.

208

209 **Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest:** There are no conflicts of interest
210 related to the data and conclusions presented.

211

212 **Research Funding:** None

213

214 **Acknowledgments:** The authors thank Paulo de Sá Osório from the maintenance area of
215 DASA's information production systems. The contribution of Drs. Dalva Margareth Valente
216 Gomes and Myrna Perez Campagnoli is also acknowledged.

217

218 **References**

219

220 1. World Health Organization. Second WHO model list of essential In Vitro
221 Diagnostics. Geneva: WHO; 2019:49 p.

222 2. CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical
223 laboratory; approved guideline – third edition. CLSI document C28-A3. Wayne (PA) CLSI;
224 2008:61 p.

225 3. Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, Sikaris K, Streichert T, Katayev A, et al. Indirect

226 methods for reference interval determination - review and recommendations. *Clin Chem Lab*
227 *Med* 2018;57:20-9.

228 4. Ritchie RF, Palomaki G. Selecting clinically relevant populations for reference
229 intervals. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:702–9.

230 5. Dahshan A, Chalmers LJ, Tolia V. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *Futur*
231 *Med* 2009;6:83–91.

232 6. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al.
233 Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: A CALIPER database of 40
234 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem* 2012;58:
235 854–68.

236 7. Dortschy R, Rosario SA, Scheidt-Nave C, Thierfelder W, Thamm M, Gutsche J, et
237 al. Population-related distribution values selected laboratory parameters from the study on the
238 health of children and adolescents in Germany (KiGGS). Berlin: Robert Koch Institute; 2009:
239 132 p.8.

240 8. Brazil. Law 8.069, of July 13, 1990 - Provides for the Statute of the Child and
241 Adolescent, and provides other measures. Brasilia: Official Gazette;1990.

242 9. Grossi E, Colombo R, Cavuto S, Franzini C. The REALAB project: A new method
243 for the formulation of reference intervals based on current data. *Clin Chem* 2005;51:1232–40.

244 10. Farrell CL, Nguyen L, Carter AC. Data mining for age-related TSH reference
245 intervals in adulthood. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:e213–5.

246 11. Farrell CL, Nguyen L. Indirect reference intervals: harnessing the power of stored
247 laboratory data. *Clin Biochem Rev* 2019;40:99–111.

248 12. Farrell CL, Nguyen L, Carter AC. Parathyroid hormone: Data mining for age-related
249 reference intervals in adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2018;88:311-317.

250 13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for the Handling and

251 Processing of Blood Specimens; approved guideline – third edition. CLSI document H18-
252 A3C28-A3. Wayne (PA) CLSI;2008.

253 14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for the Collection of
254 Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; approved standard – sixth edition. CLSI
255 document H3-A6. Wayne (PA) CLSI;2008.

256 15. Brazil, brazil. Resolution RDC 302 of 13 October 2005. It provides for technical
257 regulations for the operation of clinical laboratories. Brasilia: Official Gazette of the
258 Union;2005.

259 16. Brazil, brazil. Ministry of Health. Child Health. Informative materials. Brasilia:
260 Ministry of Health, 2012:29 p.

261 17. Zierk J, Arzideh F, Rechenauer T, Haeckel R, Rascher W, Metzler M, et al. Age-
262 and sex-specific dynamics in 22 hematologic and biochemical analytes from birth to
263 adolescence. Clin Chem 2015;61:964–73.

264 18. Trefl E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. Current Biology 2017; 27:R1147-
265 51.

266 19. Safak AA, Simsek E, Bahcebasi T. Sonographic assessment of the normal limits and
267 percentile curves of liver, spleen, and kidney dimensions in healthy school-aged children. J
268 Ultrasound Med 2005;24:1359-64.

269 20. Estey MP, Cohen AH, Colantonio DA, et al. CLSI-based transference of the
270 CALIPER database of pediatric reference intervals from Abbott to Beckman, Ortho, Roche and
271 Siemens clinical chemistry assays: direct validation using reference samples from the
272 CALIPER cohort. Clin Biochem 2013;46:1197–219.

273 21. Ichihara K, Boyd JC, IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits
274 (C-RIDL). An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. Clin
275 Chem Lab Med 2010;48:1537–51.

Table 1. Median, interquartile range, mean, and standard deviation of liver enzymes according to age group and sex.

Enzyme	Age group (years)							
	<1		1 - <5		5 - <10		10 - 11	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
ALT (U/L), n = 8,380	n = 166	n = 76	n = 1308	n = 798	n = 2333	n = 2072	n = 854	n = 773
Median (IQR) ^{a, b}	17.0 (9.6)	15.7 (7.3)	15.0 (5.9)	13.6 (4.7) ^c	15.0 (6.1)	14.0 (5.0) ^c	15.3 (7.7)	13.8 (5.7) ^c
Mean (SD)	19.0 (9.1)	17.0 (6.8)	15.5 (5.0)	14.1 (4.3)	16.0 (6.3)	14.7 (4.7)	17.0 (6.9)	14.5 (5.1)
AST (U/L), n = 10,060	n = 241	n = 154	n = 1627	n = 1523	n = 2461	n = 2391	n = 863	n = 800
Median (IQR) ^{a, b}	33.7 (19.7)	33.9 (22.3)	32.6 (9.4)	31.2 (9.0) ^c	26.0 (7.4)	25.0 (7.0) ^c	22.5 (6.0)	21.0 (6.1) ^c
Mean (SD)	34.5 (14.1)	33.4 (15.2)	33.6 (8.5)	32.0 (7.7)	26.6 (6.0)	25.6 (5.5)	23.2 (5.4)	21.4 (5.3)
ALP (U/L), n = 3,006	n = 82	n = 64	n = 467	n = 325	n = 730	n = 719	n = 314	n = 305
Median (IQR) ^{a, b}	172.5 (241.0)	213.0 (217.0)	222.0 (73.0)	217.0 (58.0)	227.5 (74.0)	234.0 (73.0) ^c	242.5 (90.0)	253.0 (92.5)
Mean (SD)	198.5 (132.3)	223.8 (126.7)	225.7 (62.3)	225.6 (85.8)	235.4 (58.2)	243.2 (60.8)	255.6 (75.1)	260.6 (78.9)
GGT (U/L), n = 2,326	n = 68	n = 45	n = 357	n = 200	n = 642	n = 532	n = 267	n = 215
Median (IQR) ^{a, b}	24.5 (24.0)	19.0 (14.0)	12.0 (6.0)	13.0 (5.0)	14.0 (7.0)	14.0 (6.0)	15.0 (7.0)	14.0 (5.0) ^c
Mean (SD)	34.4 (41.6)	32.3 (49.9)	14.7 (9.8)	15.0 (13.4)	15.2 (5.9)	15.0 (8.3)	17.5 (8.4)	14.7 (4.5)

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyl transferase; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; n, number of individuals range.

^aStatistically significant ($p < 0.05$) for boys among age categories. Kruskal-Wallis test.

^bStatistically significant ($p < 0.05$) for girls among age categories. Kruskal-Wallis test.

^cStatistically significant ($p < 0.05$) between sexes of the same age category. Mann-Whitney U-test.

Table 2. Percentiles for liver enzymes in boys according to age group.

Enzyme (IU/L)	Percentiles in boys									
	2.5	5	10	25	50	75	85	90	95	97.5
<1 year										
ALT	6.9	8.0	10.0	13.1	17.0	22.7	26.0	28.0	36.0	47.0
AST	15.0	16.0	17.2	23.0	33.7	42.7	46.2	53.3	60.2	66.1
ALP	41.1	45.3	55.0	79.7	172.5	320.7	349.1	384.6	450.8	464.5
GGT	8.4	10.0	10.0	15.0	25.0	39.0	56.6	66.0	77.3	160.4
1 - <5 years										
ALT	8.0	9.0	10.2	12.1	15.0	18.0	20.0	21.0	24.0	28.0
AST	21.0	22.6	24.8	28	32.6	37.4	41	43.7	48.0	52.8
ALP	122.4	139.2	158.0	187.0	222.0	260.0	279.0	298.2	326.2	366.2
GGT	6.0	7.0	8.0	10.0	12.0	16.0	19.0	21.2	29.0	37.5
5 - <10 years										
ALT	8.0	9.0	10.0	12.0	15.0	18.1	21.0	23.1	27.0	31.9
AST	16.6	18.0	19.6	22.6	26.0	30.0	32.0	34.0	36.5	40.0
ALP	143.5	152.5	168.0	196.0	227.5	270.0	292.3	306.9	340.9	369.8
GGT	8.0	9.0	10.0	11.0	14.0	18.0	20.0	23.0	28.0	31.9
10 - 11 years										
ALT	8.0	9.0	10.0	12.2	15.3	19.9	22.9	26.0	30.6	35.1
AST	14.9	15.7	17.3	20.0	22.5	26.0	28.0	29.0	32.0	34.0
ALP	131.7	158.0	176.0	203.0	242.5	293.0	327.7	352.5	408	446.1
GGT	8.0	9.4	11.0	13.0	15.0	20.0	23.0	25.0	33.0	38.6

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyl transferase; IQR, interquartile range.

Table 3. Percentiles for liver enzymes in girls according to age group.

Enzyme (IU/L)	Percentiles in girls									
	2.5	5	10	25	50	75	85	90	95	97.5
<1 year										
ALT	6.8	7.8	10.0	12.7	15.7	20.0	23.4	26.3	30.0	36.6
AST	12.0	15.0	15.0	20.0	33.9	42.3	49.1	52.5	61.2	70.3
ALP	35.9	41.7	56.0	107.7	213.0	324.7	383.2	420.0	432.0	444.9
GGT	6.1	7.6	10.6	13.5	19.0	27.5	32.1	42.8	191.1	261.0
1 - <5 years										
ALT	7.0	8.0	9.2	11.4	13.6	16.1	18.0	19.0	21.0	24.0
AST	19.0	21.4	23.6	27.0	31.2	36.0	39.0	41.0	45.7	49.9
ALP	85.0	126.0	161.6	190.5	217.0	248.5	274.2	296.0	336.0	373.4
GGT	7.0	8.0	9.0	11.0	13.0	16.0	18.0	21.9	27.0	37.0
5 - <10 years										
ALT	7.7	9.0	10.0	12.0	14.0	17.0	18.9	20.0	23.1	26.2
AST	16.0	18.0	19.0	22.0	25.0	28.9	31.0	32.0	35.0	38.0
ALP	144.0	158.0	173.0	203.0	234.0	276.0	301.0	321.0	358.0	389.0
GGT	7.0	8.0	10.0	11.0	14.0	17.0	19.0	21.0	24.0	29.0
10 - 11 years										
ALT	7.5	8.0	9.1	11.0	13.8	16.7	19.0	21.1	24.4	27.1
AST	13.1	14.2	15.6	17.9	21.0	24.0	26.0	27.9	30.9	32.9
ALP	127.5	152.6	172.2	207.5	253.0	300.0	332.2	355.0	391.8	420.5
GGT	7.4	9.0	10.0	12.0	14.0	17.0	20.0	21.0	23.0	25.0

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyl transferase; IQR, interquartile range.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Median ALP (a) and ALT, AST and GGT (b) levels according to age group and sex. Medians with an asterisk differ significantly ($p < 0.05$) between sexes by the Mann-Whitney test.

Figure 2. Serum concentrations (97.5th percentile) of ALT, AST, ALP and GGT in boys and girls according to age category.

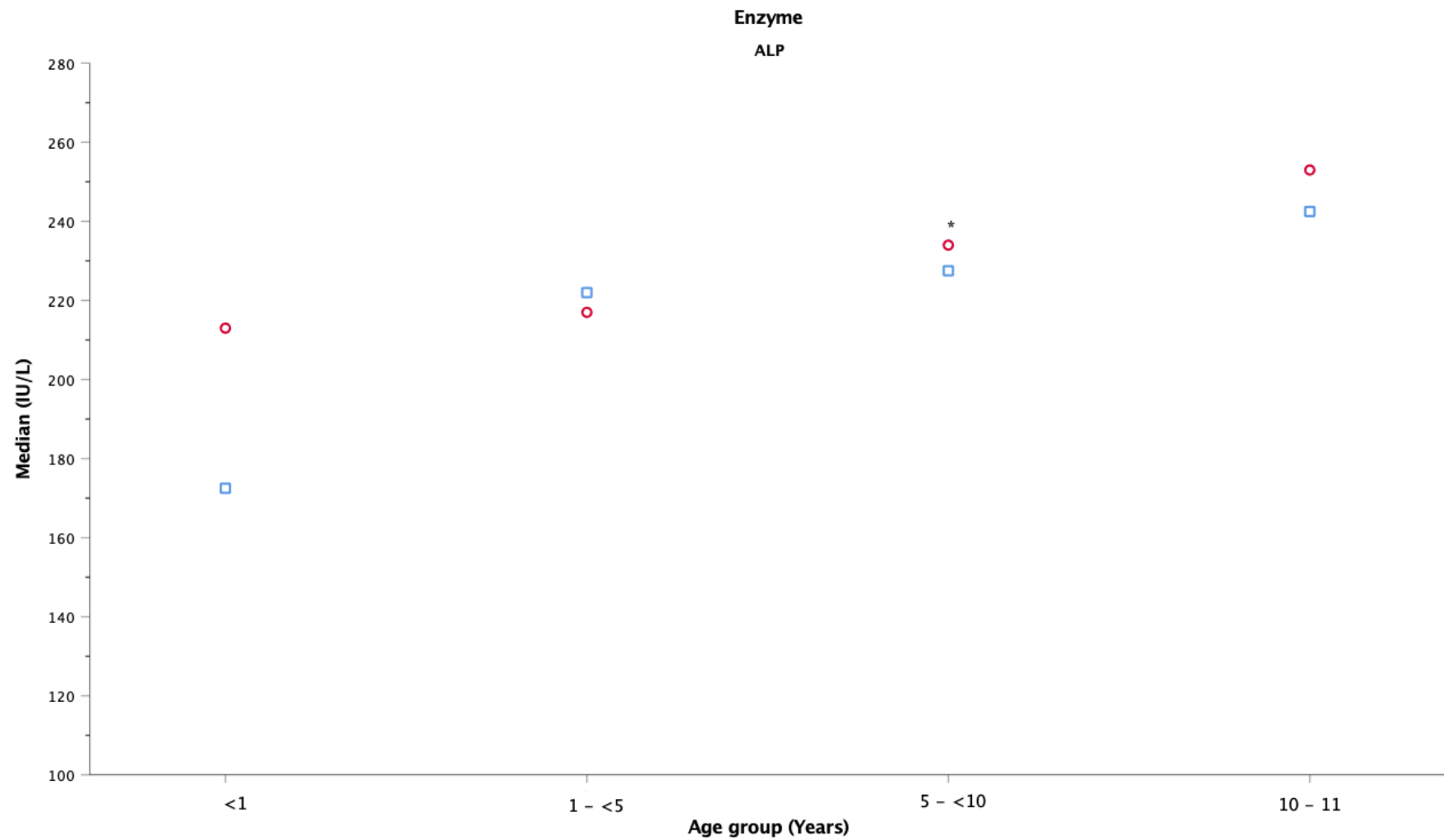


Figure 1a. Median ALP levels according to age group and sex. Medians with an asterisk differ significantly ($p < 0.05$) between sexes by the Mann-Whitney test.

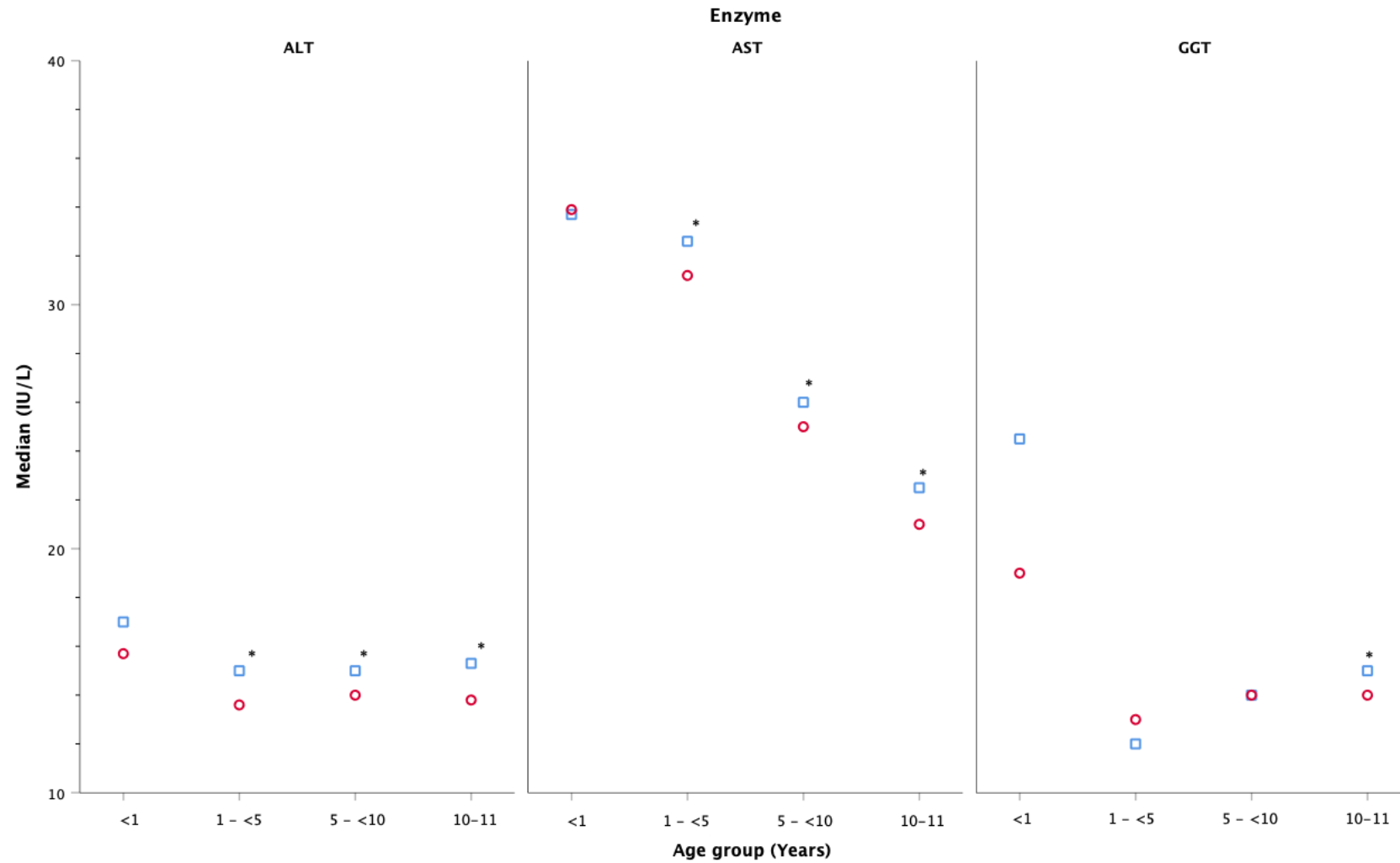


Figure 1b. Median ALT, AST and GGT levels according to age group and sex. Medians with an asterisk differ significantly ($p < 0.05$)

between sexes by the Mann-Whitney test.

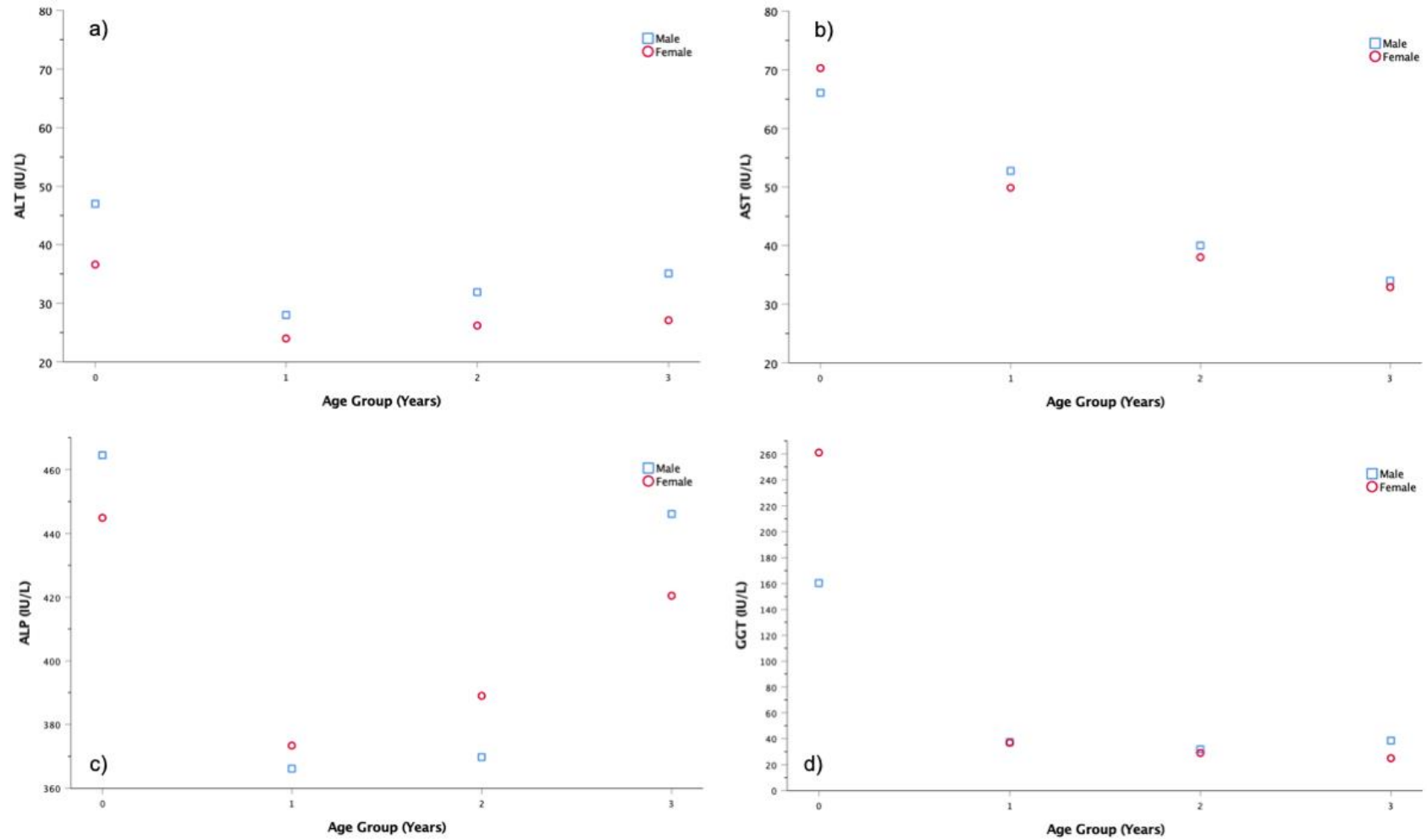


Figure 2. Serum concentrations (97.5th percentile) of ALT, AST, ALP and GGT in boys and girls according to age category.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Figure 1 Location of the DASA laboratory brands in Brazil.

Supplemental Figure 2 Flow chart illustrating the inclusion and exclusion criteria of participants in the study.

Supplemental Table 1.1 Total error analysis of the ALT, AST, ALP and GGT tests processed in the Roche automated analyzer, model cobas c 702 located in the technical operational area of the Exame brand (Distrito Federal), between the years 2017 and 2018.

Supplemental Table 1.2 Total error analysis of the ALT, AST, ALP and GGT tests processed in the Roche automated analyzer, model cobas c 702 located in the technical operational area of the Deuboni Auriemo brand (São Paulo), between the years 2017 and 2018.

Supplemental Table 2 Laboratory tests associated with serum hepatic markers. An increased and/or decreased correlated test value excludes the serum hepatic marker from the study.

Supplemental Table 3 Reference intervals currently used by DASA for laboratory tests associated with the tests studied.

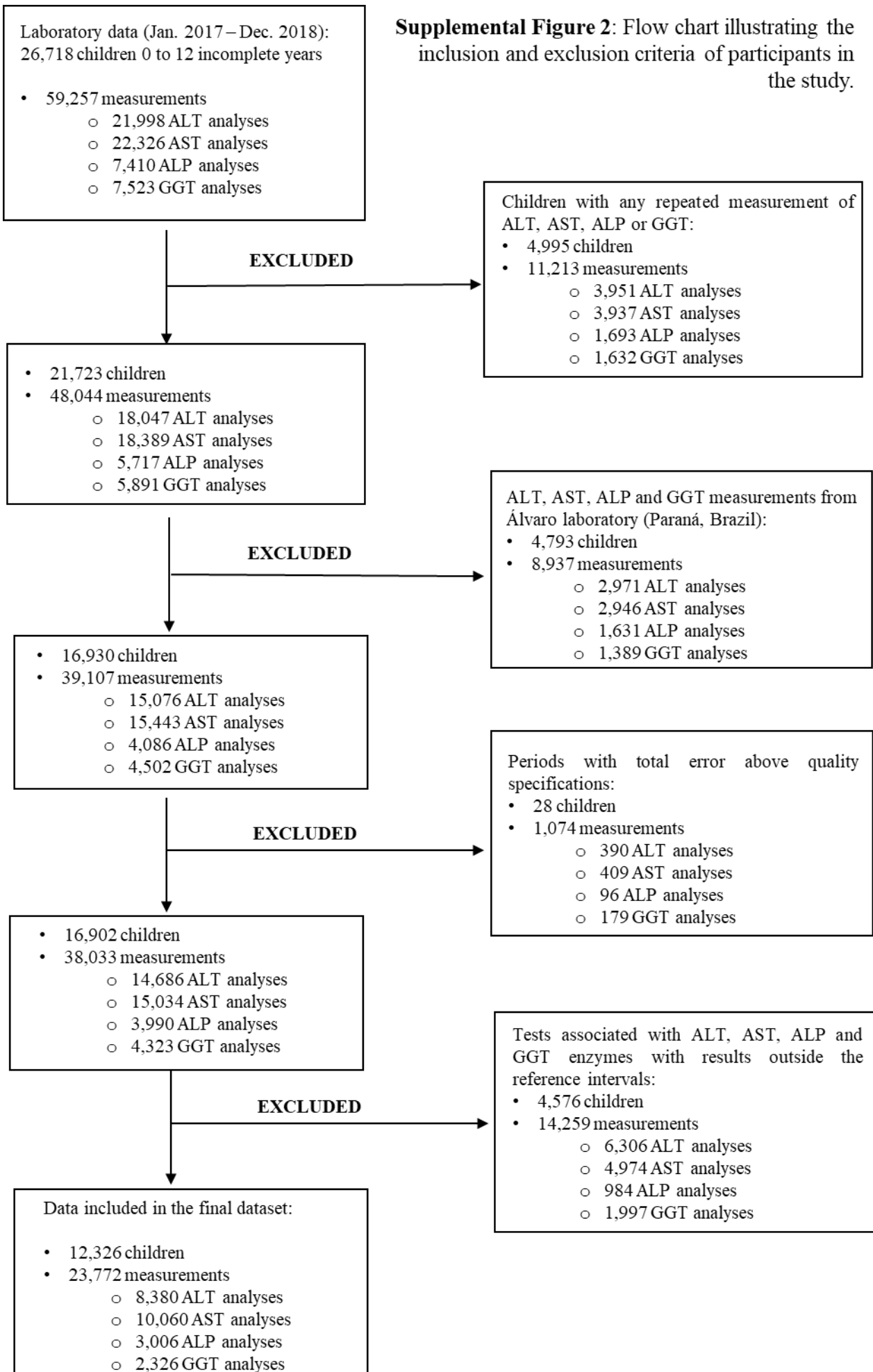
Supplemental Table 4 Main characteristics of the present study and of the studies of Colantonio et al. and Zierk et al. that established pediatric reference intervals for serum ALT, AST, ALP and GGT.

Supplemental Table 5 Comparison of the lower and upper limits of the reference interval for ALT, AST, ALP and GGT in different age groups (0-11 years) between the present study and the studies of Colantonio et al. and Zierk et al.

Supplemental Figure 1 - Location of the DASA laboratory brands in Brazil.



Supplemental Figure 2: Flow chart illustrating the inclusion and exclusion criteria of participants in the study.



Supplemental Table 1.1 Total error analysis of the ALT, AST, ALP and GGT tests processed in the Roche automated analyzer, model cobas c 702 located in the technical operational area of the Exame brand (Distrito Federal), between the years 2017 and 2018.

Exame - Roche c 702 Enzymes (U/L)	ControlLab systematic error				Systematic Error		Random error	Total error %	Referencial total error %
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	Mean	CV %	1,65*CV		
					January 2017				
ALT	1,248	2,533	1,357	1,7127	1,71	2,76	4,55	6,26	9,33
AST	-0,31	2,214	1,826	1,2439	1,24	2,91	4,80	6,04	13,48
ALP	-6,13	-7,18	-6,85	-6,72	6,72	3,38	5,57	12,29	13,44
GGT	-5,56	-5,2	-3,68	-4,813	4,81	2,25	3,71	8,53	8,32
					April 2017				
ALT	0,775	-2,11	0,112	-0,41	0,41	2,99	4,94	5,35	9,33
AST	-2,8	-1,47	-5,1	-3,12	3,12	2,98	4,91	8,04	13,48
ALP	0,765	-0,34	0,233	0,22	0,22	4,08	6,74	6,96	13,44
GGT	-6	-4,76	-2,55	-4,43	4,43	2,58	4,26	8,70	8,32
					July 2017				
ALT	-4,26	-1,34	-5,01	-3,53	3,53	2,78	4,58	8,12	9,33
AST	-5,16	-6,65	-8,48	-6,76	6,76	3,01	4,97	11,73	13,48
ALP	-0,83	0,091	-2,25	-1,00	1,00	3,76	6,20	7,20	13,44
GGT	3,988	2,297	3,136	3,14	3,14	2,19	3,61	6,75	8,32
					October 2017				
ALT	-8,45	-25,8	-10,8	-15,02	15,02	2,36	3,89	18,91	9,33
AST	-13,6	-30,5	-18,8	-20,95	20,95	3,33	5,49	26,44	13,48
ALP	-11	-31	-18,7	-20,25	20,25	3,46	5,71	25,96	13,44
GGT	1,997	-22,1	-4,91	-8,324	8,32	2,04	3,37	11,69	8,32
					January 2018				
ALT	1,248	2,533	1,357	1,7127	1,71	2,76	4,55	6,26	11,81
AST	-0,31	2,214	1,826	1,2439	1,24	2,91	4,80	6,04	12,51
ALP	-6,13	-7,18	-6,85	-6,72	6,72	3,38	5,57	12,29	12,48
GGT	-5,56	-5,2	-3,68	-4,813	4,81	2,25	3,71	8,53	9,52
					April 2018				
ALT	-2,39	-2,55	-2,33	-2,419	2,42	2,89	4,76	7,18	11,81
AST	-3,74	-3,34	-2,86	-3,32	3,32	3,18	5,25	8,57	12,51
ALP	-0,39	-1,3	-1,48	-1,06	1,06	3,33	5,50	6,56	12,48
GGT	5,127	3,551	6,383	5,02	5,02	2,17	3,58	8,60	9,52
					July 2018				
ALT	1,01	-1,23	-2,17	-0,799	0,80	2,99	4,93	5,73	11,81
AST	-1,61	11,79	-3,35	2,28	2,28	3,00	4,95	7,23	12,51
ALP	-8,75	-10	-8,9	-9,21	9,21	3,54	5,84	15,06	12,48
GGT	-1,18	-4,34	2,595	-0,97	0,97	2,21	3,64	4,62	9,52
					October 2018				
ALT	0,775	-4,37	0,877	-0,906	0,91	3,12	5,15	6,05	11,81
AST	-10,7	-6,32	-3,36	-6,799	6,80	2,87	4,73	11,53	12,51
ALP	-1,12	0,054	-0,28	-0,447	0,45	3,22	5,31	5,75	12,48
GGT	2,117	3,782	1,909	2,6026	2,60	1,83	3,03	5,63	9,52
					January 2019				
ALT	0,32	-0,23	-1,33	-0,413	0,41	2,53	4,18	4,59	11,81
AST	-6,22	-6,03	-4,55	-5,598	5,60	2,52	4,16	9,76	12,51
ALP	-5,48	1,996	-6,46	-3,313	3,31	2,56	4,23	7,54	12,48
GGT	-2,28	-0,56	2,994	0,049	0,05	1,44	2,37	2,42	9,52

Notes:

a) The total error is the sum of the systematic error and the random error. The systematic error was analyzed by external evaluation of the quality of ControlLab and the random error using the coefficient of variation (CV) of the Roche commercial internal control of each test.

b) The systematic error was analyzed every three months (January, April, July and October) and the random error monthly. The following definition was established for monthly analysis of the total error:

- ControlLab January: includes the systematic error in November, December, and January.
- ControlLab April: includes the systematic error in February, March, and April.
- ControlLab July: includes the systematic error in May, June, and July.
- ControlLab October: includes the systematic error in August, September, and October.

Thus, the total error was analyzed as follows:

- Total January error: includes the mean systematic error and mean CV of November, December, and January.
- Total April error: includes the mean systematic error and mean CV of February, March, and April.
- Total July error: includes the mean systematic error and mean CV of May, June, and July.
- Total October error: includes the mean systematic error and mean CV of August, September, and October.

c) Total error values highlighted in bold are outside the total referential error specified by the laboratory and data related to the period in question were therefore excluded from the study.

d) Total referential error: historical mean of the laboratory.

Reference: Westgard JO, Westgard SA. Total analytic error from concept to application. CLN. 2013: 1-5

Supplemental Table 1.2 Total error analysis of the ALT, AST, ALP and GGT tests processed in the Roche automated analyzer, model cobas c 702 located in the technical operational area of the Deuboni Auriemo brand (São Paulo), between the years 2017 and 2018.

Enzymes (U/L)	ControlLab systematic error				Systematic Error		Random error	Total error %	Referencial total error %
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	Mean	CV %	1,65*CV		
Delboni Auriemo - Roche c 702									
					April 2017				
ALT	-5,47	-3,85	-2,82	-4,048	4,05	3,02	4,98	9,03	13,57
AST	-9,96	-5,85	-6,03	-7,28	7,28	3,10	5,12	12,40	10,30
ALP	-5,49	-3,67	-4,94	-4,70	4,70	2,36	3,89	8,59	9,34
GGT	-2,87	-2,21	-4,76	-3,28	3,28	3,35	5,53	8,82	9,10
					July 2017				
ALT	-3,81	-4,09	-5,01	-4,30	4,30	2,81	4,63	8,93	13,57
AST	-6,25	-6,2	-7,05	-6,50	6,50	3,04	5,02	11,52	10,3
ALP	1,739	2,979	2,44	2,39	2,39	2,55	4,20	6,59	9,34
GGT	-2,4	-3,16	-2,71	-2,76	2,76	3,24	5,34	8,09	9,10
					October 2017				
ALT	-7,02	-4,24	-0,64	-3,967	3,97	2,70	4,45	8,41	13,57
AST	-5,28	-0,07	2,663	-0,893	0,89	3,12	5,14	6,04	10,30
ALP	-6,32	-4,07	-4,23	-4,875	4,87	2,06	3,40	8,27	9,34
GGT	1,702	0,537	1,54	1,2599	1,26	5,04	8,32	9,58	9,10
					January 2018				
ALT	-7,07	-4,7	-6,62	-6,134	6,13	2,38	3,92	10,05	13,57
AST	-9,56	-2,58	-6,53	-6,224	6,22	2,69	4,44	10,67	10,30
ALP	0,241	0,454	-2,1	-0,47	0,47	2,07	3,41	3,88	9,34
GGT	1,865	-0,07	1,12	0,9711	0,97	2,42	3,99	4,96	9,10
					April 2018				
ALT	-2,39	5,356	6,977	3,3154	3,32	3,08	5,07	8,39	13,57
AST	-6,42	1,1	-0,15	-1,82	1,82	3,00	4,95	6,77	10,30
ALP	0,368	2,428	1,542	1,45	1,45	2,30	3,80	5,24	9,34
GGT	-2,42	1,387	1,82	0,26	0,26	2,75	4,54	4,80	9,10
					July 2018				
ALT	-0,67	-8,64	0	-3,11	3,11	2,42	3,99	7,10	13,57
AST	-2,69	-1,58	-4,83	-3,03	3,03	2,51	4,14	7,17	10,30
ALP	1,723	4,232	0,094	2,02	2,02	2,90	4,79	6,80	9,34
GGT	-0,53	-2,73	-0,14	-1,13	1,13	2,54	4,19	5,33	9,10
					October 2018				
ALT	-4,39	-6,19	-3,51	-4,698	4,70	2,33	3,84	8,53	13,57
AST	-1,19	-4,63	-4,2	-3,34	3,34	3,16	5,22	8,56	10,30
ALP	0,356	0,08	2,314	0,9168	0,92	2,68	4,41	5,33	9,34
GGT	6,673	4,395	3,41	4,8257	4,83	2,87	4,73	9,55	9,10
					January 2019				
ALT	-0,75	-4,76	-1,33	-2,281	2,28	2,89	4,77	7,06	13,57
AST	3,966	-0,84	3,219	2,1139	2,11	3,48	5,73	7,85	10,30
ALP	3,273	1,565	4,009	2,9489	2,95	2,45	4,04	6,99	9,34
GGT	1,18	1,478	10,02	4,2268	4,23	3,63	5,98	10,21	9,10

Notes:

a) Laboratory tests processed at Deuboni Auriemo (SP) started total error analysis in April 2017 since the cobas c 702 automated analyzer began operating in February 2017.

b) The total error is the sum of the systematic error and the random error. The systematic error was analyzed by external evaluation of the quality of ControlLab and the random error using the coefficient of variation (CV) of the Roche commercial internal control of each test.

c) The systematic error was analyzed every three months (January, April, July and Octobers) and the random error monthly. The following definition was established for monthly analysis of the total error:

- ControlLab January: includes the systematic error in November, December, and January.
- ControlLab April: includes the systematic error in February, March, and April.
- ControlLab July: includes the systematic error in May, June, and July.
- ControlLab October: includes the systematic error in August, September, and October.

Thus, the total error was analyzed as follows:

- Total January error: includes the mean systematic error and mean CV of November, December, and January.
- Total April error: includes the mean systematic error and mean CV of February, March, and April.
- Total July error: includes the mean systematic error and mean CV of May, June, and July.
- Total October error: includes the mean systematic error and mean CV of August, September, and October.

d) Total error values highlighted in bold are outside the total referential error specified by the laboratory and data related to the period in question were therefore excluded from the study.

e) Total referential error: historical mean of the laboratory.

Reference: Westgard JO, Westgard SA. Total analytic error from concept to application. CLN. 2013: 1-5

Supplemental Table 2 Laboratory tests associated with serum hepatic markers. An increased and/or decreased correlated test value excludes the serum hepatic marker from the study.

Laboratory tests associated with serum hepatic markers	Test value	Serum hepatic marker excluded from the study
Myoglobin ¹ , Creatine kinase ² , Aldolase, Lactate dehydrogenase ³ , Troponin I ⁴ , Creatine kinase-MB ² , Iron ^{5,8} , Ferritin ^{5,8}	Increased	ALT and AST
Creatinine ⁶ , Urea ⁷ , Estimated glomerular filtration rate ⁷ , Bilirubin ^{8,9} , C-reactive Protein ^{8,10}	Increased	ALT, AST, ALP and GGT
Amylase ¹¹ and Lipase ¹¹	Increased	ALT, AST and GGT
Epstein-Barr IgG ¹² , Epstein-Barr IgM ¹²	Increased (Reagent)	ALT and AST
25-Hydroxy vitamin D ¹³	Decreased	ALP
Parathyroid hormone ¹³	Decreased or increased	ALP
Albumin ¹⁴	Decreased	ALT, AST, ALP and GGT
Prothrombin time ^{8,15}	Decreased or increased	ALT, AST, ALP and GGT

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyltransferase.

References:

1. Isakov A, Shapira I, Burke M, Almog C. Serum myoglobin levels in patients with ischemic myocardial insult. *Arch Intern Med.* 1988;148(8):1762–5.
2. Panteghini M. Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes. *Clin Biochem.* 1988;21(4):211–8.
3. Vesell ES, Bearn AG. Variations in the lactic dehydrogenase of vertebrate erythrocytes. *J Gen Physiol.* 1962;45(9):553–65.
4. Martin A, Malhotra A, Sullivan B, Ramakrishna H. Troponin elevations in patients with chronic cardiovascular disease: An analysis of current evidence and significance. *Ann Card Anaesth.* 2016;19(2):321–7.

5. Salgia RJ, Brown K. Diagnosis and management of hereditary hemochromatosis. *Clin Liver Dis* [Internet]. 2015;19(1):187–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2014.09.011>
6. Prowle JR, Kolic I, Purdell-Lewis J, Taylor R, Pearse RM, Kirwan CJ. Serum creatinine changes associated with critical illness and detection of persistent renal dysfunction after AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(6):1015–23.
7. Lau WL, Vaziri ND. Urea, a true uremic toxin: The empire strikes back. *Clin Sci*. 2017;131(1):3–12.
8. Newsome PN, Cramb R, Davison SM, Dillon JF, Foulerton M, Godfrey EM, et al. Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut*. 2018;67(1):6–19.
9. McDaniel MJ. Hepatic Function Testing: The ABCs of the Liver Function Tests. *Physician Assist Clin*. 2019;4(3):541–50.
10. Mwaigwisya S, Assiri RAM, O’Grady J. Emerging commercial molecular tests for the diagnosis of bloodstream infection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(5):681–92.
11. Matsuno WC, Huang CJ, Garcia NM, Roy LC, Davis J. Amylase and lipase measurements in paediatric patients with traumatic pancreatic injuries. *Injury*. 2009;40(1):66–71.
12. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am Fam Physician*. 2004;70(7).
13. Siller AF, Whyte MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res*. 2018;33(2):362–4.
14. Barle H, Nyberg B, Essen P, Andersson K, McNurlan MA, Wernerman J, et al. The synthesis rates of total liver protein and plasma albumin determined simultaneously in vivo in humans. *Hepatology*. 1997;25(1):154–8.
15. Chen J, Phillips B, Chandler WL. Evaluation of prothrombin time and activated partial thromboplastin time mixing studies using an estimated factor correction method. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016;27(1):90–6.

Supplemental Table 3 Reference intervals currently used by DASA for laboratory tests associated with the tests studied.

Test	Reference interval	
	Female	Male
Alanine aminotransferase, IU/L	< 33.0	< 41.0
Albumin ¹ , g/dL	0 to 3d: 2.8 – 4.4 4d to 13y: 3.8 – 5.4	
Albumin/globulin ratio ¹ , g/dL	2.0 - 4.1	
Aldolase, U/L	≤ 7.6	
Alkaline phosphatase, IU/L	0 to 14d: 83 - 248 15d to 11m: 122 – 469 1 to 9y: 149 - 301 10 to 11y: 127 - 326	
Amylase, U/L	28 - 100	
Aspartate aminotransferase, IU/L	< 32.0	< 40.0
Total bilirubin, mg/dL	0d: < 5.8 1d: < 8.2 2 to 4d: < 11.7 5d to 11y: < 1.2	
Creatine kinase-MB, IU/L	< 25.0	
Creatinine, mg/dL	0 to 59d: 0.29 – 1.04 2 to 11m: 0.17 – 0.42 1 to 2y: 0.24 – 0.41 3 to 4y: 0.31 – 0.47 5 to 6y: 0.32 – 0.59 7 to 8y: 0.4 – 0.6 9 to 10y: 0.39 – 0.73 11y: 0.53 – 0.79	
Creatine phosphokinase, IU/L	33 - 211	32 - 294
C-reactive protein, mg/dL	< 0.1	
Estimated glomerular filtration rate	≥ 60 mL/min/1.73 m ²	
Epstein-Barr IgG, IU/mL	< 20.0	
Epstein-Barr IgM, IU/mL	< 20.0	
Ferritin, ng/mL	13 - 150	30 - 400
Gamma-glutamyltransferase, IU/L	6.0 - 52.0	10.0 - 71.0
Globulin ¹ , g/dL	2.0 – 4.1	

continued

Supplemental Table 3 Reference intervals currently used by DASA for laboratory tests associated with the tests studied.

Test	Reference interval	
	Female	Male
Iron, µg/dL	33 - 193	
Lactate dehydrogenase, IU/L	0 to 30d: 145 - 765	0 to 30d: 120 - 325
	1 to 11m: 190 - 420	1 to 11m: 170 - 450
	1 to 3y: 165 - 395	1 to 6y: 155 - 345
	4 to 6y: 135 - 345	7 to 9y: 145 - 300
	7 to 9y: 140 - 280	10 to 11y: 105 - 235
10 to 11y: 120 - 260		
Lipase, IU/L	25 - 58	
Myoglobin, ng/mL	15 - 65	28 - 72
Parathyroid hormone, pg/mL	15 - 65	
Prothrombin time – activity, %	70 - 100	
Total protein, g/dL	0 to 3y: 5.6 – 7.5	
	4 to 18y: 6.0 – 8.0	
Troponin I, ng/mL	< 0.16	
Urea, mg/dL	16.6 – 48.5	
25-Hydroxy vitamin D, ng/mL	> 20.0	

⁽¹⁾ As part of the Total Protein and Fractions test.

a) d, days; m, months; y, years.

b) Data are reported as conventional units. The following factors were used for conversion to SI units: albumin, 1 g/dL = 10 g/L; bilirubin, 1 mg/dL = 17.1 µmol/L; C-reactive protein, 1 mg/dL = 95.24 nmol/L; creatinine, 1 mg/dL = 88.4 µmol/L; ferritin, 1 ng/mL = 1 µg/L; globulin, 1 g/dL = 10 g/L; iron, 1 µg/dL = 0.179 µmol/L; myoglobin, 1 ng/mL = 0.0571 nmol/L; parathyroid hormone, 1 pg/mL = 0.105 pmol/L; total protein, 1 g/dL = 10 g/L; troponin I, 1 ng/mL = 1,000 ng/L; urea, 1 mg/dL = 0.357 nmol/L; vitamin D, 1 ng/mL = 2.5 nmol/L.

Supplemental Table 4 Main characteristics of the present study and of the studies of Colantonio et al. and Zierk et al. that established pediatric reference intervals for serum ALT, AST, ALP and GGT.

Study characteristics	Present study	Colantonio et al.	Zierk et al.
Year	2020	2012	2015
Country	Brazil	Canada	Germany
Population	Samples from apparently healthy outpatients	Samples collected from healthy children in the community older than 1 year; from apparently healthy neonates at a maternity ward, and outpatients older than 14 days and younger than 1 year.	Inpatients and outpatients, mixture of healthy and pathological samples from a German pediatric tertiary care center
Age (years)	0 – 11	0 – 18	0 – 18
Sample size	ALT: 8,380; AST: 10,060; ALP: 3,006; GGT: 2,326	ALT: 1,070; AST: 1,056; ALP: 1,029; GGT: 1,194.	ALT: 51,574; AST: 52,039; ALP: 63,270; GGT: 45,978
Exclusion criteria	More than one measurement of the same serum enzyme during the study period; results obtained with automated analyzers that produced a total error above the benchmark; laboratory tests associated with serum enzymes with results outside the reference intervals used.	Participants with a history of chronic illness or metabolic disease, acute disease in the previous month, or use of prescribed medication over the previous 2 weeks	None
Analytical platform	Cobas c 702	Architect c8000	Cobas Integra 800
Method	Indirect approach: discrete reference intervals from 0 to 11 years partitioned by sex using the 2.5 th to 97.5 th percentiles	Direct approach: discrete reference intervals from 0 to 18 years without partitioning by sex using the 2.5 th and 97.5 th percentiles	Indirect approach: continuous reference intervals from 0 to 6570 days partitioned by sex using the 2.5 th , 50 th and 97.5 th percentiles

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyltransferase.

Supplemental Table 5 Comparison of the lower and upper limits of the reference interval for ALT, AST, ALP and GGT in different age groups (0-11 years) between the present study and the studies of Colantonio et al. and Zierk et al.

ALT (IU/L)												
Age (years)	Male						Female					
	Present study		Colantonio et al.		Zierk et al.		Present study		Colantonio et al.		Zierk et al.	
	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI
0	6.9	47.0	5.0	33.0	7.0	55.0	6.8	36.6	5.0	33.0	6.0	55.0
1	8.0	28.0	9.0	25.0	7.0	50.0	7.0	24.0	9.0	25.0	7.0	49.0
2	8.0	28.0	9.0	25.0	8.0	40.0	7.0	24.0	9.0	25.0	8.0	40.0
3	8.0	28.0	9.0	25.0	9.0	33.0	7.0	24.0	9.0	25.0	9.0	32.0
4	8.0	28.0	9.0	25.0	4.0	27.0	7.0	24.0	9.0	25.0	9.0	28.0
5	8.0	31.9	9.0	25.0	5.0	24.0	7.7	26.2	9.0	25.0	9.0	25.0
6	8.0	31.9	9.0	25.0	6.0	24.0	7.7	26.2	9.0	25.0	9.0	24.0
7	8.0	31.9	9.0	25.0	9.0	25.0	7.7	26.2	9.0	25.0	9.0	25.0
8	8.0	31.9	9.0	25.0	9.0	26.0	7.7	26.2	9.0	25.0	9.0	25.0
9	8.0	31.9	9.0	25.0	9.0	27.0	7.7	26.2	9.0	25.0	9.0	25.0
10	8.0	35.1	9.0	25.0	8.0	29.0	7.5	27.1	9.0	25.0	9.0	25.0
11	8.0	35.1	9.0	25.0	8.0	30.0	7.5	27.1	9.0	25.0	8.0	25.0

AST (IU/L)												
Age (years)	Male						Female					
	Present study		Colantonio et al.		Zierk et al.		Present study		Colantonio et al.		Zierk et al.	
	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI
0	15.0	66.1	20.0	67.0	19.0	74.0	12.0	70.3	20.0	67.0	18.0	78.0
1	21.0	52.8	21.0	44.0	20.0	37.0	19.0	49.9	21.0	44.0	19.0	72.0
2	21.0	52.8	21.0	44.0	21.0	37.0	19.0	49.9	21.0	44.0	20.0	63.0
3	21.0	52.8	21.0	44.0	22.0	56.0	19.0	49.9	21.0	44.0	22.0	55.0
4	21.0	52.8	21.0	44.0	22.0	52.0	19.0	49.9	21.0	44.0	22.0	50.0
5	16.6	40.0	21.0	44.0	22.0	48.0	16.0	38.0	21.0	44.0	23.0	46.0
6	16.6	40.0	21.0	44.0	22.0	46.0	16.0	38.0	21.0	44.0	22.0	44.0
7	16.6	40.0	18.0	36.0	22.0	44.0	16.0	38.0	18.0	36.0	22.0	42.0
8	16.6	40.0	18.0	36.0	21.0	43.0	16.0	38.0	18.0	36.0	21.0	41.0
9	16.6	40.0	18.0	36.0	20.0	43.0	16.0	38.0	18.0	36.0	27.0	40.0
10	14.9	34.0	18.0	36.0	19.0	42.0	13.1	32.9	18.0	36.0	18.0	38.0
11	14.9	34.0	18.0	36.0	18.0	41.0	13.1	32.9	18.0	36.0	17.0	37.0

continued



Supplemental Table 5 Comparison of the lower and upper limits of the reference interval for ALT, AST, ALP and GGT in different age groups (0-11 years) between the present study and the studies of Colantonio et al. and Zierk et al. *continuation*

ALP (IU/L)												
Age (years)	Male						Female					
	Present study		Colantonio et al.		Zierk et al.		Present study		Colantonio et al.		Zierk et al.	
	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI
0	41.1	464.5	134.0	518.0	116.0	563.0	35.9	444.9	134.0	518.0	118.0	582.0
1	122.4	366.2	156.0	369.0	115.0	516.0	85.0	373.4	156.0	369.0	116.0	527.0
2	122.4	366.2	156.0	369.0	111.0	370.0	85.0	373.4	156.0	369.0	115.0	360.0
3	122.4	366.2	156.0	369.0	108.0	358.0	85.0	373.4	156.0	369.0	115.0	345.0
4	122.4	366.2	156.0	369.0	108.0	312.0	85.0	373.4	156.0	369.0	117.0	295.0
5	143.5	369.8	156.0	369.0	109.0	290.0	144.0	389.0	156.0	369.0	121.0	285.0
6	143.5	369.8	156.0	369.0	112.0	288.0	144.0	389.0	156.0	369.0	123.0	302.0
7	143.5	369.8	156.0	369.0	118.0	298.0	144.0	389.0	156.0	369.0	125.0	323.0
8	143.5	369.8	156.0	369.0	118.0	313.0	144.0	389.0	156.0	369.0	126.0	338.0
9	143.5	369.8	156.0	369.0	114.0	334.0	144.0	389.0	156.0	369.0	128.0	352.0
10	131.7	446.1	141.0	460.0	109.0	361.0	127.5	420.5	141.0	460.0	123.0	364.0
11	131.7	446.1	141.0	460.0	107.0	392.0	127.5	420.5	141.0	460.0	111.0	367.0

GGT (IU/L)												
Age (years)	Male						Female					
	Present study y		Colantonio et al.		Zierk et al.		Present study		Colantonio et al.		Zierk et al.	
	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI	LRI	URI
0	8.4	160.4	8.0	127.0	7.0	19.0	6.1	261.0	8.0	127.0	7.0	21.0
1	6.0	37.5	6.0	16.0	7.0	19.0	7.0	37.0	6.0	16.0	7.0	21.0
2	6.0	37.5	6.0	16.0	7.0	19.0	7.0	37.0	6.0	16.0	7.0	21.0
3	6.0	37.5	6.0	16.0	8.0	19.0	7.0	37.0	6.0	16.0	8.0	21.0
4	6.0	37.5	6.0	16.0	8.0	19.0	7.0	37.0	6.0	16.0	8.0	20.0
5	8.0	31.9	6.0	16.0	8.0	19.0	7.0	29.0	6.0	16.0	9.0	20.0
6	8.0	31.9	6.0	16.0	9.0	19.0	7.0	29.0	6.0	16.0	9.0	20.0
7	8.0	31.9	6.0	16.0	9.0	19.0	7.0	29.0	6.0	16.0	9.0	20.0
8	8.0	31.9	6.0	16.0	9.0	21.0	7.0	29.0	6.0	16.0	10.0	20.0
9	8.0	31.9	6.0	16.0	10.0	21.0	7.0	29.0	6.0	16.0	10.0	21.0
10	8.0	38.6	6.0	16.0	10.0	22.0	7.4	25.0	6.0	16.0	10.0	21.0
11	8.0	38.6	7.0	21.0	10.0	23.0	7.4	25.0	7.0	21.0	9.0	21.0

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyl transferase; LRI, lower limit of the reference interval; URI, upper limit of the reference interval.

APÊNDICE G – Submissão do artigo científico à revista Clinical Chemistry

 Clinical Chemistry Home Author Review

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Clinical Chemistry

Manuscript ID

ClinChem-2021-0146

Title

Reference intervals for liver serum markers in Brazilian children obtained by an indirect method

Authors

Müller, Ketrin

Prado, Maria

Mastroeni, Marco

Franca, Paulo

Date Submitted

24-Mar-2021

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2021. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

APÊNDICE H – Autorização para cópias da dissertação

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Ketrin Goetz Müller

RG: 4504113

Título da Dissertação: **Intervalos de referência por método indireto para marcadores séricos hepáticos em crianças brasileiras.**

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 12 de abril de 2021.



Assinatura do aluno