



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

***La definizione dell'errore analitico nel Sistema di Qualità del servizio
di Patologia clinica dell'Ospedale di San Gavino Monreale
(Asl Medio Campidano)***

***Defining the analytical error within the Quality System of the Clinical
Pathology service in the hospital of San Gavino Monreale
(Local Health Unit of Medio Campidano)***

Tesi di Laurea
Magistrale di:
Marina Nonnis

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Elisabetta Damiani
Correlatore:
Dr. Francesco B. Ronchi

Sessione: Febbraio 2023
Anno Accademico: 2021/2022

Indice

Capitolo 1	4
Introduzione e Scopo della Tesi	4
1.1 <i>Nascita ed evoluzione del concetto di controllo di qualità</i>	5
1.2 <i>Applicazione ed evoluzione del concetto di controllo di qualità</i>	9
1.3 <i>Gli attori della Qualità</i>	11
1.4 <i>La definizione di norma</i>	13
1.5 <i>Norme ISO: la nuova Norma ISO 9001:2015</i>	14
1.6 <i>L'approccio per processi: PDCA e Risk Based Thinking</i>	16
1.7 <i>Il Risk Based Thinking</i>	21
Capitolo 2	24
2.1 <i>Il controllo di qualità e gli strumenti della qualità</i>	24
2.2 <i>Filosofia e scopo del Controllo di Qualità</i>	26
2.3 <i>Elementi di statistica di base: la distribuzione di frequenza dei dati</i>	28
2.4 <i>Creazione ed utilizzo delle carte di Levey-Jennings</i>	30
2.5 <i>Le regole di controllo: Westgard Rules</i>	32
2.6 <i>Precisione e accuratezza</i>	34
2.7 <i>L'errore totale</i>	35
2.8 <i>Errori che influenzano l'interpretazione dei risultati</i>	36
2.9 <i>Definire la qualità richiesta: i traguardi analitici o specifiche di qualità</i>	37
2.10 <i>Differenza Critica: l'importanza del trend nel test di Laboratorio</i>	42
2.11 <i>Indice di Individualità e valori di riferimento</i>	43
Capitolo 3	45
3.1 <i>La creatinina sierica e GFR stimato: aspetti fisiologici, tecnici e misura</i>	45

<i>3.2 Ruolo della creatinina e la valutazione dell'eGFR (estimated Glomerular Filtration Rate) nell'analisi del danno renale precoce.....</i>	<i>48</i>
Materiali e Metodi.....	51
<i>3.3 Creatinina standardizzata e la misura della Variabilità Analitica</i>	<i>51</i>
Risultati.....	57
<i>3.4 Reference Change Value ed eGFR.....</i>	<i>57</i>
Conclusioni	61
Bibliografia	63

Capitolo 1

Introduzione e Scopo della Tesi

Con il termine qualità, e in particolar modo con quello di qualità analitica all'interno di un laboratorio clinico, ci si riferisce a tutti gli strumenti e metodi analitici efficienti, atti a tenere sotto stretto controllo la qualità delle attività e delle prestazioni svolte in un Laboratorio. A tal proposito occorre dunque realizzare un sistema che possa valutare, identificare e definire la qualità di un dato analitico per mezzo della raccolta, dell'elaborazione e interpretazione di dati quantitativi e misurabili. Ecco che da questa premessa, si potrebbero definire gli obiettivi principali della qualità all'interno di un Laboratorio clinico ovvero: assicurarsi che le necessità di tutti i pazienti, inglobando anche il personale medico e degli altri utenti, vengano soddisfatte attraverso la messa in essere di prestazioni di alta qualità; adottare un approccio proiettato verso la formazione e l'aggiornamento continuo di tutto il personale; prefiggersi un miglioramento continuo e costante al fine di ottenere un dato analitico che risulti quanto più affidabile possibile e che possa avere un'unica interpretazione globale tra i diversi laboratori.

Inoltre, nell'ultimo ventennio si è ottenuto un miglioramento delle prestazioni dei dati analitici attraverso l'ausilio di tecnologie avanzate, prima tra tutte l'automatizzazione degli strumenti, così da ridurre al minimo l'errore umano e l'utilizzo di sistemi informatici i quali hanno permesso di snellire ed accelerare la produzione del dato analitico.

Lo scopo quindi della tesi è quello di illustrare come un Laboratorio accreditato, come è stato quello di San Gavino M.le sino a pochi anni fa e che prospetta di riaccredinarsi secondo il nuovo standard ISO 9001:2015, sia in grado di soddisfare sia i requisiti tecnici che quelli del sistema di gestione i quali risultano fondamentali per offrire risultati accurati e tecnicamente validi. Ecco che dunque, la figura di un responsabile di Medicina di Laboratorio debba essere capace di interpretare e utilizzare i metodi e gli strumenti messi a disposizione dal

laboratorio clinico, attraverso l'utilizzo di controlli di qualità esterni e interni, al fine dunque di non perdere di vista la qualità non solo delle attività svolte in laboratorio ma anche delle prestazioni che da esso vengono erogate. Il cosiddetto "miglioramento continuo della qualità analitica" riveste un ruolo fondamentale nel far rispettare le norme di buona pratica di laboratorio, le quali coinvolgono sia la fase pre-analitica, quella post-analitica e quella post-post analitica che è cruciale nell'interpretazione del dato analitico di Laboratorio. Ma perché è determinante il risultato di laboratorio? Come affermato anche da M. Plebani (Presidente della Federazione Italiana Società di Medicina di Laboratorio – FISMELAB dal 2009) e Barletta G. nel libro "La riorganizzazione dei laboratori clinici: l'obiettivo è il valore per il paziente" l'80% delle decisioni, delle formulazioni di diagnosi, prognosi e terapie da parte dei clinici deriva dal dato fornito in laboratorio. Da questa premessa sull'importanza della qualità, accuratezza e precisione del dato analitico nasce anche la volontà all'interno dell'Ospedale di San Gavino Monreale, di indicare nel referto finale, la misura dell' eGFR ovvero l'**Estimated Glomerular Filtration Rate** allo scopo di aiutare il clinico nell'individuare precocemente l'insufficienza renale sui pazienti a rischio, poiché il dosaggio della creatininemia non è in grado di individuare, da solo, lo stadio funzionale della malattia cronica renale in particolar modo nei primi stadi della malattia. Per dar prova di quanto sopra riportato, il Laboratorio ha raccolto per un anno i dati di pazienti potenzialmente a rischio e ha dimostrato come l'indicazione dell'eGFR sia stato cruciale nell'individuazione precoce di insufficienza renale cronica.

1.1 Nascita ed evoluzione del concetto di controllo di qualità

Con l'avvento della Rivoluzione Industriale e con la nascita delle prime industrie, il concetto di qualità inizia ad assumere un significato più "moderno". È in questo momento che "qualità" diventa "controllo" ed il motivo è molto semplice.

Il quadro industriale e sociale di questa epoca è incentrato prevalentemente su un modello produttivo che mira unicamente alla quantità: è quindi necessario sottolineare come, il concetto di controllo di qualità in questo momento storico, venga percepito come un costo e si focalizzi esclusivamente come controllo finale sul prodotto, al fine di certificarne e attestarne la sua idoneità all'uso.

Ma un contesto produttivo basato esclusivamente sul controllo finale del prodotto comincia a divenire economicamente proibitivo, sia per il numero di pezzi prodotti, sia e soprattutto, per il mancato intervento di correzione sulla catena produttiva di difetti, che comporta un notevole dispendio in termini di risorse economiche, legati da una parte agli innumerevoli scarti di prodotto, e dall'altra al maggior incremento di risorse umane. Ecco dunque che la qualità non è e non può essere più quantità. In Occidente, grazie anche agli insegnamenti dell'Oriente, si mette in atto una gestione della qualità che non ignora più le esigenze del cliente, ma che attraverso l'aiuto dell'innovazione si preoccupa di migliorarsi quotidianamente. Nel 1924 Walter Shewhart¹ sviluppa le omonime carte di controllo presso la Western Electric e i Bell Laboratories. Queste carte di controllo permettono di valutare la rispondenza, l'aderenza e la compliance dei prodotti industriali a ben precise specifiche di produzione prestabilite mediante misure sul prodotto finale, impiegando semplici calcoli statistici. Il lavoro di Shewhart è accompagnato e completato da quello di due suoi collaboratori, Harold Dodge e Harry Romig, che nel 1929 misero in piedi un sistema per le ispezioni campionarie. Grazie a questo innovativo approccio alla produzione, si comincia ad avvertire la necessità di ripartire il sistema dei controlli più a monte rispetto al prodotto finito. Questo approccio consente di separare il materiale conforme da quello non conforme in ciascuna delle fasi di lavorazione, dall'acquisto delle materie prime fino all'ottenimento del prodotto finito, e individuare delle carenze nel processo produttivo tramite l'analisi dei difetti che si presentano in maniera ripetuta.

Fino allo scoppio della Seconda Guerra Mondiale però, le tecniche di controllo ideate da Shewhart e collaboratori sono state ignorate dal mondo industriale americano. La filosofia che guidava la produzione a quell'epoca era del massimo profitto che identificava nella qualità un costo, attribuendole un ruolo di secondo piano o peggio, un ostacolo al profitto a breve termine.

Nel 1940, con lo scoppio della Seconda Guerra Mondiale e la corsa agli armamenti, la filosofia del Controllo di Qualità entra prepotentemente nei processi produttivi dell'industria bellica statunitense. Il Dipartimento della Difesa americano chiamò Harold Dodge a presiedere un comitato tecnico per l'applicazione dei metodi statistici di controllo di qualità dei prodotti destinati all'industria bellica.

Per la prima volta furono introdotti i controlli statistici e i controlli di qualità, quali carte di controllo, piani di campionamento, programmazione degli esperimenti, che entrarono a far parte delle clausole dei contratti per le forniture militari. Questo fatto divenne uno dei motivi del successo dell'industria degli armamenti statunitensi sul mercato.

Di questo comitato faceva parte anche lo statistico Edward Deming, il quale a partire dal 1942 tenne negli Stati Uniti una serie di corsi (convegni) sul controllo di qualità. A partire dal 1946 il Dottor Deming venne inviato in Giappone durante la ricostruzione del paese nipponico dallo stesso Dipartimento della Difesa dove tenne importanti e seguite conferenze. Su suggerimento e invito dello stesso Deming, a queste conferenze presero parte non solo gli statistici ma anche gli imprenditori e gli industriali.

I colossi industriali americani non si dimostrarono altrettanto sensibili alle indicazioni degli studiosi della Qualità. Ponendo ancora una volta come target l'incremento della produzione e rimanendo ciechi ai mutamenti in corso nel mercato: la domanda stava pareggiando l'offerta e una parte della produzione non sarebbe stata collocata interamente nel mercato.

I giapponesi, affascinati, applicarono con entusiasmo le tecniche di lavoro raccomandate da Deming durante le sue conferenze nel 1950 e grazie al robusto contributo di matematici e statistici si passò dal controllo

statistico di qualità e dal campionamento, ai concetti e alla prassi (all'applicazione) della qualità totale. Questo approccio consentì la riorganizzazione e il miglioramento dei parametri produttivi con un'ottica particolare al contenimento degli sprechi.

Gli insegnamenti di Deming consentirono la rinascita del Giappone e l'affermazione dell'industria e della tecnologia nipponica a livello mondiale.

Il decennio 1970-1980 fu di fondamentale importanza per il Giappone, segnando una svolta epocale nell'applicazione dei concetti di qualità alla produzione industriale.

Sulla spinta delle teorie elaborate nel dopoguerra dagli americani Juran e Deming in particolare, avvenne il passaggio ad un vero e proprio sistema organizzato, il cui obiettivo era la qualità totale che dovesse inglobare l'azienda nella sua interezza. L'obiettivo è perseguito mediante la motivazione e il coinvolgimento del personale, ad un controllo step by step del processo produttivo riducendo così i costi di produzione causati da scarti e rilavorazioni e alla creazione di un sistema qualità che potesse sviluppare le potenzialità dell'azienda ponendola in una posizione altamente concorrenziale sul mercato.

Solo in un secondo momento, pressata dalle mutate richieste del mercato, l'industria americana avvertì l'esigenza di intraprendere la strada della qualità nei processi produttivi. Lo stesso Deming mise in luce in una serie di conferenze e nei suoi libri le gravi carenze e i ritardi del sistema produttivo degli Stati Uniti, elencati nei '14 punti' i quali ebbero un'importanza cruciale sui processi di sviluppo industriale americano². Promotore della qualità totale, Deming venne affiancato dall'operato di Juran, Feigenbaum e Crosby, autori tra l'altro delle opere più qualificate in tema di qualità, i quali influirono grandemente con la loro attività al rilancio industriale degli Stati Uniti durante gli ultimi decenni del Novecento.

Come accennato prima, la qualità non è di facile definizione. Riportiamo alcune delle più conosciute definizioni di qualità secondo alcuni degli autori sopra citati:

– Juran: la qualità va intesa come “fitness for use” (idoneità per l’impiego previsto). Secondo la sua definizione, e fatta propria dai giapponesi, la qualità di un prodotto/servizio va intesa come “soddisfazione dei clienti”³.

– Crosby: la qualità è definita come “conformità ai requisiti degli utilizzatori o dei clienti”. Questa definizione racchiude inoltre il rapporto che sussiste tra fornitori e clienti che sono alla base degli scambi commerciali. Questa definizione può essere estesa ai rapporti che legano i laboratori clinici e i destinatari del servizio, siano essi medici, pazienti o un reparto o un dipartimento all’interno dello stesso ospedale.

– Feingebaum: secondo il quale la qualità “è un’etica”, “è l’opinione del cliente”.

1.2 Applicazione ed evoluzione del concetto di controllo di qualità

L’applicazione del concetto di qualità, di controllo di qualità e della qualità totale dai processi industriali propriamente detti ai laboratori clinici, è storia recente. I primi studi volti a valutare la comparabilità dei risultati di analisi eseguite in laboratori differenti le dobbiamo a Belk e Sunderman⁴ e risalgono al 1974. Mentre la rivoluzionaria applicazione delle tecniche di controllo statistico di qualità alle analisi chimico-cliniche le dobbiamo all’intuizione di Levey e Jennings del 1950⁵, principio base sul quale poggiano tutti i sistemi di controlli (di qualità) dei moderni laboratori.

Gli insegnamenti della scuola americana della qualità, come abbiamo visto, fecero presa in maniera profonda e radicata sulla cultura industriale. È grazie alla ‘scuola giapponese della qualità’, il cui padre è universalmente riconosciuto essere Genichi Taguchi, che viene

introdotto il controllo qualitativo a tutta la vita del prodotto affermando la nascita del concetto della Qualità Totale.

Tale concetto venne esplicito mediante Total Quality Management (TQM), il quale prevede il coinvolgimento dell'intero sistema aziendale nella cultura della qualità divenendo un fattore chiave per la competitività e il miglioramento continuo dell'azienda, e mediante il Total Quality Control (TQC) cioè l'estensione del controllo qualità a tutti i processi aziendali grazie anche al deciso apporto dell'intero management aziendale. Gli anni '80 del Novecento segnarono il passaggio dal controllo di qualità al concetto di Sistema Qualità come quell'insieme di strutture organizzative, responsabilità, procedure, processi e risorse necessari a definire e conseguire gli obiettivi di qualità prefissati. Questo permise di porre le basi di un sistema che avesse delle forti sinergie ed un'ottica centrale verso il cliente, divenendo esso stesso parte integrante del sistema produttivo. Questo approccio definisce la nascita del Sistema Gestione Qualità (SGQ) e definisce l'importanza di porre al centro del processo produttivo la qualità, recuperando i costi della "non qualità", incrementando i profitti per espandersi verso nuovi mercati. La American Society for Quality (ASQ) e la American Society for Quality Control (ASQC), ha definito la qualità come "l'insieme delle caratteristiche e delle fattezze di un prodotto/servizio che portano al soddisfacimento di bisogni", i quali possono essere manifesti o impliciti. Secondo John O. Westgard, una delle più importanti e autorevoli personalità nel controllo di qualità per i laboratori di chimica clinica, i requisiti di qualità per un laboratorio sono "l'insieme delle caratteristiche che riguardano la loro capacità di soddisfare i clienti [...]"; e da lui definite come "le conformità agli standard o alle specifiche stabilite"⁶, definendo ed elencando in tal senso 17 requisiti suscettibili di misura, relativi ai processi inerenti a un laboratorio. Una definizione del controllo di qualità che concerne i laboratori clinici fatta propria dal Laboratorio Unico Logico (LUL) del Presidio Ospedaliero Nostra Signora di Bonaria (a San Gavino Monreale (VS)) può essere così precisata: è un processo statistico utilizzato per

monitorare e valutare i processi analitici che producono risultati di pazienti. Nello specifico, il LUL definisce la propria Qualità attraverso due specifici modelli:

1. Tenuta sotto controllo delle attività e dei processi attraverso appropriati indicatori quantitativi.
2. Analisi dei dati per il perseguimento del miglioramento continuo.

Tutto ciò ci conduce alla definizione della qualità di un prodotto e di un servizio erogato quale frutto del coinvolgimento di tutta l'azienda nel raggiungimento dell'obiettivo (*mission*) che si raggiunge non solo con il coinvolgimento del management aziendale ma con il coinvolgimento e la mobilitazione dei dipendenti e collaboratori e la riduzione degli sprechi in un'ottica di ottimizzazione degli sforzi nell'ottica di un sistema gestionale che controlli tutti i processi aziendali (= Gestione per processi) e non soltanto quelli direttamente connessi con la produzione, orientata verso il cliente attraverso il soddisfacimento di requisiti da lui espressi o inespressi (*Customer Satisfaction*).

1.3 Gli attori della Qualità

Per poter fornire un risultato o un prodotto di qualità, sia nell'ambito della Medicina di Laboratorio, che di qualsiasi altro processo produttivo, è necessario che il sistema aderisca a delle specifiche e ben precise regole di produzione. Per normare i diversi processi produttivi sono stati costituiti, da enti e/o organizzazioni internazionali, degli standard specifici la cui conformità a delle specifiche di un prodotto possano essere valide sia su scala nazionale, che internazionale ed europea.

Con l'acronimo **ISO** si identifica l'Organizzazione Internazionale per la Normazione (International Organization for Standardization), il quale rappresenta il più importante organismo che si occupa di definire le norme tecniche relative ai processi in ambito aziendale su scala internazionale stabilendo dunque, quali siano le norme da rispettare per mantenere alta la qualità.

Publicato per la prima volta nel 1987 dall' ISO Technical Committee 176, lo Standard ISO 9001 è universalmente riconosciuto come un quadro di riferimento unico nel suo genere ed è sicuramente la norma più diffusa a livello globale e più applicata nel mondo, con oltre un milione di aziende e organizzazioni certificate in oltre 170 paesi.

Oggi, ISO realizza, certifica e monitora la standardizzazione dei processi gestionali delle aziende. Inoltre, rapportandosi e lavorando in collaborazione con le istituzioni e i governi locali, ha il compito di favorire che gli standard diventino successivamente leggi attraverso una serie di accordi e trattati internazionali.

Le norme e gli standard ISO sono recepiti, armonizzati ed adeguati a livello europeo dal **CEN**, Comitato Europeo di Normazione (*European Committee for Standardization; Comité européen de normalisation*), fondato nel 1961.

Gli standard e le norme europee emanati dal CEN sono armonizzati, adattati e recepiti dalle Organizzazioni nazionali dei singoli Paesi membri che li accolgono. In Italia, l'Organizzazione che armonizza e diffonde le norme EN/ISO è l'**UNI**, Ente Nazionale Italiano di Unificazione, nato per le esigenze di standardizzazione dell'allora industria meccanica. Fondata nel 1921, l'UNI "è un'associazione privata senza scopo di lucro [...] riconosciuta dallo Stato Italiano e dall'Unione Europea, che studia, elabora, approva e pubblica le norme tecniche volontarie - le cosiddette "norme UNI" - in tutti i settori industriali, commerciali e del terziario (tranne in quelli elettrico ed elettrotecnico). Le principali tipologie di soci UNI sono imprese, professionisti, associazioni, enti pubblici, centri di ricerca e istituti scolastici"⁷.

Negli anni, il sistema di accreditamento e certificazione italiano si è evoluto e riorganizzato, in particolare recependo e adeguandosi al Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio n. 765, del 9 luglio 2008, che dal 1° gennaio 2010 è applicato per l'accREDITamento e la vigilanza del mercato in tutti i Paesi UE, con la creazione di **ACCREDIA**, Ente Italiano di AccredITamento, che è l'unico organismo nazionale autorizzato dal Governo Italiano a svolgere attività di accREDITamento^{8,9}.

Tale Ente, designato dal Governo il 22 dicembre 2009 e definito come Associazione riconosciuta senza fini di lucro, è nato dalla fusione di SINAL e SINCERT e con il contributo di SIT – INRIM, ENEA e ISS. ACCREDIA è l'Ente unico nazionale di accreditamento designato dal Governo italiano, ossia l'unico ente riconosciuto in Italia ad attestare che gli organismi di certificazione ed ispezione, i laboratori di prova, anche per la sicurezza alimentare, e quelli di taratura abbiano le competenze per valutare la conformità dei prodotti, dei processi e dei sistemi agli standard di riferimento. ACCREDIA opera sotto la vigilanza del Ministero dello Sviluppo Economico e svolge un servizio di pubblica autorità, in quanto l'accREDITAMENTO è un servizio svolto nell'interesse pubblico ed un efficace strumento di qualificazione dei prodotti e servizi che circolano su tutti i mercati.

1.4 La definizione di norma

Una norma ISO è un documento che definisce le peculiarità e gli standard di un procedimento, di un prodotto, di un processo o di un servizio. La norma assume una denominazione caratteristica e differente a seconda del riferimento normativo stesso a cui si rifà (riferisce): norma internazionale (ISO), norma europea (EN) e norma nazionale italiana (UNI). La norma ha delle peculiarità caratteristiche fondamentali:

- Consensualità
- Democraticità
- Trasparenza
- Volontarietà

La dicitura EN delle norme ISO identificano una norma elaborata dall'organismo internazionale ISO, recepito, elaborato ed armonizzato dal CEN in modo tale che la norma tecnica venga recepita dagli stessi Paesi membri in modo obbligatorio ed uniformato in tutta Europa.

Ruolo del CEN è quello di elaborare le norme di concerto con gli enti nazionali e sovranazionali. Il recepimento di una norma da parte dei

Paesi membri è codificato da una sigla che identifica la norma, per esempio in Italia UNI EN ISO.

Questa codificazione assicura l'adeguatezza dei prodotti, dei processi e dei servizi alle norme nazionali dei Paesi di destinazione.

Come detto, le norme ISO presentano una codificazione speciale, basata su una numerazione particolare: lo standard di una norma è "ISO nnnnn:yyyy: Titolo". La serie di *n* indica il numero specifico della norma, la serie di *y* indica l'anno in cui è stata pubblicata e *Titolo* è una breve descrizione della stessa.

1.5 Norme ISO: la nuova Norma ISO 9001:2015

La famiglia ISO 9000 affronta diversi aspetti della gestione della qualità e contiene alcuni dei più noti standard ISO. Le norme forniscono istruzioni e strumenti per le aziende e le organizzazioni che vogliono garantire che i loro prodotti e servizi possano costantemente soddisfare le esigenze dei clienti e che la qualità sia costantemente migliorata¹⁰.

La sigla ISO 9000 identifica una serie di documenti, linee guida e norme che definiscono i requisiti per la realizzazione di un Sistema di Gestione della Qualità che guidino le aziende nella gestione dei processi produttivi in un'ottica di miglioramento dell'efficacia e dell'efficienza nella realizzazione del prodotto e nell'erogazione del servizio, per ottenere ed incrementare la soddisfazione del cliente. L'unica norma della serie ISO 9000 per la quale una azienda può essere certificata è la ISO 9001. Le altre serie possono essere considerate come utili e facoltative per favorire la corretta applicazione ed interpretazione dei principi del Sistema Qualità.

La norma ISO 9001, *Sistemi per la Gestione della Qualità – Requisiti* è stata emessa nella prima edizione nel 1987. Una prima revisione è stata

rilasciata nel 1994, ISO 9000:1994. Sotto la spinta del *continuous quality improvement*, che caratterizza le Norme stesse, sono stati coinvolti 1120 utilizzatori della ISO 9000:1994 a livello mondiale, portando alla pubblicazione di una nuova norma revisionata, in cui sono state apportate importanti innovazioni (nota impropriamente *Vision 2000*): la ISO 9000:2000. Nel settembre 2015 è avvenuta la pubblicazione dello standard UNI EN ISO 9001:2015 la quale è stata ratificata dal Presidente dell'UNI ed è diventata parte del corpo normativo italiano il 23 settembre 2015. La norma UNI EN ISO 9001:2015, sui sistemi di gestione per la qualità concepita in termini di *High Level Structure*¹, richiede che l'organizzazione analizzi il suo contesto interno ed esterno e tutti i requisiti applicabili, allo scopo di capire e determinare i fattori rilevanti che possono nascondere delle minacce e delle opportunità per la propria organizzazione. L'introduzione di questa nuova struttura, rispetto a quella presente nella precedente versione UNI EN ISO 9001:2008, non modifica sostanzialmente le finalità della norma. Il nuovo standard ha comportato numerosi vantaggi alcuni dei quali sono ad esempio il fatto che l'organizzazione lavori in modo più efficiente poiché tutti i processi sono allineati e compresi da tutte le persone che operano all'interno dell'organizzazione, in modo tale da creare una diminuzione dei costi interni e un incremento della produttività; mette inoltre al primo posto la soddisfazione delle esigenze del cliente, fidelizzandoli e offrendo all'organizzazione la possibilità di espandere la propria clientela; altresì, si prefigge di identificare e affrontare i rischi legati all'organizzazione. Questa evoluzione corrisponde ad una volontà strategica dell'ISO di facilitare le aziende e le organizzazioni nel loro percorso di integrazione ed unificazione dei diversi Sistemi di Gestione aziendali (Qualità, Ambiente, Sicurezza, Energia, ecc.). Dunque, rispetto allo standard

¹ La definizione della struttura di alto livello è presente nelle Direttive ISO/IEC, Parte 1, Annesso SL, Appendice 2, che prevede testo base identico, termini e definizioni comuni. L'adozione di questa struttura facilita l'utilizzo di più sistemi di gestione, garantendo la sostanziale compatibilità tra i sistemi di gestione e l'uniformità di linguaggio.

precedente UNI EN ISO 9001:2008, nel nuovo standard è stato introdotto il concetto di analisi e gestione dei rischi ed è stato ribadito l'approccio per processi che incorpora al suo interno il ciclo di Deming. Nella norma UNI EN ISO 9001:2015¹¹ sono stati definiti i 10 punti cardine:

1. Contesto dell'organizzazione.
2. Parti interessate esigenze e aspettative.
3. Campo di applicazione del sistema di gestione.
4. Sistema di gestione e processi.
5. Leadership e impegno.
6. Pianificazione delle azioni per affrontare i rischi.
7. Supporto di risorse e competenze.
8. Pianificazione e controllo operativi.
9. Valutazione delle prestazioni attraverso il monitoraggio, la misurazione, l'analisi e la valutazione.
10. Miglioramento continuo.

1.6 L'approccio per processi: PDCA e Risk Based Thinking

L'approccio per processi¹² rappresenta l'elemento veramente innovativo della norma ISO 9001:2000, cardine poi dell'edizione ISO 9001:2008. Nella versione del 1994 la qualità scaturiva dalla qualità del prodotto e dalla messa in atto delle procedure, mentre nella versione del 2000 il focus è posto sull'attenzione al sistema e alla gestione dei processi aziendali.

Promuovere l'adozione di un approccio per processi all'interno di un'organizzazione tradizionale comporta dei cambiamenti notevoli sia di tipo strutturale (ad esempio mediante l'utilizzo dei team) sia di tipo culturale (ad esempio mediante una maggiore responsabilizzazione delle persone). Lavorare per processi richiede una grande maturità poiché coinvolge tutta l'organizzazione e per questo è difficile da gestire. Inoltre, richiede la condivisione di risorse e la gestione del team che è più onerosa rispetto a quella del singolo.

Per definire l'approccio per processi, il nuovo standard utilizza la seguente definizione: *“L'approccio per processi implica la definizione sistematica e la gestione dei processi e delle loro interazioni, in modo da conseguire i risultati attesi in conformità alla politica per la qualità e agli indirizzi strategici dell'organizzazione. La gestione dei processi e del sistema nel suo complesso può essere realizzata utilizzando il ciclo PDCA con un orientamento generale al Risk Based Thinking volto a cogliere le opportunità e a prevenire risultati indesiderati”*¹³.

Mentre sul Bonechi Lucia troviamo come definizione di processo:

*“una serie di attività tra loro interdipendenti, che, partendo da un certo input (costituito da materiali, istruzioni e specifiche del cliente) utilizzando risorse aziendali (ossia persone, mezzi e strutture) vi apporta delle trasformazioni che aggiungono valore, per ottenere un certo output, prodotto/servizio e/o informazioni”*¹⁴.

Il processo è un insieme di attività interrelate, svolte all'interno dell'azienda, che creano valore trasformando delle *risorse* (*input* del processo) in un *prodotto* (*output* del processo) destinato ad un soggetto interno o esterno all'azienda (*cliente*).

Il processo è teso al raggiungimento di un obiettivo aziendale, determinato in sede di pianificazione.

I processi nella loro globalità non sono altro che insiemi strutturati di attività e di informazioni correlati o interagenti tra loro e dipendenti uno dall'altro, nei quali varie risorse e profili professionali differenti tra loro condividono esperienze e conoscenze.

Le attività che compongono un processo hanno in comune uno scopo, declinato in obiettivi, che per il singolo processo si identifica nella creazione di valore per i propri clienti, mentre, per l'intero sistema, coincide con i valori e con gli obiettivi aziendali e di servizio nell'ottica del miglioramento continuo, enunciate nella politica della qualità.

A differenza della *Vision 2000* nel nuovo standard, l'approccio per processi viene espressamente ribadito e associato alla gestione dei rischi

aziendali: è quindi fondamentale non solamente conoscere i processi aziendali svolgendo una analisi accurata delle interazioni tra input e output, ma tutti i processi e i loro feedback dovranno essere integrati in un sistema che utilizza il *Risk Based Thinking*.

I rischi che possono riflettersi sull'ottenimento dei risultati devono essere gestiti dall'organizzazione e per fare ciò il sistema deve svolgere un'analisi su ogni processo, nello specifico¹⁵:

- determinare come il rischio possa influenzare i processi per migliorare gli output e prevenire risultati non desiderati;
- definire l'estensione della progettazione dei processi e dei controlli necessari in base al rischio;
- migliorare l'efficacia del SGQ;
- mantenere e gestire un sistema che affronta intrinsecamente rischio e soddisfa gli obiettivi.

Ecco che dunque i benefici che un sistema può trarne dalla propria gestione dei processi possono essere così sintetizzati¹⁶:

- una maggior focalizzazione sui processi ad alto rischio e sui loro output;
- una migliore comprensione, definizione integrazione dei processi interdipendenti;
- gestione sistematica della pianificazione, attuazione, controllo e miglioramento dei processi e del sistema di gestione nel suo complesso;
- migliore utilizzo delle risorse e una maggiore responsabilità;
- realizzazione più coerente delle politiche e degli obiettivi, dei risultati attesi e delle prestazioni complessive;
- facilita l'attuazione dei sistemi di gestione;
- aumenta la soddisfazione del cliente incontrando le esigenze dei clienti;
- incrementa la fiducia nell'organizzazione.

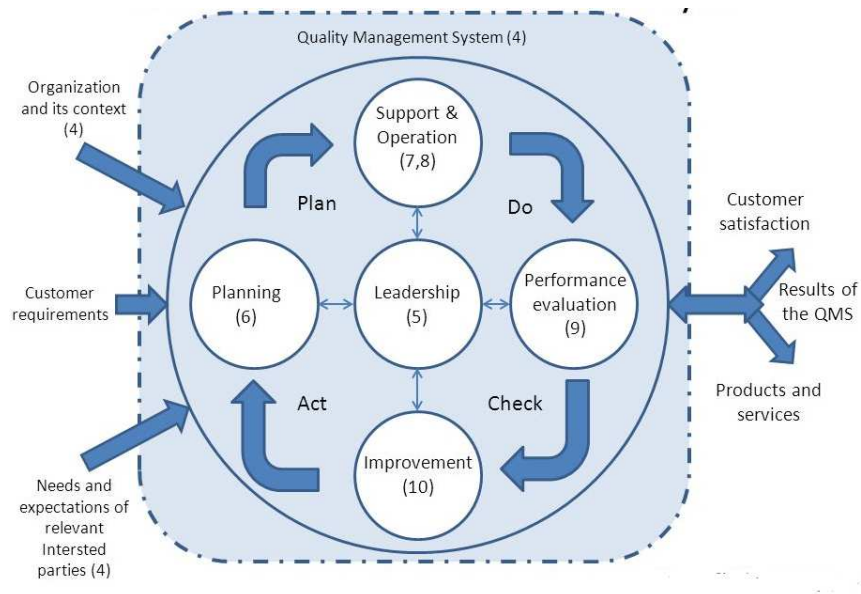


Figura 1.1: Rappresentazione della struttura della ISO 9001:2015 nel ciclo PDCA

Fonte: <https://www.certificazionediqualitya9001-2015.it/la-rappresentazione-del-ciclo-pdca>.

Dallo schema emergono alcune caratteristiche:

- ◆ gli input non sono costituiti soltanto dai requisiti del cliente ma vengono considerate anche le esigenze e le aspettative delle parti interessate oltre che il contesto dell'organizzazione e i suoi requisiti;
- ◆ si tiene conto del tema della gestione del rischio soprattutto nella fase Plan;
- ◆ al centro del ciclo è collocata la leadership che avrà un ruolo fondamentale in tutte le quattro fasi;
- ◆ gli elementi in uscita del processo sono: la soddisfazione del cliente, i prodotti e servizi ma anche i risultati del SGQ.

I requisiti del sistema che devono essere soddisfatti riguardano i risultati attesi dal sistema stesso e il conseguimento degli obiettivi di governo, per questo i risultati del SGQ sono un elemento di feedback per attuare dei miglioramenti e prevenire casi di insuccesso.

Il mezzo tramite il quale identificare, definire e pianificare le attività necessarie per sviluppare i processi all'interno di un efficace SGQ è il

ciclo di Deming attraverso il metodo PDCA (Plan-Do-Check-Act) che permette il monitoraggio dei processi mediante il miglioramento continuo. Il metodo PDCA è stato introdotto negli anni '20 da W. Shewhart, ed è stato poi sviluppato e reso popolare da W. E. Deming da cui ha preso il nome. L'acronimo del nome PDCA rappresenta la sequenza logica essenziale di approccio per la gestione dei processi:

- **P – Plan.** Osservare per Pianificare
- **D – Do.** Fare quanto pianificato
- **C – Check.** Controllare quanto fatto
- **A – Act.** Azione per migliorare ciò che si è fatto



Figura 1.2: *Ciclo di Deming*, fonte: <https://www.vskills.in/certification/tutorial/quality-circles>.

Il ciclo di Deming è un modello strutturato nell'ottica del miglioramento continuo della Qualità. È lo strumento atto a promuovere la cultura della qualità mediante il miglioramento continuo dei processi e all'utilizzo ottimale delle risorse, dove l'obiettivo della politica della qualità è la costante interazione tra ricerca, progettazione e produzione del prodotto/servizio. Per migliorare la qualità e soddisfare le esigenze del cliente, le quattro fasi devono ruotare continuamente, come in un ciclo per l'appunto, tenendo come criterio guida e come obiettivo la qualità.

La definizione dell'approccio per processi, di cosa sia un processo e di come questi interagiscono nell'organizzazione aziendale, introduce un importante elemento nell'organizzazione di un SGQ, vale a dire l'Approccio Sistemico alla gestione, ovvero: identificare, capire e gestire, come fossero sistema, processi tra loro correlati che contribuiscono all'efficacia e all'efficienza dell'organizzazione nel conseguire i propri obiettivi.

1.7 Il Risk Based Thinking.

Tra le novità principali adottate dallo standard UNI EN ISO 9001 del 2015, una delle più significative è stata quello di stabilire un approccio sistematico per analizzare i rischi, abbandonando l'idea di trattare la prevenzione del rischio come una componente separata di un Sistema di Gestione della Qualità. Infatti, il rischio è insito in tutti gli aspetti di un sistema di gestione della qualità: potrebbe insorgere nei sistemi, nei processi e nelle funzioni; adottare il Risk Based Thinking¹⁷ assicura che questi rischi siano identificati, esaminati e controllati sia in fase di progettazione che nella fase di sviluppo di un SGQ. Il pensiero basato sul rischio fa parte dell'approccio per processi: lo standard prevede infatti che l'organizzazione, dopo aver individuato i processi, ne affronti rischi ed opportunità partendo dal presupposto che alcuni processi necessitano di una pianificazione più attenta e formale rispetto ad altri in base al livello di rischio a cui espongono la capacità dell'organizzazione di raggiungere i suoi obiettivi. Il concetto di rischio era già implicito nella ISO 9001 a partire dalla Vision 2000, ma nell'edizione del 2015 questo concetto viene esplicitato ed espanso a tutto il sistema, divenendo l'elemento più originale se non rivoluzionario. Il nuovo standard vuole incrementare la fiducia dei clienti nei Sistemi di Gestione per la Qualità legata alla pianificazione e al controllo dei rischi operativi e quindi ad una valutazione delle conformità più efficace. Gli approcci innovativi riguardano l'attenzione al contesto, ai requisiti delle parti interessate oltre

che quelli dei clienti, e la visione dell'analisi del rischio come impegno della direzione. È necessario sottolineare come nella ISO 9001 il concetto stesso di rischio si riferisce all'effetto dell'incertezza sui risultati attesi, intendendo uno scostamento che può essere sia positivo che negativo. Nell'immaginario comune siamo abituati ad associare al rischio una accezione o un effetto negativo ma in realtà potrebbe non essere così: per questo la norma associa al sostantivo rischio il termine "*opportunità*" includendo un aspetto positivo come, ad esempio, il superamento delle aspettative. Le opportunità sono un insieme di circostanze che rendono possibile fare qualcosa. I livelli di rischio dipenderanno dalla scelta di cogliere oppure no un'opportunità.

L'introduzione della gestione del rischio in tutte le fasi del SGQ ha comportato alcune modifiche alla struttura stessa dello standard che si dimostra meno imperatorio e più flessibile, rispetto all'edizione del 2008, nella definizione dei requisiti riguardanti i processi, le informazioni documentate e le responsabilità organizzative. Inoltre, non compaiono più nello standard le azioni preventive che erano presenti nell'edizione precedente e che adesso vengono espresse all'interno del pensiero basato sul rischio non limitandole più ad interventi specifici sul monitoraggio del SGQ ma diventando parte del processo di pianificazione e controllo svolto dall'Alta Direzione nel determinare i rischi che influenzano la capacità dell'azienda di conseguire gli obiettivi.

I vantaggi per un'organizzazione che applica in modo efficace il pensiero basato sul rischio sono¹⁷:

- il miglioramento della governance;
- la diffusione di una cultura basata sul miglioramento;
- l'assicurazione della conformità alle leggi e regolamenti;
- l'assicurazione della qualità dei prodotti e servizi;
- il miglioramento della fiducia e della soddisfazione del consumatore.

Capitolo 2

2.1 Il controllo di qualità e gli strumenti della qualità

Come definito all'inizio della trattazione, la qualità in Laboratorio si persegue e si raggiunge attraverso la raccolta e l'elaborazione di dati quantitativi e misurabili. Uno dei concetti di base della qualità è che ogni analisi della situazione ed ogni azione di miglioramento deve essere basata su dati oggettivi, e non su sensazioni, in modo da poter comprendere e misurare il fenomeno e valutarne quindi l'effettivo miglioramento o meno.

Lo strumento principale per la verifica della qualità analitica in Laboratorio è rappresentato dal Controllo di Qualità (CQ). Lo schema globale di CQ prevede, accanto al consueto Controllo di Qualità Interno (CQI), la partecipazione attiva a programmi di interlaboratorio di peer-review o Controllo di Qualità Allargato (CQA) e la partecipazione a programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ). Le informazioni fornite da ognuno di questi strumenti, ciascuno con le proprie prerogative e utilità, consentono la stima della qualità analitica del laboratorio, il monitoraggio delle prestazioni analitiche in relazione con i traguardi analitici propri di ciascun laboratorio.

Esistono una serie di linee guida, leggi e normative regionali, nazionali e internazionali emanate da organi governativi e società scientifiche che guidano all'utilizzo corretto dei CQ:

- Decreto Lgs. 30/12/1992, n.502 (G.U. del 30/12/1992 n.305).
- Decreto Lgs 14/01/1997, n.37 (G.U. del 20/02/1997 n.42).
- Linee Guida e norma in materia di autorizzazione e accreditamento delle strutture sanitarie Regionali¹⁸.

- Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC): Linee guida sulla gestione dei Programmi di Controllo Qualità Interno; Biochimica Clinica 2008, n.32, pp102-121¹⁹.
- CLSI Document C24-A3²⁰.
- CLSI/NCCLS Document EP5-A2²¹.
- ISO 15189:2012 Medical laboratories – requirement for quality and competence.

I documenti qui citati forniscono gli strumenti essenziali per la pianificazione ed attuazione del Controllo Qualità in laboratorio, al fine di definire le modalità operative e la scelta del sistema di controllo più specifico e più adatto a mantenere sotto controllo la qualità analitica ciascuna realtà operativa nel rispetto dei requisiti richiesti, nel rispetto dei traguardi analitici e nell'ottica del miglioramento continuo.

In tal senso la ISO 15189 "*Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence*", Norma specifica per i Laboratori Medici, enuncia il proprio scopo al punto 1.1 della norma stessa: "La presente Norma Internazionale specifica i requisiti per la qualità e la competenza particolare per laboratori medici". In maniera ancora più esplicita, la Norma afferma che "Il laboratorio deve progettare sistemi di controllo della qualità interna che verificano il raggiungimento della qualità prevista dei risultati". Quindi la norma dice che il Laboratorio deve adottare una politica per la Qualità basata sulla pianificazione, progettazione di un sistema di controllo della qualità analitica attraverso l'utilizzo di Controlli di Qualità sia interni che esterni.

La norma afferma che: "*Il laboratorio deve determinare l'incertezza dei risultati, se pertinenti e possibili. Componenti dell'incertezza che sono di importanza devono essere prese in considerazione*". Il laboratorio dunque, deve determinare l'incertezza di misura dei suoi processi

analitici e gli elementi che contribuiscono a determinare l'incertezza del risultato di laboratorio.

L'**incertezza** è un parametro associato al risultato di una misurazione, che definisce la dispersione dei valori attribuiti al misurando.

In un altro passo della norma si pone l'attenzione sulla tracciabilità dei metodi e sulla riferibilità metrologica: *“Un programma per la calibrazione dei sistemi di misura e la verifica dell'esattezza deve essere progettato ed eseguito in modo da garantire che i risultati siano riconducibili a unità SI o con riferimento ad una costante fisica o altro riferimento dichiarato”*. In quest'ottica, tutte le tappe che portano al risultato a referto devono poter essere tracciabili in maniera tale da verificare la bontà e l'accuratezza del metodo attraverso la tracciabilità della calibrazione in uso con quella di riferimento (gold standard, calibratore primario, calibratore secondario) e verificare l'attendibilità rispetto allo standard di calibrazione della ditta produttrice. Quindi il Laboratorio deve dimostrare il possesso di un efficace programma per la taratura/calibrazione dei sistemi di misura e per la verifica dell'accuratezza in modo da poter risalire ad una unità di misura (SI).

2.2 Filosofia e scopo del Controllo di Qualità

Il Controllo di Qualità ha come obiettivo quello di pianificare e implementare un sistema che permetta di mettere in atto una sequenza di attività correlate e interdipendenti costituendo un vero e proprio processo. L'utilizzo dei Controlli di Qualità quale strumento per il miglioramento continuo all'interno di un Sistema di Gestione della Qualità SGQ trova fondamento sui principi che guidano il ciclo di Deming e l'approccio per processi. Il controllo di qualità (CQ) sono tutte le attività e le tecniche utilizzate in laboratorio per soddisfare i requisiti di qualità. Il laboratorio clinico si avvale dell'utilizzo del CQ sia per seguire un processo, sia per stabilire se i risultati siano sufficientemente affidabili per poter essere validati.

Lo scopo del Controllo di Qualità è quello di:

- Permettere valutazioni sulla precisione del test;
- Garantire la stabilità nel tempo delle prestazioni analitiche;
- Consentire di mantenere la qualità predeterminata (traguardi analitici);
- Permettere il controllo delle prestazioni analitiche fornendo un allarme non appena il processo risulti fuori controllo.

Lo scopo principale nell'impiego corretto del CQ, dunque, è quello di permettere valutazioni sulla precisione del test e garantire la stabilità delle prestazioni nel tempo. Stabilire i limiti di un processo e di un sistema analitico e fornire adeguati allarmi quando il sistema è fuori controllo permette al Controllo di Qualità (CQ) di fornire una stima di quanto sia grande l'errore analitico che un laboratorio possa permettersi. Implementare il controllo di qualità in laboratorio significa dunque pianificare, attivare e utilizzare procedure che hanno come target la stabilità nel tempo delle performances dei metodi/strumenti e garantiscono di mantenere la qualità predeterminata (traguardi analitici)²².

Il Controllo di Qualità permette di analizzare e ridurre al minimo l'entità degli errori frutto della variabilità analitica dei metodi/strumenti. Assume quindi il ruolo di *controllo di processo* in quanto permette di analizzare le diverse fasi e le componenti del processo analitico, in modo tale da standardizzare e armonizzare la gestione dei processi stessi.

Il Controllo di Qualità permette dunque di governare e gestire l'errore derivato dai sistemi analitici attraverso l'individuazione e l'applicazione, nell'ottica del miglioramento continuo, di un sistema di **controllo statistico**, in real time e a lungo termine, che consenta di monitorare e governare l'errore dovuto alla variabilità analitica, in maniera tale che i risultati ottenuti rispettino i limiti prestabiliti.

Queste problematiche, molto frequenti nella routine di laboratorio, necessitano di un adeguato e agile strumento di valutazione che consenta al Laboratorio di effettuare la corretta interpretazione della segnalazione di errore che si presenta di fronte. A tal proposito è necessario per il Laboratorio ridurre il rumore analitico di fondo che porta a false/inutili ricalibrizioni con conseguente destabilizzazione del sistema, non necessarie ripetizioni di controlli o campioni. Si avverte quindi l'esigenza di rendere il processo di controllo più efficace fornendo segnalazione di errori solamente quando necessario, ridisegnando il processo di Controllo di Qualità Interno (CQI) e scegliendo quelle regole statistiche di Westgard²³ veramente utili ed efficaci per ogni test.

Tale valutazione si rende necessaria anche in considerazione del fatto che se si vanno ad osservare i processi dal punto di vista analitico si notano con grande frequenza²⁴:

- Insufficiente o inadeguata conoscenza dei processi che governano il controllo statistico dei metodi analitici;
- Troppe segnalazioni di errore;
- Talvolta indifferenza davanti a segnalazione di errore;
- Verifica non efficace e non tempestiva;
- Azione correttive troppo energiche o inefficaci.

Gli strumenti statistici impiegati non possono prescindere dalla definizione, dalla misura e valutazione della qualità richiesta attraverso la stima dell'Errore Totale (ET)²⁵ dato dalla somma dell'imprecisione (CV) e della inesattezza (Bias).

2.3 Elementi di statistica di base: la distribuzione di frequenza dei dati

Quando un campione di controllo (CQ) è analizzato ripetutamente, i risultati che si ottengono non sono identici, anche nel caso in cui non

mutino le condizioni analitiche ovvero utilizzo dello stesso sistema analitico, stesso strumento, stessi reagenti, stesso operatore. I valori delle diverse determinazioni andranno a distribuirsi casualmente attorno ad un valore medio, secondo una distribuzione di probabilità caratteristica che prende il nome di distribuzione di frequenza di Gauss, rappresentata da una curva a campana simmetrica con entrambe le code che si estendono asintoticamente all'infinito.

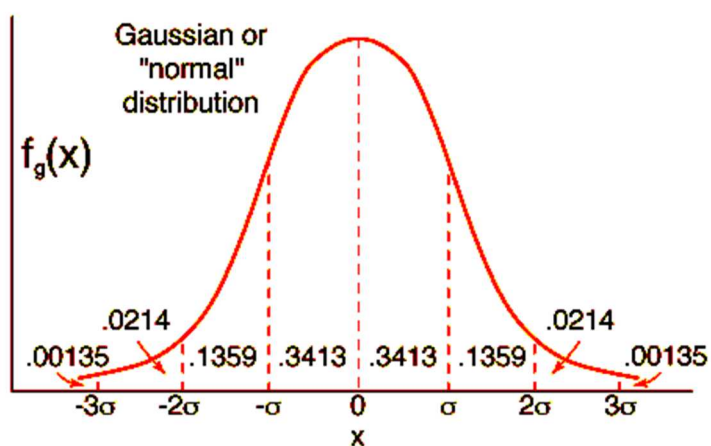


Figura 2.1: Distribuzione di frequenza di Gauss per una serie di valori, fonte: <https://www.acaecert.it>.

Nel caso in cui le condizioni di misurazione cambino (cambio lotto reagenti, turnover personale ecc) i diversi risultati delle misurazioni (gli eventi) del materiale di controllo possono dare origine a distribuzioni a campana che differiscono tra loro in altezza e in ampiezza.

Per poterle differenziare è importante conoscere e misurare i parametri che caratterizzano queste popolazioni: la media (μ) e la deviazione standard (DS).

La media e la deviazione standard definiscono la variabilità dei metodi analitici sottoposti a controllo. La media (μ) è una misura della posizione e divide la superficie della curva in 2 parti uguali, rappresentando il punto massimo di frequenze degli eventi.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

La deviazione standard (DS) è una misura della dispersione dei valori analitici (ci indica quanto i valori si discostano dalla media).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Il coefficiente di variazione (CV) indica il rapporto tra la DS e la media ed è espressa in percentuale (%).

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} * 100$$

2.4 Creazione ed utilizzo delle carte di Levey-Jennings

Una carta, o grafico, di Levey-Jennings (L-J o LJ) è una rappresentazione grafica della distribuzione di una serie ripetuta di valori (eventi) ottenuti dal dosaggio inter-serie ed intra-serie del Controllo di Qualità.

La Deviazione Standard (DS o s) è lo strumento statistico tramite il quale sono preparate le carte di Levey-Jennings. Una carta viene creata per ciascun test e per ciascun livello di CQ dosato. Il primo passo per la sua creazione è quello di stabilire dei limiti decisionali attraverso la misura di $\pm 1s$, $\pm 2s$ e $\pm 3s$ della Deviazione Standard dalla media delle misurazioni.

I valori ottenuti dalla misura del CQ che si distribuiscono nelle carte di Levey-Jennings possono essere sovrapposti su una curva a campana

che illustra la distribuzione complessiva dei valori del controllo di qualità, andando a identificare la distribuzione normale dei valori CQ (distribuzione di Gauss)²⁶.

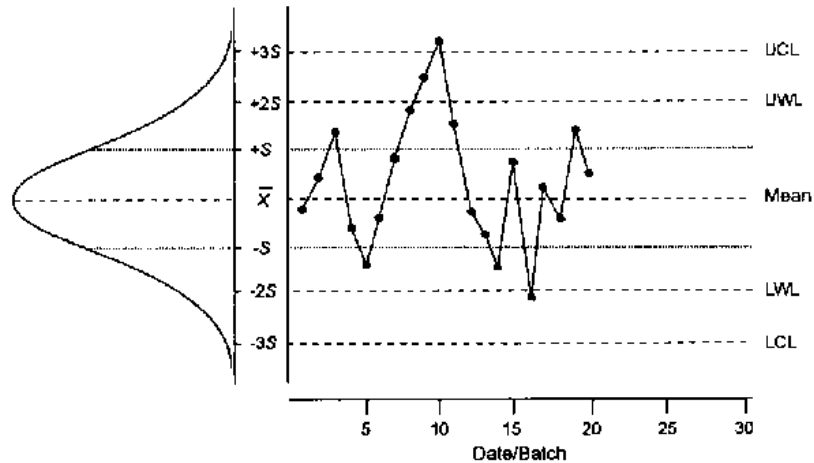


Figura 2.2: *Distribuzione relativa dei dati di Controllo CQ in una carta di Levey-Jennings, fonte: <https://www.fao.org/3/w7295e/w7295e0a.htm>.*

Quando un processo analitico è sotto controllo, approssimativamente 68% di tutti i valori di QC cadono all'interno della ± 1 Deviazione Standard (1s). Allo stesso modo il 95.5% di tutti i valori QC cadono all'interno della ± 2 Deviazione Standard (2s) dalla media. Circa il 4.5% di tutti i dati saranno fuori dai limiti $\pm 2s$ quando il processo analitico è sotto controllo. Approssimativamente il 99.7% di tutti i valori QC si trovano essere all'interno della ± 3 deviazione standard (3s) della media. Solamente lo 0.3%, cioè 3 punti su 1000, cadranno fuori dal limite $\pm 3s$, e qualsiasi valore al di fuori della $\pm 3s$ viene considerato esser associato ad una significativa condizione d'errore e la seduta analitica non può essere validata²⁷. Le carte di Levey-Jennings permettono quindi di documentare i risultati CQ i quali devono essere valutati ed analizzati quotidianamente al fine di assicurare l'attendibilità e la qualità dei risultati ottenuti all'interno di una seduta analitica.

L'andamento e la distribuzione dei risultati CQ all'interno di una carta di Levey-Jennings ci permette anche di valutare se il nostro sistema analitico è viziato da un errore sistematico o da un errore casuale.

L'**errore sistematico** è caratterizzato da un cambiamento nella media dei valori di CQ. Il cambiamento potrebbe essere di tipo graduale e dimostrato mediante una tendenza, o **trend**, nei valori CQ, oppure può essere un cambiamento brusco evidenziato come uno **shift** nei valori di controllo.

Il *trend* indica una graduale perdita di attendibilità (affidabilità) del sistema analitico solitamente sottile. Le cause possono essere numerose, tra le quali: deterioramento delle sorgenti di luce dello strumento; deterioramento dei reagenti, accumulo di detriti nella strumentazione e tubatismi; graduale perdita della stabilità della calibrazione.

Lo *shift* è caratterizzato da improvvisi cambiamenti della media CQ e da bruschi cambiamenti nelle performance del sistema analitico. Le cause possono essere: cambiamenti nella formulazione dei reagenti; cambio di lotto dei reagenti; cambiamenti nella manutenzione degli strumenti; fallimento nei processi di dispensazione di campioni o reagenti; calibrazioni non idonee.

L'**errore random** invece, è qualsiasi deviazione rispetto ad un risultato atteso. Qualsiasi scostamento, in positivo o in negativo, dalla media calcolata viene definita come errore casuale. L'errore casuale può essere accettato o rigettato a seconda di quanto definito e quantificato dalla deviazione standard.

2.5 Le regole di controllo: Westgard Rules

L'applicazione indiscriminata di regole di controllo pur fornendo tempestive segnalazioni quando il sistema è fuori controllo, potrebbe produrre falsi allarmi che comporterebbero ingiustificati blocchi al sistema o costose ripetizioni. È necessario infatti, adottare quelle regole di controllo che siano il giusto compromesso tra la qualità analitica desiderabile (errore totale massimo accettabile) e le prestazioni analitiche tipiche del metodo, caratteristiche per ciascun analita.

Nel 1981 James Westgard pubblicò un articolo sul controllo di qualità per i laboratori clinici, il quale descriveva un sistema di regole multiple, basato sui principi del controllo statistico dei processi industriali, le quali utilizzate singolarmente o in combinazione permettono di valutare la qualità di una seduta analitica²⁸.

Come ripreso ed enunciato anche dalle linee guida SIBioC per la gestione dei programmi di CQ Interno: *“Le regole rappresentano lo strumento statistico per giudicare se il risultato ottenuto è accettabile. Con il controllo statistico di qualità rileviamo due tipi di errore principali: casuali e sistematici. Ci sono alcune regole di controllo più sensibili all'errore casuale (1:3s; R:4s), altre più sensibili all'errore sistematico (2:2s, 4:1s, 10:x)”*²².

L'esempio riportato in figura 3.3, schematizza l'approccio pratico all'utilizzo dell'algoritmo che definisce l'approccio multiregola proposto da Westgard^{22,28} che si basa sull'utilizzo di sei regole base da utilizzarsi singolarmente o in combinazione tra loro:

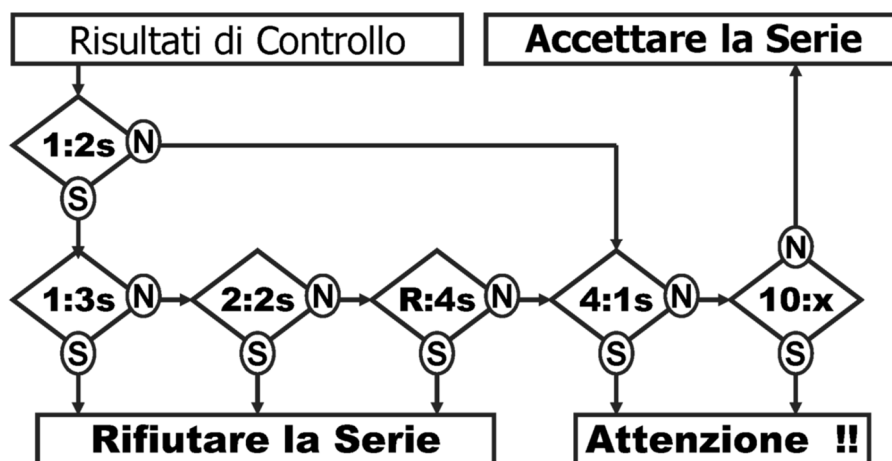


Figura 2.3: Schematizzazione dell'algoritmo di Westgard. N = non-violazione regola, S = violazione regola. 1:2s = 1 valore oltre ± 2 DS dalla media; 1:3s = 1 valore oltre ± 3 DS dalla media; 2:2s = 2 valori consecutivi oltre 2 DS dalla media, dalla stessa parte rispetto alla media; R:4s = 2 valori consecutivi che distano tra loro più di 4 DS; 4:1s = 4 valori consecutivi, tutti dalla stessa parte rispetto alla media, che distano dalla

media più di 1 DS; 10:x = 10 valori consecutivi tutti dalla stessa parte rispetto alla media (figura tratta da Biochim Clin, 2008, vol. 32, n. 2: 102-21).

È importante utilizzare le regole e l'algoritmo di Westgard in maniera non rigida, ma quale base di partenza per impostare un sistema di controllo a regole multiple che si adatti alla realtà analitica di ciascun laboratorio, alle performance dei propri metodi/strumenti, agli analiti dosati e ai traguardi analitici impostati.

2.6 Precisione e accuratezza

Le formule matematiche sopra descritte sono lo strumento per misurare l'affidabilità dei risultati del nostro Laboratorio. Un sistema di qualità efficace deve essere preciso ed efficace.

La Deviazione Standard (DS) ci permette di ottenere la stima della **precisione**. La precisione rappresenta il grado di concordanza fra una serie di misure ripetute, ottenute in condizioni definite (di ripetibilità). La precisione non ha un valore numerico, ma è quantificata dall'imprecisione ovvero dalla misura della dispersione casuale degli eventi di determinazione del QC, indicando quantitativamente la dispersione casuale dei dati attorno alla media. La precisione intesa come la capacità di ottenere lo stesso risultato in una serie di misure ripetute è un indice dell'**errore casuale**.

L'**accuratezza**, definita secondo le nuove norme ISO come **esattezza**, indica il grado di concordanza tra la media (μ) di una serie di misure ripetute e il Valore vero o di consenso del misurando (ovvero quanto la media di una serie di misurazioni si discosti dal valore vero del misurando). Nella pratica quotidiana di laboratorio si assume quale valore vero quello identificato nel gruppo di consenso omogeneo (Controllo di Qualità Allargato, CQA) per

metodo e strumentazione. Il grado di inesattezza è espresso numericamente dal **Bias** che è inversamente correlato all'esattezza.

$$\text{BIAS } (\%)_{lab}: [(M_{lab} - M_{gruppo})/M_{gruppo}] \times 100$$

2.7 L'errore totale

La qualità analitica desiderabile per uno specifico analita è definita dall'**errore totale (ET)** massimo accettabile. L'ET massimo accettabile costituisce una modalità per definire le specifiche di qualità di una misura. Se l'errore fornito dal metodo supera l'ET accettabile, la qualità analitica del metodo deve essere considerata insufficiente²⁵. Dunque, la definizione della misura dell'ET in laboratorio è un passo fondamentale per assicurare l'affidabilità dei propri risultati e soddisfare i requisiti delle specifiche di qualità.

L'errore totale è il risultato della somma dell'errore casuale più l'errore sistematico dal quale si ottiene una stima della variazione totale del valore vero (o valore bersaglio).

Poiché l'errore sistematico e quello casuale non avvengono indipendentemente, è necessario calcolare l'errore totale per riflettere la variazione totale dal valore vero.

L'**errore totale (ET)** è possibile calcolarlo attraverso la formula:

$$\text{ET} = \text{Bias} + z \times \text{DS}$$

Come detto in precedenza, il Bias misura l'inaccuratezza, mentre la DS esprime l'imprecisione del metodo attraverso la misura del CV in percentuale.

Il coefficiente **z** stabilisce la porzione dei dati della popolazione inclusi nella stima dell'errore totale. Il coefficiente **z** posto a 1,65 corrisponde ad una probabilità del 95%, un valore di **z** posto a 2,33 corrisponde ad una probabilità del 99%, mentre un valore di **z** posto a 2 garantisce una probabilità di rilevare circa il 97,72% delle situazioni di errore.

L'errore totale combina l'errore casuale ed errore sistematico e ci mostra la variazione totale dal valore vero (valore bersaglio):

$$ET = |\text{Bias}| + z \times DS = |\text{Bias}| + 2 CV$$

L'errore totale può essere espresso in percentuale:

$$\%ET = |\%\text{Bias}| + 2 CV\%$$

Prendendo ad esempio il caso in cui un test abbia un Bias assoluto del 5% e un CV del 4%, l'errore totale è calcolato come:

$$ET = |\text{Bias } \%| + 2 \times CV\% = 5 + (2 \times 4) = 13 \%$$

Dunque, la presenza di errori sistematici (Bias) e casuali (aumento della DS o del CV%) hanno una notevole influenza sia sul versante del laboratorio variando la sensibilità e la specificità del metodo, sia sul versante clinico alterando l'interpretazione degli esami di laboratorio, utilizzati a scopo diagnostico o nel monitoraggio¹⁹.

2.8 Errori che influenzano l'interpretazione dei risultati

In assenza di errori, il cut-off stabilisce correttamente le proporzioni di pazienti Veri Positivi e dei pazienti Veri negativi. Ipotizzando che in una popolazione un determinato analita abbia una distribuzione normale gaussiana, è possibile stabilire le percentuali di Veri Positivi e Veri Negativi rispetto ad un limite decisionale prefissato.

Se un test/metodo è affetto da un Bias analitico positivo, la curva di distribuzione dei risultati si sposterà a destra, facendo sì che un maggior numero di pazienti si trovi oltre il limite decisionale prefissato, quindi oltre ai soggetti veramente positivi (Veri Positivi) si avrà una parte di soggetti sani che risultano positivi al test (Falsi Positivi), classificati in modo errato.

Se un test/metodo ha un Bias negativo, la curva di distribuzione dei risultati si sposta a sinistra. In questo caso una quota di soggetti malati è negativa al test (Falsi Negativi).

Questi appena elencate sono le situazioni che si possono presentare nel caso in cui un Laboratorio sia affetto da inaccuratezza di un metodo/strumento. Allo stesso modo possiamo ragionare sui dati che si ottengono nel caso in cui un Laboratorio sia affetto da un aumento della imprecisione del metodo/strumento.

Gli errori appena descritti influenzano l'interpretazione di un dato di Laboratorio. Se un dato è utilizzato a scopo diagnostico, la presenza di un errore sistematico (Bias) o quello di un errore casuale (aumento di DS o CV%) influiscono sul calcolo di sensibilità, specificità, valore predittivo.

Nel caso in cui i dati di Laboratorio siano utilizzati nel monitoraggio, la presenza di un errore sistematico o casuale influisce sul confronto che deve essere effettuato tra due o più misurazioni ripetute di uno stesso parametro sullo stesso paziente. Quindi è evidente di come l'influenza dell'imprecisione sulla corretta interpretazione della differenza tra misurazioni ripetute dello stesso analita nello stesso paziente richieda una valutazione ed un confronto fra le differenze e il "valore" di questa differenza possa essere un valore aggiunto alla corretta interpretazione del dato di Laboratorio. Questa "differenza" introduce il concetto di Differenza Critica, il quale sarà spiegato in maniera più completa più avanti.

2.9 Definire la qualità richiesta: i traguardi analitici o specifiche di qualità

La qualità richiesta è definita attraverso l'uso dei traguardi analitici o specifiche di qualità, ovvero il livello di prestazione richiesto affinché il dato di laboratorio soddisfi adeguatamente le esigenze cliniche.

Durante la Consensus Conference tenutasi a Stoccolma nel 1999, è stata presentata una gerarchia di approcci per la definizione delle **specifiche di qualità**²⁹. Il documento definisce le specifiche di qualità sulla base delle quali effettuare la scelta del traguardo analitico sul quale comparare le prestazioni raggiunte dal Laboratorio.

I criteri sui quali effettuare la scelta del traguardo analitico ideale per definire le specifiche di qualità del Laboratorio sono:

- Variabilità biologica
- Opinione dei clinici
- Stato dell'arte

Tenuto conto che dal punto di vista pratico un approccio ottimale per la maggior parte degli analiti risulta difficilmente raggiungibile, l'approccio consigliato e maggiormente utilizzato (Linee Guida SIBioC 2008²²) è il criterio di valutazione/confronto basato sui dati di Variabilità Biologica di popolazioni normali³⁰.

La **Variabilità Biologica** si basa sulla considerazione che la concentrazione di un analita nell'organismo di ciascun individuo si trova in equilibrio dinamico attorno ad un valore medio e che ne rappresenta all'equilibrio il **punto omeostatico**.

Si definisce **Variabilità Biologica intra-individuale (CV_i)** l'oscillazione naturale di ciascun costituente dell'organismo attorno al proprio punto omeostatico misurato nello stesso individuo in tempi differenti, caratteristico dunque della fisiologica individualità di ciascuno.

Si definisce invece **Variabilità Biologica inter-individuale (CV_g)** la variabilità dei valori medi dello stesso costituente ottenuti in individui

diversi, come risultato dei differenti punti omeostatici di ciascuno individuo in una popolazione^{31,32}.

Prendendo quale criterio la Variabilità Biologica, è possibile calcolare i traguardi di imprecisione, traguardo di inesattezza e il traguardo per l'errore totale (ET).

Assumendo costante il grado di inesattezza e trascurabile la variabilità pre-analitica associati ad un singolo valore di un paziente, la **Variabilità Totale (Vt)** per il traguardo di imprecisione è data dalla somma di due fattori: la variabilità biologica intra-individuale (CV_i) e la variabilità analitica (CV_A) definita dalla formula:

$$Vt = (CV_A^2 + CV_i^2)$$

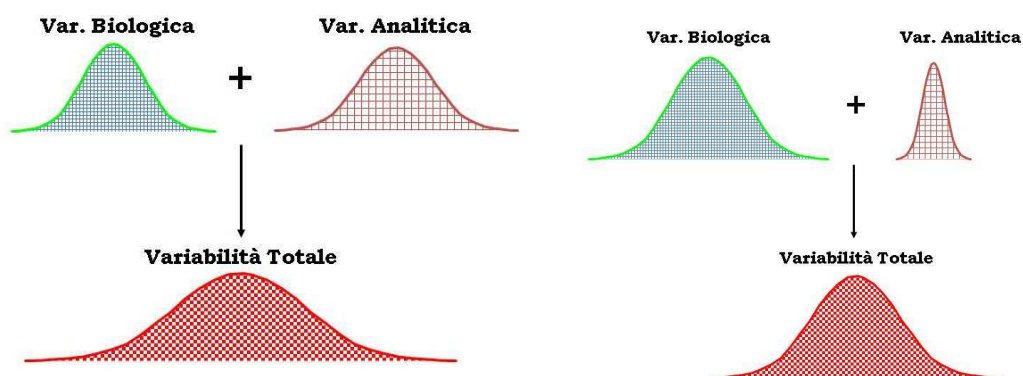


Figura 2.4: *Influenza della variabilità analitica sulla variabilità totale, fonte: <https://sibioc.it>.*

Poiché la Variabilità Biologica non è eliminabile, ne consegue che per poter tenere quanto più bassa la Variabilità Totale della prova di laboratorio, si deve tenere sotto controllo la Variabilità Analitica ad un livello sufficientemente basso e tale per cui la Variabilità totale sia dipendente solamente dalla variabilità Biologica³³. Contenere il valore della variabilità analitica al di sotto di 1/2 della variabilità biologica, significa che la Variabilità Totale (Vt) aumento solo del 11,8%, valore che viene comunemente giudicato accettabile.

Ne consegue che:

$$V_t = \sqrt{(CV_A^2 + CV_i^2)}$$

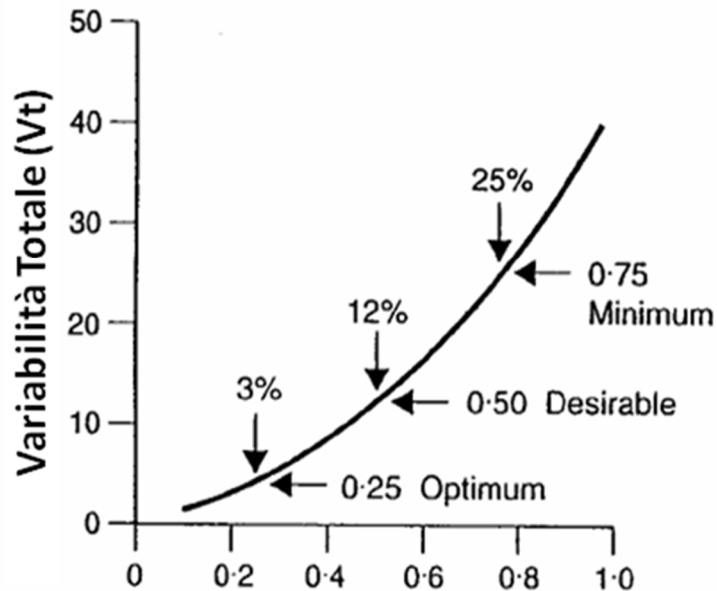


Figura 2.5: Andamento della variabilità totale in funzione del rapporto CV_A/CV_i . In % è riportato l'incremento della Variabilità del risultato vero oltre alla Variabilità Biologica (CV_i) ineliminabile, fonte: Fraser C.G., et. al. *Proposals for setting general goals solely based on biology: Ann Clin Biochem* 1997; 34; 8-12, modificata.

I traguardi analitici per l'imprecisione sono:

- Se CV_A è $\leq \frac{1}{2} CV_i$, il contributo della variabilità analitica all'aumento della Variabilità Totale sarà al massimo del 11,8% (**traguardo d'imprecisione desiderabile**).
- Se $CV_A \leq \frac{1}{4} CV_i$ si aggiunge un massimo del 3% alla Variabilità Totale (**traguardo d'imprecisione ottimale**).
- Se $CV_A \leq \frac{3}{4} CV_i$ si aggiunge un massimo del 25% alla Variabilità Totale (**traguardo d'imprecisione minimo**).

Per quanto riguarda i Traguardi di Imprecisione, se consideriamo trascurabile la Variabilità pre-analitica e assumiamo un livello di inesattezza costante, è possibile affermare che la Variabilità totale (Vt) associata ad un singolo valore osservato in un paziente deriva dall'interazione tra la Variabilità intra-individuale (CV_i) e la Variabilità analitica (CVA) in accordo con la formula: $Vt = \sqrt{(CVA^2 + CVI^2)}$.

La Variabilità Totale è quindi pari alla somma della Variabilità analitica CVA e di quella biologica intra-individuale (CV_i).

Il traguardo analitico da raggiungere è ottenere che la Variabilità Analitica sia inferiore o uguale alla metà della Variabilità Biologica.

I traguardi analitici per l'errore sistematico, ovvero quelli in cui limitare e valutare la massima accuratezza accettabile stimando il Bias sono:

- $Ba < 0,125 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$, traguardo ottimale
- $Ba < 0,25 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$, traguardo desiderabile
- $Ba < 0,375 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$, traguardo minimo

Infine, considerato che la formula per calcolare l'Errore Totale è $ET = Ba + 1,65 \cdot CVA$, usando i traguardi analitici (ottimale, desiderabile, minimo) x l'errore casuale (espresso come imprecisione) e x l'errore sistematico (espresso come inesattezza) è possibile calcolare i corrispondenti traguardi x il massimo errore totale accettabile (ETa):

- $ETa < 1,65 (0,25 CVi) + 0,125 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$
- $ETa < 1,65 (0,50 CVi) + 0,25 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$
- $ETa < 1,65 (0,75 CVi) + 0,375 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

2.10 Differenza Critica: l'importanza del trend nel test di Laboratorio

Nel caso in cui un paziente ripeta lo stesso esame a distanza di tempo per il monitoraggio di una patologia, la presenza di un errore sistemico (Bias) o di un errore casuale (espresso aumento CV%) possono falsare i risultati del test. Il Laboratorio deve essere in grado di fornire al Clinico gli strumenti adatti per poter ragionare in termini probabilistici, chiedendosi se 2 o più risultati siano significativamente diversi tra loro, considerando la Variabilità analitica CV_A e la variabilità Biologica CV_B , aggiungendo in questo modo valore al dato di Laboratorio presente a referto.

Siamo di fronte ad una **Differenza Critica**, o **Reference Change Value (RCV)**, in una serie ripetuta di test quando i risultati in serie dello stesso paziente possono dirsi cambiati in modo statisticamente significativo se la differenza tra i valori riscontrati è superiore al valore della somma della Variabilità Biologica intra-individuale e della Variabilità Analitica, e si calcola attraverso la formula:

$$\mathbf{RCV} = \mathbf{z} \times \sqrt{\mathbf{CV}_I^2 + \mathbf{CV}_A^2}$$

Avendo un'ottima accuratezza e una ottima imprecisione del metodo, possiamo valutare la Differenza Critica, la quale è applicabile solo se la Variabilità Analitica CV_A è inferiore alla Variabilità Biologica intra-individuale.

Il valore di RCV aumenta se aumenta la Variabilità Analitica, considerato che la Variabilità Biologica è ineliminabile. Se aumenta dunque l'imprecisione CV_A , bisogna intervenire in modo tale che la Variabilità Analitica non sia superiore alla metà della Variabilità Biologica intra-individuale.

Il **fattore z** è una costante che posto a 2,77 indica che ci sono solo 5 possibilità su 100 (5%) che la differenza osservata sia dovuta a fluttuazioni casuali dei risultati e dunque 95 possibilità su 100 che la variazione osservata indichi variazioni significative dell'analita considerato.

La teoria della Variabilità Biologica deve portare a conclusioni oggettive, da applicare con cautela, per evitare di accettare risultati e trarne conclusioni incompatibili con la situazione clinica del paziente. L'utilizzo della Differenza Critica presenta delle criticità: bisogna infatti valutare a quali parametri è possibile applicare il concetto di Differenza Critica e a quali invece non è possibile, evitando di accettare senza alcun criterio conclusioni incompatibili con l'esperienza clinica.

2.11 Indice di Individualità e valori di riferimento

L'**Indice di Individualità (II)** rappresenta la stima dell'individualità della variazione biologica di un analita e lo si ricava dalla formula:

$$II = CV_i / CV_g$$

Questo indice fornisce indicazioni sull'utilità o meno dell'uso dei tradizionali intervalli di riferimento. Dall'analisi della Variabilità Biologica intra-individuale scaturisce il concetto di Indice di Individualità quale stima dell'individualità della variazione biologica di un analita. Il concetto di individualità evidenzia come l'organismo di ciascun individuo si comporti in modo a sé stante rispetto al resto della popolazione, cioè i suoi valori per un dato analita in condizioni fisiologiche variano in un intervallo assai inferiore rispetto a quelli della popolazione di riferimento.

Per meglio capire il ruolo dell'indice di Individualità rispetto all'utilizzo dei valori di riferimento in alcuni analiti, è esemplificativo il caso della creatinina e del ferro sierici. La creatinina ha una Variabilità Biologica intra-individuale CV_i di 4,3% ed una Variabilità inter-individuale CV_g del 12,9%. In questi casi si afferma che l'analita in questione, la creatinina, ha una marcata individualità e l'Indice di Individualità basso espresso dal rapporto $II = CV_i / CV_g$ si 0,33. Mentre il ferro ha un CV_i di 26,4 e un CV_g di 23,2 con un II elevato di 1,14 (figura 2.5).

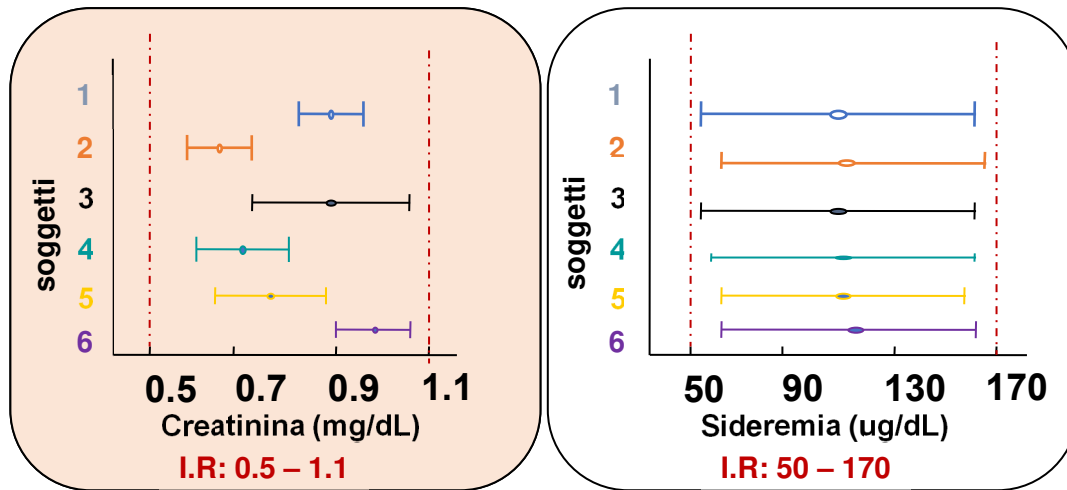


Figura 2.5: Differenze tra l'individualità della creatinina ed il ferro sierici. La creatinina ha marcata individualità e il basso. Il ferro ha bassa individualità e il elevato, fonte: Fraser CG. La variabilità biologica: dai principi alla pratica. Milano: Biomedica, 2004.

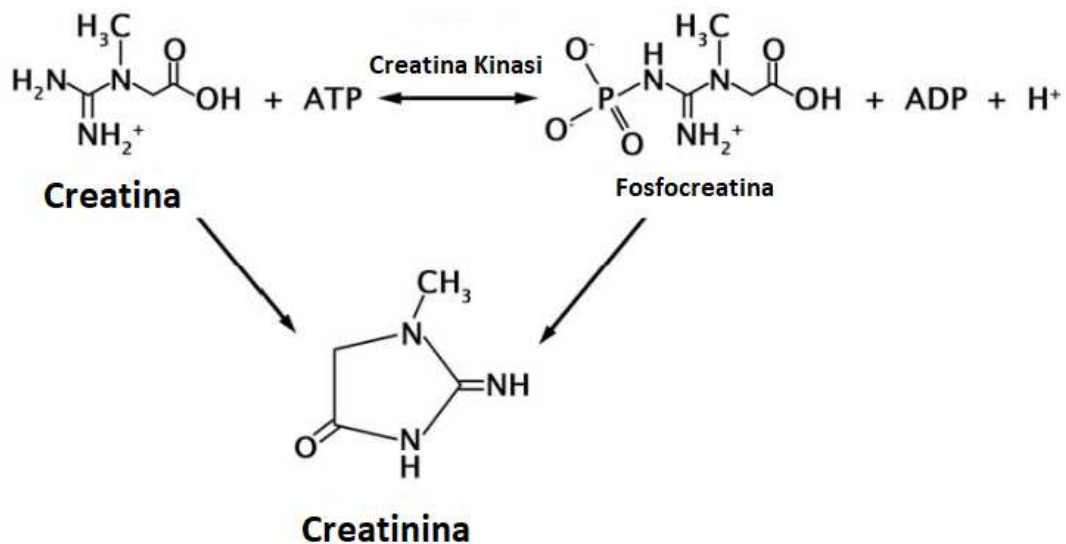
Si ritiene basso un indice di individualità quando $II < 0.6$. Nel caso della creatinina i classici Valori di Riferimento sono di limitata utilità nell'identificare risultati insoliti nelle variazioni dei risultati di Laboratorio della maggior parte degli individui mentre risulta utile monitorare il paziente attraverso l'andamento nel tempo dei risultati di laboratorio. I valori di riferimento hanno invece utilità clinica per il ferro perché i valori insoliti si collocano per tutti gli individui al di fuori degli intervalli di riferimento.

Gli studi sull'individualità^{30,31,32,33}, hanno portato a concludere che se $II < 0.6$, i comuni valori di riferimento (o intervalli di riferimento, IR) saranno di poca o scarsa utilità clinica nel monitoraggio di una patologia attraverso un test di laboratorio. In questi casi l'utilizzo dei soli intervalli di riferimento sottrae quel valore aggiunto che il dato di laboratorio dovrebbe fornire al Clinico.

Capitolo 3

3.1 La creatinina sierica e GFR stimato: aspetti fisiologici, tecnici e misura

La creatinina è sintetizzata nel fegato, nel pancreas e nel rene a partire da arginina, glicina e metionina. Attraverso il circolo ematico raggiunge i muscoli, il cervello ed altri organi che richiedono grandi quantità di energia a rapido utilizzo. Qui la creatinina è convertita in fosfocreatina che funge da deposito energetico.



Nei muscoli la creatina è particolarmente abbondante e la produzione del suo catabolita creatinina presenta minime variazioni giornaliere, proporzionali alla massa muscolare del soggetto.

Altre variabili interconnesse alla produzione di creatinina sono riconducibili al genere, all'età e al gruppo etnico di appartenenza. Una volta entrata in circolo la creatinina viene trasportata nel plasma in forma libera fino al rene, sede in cui viene eliminata quasi completamente attraverso la filtrazione glomerulare.

Classicamente, la misurazione della creatinina si basa sulla reazione di Jaffe che vede la creatinina reagire con l'acido picrico in un ambiente alcalino dando

vita a un prodotto di reazione di colore rosso arancio valutabile mediante spettrometria. Tale metodica di determinazione non risulta però essere specifica per la creatinina poiché potrebbe dar luogo a delle positività legate alla presenza di proteine, glucosio, acido ascorbico, corpi chetonici, acido piruvico, e cefalosporine. Oltre alle interferenze appena citate, la metodica di Jaffe è influenzata anche dal pH, dalla temperatura, dalla concentrazione di acido picrico, dai tempi di reazione e dalla lunghezza d'onda in cui viene letta la produzione del composto colorato. Per porre rimedio alle interferenze dovute all'applicazione di tale metodica, sono stati introdotti metodi di determinazione della creatinina basati su saggi enzimatici i quali, sfruttano l'attività della creatinasi, della creatinasi o della creatina deaminasi accoppiate a reazioni che producono dei prodotti misurabili mediante uno spettrometro, quali la reazione $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ o quella $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$. Sia le tecniche enzimatiche che quelle effettuate attraverso il metodo di Jaffe sono utilizzabili per il dosaggio della creatinina su plasma siero ed urine⁶⁰.

Tuttavia, il dosaggio della creatininemia è un test poco sensibile in particolar modo per riduzioni importanti del GFR: valori di creatininemia da ritenersi ai limiti superiori della norma in un giovane adulto sano, dotato di massa muscolare molto sviluppata, possono corrispondere ad una riduzione significativa del filtrato glomerulare in un soggetto anziano con massa muscolare ridotta. Le linee guida KDIGO 2012 nella valutazione della funzione renale raccomandano di refertare la creatinina unitamente al calcolo della stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) poiché il dosaggio della creatininemia non è in grado di individuare con sufficiente accuratezza lo stadio funzionale della Malattia Renale Cronica (MRC), soprattutto nei primi stadi della malattia. Infatti, la misura della creatinina non correla linearmente con la gravità dell'affezione, mentre la stima dell'eGFR mostra una correlazione lineare con la gravità dell'affezione.

L'utilizzo dell'equazione eGFR permette di superare l'alta probabilità di errore pre-analitico legato alla raccolta delle urine 24 ore (es. inadeguata raccolta, approssimativa determinazione del volume urinario, errata conservazione del campione) consentendo una stima più affidabile del filtrato. La richiesta della Clearance della creatinina per investigare la funzionalità renale rimane

appropriata solo per i casi in cui non è validata la formula dell'eGFR (cioè per i pazienti con età < 18 anni e > 70 anni).

Sono state sviluppate numerose formule per la stima della GFR basate sulla creatininemia, le più importanti delle quali sono le equazioni Cockcroft–Gault, “Modification of Diet in Renal Disease” (MDRD) e “Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration” (CKD-EPI) per gli adulti e la formula di Schwartz per l'età pediatrica⁶¹.

Tali equazioni sono facilmente applicabili allo screening della popolazione afferente al Laboratorio e non necessitano di particolari misure antropometriche, ma presentano delle limitazioni. Recenti studi hanno evidenziato come la misura della eGFR con formula MDRD sia sufficientemente accurata solo per valori < 60 mL/min/1,73 m² e sottostimi quando i valori di creatinina sono all'interno dell'intervallo di riferimento o “vicino” ai range di normalità^{62,63}; le formule di Cockcroft–Gault e Schwartz invece sovrastimano la GFR, sempre a basse concentrazioni di creatinina. Per questo le KDIGO 2012 indicano l'impiego dell'equazione CKD-EPI⁶², in quanto fornisce dati più accurati nell'intervallo di eGFR compreso tra 60 e 90 ml/min/1.73m². Un'appropriata prescrizione degli esami di laboratorio per l'investigazione della MRC, e quindi la richiesta dell'eGFR accanto alla creatininemia assume una certa urgenza vista la prevalenza della MRC nei paesi occidentali (circa il 20%). Inoltre, la MRC è in crescente aumento nella classifica mondiale di mortalità per le patologie croniche (è passata dal 38° al 19° posto negli ultimi 10 anni secondo dati pubblicati su “the Lancet”)⁶⁴. Come suggerito dalle KDIGO, la stima dell'eGFR, l'utilizzo di intervalli di riferimento stratificati⁶⁵ e l'impiego dei due decimali per la creatinina sono degli elementi indispensabili per garantire una diagnosi appropriata da parte dei laboratori consentendo l'adeguata classificazione clinica del paziente.

Per quanto riguarda invece la classificazione del danno renale acuto (AKI), sono state sviluppate due proposte: i criteri AKIN (“Acute Kidney Injury Network”) e RIFLE (“Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage renal disease”) che si basano sulla diminuzione dell'eGFR dedotta dalle modificazioni della creatininemia. Secondo tali criteri si ha un iniziale danno renale nel caso di un aumento della creatinina sierica $\geq 0,3$ mg/dL o aumento di 1,5-2 volte rispetto

al valore basale, o in caso di una diminuzione dell'eGFR di almeno il 25%,^{65,66} anche se i valori di creatinina si trovano ancora all'interno dell'intervallo di riferimento.

La valutazione dell'aumento di creatinina rispetto a precedenti valori basali in risultati seriali di uno stesso paziente riflette l'importanza della variabilità biologica per la creatinina.

3.2 Ruolo della creatinina e la valutazione dell'eGFR (estimated Glomerular Filtration Rate) nell'analisi del danno renale precoce

Il rene è un organo che svolge sia una funzione escretoria che endocrina, ed è coinvolto nella regolazione del volume e della composizione dei liquidi corporei. A tal proposito, un'alterazione delle sue funzioni fisiologiche comporterebbe l'insorgenza di squilibri idroelettrolitici, alterazioni dell'equilibrio acido-base e della regolazione del calcio e del fosforo. Il rene svolge principalmente quattro funzioni essenziali ovvero:

- partecipa alla regolazione dell'equilibrio idroelettrolitico mediante l'escrezione selettiva di acqua ed elettroliti in modo da bilanciare l'apporto esterno e la produzione interna;

- regola la produzione, l'assorbimento e l'escrezione di acidi e basi;

- elimina alcuni prodotti del metabolismo (urea, creatinina, acido urico ecc.);

- produce ormoni che intervengono nella regolazione del circolo ematico e renale (renina, angiotensina, prostaglandine), nella produzione dei globuli rossi (eritropoietina) e nella regolazione del metabolismo fosfocalcico (calcitriolo).

Dunque, una corretta funzione renale è essenziale per la fisiologica omeostasi corporea. Negli anni sono stati proposti dalla letteratura differenti e nuovi bio-markers per la valutazione e il monitoraggio della funzionalità e del danno renale^{34,35,36,37}. La stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR)³⁸ è utilizzata come strumento di indagine nei pazienti con malattia renale sospetta o nella valutazione prognostica durante il monitoraggio nel tempo della malattia renale cronica (CKD) conclamata. Ad oggi, il ruolo della eGFR è ampiamente consolidato, sia

come strumento ad uso del Laboratorio e del Clinico, come dimostrato e documentato dalla Letteratura prodotta dalle più importanti Società scientifiche nazionali^{39,40,41} e internazionali, le quali hanno stilato una serie di Linee Guida, che investono sia il ruolo del Laboratorio che quello del Clinico.

A livello nazionale, le *Opinioni* SIBioC (Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare) e le raccomandazioni congiunte con SIMeL (Società Italiana di Medicina di Laboratorio) e SIC (Società Italiana di Nefrologia)^{40,41,42} esprimono la posizione delle Società in materia e le linee guida internazionali KDIGO 2012 (Kidney Disease Improving Global Outcomes)⁴³, NKDEP⁴⁴ e National Kidney Foundation⁴⁵ hanno come scopo e obiettivo quello di definire e classificare la malattia cronica renale (CKD) e fornire una guida ragionata per la gestione clinica e di laboratorio del paziente con CKD.

L'equazione maggiormente utilizzata per la stima della GFR (eGFR) è quella proposta dal Gruppo di Studio MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) la quale è riportata nel referto associata alla misura della creatinina sierica. Di recente, importanti studi hanno riportato che questa equazione sottostima la GFR quando la creatinina è all'interno dell'intervallo di riferimento o "vicino" ai valori di normalità. La comparazione tra l'equazione MDRD con una nuova equazione proposta dal Gruppo CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) conclude che sia globalmente che in particolari sottogruppi delle popolazioni studiate (prese in esame), come quella con elevati valori di filtrato, la CKD-EPI risulta più accurata rispetto a MDRD⁴⁶.

Nonostante l'impegno profuso da tutte le citate Società Scientifiche, gli sforzi per proporre equazioni quanto più possibilmente attendibili per la stima della GFR nel corso del tempo e soprattutto il grande sforzo fatto dai Laboratori per il miglioramento dell'accuratezza della determinazione della creatinina sierica^{47,48,49,50} e nella stratificazione degli intervalli di riferimento⁵¹, come quelli proposti dal IFCC Committee on Reference

Interval and Decision Limit (C-RIDL), esiste ancora oggi una diffusa percezione negativa del valore e del ruolo della creatinina sierica. Il razionale che ha portato all'adozione e utilizzo delle equazioni proposte da vari e autorevoli gruppi di studio è il fatto che esse siano facilmente applicabili allo screening della popolazione ambulatoriale e che richiedono la conoscenza di soli 4 parametri. In realtà ne costituisce un grosso limite. In tre differenti lavori, Dalton RN⁵², Fraser C⁵³ e Ceriotti F⁵⁴, mettono in luce il ruolo principale della misura e attendibilità della creatinina nella valutazione della malattia renale, "demolendo" alcuni dei luoghi comuni relativi alla stima e all'appropriato utilizzo di questo analita. In particolare, l'assunto per il quale la concentrazione della creatinina sierica non superi il limite superiore degli intervalli di riferimento fino a quando la funzione glomerulare nel rene non si riduce del 50%, deriva dai risultati di un unico lavoro originale di Shemesh et al.,⁵⁵ in cui il limite superiore era posto a 1,4 mg/dL ed espresso con un solo decimale. In un lavoro più recente, Spanaus et al.⁵⁶ non solo hanno dimostrato che la misura della creatinina sierica è equivalente a quella della Cistatina C e β -trace protein nella valutazione della funzionalità renale, ma che la misura della eGFR calcolata mediante equazione MDRD con i nuovi marcatori non è più accurata rispetto all'utilizzo dei nuovi biomarkers. La misura della creatinina effettuata con metodica standardizzata, sia enzimatica (gold standard) che colorimetrico-cinetico, assieme all'utilizzo di adeguati intervalli di riferimento stratificati⁵¹ per genere e l'impiego di due decimali a referto, consentono non solamente una accurata misura di laboratorio ma una adeguata classificazione clinica del paziente e delle prestazioni perfettamente sovrapponibili ai risultati ottenuti con le formule CKD-EPI e MDRD per la misura della eGFR. Alla luce dei limiti mostrati delle equazioni CKD-EPI, MDRD, dei nuovi biomarkers proposti per la valutazione del danno renale e soprattutto del "nuovo ruolo" riacquisito dalla determinazione della creatinina sierica eseguita in condizioni ottimali con l'adozione dei intervalli di riferimento appropriati e alla misura della Variabilità Analitica, lo scopo del lavoro portato avanti dal Laboratorio del P.O. di San Gavino Monreale è stato

confrontare in maniera retrospettiva le performance ottenute dalla stima della eGFR con le formule MDRD e CKD-EPI con i risultati della applicazione delle Reference Change Value (RCV) ai risultati in serie di creatinina in due gruppi di pazienti per la diagnosi precoce di danno renale:

- Gruppo 1: Pazienti in cui la stima eGFR non è appropriata, come ad esempio per gli over 70 anni, donne in gravidanza, condizioni di comorbidità alla CKD, soggetti con masse corporee estreme o particolari *status* nutrizionali.
- Gruppo 2: Pazienti con valori di creatinina ancora all'interno degli Intervalli di Riferimenti (IR) e valori di eGFR nella norma, che hanno in seguito sviluppato CKD.

L'utilizzo della creatinina sierica quale efficace marcatore di danno renale è possibile grazie alla sua marcata individualità biologica (Indice di Individualità < 0.6), come mostrato in figura 2.5.

Materiali e Metodi

3.3 Creatinina standardizzata e la misura della Variabilità Analitica

Si è tenuto sotto controllo la performance analitica del Laboratorio per un anno, stimando mensilmente la Variabilità Analitica CV_A del nostro Laboratorio, elaborando i dati forniti dalla misura quotidiana dei Controlli di Qualità (CQ) di terza parte (Bio-Rad Laboratories)² per la creatinina. Si è provveduto quindi a misurare la Differenza Critica valutata in

² Il nostro laboratorio, sempre nella visione di un controllo di qualità allargato, è collegato alla comunità dei laboratori clinici a livello mondiale tramite il software Unity Real Time 2.0 della ditta Bio-Rad, fornitrice dei controlli di qualità in uso all'interno del nostro laboratorio. Unity rappresenta un nuovo sistema informatico di controllo di qualità, il quale consente di monitorare sia l'andamento giornaliero dei nostri risultati ma anche di confrontare questi dati con un gruppo di consenso omogeneo per metodo e strumento. Questo confronto permette la valutazione in tempo reale dell'accuratezza delle analisi. Per questo motivo, le informazioni fornite dal CQA consentono una valutazione statistica di bias e imprecisione in tempi molto brevi concedendo la possibilità di compiere delle correzioni simultanee ad eventuali errori sul controllo di qualità interno.

Laboratorio, o RCV, per la creatinina sierica utilizzando i dati di Variabilità Biologica CV_B^{57} tratti dal database di Ricos C et al.³¹. La misura dei Controlli di Qualità di terza parte (Bio-Rad Laboratories) della creatinina è stata effettuata su strumentazione Architect i8200SR (Abbott) utilizzando il metodo modificato cinetico di Jaffe al picrato alcalino.

Figura 3.1: *Strumento Architect i8200SR (Abbott) dell'Ospedale di San Gavino M.le utilizzato per le analisi.*



NAME

CREATININE

INTENDED USE

The Creatinine assay is used for the quantitation of creatinine in human serum, plasma, or urine.

SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

In 1886 Jaffe developed an assay for creatinine based upon the reaction between creatinine and sodium picrate.¹ In 1904 Folin² used this reaction for the quantitative determination of creatinine in urine. Kinetic procedures based on the observed reaction rates of various substances, including creatinine, with alkaline picrate have been proposed by Fabiny³ and Soldin.⁴ This improved Jaffe chemistry is a kinetic procedure which does not require deproteinization of the sample and is formulated to reduce the interference of serum proteins.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

At an alkaline pH, creatinine in the sample reacts with picrate to form a creatinine-picrate complex. The rate of increase in absorbance at 500 nm due to the formation of this complex is directly proportional to the concentration of creatinine in the sample.

Methodology: Alkaline Picrate

REAGENTS

Reagent Kit

[REF] 7D64 Creatinine is supplied as a liquid, ready-to-use, two-reagent kit which contains:

- [R1]** 10 x 84 mL
- [R2]** 10 x 25 mL

Estimated tests per kit: 3,622

Calculation is based on the minimum reagent fill volume per kit.

Reactive Ingredients	Concentration
[R1] Sodium Hydroxide	0.25 mol/L
[R2] Picric Acid	20.5 mmol/L

REAGENT HANDLING AND STORAGE

Reagent Handling

Remove air bubbles, if present in the reagent cartridge, with a new applicator stick. Alternatively, allow the reagent to sit at the appropriate storage temperature to allow the bubbles to dissipate. To minimize volume depletion, do not use a transfer pipette to remove the bubbles.

CAUTION: Reagent bubbles may interfere with proper detection of reagent level in the cartridge, causing insufficient reagent aspiration which could impact results.

Reagent Storage

Unopened reagents are stable until the expiration date when stored at 15 to 30°C.

Reagent stability is 6 days if the reagent is uncapped and onboard.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Precautions for Users

- For in vitro diagnostic use.
- Do not use components beyond the expiration date.
- Do not mix materials from different kit lot numbers.
- [R1]** contains sodium hydroxide and is classified per applicable European Community (EC) Directives as: Corrosive (C). The following are the appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases:



- R34 Causes burns.
- S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
- S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
- S36/37/39 Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
- S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

- CAUTION:** This product requires the handling of human specimens. It is recommended that all human sourced materials be considered potentially infectious and handled in accordance with the OSHA Standard on Bloodborne Pathogens⁵. Biosafety Level 2⁶ or other appropriate biosafety practices^{7,8} should be used for materials that contain or are suspected of containing infectious agents.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Suitable Specimens

Serum, plasma, and urine are acceptable specimens.

- Serum:** Use serum collected by standard venipuncture techniques into glass or plastic tubes with or without gel barriers. Ensure complete clot formation has taken place prior to centrifugation. Separate serum from red blood cells or gel as soon after collection as possible.
Some specimens, especially those from patients receiving anticoagulant or thrombolytic therapy, may take longer to complete their clotting processes. Fibrin clots may subsequently form in these sera and the clots could cause erroneous test results.
- Plasma:** Use plasma collected by standard venipuncture techniques into glass or plastic tubes. Acceptable anticoagulants are lithium heparin (with or without gel barrier) and sodium heparin. Ensure centrifugation is adequate to remove platelets. Separate plasma from red blood cells or gel as soon after collection as possible.
- Urine:** Collect with no preservative. Random specimens or specimens timed over intervals shorter than 24 hours are acceptable for analysis. The reference ranges provided are for 24 hour excretion.

Refer to the specimen collection tube manufacturer's instructions for processing and handling requirements.

For total sample volume requirements, refer to the instrument-specific ASSAY PARAMETERS section of this package insert and Section 5 of the instrument-specific operations manual.

Specimen Storage

Serum, plasma, and urine

Temperature	Maximum Storage		Bibliographic Reference
	Serum/Plasma	Urine	
20 to 25°C	7 days	2 days	9
2 to 8°C	7 days	6 days	9, 10
-20°C	3 months	6 months	9

Guder et al.⁹ suggest storage of frozen specimens at -20°C for no longer than the time intervals cited above. However, limitations of laboratory equipment make it necessary in practice for clinical laboratories to establish a range around -20°C for specimen storage. This temperature range may be established from either the freezer manufacturer's specifications or your laboratory standard operating procedure(s) for specimen storage.

NOTE: Stored specimens must be inspected for particulates. If present, mix and centrifuge the specimen to remove particulates prior to testing.

PROCEDURE

Materials Provided

[REF] 7D64 Creatinine Reagent Kit

Materials Required but not Provided

- [REF]** 1E65 Multiconstituent Calibrator, **[CAL1-2]** 3 x 5 mL
- Control Material
- Saline (0.85% to 0.90% NaCl) for specimens that require dilution

Assay Procedure

For a detailed description of how to run an assay, refer to Section 5 of the instrument-specific operations manual.

Specimen Dilution Procedures

The ARCHITECT cSystems and the AEROSSET System have automatic dilution features; refer to Section 2 of the instrument-specific operations manual for additional information.

Serum and plasma: Specimens with creatinine values exceeding 38.7 mg/dL (3,421 µmol/L) are flagged and may be diluted using the Automated Dilution Protocol or the Manual Dilution Procedure.

Urine: Urine samples are automatically diluted 1:20 by the system using the Standard dilution option, then the system automatically corrects the concentration by multiplying the result by the appropriate dilution factor. This dilution extends urine Creatinine linearity to 757.0 mg/dL (66.9 mmol/L). Samples exceeding this concentration are flagged and may be diluted with the Automated Dilution Protocol or the Manual Dilution Procedure.

Automated Dilution Protocol

If using the Automated Dilution Protocol, the system performs a dilution of the specimen and automatically corrects the concentration by multiplying the result by the appropriate dilution factor. To set up the Automatic Dilution feature, refer to Section 2 of the instrument-specific operations manual for additional information.

Figura 3.2: Inserto descrittivo della Creatinina per l'utilizzo in Architect i8200SR (Abbott) dell'Ospedale di San Gavino M.le

PROCEDURE (Continued)

Manual Dilution Procedure

Manual dilutions should be performed as follows:

- Use saline (0.85% to 0.90% NaCl) to dilute the sample.
- The operator must enter the dilution factor in the patient or control order screen. The system uses this dilution factor to automatically correct the concentration by multiplying the result by the entered factor.
- If the operator does not enter the dilution factor, the result must be multiplied by the appropriate dilution factor before reporting the result.

NOTE: If a diluted sample result is flagged indicating it is less than the linear low limit, do not report the result. Rerun using an appropriate dilution.

For detailed information on ordering dilutions, refer to *Section 5* of the instrument-specific operations manual.

CALIBRATION

Calibration is stable for 24 hours and is required with each change in reagent lot number. Verify calibration with at least two levels of controls according to the established quality control requirements for your laboratory. If control results fall outside acceptable ranges, recalibration may be necessary.

For a detailed description of how to calibrate an assay, refer to *Section 6* of the instrument-specific operations manual.

For information on calibrator standardization, refer to the Multiconstituent Calibrator package insert.

QUALITY CONTROL

The following is the recommendation of Abbott Laboratories for quality control. As appropriate, refer to your laboratory standard operating procedure(s) and/or quality assurance plan for additional quality control requirements and potential corrective actions.

- Two levels of controls (normal and abnormal) are to be run every 24 hours.
- If more frequent control monitoring is required, follow the established quality control procedures for your laboratory.
- If quality control results do not meet the acceptance criteria defined by your laboratory, patient values may be suspect. Follow the established quality control procedures for your laboratory. Recalibration may be necessary.
- Review quality control results and acceptance criteria following a change of reagent or calibrator lot.

RESULTS

Refer to the instrument-specific operations manual for information on results calculations.

- **ARCHITECT System Operations Manual—Appendix C**
- **AEROSET System Operations Manual—Appendix A**

Representative performance data are given in the EXPECTED VALUES and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections of this package insert. Results obtained in individual laboratories may vary.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Refer to the SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections of this package insert.

EXPECTED VALUES

Reference Range

Serum/Plasma ¹¹	Range (mg/dL)	Range (μmol/L)
Cord	0.6 to 1.2	53 to 106
Newborn, 1 to 4 days	0.3 to 1.0	27 to 88
Infant	0.2 to 0.4	18 to 35
Child	0.3 to 0.7	27 to 62
Adolescent	0.5 to 1.0	44 to 88
Adult, Male	0.7 to 1.3	62 to 115
Adult, Female	0.6 to 1.1	53 to 97

To convert results from mg/dL to μmol/L, multiply mg/dL by 88.4.

Urine ¹¹	Range (mg/kg/day)	Range (μmol/kg/day)
Infant	8 to 20	71 to 177
Child	8 to 22	71 to 194
Adolescent	8 to 30	71 to 265
Adult, Male	14 to 26	124 to 230
Adult, Female	11 to 20	97 to 177

Declines with age to 10 mg/kg/day at age 90

EXPECTED VALUES

Reference Range (Continued)

To convert results from mg/kg/day to μmol/kg/day, multiply mg/kg/day by 8.84.

It is recommended that each laboratory determine its own reference range based upon its particular locale and population characteristics.

24 Hour Urinary Excretion, adjusted per kg body weight

To convert results from mg/dL to mg/kg/day (24 hour urinary excretion)

Where: V = 24 hour urine volume (mL)
 c = analyte concentration (mg/dL)
 W = body weight in kg

$$24 \text{ hour excretion} = [(V \times c) + (W \times 100)] \text{ mg/kg/day}$$

To convert results from mmol/L to μmol/kg/day (24 hour urinary excretion)

Where: V = 24 hour urine volume (mL)
 c = analyte concentration (mmol/L)
 W = body weight in kg

$$24 \text{ hour excretion} = [(V \times c) + W] \text{ μmol/kg/day}$$

24 Hour Urinary Excretion, not adjusted per kg body weight

To convert results from mg/dL to mg/day (24 hour urinary excretion)

Where: V = 24 hour urine volume (mL)
 c = analyte concentration (mg/dL)

$$24 \text{ hour excretion} = [(V \times c) + 100] \text{ mg/day}$$

To convert results from mmol/L to mmol/day (24 hour urinary excretion)

Where: V = 24 hour urine volume (mL)
 c = analyte concentration (mmol/L)

$$24 \text{ hour excretion} = [(V \times c) + 1000] \text{ mmol/day}$$

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Linearity

Creatinine serum is linear up to 38.7 mg/dL (3.421 μmol/L). Creatinine urine is linear up to 757.0 mg/dL (66.9 mmol/L). Linearity was verified using Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol NCCLS EP6-P.¹²

Limit of Detection (LOD)

The LOD for Creatinine serum is 0.05 mg/dL (4.5 μmol/L). The LOD for Creatinine urine is 1.35 mg/dL (0.12 mmol/L). The LOD is the mean concentration of an analyte-free sample + 2 SD, where SD = the pooled, within-run standard deviation of the analyte-free sample.

Limit of Quantitation (LOQ)

The LOQ for Creatinine serum is 0.20 mg/dL (17.7 μmol/L). The LOQ for Creatinine urine is 4.20 mg/dL (0.38 mmol/L). The LOQ is the analyte concentration at which the CV = 20%.

Interfering Substances

Interference studies were conducted using CLSI protocol NCCLS EP7-P.¹³ Interference effects were assessed by Dose Response and Paired Difference methods, at the medical decision level of the analyte.

Interfering Substance	Interferent Concentration	N	Target (mg/dL)	Observed (% of Target)
Bilirubin	3.8 mg/dL (65 μmol/L)	3	1.4	91.9
	7.5 mg/dL (128 μmol/L)	3	1.4	84.4
Hemoglobin	500 mg/dL (5.0 g/L)	4	1.2	109.7
	750 mg/dL (7.5 g/L)	4	1.2	110.9
Intralipid	750 mg/dL (7.5 g/L)	4	1.3	93.4
	1,000 mg/dL (10.0 g/L)	4	1.3	93.4
Ascorbate	1.5 mg/dL (85 μmol/L)	4	1.4	99.3
	3.0 mg/dL (170 μmol/L)	4	1.4	99.4
Glucose	300 mg/dL (17 mmol/L)	4	1.4	105.8
	600 mg/dL (33 mmol/L)	4	1.4	112.1
Protein	9 g/dL (90 g/L)	4	1.4	108.9
	12 g/dL (120 g/L)	4	1.4	117.1

Con questa metodica, la creatinina presente nel siero reagisce, in ambiente alcalino, col picrato formando un complesso creatinina-picrato, misurata ad una assorbanza di 500 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla formazione del complesso che a sua volta è direttamente proporzionale alla concentrazione nel siero della creatinina.

A tal proposito, è utile fare una parentesi su come l'assorbanza può essere determinata in base alla legge di Lambert-Beer. Quest'ultima correla la quantità di luce assorbita da una sostanza con la sua concentrazione, con la sua natura chimica e con lo spessore del mezzo attraversato. Una luce (poli- o monocromatica) che colpisce una soluzione contenente una certa quantità di una sostanza chimica, perde parte della sua energia in modo direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza nella soluzione stessa e alla dimensione dello spessore di soluzione che deve attraversare, il tutto corretto per un parametro costante per ogni sostanza detto coefficiente di estinzione molare:

$$A = \epsilon_{\lambda} Cl$$

dove A è l'assorbanza ed esprime la quantità di luce assorbita, C è la concentrazione della specie in esame espressa generalmente in moli/L, l il cammino della luce attraverso la soluzione generalmente espresso in centimetri e ϵ_{λ} è un coefficiente caratteristico detto di estinzione molare, o assorbività molare, espresso in $\text{moli}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Per la determinazione della concentrazione dei metaboliti si utilizza uno standard a concentrazione nota applicando l'equazione derivante dalla legge di Lambert Beer:

$$C_c = \frac{A_c}{A_s} \times C_s$$

Dove:

C	Concentrazione del substrato nel campione
C _s	Concentrazione del substrato nello standard
A _C	Assorbanza del campione
A _S	Assorbanza dello standard

$$\frac{A_C}{A_S} = \frac{C_C}{C_S}$$

Quando non si può ricorrere all'impiego di uno standard, la concentrazione può essere determinata direttamente con l'impiego che il coefficiente di estinzione punto si dovrà poi tener conto del volume (V) della miscela di reazione e del volume del campione (v).

$$C = \frac{A}{\epsilon \times l} \times \frac{V}{v}$$

La calibrazione del metodo è effettuata con un calibratore multi-costituente preparato a partire da matrice umana commutabile. La tracciabilità del calibratore secondo quanto prevedono le procedure di Riferibilità Metrologica, è standardizzata dal NIST (*National Institute of Standard and Technology*) utilizzando come materiale di riferimento lo *Standard Reference Material* SRM 967 e 914 ed eseguito mediante metodo di riferimento IDMS (*Isotope Dilution Mass Spectrometry*).

La tenuta sotto controllo della performance analitica del metodo/strumento e la misura della nostra imprecisione analitica CV_A è stata possibile misurando ed elaborando i risultati di CQ mediante un software dedicato: UNITY Interlaboratory Program (Bio-Rad). Si sono dunque confrontati i dati di imprecisione CV_A con i traguardi analitici (analytical goals AG) derivati dalla Variabilità Biologica CV_B³¹ per la creatinina mediante formula di Fraser^{30,32}.

I due gruppi di pazienti presi in considerazione sono stati valutati nel seguente modo:

- Nel Gruppo 1 si è posto e valutato 60 pazienti adulti, 16 sotto i 70 anni e 44 oltre 70 anni, i quali mostravano alle prime osservazioni almeno 2 valori consecutivi di creatinina sierica all'interno di RI che solamente in seguito si è mossa oltre il limite superiore di RI. Per tutti i pazienti appartenenti al Gruppo è stata stimata la eGFR secondo entrambe le equazioni MDRD e CKD-EPI che sono state confrontate con i valori di Differenza Critica, RCV, di ciascun paziente⁵⁸.

Nel Gruppo 2 si è posto e valutato 62 pazienti (36 M, 26 F) che hanno mostrato inizialmente almeno 2 valori consecutivi di creatinina sierica all'interno di IR e solo in seguito hanno sviluppato una manifesta CKD con valori di creatininemia ben al di sopra del limite superiore degli IR⁵⁹.

Risultati

3.4 Reference Change Value ed eGFR

I risultati di questo lavoro sono stati tratti dai valori di creatinina sierica che sono presenti sul LIS, ovvero Laboratory Information System (Sistema Informatico di Laboratorio). Tali risultati provengono da pazienti afferenti all'ospedale "Nostra Signora di Bonaria" di San Gavino Monreale che sono stati ricoverati in reparti di lungo degenza come quello di Medicina Generale, Chirurgia Generale, Ortopedia, Terapia Intensiva e Rianimazione e i cui esami sono presenti nel laboratorio stesso. Durante lo studio di questo lavoro, poiché nel gruppo 1 la percentuale di soggetti maschi superava di gran lunga quella dei soggetti di sesso femminile, si è reputato non significativo stratificare i risultati per genere ma al contrario si è deciso di creare un solo gruppo monitorando unicamente l'andamento in evoluzione della creatinina. Per ciascuno di questi pazienti è stato monitorato l'andamento di tre valori consecutivi di

creatinina ovvero, sono stati considerati i valori di creatinina dei pazienti ricoverati per almeno tre giorni e per poter avvalorare la nostra tesi sono stati presi in considerazione i pazienti che riportavano un incremento di creatinina sierica con almeno due risultati consecutivi all'interno dell'intervallo di riferimento e solamente il terzo risultato sopra il limite superiore di riferimento della creatinina stessa. Nel gruppo 1, l'età dei pazienti era maggiore di 70 anni, perciò, l'utilizzo in questo caso delle RCV è stata utile per capire se quello spostamento all'interno dell'intervallo di riferimento potesse essere ricollegato a qualche fenomeno patologico e se il paziente abbia sviluppato in modo più o meno grave una insufficienza renale. Oltre ai valori consecutivi di creatinina si è calcolata la stima del filtrato glomerulare eGFR, secondo la formula sia MDRD che CKD-EPI, le quali mostrano in maniera più precisa rispetto alla sola determinazione della creatinina una riduzione del filtrato. Quindi è un utile mercatore di danno renale, e nei casi più importanti di insufficienza renale. Oltre l'utilizzo delle formule sulla stima del filtrato, è stata utilizzata il calcolo della Differenza Critica RCV per dimostrare se vi fosse una differenza statisticamente significativa tra valori consecutivi di creatinina, quando questi erano, per almeno due misurazioni all'interno degli intervalli di riferimento. Nel Gruppo 1 la concentrazione media dei valori QC della creatinina è stata di 0,59 mg/dL e la sua Variabilità Analitica CV_A media annuale di 1,5%, confrontato col traguardo ottimale (AG ottimale di 1,5%). RCV calcolato per la creatinina era 17,2% ($z = 1.96$; $p < 0.05$). La RCV calcolata per tutti i risultati di creatinina dei pazienti del Gruppo 1 ha mostrato un cambiamento significativo ($> 17,2\%$) in 34 pazienti (55% dei casi), in particolar modo quando i livelli di creatinina erano all'interno dell'Intervallo di Riferimento e il valore del filtrato glomerulare eGFR

> 60 mL/min/1,73m². Nel Gruppo 2 la concentrazione media dei valori di QC della creatinina è stata di 0,59 mg/dL e la sua Variabilità Analitica CV_A media annuale di 1,5% confrontato col traguardo ottimale (AG ottimale: 1,5%) come nel precedente Gruppo. Anche in questo caso la RCV per la creatinina era 17,2% (z = 1.96; p <0.05). In tutti i casi analizzati RCV correlava con le informazioni sul filtrato ottenute dalle due equazioni MDRD e CKD-EPI. L'applicazione della RCV ha mostrato un cambiamento significativo nei valori di creatininemia nel 50% dei 60 casi (stratificazioni per età 8 pazienti <70 anni, 22 pazienti >70 anni) con mediana per la creatinina di 1,10 mg/dL. In questa percentuale di paziente è da evidenziare come i valori di creatinina erano ancora all'interno dell'Intervallo di Riferimento e la misura di eGFR era ancora normale (> 60 mL/min/1,73 m²).

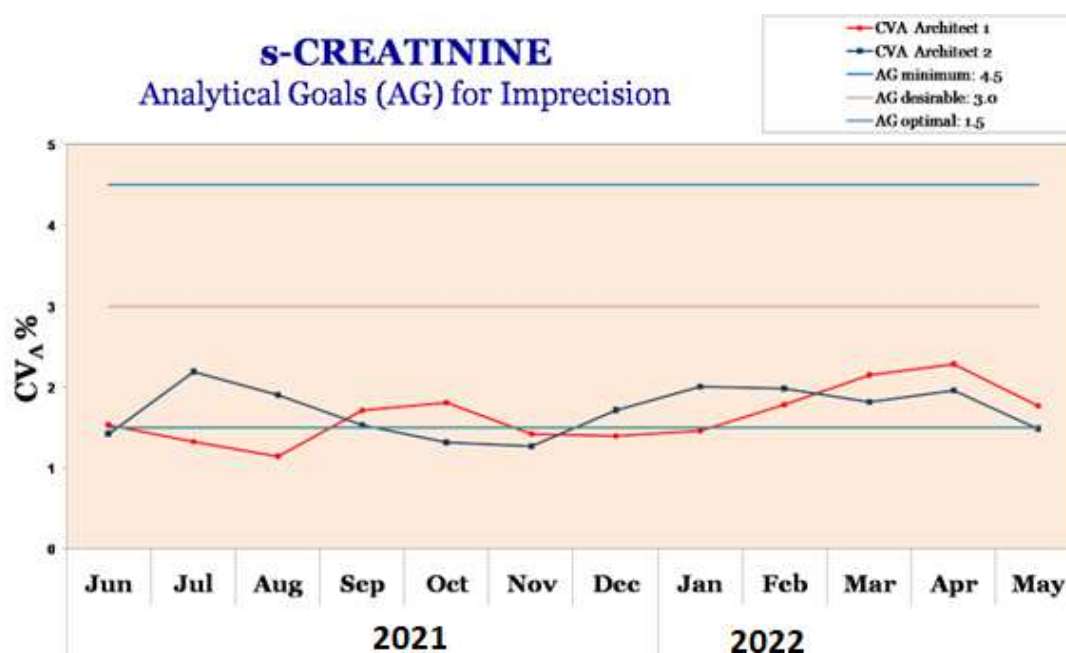


Figura 3.3: Coefficiente variazione analitico (CV_A %), fonte: Laboratory Information System dell'Ospedale di San Gavino M.le.

La figura 3.3 ci mostra l'andamento del CV_A % della creatinina sierica durante l'arco di un anno e tali dati sono stati ottenuti dall'esecuzione giornaliera del controllo di terza parte Bio-Rad. La linea rossa e la linea blu rappresentano i due strumenti gemelli Architect ci8200, appartenenti all'azienda Abbott presenti all'interno del laboratorio di Patologia clinica dell'ospedale di San

Gavino Monreale, i quali utilizzano il metodo cinetico modificato al picrato alcalino (reazione di Jaffe).

Le tre linee rette orizzontali rappresentano i traguardi analitici (Analytical Goal AG): il traguardo più basso indicato dal colore verde rappresenta l'ottimale, il secondo indicato dal colore arancio è quello desiderabile e il terzo indicato dal colore blu è quello minimo. Dal grafico si evidenzia che per entrambi gli strumenti, l'andamento del CV_A % durante tutto l'anno si attesta attorno al traguardo analitico ottimale. Ciò indica che entrambi gli strumenti possiedono un'ottima performance analitica.

Days	1	2	3	4	7
s-Creatinine mg/dL ($\mu\text{mol/L}$)	0.63 (56)	0.83 (73)	1.09 (97)	1.31 (116)	3.57 (316)
eGFR MDRD (mL/min/1.73 m ²)	91	66	48	39	12
% RCV s-Creatinine		31.8	32.5	19.1	172.5

Figura 3.4: Monitoraggio di un caso clinico: determinazioni a confronto, fonte: dati elaborati dal Laboratory Information System dell'Ospedale di San Gavino M.le.

I.R.
0.57 – 1.11 mg/dL
> 60 mL/min/1.73m²

Figura 3.5: Intervalli di riferimento relativi alla creatinina sierica e all' eGFR nel Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale di San Gavino M.le fonte: Laboratory Information System dell'Ospedale di San Gavino M.le

Un esempio significativo è rappresentato dal caso clinico rappresentato nella tabella 3.4. Da quest'ultima si evince sia l'andamento della concentrazione di creatinina sierica dal giorno 1 al giorno 7 espressa in mg/dL e in mmol/L, sia i valori di filtrato glomerulare stimato (eGFR) secondo la formula MDRD e i valori di Differenza Critica (RCV) durante tutto il periodo osservato.

Ciò che è opportuno evidenziare è che nei primi tre giorni la creatinina sierica ha avuto un andamento incrementale ma sempre all'interno degli intervalli di riferimento mentre dal quarto giorno i valori si sono attestati fin sopra il limite superiore dell'intervallo di riferimento.

Valutando, invece, la formula relativa all'andamento dell'eGFR, si evince una riduzione del filtrato già dal terzo giorno, quindi più precoce rispetto al solo utilizzo della creatinina sierica.

Mentre se si utilizza il Calcolo delle Differenza Critica (RCV), il valore di RCV calcolato presso il Laboratorio dell'Ospedale di San Gavino M.le il cui dato risulta essere statisticamente significativo oltre il valore di 17, è possibile stimare un precoce danno renale già a partire dal secondo giorno di ricovero, in quanto il valore di RCV è già oltre 32 a partire dal secondo giorno. L'utilità e la precocità di questo strumento di calcolo risultano di particolare ausilio nel monitoraggio del danno renale in quanto il paziente sviluppa un danno renale acuto al settimo giorno come è visibile dalla concentrazione elevata di creatinina sierica.

Conclusioni

I nostri dati evidenziano come l'RCV per i valori di creatinina sierica correli in tutti i casi con le informazioni sulla stima del filtrato fornite dalle equazioni MDRD e CKD-EPI, supportando così l'attendibilità delle informazioni tratte dai dati di RCV. Inoltre la stima dell'RCV risulta essere più accurata e di gran lunga più sensibile della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) nel predire precocemente un iniziale danno renale. In particolare, è da notare come l'RCV evidenzi cambiamenti precoci della funzione renale, che si possono verificare anche quando i valori di creatinina rientrano nell'intervallo di riferimento. Dai nostri dati risulta che l'utilizzo di RCV associato ai valori di creatinina sierica permette il

monitoraggio della funzionalità renale anche nei pazienti con età superiore ai 70 anni, quindi potrebbe rappresentare uno strumento utile anche in quelle condizioni in cui la stima di eGFR non è applicabile secondo le Linee Guida, quali pazienti anziani, le donne in gravidanza, condizioni di comorbidità associate alla MRC e soggetti con masse corporee estreme o con particolari status nutrizionali. L'RCV non risente infatti dei limiti intrinseci delle equazioni stesse per la stima di eGFR. L'impiego delle RCV potrebbe e dovrebbe esser impiegato in tutti i Laboratori che sono in grado di tenere sotto controllo i processi analitici e di misurare la propria Variabilità Analitica. Il valore di RCV insieme alla misura della creatinina sierica e alla stima della eGFR si pone come strumento nello sviluppo di una 'medicina personalizzata' che investe in maniera centrale il ruolo del Laboratorio. L'RCV basandosi sui concetti di Variabilità analitica e Variabilità biologica potrebbe rappresentare un nuovo strumento diagnostico dal momento che consente una più appropriata interpretazione del risultato ottenuto specificamente nel nostro laboratorio. La possibilità di inserire a referto i valori Reference Change Value non solo della creatinina sierica, ma di tutti quegli analiti in cui l'Indice di Individualità sia inferiore a 0.6, darebbe al dato di Laboratorio un valore aggiunto, diventando strumento potente nelle mani del Clinico non solo nell'interpretazione dei risultati di Laboratorio ma nella diagnostica e nel monitoraggio quotidiano dei pazienti.

Bibliografia

1. Shewhart WA: Economic control of quality of manufactured products. Van Nostrand, Princeton (N. J.), 1931.
2. Deming WE: Quality, productivity and competitive position. MIT Center for advanced studies, Cambridge, U.S.A., 1986.
3. Juran JM, Gryna FM EDS: Juran's quality control handbook., 4th Edithion. McGraw-Hill, New York 1998.
4. Belk WP, Sunderman FW: A survey of the accuracy of chemical analyses in clinical laboratories. Am. J. Clin. Pathol. 1947; 17:853-56.
5. Levey S, Jennings ER: The of control charts in the clinical laboratories. Am. J. Clin. Pathol. 1950; 20: 1059-66.
6. Westgard JO, Barry PL: Cost effective quality control: managing the quality and productivity af analytical processes. AACC Press, Washington 1986.
7. Elenco degli organismi nazionali di normazione ai sensi dell'articolo 27 del regolamento (UE) n.1025/2012.
8. G. U. della Repubblica Italiana, serie generale - n.20; DECRETO 22 dicembre 2009; pp 17-19 - «Accredia» Ente unico.
9. G. U. della Repubblica Italiana, serie generale – 19; DECRETO 22 dicembre 2009; 64-67 – prescrizioni Ente unico.
10. http://www.iso.org/iso/home/standards/management-standards/iso_9000.htm
11. Presentazione di Gigante Nicola, 2015 “La nuova norma ISO 9001:2015. Novità principali della ISO 9001:2015” disponibile sul sito www.accredia.it nella sezione “Pubblicazioni – materiali didattici”.
12. UNI. Applicare la norma UNI ISO 9001:2000 nelle strutture sanitarie. UNI 2022.

13. UNI EN ISO 9001:2015 “Sistemi di gestione per la qualità – Requisiti”, 2015, paragrafo 0.3.
14. Bonechi Lucia e altri, La gestione della qualità nelle organizzazioni, Pisa, Plus-Pisa University Press, 2004, pag 223.
15. The process approach in ISO 9001:2015” disponibile sul sito della ISO al link: www.iso.org/tc176/sc02/public.
16. “The process approach in ISO 9001:2015” pubblicato da ISO e disponibile sul sito ufficiale dell’organizzazione al link: www.iso.org/tc176/sc02/public.
17. Risk-Based Thinking in ISO 9001:2015”, pubblicato da ISO e disponibile sul sito ufficiale al link: www.iso.org/tc176/sc02/public.
18. Regione Lombardia, Decreto Direzione Generale Sanità, n.32856 19/12/2000. Oggetto: Linee guida su “Controllo di Qualità Interno nel Servizio di Medicina di Laboratorio”.
19. Brugnoli D, Iandolo P, Mattioli S. Il controllo di qualità interno dalla teoria alla pratica: guida passo per passo. 25; Biomedica Source Books 20.
20. CLSI Document C24-A3: Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions; Approved guideline – 3th Ed. 2006. Clinical and Laboratory Standard Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA 2006.
21. CLSI/NCCLS Document EP5-A2: Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline – 2th Ed. 2004. Clinical and Laboratory Standard Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA 2006.
22. Ottomano C. et al. Linee guida per gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno. Documento preparato a cura del Gruppo di Lavoro SIBioC Linee guida sul Controllo di Qualità Interno. Biochim Clin, 2008, vol. 32, n. 2: 102-21.

23. Westgard JO, Groth T. Power functions for statistical control rules. Clin Chem 1979;25: 863-9.
24. Westgard JO, Groth T. Performances characteristics of rules for internal quality control: probabilities for false rejection and error detection. Clin Chem 1977;23: 1857-67.
25. Besozzi M, Bolelli G, Borsotti M, et al. Il controllo qualità in chimica clinica: le basi, gli obiettivi, il disegno. Biochim Clin 1995;19:372-400.
26. Levey S, Jennings ER: The of control charts in the clinical laboratories. Am. J. Clin. Pathol. 1950; 20: 1059-66.
27. Westgard JO, Groth T. Performance characteristics of rules for internal quality control: probabilities for false rejection and error detection. Clin Chem 1977;23:1857-67.
28. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, et al. A multirule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem 1981;27:493-501.
29. Hyltoft Petersen P, Fraser CG, Kallner A, et al. Strategies to set global quality specifications in laboratory medicine. Scan J Clin Lab Invest 1999;59:474-85.
30. Fraser CG. La variabilità biologica: dai principi alla pratica. Milano: Biomedica, 2004.
31. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491-500.
32. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
33. Fraser GC, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, et al. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. Ann Clin Biochem 1997;34:8-12.

34. Miyata T, Jadoul M, Kurokawa K, et al. Beta-2 microglobulin in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1723.
35. Filler G, Priem F, Lepage N, et al. Beta-trace protein, cystatin C, beta(2)-microglobulin, and creatinine compared for detecting impaired glomerular filtration rates in children. *Clin Chem* 2002;48:729–36.
36. Donadio C. Serum and urinary markers of early impairment of GFR in chronic kidney disease patients: diagnostic accuracy of urinary beta-trace protein. *Am J Physiol Renal Physiol*;299: F1407–23.
37. Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 2002; 48:699–707.
38. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150:604-12.
39. Ceriotti F. Velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR): fonte di informazioni o fattore di confusione? *Biochim Clin* 2010; 34: 247-49.
40. Zoccali C, Plebani M, Cappelletti P. Valutazione di laboratorio della funzionalità renale. *Biochim Clin* 2009; 33: 144-46.
41. Identificazione, prevenzione e gestione della malattia renale cronica nell'adulto. Linea Guida 23. Ministero della Salute – Istituto Superiore di Sanità – Società Italiana di Nefrologia.
42. Graziani MS. Un aggiornamento delle linee guida internazionali per la valutazione e la gestione della malattia renale cronica. *Biochim Clin* 2014;30: 32-38.
43. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Supp* 2013; 3:1-150.
44. <http://www.nkdep/nih/gov>

45. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:S1–266.
46. Stevens LA, Schmidh CH, Green T, et al. comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73m². *Am J Kid Dis* 2010; 56:486-95.
47. Jaffe M. über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886; 10:391-400.
48. Infusino I, Luraschi P, Valente C, Panteghini M. Miglioramento dell'accuratezza della determinazione mediante l'impiego di metodica enzimatica. *Biochim Clin* 2007; 31: 349-352.
49. Myers GL, Miller WG, Coresh J et al. recommendations for improving serum creatinine measurement: A report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Educ. Program. *Clin Chem* 2006; 52:5-18.
50. Miller WG, Myers GL, Ashwood ER et al. Creatinine measurement: state of the art in accuracy and inter-laboratory harmonization. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129:297-304.
51. Ceriotti F, Boyd JC, Klein G, et al. Reference interval for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. IFCC Committee on Reference Interval and Decision Limit (C-RIDL). *Clin Chem* 2008; 54:559-66.
52. Dalton RN. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. *Clin Chem* 2010; 56: 687-689.
53. Fraser C. Estimating GFR: what's wrong with using serum creatinine alone? National Academy of Clinical Chemistry. 2012; AACC.

54. Ceriotti F. Velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR): fonte di informazioni o fattore di confusione. *Biochim Clin* 2010; 34: 247-249.
55. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP et al. limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 1985; 28:830-8.
56. Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, et al. Serum Creatinine, cystatin C, and β -trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem* 2010; 56:740-9.
57. Gowans EM, Fraser CG. Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care. *Ann Clin Biochem* 1988; 25:259-63.
58. Ronchi F, Serra G, Demuro G, Caria S, Laconi E. Could Reference Change Value for serum creatinine be a useful tool in special clinical conditions when eGFR is not appropriate? - 46° Congresso Nazionale SIBioC. Poster P125.
59. Ronchi F, Demuro G, Serra G, Meli M, Caria S. Reference Change Value for serum creatinine: the new life of old marker. - 46° Congresso Nazionale SIBioC. Poster P125.
60. Italo Antonozzi Elio Gulletta Piccin- *Medicina di laboratorio. Logica e patologia clinica* Nuova Libreria, 2019, 766-770.
61. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, et al. *New equations to estimate GFR in children with CKD*. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:629–37.
62. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, et al. *Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m²*. *Am J Kidney Dis* 2010;56:486-95.
63. Myers GL, Miller WG, Coresh J, et al. *Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory*

Working Group of the National Kidney Disease Education Program. Clin Chem 2006;52:5–18.

64. Eckardt KU et al. *Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. Lancet.* 2013 Jul 13;382(9887):158-69.

65. Townsend N, Nichols M, Scarborough P, et al. *Cardiovascular disease in Europe – Epidemiological update 2015. Eur Heart J* 2015;36:2696-705.

66. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care* 2004;8:R204–12.

67. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit Care* 2007;11:R31.