

## Riferibilità metrologica e validità della determinazione della creatinina come indice di funzionalità renale

Ilenia Infusino, Mauro Panteghini

Centro Interdipartimentale di Ricerca sulla Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi di Milano

### ABSTRACT

**Metrological traceability and use of creatinine measurement as an index of renal function.** The glomerular filtration rate (GFR) is currently considered the best overall index of kidney function. The possibility that laboratories might routinely report an estimated GFR has become practically feasible with the development of a formula, the "four-variable" Modification of Diet in Renal Disease study (MDRD) equation that uses age, sex, race, and serum creatinine parameters. However, a limitation of this equation for general implementation in healthcare is related to the use of differently calibrated creatinine measurement procedures among laboratories. The only way to achieve universal implementation of the GFR prediction equation, with the associated clinical benefits for the patients, is, therefore, to promote worldwide standardization of methods to determine creatinine together with the introduction of a revised GFR estimating equation appropriate for use with standardized creatinine methods.

### INTRODUZIONE

Le nefropatie croniche (CKD) costituiscono uno dei maggiori problemi sanitari a livello mondiale<sup>1</sup>. Negli Stati Uniti (USA), l'incidenza delle malattie renali all'ultimo stadio, dell'insufficienza renale trattata con la dialisi e del trapianto di rene è più che quadruplicata negli ultimi venti anni<sup>2</sup>. Coresh et al. hanno recentemente stimato che il numero degli americani con CKD in stadio precoce è di circa 19 milioni, includendo circa 8 milioni di persone con una ridotta velocità di filtrazione glomerulare (GFR)<sup>3</sup>. In Europa, l'incidenza annuale delle malattie renali all'ultimo stadio è duplicata negli ultimi dieci anni fino a raggiungere circa 135 nuovi casi per milione di abitanti<sup>1</sup>.

Negli USA, la National Kidney Foundation ha recentemente definito la CKD come una situazione clinica di danno renale strutturale o funzionale che possa portare ad una diminuzione della GFR o, in alternativa, come una situazione in cui la GFR sia <60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> da almeno tre mesi, indipendentemente dalla causa<sup>4</sup>. Tale livello decisionale per la GFR è stato selezionato perché in corrispondenza di tale valore si ha la perdita di circa la metà dei normali glomeruli funzionanti in un adulto, con il

rischio di insorgenza di numerose complicazioni<sup>5</sup>. La National Kidney Foundation ha anche classificato la severità della CKD basandosi sul valore della GFR (Tabella 1)<sup>4</sup>. Pertanto, il valore di GFR è ora considerato come il miglior indice di funzionalità renale.

### STIMA DELLA GFR

La GFR può essere valutata misurando la clearance urinaria di marcatori di filtrazione esogeni come l'inulina, l'ioexolo, l'iotalamato marcato con I125, l'EDTA marcato con Cr51 o l'acido dietilentriaminopentacetico marcato con Tc99<sup>6,7</sup>. A causa della difficoltà nell'utilizzo e dell'indaginosità, dell'uso di radionuclidi e del costo dei reagenti, questi metodi hanno tuttavia un uso limitato nella pratica clinica e sono generalmente confinati a laboratori specializzati<sup>8</sup>. La valutazione della clearance della creatinina può costituire un'utile alternativa quando i marcatori di filtrazione esogeni non sono disponibili. Tuttavia, essa richiede, oltre ad un'adeguata idratazione, una raccolta temporizzata delle urine (di solito per 24 ore), che è spesso problematica ed inaccurata, rendendo tale esame non idoneo per un ampio impiego clinico<sup>9</sup>. In pra-

**Tabella 1**

*Stadi delle malattie renali croniche*

Stadio	Descrizione	Velocità di filtrazione glomerulare (GFR), mL/min/1,73 m <sup>2</sup>
1	Danno renale con GFR normale o aumentata	≥ 90
2	Danno renale con lieve diminuzione della GFR	60-89
3	Moderata diminuzione della GFR	30-59
4	Severa diminuzione della GFR	15-29
5	Insufficienza renale	< 15 (o dialisi)

tica, quindi, la GFR è spesso stimata con la valutazione della concentrazione della creatinina nel siero o, in misura meno frequente, della cistatina C<sup>10</sup>. Tuttavia, quest'ultima non è stata ancora adeguatamente valutata e definitivamente validata come indice di GFR<sup>11</sup>. Il dosaggio della creatinina nel siero è quindi frequentemente richiesto per stimare la funzionalità renale, ma la sua sensibilità per la diagnostica della CKD è bassa poiché la sua concentrazione plasmatica è influenzata, oltre che dalla GFR, da fattori indipendenti dalla GFR, quali età, sesso, razza, massa muscolare, dieta ed alcuni farmaci<sup>9</sup>. La sua misura, in particolare, fallisce nell'identificare circa la metà dei pazienti con CKD allo stadio 3, con una GFR tra 30 e 59 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, ed il suo valore diagnostico è anche peggiore in particolari gruppi di pazienti, come ad esempio i soggetti anziani<sup>12</sup>.

Stime più accurate e precise della GFR si possono ottenere mediante l'impiego di equazioni di calcolo che empiricamente combinano i valori delle variabili confondenti che possono influenzare la concentrazione della creatinina sierica in aggiunta alla GFR<sup>13</sup>. Teoricamente le formule per la stima della GFR dovrebbero essere sviluppate in una larga coorte di soggetti, includendo diversi gruppi razziali ed etnici per un loro impiego a livello internazionale, valutate in una coorte di soggetti indipendente, validate per dimostrare un accettabile bias rispetto ad una misura di GFR ottenuta con marcatori esogeni e, infine, facilmente implementabili tenendo in considerazione i costi, i dati richiesti e l'attendibilità dei metodi utilizzati per la determinazione della creatinina<sup>5</sup>.

Attualmente esistono almeno 25 differenti equazioni proposte per la stima della GFR, ma molte (inclusa l'equazione di Cockcroft-Gault) richiedono informazioni aggiuntive, come una misura della superficie corporea (basata sulle misure di altezza e/o peso), che non sono facilmente disponibili, limitandone pertanto l'impiego. La possibilità che i laboratori clinici possano facilmente stimare la GFR dalla concentrazione della creatinina del siero è diventata realtà con lo sviluppo di una formula le cui uniche variabili sono età, sesso, razza e concentrazione della creatinemia<sup>14</sup>. Questa formula, la cosiddetta equazione MDRD a "quattro variabili" [sviluppata nel corso dello studio statunitense sulle Modificazioni della Dieta nelle Malattie Renali (MDRD)], è stata sviluppata sul confronto con i valori di GFR misurati con la clearance dello I125-iotalamato in più di 1600 soggetti adulti e successivamente validata su altri 1775 adulti, con il 91% dei soggetti aventi una GFR stimata dalla formula entro il 30% dei valori di GFR misurati con la valutazione della clearance dell'iotalamato<sup>15,16</sup>. L'equazione MDRD non richiede come variabile il peso corporeo perché normalizza la GFR ad una superficie corporea standard di 1,73 m<sup>2</sup>. Tale equazione è stata dimostrata efficace per il calcolo della GFR in pazienti con CKD e si comporta analogamente nei diabetici di tipo 2 e nei soggetti trapiantati di rene, anche se il suo valore non è ancora stato definito nei soggetti con basse concentrazioni di creatinina nel siero e valori elevati di GFR, inclusi soggetti sani, bambini e donne in gravidanza<sup>5</sup>. Sono però in corso ulteriori studi di validazione per valutarne l'efficacia in altri grup-

pi etnici (in aggiunta ai già studiati Caucasici ed Afroamericani) e in altre condizioni cliniche.

La maggiore limitazione per l'implementazione generalizzata delle equazioni per la stima della GFR è rappresentata dall'utilizzo da parte dei laboratori di procedure di misura differenti per la determinazione della creatinina<sup>17-19</sup>. In assenza di standardizzazione, l'impiego di metodi calibrati in maniera diversa rispetto a quello usato nello studio che ha sviluppato e validato la specifica equazione (per esempio, quello utilizzato alla Cleveland Clinic per lo sviluppo dell'equazione MDRD) può introdurre una significativa fonte di errore nella stima della GFR. Speciale attenzione dovrebbe essere prestata alle possibili conseguenze cliniche dovute alle differenze di calibrazione dei metodi per la creatinina, considerando che solitamente la relazione tra il metodo impiegato in un particolare laboratorio e quello impiegato nel laboratorio dello studio originale è generalmente sconosciuta<sup>20, 21</sup>. Sebbene la National Kidney Foundation nelle sue linee guida abbia chiaramente consigliato di utilizzare per la stima della GFR con la formula MDRD solo valori di creatinina opportunamente corretti, molti laboratoristi, medici di medicina generale e nefrologi non sembrano essere consapevoli di questa importante fonte di errore nella stima della GFR effettuata con l'impiego di formule nella quotidiana pratica clinica<sup>22</sup>.

Una differenza di calibrazione conferisce alla stima della GFR una grande incertezza, specie a concentrazioni di creatinina vicine ai livelli fisiologici. Myers et al. (2) hanno recentemente mostrato gli effetti sulla GFR ricavata con l'equazione MDRD di differenti bias di calibrazione dei metodi per la misura della creatinina. Nel loro esempio, per una donna di razza caucasica di 60 anni, per la quale la GFR calcolata era di 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ad una creatinemia di 1,00 mg/dL, una differenza nella calibrazione di +0,12 mg/dL era associata ad un errore nella stima della GFR di -12%. L'errore nella stima della GFR nell'intervallo dei bias di calibrazione esaminati (da -0,06 mg/dL a +0,31 mg/dL) era tra +7,5% e -27%. Di particolare importanza il fatto che i dati riportati nelle varie Verifiche Esterne di Qualità (VEQ) suggeriscono che tale variazione sistematica è abbastanza comune nei laboratori clinici<sup>23,24</sup>.

## COME MIGLIORARE LA STIMA DELLA GFR MEDIANTE L'EQUAZIONE MDRD

Da tutte le precedenti considerazioni, è ormai chiaro che l'unica via che consenta un'universale implementazione dell'equazione MDRD di predizione della GFR basata sul valore della creatinemia, con gli associati benefici clinici per i pazienti, è quella di promuovere globalmente la standardizzazione dei metodi per la misura della creatinina insieme con lo sviluppo di una versione dell'equazione MDRD adatta all'utilizzo dei risultati di creatinina standardizzati.

Esiste ora accordo scientifico internazionale nell'accettare che l'implementazione della riferibilità della misura di un analita a metodi e materiali di riferimento di ordine superiore ("sistema di riferimento") costituisca l'ap-

proccio più indicato per raggiungere la necessaria confrontabilità dei risultati della misura biochimica indipendentemente dal metodo usato e/o dal laboratorio dove viene eseguita l'analisi<sup>25</sup>. Questo implica necessariamente una cooperazione internazionale tra le aziende produttrici dei dispositivi diagnostici in vitro (IVD), i laboratori clinici, le società scientifiche, le agenzie governative ed i fornitori di VEQ. In altre parole, il raggiungimento di una migliore accuratezza dei risultati della misura della creatinina richiede che i valori assegnati dalla ditta produttrice ai calibratori ed ai materiali di controllo siano riferibili ("traceable") alle procedure ed ai materiali di riferimento di ordine metrologico superiore<sup>2</sup>.

Il materiale di riferimento SRM 914 prodotto dal National Institute of Standards and Technology (NIST) americano, costituito da creatinina cristallina, rappresenta oggi il materiale di riferimento primario. Soluzioni di SRM 914, preparate gravimetricamente dissolvendolo in apposito tampone, sono utilizzate nella calibrazione del metodo di riferimento costituito da spettrometria di massa in diluizione isotopica accoppiata alla gas cromatografia (GC-IDMS) o, in alternativa, alla cromatografia liquida (LC-IDMS). Dei due metodi, il primo (GC-IDMS) richiede una fase preliminare di separazione per rimuoverne dal campione la creatina, che dà lo stesso prodotto di derivatizzazione della creatinina, ed è pertanto una procedura indaginosa che permette l'analisi di un numero molto limitato di campioni<sup>26-28</sup>. Il metodo LC-IDMS presenta invece una preparazione del campione molto più semplice e veloce, adattandosi meglio all'esecuzione di un numero sufficiente di campioni che consentano alle ditte produttrici di IVD la validazione della riferibilità dei loro sistemi e, quindi, la promozione di un programma di standardizzazione su vasta scala<sup>29</sup>.

I materiali di riferimento SRM 909b prodotto dal NIST e BCR 573/4/5 prodotti dal Institute for Reference Materials and Measurement (IRMM) sono materiali secondari (vale a dire in matrice simil-siero), liofilizzati, con valori assegnati con il metodo di riferimento GC-IDMS, che potrebbero teoricamente essere utilizzati per calibrare i metodi di routine. Tuttavia, la matrice di tali materiali prodotti con siero umano è stata modificata dai trattamenti per la loro conservazione e dal processo di liofilizzazione, col risultato di alterare le loro caratteristiche e renderne il comportamento diverso da quello dei sieri umani freschi sui quali sono normalmente effettuate le misurazioni della creatinina<sup>30</sup>. Questo fa sì che questi materiali in pratica non siano idonei per calibrare direttamente i metodi commerciali. Infatti, materiali di riferimento che non sono commutabili con i campioni di

siero umano nativo possono introdurre significativi errori nella calibrazione del metodo<sup>31</sup>. In questa situazione, un utile approccio alternativo per la standardizzazione dei risultati attraverso l'implementazione della riferibilità ad una procedura di riferimento è, per i produttori di IVD, quello di misurare con il proprio metodo commerciale campioni freschi in doppio con un laboratorio che esegue un metodo di riferimento e utilizzare i risultati ottenuti da questo confronto per allineare la calibrazione del sistema commerciale (Figura 1)<sup>32</sup>.

La disponibilità di un materiale di riferimento secondario che sia commutabile, e quindi utilizzabile per calibrare direttamente i metodi di routine, costituisce comunque una fase fondamentale per l'implementazione della standardizzazione della creatinina (Figura 1). A tale scopo, il NIST ha molto recentemente preparato un nuovo materiale di riferimento per la misura della creatinina con matrice sierica, denominato SRM 967<sup>2</sup>. La base per questo materiale è rappresentata da un pool congelato di sieri umani, preparato secondo le indicazioni contenute nel documento C37-A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>33</sup>. In particolare, sono stati preparati due livelli di concentrazione di creatinina (0,75 mg/dL e 3,92 mg/dL), ai quali i valori sono stati assegnati con entrambe i metodi di riferimento GC-IDMS e LC-IDMS. Considerando le sue peculiari caratteristiche, il materiale dovrebbe dimostrarsi commutabile nei confronti dei sieri umani nativi. E' comunque in corso uno specifico studio inteso a validare sperimentalmente la sua commutabilità con i campioni di siero umano nativo, misurati usando un'ampia varietà di metodi commerciali per la misura della creatinina e con i metodi di riferimento.

In associazione con la ricalibrazione dei metodi commerciali rispetto al metodo e ai materiali di riferimento certificati, è stato necessario riparametrizzare l'equazione MDRD, affinché essa potesse utilizzare i risultati di creatinina standardizzati rispetto al sistema di riferimento. Ciò è stato fatto recentemente, con la pubblicazione di una nuova equazione MDRD, utilizzabile esclusivamente con valori di creatinina standardizzati (Tabella 2)<sup>34</sup>.

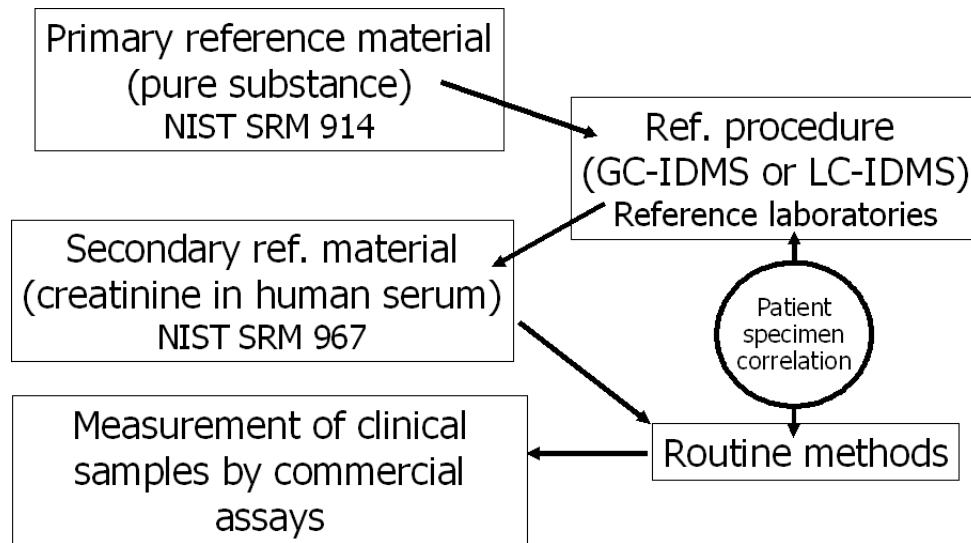
E' quindi giunto il momento che tutte le ditte produttrici di IVD calibrino i loro sistemi di misurazione della creatinina in modo da essere riferibili al sistema di riferimento internazionalmente approvato (Figura 1) e che i laboratori clinici impieghino esclusivamente questi metodi standardizzati insieme all'equazione di stima della GFR rivisitata ed adattata per l'impiego di risultati ottenuti con questi metodi (Tabella 2).

## Tabella 2

*Equazione a "quattro variabili" per la stima della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) derivata dallo studio MDRD da utilizzare con valori di creatinina sierica ottenuti con metodi i cui risultati siano riferibili alla spettrometria di massa in diluizione isotopica (IDMS) o, più in generale, al sistema di riferimento riportato nella Figura 1*

$$\text{GFR (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 175 \times (\text{s-creatinina})^{-1,154} \times (\text{età})^{-0,203} \times (0,742 \text{ se femmina}) \times (1,210 \text{ se razza afroamericana})$$

Nota: i valori di creatinina del siero sono espressi in mg/dL. Se i valori di creatinina sono espressi in  $\mu\text{mol/L}$ , tali valori devono essere divisi per 88,4 prima di introdurli nell'equazione.



**Figura 1**

*Il sistema di riferimento per la creatinina.*

## LA SITUAZIONE ATTUALE

Sebbene implementare un processo di standardizzazione possa sembrare teoricamente semplice, in pratica l'introduzione associata di procedure standardizzate per la misurazione della creatinina e dell'apposita equazione MDRD per il calcolo della GFR mediante valori di creatinina standardizzati può essere complicata dal fatto che gli approcci proposti devono essere compresi ed accettati come validi da tutte le parti coinvolte.

Nell'Unione Europea l'implementazione degli approcci di riferibilità del risultato in Medicina di Laboratorio a sistemi di riferimento (ove disponibili) è dal 2003 obbligatoria per legge<sup>35</sup>. A livello internazionale, ci troviamo quindi in un periodo di transizione nel quale alcuni produttori di diagnostici hanno già ricalibrato il loro metodo per la misura della creatinina rispetto all'IDMS al fine di rispettare la normativa della Comunità Europea, alcuni produttori vendono sistemi con calibrazioni differenti in Europa (dove è richiesta per legge la riferibilità) nei confronti di altre parti del mondo (dove la riferibilità non è cogente), e, infine, altri produttori mantengono ancora la vecchia calibrazione (non ottemperando alla riferibilità dei risultati) in attesa di riallineare prima o poi i loro sistemi di misurazione al momento di introdurre nuovi lotti di reagenti. Questa situazione molto confondente viene ben rilevata dai risultati di alcune valutazioni esterne eseguite recentemente a livello internazionale.

Nel 2002, l'International Measurement Evaluation Program n. 17 ha coinvolto oltre 800 laboratori di 35 nazioni, dimostrando una quasi generalizzata sovrastima della determinazione della creatinina nel siero in un

pool con concentrazione certificata con GC-IDMS<sup>36</sup>. Su 14 sistemi commerciali, 11 mostravano un rilevante bias positivo se confrontati con il valore di riferimento, che variava tipicamente tra +10 e +15%. Nel 2003, un'indagine svolta dall'American College of Pathology su 5624 laboratori nord-americani ha dimostrato una simile sovrastima per tutti i metodi commerciali, escluso uno, in un pool di sieri con concentrazione di 0,90 mg/dL in GC-IDMS<sup>24</sup>. Tali dati sono stati riconfermati in un esperimento svoltosi più di recente nel 2005. Nonostante l'esistenza della Direttiva Europea 98/79/EC sui dispositivi IVD, la situazione non appare in pratica essere tanto diversa in Europa. In un recentissimo studio coinvolgente 172 laboratori di sei paesi europei, svolto sotto gli auspici della European Community Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EC4), i metodi per la misurazione della creatinina di quattro dei maggiori produttori di diagnostici non soddisfacevano l'obiettivo di riferibilità per i risultati ottenuti in un campione umano con concentrazione di creatinina di 0,85 mg/dL alla GC-IDMS<sup>37</sup>. Complessivamente, queste osservazioni suggeriscono che un ampio numero di sistemi analitici commerciali per la misura della creatinina del siero non fornisce ancora risultati standardizzati e sovrastima significativamente tale parametro, necessitando quindi ulteriore lavoro per raggiungere una migliore accuratezza dei risultati di creatinina con i metodi di routine.

## LE INIZIATIVE INTERNAZIONALI

Il Gruppo di Lavoro del National Kidney Disease Education Program (NKDEP)<sup>1</sup> ha recentemente pubbli-

<sup>1</sup> NKDEP (<http://www.nkdep.nih.gov/index.htm>) è un'iniziativa dei National Institutes of Health americani progettata per ridurre la morbilità e la mortalità causate dalle malattie renali e dalle loro complicanze

cato delle raccomandazioni per migliorare la misura della creatinina del siero<sup>2</sup>. In breve, i produttori di diagnostici dovrebbero assicurare prestazioni ottimali dei metodi a concentrazioni di 1,00 mg/dL ed assicurare che inesattezza e imprecisione siano costanti per tutto l'intervallo di misura analitica. Un traguardo di errore totale desiderabile per la misura della creatinina dovrebbe essere quello associato ad un errore massimo del 10% nella stima della GFR mediante la formula. Una figura esemplificativa concernente le combinazioni di bias ed imprecisione accettabili per l'ottenimento di questo errore totale è stata inclusa nel report sopraccitato<sup>2</sup>. Per esempio, un metodo di routine per la misura della creatinina con un'imprecisione totale (CV) <8% ed un bias (se confrontato ad un metodo di riferimento) <5% alla concentrazione di creatinina  $\geq 1,00$  mg/dL soddisferebbe tale traguardo analitico.

I produttori di diagnostici dovrebbero anche risolvere i problemi legati all'aspecificità analitica di alcuni metodi commerciali per la misura della creatinina del siero. La standardizzazione della calibrazione non può, infatti, correggere le interferenze analitiche legate all'aspecificità di un metodo. A questo proposito, per cercare di risolvere il problema delle reazioni aspecifiche con cromogeni non-creatininici da parte dei metodi basati sulla reazione di Jaffè, alcuni produttori hanno modificato la calibrazione di questi metodi, introducendo variazioni rilevanti nella pendenza e nell'intercetta delle curve di calibrazione, al fine di minimizzare il contributo delle proteine plasmatiche che mimano la creatinina nella reazione, tentando di ottenere risultati più strettamente allineati al metodo di riferimento. Tale strategia, basandosi sull'assunto che l'interferenza del cromogeno non-creatininico sia costante tra i campioni, è, tuttavia, un'inaccettabile semplificazione<sup>38</sup>. L'aspecificità analitica per sostanze trovate in tipo e quantità diversa nei campioni di singoli pazienti può continuare ad influenzare significativamente l'accuratezza del calcolo della GFR anche quando la creatinina venga determinata con i cosiddetti metodi di Jaffe "compensati"<sup>39</sup>. L'utilizzo di metodi che sono più specifici per la creatinina del siero, come quelli basati su alcuni principi analitici utilizzando reazioni enzimatiche, può quindi fornire una stima della GFR più affidabile e deve essere incentivato<sup>13</sup>. Compito dei laboratori clinici è quello di procedere nella scelta di metodi più specifici per la misurazione della creatinina e di abbandonare di conseguenza metodologie obsolete. Una raccomandazione in tal senso sarà anche prodotta a breve dall'IFCC<sup>40</sup>.

## CONCLUSIONE

Al fine di ridurre l'incidenza della CKD e delle sue complicanze è necessario che venga introdotta la stima routinaria della GFR in tutti i soggetti adulti in cui è misurata la creatininemia. Al fine di evitare eccessive variabilità in questa stima, conseguenti all'impiego di differenti metodologie di misurazione della creatinina, la scelta dei laboratori deve cadere su metodi che siano standardizzati in maniera certificata e privi di interferenze da com-

ponenti endogeni. L'uso di tali metodi deve essere associato all'impiego dell'appropriata equazione MDRD al fine di fornire una stima accurata della GFR in tutte le situazioni cliniche pertinenti.

## BIBLIOGRAFIA

1. El Nahas AM, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *The Lancet* 2005; 365:331-40.
2. Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, 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.
3. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:1-12.
4. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Kidney Disease Outcome Quality Initiative. Am J Kidney Dis* 2002; 39:S1-246.
5. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67:2089-100.
6. Flynn FV. Assessment of renal function: selected developments. *Clin Biochem* 1990; 23:49-54.
7. Cohen EP, Lemann J. The role of the laboratory in evaluation of kidney function. *Clin Chem* 1991; 37:785-96.
8. Swan SK. The search continues – An ideal marker of GFR. *Clin Chem* 1997; 913-4.
9. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992; 38:1933-53.
10. Price CP, Finney H. Developments in the assessment of glomerular filtration rate. *Clin Chim Acta* 2000; 297:55-66.
11. Larsson A. Cystatin C: An emerging glomerular filtration rate marker. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65:89-91.
12. Stevens LA, Levey AS. Chronic kidney disease in the elderly – How to assess risk? *N Engl J Med* 2005; 352:2122-4.
13. Lamb EJ, Tomson CRV, Roderick PJ. Estimating kidney function in adults using formulae. *Ann Clin Biochem* 2005; 42:321-45.
14. Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ, Group MS. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:A0828.
15. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Intern Med* 1999; 130:461-70.
16. Lewis J, Agodoa L, Cheek D, Greene T, Middleton J, O'Connor D, et al. African-American Study of Hypertension and Kidney Disease. Comparison of cross-sectional renal function measurements in African Americans with hypertensive nephrosclerosis and of primary formulas to estimate glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:744-53.
17. Coresh J, Astor BC, McQuillan G, Kusek J, Greene T, Van Lente F, Levey AS. Calibration and random variation of the serum creatinine assay as critical elements of using equations to estimate glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:920-9.
18. Wuyts B, Bernard D, Van Den Noortgate N, Van De Valle J, Van Vlem B, De Smet R, et al. Reevaluation of formu-

- las for predicting creatinine clearance in adults and children, using compensated creatinine methods. *Clin Chem* 2003; 49:1011-4.
19. Lamb EJ, Wood J, Stowe HJ, O'Riordan SE, Webb MC, Dalton RN. Susceptibility of glomerular filtration rate estimations to variations in creatinine methodology: a study in older patients. *Ann Clin Biochem* 2005; 42:11-8.
  20. Hallan S, Asberg A, Lindberg M, Johnsen H. Validation of the Modification of Diet in Renal Disease formula for estimating GFR with special emphasis on calibration of the serum creatinine assay. *Am J Kidney Dis* 2004; 44:84-93.
  21. McKillop DJ, Cairns B, Duly E, Van Drimmelen M, Ryan M. The effect of serum creatinine method choice on estimated glomerular filtration rate determined by the abbreviated MDRD formula. *Ann Clin Biochem* 2006; 43:220-2.
  22. Van Biesen W, Vanholder R, Veys N, Verbeke F, Delanghe J, De Bacquer D, Lameire N. The importance of standardization of creatinine in the implementation of guidelines and recommendations for CKD: implications for CKD management programmes. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:77-83.
  23. Secombe DW, Tholen D, Jacobson BE. Standardization of creatinine: A pre-requisite for implementing the MDRD formula for the estimation of glomerular filtration rate (eGFR). *Clin Chem* 2005; 51(suppl):A44.
  24. Miller WG, Myers GL, Ashwood ER, Killeen AA, Wang E, Thienpont LM, Siekmann L. Creatinine measurement: State of the art in accuracy and inter-laboratory harmonization. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129:297-304.
  25. Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: new challenges. *Clin Chim Acta* 2005; 355:1-12.
  26. Siekmann L. Measurement of creatinine in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:137-44.
  27. Welch MJ, Cohen A, Hertz HS, Ng KJ, Schaffer R, Van Der Lijn P, et al. Determination of serum creatinine by isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method. *Anal Chem* 1986; 58:1681-5.
  28. Stöckl D, Reinauer H. Candidate reference methods for the determination of target values for cholesterol, creatinine, uric acid and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method setup. *Clin Chem* 1993; 39:993-1000.
  29. Stokes P, O'Connor G. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum. *J Chromatography B* 2003; 794:125-36.
  30. Séronie-Vivien S, Galteau MM, Carlier MC, Hadj-Aissa A, Hanser AM, Hym B, et al. Impact of standardized calibration on the inter-assay variation of 14 automated assays for the measurement of creatinine in human serum. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:1227-33.
  31. Miller WG, Myers GL, Rej R. Why commutability matters. *Clin Chem* 2006; 52:553-4.
  32. Clinical and Laboratory Standards Institute. Metrological traceability and its implementation; A report. CLSI document X5-R. Wayne, PA: CLSI, 2006.
  33. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for cholesterol measurement procedures; Approved guideline. CLSI document C37-A. Wayne, PA: CLSI, 1999.
  34. Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek J, Van Lente F. Expressing the MDRD study equation for estimating GFR with IDMS traceable (gold standard) serum creatinine values. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:69a.
  35. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *Off J Eur Communities L* 1998 (Dec 7); L331:1-37.
  36. Örnemark U, Van Nevel L, Smeyers P, Harper C, Taylor PDP. The international Measurement Evaluation Program IMEP-17. Trace and minor constituents in human serum. EUR 20694 EN. Report to participants. Part 2: Methodology and quantity specifications. [www.imep.ws](http://www.imep.ws) (accessed June 12, 2006).
  37. Ceriotti F, Infusino I, Luraschi P, Thienpont L, Panteghini M. Valutazione dell'esattezza della determinazione della creatinina nel siero: risultati su un campione di laboratori nazionali. *Biochim Clin* 2006;30:in stampa.
  38. Junge W, Wilke B, Halabi A, Klein G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. *Clin Chim Acta* 2004; 344:137-48.
  39. Khatami Z, Dey D, Handley G, Klein G, Nagel R, Becher D. In the name of traceability. Author's reply. *Ann Clin Biochem* 2005; 42:162-3.
  40. Panteghini M, Myers G, Miller WG, Greenberg N. The importance of metrological traceability on the validity of creatinine measurement as an index of renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006;44: 1187-92.