

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAMERINO

Facoltà di Scienze e Tecnologie

Scuola di specializzazione in Biochimica Clinica

Indirizzo Analitico Tecnologico



## AUMENTO DELLA SIGNIFICATIVITA' DEL DATO ANALITICO MEDIANTE UN APPROPRIATO USO DELLA DIFFERENZA CRITICA NELLA PRATICA DI LABORATORIO

Tesi sperimentale di Specializzazione

Specializzando:

Dott. Anna Elena Montauti

Relatore:

Prof. Rosalia Tacconi

**Anno Accademico 2003-2004**

## **1. INTRODUZIONE**

Notevoli sforzi si sono compiuti negli ultimi due decenni nell'ambito del laboratorio di Chimica Clinica per il raggiungimento della cosiddetta "Qualità totale" intesa come soddisfacimento delle attese del cliente, sia esso il medico o il paziente.[24, 25, 27]

Se inizialmente le attenzioni erano rivolte più alle metodiche e alla parte strettamente analitica, nel tentativo di migliorare le performances delle analisi sia in termini di precisione che di accuratezza, ci si è presto resi conto che altrettanto importanti erano gli aspetti preanalitici, al pari di quelli postanalitici, concorrendo

tutti ed in egual misura al raggiungimento dell'obiettivo di "qualità globale" a cui ogni laboratorista deve costantemente tendere.[24, 25, 27]

Non basta quindi ottenere un buon dato di laboratorio con metodiche che abbiano un'adeguata sensibilità e specificità, se gran parte del significato del dato analitico si perde a causa di una inaccurata o incompleta refertazione.

Perché questo non accada bisogna che il referto sia adeguatamente corredato da una nomenclatura il più possibile univoca e valida a livello internazionale, ove sia espressa la natura del materiale analizzato, al pari delle unità di misura e dei valori di riferimento in relazione al metodo usato. [24]

Sebbene le Società scientifiche internazionali raccomandino da alcuni decenni l'uso delle Unità del Sistema Internazionale (S.I.) [5, 6, 16], sono ancora pochi i laboratori che le hanno adottate, e questo a causa delle grosse difficoltà di ordine pratico che si incontrano poiché medici e pazienti, essendo abituati ai valori tradizionali mal si adatterebbero ad un cambiamento repentino che comporterebbe inevitabilmente spiacevoli e pericolosi equivoci. Sarebbe invece auspicabile affiancare i valori espressi nelle due diverse Unità per tutto il tempo necessario ad una familiarizzazione con i nuovi dati, come da più parti raccomandato e come nel nostro laboratorio si fa ormai da alcuni anni, utilizzando il programma gestionale XLAB e di cui si dà un esempio nella fig. 1.

A proposito dei cosiddetti "valori normali", fin dal 1969 Grasbek e Saris [15] hanno proposto di sostituirli con i "valori di riferimento" e questo sia perché il concetto di normalità non è definito in modo univoco e sia per le difficoltà di definire valori assoluti di normalità a causa di variabilità genetiche oltre che fisiologiche quali sesso, età, variazioni circadiane, stasi venosa, postura, attività fisica, uso di alcool o di contraccettivi.

E' noto che i valori di riferimento vanno calcolati da ciascun laboratorio in relazione alla propria utenza e alla propria strumentazione, ma anche in questo caso le difficoltà non sono poche e spesso si finisce per adottare i valori tratti dalla letteratura incorrendo non infrequentemente in macroscopici equivoci.

Volendo procedere al calcolo dei propri valori di riferimento è necessario adottare opportuni criteri di stratificazione della popolazione di riferimento in gruppi omogenei ed applicare criteri di esclusione nei confronti di portatori di patologie e di chi è in gravidanza o sotto trattamento farmacologico.[2]

In seguito ad un trattamento statistico dei dati così ottenuti, in modo arbitrario si definisce come intervallo di riferimento quello in cui rientra il 95 % dei valori, avendo escluso il 2,5 % dei valori in alto ed il 2,5 % in basso.[18, 26] Quando la distribuzione di frequenza dei dati è di tipo Gaussiano la normalità è compresa tra il valore medio e +/- il doppio della deviazione standard.[1,17, 26]

In alcuni casi, come ad esempio per il Colesterolo, piuttosto che ai comuni valori di riferimento, si ricorre ai *valori desiderati o ottimali*; numerosi studi hanno dimostrato infatti l'assenza di una soglia al di sotto della quale la colesterolemia non risulti associata ad un aumento del rischio di morte coronarica, pertanto dalla definizione del massimo rischio relativo accettabile rispetto al rischio minimo scaturiscono i relativi valori desiderati, che per l'adulto corrispondono a 200 mg/dl.

In altri casi vengono individuati dei *valori decisionali* in base a considerazioni fisiopatologiche o alla necessità da parte del medico di operare opportune scelte cliniche o farmacologiche; tali valori permettono di includere o meno un soggetto in una determinata categoria clinica, ma permettono anche di individuare la probabilità che si verifichino significativi effetti fisiopatologici, quando il livello di alcuni analiti raggiunge determinati valori, come nel caso dei *livelli di allarme* per valori estremamente alti di potassio o estremamente bassi di calcio o di glucosio (*valori di panico*).[23]

Quando si fa ricorso al laboratorio per stabilire una concentrazione terapeutica, a motivo di una variabilità tra i vari individui nel metabolismo e nell'escrezione di alcuni farmaci, bisogna rapportarsi a precisi *intervalli terapeutici*, tenuto conto che al di sotto di certi valori la terapia non risulta efficace, mentre al di sopra di certi altri risulta addirittura tossica.

E' possibile tuttavia aumentare ulteriormente il valore semiologico dei vari test a favore della diagnosi, della prognosi o del controllo terapeutico di una malattia mettendo a confronto risultati ottenuti in tempi diversi, al fine di poter valutare se sia intervenuta o meno una variazione statisticamente significativa.

Nell'organismo, infatti, le concentrazioni dei vari metaboliti presentano delle variazioni casuali attorno ad un punto omeostatico, che sono caratteristiche di ciascun individuo, e rappresentano la cosiddetta *variabilità biologica intraindividuale* (CVi).[10, 22]

In modo analogo, la differenza nei risultati dello stesso costituente ottenuti in individui diversi, tutti nelle stesse condizioni fisiologiche, dovuta alla diversità dei punti omeostatici tra questi individui, costituisce la *variabilità biologica interindividuale* (CVg), che può essere associata ai tradizionali valori di riferimento.[10, 22]

Si comprende come il rapporto tra le due variabilità per ciascun metabolita, detto *indice di individualità*, fornisca informazioni sull'individualità biologica di un dato analita e di conseguenza indichi l'utilità o meno di impiegare i tradizionali limiti di riferimento.[10, 22]

Nella interpretazione dei risultati serati bisogna tener conto che la variabilità totale dipende non solo dalla variabilità biologica che è per sua natura incompressibile ma anche da quella analitica che dipende strettamente dal livello di qualità delle prestazioni analitiche, secondo la formula:

$$V_t = DSt = (DS_A^2 + DS_I^2)^{1/2}$$

Dove :

$V_t$  = Variabilità totale

$DSt$  = Deviazione standard della variabilità totale

$DS_A$  = Deviazione standard dell'imprecisione analitica (variabilità analitica)

$DS_I$  = Deviazione standard della variabilità biologica intraindividuale.

In particolare la *variabilità biologica intraindividuale* assume un ruolo fondamentale nello stabilire quali siano gli obiettivi analitici da perseguire; infatti è ormai universalmente accettato che per la precisione, espressa come CV analitico, l'obiettivo da raggiungere sia pari alla metà della *variabilità biologica intraindividuale*. [8, 10, 12]

Come indicatore della qualità analitica si utilizza infatti l'"Errore Totale Analitico Accettabile" (ETa), calcolato come:

$$ETa = [\text{bias} + (z \times s)]$$

dove  $z$  è posto uguale a 1,65 (per una probabilità di 0,95) mentre  $\text{bias}$  ed  $s$  rappresentano il "*traguardo di inaccuratezza analitica*" e il "*traguardo di imprecisione analitica*", calcolati rispettivamente come:

$$\text{bias} = 0,25 \times (\text{CVi}^2 + \text{CVg}^2)^{1/2} \quad s = 0,5 \times \text{CVi} \quad [24]$$

La differenza tra due risultati analitici ottenuti in tempi diversi su uno stesso paziente è statisticamente significativa con una probabilità del 95 % se è uguale o supera il valore della cosiddetta "*differenza critica*" che risulta così definita:

$$\text{dcr} = 2,77 \times Vt = 2,77 \times \text{DSt} = 2,77 \times (\text{DS}_A^2 + \text{DS}_I^2)^{1/2}$$

Il superamento della *differenza critica* sta quindi ad indicare una variazione non casuale, dovuta all'insorgenza di una malattia o ad una sua evoluzione in senso negativo, e questo prima ancora che i valori escano fuori dal generico intervallo di riferimento che, se è valido per l'insieme degli individui di una popolazione, risulta tuttavia troppo ampio per il singolo individuo se non si vuol perdere l'informazione clinica contenuta nel risultato del test.

Si comprende facilmente quanto siano rilevanti le implicazioni inerenti all'impiego della differenza critica nell'interpretazione dei risultati da parte del clinico, poiché è possibile in tal modo restringere notevolmente l'intervallo di

riferimento per ciascun individuo, in modo da poter cogliere più precocemente eventuali tendenze.

Nella tavola che segue si riportano i dati di X.Fuentes-Arderiu messi a confronto con quelli pubblicati da CG. Fraser riguardo alla *variabilità biologica intraindividuale* e a quella *interindividuale*, da cui si evince che non sempre i dati sono univoci, ma che si hanno spesso discordanze notevoli, meritevoli di ulteriori studi. [14, 22]

Inoltre si tratta di dati espressi come valori medi, mentre nel singolo individuo la variabilità intraindividuale può risultare decisamente diversa da quella media. Un'ulteriore complicazione è rappresentata dal fatto che sia la variabilità biologica come la differenza critica, che da questa deriva, sono espresse come valori percentuali ed è evidente quanto in valore assoluto differisca una determinata percentuale di un valore piccolo rispetto alla stessa percentuale di un valore più elevato.

Quindi dopo aver enfatizzato la grande utilità dell'uso della differenza critica nella pratica di laboratorio, non possiamo esimerci dall'evidenziare gli inconvenienti sopracitati al fine di poterne valutare l'entità ed eventualmente ridurne gli effetti con specifici accorgimenti.

E' proprio questo lo scopo del presente lavoro, con il quale intendiamo superare quelle difficoltà che in alcuni casi rischiano di vanificare questo utilissimo confronto retrospettivo, nel tentativo di migliorare ulteriormente la significatività del dato analitico, per far sì che questo non sia semplicemente un numero, ma una preziosa informazione.

Costituente	X. Fuentes Arderiu		GC. Fraser	
	CVi	CVg	CVi	CVg
17-Hydroxyprogesterone	14,6	52,4	14,6	52,4
Alanina amminotransferasi	23,0	41,1	24,3	41,6
Albumina	2,8	4,4	3,1	4,2
Aldosterone	29,4	40,1	29,4	40,1
Amilasi	8,7	25,8	9,5	29,8
Androstendione	15,8	38,8	11,5	51,1
Apolipoproteina B	15,4	29,2	6,9	22,8
Apolipoproteina A-I	6,4	14,0	6,5	13,4
Aptoglobina	23,3	36,2	20,4	36,4
Aspartato amminotransferasi	11,6	13,6	11,9	17,9
Bilirubina coniugata	36,8	41,0	36,8	43,2
Bilirubina totale	22,0	42,6	25,6	30,5
C peptide	9,3	13,3	9,3	13,3
C3 complemento	5,2	14,8	5,2	15,6
C4 complemento	8,9	31,1	8,9	33,4
CA 125	36,0	59,3	13,6	46,5
CA 15-3	5,7	43,9	5,7	42,9
Calcio	1,8	1,9	1,9	2,8
Calcio, Urina giornaliera	28,0	36,6	26,2	27,0
CEA	10,6	69,8	9,3	55,6
Cloruro	1,3	1,3	1,2	1,5
Colesterolo	5,3	15,2	6,0	15,2
Colinesterasi	5,4	17,8	7,0	10,4
Cortisolo	20,9	45,6	20,9	45,6
Creatina kinasi	28,2	49,3	22,8	40,0
Creatinina	4,3	10,4	4,3	12,9
Creatinina, Urina giornaliera	24,2	24,5	11,0	23,0
Deidroepiandrosterone solfato	3,4	30,0	3,4	30,0
Emoglobina	3,4	6,2	2,8	6,6
Eritrociti	2,1	7,0	3,2	6,1
Estradiolo-17 $\beta$	21,7	88,7	22,6	24,4
Ferritina	12,8	13,5	14,9	13,5
Ferro	26,6	23,3	26,5	23,2
Follitropina	17,3	33,6	10,1	32,0
Fosfatasi alcalina	5,9	22,3	6,4	24,8
Fosfato	7,6	11,2	8,5	9,4
Fosfato, Urine	18,2	19,7	26,4	26,5
Fruttosammina	3,7	7,6	3,4	5,9
Glucosio	6,1	7,8	6,5	7,7
$\gamma$ -Glutammitransferasi	12,2	41,0	13,8	41,0
HbA1c	8,8	No	5,6	
HDL-Colesterolo	7,5	23,8	7,1	19,7
Immunoglobuline A	5,0	38,1	5,0	36,8
Immunoglobuline G	4,4	15,9	4,5	16,5

Costituente	CVi	CVg	CVi	CVg
Immunoglobuline M	5,9	47,9	5,9	47,3
Insulina	21,1	58,2	21,1	58,2
LAD	7,3	14,4	6,7	14,7
Lattato	27,2	16,7	27,2	16,7
LDL-Colesterolo	8,6	19,7	8,3	25,7
Leucociti	11,2	19,7	10,9	19,6
Lipasi	32,2	36,0	23,1	33,1
Lipoproteina(a)	10,8	85,8	8,5	85,8
Luteotropina	24,0	29,6	14,5	27,8
Magnesio	3,2	5,9	3,6	6,4
$\alpha$ 1-Microglobuline, Urine	33,0	58,0	33,0	58,0
$\beta$ 2-Microglobuline	4,4	15,5	5,9	15,5
Osmolalità	1,9	1,4	1,3	1,2
Ossalato, Urine	44,0	18,0	44,0	18,0
Osteocalcina	7,3	25,7	6,3	23,1
pH	3,5	2,0	3,5	2,0
Piastrine	9,0	23,3	9,1	21,9
Piruvato	15,2	13,0	15,2	13,0
Potassio	4,6	4,7	4,8	5,6
Potassio, Urine	28,6	23,2	27,1	23,2
Prealbumina	4,4	no	10,9	19,1
Progesterone	31,3	no	31,3	38,0
Prolattina	23,7	52,1	6,9	61,2
Proteina C reattiva	56,6	53,2	52,6	84,4
Proteine totali	2,6	4,8	2,7	4,0
Proteine totali, Urine	36,1	34,5	39,6	17,8
Rame	4,3	13,4	4,9	13,6
Sodio	0,6	0,6	0,7	1,0
Sodio, Urine	24,0	26,8	24,0	26,8
Testosterone	9,6	21,3	8,8	21,3
Tireoglobulina	4,4	12,6	13,0	25,0
Tireotropina	20,0	29,4	19,7	27,2
Tiroxina	6,0	11,9	6,0	12,1
Tiroxina libera	7,6	12,2	7,6	12,2
Transferrina	2,8	2,1	3,0	4,3
Trigliceridi	22,0	46,4	31,0	37,2
Triiodotironina	7,8	17,2	8,7	14,4
Triiodotironina libera	7,9	22,5	7,9	22,5
Urato	7,3	18,8	8,6	17,2
Urato, Urine	25,1	17,4	24,7	22,1
Urea	11,6	17,4	12,3	18,3
Urea, Urine	23,2	25,9	22,7	25,9
Zinco	6,5	6,1	9,3	9,4

## 2. MATERIALI E METODI

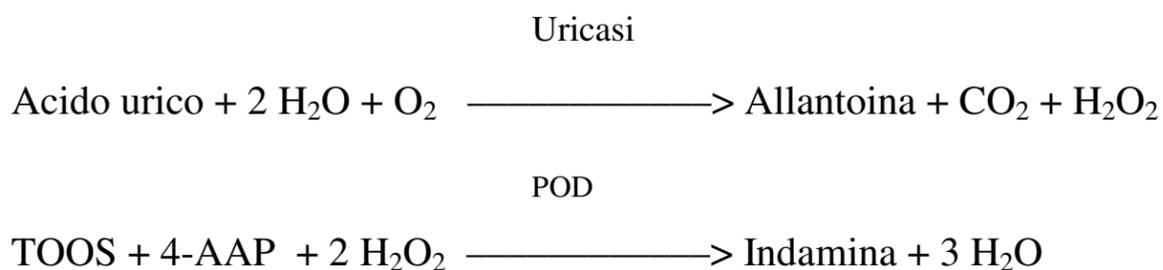
E' stata effettuata una valutazione retrospettiva dei valori di acido urico contenuti in archivio, afferenti ad individui che negli ultimi quattro anni si sono sottoposti ad accertamenti periodici fatti a scopo preventivo e non motivati da patologie specifiche, al fine di valutare la distribuzione delle *variabilità biologiche intraindividuali* dei singoli individui attorno al valore medio, partendo dalla valutazione della *variabilità totale*, a cui abbiamo sottratto la *variabilità analitica* media relativa ai quattro anni.

Parallelamente a questa valutazione retrospettiva si è proceduto alla raccolta di dati mirati in tal senso, seguendo i canoni classici che permettono la valutazione della *variabilità biologica intraindividuale*. [14, 22]

Nell'arco di due mesi otto volontari in buone condizioni di salute sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue in condizioni basali standardizzate. I campioni sono stati congelati a  $-20\text{ C}^\circ$  ed analizzati in duplicato in un'unica seduta, in modo da poter valutare l'imprecisione analitica del metodo usato. Sottraendo quest'ultima alla variabilità totale è stato possibile calcolare la *variabilità biologica intraindividuale CVi* per ciascun individuo.

I dosaggi sono stati effettuati con reagenti Thermo Clinic Labsystem mediante il metodo dell'uricasi ed usando l'analizzatore Konelab 30i della Dasit.

L'acido urico viene ossidato in allantoina ad opera dell'uricasi; il perossido d'idrogeno generato reagisce con la 4-Aminoantipirina (4-AAP) e con la N-etil-N-(idrossi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS) ad opera della perossidasi, dando luogo ad una colorazione blu-violetta; l'assorbanza della colorazione viene misurata a 540 nm.



E' presente Ascorbato-ossidasi per eliminare l'interferenza dell'acido ascorbico fino ad una concentrazione di 50 mg/l. [9]

### **3. RISULTATI**

L'esame retrospettivo dei dati presenti in archivio ha fornito utili informazioni relative ad 80 individui con valori di acido urico compresi tra 2,11 mg/dl e 6,96 mg/dl, che vengono riportati nella TAV. 1.

Trattandosi di dati riferiti a circa quattro anni sono stati presi in considerazione individui di cui erano a disposizione almeno quattro valori, sebbene in qualche caso si arrivi ad averne anche undici.

TAV. 1 (valori di uricemia in mg/dl)

N.paz.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	6,21	6,11	4,78	5,80	6,12	5,79	4,38	5,22			
2	5,89	5,49	5,12	5,81	4,86	5,70	5,47				
3	5,78	6,10	5,23	6,12							
4	3,78	3,68	4,21	4,52							
5	5,32	5,48	4,95	5,18							
6	4,79	4,43	4,78	4,98							
7	2,94	3,82	3,44	3,58							
8	3,11	2,89	3,95	3,01							
9	3,69	3,41	3,42	2,82							
10	7,11	7,13	7,47	6,12	7,00	6,05					
11	3,87	3,81	4,51	3,95	4,98	3,91					
12	3,64	3,12	4,11	3,90	4,50						
13	6,48	6,31	5,48	6,01							
14	3,88	3,18	3,59	3,31	2,73						
15	4,98	5,70	4,68	4,75	5,37	5,78	4,60				
16	5,44	6,03	5,91	5,26							
17	4,94	4,71	5,52	5,68							
18	4,48	5,19	4,89	4,71							
19	4,03	4,41	3,98	3,48	3,52						
20	4,59	4,09	3,90	3,74	3,83						
21	3,66	3,82	3,02	4,45	3,79	4,45	4,70	4,21	5,03	5,27	4,23
22	5,61	5,68	4,48	5,48	4,99						
23	5,68	5,10	5,23	6,12							
24	4,03	3,24	3,58	2,76	3,81	3,71					
25	5,18	4,61	4,70	5,09							
26	4,51	4,83	4,45	4,05							
27	6,38	6,99	6,03	6,51							
28	4,24	4,40	4,71	4,47	4,81						
29	6,68	6,31	7,81	7,02							
30	3,31	4,02	3,61	2,69	2,94						
31	6,49	6,93	6,48	6,88	5,91						
32	2,40	1,82	1,91	2,30							
33	5,12	6,72	5,47	5,66	5,42						
34	4,93	6,18	6,48	5,81							
35	5,53	5,90	5,04	4,47							
36	7,19	6,90	6,14	5,81							
37	5,72	6,22	6,32	5,89	5,61	6,48	5,30				
38	6,00	5,12	5,69	5,68	6,01	5,37					
39	3,41	4,13	4,00	3,42							

40	2,46	2,31	2,28	2,89						
41	4,13	3,01	3,48	3,50	3,83					
42	5,73	5,91	6,22	5,28						
43	5,62	5,55	4,57	4,51						
44	4,97	4,70	5,92	4,39	4,52					
45	3,03	3,01	2,42	3,81	3,11	2,73				
46	4,05	4,01	3,29	4,27	4,02	3,93				
47	4,54	3,72	3,71	3,91	4,38	3,12				
48	3,02	2,42	3,29	2,62						
49	4,40	4,12	5,39	4,61	3,48					
50	2,43	3,41	2,80	2,38	3,20					
51	4,90	4,98	5,11	4,30						
52	6,32	6,43	6,14	5,25						
53	5,88	6,00	5,89	6,20	6,63					
54	5,62	6,01	5,68	5,27						
55	6,00	6,38	5,37	5,77						
56	6,71	5,79	6,39	6,67						
57	5,63	4,81	5,52	4,51						
58	5,31	4,69	4,99	5,69						
59	3,32	3,71	3,88	3,96	3,84					
60	5,87	6,91	5,70	6,48						
61	4,75	4,83	4,04	5,01						
62	2,76	3,09	2,85	3,43						
63	6,01	5,72	5,50	5,21						
64	5,41	4,21	5,12	4,01						
65	5,02	4,63	4,30	4,00						
66	5,11	4,55	5,28	5,01						
67	7,01	6,61	6,02	6,57						
68	7,32	6,34	7,27	6,50						
69	4,82	4,73	4,77	5,92						
70	4,97	4,33	4,69	5,22						
71	6,60	6,38	6,81	6,05						
72	4,42	4,00	3,91	3,22						
73	3,92	3,44	3,39	3,27						
74	5,27	5,39	5,67	4,57	4,78					
75	4,63	4,71	4,63	4,11						
76	6,31	5,61	5,17	6,52						
77	6,60	6,82	7,41	5,85	6,52					
78	5,60	5,67	4,88	5,77	5,30					
79	3,71	3,69	4,48	4,01						
80	4,11	3,69	3,51	3,63						

Dalla valutazione statistica dei dati riportati nella TAV. 2 è possibile ricavare la *variabilità biologica intraindividuale* che oscilla da un minimo di 1,61 % ad un massimo di 15,57 % con una media pari a 8,36 %; analogamente la differenza critica va da un minimo di 11,9 % ad un massimo del 44,5 % con valore medio pari a 26,02 %. (TAV. 2).

La variabilità biologica interindividuale risulta di 20,8 % per l'uomo e di 19,4 % per la donna.

E' interessante notare come i dati ottenuti, sebbene ricavati da un archivio, siano sostanzialmente in linea con i dati di Fraser.

TAV. 2

Numero paz.te	Uricemia mg/dl	Deviazione standard	var.tot. %	var.anal. %	var.biol. %	diff.critica %
32	2,1075	0,2854	13,5398	3,98	12,94	37,5
40	2,4850	0,2812	11,3178	3,98	10,59	31,4
48	2,8375	0,3914	13,7952	3,98	13,21	38,2
50	2,8440	0,4571	16,0720	3,98	15,57	44,5
45	3,0183	0,4640	15,3727	3,98	14,85	42,6
62	3,0325	0,2994	9,8722	3,98	9,03	27,3
8	3,2400	0,4818	14,8704	3,98	14,33	41,2
30	3,3140	0,5280	15,9337	3,98	15,43	44,1
9	3,3350	0,3670	11,0049	3,98	10,26	30,5
14	3,3380	0,4338	12,9954	3,98	12,37	36,0
7	3,4450	0,3714	10,7820	3,98	10,02	29,9
73	3,5050	0,2857	8,1517	3,98	7,11	22,6
24	3,5217	0,4560	12,9497	3,98	12,32	35,9
41	3,5900	0,4201	11,7008	3,98	11,00	32,4
80	3,7350	0,2610	6,9869	3,98	5,74	19,4
39	3,7400	0,3790	10,1346	3,98	9,32	28,1
59	3,7420	0,2526	6,7511	3,98	5,45	18,7
12	3,8540	0,5171	13,4169	3,98	12,81	37,2
19	3,8840	0,3882	9,9959	3,98	9,17	27,7
72	3,8875	0,4974	12,7953	3,98	12,16	35,4
47	3,8967	0,5132	13,1705	3,98	12,55	36,5
46	3,9283	0,3329	8,4741	3,98	7,48	23,5
79	3,9725	0,3686	9,2797	3,98	8,38	25,7
20	4,0300	0,3385	8,3983	3,98	7,40	23,3
4	4,0475	0,3900	9,6353	3,98	8,77	26,7
11	4,1717	0,4706	11,2807	3,98	10,56	31,2
21	4,2391	0,6473	15,2689	3,98	14,74	42,3
49	4,4000	0,6980	15,8644	3,98	15,36	43,9
26	4,4600	0,3202	7,1796	3,98	5,98	19,9
65	4,4875	0,4384	9,7701	3,98	8,92	27,1
75	4,5200	0,2759	6,1045	3,98	4,63	16,9
28	4,5260	0,2320	5,1262	3,98	3,23	14,2
61	4,6575	0,4258	9,1419	3,98	8,23	25,3
64	4,6875	0,6822	14,5530	3,98	14,00	40,3
6	4,7450	0,2293	4,8319	3,98	2,74	13,4
70	4,8025	0,3822	7,9588	3,98	6,89	22,0
18	4,8175	0,2997	6,2212	3,98	4,78	17,2
51	4,8225	0,3589	7,4427	3,98	6,29	20,6
25	4,8950	0,2820	5,7601	3,98	4,16	16,0

44	4,9000	0,6103	12,4548	3,98	11,80	34,5
66	4,9875	0,3122	6,2604	3,98	4,83	17,3
69	5,0600	0,5745	11,3540	3,98	10,63	31,5
43	5,0625	0,6045	11,9408	3,98	11,26	33,1
57	5,1175	0,5441	10,6330	3,98	9,86	29,5
15	5,1229	0,4924	9,6125	3,98	8,75	26,6
74	5,1360	0,4513	8,7872	3,98	7,83	24,3
58	5,1700	0,4293	8,3030	3,98	7,29	23,0
17	5,2125	0,4618	8,8601	3,98	7,92	24,5
5	5,2325	0,2247	4,2944	3,98	1,61	11,9
35	5,2350	0,6198	11,8398	3,98	11,15	32,8
22	5,2480	0,5069	9,6593	3,98	8,80	26,8
78	5,4440	0,3607	6,6263	3,98	5,30	18,4
2	5,4771	0,3741	6,8295	3,98	5,55	18,9
23	5,5325	0,4639	8,3841	3,98	7,38	23,2
1	5,5513	0,6829	12,3025	3,98	11,64	34,1
63	5,6100	0,3387	6,0378	3,98	4,54	16,7
38	5,6450	0,3504	6,2065	3,98	4,76	17,2
54	5,6450	0,3032	5,3702	3,98	3,61	14,9
16	5,6600	0,3687	6,5140	3,98	5,16	18,0
33	5,6780	0,6139	10,8111	3,98	10,05	29,9
42	5,7850	0,3928	6,7902	3,98	5,50	18,8
3	5,8075	0,4153	7,1515	3,98	5,94	19,8
34	5,8500	0,6718	11,4831	3,98	10,77	31,8
55	5,8800	0,4229	7,1926	3,98	5,99	19,9
76	5,9025	0,6244	10,5779	3,98	9,80	29,3
37	5,9343	0,4250	7,1612	3,98	5,95	19,8
52	6,0350	0,5368	8,8950	3,98	7,95	24,6
13	6,0700	0,4387	7,2275	3,98	6,03	20,0
53	6,1200	0,3128	5,1113	3,98	3,21	14,2
60	6,2400	0,5583	8,9467	3,98	8,01	24,8
56	6,3900	0,4246	6,6444	3,98	5,32	18,4
71	6,4600	0,3249	5,0288	3,98	3,07	13,9
27	6,4775	0,3973	6,1331	3,98	4,67	17,0
36	6,5100	0,6433	9,8813	3,98	9,04	27,4
31	6,5380	0,4095	6,2630	3,98	4,84	17,3
67	6,5525	0,4068	6,2084	3,98	4,76	17,2
77	6,6400	0,5624	8,4706	3,98	7,48	23,5
10	6,8133	0,5861	8,6027	3,98	7,63	23,8
68	6,8575	0,5098	7,4341	3,98	6,28	20,6
29	6,9550	0,6395	9,1949	3,98	8,29	25,5
medie	4,85	0,44	9,39	3,98	8,36	26,02

I dati sperimentali relativi agli otto donatori vengono riportati qui di seguito, riuniti due a due, e si riferiscono a valori medi di acido urico compresi tra 2,80 mg/dl e 8,13 mg/dl.

	paz.te n.1			paz.te n.2		
	1° dos.	2° dos.	differenze	1° dos.	2° dos.	differenze
1° campione	3,16	3,25	-0,09	3,80	3,86	-0,06
2° campione	2,91	2,93	-0,02	3,59	3,60	-0,01
3° campione	2,55	2,54	0,01	4,37	4,32	0,05
4° campione	2,78	2,81	-0,03	3,60	3,59	0,01
5° campione	2,38	2,36	0,02	3,35	3,35	0,00
6° campione	2,95	2,98	-0,03	4,19	4,23	-0,04
	1° dos.	2° dos.	val.medi	1° dos.	2° dos.	val.medi
variabilità analitica			<b>0,04243</b>			<b>0,03629</b>
Media	2,79	2,81	<b>2,80</b>	3,82	3,83	<b>3,82</b>
variabilità analitica %			<b>1,52</b>			<b>0,95</b>
variabilità totale (d.st.)	0,28	0,32	<b>0,30</b>	0,39	0,39	<b>0,39</b>
variabilità totale %	10,18	11,38	<b>10,78</b>	10,23	10,07	<b>10,15</b>
variabilità biologica (d.s)	0,28	0,32	<b>0,30</b>	0,39	0,38	<b>0,39</b>
variabilità biologica %	<b>10,06</b>	<b>11,28</b>	<b>10,67</b>	<b>10,18</b>	<b>10,02</b>	<b>10,10</b>

	paz.te n.3			paz.te n.4		
	1° dos.	2° dos.	differenze	1° dos.	2° dos.	differenze
1° campione	4,45	4,34	0,11	3,51	3,52	-0,01
2° campione	4,14	4,08	0,06	3,95	3,98	-0,03
3° campione	3,81	3,76	0,05	5,00	5,06	-0,06
4° campione	3,36	3,39	-0,03	4,41	4,39	0,02
5° campione	4,65	4,66	-0,01	4,19	4,15	0,04
6° campione	4,68	4,69	-0,01	4,37	4,42	-0,05
	1° dos.	2° dos.	val.medi	1° dos.	2° dos.	val.medi
variabilità analitica			<b>0,05672</b>			<b>0,03894</b>
Media	4,18	4,15	<b>4,17</b>	4,24	4,25	<b>4,25</b>
variabilità analitica %			<b>1,36</b>			<b>0,92</b>
variabilità totale (d.st.)	0,52	0,51	<b>0,52</b>	0,50	0,51	<b>0,51</b>
variabilità totale %	12,45	12,38	<b>12,41</b>	11,76	12,08	<b>11,92</b>
variabilità biologica (d.s)	0,52	0,51	<b>0,51</b>	0,50	0,51	<b>0,50</b>
variabilità biologica %	<b>12,37</b>	<b>12,31</b>	<b>12,34</b>	<b>11,73</b>	<b>12,05</b>	<b>11,89</b>

	paz.te n.5			paz.te n.6		
	1° dos.	2° dos.	differenze	1° dos.	2° dos.	differenze
1° campione	4,55	4,55	0,00	5,75	5,80	-0,05
2° campione	4,86	4,86	0,00	5,17	5,12	0,05
3° campione	4,63	4,57	0,06	4,98	5,02	-0,04
4° campione	4,57	4,58	-0,01	5,44	5,40	0,04
5° campione	4,59	4,69	-0,10	5,61	5,58	0,03
6° campione	4,73	4,82	-0,09	4,91	5,00	-0,09
	1° dos.	2° dos.	val.medi	1° dos.	2° dos.	val.medi
variabilità analitica			<b>0,06028</b>			<b>0,05354</b>
Media	4,66	4,68	<b>4,67</b>	5,31	5,32	<b>5,32</b>
variabilità analitica %			<b>1,29</b>			<b>1,01</b>
variabilità totale (d.st.)	0,12	0,13	<b>0,13</b>	0,34	0,33	<b>0,34</b>
variabilità totale %	2,56	2,88	<b>2,72</b>	6,46	6,16	<b>6,31</b>
variabilità biologica (d.s)	0,10	0,12	<b>0,11</b>	0,34	0,32	<b>0,33</b>
variabilità biologica %	<b>2,20</b>	<b>2,58</b>	<b>2,39</b>	<b>6,38</b>	<b>6,08</b>	<b>6,23</b>

	paz.te n.7			paz.te n.8		
	1° dos.	2° dos.	differenze	1° dos.	2° dos.	differenze
1° campione	6,71	6,74	-0,03	7,95	7,86	0,09
2° campione	6,06	6,11	-0,05	8,28	8,22	0,06
3° campione	6,31	6,25	0,06	8,39	8,46	-0,07
4° campione	6,15	6,22	-0,07	7,81	7,78	0,03
5° campione	6,05	5,94	0,11	8,38	8,44	-0,06
6° campione	5,44	5,42	0,02	7,97	8,01	-0,04
	1° dos.	2° dos.	val.medi	1° dos.	2° dos.	val.medi
variabilità analitica			<b>0,06377</b>			<b>0,06151</b>
Media	6,12	6,11	<b>6,12</b>	8,13	8,13	<b>8,13</b>
variabilità analitica %			<b>1,04</b>			<b>0,76</b>
variabilità totale (d.st.)	0,41	0,43	<b>0,42</b>	0,25	0,29	<b>0,27</b>
variabilità totale %	6,76	7,07	<b>6,91</b>	3,08	3,58	<b>3,33</b>
variabilità biologica (d.s)	0,41	0,43	<b>0,42</b>	0,24	0,28	<b>0,26</b>
variabilità biologica %	<b>6,68</b>	<b>6,99</b>	<b>6,84</b>	<b>2,98</b>	<b>3,50</b>	<b>3,24</b>

Come è possibile verificare nella tavola riassuntiva qui di seguito riportata (TAV. 3), i valori di *variabilità biologica* negli otto donatori vanno da 2,39 % a 12,34 % con un valore medio di 7,96; rispettivamente la *differenza critica* oscilla tra 7,53 % e 34,4 % con un valore medio pari a 22,3 %.

**TAV.3**

<b>Numero paziente</b>	<b>Uricemia mg/dl</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>var. tot. %</b>	<b>var. anal. %</b>	<b>var. biol. %</b>	<b>diff. critica %</b>
1	<b>2,80</b>	0,30	10,78	1,52	<b>10,67</b>	<b>29,9</b>
2	<b>3,82</b>	0,39	10,15	0,95	<b>10,10</b>	<b>28,1</b>
3	<b>4,17</b>	0,52	12,41	1,36	<b>12,34</b>	<b>34,4</b>
4	<b>4,25</b>	0,51	11,92	0,92	<b>11,89</b>	<b>33,0</b>
5	<b>4,67</b>	0,13	2,72	1,29	<b>2,39</b>	<b>7,53</b>
6	<b>5,32</b>	0,34	6,31	1,01	<b>6,23</b>	<b>17,5</b>
7	<b>6,12</b>	0,42	6,91	1,04	<b>6,84</b>	<b>19,1</b>
8	<b>8,13</b>	0,27	3,33	0,76	<b>3,24</b>	<b>9,22</b>
<b>Medie</b>	<b>4,91</b>	0,36	8,07	1,11	<b>7,96</b>	<b>22,3</b>

## 4. DISCUSSIONE

Dal confronto tra i valori di *variabilità biologica intraindividuale* e quelli di *variabilità biologica interindividuale* si deduce che l'acido urico ha un basso *rapporto di individualità*, pertanto in questo caso l'uso della differenza critica risulta particolarmente utile, poiché interviene a ridurre sensibilmente un intervallo di riferimento piuttosto ampio.

Dai dati desunti in modo retrospettivo dall'archivio storico e valutati statisticamente, ordinati secondo valori medi di acido urico crescenti, così come si presentano nella TAV. 2 , si nota innanzitutto che c'è una certa dispersione dei valori di deviazione standard attorno al valore medio di 0,44, che vanno da 0,22 a 0,70 ; questo vuol dire che in alcuni individui i valori oscillano attorno al valore medio meno che in altri, pertanto l'uso di un valore di *variabilità biologica*

*intraindividuale media* in questi soggetti porta inevitabilmente a considerare non significative differenze che in realtà lo sono, mentre succede il contrario per gli individui con variabilità maggiore della media.

A questo punto viene da chiedersi se ci sia o meno una relazione tra l'entità della deviazione standard ed il valore dell'uricemia.

Per rendere più evidenti certe relazioni di difficile valutazione proprio a causa della variabilità dei dati, riteniamo opportuno ripartire tutti i valori in 5 classi e riferirci ai valori medi di ciascuna classe, come riportato nella TAV. 4.

TAV. 4

<b>Classi uricemia mg/dl</b>	<b>deviazione standard</b>	<b>var. tot. %</b>	<b>var. anal. %</b>	<b>var. biol. %</b>	<b>diff. critica %</b>
<b>2,5685</b>	<b>0,3538</b>	<b>13,6812</b>	<b>3,98</b>	<b>13,08</b>	<b>37,9</b>
<b>3,5779</b>	<b>0,4009</b>	<b>11,2968</b>	<b>3,98</b>	<b>10,52</b>	<b>31,3</b>
<b>4,5665</b>	<b>0,4107</b>	<b>9,0696</b>	<b>3,98</b>	<b>7,96</b>	<b>25,1</b>
<b>5,4800</b>	<b>0,4687</b>	<b>8,5889</b>	<b>3,98</b>	<b>7,48</b>	<b>23,8</b>
<b>6,4756</b>	<b>0,4822</b>	<b>7,4316</b>	<b>3,98</b>	<b>6,18</b>	<b>20,6</b>

Dal confronto tra le varie classi si nota come con il crescere del valore di uricemia cresce anche se di poco la deviazione standard, mentre tutti gli altri dati, essendo espressi in valori percentuali, decrescono progressivamente ed in modo abbastanza consistente.

Se la variabilità analitica risulta piuttosto alta è perché si è fatta una valutazione di dati ottenuti nell'arco di quattro anni nel corso dei quali possono essere intervenuti diversi fattori di instabilità. L'aver usato nei calcoli un valore fisso di variabilità analitica è un'approssimazione inevitabile, che non rispecchia fedelmente la situazione reale ma porta a sovrastimare leggermente la variabilità biologica ai bassi livelli e a sottostimarla agli alti livelli, senza che questo vada ad incidere minimamente sulla differenza critica.

Qualcosa di analogo si può dedurre anche dalla valutazione dei dati sperimentali (vedi TAV. 3) anche se, trattandosi di soli otto individui, valutazioni

statistiche in tal senso sarebbero fuorvianti a motivo della grossa dispersione dei valori di deviazione standard attorno al valore medio. Qui la valutazione della variabilità analitica è sicuramente più puntuale e risulta molto più contenuta poiché è intraserie variando in modo pressoché insensibile al variare dei valori di uricemia.

Si può quindi concludere che al variare del punto omeostatico attorno al quale oscillano i valori dei singoli individui non varia di molto l'entità delle oscillazioni, mentre in valori percentuali, a livelli bassi di uricemia corrispondono proporzionalmente valori alti di variabilità biologica e di differenza critica e viceversa.

Queste considerazioni inducono a ritenere che la *differenza critica* pur essendo espressa come valore percentuale medio poiché correlata alla *variabilità biologica intraindividuale media*, anch'essa espressa in percentuale, non vada usata come tale, poiché equivarrebbe a sostenere che individui con valori bassi debbano avere una bassa variabilità attorno al valore medio e individui con valori alti debbano averla alta. Anche se questo è in minima parte vero, il fenomeno viene amplificato e si rischia di vanificare i vantaggi che un uso appropriato della differenza critica può sicuramente arrecare in termini di significatività.

A questo proposito è opportuno fare qualche esempio.

Nel caso dell'acido urico la differenza critica ufficiale corrisponde al 25%. Il che vuol dire che già un valore di 2,5 mg/dl è significativamente diverso da 2 mg/dl, mentre perché ci sia una differenza significativa rispetto a 7,0 mg/dl bisogna arrivare a 8,75 mg/dl; se poi si estende il discorso ai valori in ambito patologico, giacché l'utilizzo della differenza critica si applica anche per valutare un miglioramento di uno stato di malattia, si arriva all'assurdo che un individuo con 12 mg/dl di acido urico non possa essere considerato in fase di reale miglioramento se non quando i valori dovessero scendere al di sotto di 9 mg/dl.

I dati sperimentali e quelli tratti dall'archivio dimostrano entrambi che ai livelli estremi la variabilità espressa come deviazione standard differisce di poco, mentre in valori percentuali differisce sensibilmente.

L'inconveniente appena descritto è ancora più evidente nei confronti di altri esami come ad esempio il PSA. In letteratura la differenza critica per il PSA corrisponde al 39 %, il che vuol dire che si supera la differenza critica quando da 3,0 ng/ml si passa a 4,17 ng/ml, ma anche quando da 0,3 ng/ml si passa a 0,4 ng/ml. Inoltre, un individuo con 30 ng/ml non può considerarsi in fase di miglioramento se non quando arrivi a 18 ng/ml. Viceversa un individuo con 18 ng/ml non deve arrivare a 30 ng/ml perché la differenza possa considerarsi significativa ma semplicemente a 25 ng/ml.

Tutto lascia intendere che sebbene variabilità biologica e differenza critica siano espresse come valori percentuali, essendo valori medi debbono essere riferite ai valori medi dell'intervallo di riferimento e il valore che ne deriva deve essere usato come valore assoluto, pur sapendo che si sta compiendo un'approssimazione, che tuttavia risulta di gran lunga inferiore rispetto a quella che si compie applicando i valori percentuali.

Tornando quindi all'acido urico, una differenza critica del 25 % riferita ad un valore medio di 4,50 mg/dl corrisponde ad un valore di 1,12 mg/dl che con qualche approssimazione per i valori estremi, può a buon ragione rappresentare una misura oltre la quale una differenza tra due successivi valori può risultare significativa, a qualunque livello ci si trovi.

Volendo visualizzare gli esempi fatti, prendiamo in esame il grafico relativo al paziente n. 50.

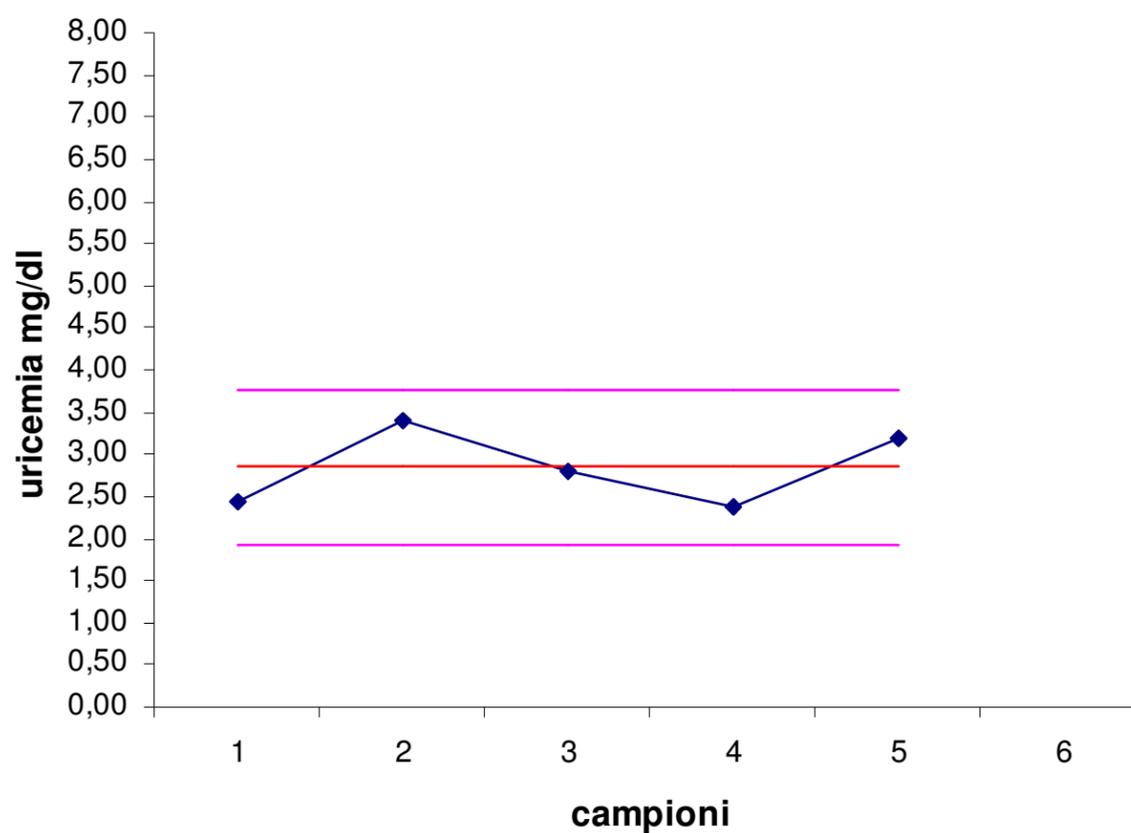
Qui in due casi su quattro le differenze tra due valori consecutivi, pur essendo accettabili, superano il limite del 25% generando due falsi allarmi, mentre in nessun caso viene superato il limite pari a 1,12 mg/dl.

Viceversa nel caso del paziente n. 77 a differenze più consistenti, anche più che doppie, non corrispondono allarmi di superamento della differenza critica, che non sfuggono invece ad un confronto con una quantità fissa pari a 1,12 mg/dl.

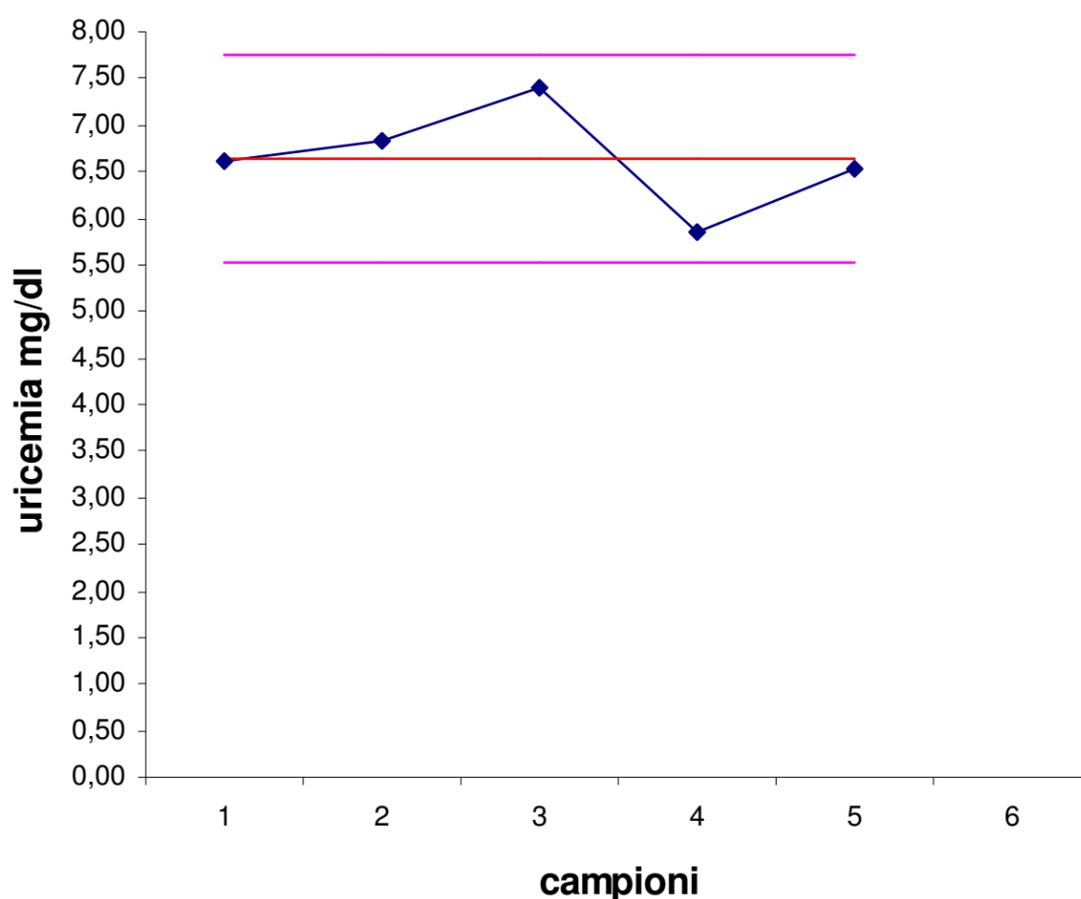
Inoltre il grafico in esame permette di evidenziare un ulteriore limite dell'uso della differenza critica, nel senso che il confronto viene inevitabilmente fatto con l'ultimo valore, e se questo è un valore alto rispetto alla media dei valori

di quell'individuo, quale nel nostro caso il terzo valore pari a 7,41, un ulteriore aumento del 25% risulterebbe ancora accettabile fino ad arrivare a 9,26 mg/dl, così come una diminuzione del 25 % rispetto al quarto valore, pari a 5,85 mg/dl, potrebbe portare senza allarmi al valore di 4,39 mg/dl.

### Paziente n. 50



### Paziente n. 77



Decisamente più contenuto sarebbe l'errore se il confronto venisse fatto con il 25 % del valore medio di acido urico pari a 1,12 mg/dl, anche se sarebbe auspicabile confrontare il dato attuale con la media dei valori precedenti e considerarlo fuori *range* se cade al di fuori dell'intervallo definito dal valore della deviazione standard.

Questo è quanto il programma gestionale in uso nel nostro laboratorio ci permetterebbe di fare dal momento che i dati sono conservati in un archivio storico e per ciascun paziente e per ciascun esame potremmo avere a disposizione valori medi e deviazioni standard. Ovviamente questo confronto dovrebbe essere possibile soltanto quando la dispersione dei valori (almeno sei) attorno al valore medio non superi un certo valore limite, oltre il quale dovrebbe essere ripreso in

considerazione l'uso della differenza critica modificata come con questo lavoro abbiamo ritenuto di indicare.

## **4. CONCLUSIONI**

Partendo dall'esigenza di perseguire un adeguato livello di qualità globale nella pratica quotidiana di laboratorio, abbiamo ritenuto di soffermarci a valutare alcuni aspetti della fase postanalitica nel tentativo di evidenziare alcuni accorgimenti utili al potenziamento del significato clinico dei dati analitici.

Questo obiettivo è possibile raggiungerlo ponendo una cura particolare al referto in modo che possa contenere il massimo delle informazioni, esposte nella forma più chiara ed immediata.

Abbiamo visto come ai tradizionali valori di riferimento riferiti alla popolazione andrebbero affiancati i valori di riferimento personali; anche se tale modifica richiede uno sforzo notevole abbiamo dimostrato come con opportuni programmi di gestione del laboratorio questo sia possibile.

Tuttavia un uso appropriato della differenza critica rappresenta già un grosso passo in avanti poiché nella maggior parte dei casi fornisce al clinico un elemento di valutazione in più circa l'andamento di una malattia o l'effetto di una terapia. Inoltre la differenza critica offre il modo di comunicare al clinico anche il livello di qualità raggiunto dal laboratorio, poiché il dato comprende in sé la variabilità analitica e quindi dà una misura della imprecisione analitica del laboratorio, fungendo così da stimolo per un contenimento sempre maggiore della stessa. Se da un lato si è esaltato l'uso della differenza critica, dall'altro non si è potuto fare a meno di evidenziare i limiti di questa pratica, il primo fra tutti dovuto alla grande dispersione dei valori di variabilità biologica attorno al valore medio che è l'unico valore a cui possiamo riferirci in assenza di un archivio storico dei dati. Inoltre l'uso del valore percentuale della differenza critica potrebbe essere addirittura fuorviante quanto più ci si allontana dai valori medi, al punto che sarebbe preferibile esprimere la differenza critica come valore assoluto oltre il quale la differenza tra due valori successivi debba essere considerata significativa. Non bisogna trascurare il fatto che laddove i valori dovessero crescere lentamente ma progressivamente, la differenza critica potrebbe non essere idonea a rilevare questa tendenza poiché ogni volta la differenza tra i due valori successivi potrebbe essere inferiore a quella critica e si potrebbe passare da valori normali a valori francamente patologici senza nessun segnale di allarme. Tutti questi accorgimenti permettono di fare della differenza critica un uso certamente più oculato e sicuramente più adeguato alle esigenze cliniche, fermo restando che un archivio storico dei dati permetterebbe una valutazione ancora più rigorosa del dato analitico nel momento in cui questo viene valutato statisticamente tramite un confronto con i valori dello stesso individuo piuttosto che con quelli sicuramente più ampi riferiti a tutta la popolazione.

## 5. Bibliografia

1. Agnese G. : *Statistical considerations on the variability of analyticals results*. Ann. Ist. Sup.San. 1971; 7:231-243.
2. Agnese G. : *Sulla definizione dei valori normali in medicina*. Arch.Sc.Med. 1975; 132: 139-150.
3. Barnett, R.N.: *Medical Significance of laboratory results*. Am. J. Clin. Pathol, 1968; 50:671
4. Bland, G.M., Altman, D.G.: *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. Lancet 1986; 1: 07-310.

5. De Angelis, G., Franzini C., Masi, I.: *Norme, raccomandazioni e proposte per esprimere le grandezze e le unità in chimica clinica.* Giorn.It.Chim.Cl., 1,173 (1976).
6. De Angelis,G., Franzini,C.: *Nomenclatura, grandezze e unità di misura nel laboratorio di analisi chimico-cliniche,* Giorn.It.Chim.Clin. 1988; 13:1.
7. ECCLS. *Guidelines for the evaluation of analysers in clinical chemistry.* ECCLS documents 1986; 3:25.
8. Eilers,RJ.: *Quality assurance in health care: Missions, goals, activities.* Clin.Chem., 21:1357-1367, 1975.
9. Fossati, P., Prencipe, L.,and Berti, G.: *Use of 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic Acid / 4-Aminophenazone Chromogenic Systems in Direct Enzymatic Assay of Uric Acid in Serum and Urine.* Clin.Chem., 26(2), 1980, pp.227-231.
10. Fraser CG.: *Biological variation in clinical chemistry: an update. Collated data, 1988-1991.* Arch. Pathol. Lab. Med.1992; 116:916-23.
11. Fraser, CG., Browning,MCK.: *The "Index of fiduciability" proposed for use in evaluation and comparison of methods.* Clin.Chim.1988; 34:1356-7.
12. Fraser, CG.: *The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing.* Arch. Pathol.Lab.Med. 1988; 112:404-15.

13. Fraser, CG. et al.: *Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry*. Eur.J.Clin. Chem. Clin. Biochem. 1992; 30:311-7.
14. Fraser,CG., Harris,EK.: *Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry*. Crit.Rev.Lab.Sci. 1989; 27:409-37.
15. Grasbek, R.,Saris, N.E.: *Establishment and use of normal value*. J.Clin.Lab.Invest., 1969; 24(suppl); 110:62
16. IUPAC-IFCC : *Quantities and units in clinical chemistry. Recommendation 1973*. Pure and Appl.Chem. 37, 517 (1974).
17. Levey, S., Jennings E.R. : *The use of control charts in the clinical laboratories*. Am.J.Clin.Pathos 1950; 20:1059-1066.
18. Lison, C.: *Statistica per biologi*, 1961, CEA.
19. Ricos, C. Et al.: *Current databases on biological variation : pros, cons and progress*, Scan.J.lab. Invest. 1999 ; 59 :491-500.
20. Ross, JW.:*Evaluation of precision*. In:Werner, M. Editor. Handbook of clinical chemistry. Vol.1, 1982: 391,42.
21. Sanders,G.T. et al.: *The European Register for Clinical Chemist.*, Eur.J.Clin.Chem.Biochem.1997; 35(10):795-796.
22. Sebastian-Gambaro, M.A., Liròn Hernández, PJ, Fuentes-Arderiu, X.: *Intra- and inter-individual biological variability data bank*. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1997); 35:845-52.

23. Spandrio,L.: *Biochimica Clinica*. Sorbona, Ed. Milano 1989.
24. Vanzetti, G. : *La qualità analitica in biochimica clinica*. Milano: Biomedia 2001.
25. Vanzetti,G.,Franzini, C.: *Il Controllo di Qualità in Chimica Clinica*, Notiziario SIBIOC, Novembre 1981.
26. Westgard, J.O. et al.: *A Multi-RuleShewart Chart for Qualità in Clinical Chemistry*, Clin.Chim. 1981, 27/3:493-501.
27. Westgard, J.O., Klee, G.G.: *Quality management* – in Tietz textbook of Clinical Chemistry, 1994, Saunders Company, Filadelfia.