

Appropriatezza della richiesta di esami ed esiti clinici: il caso delle malattie renali, tiroidee e della celiachia

Mario Plebani¹, Renato Tozzoli², Tommaso Trenti³, Ferruccio Ceriotti⁴, Francesca Di Serio⁵

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Maria degli Angeli, Pordenone

³Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria e Azienda USL, Modena

⁴Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁵Patologia Clinica Ospedaliera, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico, Bari

ABSTRACT

Appropriateness of test request and clinical outcome: the example of kidney, thyroid and coeliac disease. This document analyzes the topic of appropriateness of test request. It is organized in 4 parts. The first deals with the theme of appropriateness, the consequences of insufficient or excessive test request and the need to balance guideline indications with the clinical need of a single patient. The other 3 parts present the cases of thyroid, chronic kidney and coeliac disease. With regard to the thyroid function, population screening, excluding neonates, is not recommended; on the contrary, it is highly recommended to evaluate the thyroid function in any individual with even only a minimal clinical suspect. The thyrotropin (TSH) is the test of choice with reflex free T4 and free T3, according to specific algorithms. The contemporaneous measurement of free FT3, free FT4 and TSH, except for specific cases, should be discouraged due to the high frequency of unjustified abnormal findings. Anti-thyroperoxidase antibodies are the test of choice for autoimmune thyroid diseases. In chronic kidney disease (CKD), the estimated glomerular filtration rate (eGFR) based on serum creatinine in most cases is the best indicator of renal function, provided that creatinine is measured with the accurate enzymatic method. In borderline situations, a confirmatory eGFR calculation based on cystatin C is recommended. Urinary albumin, expressed as albumin/creatinine ratio, is an essential complement for CKD staging. The diagnosis of coeliac disease requires integration between clinical, histological and serological data. The anti-transglutaminase IgA is the test of choice; only when an IgA deficit is present, the test to be used is IgG anti-gliadin deamidate peptides. The genetic HLA DQ2/DQ8 test is indicated for screening of subjects at risk: if negative, coeliac disease can be excluded.

PREMESSA

Il presente documento ha lo scopo di analizzare il problema dell'appropriatezza della richiesta di esami di laboratorio, argomento complesso e dibattuto dal punto di vista professionale, gestionale ed economico. L'analisi e le proposte rappresentano un primo contributo di un gruppo di professionisti di Medicina di Laboratorio, chiamati da Siemens Healthcare Italia a operare, in collaborazione con il Centro di Ricerche sulla Gestione dell'Assistenza Sanitaria e Sociale (CERGAS) dell'Università Bocconi di Milano, su tematiche di "management" sanitario. L'articolo è strutturato in 4 parti: la prima relativa ad aspetti generali di governo clinico, la seconda riferita al caso degli esami di funzionalità tiroidea (TFT), la terza relativa alle modalità dello

screening della malattia renale cronica (CKD), la quarta riferita alla diagnosi della malattia celiaca.

L'APPROPRIATEZZA IN MEDICINA DI LABORATORIO

Vi è crescente interesse e dibattito sul tema dell'appropriatezza in medicina, fondamentale per la preoccupazione derivante dall'aumento dei costi e per le problematiche di accessibilità, equità, sostenibilità e sicurezza per la diagnosi e cura in tutti i sistemi sanitari (1, 2). In Medicina di Laboratorio la ricerca di un equilibrio ottimale tra necessità di razionalizzazione senza razionamento è problema quotidiano: il tema dell'inappropriatezza nella richiesta degli esami è legato

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Via Francesco Sforza 28, 20122 Milano. Tel. 0255032876, Fax 0255032876, E-mail ferruccio.ceriotti@policlinico.mi.it

Ricevuto: 22.05.2017

Revisionato: 30.06.2017

Accettato: 04.07.2017

Publicato on-line: 03.08.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.040

al costo crescente delle indagini di laboratorio e ai costi indiretti che possono derivare dall'informazione di laboratorio in termini di ricadute e ulteriori indagini diagnostiche, ricoveri e trattamenti terapeutici (3). In quest'ultimo caso, si parla di "sindrome di Ulisse" a raffigurare come i pazienti possano perdersi in peregrinazioni sanitarie generate da domande sbagliate derivanti da precedenti risposte errate (4).

A fronte di una generale e generica enfasi sull'inappropriatezza nella richiesta di esami di laboratorio, deve peraltro essere sottolineato che i dati della letteratura nel quindicennio 1997-2012 documentano che la sottoutilizzazione è prevalente rispetto alla sovrautilizzazione (all'incirca, 45% vs. 20%) (5). Inoltre, si evidenzia il numero relativamente modesto di studi sul tema dell'appropriatezza e i difetti nel loro disegno legati anche allo scarso consenso sulla definizione stessa del termine. Il "College of American Pathologists" negli "Standards for Accreditation" ha definito l'appropriatezza come "il grado con il quale una procedura, un trattamento, un esame o il servizio di laboratorio è efficace, chiaramente indicato, non eccessivo, adeguato in quantità, e fornito in regime di ospedalizzazione, ambulatoriale e in altri contesti clinici per rispondere ai bisogni del paziente" (6). In effetti, anche la definizione generica di appropriatezza in medicina che fa riferimento alle prove che la procedura generi un beneficio per la salute superiore di un margine adeguato al rischio per il paziente, anche in termini psicologici e di costi, ribadisce l'esigenza di una visione centrata sui bisogni clinici.

Più recentemente, il tema dell'appropriatezza in Medicina di Laboratorio è stato ricondotto all'interno del concetto del "demand management", ossia della gestione dell'appropriatezza della richiesta non solo per evitare sprechi, uso incongruo delle risorse e aumento ingiustificato dei costi, ma per migliorare la qualità e la sicurezza per i pazienti (7-9). È infatti dimostrato che una richiesta eccessiva e non correlata al reale quesito clinico determina un aumento dei falsi positivi per effetto della ridotta prevalenza della malattia e quindi della bassa probabilità a priori che incide fortemente sull'accuratezza diagnostica (valore predittivo) dell'esame (10-12).

Pertanto, se è vero che si definisce inappropriata una richiesta di esami che sia al di fuori di ogni forma di guida accettata (linea guida, raccomandazione, suggerimento di esperti), è altrettanto chiaro che l'appropriatezza va misurata rispetto ai reali bisogni del paziente e nello specifico contesto clinico. Inoltre, il tema dell'appropriatezza non deve limitarsi alla sola fase della richiesta, ma si deve estendere a tutte le fasi del ciclo dell'esame di laboratorio per evitare inappropriate modalità di prelievo, manipolazione, trasporto dei campioni biologici e ancora inappropriate modalità analitiche e post-analitiche.

Scopo di questo articolo è identificare alcune situazioni paradigmatiche all'interno delle quali sia possibile studiare e identificare i bisogni clinici del paziente e, su questa base razionale, creare le

opportunità per migliorare l'appropriatezza nella richiesta di esami di laboratorio. Si ritiene, in particolare, che nell'ambito della diagnostica della funzionalità tiroidea, delle malattie renali e della malattia celiaca esistano prove di letteratura ed esperienze idonee a portare a termine il percorso per una "governance" clinica della domanda di esami diagnostici efficiente ed efficace.

La crescita dei carichi di lavoro e delle attività diagnostiche nel laboratorio clinico

Vi è indubbiamente un costante incremento nella richiesta di esami di laboratorio, anche se è difficile identificare dati che riassumano esplicitamente i "pattern" di richiesta degli esami diagnostici sia in ambito nazionale che internazionale. Nell'ultimo decennio vi è stato un aumento non solo nel Regno Unito, ma anche negli Stati Uniti, in Canada e in tanti altri paesi, tra cui l'Italia. L'aumento osservato nella richiesta di esami di laboratorio è particolarmente evidente nelle richieste provenienti dalla medicina di base, con incrementi annuali a due cifre. Vi sono molte ragioni che spiegano e giustificano questo incremento, quali:

- il passaggio da una medicina curativa a una medicina preventiva e personalizzata che ricerca l'identificazione dei fattori di rischio, la diagnosi precoce e terapie sempre più mirate grazie all'utilizzo dell'informazione di laboratorio;
- l'espansione della gamma degli esami disponibili, con possibilità di pannelli "multimarker" a impatto decisionale rilevante, come nella gestione dell'infarto miocardico acuto (13);
- la curiosità e l'interesse verso nuove tecnologie ed esami diagnostici fortemente propagandati come innovativi;
- un approccio passivo a recepire acriticamente iniziali risultati di ricerche, nonostante l'incompletezza e la parzialità dei dati scientifici;
- l'impulso sociologico e culturale a ritenere che lo screening in condizioni di basso rischio di patologia, come nel caso di "check-up" in soggetti sani, sia di valore importante (14);
- la crescita delle aspettative, sia nei medici che nei pazienti, nel potere diagnostico degli esami di laboratorio (15);
- l'uso di profili di esami per cercare di ridurre i tempi del processo clinico-diagnostico;
- la rassicurazione del paziente mediante esami diagnostici in sostituzione del rapporto personale medico-paziente, con l'unico effetto di diminuire le successive visite al medico di famiglia e di produrre peraltro rischi relativi alla non corretta valutazione clinica (16, 17);
- le modalità di finanziamento presenti in alcuni sistemi sanitari, in cui il numero di esami richiesti determina l'incremento dei profitti dell'istituzione sanitaria con conseguente incentivo a proporre sempre di più, fenomeno storicamente presente negli Stati Uniti o in ambiti sanitari fortemente orientati a modelli privatistici di sanità;

- j) invecchiamento della popolazione, con conseguente aumento della prevalenza di malattie croniche;
- k) protocolli e linee guida sviluppate e utilizzate con elenchi di esami applicati genericamente a tutti i pazienti (18);
- l) timore di contestazioni e medicina difensiva;
- m) esami in sequenza indotti da dati anomali; statisticamente molti esami sono caratterizzati (specialmente nei risultati indiretti dei test multipli di screening) da un alto numero di risultati anomali in soggetti senza vere patologie. Questo fenomeno a sua volta induce la ripetizione degli esami di partenza e la richiesta di ulteriori esami e indagini diagnostiche, anche complesse (19);
- n) l'esercizio professionale in laboratori isolati dalla complessità dei percorsi diagnostici; sia i medici che operano all'interno degli ospedali, che i medici di medicina generale, se isolati dai laboratori che erogano le prestazioni diagnostiche, tendono a non essere pienamente consapevoli di quanto richiesto per mancanza di significativi "feedback".

Richieste inappropriate e sicurezza del paziente: quando un esame è rischioso per la salute

È noto come molti errori in medicina avvengono nel momento diagnostico; tuttavia, l'effettiva comprensione e gestione dell'errore di laboratorio è resa complessa dalla difficoltà di definire in modo esplicito e misurabile la relazione fra rischio e processo di erogazione/esecuzione dell'esame, ovvero di quanto avviene all'interno del laboratorio in ragione di quanto avviene o si determina all'esterno. Il modello di processo diagnostico globale proposto da Gambino già nel 1970 (20), sviluppato nel "brain to brain loop" da Lundberg nel 1981 (21), e infine più recentemente rivisto da Plebani et al. (22), evidenzia come il valore dell'informazione diagnostica sia fortemente determinato e condizionato da eventi che avvengono prima che il campione giunga in laboratorio o dopo che il risultato è rilasciato dal laboratorio stesso.

La percentuale di richieste inappropriate, intese come inutili o potenzialmente dannose, è stimata fra 5% e 95% (3, 23), dimostrando grande variabilità nelle modalità e nelle metodologie di valutazione. È comunque evidente come l'utilizzo di esami di laboratorio non necessari produce un impatto rilevante sulle risorse a disposizione e sulle modalità del loro impiego, con un potenziale danno ai pazienti (24). Tradizionalmente, i laboratori clinici valutano le loro prestazioni basandosi su dati di efficienza e di qualità analitica interna piuttosto che sulla valutazione dei risultati ottenuti sulla salute dei pazienti. Ad esempio, il "turnaround time" (TAT) è la misura all'interno del laboratorio dal tempo di arrivo del campione al tempo di refertazione e non del completo iter del "brain to brain loop"; analogamente, le valutazioni della qualità del processo esterno sono sostanzialmente valutazioni di qualità del processo di produzione, come nel caso dei campioni con emolisi, perdita o non esecuzione di

campioni inviati, errori d'identificazione, etc.

L'approccio basato sui risultati valutati come esiti per il paziente, ovvero sugli "outcome" di salute, è alla base di una corretta politica per l'identificazione dell'errore e del rischio clinico e delle conseguenti azioni volte all'effettivo miglioramento del processo. Tuttavia, questo approccio richiede strumenti e ricerche finalizzate per misurare in modo sistematico l'impatto delle cause di errore quasi sempre complesse e di ardua individuazione. In altri termini, le prove di efficacia, pressantemente richieste nei percorsi basati sull'"evidence-based medicine" (EBM), sono difficili da ottenere. La richiesta di un esame inappropriato, per esempio, è stata sempre direttamente correlata e valorizzata in termini di costo dell'esame, nella prospettiva di ridurre il volume delle prestazioni diagnostiche e dei budget, anche se è l'esito complessivo nel percorso di cura a essere considerato come vero "end point" di una valutazione EBM (25, 26). Una risposta operativa recentemente introdotta in alcuni laboratori è di modificare il percorso diagnostico con allarmi ("warning/alert") prescrittivi al momento della richiesta o aggiunta di nuovi esami "riflessi" a seguito dei risultati di un esame iniziale, con l'obiettivo di ridurre l'esecuzione di esami potenzialmente inutili o capaci d'indurre un inaccettabile numero di falsi positivi, come nel caso della diagnostica tiroidea. E' da sottolineare come non sia possibile implementare alcuna azione quando non esistano raccomandazioni diagnostiche basate su prove robuste e rilevanti e più in generale su una cultura scientifica adeguata.

FUNZIONALITÀ TIROIDEA

Le tireopatie sono patologie estremamente diffuse nella popolazione di tutto il mondo: considerando le due forme cliniche principali di disfunzione tiroidea, la prevalenza è del 4,6-8,9% per l'ipotiroidismo (4,3-8,5% per le forme subcliniche e 0,3-0,4% per le forme conclamate) e del 1-2% per l'ipertiroidismo (0,5-1,2% per le forme subcliniche e 0,4-0,8% per le forme conclamate (27-29). L'ipotiroidismo riconosce come cause più frequenti la tiroidite cronica autoimmune, la tiroidectomia e la terapia radiometabolica per ipertiroidismo, mentre l'ipertiroidismo annovera tra le cause più comuni il morbo di Basedow-Graves, il morbo di Plummer (adenoma solitario tossico), il gozzo multinodulare e la terapia sostitutiva per ipotiroidismo.

Gli esami di laboratorio relativi alla funzione della ghiandola tiroidea sono attualmente rappresentati da tireotropina (TSH), triiodotironina, libera (FT3) e totale (TT3), tetraiodotironina o tiroxina, libera (FT4) e totale (TT4), tireoglobulina, calcitonina, iodio nelle urine, anticorpi anti-tireoglobulina (TgAb), anti-tireoperossidasi (TPOAb) e anti-recettore del TSH (TRAb).

Le condizioni cliniche prevalenti nelle quali viene attivata la richiesta di esami di funzionalità tiroidea (TFT) sono rappresentate da:

- a) screening di popolazione apparentemente sana;
- b) accertamento diagnostico su soggetto ambulatoriale

- con sintomatologia clinica ascrivibile a disfunzione tiroidea;
- c) accertamento diagnostico su paziente ospedalizzato con sintomatologia clinica ascrivibile a disfunzione tiroidea;
- d) monitoraggio del decorso della tireopatia diagnosticata e/o della terapia specifica (medica e/o chirurgica).

A causa della mancanza di consenso tra società scientifiche sull'efficacia/opportunità dello screening di funzione tiroidea, l'opinione prevalente considera che non vi siano sufficienti prove a sostegno dell'attuazione di screening di popolazione (con l'unica eccezione dei neonati), quanto invece quelle a sostegno del "case finding" aggressivo di soggetti ad alto rischio (ad es., donne in gravidanza) (30). L'accertamento diagnostico in soggetti ambulatoriali con sospetto clinico di tireopatia va previsto in tutte le condizioni in cui siano presenti sintomi ascrivibili a disfunzione tiroidea, mentre l'accertamento diagnostico in pazienti ospedalizzati viene considerato nel caso di un paziente sintomatico per malattia tiroidea durante un ricovero ospedaliero o nel caso di una malattia non tiroidea nel corso della quale si vuole identificare una concomitante disfunzione tiroidea.

La determinazione della concentrazione plasmatica del TSH rappresenta l'esame più affidabile per la diagnosi di disfunzione tiroidea, per la valutazione della terapia sostitutiva con L-tiroxina e della terapia soppressiva (tireostatica) con anti-tiroidei (28-30). Il TSH per primo (TSH "first") o TSH da solo (TSH "alone") o TSH di prima linea ("first-line" TSH) ha una storia almeno trentennale, dato che questa strategia diagnostica è stata proposta per la prima volta a metà degli anni '80 (31). Il rationale di questa strategia si basa su due fondamentali presupposti:

- a) l'evoluzione tecnologica dei metodi immunometrici di misura del TSH di 2^a (sensibilità funzionale: 0,1-0,2 mUI/L) e, in particolare, di 3^a generazione (sensibilità funzionale: 0,01-0,02 mUI/L), introdotti nella pratica corrente da più di 20 anni (32). Questi metodi hanno consentito di distinguere le concentrazioni circolanti dell'ormone nei soggetti sani da quelli ipertiroidei;
- b) la dimostrazione della relazione logaritmica-lineare inversa tra TSH e FT₄, che si estrinseca nella comparsa di rilevanti variazioni di TSH in presenza di minime variazioni di FT₄; conseguentemente, il TSH presenta una maggiore sensibilità rispetto a FT₄ nel dimostrare variazioni di funzione tiroidea (33), anche se questa relazione è stata recentemente dimostrata essere più complessa di quanto a lungo ritenuto, essendo dipendente dall'età e dal sesso (34).

L'introduzione dei metodi di 2^a e 3^a generazione per la determinazione del TSH ha permesso di identificare correttamente la maggior parte dei pazienti affetti da ipotiroidismo e ipertiroidismo subclinici e conclamati: un valore di TSH compreso all'interno di un intervallo di riferimento correttamente identificato consente di definire accuratamente un soggetto come eutiroidico.

Questa strategia è caldamente raccomandata da

almeno 15 anni nello screening o nel "case finding" aggressivo della funzione tiroidea (27, 29, 33, 35, 36), anche se sono note da molto tempo numerose insidie dell'impiego del TSH da solo, legate al fatto che concentrazioni anormali dell'ormone possono essere osservate in numerose condizioni non tiroidee (ad es., gravidanza, anoressia nervosa, impiego di farmaci), nelle patologie ipotalamo-ipofisarie (adenomi ipofisari, ipotiroidismo centrale, ipertiroidismo centrale, resistenza ipofisaria all'ormone tiroideo), in caso di presenza nel siero di sostanze interferenti con la misura di TSH e nella fase iniziale della terapia sostitutiva o soppressiva (30, 36-41). In assenza di queste condizioni, la misurazione del TSH da solo presenta un'accuratezza diagnostica >90% (30, 40): questa caratteristica, unita al contenimento dei costi rispetto all'associazione di più esami tiroidei, ha ormai attribuito un ruolo fondamentale alla misurazione del TSH da solo nello screening o nel "case finding".

"TSH riflesso" e algoritmo diagnostico di laboratorio

La pratica di aggiungere ulteriori esami di laboratorio alle richieste originali del clinico è ormai comune nei laboratori in molti paesi del mondo (42). Lo scopo è di escludere o confermare una diagnosi in base ai risultati dell'esame iniziale: la maggior parte degli esami ulteriori sono aggiunti direttamente dai sistemi informatici dei moderni analizzatori automatici sulla base di regole predefinite degli algoritmi diagnostici di laboratorio (esami riflessi o a cascata o a protocollo).

Assieme agli esami riflessivi (aggiunti mediante un intervento diretto del laboratorista a esercitare la sua esperienza nel governo clinico e nella consulenza clinica) (43), gli esami riflessi aggiungono valore agli esami di laboratorio e consentono di coniugare efficienza, efficacia e riduzione del tempo di risposta, quando gli analizzatori sono in grado di eseguire tutti gli esami presenti nell'algoritmo.

Con l'introduzione dei metodi di misurazione del TSH a elevata sensibilità e delle frazioni libere degli ormoni tiroidei, con l'impiego di metodi diretti ad analogo marcato, sono state progressivamente proposte strategie di analisi decisionale basate essenzialmente sull'impiego di T₄ per primo (TT₄ o FT₄ screen) (44) o di TSH per primo (31), con l'esecuzione successiva di altri TFT (TSH e FT₃ nel primo caso e FT₄ e FT₃ nel secondo), in base alla presenza di risultati eccedenti i limiti di riferimento, superiore (URL) e inferiore (LRL), del primo esame. L'analisi costo-beneficio ha fin dall'inizio dimostrato che entrambe le soluzioni sono economicamente più vantaggiose rispetto all'esecuzione di esami a profilo, consentendo di evitare esami inutili e, in particolare, che la seconda soluzione (solo TSH) risulta preferibile (27, 36, 37, 45, 46), anche se di costo lievemente superiore alla strategia basata su FT₄ (47). Il "TSH riflesso" è quindi entrato ormai nella pratica di molti laboratori del nostro Paese. Del tutto recentemente sono stati proposti algoritmi diagnostici estesi non solo a TSH,

FT4 e FT3, ma anche agli autoanticorpi (TPOAb, TgAb, TRAb) (Figura 1) (48), grazie all'introduzione di metodi automatizzati nelle piattaforme analitiche commerciali e al sempre più riconosciuto ruolo di questi anticorpi nella diagnosi delle principali tireopatie (49, 50).

Intervallo di riferimento del TSH

Il corretto impiego del TSH riflesso presuppone la definizione del corretto intervallo di riferimento (IR) dei TFT presso i laboratori che impiegano questa procedura. Il problema dell'IR del TSH è dibattuto da molto tempo: mentre il suo LRL è considerato meno variabile e vi è consenso nel considerare un valore oscillante tra 0,2 e 0,4 mUI/L (51, 52), la definizione dell'URL è stata lungamente dibattuta, a causa della variabilità analitica tra i metodi di misura del TSH di 3^a generazione e le modalità di selezione della popolazione di riferimento. Dato che le esperienze condotte in vari centri hanno confermato la variabilità inter-laboratorio degli IR, negli ultimi 15 anni il valore di URL è stato profondamente modificato sulla base di studi di popolazione. Nei primi anni 2000, l'Accademia Americana di Biochimica Clinica (NACB) ha proposto il valore di 4,5 mUI/L, come evidenziato da numerosi studi su vaste casistiche (33). Dato che la distribuzione dei valori di TSH non è gaussiana, altri valori di URL sono stati proposti sulla base del criterio che il 95° percentile della popolazione esente da patologie tiroidee presenta valori <2,5 mUI/L: in particolare, un IR empirico compreso tra 0,3 e 3,0 mUI/L è stato suggerito come alternativa a quello sperimentale (53). La proposta di NACB di utilizzare un metodo diretto mediante esclusione a posteriori dei pazienti con anomalie immunologiche o ultrasonografiche ha prodotto numerosi studi che hanno

consentito di affermare che:

- le concentrazioni di TSH sono metodo- e popolazione-dipendenti;
- ciascun laboratorio dovrebbe determinare i propri valori sulla popolazione servita;
- in caso di ipotiroidismo, URL del TSH dovrebbe essere fissato a 4,0-4,1 mUI/L, quando il laboratorio non è in grado di calcolare i propri intervalli di riferimento (28, 54);
- utilizzando criteri rigorosi di selezione del gruppo di riferimento, la definizione dei valori di riferimento del TSH è particolarmente ardua nella fase di esclusione, dal momento che spesso una percentuale >40% viene esclusa (55), per la presenza di soggetti tireopatici subclinici o asintomatici.

Dato che la maggior parte dei laboratori di grandi dimensioni dispone di sufficienti dati correnti, storicizzati negli archivi dei sistemi informatici, i metodi indiretti possono essere utili quando applicati su popolazioni di adeguate dimensioni (>2000 individui): il presupposto di tale metodologia è che la maggior parte dei dati prodotti dal laboratorio derivano da indagini di screening e si riferiscono a soggetti non affetti da patologie che influiscono sulle concentrazioni dell'analita misurato. I TFT si prestano particolarmente a operazioni di questo tipo, anche se in letteratura sono scarsamente presenti esperienze di definizione degli IR utilizzando i metodi indiretti su casistiche particolarmente numerose (56-58).

I test tiroidei discordanti e il commento interpretativo del laboratorio

In alcune nazioni, e particolarmente in Italia, l'impiego della strategia del TSH come esame di prima linea non è particolarmente diffusa, come retaggio culturale

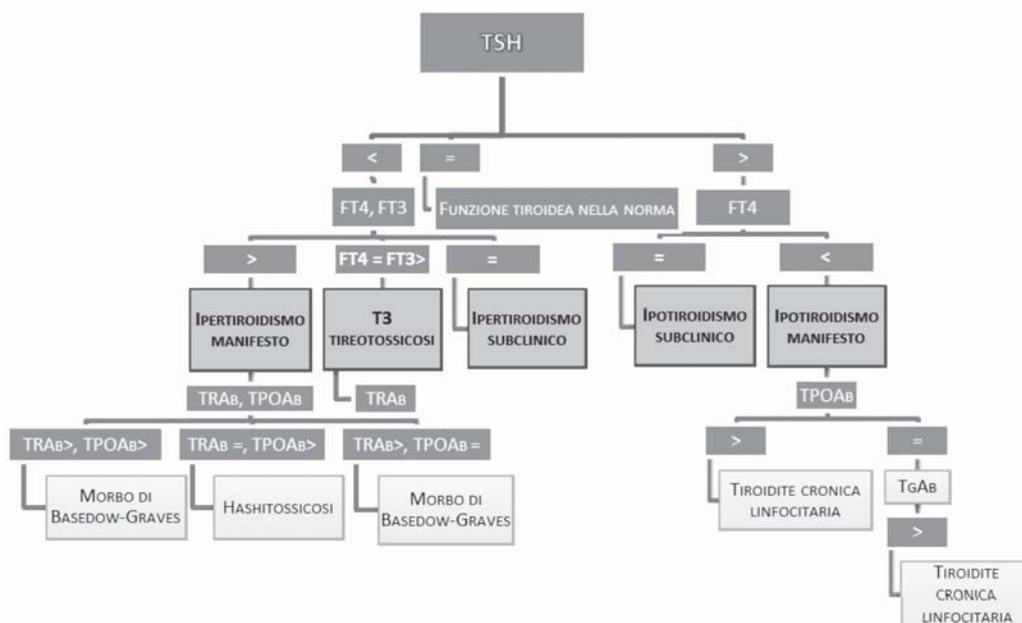


Figura 1

Algoritmo del "TSH riflesso" esteso agli autoanticorpi tiroidei.

TRAb, anticorpi anti-recettore TSH; TPOAb, anticorpi anti-tireoperossidasi; TgAb, anticorpi anti-tireoglobulina.

dell'impiego di esami a profilo per garantire la maggiore sensibilità diagnostica alle indagini di laboratorio per lo studio della funzionalità tiroidea in voga negli anni '80 e '90 e come effetto collaterale della rapida diffusione di metodi immunometrici, isotopici o non-isotopici, e della loro implementazione su piattaforme analitiche ad alta automazione. Ne è conseguito il crescente incremento di richieste di TFT nella popolazione, dimostrato da numerose indagini di tipo epidemiologico condotte negli ultimi anni (59).

L'appropriatezza della richiesta di TFT rimane controversa e la pratica medica può variare notevolmente in base alle indicazioni delle linee guida che sull'argomento si sono susseguite negli ultimi 10 anni. Gli studi che hanno indagato i vari "pattern" di richiesta applicati in vari Paesi indicano che la frequenza di richiesta dei TFT multipli è più alta di quella del TSH da solo: uno studio recente condotto in India segnala che la richiesta di TFT multipli (TSH, FT3, FT4) rappresenta ~47,5% del totale (59), mentre il solo TSH raggiunge il 46%; in altre sedi, tuttavia, il valore del TSH da solo supera il 70% del totale (60).

L'impiego esteso dei TFT a profilo o in combinazione (TSH e FT4, TSH e FT3, TSH, FT4 e FT3) non è in assoluto considerato un approccio inappropriato, in quanto spesso sottende una particolare attenzione a possibili mancate diagnosi, quali quelle dell'ipotiroidismo centrale (per disturbi ipotalamici e/o ipofisari), malattie non tiroidee concomitanti, recente trattamento con tireostatici, resistenza all'ormone tiroideo (sindrome di Refetoff), adenoma ipofisario TSH-secerne (TSHoma) (61). Queste rare condizioni possono risultare non

diagnosticate, in quanto spesso il valore di TSH è compreso all'interno degli IR, anche se rappresentano non più del 1% delle condizioni cliniche di disfunzione tiroidea.

Al di là di considerazioni di carattere diagnostico, l'impiego del TSH quale test di prima linea presenta rilevanti vantaggi di carattere economico. Va inoltre segnalato che la strategia diagnostica dei TFT a profilo o in combinazione genera una quota non irrilevante di risultati discordanti, che comportano ulteriori costi e una progressiva medicalizzazione del paziente. In questo senso, se nella maggior parte dei casi la combinazione dei TFT conferma l'eu-, l'ipo- o l'ipertiroidismo, tuttavia, in una percentuale significativa i risultati di laboratorio non concordano con il quadro clinico e danno luogo a un quadro inusuale: tra i 7 quadri possibili descritti nella Figura 2, i 3 al centro sono da considerare concordanti con le condizioni fisiopatologiche e con i meccanismi di "feedback" dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide, mentre i 4 rimanenti richiedono un intervento specifico del laboratorio come ausilio all'interpretazione e alla diagnosi clinica (62).

L'impiego di un referto interpretativo del laboratorio in tutte le condizioni in cui i TFT sono discordanti consente di indirizzare la diagnosi verso le forme comuni o meno comuni di disfunzione tiroidea, una volta che venga confermata l'accuratezza analitica del dato (necessità di una ripetizione dell'esame, ricerca di possibili interferenti); quest'ultimo aspetto rappresenta da sempre una sfida per il laboratorio, data la gamma di sostanze interferenti negli immunodosaggi, dove spesso l'identificazione dell'interferente risulta

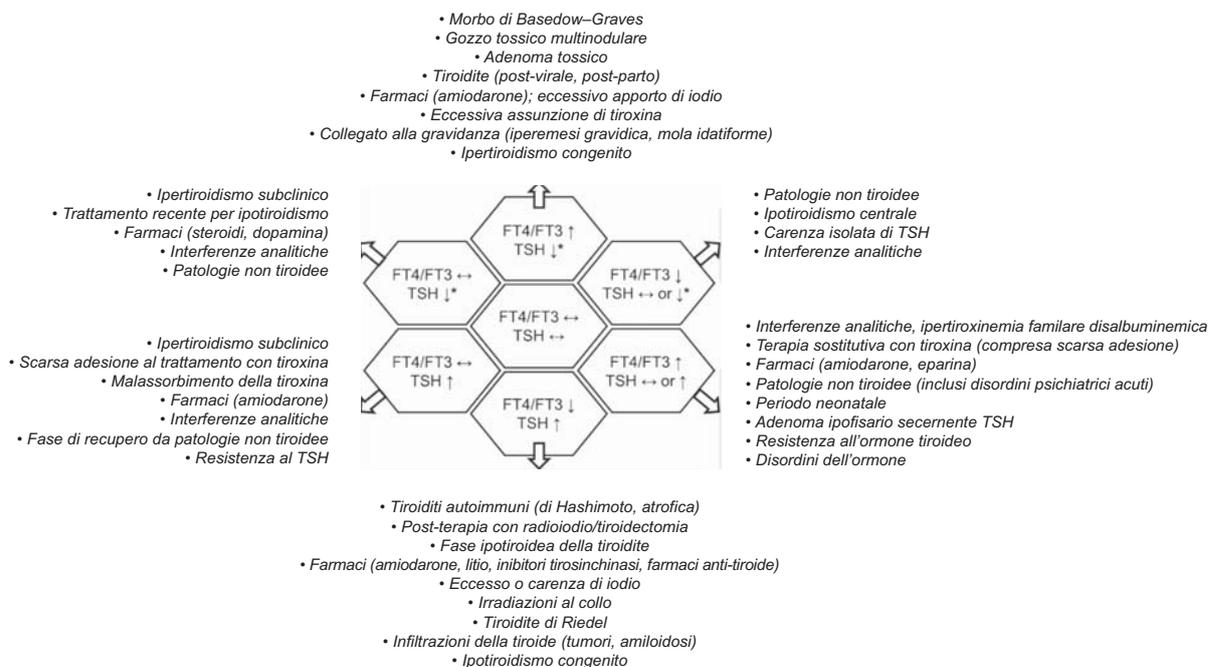


Figura 2

Differenti quadri degli esami di funzionalità tiroidea e loro cause. Modificata da Koulouri O et al (62).

L'asterisco indica che il TSH può essere completamente (ad es., nell'ipertiroidismo primario) o parzialmente soppresso (cioè misurabile, ma al di sotto del limite inferiore di riferimento)].

impossibile, determinando quella che è nota come 'storia infinita' senza risultato (63, 64).

I quadri possibili e il corrispondente referto interpretativo del laboratorio sono i seguenti:

- 1) TSH, FT3, FT4 in concentrazioni fisiologiche. Condizione di eutiroidismo.
- 2) TSH diminuito, FT4 (e FT3) aumentati. Quadro di ipertiroidismo primario [cause principali: morbo di Basedow-Graves e gozzo multinodulare; cause meno frequenti: tiroiditi e impiego di farmaci (amiodarone)].
- 3) TSH aumentato e FT4 (e FT3) diminuiti. Quadro di ipotiroidismo primario (comunemente dipendente da una tiroidite autoimmune, da un trattamento radiante o da una tiroidectomia).
- 4) TSH diminuito, FT4 (e FT3) in concentrazioni fisiologiche. Quadro di ipertiroidismo lieve o subclinico. In taluni casi possono essere in gioco l'impiego di farmaci o malattie tiroidee concomitanti o una condizione di interferenza analitica.
- 5) TSH aumentato, FT4 (e FT3) in concentrazioni fisiologiche. Quadro di ipotiroidismo subclinico (possono essere anche in gioco una non corretta terapia sostitutiva con L-tiroxina, la sindrome di Refetoff, l'impiego di amiodarone o una condizione di interferenza analitica).
- 6) TSH nei limiti fisiologici o diminuito, FT4 (e FT3) diminuiti. Quadro di ipotiroidismo centrale o di deficit isolato di TSH (spesso è tuttavia il risultato di un'interferenza analitica).
- 7) TSH nei limiti fisiologici o aumentato, FT4 (e FT3) aumentati. Quadro più complesso da diagnosticare, ma anche in questo caso spesso è presente un'interferenza analitica (62).

Come detto più sopra, in assenza di un commento interpretativo di laboratorio sulla possibile fisiopatologia della non concordanza tra i TFT, si realizza spesso un processo di medicalizzazione del soggetto, che prevede un iter diagnostico lungo e complesso, le cui tappe sono rappresentate da ripetizione dei TFT presso lo stesso o un altro laboratorio, per confermare i risultati, nell'ipotesi di un errore analitico; visita endocrinologica; ecografia tiroidea, nel caso del sospetto di ipotiroidismo, e/o scintigrafia tiroidea, nel caso del sospetto di ipertiroidismo.

Appropriatezza della richiesta di TFT: il decalogo delle raccomandazioni

Sulla base di esperienze simili proposte in letteratura (12), vengono di seguito presentate delle raccomandazioni sotto forma di un decalogo che deve guidare il clinico verso una più appropriata prescrizione dei TFT.

1. I TFT non vanno utilizzati per lo screening di popolazione, ma per l'accertamento diagnostico su pazienti con sintomatologia clinica ascrivibile a disfunzione tiroidea e per il monitoraggio dei soggetti in trattamento per tireopatie.
2. La misurazione del TSH è l'esame più affidabile per

la diagnosi di disfunzione tiroidea, per la valutazione della terapia sostitutiva con L-tiroxina e della terapia soppressiva (tireostatica) con anti-tiroidei.

3. La misurazione del TSH va effettuata con metodi immunometrici ad alta sensibilità.
4. Il "TSH riflesso" è lo strumento pratico più comune per l'accertamento di disfunzione tiroidea, mediante l'impiego di algoritmi diagnostici estesi non solo a TSH, FT4 e FT3, ma anche agli autoanticorpi (TPOAb, TgAb, TRAb), grazie alla disponibilità di metodi automatizzati nelle piattaforme analitiche commerciali in grado di completare il profilo.
5. Il corretto impiego del "TSH riflesso" presuppone la definizione del corretto IR dei TFT presso i laboratori che impiegano questa procedura.
6. L'impiego dei TFT a profilo o in combinazione (TSH e FT4, TSH e FT3, TSH, FT4 e FT3) è utile in limitate condizioni, quali l'ipotiroidismo centrale (per disordini ipotalamici e/o ipofisari), le malattie non tiroidee concomitanti, il recente trattamento con tireostatici, la resistenza all'ormone tiroideo (sindrome di Refetoff) o l'adenoma ipofisario TSH-secernente (TSHoma).
7. I quadri dei TFT fisiologici o discordanti necessitano di un referto interpretativo del laboratorio.
8. L'uso inappropriato dei TFT può determinare pratiche mediche inutili e potenzialmente dannose per il paziente (65).
9. L'esame più appropriato per la diagnosi delle tiroiditi autoimmuni è la determinazione dei TPOAb.
10. La determinazione dei TRAb è fondamentale nella fase diagnostica dell'ipertiroidismo autoimmune.

MALATTIA RENALE CRONICA

La CKD rappresenta un problema maggiore di salute pubblica e può essere oggi considerata come un'epidemia. Secondo uno studio recente (66), nel 1990 la CKD era al 36° posto tra le cause di morte più frequenti, mentre nel 2013 è salita al 19° posto. La frequenza della malattia nel mondo è compresa tra 4% (nei paesi asiatici e, in generale, in quelli meno sviluppati) e 7,7% negli Stati Uniti (67); in Italia è intorno al 7% (68).

Secondo la classificazione di Levey et al. (69), l'evoluzione della malattia segue diverse fasi: dalla fisiologia si passa a una condizione di rischio (il soggetto, cioè, ha fattori di rischio riconosciuti, ma non ha né albuminuria né filtrato glomerulare ridotto); segue la fase del danno renale (stadio 1 di malattia, caratterizzato da un filtrato glomerulare fisiologico, ma con segni di danno renale, come albuminuria o danni al segmento urinario), gli stadi 2-4, che identificano fasi successive di riduzione del filtrato glomerulare e lo stadio 5, che corrisponde all'insufficienza renale, e richiede la sostituzione della funzionalità.

A questa stadiazione della malattia è stato associato un piano di azioni (70): nella popolazione generale, per individuare i soggetti che hanno segni iniziali di malattia, è necessario uno screening; in presenza di fattori di rischio occorre trattare i soggetti per prevenire che si

instauri il danno renale; il trattamento va poi continuato quando la malattia si è manifestata. Quando l'insufficienza è tale che il trattamento non è più sufficiente, si ricorre alla dialisi e al trapianto.

La stadiazione è importante per due motivi: è collegata in modo diretto con il rischio cardiovascolare e consente di valutare il rischio di arrivare agli stadi avanzati di malattia (che richiedono dialisi e trapianto). I classici fattori di rischio (età, ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, fumo) colpiscono in egual misura cuore e rene. Nello stadio 1 di malattia (quando il filtrato è ancora conservato), si assume che il rischio di malattia cardiovascolare sia quello standard. Mentre la funzione renale si riduce fino allo stadio terminale, il rischio di morte per cause cardiovascolari cresce in modo speculare. Allo stadio 5, il rischio di morte cardiovascolare è pari a 3,6, cioè del 360% più alto rispetto a quello standard. Va sottolineato che si tratta di un rischio "fully adjusted", cioè che non dipende più dagli altri fattori di rischio cardiovascolare; ciò significa che quando il rene non funziona si ha un alto rischio di morte che non dipende dalle cause che hanno indotto la malattia renale, ma da fattori peculiari presenti nei pazienti con CKD. Tra questi, il principale è l'espansione di volume occulta, poi l'anemia, l'ipoalbuminemia e l'aumento della proteina C reattiva nel siero (l'insieme delle ultime due condizioni è chiamato sindrome malnutrizione-infiammazione), l'iperfosfatemia, l'accumulo di dimetil-arginina simmetrica e l'elevata attività simpatica. Questi due ultimi fattori non si misurano nella pratica, ma negli studi clinici hanno dimostrato un legame con il rischio di danno renale e cardiovascolare.

Secondo i risultati di un grande studio di popolazione (71), un individuo che ha avuto un infarto del miocardio ha un alto rischio di averne un altro. Confrontando il rischio di infarto per un paziente con filtrato <60 mL/min (limite che configura un filtrato ridotto) con quello di un paziente che ha avuto un infarto precedente, ma senza CKD, e con quello di un paziente diabetico, emerge che il rischio per chi ha un filtrato basso è circa la metà di quello di chi ha avuto precedente infarto, ma è molto più alto di quello di un diabetico. Se però si abbassa la soglia del filtrato a 45 mL/min e si considera anche la proteinuria, il rischio risulta pari a quello di chi ha avuto un precedente infarto. Dal punto di vista del rischio di infarto, quindi, avere una CKD è come aver già avuto un infarto. Se si considera la mortalità, un soggetto con filtrato <60 mL/min ha un rischio più alto rispetto a chi ha avuto un precedente infarto e 3 volte maggiore rispetto a chi ha il diabete.

In base ai dati epidemiologici disponibili, si stima che un uomo di 65 anni abbia il 3% di probabilità di andare in dialisi; a 80 anni il rischio sale al 5% (72). Il problema è quindi serio e, viste le dimensioni, sarebbe importante attuare una politica di screening. Tuttavia, per poter affermare che lo screening è realmente utile è necessario operare uno studio clinico controllato; purtroppo non sono disponibili dati di questo tipo per la CKD. In mancanza di essi è necessario costruire dei

modelli con le informazioni a disposizione per valutare il rapporto costo-efficacia di un intervento di screening. Il parametro che si utilizza nelle analisi di costo-efficacia è il "quality adjusted life years" (QALY), che esprime gli anni di vita guadagnati, ponderati per la qualità di vita. In pratica, se un soggetto ha un evento cardiovascolare, gli anni di vita successivi avranno una qualità di vita più bassa: si stima che sia circa la metà. In altre parole, la qualità di vita peggiora a causa dell'evento tanto che è come se il paziente visse la metà degli anni. Il QALY è un concetto economico, perché attribuisce un valore agli anni di vita, che varia da paese a paese in quanto stabilito con decisione politica: un QALY negli Stati Uniti vale 50.000 dollari, nel Regno Unito 20.000-30.000 sterline.

Uno screening annuale nella popolazione generale a partire da 50 anni non è costo-efficace (cioè il suo costo è sopra la soglia); se però si concentra l'attenzione solo sui soggetti ipertesi, sotto i 70 anni, lo screening è costo-efficace. Nei pazienti diabetici, poi, lo screening annuale risulta sempre costo-efficace; infine, se lo screening viene fatto ogni 2 anni, è costo-efficace anche in tutti i soggetti ipertesi (73). Anche in mancanza di uno studio clinico, quindi, si può affermare che è conveniente fare lo screening per la CKD nei pazienti diabetici e negli ipertesi, come suggerito dalle linee guida statunitensi ed europee, dato che il peso economico degli eventi cardiovascolari è molto alto (74).

In Italia, come detto, si stima che la CKD abbia una frequenza intorno al 7%: ciò significa che oltre 4,2 milioni di persone hanno CKD negli stadi 1-5. In termini di incidenza di infarto, questo significa che oltre 37.500 infarti del miocardio sono attribuibili a CKD. Valutando in ~10.000 euro il costo per un infarto, questo si traduce in una spesa totale di ~375 milioni di euro; riducendo questo valore di ~20% per tenere conto della sovrapposizione con i fattori di rischio classici (un processo detto analisi di sensibilità) si ottiene una stima di spesa complessiva di ~300 milioni di euro.

In sintesi, si può affermare che, dato che la CKD è prevalente nella popolazione generale e la sua frequenza è in crescita, il rischio cardiovascolare associato a questa patologia è dello stesso ordine di quello che si osserva nei soggetti che hanno avuto un precedente infarto del miocardio; il carico economico è quasi insostenibile per i sistemi sanitari (~300 milioni/anno per infarti nei pazienti con CKD) e quindi è necessario applicare politiche di screening mirate a soggetti ipertesi, obesi, diabetici e attuare strategie di prevenzione del rischio preferibilmente con una visione multispecialistica.

Determinazione del filtrato glomerulare e standardizzazione della determinazione della creatinina

La misura della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è lo standard clinico per la valutazione della funzionalità renale (70). In passato, la modalità di

riferimento per la misura della GFR era la "clearance" dell'inulina, utilizzata attualmente solo in situazioni molto particolari per la sua complessità di esecuzione. Attualmente, il "gold standard" per la misura della GFR prevede l'uso di iotalamato (75) o ioexolo (76). La misurazione avviene effettuando un'iniezione endovenosa di un quantitativo conosciuto della sostanza e la "clearance" viene calcolata in base alla cinetica della riduzione della sua concentrazione plasmatica, valutata tramite prelievi seriati. Questi metodi sono disponibili solo in pochi centri specialistici e non possono essere applicati alla popolazione generale: per questo motivo sono state sviluppate formule che consentano una stima della GFR (eGFR) sulla base della sola determinazione della creatinina plasmatica. Quelle attualmente utilizzate sono la formula di Cockcroft-Gault, la "MDRD", la "CKD-EPI", la formula di Schwartz (in ambito pediatrico) e quelle basate sulla creatinina C.

La formula di Cockcroft-Gault fu sviluppata nel 1976 per confronto con la "clearance" della creatinina (77). La formula MDRD ("Modification of Diet in Renal Disease study") (78) è sufficientemente accurata in soggetti con CKD, mentre per soggetti con GFR fisiologica tende a sottostimare. Con questa formula il valore che si calcola è per il 90% dei soggetti entro il $\pm 30\%$ dal valore vero ottenuto con il "gold standard". La formula CDK-EPI è stata proposta nel 2009 sulla base di uno studio condotto su 8000 soggetti e poi validata su altri 4000 (79); nella popolazione in studio era compresa anche una percentuale di soggetti sani. Si tratta di una formula, che tiene conto di sesso, età, etnia e indica come calcolare la eGFR sia nei soggetti con funzionalità renale fisiologica, sia in quelli con malattia renale. La formula di Schwartz (modificata) si applica nei bambini e stima il filtrato glomerulare entro il $\pm 30\%$ dal valore misurato con il "gold standard" nel 87,7% dei casi (80).

Riguardo al calcolo dell'eGFR sono state formulate alcune raccomandazioni dirette specificamente ai laboratori:

- 1) per calcolare eGFR i laboratori devono utilizzare l'equazione CKD-EPI;
- 2) il valore dell'eGFR deve essere riportato arrotondato al numero intero, usando negli adulti come unità di misura mL/min per 1,73 m²;
- 3) i laboratori devono classificare i valori di eGFR <60 mL/min per 1,73 m² come ridotta funzionalità;
- 4) i laboratori devono misurare la creatinina con un metodo riferibile al materiale di riferimento internazionale e con "bias" minimo verso il metodo di riferimento (spettrometria di massa con diluizione isotopica);
- 5) i valori di creatininemia devono essere riportati arrotondati al numero intero quando si usano le unità SI (ad es., 127 $\mu\text{mol/L}$) e con 2 decimali quando si usano le unità tradizionali (ad es., 0,95 mg/dL).

Le formule hanno alcuni limiti (trasformano una concentrazione di sostanza in velocità di flusso, con una operazione scorretta dal punto di vista metrologico; non

hanno variabili aggiuntive, ma aggiungono incertezza legata ai fattori per il calcolo), ma presentano il vantaggio indubbio di fornire un numero direttamente interpretabile e confrontabile con valori decisionali universalmente accettati.

Tutte le formule sopra descritte sono basate sulla misura della concentrazione della creatinina serica (sostanza endogena che deriva dalla deidratazione della creatina, prodotta dal fegato e utilizzata soprattutto dal tessuto muscolare). Le concentrazioni sieriche di creatinina dipendono da quelle della creatina e queste, a loro volta, variano in funzione della massa muscolare. L'apporto di carne comporta l'introduzione di quantità elevate di creatinina e fino al 30% della creatinina eliminata è di origine alimentare. La creatinina viene eliminata a livello renale principalmente per filtrazione glomerulare, ma in una percentuale variabile tra 5% e 15% anche per secrezione a livello tubulare. La sua dipendenza dalla massa muscolare fa sì che la concentrazione della creatinina vari in funzione dell'età e del sesso: nell'anziano la creatinina prodotta diminuisce perché la massa muscolare si riduce, ma cala anche la GFR; infine, i valori si abbassano in gravidanza.

La creatininemia possiede un basso indice di individualità, dato dal rapporto tra variabilità intra- e inter-individuale. Questo implica che l'IR ha un minor valore nella sua interpretazione, perché la creatininemia di un soggetto può aumentare significativamente, ma restare comunque all'interno dell'IR. Gli IR ottenuti in uno studio del 2008 sono riportati nella Tabella 1 (81).

La relazione tra creatinina sierica e filtrato glomerulare non è lineare; piccoli aumenti della concentrazione della creatinina sono collegati a riduzioni importanti della GFR: una variazione a livello critico (1,00 mg/dL o 90 $\mu\text{mol/L}$) anche solo di 0,12 mg/dL (10 $\mu\text{mol/L}$) comporta una riduzione del 12% del valore della GFR.

Il metodo di determinazione della creatinina è standardizzabile in quanto esiste un sistema di riferimento formato da uno standard primario (NIST SRM 914), con il quale si può calibrare un metodo di riferimento (gascromatografia o cromatografia liquida con spettrometria di massa con diluizione isotopica). Con questo metodo, i laboratori di riferimento possono certificare un materiale di riferimento secondario commutabile (creatinina in siero umano) (ad es., NIST SRM 967), che può essere usato dai produttori per

Tabella 1

Limiti di riferimento per la creatinina sierica nell'adulto

Sesso	Unità di misura	2,5° percentile (90% CI)	97,5° percentile (90% CI)
Maschi	$\mu\text{mol/L}$	64 (63-66)	104 (99-107)
Maschi	mg/dL	0,71 (0,71-0,75)	1,18 (1,12-1,21)
Femmine	$\mu\text{mol/L}$	49 (46-55)	90 (83-103)
Femmine	mg/dL	0,55 (0,52-0,62)	1,02 (0,94-1,12)

CI, intervallo di confidenza.

calibrare i propri metodi e certificare i calibratori che vengono usati nei laboratori clinici. In questo modo i risultati ottenuti sono riferibili alla sostanza pura (82).

Tra i metodi disponibili commercialmente, quello cosiddetto di Jaffe, dal nome dell'autore che nel 1886 per primo lo ha proposto, più opportunamente denominato al picrato alcalino, si basa sulla reazione dell'acido picrico con la creatinina in ambiente alcalino. La reazione è poco specifica e ci sono alcuni interferenti positivi (chetoni e chetoacidi, glucosio, proteine, cefalosporine) e negativi (bilirubina) (83). I metodi enzimatici sono basati su due possibili schemi di reazione: quello che impiega creatinina idrolasi, creatinasi, sarcosina ossidasi e reazione finale di Trinder (84) e quello che utilizza creatinina deaminasi e glutammato deidrogenasi consumando NADH per una lettura nell'UV (85).

Le specifiche di qualità analitica per la misura della creatinina si possono basare sulla variabilità biologica, con un traguardo analitico per l'imprecisione $\leq 3\%$ e errore totale entro $\pm 9\%$. Considerando invece l'impatto sull'"outcome" clinico, un aumento di 0,3 mg/dL (26,4 $\mu\text{mol/L}$) indica l'insorgenza di danno renale acuto di stadio 1 (classificazione secondo "Acute Kidney Injury Network") (86). Il dato riportato nel documento SIBioC-Società Italiana di Radiologia Medica sulle contrastografie indica che un aumento $>5\%$ a 12 ore è predittivo di nefropatia da mezzo di contrasto (87). La qualità della misura della creatinina è quindi estremamente importante. I dati della letteratura suggeriscono che l'accuratezza dei metodi enzimatici è superiore a quella dei metodi basati sul picrato alcalino. In particolare, uno studio ha valutato la specificità di vari metodi commerciali rispetto a un metodo di riferimento in spettrometria di massa, in presenza di varie tipologie di possibili interferenti (83). Come atteso, i metodi basati sul picrato alcalino mostravano interferenze positive in presenza di glucosio, mentre il fattore di compensazione, introdotto per eliminare l'interferenza positiva da proteine, non riusciva a correggere le situazioni in cui albumina o proteine totali sono particolarmente elevate o ridotte. In sintesi, l'influenza degli interferenti è meno frequente con i metodi enzimatici, che in generale hanno maggiore precisione, sono più robusti e garantiscono quindi risultati più affidabili; il vantaggio dei metodi enzimatici è particolarmente evidente nei pazienti diabetici e nei soggetti pediatrici.

Di seguito, alcune indicazioni da applicare nella pratica di laboratorio:

- a) data la dispersione dei risultati per valori di eGFR >90 mL/min per $1,73$ m², per valori superiori a questa soglia è opportuno indicare il risultato nel referto come eGFR >90 mL/min per $1,73$ m²;
- b) è importante utilizzare un metodo analitico con ottima precisione e minimo "bias", soprattutto alle concentrazioni vicine all'URL;
- c) se si referta la creatinina in mg/dL, usare 2 cifre decimali;
- d) poiché la formula per il calcolo del filtrato glomerulare

non è applicabile a tutti i soggetti, è importante aggiungere la seguente nota esplicativa nel referto: "In presenza di soggetto appartenente a gruppo etnico afro-americano, moltiplicare il risultato per il coefficiente 1,157 (CKD-EPI). L'eGFR non è applicabile in gravidanza, a soggetto defedato e/o affetto da patologie multiple, negli estremi di massa corporea, massa muscolare, stato nutrizionale, nei gruppi etnici orientali: in questi casi è indicata la valutazione diretta della "clearance" renale".

Cistatina C nello screening della CKD

La cistatina C è una proteina di 13,3 kDa, prodotta da tutte le cellule nucleate e distribuita nel fluido extracellulare, liberamente filtrata e riassorbita e catabolizzata a livello del tubulo renale. La sua concentrazione sierica è meno influenzata dalla massa muscolare e dalla dieta rispetto a quella della creatinina; altri fattori non legati al filtrato glomerulare, che possono potenzialmente influenzare la concentrazione sierica di un marcatore di funzione renale (obesità, infiammazione, fumo), non interferiscono con la cistatina C. Gli studi effettuati nel corso del tempo hanno poi dimostrato che la "clearance" della cistatina è correlata strettamente con i valori ottenuti con il "gold standard" per la determinazione del filtrato glomerulare, dato che essa è filtrata liberamente e viene catabolizzata quasi totalmente ($>99\%$) nei tubuli renali. Gli aspetti favorevoli alla cistatina C come marcatore di filtrazione glomerulare, quindi, sono i seguenti:

- a) è indipendente dall'età, dal sesso e dalla massa muscolare (a differenza della creatinina);
- b) è prodotta costantemente in tutte le cellule nucleate;
- c) è filtrata liberamente dal glomerulo;
- d) è completamente riassorbita e catabolizzata dal tubulo;
- e) non è secreta dal tubulo renale (diversamente alla creatinina).

Quindi, molti dei fattori che influenzano la creatininemia non hanno effetto sulla cistatina C.

La cistatina C è misurabile con metodi immunoturbidimetrici e immunonefelometrici. Studi di meta-analisi hanno confrontato sensibilità e specificità della cistatina C rispetto alla creatinina, rilevando una superiorità della prima (88, 89). Nonostante ciò la misura della cistatina C nella malattia renale è richiesta raramente per motivi clinici (l'impiego della cistatina C non sembra modificare il processo decisionale clinico ed esistono condizioni cliniche confondenti come la terapia steroidea e le malattie tiroidee), analitici (standardizzazione non ottimale dei risultati tra i vari metodi), post-analitici (eterogeneità degli IR, differenziati per età e sesso, e dei valori decisionali), gestionali (il TAT è superiore a quello della misura della creatinina) ed economici (il costo è superiore).

In letteratura sono riportate differenze significative nella determinazione della cistatina C tra laboratori (90), anche se è assistito negli ultimi anni a un significativo miglioramento dovuto alla disponibilità del materiale di

riferimento ERM DA471 (91).

Recentissime valutazioni indicano tuttavia che esiste ancora una dispersione dei valori rispetto al "target", sebbene ridotta rispetto a qualche anno fa, e che alcuni sistemi analitici hanno prestazioni migliori di altri in termini di esattezza (92). Si può però affermare che in generale la cistatina non ha livelli di standardizzazione peggiori della creatinina e che in particolare essa ha una migliore accuratezza diagnostica quando il filtrato è lievemente alterato: in queste condizioni la stima con la creatinina risente di numerosi fattori che la influenzano.

Dal punto di vista clinico, è importante valutare se la cistatina possa intercettare malattie renali allo stadio preclinico. Uno studio ha messo a confronto la determinazione del filtrato glomerulare effettuata con il "gold standard" iotalamato con la cistatina C e con la formula MDRD (che utilizza la creatinina) nel corso della storia naturale della malattia diabetica (93). I risultati indicavano che nella fase preclinica (quando cioè il filtrato non è ancora ridotto), la misura ottenuta con iotalamato e la stima effettuata con la cistatina C erano simili tra loro, ma molto diverse da quella ottenuta con la formula MDRD; quando il filtrato si riduce, le stime diventano tutte sovrapponibili. Vi è quindi maggiore probabilità di evidenziare un'iniziale riduzione del volume di filtrato glomerulare con la cistatina C piuttosto che con la creatinina.

Le formule proposte per eGFR con la cistatina C sono numerose, specialmente nella popolazione pediatrica. Per stabilire quale sia la migliore, bisogna considerare due requisiti: la formula deve essere ottenuta e valutata da un confronto con il metodo di riferimento e in coorti di popolazione. La sola formula che risponde a questi requisiti è l'equazione CKD-EPI.

Nelle linee guida KDIGO, per la valutazione iniziale della CKD si raccomanda l'uso della creatinina e la stima della eGFR tramite formula CKD-EPI (70). Si consigliano però esami aggiuntivi, come cistatina C o la misura della "clearance" della creatinina, per la conferma della diagnosi, quando la stima del filtrato basato sulla creatinina sierica è meno accurata.

Dagli studi emerge che la stima del filtrato fatta attraverso la misura di creatinina e cistatina in combinazione modifica il rischio relativo e il numero di soggetti individuati come portatori di CKD rispetto alla stima fatta con la sola creatinina (94). La raccomandazione è quindi quella di determinare la cistatina C nei soggetti adulti con volume di filtrato (stimato con formule che si basano sulla creatinina) compreso tra 45 e 59 mL/min/1,73 m² e senza alterazione di altri marcatori di danno renale. Se la determinazione con la cistatina dà un valore di eGFR <60 mL/min/1,73 m², la diagnosi viene confermata; per valori superiori, la diagnosi deve essere considerata scorretta. Negli studi effettuati è emerso che la riclassificazione riguarda il 16,8% dei soggetti inizialmente individuati come portatori di CKD. Inoltre, nei pazienti in cui il filtrato stimato con l'aggiunta della cistatina è compreso tra 45 e 59 mL/min/1,73 m² la prognosi è peggiore e in questi casi sono importanti gli

interventi clinici precoci.

Le linee guida raccomandano anche che la misura della cistatina C sia riportata con una formula e non solo in concentrazione. I laboratori devono utilizzare metodi standardizzati e la formula CKD-EPI per la refertazione.

La cistatina può essere inoltre utilizzata come marcatore di mortalità cardiovascolare (95).

Albuminuria nella diagnosi e nella classificazione della CKD

L'albuminuria è utilizzata per la definizione clinica di CKD e per la classificazione della malattia. I valori di albuminuria sono suddivisi in classi, per ognuna delle quali sono definiti i valori decisionali (96). Nella linea guida KDIGO (70) si trovano tabelle di rischio nelle quali la presenza di albuminuria (suddivisa nelle varie classi) è combinata con le diverse classi di eGFR per definire il livello di rischio. Inoltre, sempre in combinazione con la eGFR, essa serve per definire la frequenza del monitoraggio, che dovrà essere maggiore al crescere del livello di rischio. Va infine osservato che le concentrazioni di albuminuria sono correlate positivamente con la mortalità totale e con quella cardiovascolare, indipendentemente dagli altri fattori di rischio e dalla GFR (97).

Le indicazioni che provengono dalla linea guida KDIGO (70) sono le seguenti:

- per la valutazione iniziale di una proteinuria utilizzare (in ordine di preferenza): rapporto albumina/creatinina (ACR), rapporto proteine totali/creatinina (PCR), strisce reattive con lettura automatica, strisce reattive con lettura manuale;
- utilizzare in ogni caso il primo campione di urine del mattino e non la raccolta delle 24 ore, che rappresenta il "gold standard", ma è gravata da rischi di inaccuratezza della raccolta;
- per la popolazione pediatrica, l'ordine di preferenza tra ACR e PCR è invertito.

È raccomandato utilizzare la prima minzione del mattino in quanto questo è il campione che correla meglio con l'escrezione nelle 24 ore, mostra la variabilità biologica più bassa, presenta la concentrazione di proteina più bassa e consente di evitare la variabilità dovuta alla postura e all'esercizio fisico. Per quanto riguarda la variabilità biologica, una rassegna ha fornito dati importanti, indicando che in oltre il 70% degli studi analizzati, il primo campione del mattino presentava la variabilità biologica più bassa (98).

Altre indicazioni presenti nella linea guida KDIGO e relative al laboratorio clinico sono le seguenti:

- è opportuno riportare sempre il valore di ACR (o PCR) assieme al valore dell'albuminuria;
- vanno abbandonati i termini micro- e macroalbuminuria perché possono essere confondenti;
- un risultato positivo su un campione di urina "random" deve essere confermato sul primo campione del mattino;
- un risultato positivo ottenuto con strisce reattive deve

essere confermato con il metodo in chimica liquida sul primo campione del mattino;

- e) in caso sia necessaria una stima più accurata, deve essere utilizzato un campione delle 24 ore;
- f) se si sospetta una proteinuria diversa dall'albuminuria, è raccomandato richiedere la determinazione delle proteine urinarie specifiche (ad es., α 1-microglobulina, proteina di Bence-Jones).

Per la misura dell'albumina nelle urine la standardizzazione non è semplice, ma non è ulteriormente rimandabile (99); al riguardo un gruppo di studio IFCC, che opera in collaborazione con il "National Kidney Disease Education Program" (NKDEP), si sta occupando di definire il sistema di riferimento per la standardizzazione in tutte le sue componenti (96). Attualmente il materiale di riferimento primario candidato è albumina umana ricombinante in soluzione acquosa (NIST SRM 2925) e il materiale secondario è albumina (e creatinina) sciolta in urina (NIST SRM 3666) (100). Questi materiali dovrebbero essere utilizzati per assegnare i valori ai calibratori commerciali; tuttavia, questi materiali sono in corso di validazione e non sono ancora disponibili: quindi al momento ai calibratori commerciali viene assegnato il valore utilizzando il vecchio materiale di riferimento per le proteine sieriche (ERM DA470), che ha una concentrazione adatta alle proteine del siero e quindi deve essere fortemente diluito per essere utilizzato per la misura delle proteine nelle urine; per la diluizione, però, manca un protocollo definito e questo crea problemi di assegnazione dei valori ai calibratori. Per quanto riguarda il metodo di riferimento, anche in questo caso esiste un metodo candidato basato sulla cromatografia liquida a diluizione isotopica e spettrometria di massa (101). Il metodo è ancora in fase di validazione per alcuni problemi relativi a discrepanze in singoli campioni (99). In questa situazione è quindi difficile definire le caratteristiche analitiche necessarie alla misura (96). Se, come emerge da esperienze condotte nel nostro paese (96), la variabilità interlaboratorio presenta risultati soddisfacenti, per quanto concerne l'esattezza invece, i "bias", metodo-dipendenti, risultano ancora elevati in alcuni casi (102).

Appropriatezza della richiesta dei test di funzionalità renale: il decalogo delle raccomandazioni

1. Un programma di screening della CKD non è appropriato nella popolazione generale, ma solamente se mirato a pazienti ipertesi, obesi, diabetici al di sotto dei 70 anni.
2. La stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) è lo standard clinico per la valutazione della funzionalità renale.
3. La formula CDK-EPI rappresenta la migliore soluzione per la stima del filtrato glomerulare negli adulti.
4. La formula di Schwartz rappresenta la migliore soluzione per la stima del filtrato glomerulare nei bambini.
5. Per poter utilizzare le formule è necessario che il metodo di misura della creatinina sia standardizzato (riferibile al sistema di riferimento).
6. La cistatina C è raccomandata e va misurata in pazienti con stima del filtrato glomerulare (CDK-EPI) tra 45 e 59 mL/min/1,73 m² e senza danno renale, in pazienti pediatrici e nelle fasi iniziali del trapianto.
7. Per la valutazione iniziale di una proteinuria vanno utilizzati in ordine di preferenza: ACR, PCR, strisce reattive con lettura automatica, strisce reattive con lettura manuale, utilizzando in ogni caso il primo campione del mattino; per la popolazione pediatrica, l'ordine di preferenza tra ACR e PCR viene invertito.
8. Nel referto è opportuno riportare sempre il valore di ACR (o PCR) assieme al valore dell'albuminuria.
9. Vanno abbandonati i termini micro- e macroalbuminuria.
10. Un risultato positivo su un campione "random" deve essere confermato sul primo campione del mattino; un risultato positivo ottenuto con strisce reattive deve essere confermato con il metodo in chimica liquida sul primo campione del mattino.

MALATTIA CELIACA

La celiachia è un'enteropatia autoimmune a elevata prevalenza (presente nel 1% della popolazione) determinata dall'ingestione di cereali contenenti glutine in soggetti geneticamente suscettibili e rappresenta la fase finale di una serie di processi complessi che coinvolgono sia l'immunità innata sia quella adattativa, ancora largamente poco conosciuti (103). La prevalenza è sottostimata, in quanto per ogni soggetto diagnosticato, da 3 a 10 soggetti affetti dalla malattia non sono riconosciuti. Il picco di prevalenza della patologia è in netto aumento sia in Europa sia negli Stati Uniti e raddoppia ogni 15 anni circa, sia per le migliorate capacità diagnostiche sia per un reale incremento (104).

Dal punto di vista patogenetico, quello che accade quando la gliadina penetra la barriera intestinale è sufficientemente conosciuto. Il danno avviene a livello dell'intestino tenue prossimale: le alterazioni che si verificano al momento dell'introduzione del glutine sono complesse e coinvolgono sia l'immunità innata (con la produzione di interleuchina 15), sia quella adattativa (con l'attivazione del sistema immunitario), che viene amplificata dall'azione della transglutaminasi tissutale. Questo comporta una variazione di fattori biumorali e cellulari, che sono responsabili del danno a livello prossimale, tale da provocare alterazioni dei villi intestinali con quadri che possono arrivare all'atrofia completa.

La celiachia è l'unica malattia autoimmune per la quale si riconosce un "trigger" ambientale, il glutine, una prolamina contenuta nel grano. Esistono però altre prolammine tossiche, presenti nel farro, nel kamut, nella segale e nell'orzo. È importante anche la genetica di predisposizione. Infatti, i geni dell'antigene di

istocompatibilità di classe seconda (HLA DQ2-8) spiegano ~40% del rischio genetico. Ambiente e geni, però, sono elementi necessari ma non sufficienti per la comparsa della celiachia: il 30% della popolazione generale ha gli stessi geni e viene a contatto con il glutine, ma solo 1% sviluppa la celiachia (103). La possibilità di sviluppare la malattia è legata alla presenza di cofattori, che non sempre vengono individuati, ma che fanno in modo che la malattia si slatenizzi in un determinato momento della vita dei soggetti predisposti. Contrariamente a quanto si pensava in precedenza, non si tratta quindi di una patologia pediatrica; anzi, la maggior parte dei soggetti la sviluppa in età adulta e nel 20% dei casi l'esordio è dopo i 60 anni.

Dal punto di vista clinico, le manifestazioni della malattia sono estremamente variabili e comprendono quadri che vanno da grave deterioramento delle condizioni generali (raro) a sintomi clinici sfumati (frequenti), spesso con assenza dei classici sintomi gastrointestinali. Nei bambini, i sintomi sono di solito più specifici: sintomi di tipo gastroenterologico (dolore, gonfiore addominale, ecc.), irritabilità e variazioni dell'umore. Negli adulti, invece, la malattia si presenta spesso in maniera sfumata o viene riscontrata casualmente; si stima che tra l'esordio della malattia e la diagnosi trascorrono in media 6 anni. In meno del 30% dei soggetti la malattia si manifesta con i sintomi addominali classici (diarrea, malassorbimento, gonfiore e dolori addominali), spesso molto sfumati.

Esistono gruppi a maggior rischio di sviluppare la malattia: familiari di primo e secondo grado di persone celiache, soggetti con deficit selettivo di IgA, soggetti con altre patologie autoimmuni o anomalie genetiche. Per i familiari di primo grado, il rischio è 10-15 volte più alto rispetto a quello della popolazione generale (105).

Diagnosi di celiachia

Fino a 10-15 anni fa la diagnosi veniva effettuata in base alla clinica e alla positività dei risultati di due biopsie intestinali; attualmente, grande importanza è attribuita ai marcatori sierologici, genetici e istologici. Gli esami sierologici sono molto più sensibili e specifici,

hanno costi più bassi e sono più diffusi. Tuttavia, spesso la loro interpretazione è dubbia, con presenza di falsi positivi e negativi. Sono disponibili dei test genetici, utili soprattutto in alcuni casi particolari. La differenza principale rispetto al passato, però, riguarda l'istologia: le nuove conoscenze hanno permesso di capire che la biopsia intestinale non è affidabile come si pensava e mostra invece oggi sensibilità e specificità inferiori rispetto alla sierologia. Il risultato dell'esame, infatti, è condizionato dalle modalità con cui viene eseguito. L'esame istologico su tutto l'intestino viene effettuato tramite la gastroscopia, che permette di raccogliere campioni in punti non predefiniti. La campionatura potrebbe quindi non essere sufficiente a individuare lesioni specifiche, se queste non sono distribuite in modo uniforme. Esiste poi una variabilità nell'interpretazione dell'esame da parte degli anatomopatologi, che porta a valutazioni diverse della gravità del danno. Inoltre, le lesioni più lievi (non atrofici) non sono necessariamente indicative di celiachia. Queste alterazioni infatti, riscontrabili in un'alta percentuale di soggetti adulti e caratterizzate dalla presenza di un infiltrato di linfociti CD3⁺, possono essere presenti in molte altre condizioni, indicate nei loro complesso con il termine di enterite microscopica.

La diagnosi di celiachia è quindi un processo che prevede la valutazione congiunta di dati clinici, sierologici e istologici (105). I marcatori sierologici hanno un ruolo fondamentale. Le loro caratteristiche sono riassunte nella Tabella 2. In caso di sospetto clinico, i marcatori di prima scelta sono gli anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA (anti-tTG IgA) e le IgA totali. Solo se si rileva un deficit di IgA, si misurano gli anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina (anti-DGP IgG). Vanno valutate non solo positività o negatività di questi marcatori, ma anche l'entità dell'incremento, che dà indicazioni sull'entità del danno intestinale (più forte è l'incremento, maggiore il livello di atrofia dei villi).

L'endoscopia può fornire indicazioni sulla presenza o meno della celiachia evidenziando alterazioni specifiche (ad es., riduzione o scomparsa delle pliche, aspetto a mosaico o evidenza dei vasi ematici sottostanti, che

Tabella 2

Caratteristiche dei principali marcatori sierologici di celiachia

Esame	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Valore predittivo positivo	Valore predittivo negativo
AGA IgA	85 (57-100)	90 (47-94)	18%	99%
AGA IgG	85 (42-100)	80 (50-94)	31%	99%
EMA	95 (86-100)	99 (97-100)	83%	99%
Anti-tTG IgA	98 (78-100)	98 (90-100)	72%	99%
Anti-tTG IgG	70 (45-95)	95 (94-100)	42%	99%
Anti-DGP IgA	88 (74-100)	95 (90-99)	44%	99%
Anti-DGP IgG	80 (63-95)	98 (90-99)	68%	99%

AGA, anticorpi anti-gliadina; EMA, anticorpi anti-endomisio; Anti-tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; Anti-DGP, anticorpi anti-peptidi della gliadina deamidata.

indicano una probabilità molto alta di lesioni atrofiche). Le recenti tecniche diagnostiche di tipo endoscopico (endoscopia ad alta risoluzione, endoscopia ad alta risoluzione con immersione in acqua, "narrow band imaging", video-endoscopia capsulare, endomicroscopia confocale *in vivo*) consentono di operare biopsie mirate e di individuare soggetti che altrimenti sfuggirebbero alla diagnosi.

È fondamentale che tutti gli esami diagnostici siano effettuati in dieta libera: non bisogna sospendere l'assunzione di glutine prima di aver affrontato il percorso diagnostico per non falsare i risultati degli esami.

Una dieta aglutinata seguita con la massima regolarità è fondamentale per la salute delle persone celiache. Infatti, l'eliminazione del glutine dalla dieta permette di avere un intestino strutturalmente quasi normale e funzionalmente integro. La quantità di glutine tollerata è di 10 mg al giorno e questa è una informazione molto importante da trasferire ai soggetti celiaci.

Individuare il soggetto celiaco, anche se quasi asintomatico, è molto importante in quanto nel tempo possono comparire complicanze. Le più significative sono la celiachia refrattaria (una condizione in cui i sintomi da malassorbimento e l'atrofia dei villi si mantengono anche in presenza di dieta aglutinata stretta da almeno 6-12 mesi), la digiuno-ileite ulcerativa e la sprue collagena (che comportano elevata mortalità), i linfomi e i tumori epiteliali. Il rischio di sviluppare una complicanza di quest'ultimo tipo si è ridotto nel tempo,

grazie alla possibilità di individuare (e di sottoporre quindi a dieta aglutinata) anche soggetti con forme più lievi rispetto al passato, caratterizzate da sintomi molto sfumati.

Algoritmi per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia

Esiste nelle linee guida internazionali una relativa eterogeneità nelle proposte di algoritmi per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia. Di rilievo, quelle proposte recentemente da specialisti dell'area della Medicina di Laboratorio (105). Sul piano diagnostico-clinico, nuove conoscenze sono state rese disponibili negli ultimi anni: alla celiachia si sono affiancate una serie di reazioni avverse al glutine, che richiedono una diagnosi differenziale (106); è stata resa disponibile una nuova classificazione istologica semplificata (107); sono disponibili nuovi marcatori sierologici e genetici [anticorpi anti-gliadina (AGA) anti-DGP, HLA]; è possibile fare diagnosi anche senza biopsia, ma solo in casi specifici e limitati.

Le malattie correlate al glutine sono numerose e sono rappresentate nella Figura 3. In particolare, nei bambini l'allergia al grano può presentarsi con manifestazioni simili a quelle della celiachia, mentre negli adulti è rarissima e ha una sintomatologia del tutto diversa. La classificazione istologica è cambiata: la classica classificazione di Marsh-Oberhuber è stata sostituita da quella più semplice di Corazza-Villanacci; nel 2015 è stata proposta un'ulteriore semplificazione

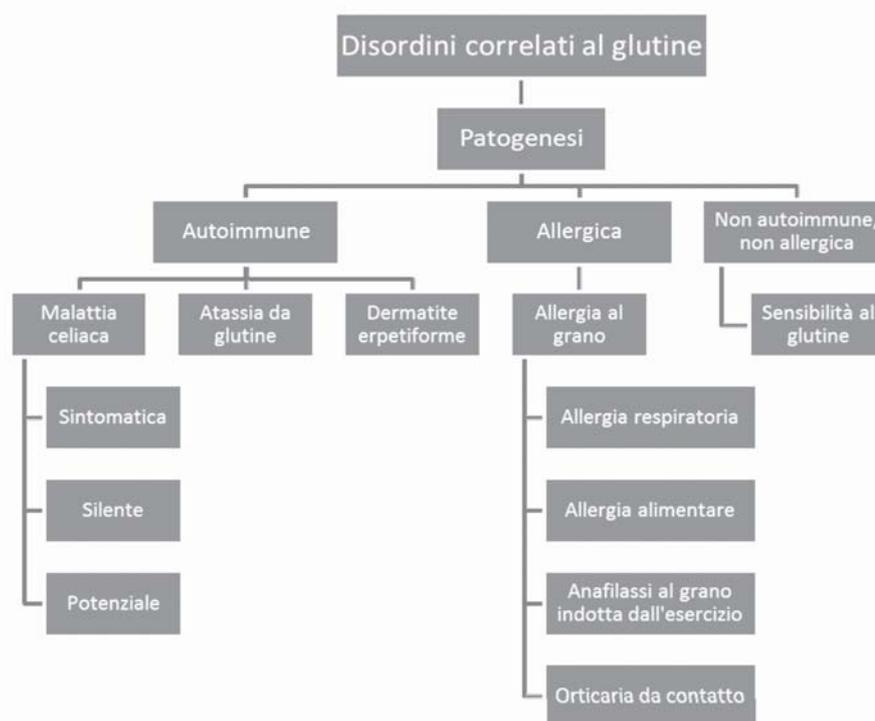


Figura 3
Spettro delle malattie correlate al glutine. Modificata da Sapone A et al. (106).

(classificazione di Villanacci), non ancora recepita nelle linee guida, ma che ha l'obiettivo di armonizzare il referto istologico (107). Infine, oggi si sa che soggetti con biopsia normale possono aver un infiltrato anticorpale anti-tTG a livello della mucosa gastrica e questo può essere importante per la diagnosi nel caso di biopsia non indicativa.

Per la diagnosi di celiachia la determinazione della concentrazione plasmatica degli anticorpi IgA anti-tTG è in generale più affidabile degli anti-DGP-IgA (108). Quest'ultimo esame ha però una predittività superiore nell'identificare soggetti con deficit di IgA nei bambini al di sotto dei 2 anni.

Per quanto riguarda il test genetico (presenza dell'antigene di istocompatibilità di classe seconda HLA DQ2/DQ8), esso è indicato come esame di ingresso per lo screening dei soggetti a rischio, prima della sierologia;

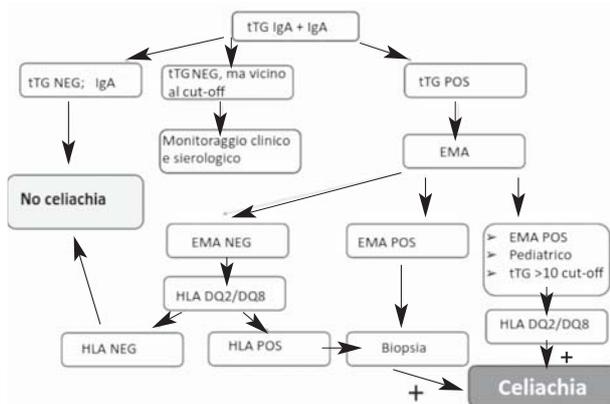


Figura 4
Algoritmo per la diagnosi di celiachia in soggetti con manifestazioni cliniche ed età >2 anni.
tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; EMA, anticorpi anti-endomisio.

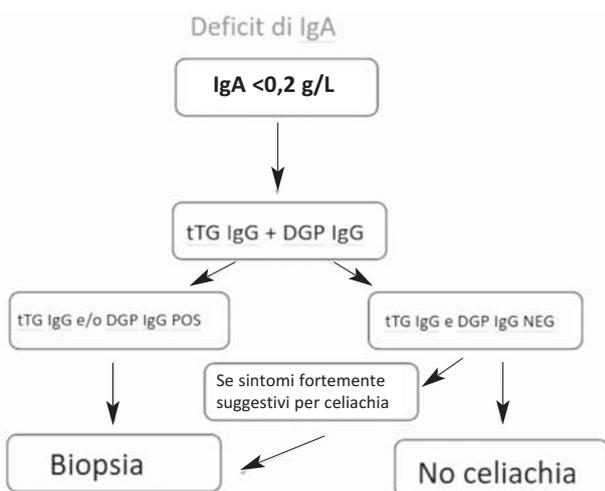


Figura 5
Algoritmo per la diagnosi di celiachia in soggetti con deficit di IgA.
tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; DGP, anticorpi anti-peptidi della gliadina deamidata.

qualche esperto ne indica l'uso alla nascita per i familiari di primo grado dei soggetti celiaci.

Numerosi studi supportano la possibilità di fare la diagnosi senza la biopsia: in particolare, uno studio ha indicato che con valori >10 volte il valore soglia di anti-tTG IgA il valore predittivo positivo dell'esame è del 100% (109). Le recenti linee guida dell'European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) indicano che nei bambini sintomatici con anti-tTG >10 volte la soglia, confermati da anticorpi anti-endomisio (EMA) e da positività HLA DQ2/8, si può evitare la biopsia (110). Si tratta, però, dell'unico caso in cui è possibile porre la diagnosi di celiachia senza la biopsia.

Tra le varie proposte da parte delle recenti linee guida [soggetti con età >2 anni (Figura 4), soggetti con deficit di IgA (Figura 5), soggetti asintomatici appartenenti a gruppi a rischio (Figura 6)] esistono alcune controversie circa la collocazione della ricerca di EMA nella procedura diagnostica, l'esclusione di celiachia fatta senza biopsia in caso di anti-tTG IgA di poco oltre la soglia e di EMA negativi, e il valore soglia delle IgA totali per definire il deficit di IgA.

Per quanto concerne il "follow-up", le linee guida ministeriali forniscono le seguenti indicazioni:

- effettuare un controllo entro 6-12 mesi dalla diagnosi e, successivamente, ogni 1-2 anni (salvo complicanze);
- eseguire a ogni controllo esame emocromocitometrico e dosaggio di anti-tTG IgA (o IgG in presenza di deficit di IgA);
- effettuare gli accertamenti ematici per il metabolismo del ferro (sideremia, ferritina) e la folatemia solo al primo controllo e, se alterati, ripeterli ai successivi controlli fino alla normalizzazione.

Poiché alla celiachia si associano con alta prevalenza le tiroiditi autoimmuni, è prevista anche la determinazione

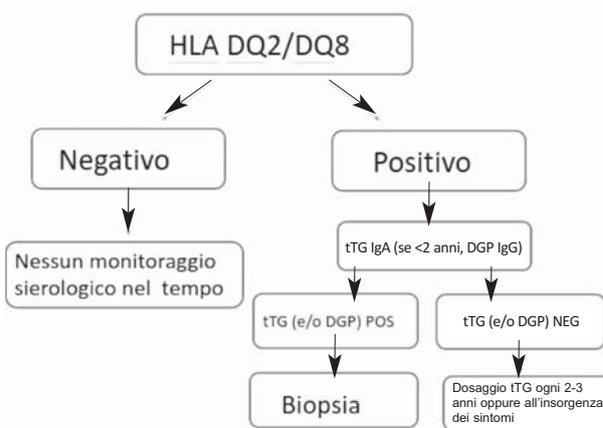


Figura 6
Algoritmo per la diagnosi di celiachia in soggetti asintomatici appartenenti a gruppi a rischio.
tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; DGP, anticorpi anti-peptidi della gliadina deamidata.

di TSH e TPOAb alla diagnosi. Se entrambi negativi, si ripete il TSH ogni 3 anni; se entrambi sono alterati, occorre avviare il paziente al trattamento della tireopatia autoimmune; se solo uno è alterato, si deve effettuare una valutazione endocrinologica. Altri eventuali esami ematologici e strumentali vanno eseguiti solo in base alla valutazione clinica. La densitometria ossea va fatta solo nell'adulto, dopo 18 mesi di dieta senza glutine.

In conclusione, per la diagnosi di celiachia devono essere considerati diversi aspetti: la sierologia, il dato anatomopatologico, il genotipo e il dato clinico. Spesso, però, uno o più di questi elementi sono mancanti. Per questo motivo, alcuni esperti hanno proposto una procedura simile a quella già adottata in altre malattie autoimmuni, che non prevede algoritmi diagnostici complicati, ma definisce criteri classificativi per la diagnosi basati sugli elementi indicati; questa possibilità è stata ripresa dalle linee guida ESPGHAN, che hanno proposto l'applicazione di uno "score" con punteggi definiti, la cui somma, se si pone al di sopra di una soglia prestabilita, permette di porre la diagnosi di celiachia (110). Questi "score", però, non sono ancora stati validati da studi clinici che ne abbiano valutato il grado di predittività.

Specifiche di qualità della determinazione degli anti-tTG

Il valore predittivo negativo dei test per la diagnostica della celiachia è alto, ma solo gli anti-tTG di classe IgA e gli EMA hanno specificità e sensibilità elevate (Tabella 2). Alcuni studi hanno messo a confronto EMA, anti-tTG e anti-DGP (108, 111-113).

Per quanto riguarda la determinazione di anti-tTG IgA, in commercio sono disponibili diversi kit diagnostici, che utilizzano antigeni, unità e intervalli di misura differenti e suggeriscono diversi cut-off. Gli antigeni usati più di frequente sono di origine umana ricombinante da *Escherichia coli*, baculovirus o derivati da linee cellulari di mieloma, e gli antigeni purificati di tipo umano da eritrociti. Nei bambini, gli studi indicano che le prestazioni diagnostiche degli anti-tTG IgA sono dipendenti dal metodo utilizzato e dall'età del bambino. Il laboratorio deve suggerire l'antigene (umano ricombinante o purificato), il metodo immunoenzimatico (ELISA o chemiluminescenza) e il cut-off diagnostico. Inoltre, dovrebbe definire e monitorare le prestazioni analitiche degli esami.

Per quanto riguarda l'antigene utilizzato, una meta-analisi ha valutato kit con antigeni diversi, indicando che gli antigeni di origine umana, sia ricombinanti che purificati, hanno specificità e sensibilità superiori (114).

Per ottenere la migliore combinazione di sensibilità e specificità diagnostica per i metodi ELISA occorre utilizzare il cut-off di 17,5 U; per i metodi in chemiluminescenza la migliore combinazione di sensibilità e specificità si ottiene con un cut-off di 16 U. Numerosi studi hanno messo in luce come il cut-off nella determinazione di tTG IgA con lo stesso antigene e lo stesso metodo possa variare notevolmente. L'eterogeneità dei risultati degli esami condotti nei vari

laboratori è stata evidenziata nel 2009 da una ricerca, i cui risultati hanno messo in luce una grande variabilità nella sensibilità (69-93%) e nella specificità (96-100%) dei diversi metodi e un CV intrasaggio piuttosto ampio in alcuni laboratori (115).

Ruolo dell'HLA nella diagnosi di celiachia

La celiachia è una malattia autoimmune ad alta prevalenza con forme cliniche classiche e forme latenti e silenti: alla base di tutte c'è la suscettibilità genetica. Il principale fattore genetico predisponente alla malattia celiaca è l'aplotipo HLA DQ2/DQ8, che rende conto del 40% della predisposizione genetica. Il restante 60% è dovuto a molti altri fattori genetici, non del tutto noti.

I pazienti celiaci sono portatori dell'aplotipo HLA DQ2/DQ8 nella quasi totalità dei casi; tuttavia, solo una piccola parte sviluppa la celiachia. Le molecole HLA DQ2/DQ8 vengono espresse dalle cellule dendritiche della mucosa dell'intestino e, nei portatori di questo aplotipo, le cellule hanno elevata affinità per i peptidi con carica elettrica negativa, come i peptidi deamidati della gliadina. La presenza dell'aplotipo favorisce l'innescare della risposta immunitaria, perché gli antigeni vengono presentati alle cellule T, che a loro volta danno il via al processo di autoimmunità.

L'HLA di classe II non comprende solo DQ2 e DQ8, ma una ampia varietà di possibili alleli, molti dei quali sono coinvolti nella predisposizione alle malattie autoimmuni o, in alcuni casi, sono protettivi. HLA entra nel *locus* del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), sul braccio corto del cromosoma 6, dove si trovano diverse regioni genetiche; quella di interesse per la malattia celiaca è la regione della classe II, che contiene una serie di geni, tra i quali HLA DQB1 e HLA DQA1, che sono in "linkage" con il *locus* DR. Il gene A1 codifica per la catena proteica α , il B1 per la catena proteica β ; nelle cellule che presentano l'antigene, queste proteine sono espresse a livello di membrana, in modo da formare un eterodimero. Tra i possibili alleli dei geni HLA DQA1 e B1, quelli direttamente coinvolti nella predisposizione alla malattia celiaca sono pochi e sono quelli che codificano per le proteine che concorrono a formare DQ2 e DQ8. Per quanto riguarda il DQ2, l'allele più importante è *02 del *locus* DQB1, che codifica la catena β dell'eterodimero HLA DQ2. Perché vi sia presenza di DQ2 è necessario avere questo allele; non è però sufficiente: occorre avere anche l'allele *05 del *locus* DQA1. Questi alleli si possono combinare in maniera molto variabile e complessa. Per il DQ8, invece, è necessaria la combinazione degli alleli *0302 del *locus* DQB1 e *03 del *locus* DQA1.

Per eseguire l'analisi di HLA DQ2/DQ8 sono disponibili molte opzioni, grazie alle tecniche di biologia molecolare. Per esempio, è possibile effettuare una "polymerase chain reaction" (PCR) allele-specifica con analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio oppure si può effettuare un sequenziamento. In realtà, però, l'obiettivo è individuare solo l'eventuale presenza dei 4 alleli direttamente coinvolti. Uno dei possibili metodi è un'analisi PCR in "real time", usando sequenze

specifiche, "primer" e sonde che riconoscono gli alleli di interesse. Si analizza il campione di DNA e, se si individua l'allele principale (*02 del *locus* DQB1), viene rilevato un segnale di amplificazione. Per poter affermare che il soggetto ha HLA DQ2 è necessario poi individuare anche l'allele *05 del *locus* DQA1, con lo stesso metodo. Si può poi verificare se *02 del *locus* DQB1 è in omozigosi o eterozigosi. Se il risultato è positivo, le varie combinazioni alleliche si traducono in un diverso rischio di malattia. Infatti, è condizione diversa avere tutti gli alleli di DQ2 e DQ8 rispetto ad avere il solo *02 del *locus* DQB1.

Esiste una notevole variabilità del rischio (116). I soggetti con DQ2 in omozigosi hanno un rischio molto elevato di essere celiaci, mentre quelli con il DQ8 hanno un rischio più contenuto. Per quanto riguarda i familiari, che sono soggetti a rischio, nella comunità scientifica si discute sull'opportunità di effettuare il test genetico. Se è negativo, infatti, la celiachia si può escludere e questo è un motivo a sostegno dell'opportunità dell'esame. Tuttavia, la probabilità che i familiari dei soggetti celiaci abbiano questo aplotipo e che l'esame risulti positivo è molto alta, e in questo caso non c'è nulla che si possa fare. Il problema quindi è tradurre nella pratica clinica il diverso rischio associato ai risultati dell'analisi genetica. Occorre decidere a chi e come effettuare il monitoraggio e con quale frequenza, dato il diverso livello di rischio. In un'esperienza recente sono stati valutati ~200 soggetti, con età media intorno a 20 anni, nei quali anti-tTG IgA e HLA DQ2 e DQ8 sono stati richiesti ed effettuati in modo inappropriato (117). ~40% dei soggetti è risultato negativo e, tra quelli positivi, la maggior parte aveva DQ2 in eterozigosi. Tra i soggetti analizzati, ~10-15% ha poi effettuato la gastroscopia. Tenendo conto dell'età, del sesso, dei valori di anti-tTG e dell'aplotipo HLA DQ2/DQ8 è risultato che il fattore che indice di più a effettuare la gastroscopia è il dato genetico.

Esistono moltissimi altri geni diversi da HLA che hanno un ruolo nella predisposizione alla malattia celiaca e ad altre malattie autoimmuni. Ogni variante non-HLA apporta un contributo minimo al rischio genetico associato all'HLA; è quindi difficile pensare di analizzare tutte le varianti e, in ogni caso, il loro significato clinico non è così rilevante. Per esempio, gli aplotipi "tumor necrosis factor (TNF) α ", a parità di HLA, aumentano il rischio di celiachia: in un soggetto ad alto rischio, la genetica del TNF consente di individuare differenze di rischio (116). Nella pratica clinica, però, il significato di queste varianti genetiche è al momento trascurabile.

In conclusione:

- il *locus* HLA è il principale fattore genetico di predisposizione alla malattia celiaca;
- gli aplotipi HLA DQ2 e DQ8 sono necessari, ma non sufficienti per lo sviluppo della patologia;
- la diagnosi nei bambini sintomatici viene posta se vi è la presenza contemporanea di HLA DQ2 o DQ8 e di livelli di tTG IgA >10 volte la soglia;
- l'assenza di HLA DQ2 e DQ8 consente di escludere la celiachia nei pazienti a rischio, che non

necessitano di ulteriori monitoraggi;

- esiste un gradiente di rischio di celiachia associato ai diversi aplotipi HLA DQ che derivano dalle varie combinazioni degli alleli HLA DQA1 and DQB1;
- la sola regione HLA è responsabile di ~40% della predisposizione genetica alla celiachia. Altri loci coinvolti saranno oggetto di ricerca in futuro.

Appropriatezza della richiesta degli esami diagnostici per la celiachia: il decalogo delle raccomandazioni

- La diagnosi di celiachia prevede l'integrazione di dati clinici, sierologici e istologici: è fondamentale che tutti gli esami diagnostici siano effettuati in dieta libera, evitando, in particolare, la sospensione dell'assunzione di glutine per non falsare i risultati degli esami.
- I biomarcatori di prima scelta sono gli anti-tTG IgA e le IgA totali. Se si rileva un deficit di IgA, si misurano gli anti-DGP IgG.
- L'esame genetico per la ricerca di HLA DQ2/DQ8 è indicato come esame di ingresso per lo screening dei soggetti a rischio, prima della sierologia: qualche esperto ne indica l'uso alla nascita per i familiari di primo grado dei soggetti celiaci.
- Gli esami diagnostici di ingresso per celiachia in soggetti con manifestazioni cliniche ed età >2 anni sono anti-tTG IgA e IgA totali.
- Gli esami di prima scelta per i soggetti con deficit di IgA sono anti-tTG IgG e anti-DGP IgG.
- L'esame più importante per i soggetti asintomatici appartenenti a gruppi a rischio è HLA DQ2/DQ8.
- Permane ancora controversa la collocazione dell'esame EMA nella procedura diagnostica.
- Nel referto diagnostico dei marcatori vanno chiaramente esplicitati l'antigene impiegato nel metodo, il metodo stesso e il valore soglia diagnostico.
- Nei bambini sintomatici con presenza contemporanea di HLA DQ2/DQ8 e livelli elevati di anti-tTG IgA (10 volte URL), la diagnosi può essere posta senza ricorrere alla biopsia.
- L'assenza di DQ2/DQ8 nei soggetti a rischio consente di escludere la celiachia e di evitarne il monitoraggio.

CONCLUSIONI

Il tema dell'appropriatezza in medicina di laboratorio, anziché concentrarsi su dibattiti teorici, deve entrare nella definizione di protocolli operativi, linee guida cliniche e percorsi diagnostico-terapeutici basati su solide prove scientifiche e di letteratura, che permettano di ridurre sprechi e ricorso a esami obsoleti o inutili. Le 3 aree diagnostiche prese in considerazione nel presente documento dimostrano 3 fatti essenziali: a) lo sviluppo, avvenuto nelle ultime decadi, di una nuova generazione di esami di laboratorio più accurati dal punto di vista clinico; b) la necessità di creare algoritmi diagnostici e

utilizzare i test riflessi per garantire qualità, sicurezza e appropriatezza all'informazione di laboratorio; e c) l'importanza di sviluppare e diffondere linee guida e protocolli che permettano di realizzare l'appropriatezza non solo nella richiesta, ma in tutte le fasi del ciclo dell'esame di laboratorio. Un insegnamento che proviene dalle esperienze sviluppate in vari ambiti internazionali evidenzia come l'appropriatezza non possa essere perseguita solamente per scopi economici e di riduzione dei costi, ma attraverso una serie di strategie che permettano di educare, formare e responsabilizzare i professionisti del sistema sanitario.

CONFLITTO DI INTERESSI

F. Ceriotti, F. Di Serio e M. Plebani dichiarano supporti per riunioni da Siemens Healthcare Italia.

BIBLIOGRAFIA

1. Giavarina D. L'appropriatezza in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:209-16
2. Quaseem A, Alguire P, Dallas P, et al. Appropriate use of screening and diagnostic test to foster high-value, cost-conscious care. *Ann Intern Med* 2012;156:147-9
3. Mughal Z, Narayanan A, Gupta V, et al. Clinical need-directed blood tests: a step in saving the NHS? *Ann Clin Biochem* 2016;53:568-74.
4. Dorevitch AP. The "Ulysses syndrome" in pathology: when more is less. *Med J Aust* 1992;156:140
5. Zhi M, Ding EL, Theisen-Toupal J, et al. The landscape of inappropriate laboratory testing: a 15-year meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:1-7.
6. College of American Pathologists. Standards for Laboratory Accreditation. Northfield, Ill: College of American Pathologists; 1998.
7. Fryer AA, Smellie WS. Managing demand for laboratory tests: a laboratory toolkit. *J Clin Pathol* 2013;66:62-72.
8. Jackson BR. Managing laboratory test use: principles and tools. *Clin Lab Med* 2007;27:733-48.
9. Baird G. The laboratory test utilization management toolbox. *Biochem Med* 2014;24:223-34.
10. Rovner DR. Laboratory testing may not glitter like gold. *Med Decis Making* 1998;18:32-3.
11. Lippi G, Plebani M. False myths and legends in laboratory diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:2087-97.
12. Lippi G, Cervellini G, Plebani M. The ten commandments of laboratory testing for emergency physicians. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:183-7.
13. Ionnidis JP. Biomarkers failures. *Clin Chem* 2013;59:202-4
14. Prochazka AV, Caverly T. General health checks in adults for reducing morbidity and mortality from disease: summary review of primary findings and conclusions. *JAMA* 2013;308:416-7.
15. Coulter A, Cleary PD. Patients' experiences with hospital care in five countries. *Health Aff* 2001;20:244-52.
16. Rolfe A, Burton C. Reassurance after diagnostic testing with a low pretest probability of serious disease: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2013;173:407-16.
17. Redberg R, Katz M, Grady D. Diagnostic tests: another frontier for less is more: or why talking to you patients is a safe and effective method of reassurance. *Arch Intern Med* 2011;171:619.
18. Solomon DH, Hideki H, Daltroy L, et al. Techniques to improve physicians' use of diagnostic tests. *JAMA* 1998;280:2020-7.
19. Sherwood P, Lyburn I, Brown S, et al. How are abnormal results for liver function tests dealt with in primary care? Audit of yield and impact. *Br Med J* 2001;322:277-8.
20. Gambino SR. Met and unmet needs of the automated clinical laboratory. *Trans N Y Acad Sci* 1970;32:816-20.
21. Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;45:1762-3.
22. Plebani M, Laposata M, Lundberg GD. The brain-to-brain loop concept for laboratory testing 40 years after its introduction. *Am J Clin Pathol* 2011;136:829-33.
23. Kobewska DM, Ronksley PE, McKay JA, et al. Influence of educational audit and feedback, system based, and incentive and penalty interventions to reduce laboratory test utilization: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:157-83.
24. Liu Z, Abdullah A, Baskin L, et al. An intervention to reduce laboratory utilization of referred-out tests. *Lab Med* 2012;43:164-7.
25. Feldman LS, Shihab HM, Thiemann D, et al. Impact of providing fee data on laboratory test ordering: a controlled clinical trial. *JAMA Intern Med* 2013;173:903-8.
26. Astion M, Shojanian KG, Hamill TR, et al. Classifying laboratory incident reports to identify problems that jeopardize patient safety. *Am J Clin Pathol* 2003;120:18-26.
27. Bahn RS, Burch HB, Cooper DS, et al. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines at the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Thyroid* 2011;21:593-646.
28. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Endocr Pract* 2012;18:988-1028.
29. Brenta G, Vaisman M, Sgarbi JA, et al. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013;57:265-98.
30. De Carvalho GA, Perez CLS, Ward LS. The clinical use of thyroid function tests. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013;57:193-204.
31. Caldwell G, Kellett GJ, Gow SM, et al. A new strategy for thyroid function testing. *Lancet* 1985;1:1117-9.
32. Squire CR, Fraser WD. Thyroid stimulating hormone measurement using a third generation immunometric assay. *Ann Clin Biochem* 1995;32:307-13.
33. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003;13:3-126.
34. Pearce EN. The relationship between serum TSH and free T4 is not log-linear and varies by age and sex. *Clin Thyroidol* 2013;25:156-7.
35. Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, et al. American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med* 2000;160:1573-5.
36. Muller AF, Berghout A, Wiersinga WM, et al. Thyroid function disorders – Guidelines of the Netherlands Association of Internal Medicine. *J Med* 2008; 66:134-42.
37. Nordyke RA, Reppun SR, Madanay LD, et al. Alternative sequences of thyrotropin and free thyroxine assays for routine thyroid function testing. *Arch Intern Med* 1998;158:266-72.
38. Wardle CA, Fraser WD, Squire CR. Pitfalls in the use of thyrotropin concentration as a first-line thyroid function test. *Lancet* 2001;357:1013-4.
39. Beckett GJ, Toft AD. First-line thyroid function tests – TSH

- alone is not enough. *Clin Endocrinol* 2003;58:20-1.
40. Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and post-partum. *Thyroid* 2011;10:1081-125.
 41. Matyjasek-Matuszek B, Pyzik A, Nowakowski, et al. Diagnostic methods of TSH in thyroid screening tests. *Ann Agric Environ Med* 2013;20:731-5.
 42. Srivastava R, Bartlett WA, Kennedy IM, et al. Reflex and reflective testing: efficiency and effectiveness of adding on laboratory tests. *Ann Clin Biochem* 2010;47:223-7.
 43. Verboeket-van de Venne WPHG, Aakre KM, Watine J, et al. Reflective testing: adding value to laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1249-52.
 44. Penney MD, O'Sullivan DJ. Total or free thyroxine as a primary test of thyroid function. *Clin Chem* 1987;33:170-1.
 45. Klee GG, Hay ID. Assessment of sensitive thyrotropin assays for an expanded role in thyroid function testing: proposed criteria for analytic performance and clinical utility. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:461-71.
 46. Vieira AJ. Thyroid function testing in outpatients: are both sensitive thyrotropin (sTSH) and free thyroxine (FT4) necessary? *Fam Med* 2003;35:408-10.
 47. Stockigt J. Assessment of thyroid function: towards an integrated laboratory-clinical approach. *Clin Biochem Rev* 2003;24:109-22.
 48. Barbesino G, Tomer Y. The clinical use of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2247-55.
 49. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N. Challenges in the standardization of autoantibody testing: A comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;53:68-77.
 50. Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D, et al. Evaluation of the first autoamted immunoassay method for the measurement of stimulating TSH receptor autoantibodies in Graves'disease. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:58-64.
 51. Zophel K, Wunderlich G, Kotzerke J. Should we really determine a reference population for the definition of thyroid-stimulating hormone reference interval? *Clin Chem* 2006;52:329-30.
 52. Goichot B, Sapin R, Schlienger JL. Subclinical hyperthyroidism: considerations in defining the lower limit of the thyrotropin reference interval. *Clin Chem* 2009;55:420-4.
 53. Baskin HJ, Cobin RH, Duick DS, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Pract* 2002;8:457-69.
 54. Hamilton TE, Davis S, Onstad L, et al. Thyrotropin levels in a population with no clinical, autoantibody, or ultrasonographic evidence of thyroid disease: implications for the diagnosis of subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1224-30.
 55. Vieira JGH. Defining reference values for TSH: nearing perfection in an imperfect world. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010;54:589-90.
 56. Inal TC, Serteser M, Coskun A, et al. Indirect reference intervals estimated from hospitalized population for thyrotropin and free tyroxine. *Croat Med J* 2010;51:124-30.
 57. Surks MI, Boucai L. Age and race-based serum thyrotropin reference limits. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:496-502.
 58. Dorizzi R, Giannone G, Cambiaso P, et al. Indirect methods for TSH reference interval: at last fit for purpose? *Am J Clin Pathol* 2011;135:167-74.
 59. Gupta S, Verma M, Gupta AK, et al. Are we using thyroid function tests appropriately? *Ind J Clin Biochem* 2011;26:178-81.
 60. Vaidya B, Ekoumunne OC, Shuttleworth J, et al. Variability in thyroid function test requests across general practices in south-west England. *Qual Prim Care* 2013;213:143-8.
 61. Gurnell M, Halsall DJ, Chatterjee K. What should be done when thyroid function tests do not make sense? *Clin Endocrinol* 2011;74:673-8.
 62. Koulouri O, Moran C, Halsall D, et al. Pitfalls in the measurement and interpretation of thyroid function tests. *Best Pract Clin Endocrinol Metab* 2013;27:745-62.
 63. Zaninotto M, Tognon C, Venturini R, et al. Interference in thyroid hormones with Roche immunoassays: an unfinished story. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:e269-70.
 64. Bolstad N, Warren DJ, Nustad K. Heterophilic antibody interference in immunometric assays. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27:647-61.
 65. Rang M. The Ulysses syndrome. *Can Med Assoc J* 1972;106:122-3.
 66. Foraounzafar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385:117-71.
 67. Castro A, Coresh J. CKD surveillance using laboratory data from the population-based National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis* 2009;53:S46-55.
 68. De Nicola L, Donfrancesco C, Minutolo R, et al. Prevalence and cardiovascular risk profile of chronic kidney disease in Italy: results of the 2008-12 National Health Examination Survey. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:806-14.
 69. Lewey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO controversies conference report. *Kidney Int* 2011;80:17-28.
 70. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1-150.
 71. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. *Lancet* 2012;380:807-14.
 72. Berger JR, Jaikaransingh V, Hedayati SS. End-stage kidney disease in the elderly: approach to dialysis initiation, choosing modality, and predicting outcomes. *Adv Chronic Kidney Dis* 2016;23:36-43.
 73. Peralta CA, Estrella MM. Preventive nephrology in the era of "I" evidence: should we screen for chronic kidney disease? *Kidney Int* 2017;92:19-21.
 74. Stevens PE, Levin A; Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 2013;158:825-30.
 75. Agarwal R, Bills JE, Yigazu PM, et al. Assessment of iothalamate plasma clearance: duration of study affects quality of GFR. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:77-85.
 76. Schwartz GJ, Abraham AG, Furth SL, et al. Optimizing iothexol plasma disappearance curves to measure the glomerular filtration rate in children with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010;77:65-71.
 77. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.
 78. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum

- creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Int Med* 1999;130:461-70.
79. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Int Med* 2009;150:604-12.
 80. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:629-37.
 81. Ceriotti F, Boyd JC, Klein G, et al. Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. *Clin Chem* 2008;54:559-66.
 82. Infusino I, Panteghini M. Riferibilità metrologica e validità della determinazione della creatinina come indice di funzionalità renale. *Biochim Clin* 2007;31:13-8.
 83. Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, et al. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clin Chem* 2012;58:391-401.
 84. Guder WG, Hoffmann GE, Hubbuch A, et al. Multicentre evaluation of an enzymatic method for creatinine determination using a sensitive colour reagent. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24:889-902.
 85. Fossati P, Ponti M, Passoni G, et al. A step forward in enzymatic measurement of creatinine. *Clin Chem* 1994;40:130-7.
 86. 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.
 87. Mussap M, Graziani MS, Caldini A, et al. Documento di consenso SIBioC e Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) sulla richiesta di esami di laboratorio per la valutazione del danno renale da mezzi di contrasto. *Biochim Clin* 2014;38:140-1.
 88. Roos JF, Doust J, Tett SE, et al. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children - a meta-analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383-91.
 89. Zhang M, Cao X, Cai G, et al. Clinical evaluation of serum cystatin C and creatinine in patients with chronic kidney disease: a meta-analysis. *J Int Med Res* 2013;41:944-55.
 90. Li J, Dunn W, Breaud A, et al. Analytical performance of 4 automated assays for measurement of cystatin C. *Clin Chem* 2010;56:1336-9.
 91. Grubb A, Blirup-Jehnsen S, Lindstrom V, et al. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1619-21.
 92. Bargnoux AS, Piéroni L, Cristol JP, et al. Multicenter evaluation of cystatin C measurement after assay standardization. *Clin Chem* 2017;63:833-41.
 93. Perkins BA, Nelson RG, Ostrander BEP, et al. Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1404-12.
 94. Shlipak MG, Matsushita K, Arnlov J, et al. Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *N Engl J Med* 2013;369:932-43.
 95. Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinin ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA* 2011;305:1545-52.
 96. Graziani MS, Secchiero S, Terreni A, et al. La diagnostica di laboratorio della malattia renale cronica in Italia: armonizzare è d'obbligo. *Biochim Clin* 2015;39:617-26.
 97. Van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-52.
 98. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, et al. Principali aspetti nella misurazione e refertazione della escrezione urinaria di albumina. *Biochim Clin* 2010;34:337-50.
 99. Graziani MS, Plebani M. The standardization of the urine albumin assays: no longer deferrable. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1657-9.
 100. Lieske JC et al. A reference system for urinary albumin: current status. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:981-9.
 101. Ketha H, Singh RJ. Quantitation of albumin in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2016;1378:31-6.
 102. Bachmann LM, Nilsson G, Bruns DE, et al. State of the art for measurement of urine albumin: comparison of routine measurement procedures to isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2014;60:471-80.
 103. Leonard MM, Camhi S, Huedo-Medina TB, et al. Celiac disease genomic, environmental, microbiome, and metabolomics (CDGEMM) study design: approach to the future of personalized prevention of celiac disease. *Nutrients* 2015;7:9325-36.
 104. Catassi C, Gatti S, Fasano A. The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59(suppl 1):S7-9.
 105. Porcelli B, Alessio MG, Villalta D, et al. Linee guida per la diagnosi di laboratorio e istologica della malattia celiaca. Revisione 2015. *Riv Ital Med Lab* 2015;11:76-95.
 106. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine* 2012;10:13.
 107. Villanacci V. The histological classification of biopsy in celiac disease: time for a change? *Dig Liver Dis* 2015;47:2-3.
 108. Tonutti E, Bizzaro N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmun Rev* 2014;13:472-6.
 109. Alessio MG, Tonutti E, Brusca I, et al. Correlation between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:44-9.
 110. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, et al. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for the diagnosis of celiac disease. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2014;54:136-60.
 111. Van der Windt DA, Jellema P, Mulder CJ, et al. Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *JAMA* 2010;303:1738-46.
 112. Lewis NR, Scott BB. Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase compared as screening test for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:73-81.
 113. Husby S, Murray JA. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:655-63.
 114. Zintzaras E, Gemenis AE. Performance of antibodies against tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease: meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:187-92.
 115. Li M, Liping Y, Tiberti C, et al. A report on the International Transglutaminase Autoantibody Workshop for Celiac Disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:154-63.
 116. Rossi E, Basso D, Zamboni CF, et al. TNFA haplotype genetic testing improves HLA in estimating the risk of celiac disease in children. *PLoS One* 2015;10:e0123244.
 117. Pallav K, Kabbani T, Tariq S, et al. Clinical utility of celiac disease-associated HLA testing. *Dig Dis Sci* 2014;59:2199-206.