



V. DELATOURE

# Développement d'une méthode de référence pour le dosage de la créatinine pour améliorer le diagnostic et le suivi de l'insuffisance rénale

## *Development of a reference method for creatinine measurement to improve diagnosis and follow-up of kidney disease*

Vincent DELATOURE<sup>1</sup>, Béatrice LALERE<sup>1</sup>, Gilles DUMONT<sup>2</sup>, Jean-Marc HATTCHOUEL<sup>2</sup>, Marc FROISSART<sup>3</sup>, Jacques DE GRAEVE<sup>3</sup> et Sophie VASLIN-REIMANN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), 1 rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, France, vincent.delatour@lne.fr.

<sup>2</sup> Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), Département de l'évaluation externe de la qualité, 143/147 Bd Anatole France, 93285 Saint Denis Cedex, France.

<sup>3</sup> Service de physiologie, Hôpital européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, 75908 Paris Cedex 15, France.

<sup>4</sup> Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Rangueil – Larrey Toulouse, 1 avenue du Pr Jean Poulhès 31059 Toulouse Cedex, France.

### Résumé

Le dosage de la créatinine représentait le cinquième examen de biologie médicale le plus fréquent en France en 2008. Cette analyse permet d'effectuer le diagnostic et le suivi de la maladie rénale chronique, une pathologie grave qui touche environ trois millions de personnes en France. Afin de prévenir l'évolution de l'insuffisance rénale chronique vers le stade terminal de la maladie, il est indispensable de disposer de mesures fiables pour pouvoir établir un diagnostic le plus précoce possible, assurer le suivi et adapter le traitement des patients. Devant ces enjeux considérables de santé publique, l'apport de la métrologie est nécessaire pour améliorer la fiabilité des analyses et permettre la comparabilité des résultats. Les méthodes de référence permettent d'une part d'assigner des valeurs de référence aux matériaux d'étalonnage, une étape indispensable pour établir la traçabilité métrologique des résultats et raccorder ceux-ci au Système international d'unités (SI). D'autre part, les méthodes de référence sont essentielles pour assigner des valeurs de référence aux échantillons de contrôle de la qualité. Elles fournissent ainsi des outils indispensables pour évaluer la justesse des méthodes de routine et celles utilisées par les fabricants de produits de diagnostic *in vitro* pour qualifier les solutions d'étalonnage.

**MOTS CLÉS :** CRÉATININE, MÉTROLOGIE, TRAÇABILITÉ, LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE, ISO 15189, ÉVALUATION EXTERNE DE LA QUALITÉ.

### Abstract

*In 2008, creatinine measurement was the fifth most common analysis in laboratory medicine in France. Creatinine is the main biomarker*

*used for the diagnosis, follow-up and monitoring of chronic kidney disease, a serious pathology that affects approximately three million subjects in France. To avoid the evolution of chronic kidney disease to end stage renal disease, it is essential to have reliable creatinine measurements in order to allow efficient and early diagnosis. To address these challenges, the contribution of metrology is essential to improve clinical measurements reliability and comparability. First, reference methods are necessary to assign reference values to calibration materials. This is the first step to establish the metrological traceability of results to the International system of units (SI) and lead to the standardization of medical analysis. Second, reference methods are essential to assign reference values to quality control samples, providing suitable tools for assessing the accuracy of routine methods and those used by in vitro diagnostic products manufacturers.*

**KEY WORDS:** CREATININE, METROLOGY, TRACEABILITY, CLINICAL LABORATORY, ISO 15189, EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT.

### 1. Introduction

En France comme dans les autres pays industrialisés, la maladie rénale chronique constitue un problème majeur de santé publique [1–3] : il est estimé que deux à trois millions de personnes sont atteintes par cette pathologie en France (26 millions aux Etats-Unis d'Amérique). Le nombre de patients en insuffisance rénale terminale est de l'ordre de 65 000 et augmente continûment,

Tableau 1

Les dix analyses de biologie médicale les plus fréquentes en France en 2008 et le coût de leur remboursement par l'Assurance maladie.

Rang	Libelle de l'acte	Nombre d'analyses			Montant remboursé (€)		
		2006	2007	2008	2006	2007	2008
1	Hémogramme	29 098 238	30 273 341	31 676 176	228 952 472	219 891 596	230 134 361
2	Glucose	20 520 761	20 972 673	21 581 411	41 206 224	41 987 789	43 236 576
3	Transaminases	13 090 512	15 419 078	16 301 060	61 724 141	68 587 157	72 619 556
4	Vitesse de sédimentation	14 337 200	14 727 502	15 130 969	27 825 839	28 529 424	29 312 210
5	Créatinine	13 661 666	14 389 134	15 128 005	28 683 146	30 125 137	31 644 523
6	Ionogramme	12 591 258	13 701 014	14 767 323	54 592 463	59 193 144	63 701 738
7	Exploration d'une anomalie lipidique	12 636 319	13 315 580	13 946 430	132 559 011	136 915 036	120 095 824
8	Temps de Quick (en cas de traitement par les AVK)	11 865 017	12 483 505	13 151 908	56 851 707	59 885 773	63 102 892
9	Protéine C-réactive	10 187 555	11 161 255	12 292 560	67 242 073	67 332 547	74 303 031
10	Gamma GT	8 195 309	10 429 640	11 167 152	32 751 583	41 060 517	33 989 173

principalement aux dépens des sujets âgés [4]. Actuellement, environ un tiers des patients atteints d'insuffisance rénale sont diagnostiqués alors qu'ils sont déjà à un stade avancé de la maladie [5]. Le diagnostic précoce de l'insuffisance rénale est déterminant dans la prise en charge du patient pour prévenir l'évolution de la maladie vers l'insuffisance rénale terminale, qui nécessite une greffe de rein ou la mise en épuration extra-rénale du patient [6]. En plus de ces enjeux de santé publique, il est indispensable de considérer les enjeux économiques considérables à cette pathologie : le coût du traitement de l'insuffisance rénale terminale est estimé à 1,5 milliards d'euros par an et représente 2 % de la totalité des dépenses de santé de l'Assurance Maladie au bénéfice de seulement 0,075 % de la population française [1, 7].

Pour garantir un dépistage efficace des patients et limiter les dépenses de santé publique, il est donc nécessaire de pouvoir s'appuyer sur des résultats d'analyse les plus fiables possible. L'apport de la métrologie est indispensable : d'une part pour établir la traçabilité métrologique des résultats et assurer leur comparabilité et d'autre part pour disposer de contrôles de la qualité permettant d'évaluer efficacement la qualité des méthodes commerciales [8–10].

En routine en biologie clinique, la créatinine est le principal biomarqueur utilisé pour le diagnostic de l'insuffisance rénale chronique [1]. La mesure de la concentration de créatinine sérique ou plasmatique (créatininémie) permet d'estimer le débit de filtration glomérulaire [11–13]. La mesure de la créatininémie est donc un examen très fréquent, qui représentait en 2008 la cinquième analyse la plus pratiquée en France avec environ 15 millions d'actes [14]. Le remboursement de ces examens par l'assurance maladie représentait un coût de 31 millions d'euros (tab. 1).

## 2. Méthodes de dosage de la créatinine : état de l'art

Il existe différentes méthodes de dosage de la créatinine, qui peuvent être classées en trois grands groupes : les méthodes colorimétriques basées sur la réaction de

Jaffe, les méthodes enzymatiques et les méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse. Les techniques colorimétriques et enzymatiques sont utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. En revanche, les méthodes par spectrométrie de masse sont beaucoup plus lourdes et coûteuses à mettre en œuvre et pour cette raison, elles ne sont utilisées quasi-exclusivement qu'au sein des laboratoires de référence et des laboratoires nationaux de métrologie.

### 2.1. Méthodes colorimétriques basées sur la réaction de Jaffe

Les méthodes les plus utilisées pour la détermination de la créatininémie reposent sur la réaction de Jaffe. Le principe général de cette méthode consiste à mesurer, à 505 nm, l'intensité de la coloration du complexe rouge-orangé formé par la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin. En 2009, la quasi-totalité des méthodes reposant sur ce principe effectuent cette mesure non plus en point final mais en cinétique, la vitesse de formation de la coloration étant proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon. Les principaux avantages de cette méthode sont la simplicité de mise en œuvre et le faible coût des réactifs.

Le principal inconvénient de cette méthode est son manque de spécificité [15, 16]. Jusqu'à 20 % du signal colorimétrique généré lors des évaluations de sérum ou de plasma peut provenir de substances endogènes autres que la créatinine qui réagissent avec l'acide picrique. Les protéines, le glucose, l'acide ascorbique, les céphalosporines et les  $\alpha$ -céto-acides comme l'acétoacétate et le pyruvate font partie de ces chromogènes non spécifiques qui interfèrent avec la réaction à l'acide picrique et conduisent à une surestimation du résultat. Selon leur concentration, ces composés peuvent provoquer une surestimation de  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  à  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de la concentration de créatinine. Au contraire, certains composés comme la bilirubine masquent le développement de la coloration, donnant des résultats de créatinine faussement bas et pouvant conduire à une erreur de diagnostic. Certains médicaments peuvent également biaiser les résultats. Il

apparaît donc que le manque de spécificité de ce type de méthode constitue leur principal inconvénient.

Pour corriger le biais induit par les réactions non spécifiques avec les « chromogènes non-créatinine », des méthodes de correction (« Jaffe » corrigé ou compensé) ont été développées. Celle-ci est basée sur des mesures comparatives avec une méthode de référence reposant sur la dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse. Ainsi, selon le réactif et l'analyseur concerné, une correction de  $-26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ou  $-18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  est automatiquement effectuée sur les résultats obtenus. Dans la plupart des cas, cette correction arbitraire du biais induit par les interférents permet d'améliorer la justesse de cette méthode [17, 18]. Néanmoins, comme la concentration en chromogènes non spécifiques est susceptible de varier très fortement d'un échantillon à l'autre, cette approche conduit parfois à des résultats aberrants [19]. Par exemple, la concentration des principaux chromogènes non-créatinine est plus basse chez les nourrissons et les personnes âgées que chez les patients ayant servi de base au calcul du facteur correctif. Il en résulte l'obtention de résultats faussement négatifs dans certains cas, du fait de la correction excessive.

## 2.2. Méthodes enzymatiques

Plusieurs fabricants ont développé des méthodes enzymatiques pour surmonter le manque de spécificité des méthodes colorimétriques de type Jaffe. On distingue deux classes de techniques enzymatiques : celles qui reposent sur une détection spectrorélectométrique et celles mettant en œuvre une détection spectrophotométrique (dans l'UV ou dans le visible). Le principe de ces techniques est identique dans les deux cas et met en œuvre une cascade de réactions enzymatiques dont le produit final contient un chromogène. L'intensité de la coloration de celui-ci est directement proportionnelle à la concentration en créatinine.

Différentes études ont montré que les méthodes enzymatiques sont moins sensibles aux interférences que celles reposant sur la réaction de Jaffe et présentent d'excellentes performances en terme de justesse et de fidélité [15, 20–24]. Par ailleurs, elles présentent pour la plupart l'avantage d'être directement raccordées aux méthodes de référence reposant sur la dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse.

Jusqu'à présent, les méthodes enzymatiques avaient un prix de revient nettement supérieur aux autres méthodes ; ce qui a vraisemblablement limité leur utilisation dans les laboratoires d'analyse. Leur coût étant en baisse, la logique voudrait que ces méthodes soient de plus en plus utilisées. Néanmoins, malgré leur utilisation croissante, ces méthodes restent encore assez peu utilisées, les méthodes colorimétriques restant nettement majoritaires (fig. 3). Les recommandations des sociétés savantes (Société Française de Biologie Clinique et Société de Néphrologie) déjà publiées [25], ainsi que le rapport de contrôle de marché de l'AFSSAPS [9, 10] en termes

de choix méthodologiques devraient influencer en faveur des méthodes enzymatiques

## 2.3. Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse

Les techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse sont les plus sensibles et les plus spécifiques mais elles nécessitent une étape de préparation d'échantillons longue et fastidieuse. Elles sont coûteuses, ce qui exclut leur utilisation en routine.

Les méthodes de référence validées par le JCTLM (*Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine*) [26] pour le dosage de la créatinine reposent exclusivement sur la dilution isotopique associée à des méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (IDMS) : la dilution isotopique associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-IDMS) [18, 27–32] et la dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-IDMS) [29, 33].

La dilution isotopique consiste à déterminer la concentration d'un composé donné dans un échantillon en ajoutant une quantité connue d'un analogue du composé d'intérêt marqué avec un ou plusieurs isotopes stables ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ...). La mesure du rapport entre l'intensité du signal de la molécule et celle de la molécule marquée permet de déterminer directement le rapport de quantité de matière entre les deux molécules et donc de déduire la concentration du composé. De ce fait, la dilution isotopique associée à un protocole métrologique adapté est une méthode primaire de haute exactitude. Elle permet de s'affranchir des effets de matrice et a démontré d'excellentes performances en termes de répétabilité et de spécificité, permettant ainsi d'obtenir de très faibles incertitudes.

## 3. Développement et validation d'une méthode de référence pour le dosage de la créatinine

L'objectif est de développer et valider une méthode de référence pour le dosage de la créatinine sérique car il n'en existe pas au niveau national. Cette méthode doit permettre un dosage fiable pour des concentrations physiologiques de créatinine mais également pour les valeurs élevées caractéristiques des patients atteints d'insuffisance rénale.

### 3.1. Principe général de la méthode

Le protocole retenu est une adaptation de la méthode de référence mise au point par L. Siekmann et ses collaborateurs [27]. Les différentes étapes du protocole sont illustrées dans la figure 1 et ont chacune fait l'objet d'optimisations.

À un échantillon de sérum contenant une quantité inconnue de créatinine est ajoutée une quantité connue de créatinine marquée par des isotopes stables ( $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ ).

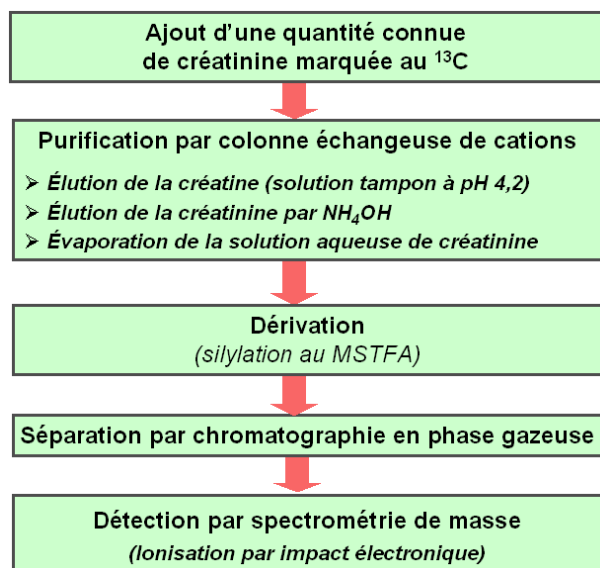


Fig. 1. – Les différentes étapes de la méthode de détermination de la créatinine par ID-GC/MS.

La créatinine et son homologue marqué doivent être dérivés car ces composés ne sont pas suffisamment volatiles pour être analysés directement par chromatographie en phase gazeuse. Comme la créatine (qui est le précurseur non cyclique de la créatinine) forme le même dérivé que la créatinine (mêmes ions caractéristiques), la créatine est un interférent qui doit être éliminé avant l'étape de dérivation [29, 34]. La purification de la créatinine se fait par colonne échangeuse d'ions. La fraction contenant la créatinine purifiée est évaporée car l'étape de dérivation qui suit doit avoir lieu en l'absence totale d'eau. Le mélange de dérivation est injecté directement dans le chromatographe pour séparer les composés. La détection se fait par spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique et permet de mesurer le rapport entre les aires des pics des ions caractéristiques de la créatinine et de son homologue marqué. Le rapport des aires des pics de la créatinine et de la créatinine marquée est comparé avec celui obtenu en analysant des étalons contenant des quantités connues de créatinine et de créatinine marquée avec la régression linéaire comme modèle d'étalonnage. La quantité de créatinine marquée introduite initialement dans l'échantillon étant connue, cela permet de déterminer la quantité de créatinine contenue dans celui-ci.

### 3.2. Préparation des échantillons

Pour mettre en œuvre la dilution isotopique, il est recommandé d'introduire une quantité de composé marqué proche de celle du composé non marqué contenu dans l'échantillon à analyser (*exact matching isotope dilution*). Dans le cas présent, cette quantité a été fixée à 1,2 µg. La première étape de la préparation de l'échantillon consiste à prélever le volume de sérum contenant 1,2 µg de créatinine, ce qui nécessite un pré-dosage. Une solution mère de créatinine [ $^{13}\text{C}$ ;  $^{15}\text{N}_2$ ] (Icon Isotopes, taux de marquage 99,99 %) (créatinine marquée) est préparée gravimétriquement de manière à ce que sa concentration

soit voisine de  $110 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Typiquement, le volume de créatinine marquée ajoutée au sérum est de l'ordre 100 µL. Le pH est ensuite ajusté à 4,2 en ajoutant 100 µL de solution tampon composée d'acétate de sodium et d'acide acétique à  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  puis un volume d'HCl à  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  correspondant à la moitié du volume de sérum prélevé. Enfin, le volume de la préparation est complété à 500 µL avec de l'eau déionisée et l'ensemble est laissé deux heures à température ambiante pour mise à l'équilibre avant d'être passé sur colonne échangeuse d'ions.

### 3.3. Préparation des étalons

L'étalonnage est effectué à partir du matériau de référence certifié du NIST (NIST SRM 914a), qui se présente sous forme de créatinine pure à l'état cristallin. L'utilisation de cet étalon primaire permet d'assurer la traçabilité métrologique des résultats et assure leur raccordement au système international d'unités. Une solution de créatinine non marquée est préparée gravimétriquement de manière à obtenir une solution à  $550 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Celle-ci est diluée dix fois pour obtenir une solution de créatinine à  $55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Les solutions de créatinine et de créatinine marquée sont utilisées pour préparer cinq étalons dont le rapport entre la masse de créatinine et celle de la créatinine marquée vaut respectivement 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 et 1,2. Les étalons sont traités de la même manière que les échantillons de sérum : le pH est ajusté à 4,2 en ajoutant 100 µL de solution tampon composée d'acétate de sodium et d'acide acétique à  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Le volume total est complété jusqu'à 500 µL avec de l'eau déionisée et chaque étalon est équilibré deux heures à température ambiante avant d'être passé sur colonne échangeuse d'ions.

### 3.4. Purification sur colonne échangeuse d'ions

Comme décrit dans le protocole original de Siekmann [27], la résine « AG W50X2 200-400 mesh, hydrogen form » (Sigma) est conditionnée dans une solution d'hydroxyde d'ammonium à  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  puis lavée avec de l'eau déionisée. Ensuite, un volume de 0,5 mL de cette résine est déposé dans une colonne en verre de diamètre 5 mm. La résine est lavée avec un volume de 2,5 mL d'eau déionisée (Millipore) puis avec un volume de 1 mL de solution tampon composée d'acétate de sodium et d'acide acétique de concentration  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Un volume de 500 µL d'échantillon ou d'étalon est ensuite déposé sur la colonne.

L'élution de la créatine est effectuée non pas avec de l'eau comme dans le protocole original, mais avec 1,5 mL de solution tampon. La fraction contenant la créatine est écartée. Dans un deuxième temps, la créatinine est éluée avec 1 mL d'hydroxyde d'ammonium à  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La fraction contenant la créatinine purifiée est évaporée au minimum une heure à  $80^\circ\text{C}$  sous flux d'azote, car l'étape de dérivation qui suit doit avoir lieu en l'absence totale d'eau.

### 3.5. Dérivation de la créatinine

Trois stratégies de dérivation de la créatinine ont été décrites dans les méthodes de référence du JCTLM. Elles mettent en œuvre sur les réactifs de dérivation suivants :

- MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoro-acetamide) [27];
- MTBSTFA (N-(t-butyltrimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamide) [18, 30–33];
- 2,4 pentanedione et acide acétique glacial [28, 29].

La dérivation à la 2,4 pentanedione et l'acide acétique glacial étant très longue (entre 66 h et 72 h), seules les réactions avec le MSTFA et le MTBSTFA ont été testées. La dérivation au MSTFA a finalement été retenue, car les rendements de dérivation sont supérieurs à ceux du MTBSTFA.

La composition du mélange de dérivation a été étudiée. La créatinine doit être soluble dans le mélange de dérivation; pareillement, à la suite de la réaction, la créatinine dérivée doit être soluble dans ce même mélange alors que les groupements polaires ont été masqués par la dérivation. En effet, la créatinine est un composé polaire tandis que la créatinine dérivée est un composé beaucoup moins polaire après que la réaction de dérivation ait masqué les groupements hydrophiles de la molécule pour la rendre thermostable. Ainsi, différentes proportions relatives d'agent de dérivation (MSTFA) et de pyridine ont été testées. Les résultats obtenus montrent qu'un mélange 50/50 (vol/vol) permet d'obtenir les rendements de dérivation les plus élevés.

En parallèle de l'optimisation des volumes relatifs de MSTFA et de pyridine, le volume optimal de MSTFA a été déterminé : celui-ci est égal à 100  $\mu\text{L}$ . Le volume de pyridine a, quant à lui, été fixé à 100  $\mu\text{L}$ . Le volume total du mélange de dérivation est donc de 200  $\mu\text{L}$ . Si ce ratio de 50/50 (MSTFA / pyridine) est le même que celui décrit dans la littérature, le volume total est en revanche beaucoup plus élevé (200  $\mu\text{L}$  contre 30  $\mu\text{L}$ ). En plus de permettre une réaction rapide par un large excès de réactif, travailler avec un volume plus important de mélange réactionnel permet de reprendre plus facilement le composé après l'étape d'évaporation, ce qui diminue la dispersion des résultats. Nos résultats indiquent qu'il est préférable de ne pas dépasser un volume de 400  $\mu\text{L}$  pour le mélange « MSTFA + pyridine ».

Le temps de dérivation a également été optimisé. La réaction de dérivation atteint un plateau après 30 min. Le temps de dérivation a été fixé à 40 min, c'est à dire la même durée que le protocole décrit dans la littérature. Le mélange de dérivation est injecté directement dans le chromatographe.

### 3.6. Optimisation des conditions chromatographiques et détection par spectrométrie de masse

L'analyse est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890N couplé à un spectromètre

de masse Agilent 5975B équipé d'une colonne capillaire apolaire de type Agilent 19091J-436 (HP5 5 % Phényl – 95 % diméthylpolysiloxane 30 m  $\times$  250  $\mu\text{m}$   $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ). L'injection se fait en mode *splitless* (volume injecté : 1  $\mu\text{L}$ ). La programmation de température de la colonne a été optimisée pour permettre une analyse la plus rapide possible, tout en séparant la créatinine dérivée des autres composés de la matrice : la température de colonne est portée à 100  $^{\circ}\text{C}$  puis augmente de 10  $^{\circ}\text{C}$  par minute pour atteindre 280  $^{\circ}\text{C}$ . Le gaz vecteur est l'hélium. Les paramètres d'acquisition sont les suivants :

- température de la ligne de transfert : 270  $^{\circ}\text{C}$
- température de la source : 230  $^{\circ}\text{C}$
- température du quadripôle : 150  $^{\circ}\text{C}$
- fréquence d'acquisition des données : 20 Hz
- délai de solvant : 5 min
- Dwell time : 50 ms

Le temps de rétention de la créatinine dérivée est d'environ 7 min mais il faut éluer l'ensemble des composés injectés dans le chromatographe, ce qui inclut ceux ayant un temps de rétention supérieur à celui de la créatinine dérivée. Au final, chaque analyse dure 26 min. Les ions de quantification de la créatinine et de la créatinine marquée sont respectivement 329 et 332.

### 3.7. Etudes de justesse et validation de la méthode

La justesse de la méthode a été évaluée avec quatre matériaux de référence (NIST SRM 967 Level 1 & NIST SRM 967 Level 2 + ERM-DA 252a & ERM-DA 253a). La figure 2 indique que pour chaque matériau de référence certifié analysé, les écarts normalisés sont inférieurs à 2, ce qui signifie que les valeurs mesurées ne sont pas significativement différentes de la valeur de référence.

## 4. Assignment de valeurs de référence aux échantillons du Contrôle National de Qualité de l'AFSSAPS de 2009 (échantillon B11 de concentration très élevée : $\sim 330 \mu\text{mol/L}$ )

La méthode de référence a été mise à profit pour assigner une valeur de référence aux échantillons utilisés par l'AFSSAPS dans le cadre du contrôle national de qualité (CNQ) de 2009 (échantillon « B11 »). Tous les laboratoires de biologie médicale sont tenus d'y participer. En 2009, 3 107 laboratoires y ont participé. Les échantillons se présentaient sous forme de sérum humain lyophilisé devant être reconstitué dans 5 mL d'eau.

Les informations communiquées par l'AFSSAPS permettent une analyse des résultats non seulement en fonction du principe de la technique (méthode colorimétrique de type « Jaffe », méthode enzymatique, etc.) mais aussi en fonction du couple « automate / fabricant du réactif ». Environ 80 % des laboratoires utilisent une méthode colorimétrique reposant sur la réaction de Jaffe, 15 % utilisent

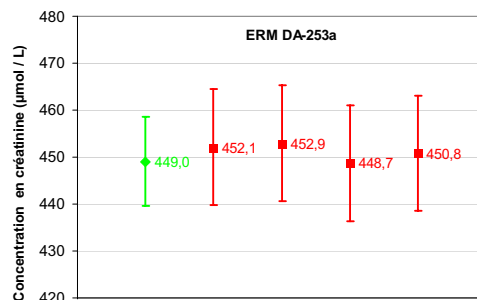
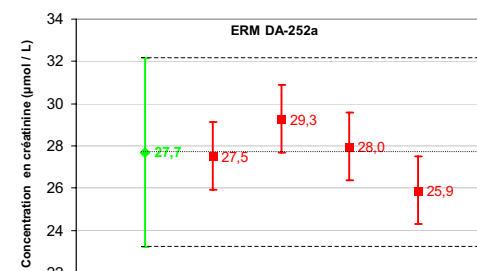
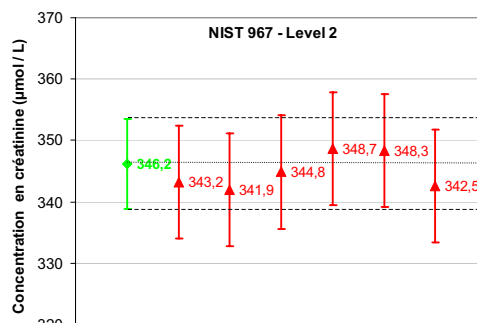
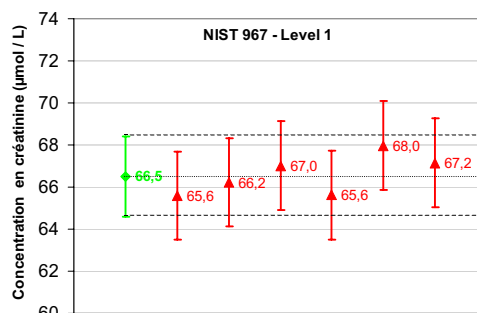
NIST 967 - Level 1					
	Valeur mesurée (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2) (µmol / L)	Valeur de référence (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2)	Ecart normalisé
Jour 1	65,6	2,1	66,5	1,9	0,6
	66,2	2,1	66,5	1,9	0,2
	67,0	2,1	66,5	1,9	0,4
Jour 2	65,6	2,1	66,5	1,9	0,6
	68,0	2,1	66,5	1,9	1,0
	67,2	2,1	66,5	1,9	0,5

NIST 967 - Level 2					
	Valeur mesurée (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2)	Valeur de référence (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2)	Ecart normalisé
Jour 1	343,2	9,2	346,2	7,3	0,6
	341,9	9,2	346,2	7,3	0,9
	344,8	9,2	346,2	7,3	0,3
Jour 2	348,7	9,2	346,2	7,3	0,5
	348,3	9,2	346,2	7,3	0,4
	342,5	9,2	346,2	7,3	0,7

ERM DA-252a					
	Valeur mesurée (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2)	Valeur de référence (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2)	Ecart normalisé
Jour 1	27,5	1,6	27,5	4,5	0,0
	29,3	1,6	27,5	4,5	1,0
Jour 2	28,0	1,6	27,5	4,5	0,3
	25,9	1,6	27,5	4,5	0,9

ERM DA-253a					
	Valeur mesurée (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2)	Valeur de référence (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2)	Ecart normalisé
Jour 1	452,1	12,3	449,0	9,5	0,5
	452,9	12,3	449,0	9,5	0,6
Jour 2	448,7	12,3	449,0	9,5	0,0
	450,8	12,3	449,0	9,5	0,3

	Valeur mesurée (µmol/L)	CV (%)	Incertitude élargie (k=2) (µmol / L)	Valeur de référence (µmol/L)	Incertitude élargie (k=2) (µmol / L)	Ecart normalisé
NIST 967 Niveau 1	66,6	1,4%	1,4	66,5	1,9	0,1
NIST 967 Niveau 2	344,9	0,9%	5,4	346,2	7,3	0,4
ERM DA-252a	27,7	5,0%	1,6	27,5	4,5	0,1
ERM DA-253a	451,1	0,4%	6,4	449,0	9,5	0,5



$$E_N = \frac{X_{\text{mes}} - X_{\text{ref}}}{\sqrt{u_{\text{mes}}^2 + u_{\text{ref}}^2}}$$

Fig. 2. – Contrôles de justesse avec les matériaux de référence certifiés du NIST (NIST SRM 967 niveau 1 et niveau 2) et du LGC (ERM-DA 252a et ERM-DA 253a). La valeur certifiée par le NIST ou le LGC est représentée à gauche de chaque graphique par un losange et l'incertitude associée (incertitude élargie,  $k = 2$ ). Les valeurs obtenues par le LNE sont représentées par un triangle ou un carré, avec l'incertitude associée. Dans les tableaux, l'écart normalisé ( $E_N$ ) doit être inférieur à 2 pour que la valeur fournie par le LNE ( $X_{\text{mes}}$ ) soit considérée comme non statistiquement différente de la valeur de référence ( $X_{\text{ref}}$ ).  $u_{\text{mes}}^2$  et  $u_{\text{ref}}^2$  correspondent aux incertitudes élargies ( $k = 2$ ) associées respectivement à  $X_{\text{mes}}$  et à  $X_{\text{ref}}$ .

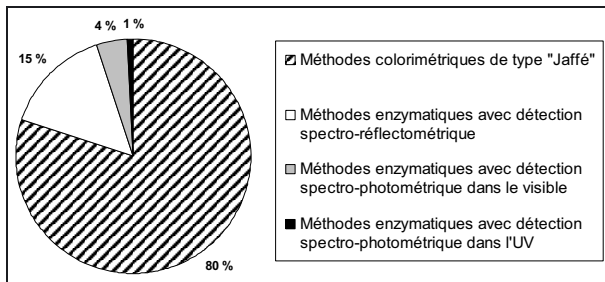


Fig. 3. – Répartition des méthodes de routine.

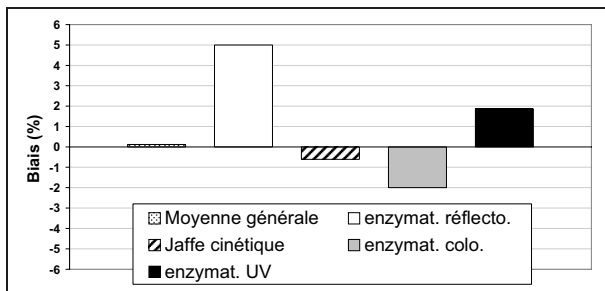


Fig. 4. – Résultats du CNQ 2009 (échantillon B11) par principe de méthode. L'écart relatif entre la valeur mesurée par les techniques de routine et la valeur de référence est porté en ordonnée du graphique.

une méthode enzymatique avec détection spectrorélectrométrique et moins de 5 % utilisent une méthode enzymatique avec détection spectrophotométrique (fig. 3).

Les méthodes colorimétriques de type Jaffe et les méthodes enzymatiques avec détection spectrophotométrique sont dans l'ensemble justes car le biais n'excède pas 2 % (fig. 4). La valeur consensuelle (moyenne des valeurs de routine après élimination des résultats aberrants) est de  $(332,40 \pm 29,25) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et la valeur de référence de  $(332,02 \pm 6,44) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (tab. 2). Dans l'ensemble, la justesse des méthodes de routine peut être considérée comme très satisfaisante car la valeur consensuelle est très proche de la valeur de référence (figs. 5 et 6).

Le tableau 3 présente les résultats des contrôles internes réalisés en analysant les matériaux de référence certifiés du NIST et du LGC comme échantillons de contrôle de la justesse.

## 5. Conclusion

Les résultats du contrôle national de qualité de 2009 indiquent qu'une seule méthode (colorimétrique) présente un défaut de justesse significatif (biais de  $-14,8\%$ ) et qu'une autre méthode (enzymatique avec détection spectrophotométrique dans le visible) est légèrement au dessus de la valeur limite (biais de  $-7,5\%$ ). Aucune méthode ne souffre d'un manque de reproductibilité significatif. A ces deux exceptions près, les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de dosage de la créatinine satisfont toutes les recommandations du NKDEP (*National Kidney Disease Education Program*) aux concentrations

élevées de créatinine. Ces recommandations internationales définissent les performances analytiques des méthodes de routine de manière à ce que l'incertitude de mesure sur la créatininémie n'impacte pas de plus de 10 % le résultat d'estimation du débit de filtration glomérulaire [16, 35]. Pour une concentration de créatinine comprise entre  $88,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $133 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , le biais par rapport à une méthode de référence doit être inférieur à 5 %, soit  $17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en extrapolant à une concentration de  $332 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Il faut souligner que les résultats obtenus avec une concentration élevée de créatinine ne sont pas directement extrapolables aux concentrations basses et moyennes. Les performances des méthodes de routine sont très satisfaisantes pour les concentrations élevées.

Dans l'ensemble, les méthodes enzymatiques avec détection spectrorélectrométrique ont tendance à surestimer légèrement la créatininémie (biais d'environ 5 %). Ce biais reste cependant très faible et ne compromet pas l'interprétation des résultats d'analyse et l'adaptation du traitement des patients. Dans l'ensemble, les méthodes colorimétriques de type Jaffe ont tendance à sous-estimer très légèrement la créatininémie aux concentrations élevées. Elles présentent un biais inférieur à 1 % en moyenne, ce qui n'est pas significatif, compte tenu de l'incertitude de la méthode de référence (elle-même de l'ordre de 1 %). Les méthodes enzymatiques avec détection spectrophotométrique (dans l'UV ou le visible) fournissent également des résultats justes et peu dispersés (biais inférieur à 2 %).

Néanmoins, les échantillons utilisés étant des pools de sérum, les chromogènes non créatinine (CNC) ont une valeur « moyenne » qui améliore le résultat apparent des Jaffe transposé à la pratique clinique. Ceci est dû à la variabilité inter-individuelle des CNC et la variabilité inter-technique de sensibilité aux CNC.

Par ailleurs, le fait que les échantillons se présentent sous forme de sérum lyophilisé dont la commutabilité n'a pas été évaluée laisse persister un doute concernant l'existence d'un effet de la matrice. Il faut donc garder présent à l'esprit que le biais observé peut non seulement provenir des performances des méthodes mais aussi d'un effet de la matrice susceptible de varier d'une méthode à l'autre. Une perspective de ces travaux sera de développer un matériau de référence certifié commutable qui permette de déterminer le biais sans générer d'effet de matrice.

Les résultats obtenus sont néanmoins très rassurants : la qualité des mesures de créatinine aux concentrations élevées (typiquement supérieures à  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) est très importante car ces concentrations sont caractéristiques des personnes atteintes d'insuffisance rénale avérée. Il est donc important de disposer de mesures fiables dans cette gamme de concentrations pour pouvoir adapter le plus finement possible le traitement des patients.

Lors du dernier contrôle de marché des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de dosage de la créatinine réalisé en 2009, l'AFSSAPS a recensé 60 réactifs différents commercialisés par 26 fabricants [9, 10]. Parmi

Tableau 2

Résultats du CNQ 2009 (échantillon B11). Le nombre d'utilisateurs indiqué correspond à celui obtenu après élimination des valeurs aberrantes. Le coefficient de variation (CV) est indiqué en %. L'incertitude élargie associée à la valeur consensuelle a été calculée en prenant deux fois l'écarttype alors que pour la valeur de référence, l'incertitude élargie a été calculée en incluant l'ensemble des sources d'incertitude (éléments de la méthode, reproductibilité, etc.). Le biais (en %) correspond à l'écart relatif entre la valeur de la créatininémie mesurée en routine par une méthode donnée et la valeur fournie par la méthode de référence. L'écart normalisé, lorsqu'il est supérieur à 2, indique que la valeur de routine est significativement différente de la valeur de référence.

	Nombre d'utilisateurs	Concentration en créatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	CV (%)	Ecart type	incertitude élargie ( $k = 2$ ) ( $\mu\text{mol/L}$ )	Biais (%)	Ecart normalisé
<b>Toutes méthodes confondues</b>							
Moyenne générale	2783	332,4	4,4	14,6	29,3	0,1	0,0
<b>Méthodes enzymatiques avec détection spectro-réflexométrique</b>							
Moyenne	414	348,6	3,8	13,2	26,5	5,0	1,3
Méthode 1	407	348,8	3,8	13,3	26,5	5,1	1,3
<b>Méthodes colorimétriques de type « Jaffé »</b>							
Moyenne	2242	330	4,2	13,9	27,7	-0,6	0,1
Méthode 1	18	324,2	7,4	24,0	48,0	-2,4	0,3
Méthode 2	174	333,9	2,4	8,0	16,0	0,6	0,2
Méthode 3	62	328,4	4,7	15,4	30,9	-1,1	0,2
Méthode 4	130	329,3	1,4	4,6	9,2	-0,8	0,6
Méthode 5	71	338,5	3,7	12,5	25,0	2,0	0,5
Méthode 6	391	319,6	3,8	12,1	24,3	-3,7	1,0
Méthode 7	115	282,8	4,3	12,2	24,3	-14,8	4,0
Méthode 8	115	332,9	3,7	12,3	24,6	0,3	0,1
Méthode 9	69	335,1	2,6	8,7	17,4	0,9	0,4
Méthode 10	22	318,8	6,4	20,4	40,8	-4,0	0,6
Méthode 11	214	335,2	2,4	8,0	16,1	1,0	0,4
Méthode 12	80	323	5	16,2	32,3	-2,7	0,6
Méthode 13	48	324,4	2,8	9,1	18,2	-2,3	0,8
Méthode 14	286	343,4	2	6,9	13,7	3,4	1,7
Méthode 15	118	335,8	4,7	15,8	31,6	1,1	0,2
Méthode 16	181	315,9	4,8	15,2	30,3	-4,9	1,1
Méthode 17	38	320,9	3,4	10,9	21,8	-3,3	1,0
Méthode 18	70	320	4	12,8	25,6	-2,7	0,9
Méthode 19	107	336,6	2,2	7,4	14,8	1,4	0,6
<b>Méthodes enzymatiques avec détection spectrophotométrique dans le visible</b>							
Moyenne	115	325,4	4,2	13,7	27,3	-2,0	0,5
Méthode 1	30	324,6	4,6	14,9	29,9	-2,2	0,5
Méthode 2	17	307,2	5,1	15,7	31,3	-7,5	1,6
Méthode 3	14	335,1	3,3	11,1	22,1	0,9	0,3
Méthode 4	38	326,5	3,1	10,1	20,2	-1,7	0,5
<b>Méthodes enzymatiques avec détection spectrophotométrique dans l'UV</b>							
Moyenne	27	338,2	2,6	8,8	17,6	1,9	0,7
Méthode 1	28	338,2	2,6	8,8	17,6	1,9	0,7
<b>IDMS</b>							
IDMS	/	332,0	/	/	6,4	/	/

Tableau 3

Contrôles internes de la justesse de la méthode de référence avec des matériaux de référence certifiés.

	LNE		Valeurs certifiées (NIST / LGC)		Écart normalisé
	Valeur mesurée ( $\mu\text{mol/L}$ )	Incetitude élargie ( $k = 2$ ) ( $\mu\text{mol/L}$ )	Valeur certifiée ( $\mu\text{mol/L}$ )	Incetitude élargie ( $k = 2$ ) ( $\mu\text{mol/L}$ )	
ERM-DA 252a	27,56	0,30	27,50	4,30	0,04
ERM-DA 253a	453,46	5,86	449,00	16,00	1,10
NIST 967 Level 2	345,71	3,31	346,20	7,30	0,19



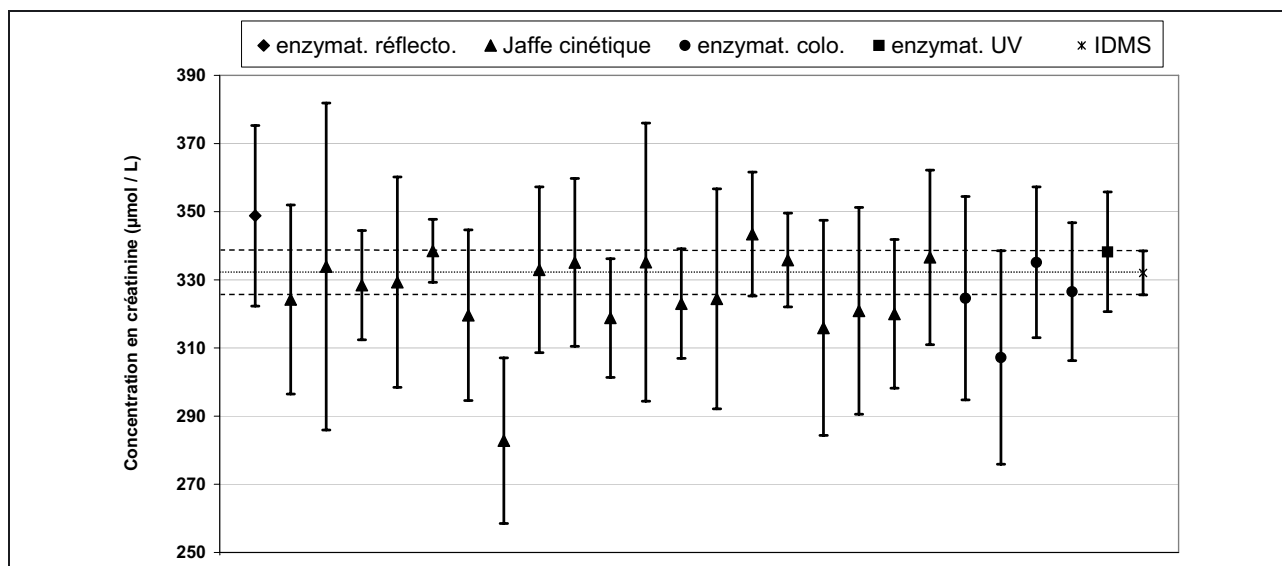


Fig. 5. – Résultats du CNQ 2009 (échantillon B11) par couple automate / réactif. De gauche à droite les résultats obtenus avec les méthodes enzymatiques avec détection spectrorélectométrique sont représentés par le losange, les méthodes colorimétriques de type Jaffe par les triangles, les méthodes enzymatiques avec détection photométrique dans le visible par les cercles pleins, les méthodes enzymatiques avec détection photométrique dans l'UV par le carré plein, et la méthode de référence (IDMS) par la croix.

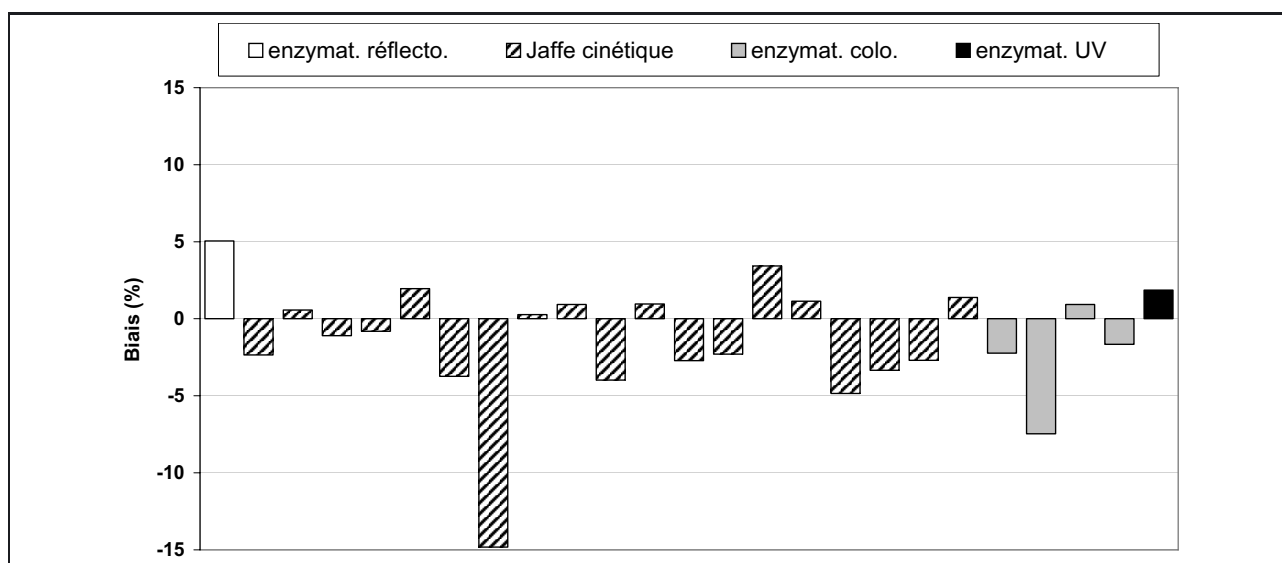


Fig. 6. – Résultats du CNQ 2009 (échantillon B11) par couple automate / fournisseur du réactif. L'écart entre la valeur mesurée par les méthodes de routine et la valeur de référence est porté en ordonnée du graphique.

les 49 kits dont le procédé d'étalonnage était spécifié dans la notice, la moitié (25) reposent sur un étalonnage en un seul point dont la concentration est généralement comprise entre  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et 10 kits sur 49 reposent sur un étalonnage en deux points dont un ayant une concentration supérieure à  $330 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Par conséquent, la justesse des valeurs associées aux solutions d'étalonnage aux concentrations élevées a un impact direct sur la justesse des mesures de routine sur toute la gamme de concentrations et notamment pour les concentrations basses, qui permettent de différencier l'insuffisance rénale débutante de la normalité (entre  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  environ). Il est donc nécessaire de

pouvoir démontrer la justesse des méthodes utilisées par les fabricants de produits de diagnostic *in vitro* pour attribuer les valeurs aux solutions d'étalonnage. Dans ce contexte, l'assignation de valeurs de référence aux matériaux d'étalonnage constitue une application de choix à la méthode de référence développée par le LNE.

## Références

- [1] Diagnostic de l'insuffisance rénale chez l'adulte : recommandation pour la pratique clinique, Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Aneas), 2002. <http://www.has-sante.fr/>

- [2] LEVEY A.S. *et al.*, "Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease : Improving Global Outcomes (KDIGO)", *Kidney Int.*, **67**, 2005, 2089-100.
- [3] CORESH J. *et al.*, "Prevalence of chronic kidney disease in the United States", *JAMA*, **298**, 17, 2007, 2038-47.
- [4] Rapport REIN 2008 – Prévalence 2008, Agence de la Biomédecine, Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie, *Nephrol. Ther.*, **6**, 2010, S67-S96.
- [5] LOOS-AYAV C. *et al.*, "Incidence of chronic kidney disease in general population", EPIRAN study, *Nephrol. Ther.*, **5**, Suppl. 4, 2009, S250-5.
- [6] JUNGERS P. *et al.*, « Bénéfices d'une prise en charge néphrologique précoce de l'insuffisance rénale chronique », *Presse Méd.*, **26**, 28, 1997, 1325-9.
- [7] STENGEL B. *et al.*, « Programme National de recherché sur les maladies du rein et des voies urinaires », *Nephrol. Ther.*, **3**, 2007, 157-62.
- [8] DELANGHE J., "Standardization of creatinine determination and its consequences for the clinician", *Acta Clin. Belg.*, **57**, 2002, 172-5.
- [9] « Rapport de contrôle de marché des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage de la créatinine : état des lieux, notices et traçabilité », Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). [http://www.afssaps.fr/var/afssaps\\_site/storage/original/application/e8d6968887948105b6a7eafbb55bd12f.pdf](http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/e8d6968887948105b6a7eafbb55bd12f.pdf)
- [10] « Recommandations relatives au dosage de la créatinine (Contrôle de marché 2008-2010) », Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), [http://www.afssaps.fr/var/afssaps\\_site/storage/original/application/e12ecef10cbaadd6c1ff9ada06eda0a.pdf](http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/e12ecef10cbaadd6c1ff9ada06eda0a.pdf)
- [11] SERONIE-VIVIEN S. *et al.*, "Consequences for clinical biochemists of the modifications of the creatinine-based evaluation of glomerular filtration rate between 2005 and 2008", *Ann. Biol. Clin.*, **66**, 3, 2008, 263-8.
- [12] MILLER W.G., "Estimating glomerular filtration rate", *Clin. Chem. Lab. Med.*, **47**, 9, 2009, 1017-9.
- [13] STEVENS L.A., CORESH J., GREENE T. et LEVEY A.S., "Assessing kidney function – measured and estimated glomerular filtration rate", *N. Engl. J. Med.*, **354**, 2006, 2473-83.
- [14] « Dépenses de biologie du régime général de la sécurité sociale en France métropolitaine », <http://www.ameli.fr/>
- [15] LAWSON N. *et al.*, "Creatinine assays : time for action ?", *Ann. Clin. Biochem.*, **39**, 2002, 599-602.
- [16] MYERS G.L. *et al.*, "Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement: A Report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program", *Clin. Chem.*, **52**, 2006, 5-18.
- [17] SERONIE-VIVIEN S. *et al.*, « SFBC "Créatinine" de la section "Assurance qualité". Dosage de la créatininémie en 2003 : état des lieux analytiques et essai de standardisation de l'étalonnage », *Ann. Biol. Clin.*, (Paris), **62**, 2004, 165-75.
- [18] STÖCKL D. et REINAUER H., "Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method setup", *Clin. Chem.*, **39**, 6, 1993, 993-1000.
- [19] PANTEGHINI M., MYERS G.L., MILLER W.G. et GREENBERG N., "The importance of metrological traceability on the validity of creatinine measurement as an index of renal function", *Clin. Chem. Lab. Med.*, **44**, 10, 2006, 1287-92.
- [20] MILLER W.G. *et al.*, "Creatinine measurement : state of the art in accuracy and interlaboratory harmonization", *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **129**, 3, 2005, 297-304.
- [21] PANTEGHINI M., "Enzymatic assays for creatinine : time for action", *Clin. Chem. Lab. Med.*, **46**, 4, 2008, 567-72.
- [22] SÉRONIE-VIVIEN S. *et al.*, "Impact of standardized calibration on the inter-assay variation of 14 automated assays for the measurement of creatinine in human serum", *Clin. Chem. Lab. Med.*, **43**, 11, 2005, 1227-33.
- [23] HANSER A.M. *et al.*, « Comparaison des méthodes de dosage de la créatinine sérique », *Ann. Biol. Clin.*, **59**, 2001, 737-42.
- [24] CAROBENE A. *et al.*, "Creatinine measurement proficiency testing : assignment of matrix-adjusted ID GC-MS target values", *Clin. Chem.*, **43**, 1997, 1342-7.
- [25] « Évaluation de la fonction rénale et de la protéinurie pour le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte. Recommandations pour la pratique clinique », Groupe de travail de la Société de Néphrologie., *Nephrol. Ther.*, **5**, 2009, 302-5.
- [26] [www.bipm.org/jctlm/](http://www.bipm.org/jctlm/)
- [27] SIEKMANN L., "Determination of creatinine in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. Definitive methods in clinical chemistry", IV., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **23**, 3, 1985, 137-44.
- [28] WELCH M.J. *et al.*, "5th. Determination of serum creatinine by isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method", *Anal. Chem.*, **58**, 8, 1986, 1681-5.
- [29] DODDER N.G. *et al.*, "Certification of creatinine in a human serum reference material by GC-MS and LC-MS", *Clin. Chem.*, **53**, 9, 2007, 1694-9.
- [30] THIENPONT L.M., LEENHEER A.P., STÖCKL D. et REINAUER H., "Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. II. Method transfer.", *Clin. Chem.*, **39**, 6, 1993, 1001-1006.
- [31] THIENPONT L.M. *et al.*, "Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: a five years' experience of two European Reference Laboratories", *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **34**, 10, 1996, 853-60.

[32] THIENPONT L.M. *et al.*, “Candidate reference method for determining serum creatinine by isocratic HPLC: validation with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry and application for accuracy assessment of routine test kits”, *Clin. Chem.*, **41**, 7, 1995, 995-1003.

---

Article reçu le 28 octobre 2010, version révisée reçue le 26 juillet 2011.

[33] STOKES P. et O’CONNOR G., “Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum”, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **794**, 1, 2003, 125-136.

[34] WELCH M.J. *et al.*, “CCQM–K12: The determination of creatinine in serum”, *Metrologia*, **40**, 2003 08005.

[35] [http://www.nkdep.nih.gov/labprofessionals/cs\\_recommendations.htm](http://www.nkdep.nih.gov/labprofessionals/cs_recommendations.htm)