
BC

biochimica clinica

In questo numero:

**AGGIORNAMENTI DI MEDICINA DI LABORATORIO
NELLE PATOLOGIE RENALI**

Guest Editors: Michele Mussap, Davide Giavarina



*SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di*

*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)*



sommario

SS1

EDITORIALE

S5

Diagnosi, monitoraggio e prevenzione delle patologie renali
M. Mussap, D. Giavarina, MS. Graziani

RASSEGNE

S8

I biomarcatori di danno renale acuto
S. Samoni, S. De Rosa, C. Ronco

S18

Current trends and future directions of liquid biopsy in renal cell carcinoma
E. La Civita, A. Liotti, M. Cennamo, L. Conte, E. Grassia, D. Terracciano

S25

Amiloidosi renali
M. Basset, M. Nuvolone, G. Palladini

S37

Rene policistico: dall'ereditarietà complessa alla terapia
C. Caprara, V. Corradi, A. Curioni, O. Pegoraro, A. Giuliani, F. Gastaldon, C. Ronco

S48

Malattia renale nel diabete: oltre la nefropatia diabetica
D. Ceccarelli Ceccarelli, R. Paleari, R. Tarenzi, A. Mosca, B. Solerte

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

S60

Valutazione critica e meta-analisi delle stime di variabilità biologica degli analiti relativi alle patologie renali
N. Jonker, B. Aslan, B. Boned, F. Marqués-García, C. Ricós, V. Alvarez, W. Bartlett, F. Braga, A. Carobene, A. Coskun, J. Diaz-Garzón, P. Fernández-Calle, E. Gonzalez-Lao, J. Minchinela, C. Perich, M. Simón, S. Sandberg, AK. Aarsand, on behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Biological Variation and Task Group for the Biological Variation Database

S71

Potenziale ruolo dell'Human Epididymis Protein 4 come biomarcatore nella nefropatia mesangiale a depositi di IgA
A. Schirinzi, G. Fontò, F. Pesce, A. Calamita, R. Contino, L. Gesualdo, F. Di Serio

S76

Stato dell'arte dei biomarcatori di malattia renale osservato mediante i Programmi di VEQ del Centro di Ricerca Biomedica
S. Secchiero, L. Sciacovelli, M. Plebani

OPINIONI

S90

Valutazione della filtrazione glomerulare: riflessione sull'impiego clinico
G. Gambaro

LETTERE ALL'EDITORE

S97

Proteinuria nel COVID-19: l'importanza di un esame consolidato in una patologia complessa
P. Natali, T. Trenti

S100

Una nuova equazione dell'European Kidney Function Consortium per la stima della filtrazione glomerulare: implicazioni cliniche delle scelte del laboratorio
D. Giavarina, F. Husain-Syed, C. Ronco

sommario

CASI CLINICI

S104

Utilizzo della differenza critica per una corretta interpretazione dei valori di creatinina sierica
A. Carobene, M. Vidali

S107

Remissione di iperparatiroidismo secondario dopo nefrectomia in un paziente emodializzato: ruolo di Etelcalcetide
S. Aterini, F. Calderini, M. Gallo, S. Bandini, S. Nigrelli, D. Sacchi, F. Guzzi, L. Aterini, F. Balboni

SAVE THE DATE

53^o Congresso Nazionale SIBioC-Medicina di Laboratorio

LA MEDICINA DI LABORATORIO
NELLA MEDICINA DI PROSSIMITÀ:
telemedicina, ruoli e competenze

11-13 OTTOBRE 2021
VIRTUAL EDITION

un evento
organizzato da



BIOMEDIA
La condivisione del sapere

<https://sibioc.congressonazionale.com>

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

Rivista della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio

membro di

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

*Biochimica Clinica è indicizzata in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) e ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)*
*Biochimica Clinica is indexed in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) and ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)*

Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

Deputy Director

Martina Zaninotto

Associate Editors

Ferruccio Ceriotti
Davide Giavarina
Bruna Lo Sasso
Giampaolo Merlini
Martina Montagnana
Andrea Mosca
Paola Pezzati
Rossella Tomaiuolo
Matteo Vidali

International Advisory Board

Khosrow Adeli *Canada*
Sergio Bernardini *Italy*
Marcello Ciaccio *Italy*
Eleftherios Diamandis *Canada*
Philippe Gillery *France*
Kjell Grankvist *Sweden*
Hans Jacobs *The Netherlands*
Eric Kilpatrick *UK*
Magdalena Krintus *Poland*
Giuseppe Lippi *Italy*
Mario Plebani *Italy*
Sverre Sandberg *Norway*
Ana-Maria Simundic *Croatia*
Tommaso Trenti *Italy*
Cas Weykamp *The Netherlands*
Maria Willrich *USA*
Paul Yip *Canada*

Editorial Secretary

Biomedica Editore
biochimica.clinica@sibioc.it
Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
Tel. 0245498282
Fax 0245498199
www.bc.sibioc.it

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
www.biomedica.net

SIBioC Executive Board 2020-2021

Fiamma Balboni
Umberto Basile
Sergio Bernardini *Past President*
Ciriaco Carru
Giorgio Da Rin
Giuseppe Lippi
Martina Montagnana
Gavino Napolitano
Enza Pavanello
Laura Sciacovelli *Presidente*
Tommaso Trenti

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282



utilizza un Sistema di
Gestione Qualità Certificato
per l'attività di

Fornitura di
servizi per la progettazione,
realizzazione e distribuzione di prodotti editoriali

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

Abbonamento annuo
Euro 50 per Italia/Privati
Euro 75 per Italia/Enti
Euro 75 per Estero/Privati
Euro 90 per Estero/Enti

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

Spedizione in abbonamento postale
D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004
n. 46) art. 1, comma 1, LO/MI

Associato all'USPI

Unione Stampa
Periodica Italiana
Tiratura di questo
numero 2000 copie
2000 copies of this
issue have been printed
ISSN 0393-0564
e-ISSN 0392-7091



L'utilizzo degli estratti dei lavori pubblicati è
consentito esclusivamente per uso personale
e non può essere in alcun modo esteso ad
altri impieghi (commerciali, pubblicitari, ecc).
La SIBioC - Medicina di Laboratorio si riserva
di perseguire eventuali utilizzi impropri.

Volume 45
Special Supplement 1

Diagnosi, monitoraggio e prevenzione delle patologie renali

Michele Mussap¹, Davide Giavarina², Maria Stella Graziani³

¹Medicina di Laboratorio, Unità di laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche - Università di Cagliari

²Laboratorio Analisi, AULSS n. 8 Berica, Vicenza

³Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona, Verona

Le patologie renali interessano un numero sempre più grande di persone in tutto il mondo; complessivamente, circa 850 milioni di persone, pari a circa un individuo ogni nove, sono affette da malattia renale cronica (CKD, Chronic Kidney Disease), danno renale acuto (AKI, Acute Kidney Injury) e malattia renale terminale (ESKD, End Stage Kidney Disease) o in terapia sostitutiva (emodialisi, dialisi peritoneale o trapianto d'organo) (1). La prevalenza delle malattie renali è approssimativamente il doppio della malattia diabetica e circa 20 volte quella dell'infezione da HIV. Dal 2005 al 2015, il tasso di mortalità della malattia renale è aumentato del 32% (2). In Italia, la prevalenza della sola malattia renale cronica è circa il 7,5% della popolazione maschile e il 6,5% di quella femminile in un intervallo di età compreso tra i 35 e i 79 anni (3). Questi dati sono destinati ad aumentare drammaticamente nei prossimi 20 anni: secondo una recente previsione a medio termine, la malattia renale cronica è destinata a diventare la quinta causa di morte in tutto il mondo entro il 2040 sia per l'aumentare delle condizioni socio-economiche svantaggiate in molte popolazioni, che per il progressivo aumento di patologie come la malattia diabetica e l'ipertensione arteriosa (4). La storia naturale della malattia è un declino progressivo della velocità di filtrazione glomerulare (GFR), considerata universalmente come l'indice più comune di funzionalità renale.

Di grande rilevanza poi è il danno renale acuto: sebbene siano presenti ampie variazioni tra le varie aree geografiche, i dati di prevalenza nelle terapie intensive si aggirano intorno al 19-25% in Europa, Nord-America, Cina, Russia, Africa centrale e Australia e intorno al 31% in Sud-America e Sud-Est Asiatico (5). Il danno renale acuto interessa circa il 10-15% dei pazienti ospedalizzati (e circa il 50% dei pazienti delle unità di terapia intensiva) con un tasso elevato di mortalità (6).

La diagnosi precoce è strategica sia nella malattia acuta che in quella cronica. Nel primo caso consente un intervento terapeutico tempestivo evitando danni acuti all'organo e complicanze emodinamiche che spesso richiedono terapie intensive e possono residuare in danni permanenti a lungo termine. Nel caso della malattia cronica, la diagnosi precoce consente di rallentare l'evoluzione della malattia e delle sue complicanze, soprattutto quelle cardiovascolari, evitando o ritardando quanto più possibile l'uremia e la necessità di terapie sostitutive (7).

Poiché il danno renale è clinicamente silente nelle fasi precoci, il Laboratorio Clinico assume un ruolo fondamentale, fornendo elementi indispensabili nei diversi scenari clinici, che vanno dallo screening alla diagnosi, alla prognosi, al monitoraggio della terapia.

Esistono poi altri aspetti delle malattie renali nelle quali il laboratorio riveste un ruolo chiave; tra queste possiamo ricordare, il rene policistico, il mieloma, le neoplasie renali.

Biochimica Clinica ha pertanto deciso di dedicare un numero monografico alle malattie renali, mettendo a disposizione dei suoi lettori una serie di contributi aggiornati su questo argomento.

Il volume si apre con una serie di rassegne (8-12) preparate da rinomati ricercatori italiani che coprono rilevanti aspetti di queste patologie, fornendo ai lettori un panorama ampio e aggiornato sul versante sia clinico che laboratoristico.

La rassegna di Samoni et al. (8) è un contributo della Scuola di Claudio Ronco (Vicenza) e collaboratori che descrive in modo chiaro ed esaustivo il ruolo dei biomarcatori nella diagnosi e nella classificazione del danno renale acuto (AKI). Il lavoro presenta una istruttiva sintesi della evoluzione dei criteri per la diagnosi e la stadiazione di AKI nonché una dettagliata descrizione dei diversi biomarcatori oggi disponibili elencando le loro caratteristiche e il rispettivo ruolo nella pratica clinica fornendo in questo modo al lettore una panoramica sull'argomento utile ad orientarsi in un campo in rapida evoluzione.

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona, Verona, E-mail mariastella@graziani.eu

Ricevuto: 23.07.2021

Accettato: 26.07.2021

Publicato on-line: 03.08.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.060

La seconda rassegna di La Civita et al. (9) descrive il ruolo della biopsia liquida e dei biomarcatori in questo modo misurabili (DNA, acidi nucleici circolanti, cellule neoplastiche e immunitarie) nella gestione dei pazienti con carcinoma a cellule renali (specialmente nella variante a cellule chiare). Il trattamento di questa neoplasia altamente aggressiva può giovare della biopsia liquida per l'identificazione sia del farmaco più adatto sia per il monitoraggio della risposta alla terapia. La biopsia liquida si conferma come un mezzo a più basso costo e a minor rischio per il paziente rispetto alla biopsia tessutale anche per la gestione di questa neoplasia

È noto da tempo come il rene sia un organo bersaglio per la deposizione dei depositi di amiloide. La rassegna di Basset et al. (10) illustra chiaramente l'importanza del ruolo del laboratorio nei diversi scenari clinici nelle amiloidosi renali. Nella diagnosi, l'elettroforesi delle proteine sieriche e urinarie, l'immunofissazione e la misura delle catene leggere libere sono necessarie per la identificazione della proteina monoclonale; nella valutazione del rischio renale, la stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) e la proteinuria; nel monitoraggio della efficacia della terapia, di nuovo la misura delle catene leggere libere, e della proteinuria e la eGFR. Senza la disponibilità di questi esami di laboratorio, la gestione di questi pazienti sarebbe estremamente difficile.

Il rene policistico è il tema della rassegna di Caprara et al. (11). Gli Autori esaminano la letteratura disponibile illustrando la complessità genetica e i recenti approfondimenti sulla correlazione genotipo-fenotipo di questa malattia. La disponibilità di queste nuove informazioni richiederà un approccio multidisciplinare che coinvolga biologi molecolari, genetisti e nefrologi, nell'ottica della applicazione sul campo della medicina di precisione.

L'ultima rassegna inclusa nel volume tratta il tema del possibile danno renale nella malattia diabetica. Ceccarelli Ceccarelli et al., nel loro interessante contributo (12), puntualizzano la differenza tra la nefropatia causata dal diabete (nefropatia diabetica) e il coinvolgimento renale nel diabete non causato direttamente dalla malattia diabetica (malattia renale non-diabetica). In entrambi i casi, il ruolo del laboratorio è fondamentale; i biomarcatori renali (albuminuria e GFR) e quelli relativi al controllo glicemico (emoglobina e albumina gliccate) restano fondamentali per la diagnosi e il monitoraggio. La rassegna poi prende in esame il potenziale utilizzo di nuovi biomarcatori elencandone le caratteristiche.

Nel complesso, queste rassegne coprono una varietà ampia di malattie renali e costituiscono una fonte rilevante di informazioni aggiornate per i lettori che volessero approfondire alcune tematiche specifiche.

La sezione contributi originali contiene tre articoli. La traduzione italiana, a cura di Anna Carobene, del lavoro di Jonker et al. (13) a nome del Gruppo di Studio di EFLM, riporta dati aggiornati e affidabili di variabilità biologica di molti analiti utilizzati nelle malattie renali. Questi dati costituiscono uno strumento utile per l'utilizzo ottimale di questi parametri sia relativamente alla definizione delle loro caratteristiche analitiche che relativamente alla interpretazione dei risultati. Schirinzi et al. (14) riportano una esperienza nell'utilizzo dell'Human Epididymis Protein 4 nei pazienti con nefropatia ad IgA; la relazione positiva tra la concentrazione del biomarcatore con il grado di fibrosi interstiziale suggerisce un potenziale ruolo del parametro in questa specifica nefropatia. Chiude la sezione l'articolo di Secchiero et al. (15) del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio di Padova che riportando i dati degli esercizi di VEQ degli ultimi anni, indica come nonostante si siano osservati indubbi miglioramenti, importanti sforzi siano da adottare per allineare le caratteristiche analitiche (e di referenziazione) di questi parametri alle raccomandazioni internazionali. La considerazione finale da tenere sempre presente è che la partecipazione ai programmi di VEQ è lo strumento da adottare per la necessaria armonizzazione della determinazione di questi (e di altri) analiti.

Abbiamo poi una interessante Opinione di Gambaro G. sull'utilizzo clinico della valutazione della filtrazione glomerulare (16). L'Autore esamina l'uso in clinica delle stime della GFR ottenute con le diverse formule disponibili, tenendo conto delle limitazioni in specifiche condizioni (diverse etnie, diversi pazienti, diverse età e sesso) nonché delle note problematiche derivate dall'uso della misura della creatinina plasmatica come indice di GFR. Come considerazione finale, l'Autore annota che in certe specifiche situazioni (ad esempio per il dosaggio dei farmaci a stretto margine terapeutico) sia consigliabile la misura della GFR anziché la sua stima. I laboratori clinici dovrebbero essere in grado di fornire questa misura. Sebbene possa sembrare eccessiva la ricerca di nuove equazioni per la stima della filtrazione glomerulare, occorre considerare che lo sforzo dei ricercatori, dei laboratoristi e dei clinici è volto a migliorare l'accuratezza di questa stima, armonizzando una serie di variabili che influiscono sul risultato finale, come la creatinina, per la quale esistono metodi enzimatici riferibili, etnia, età, genere, parametri antropometrici.

Seguono poi tre Lettere all'Editore contenenti spunti di riflessione su tre importanti tematiche. La Lettera di Natali et al. esamina la presenza di danno renale acuto nei pazienti COVID (17), evento non infrequente nei pazienti con malattia grave. La semplice misura della proteinuria può costituire un indicatore prognostico importante per la corretta gestione dell'instaurarsi di un danno renale. La Lettera di Giavarina et al. riporta sulla recente disponibilità di una nuova formula (EKFC) per la eGFR (18). Pur essendo necessari ulteriori approfondimenti e necessarie cautele, l'adozione della nuova formula potrebbe comportare miglioramenti nella esattezza della stima della GFR.

La terza lettera, di Carobene et al. riflette sull'utilità dell'uso della differenza critica per ottenere una corretta interpretazione dei valori della creatinina plasmatica (19). Per gli analiti con una marcata individualità (come la creatinina), l'uso della differenza critica costituisce un supporto di estremo valore per l'interpretazione di valori successivi di uno stesso paziente anche quando questi si collochino all'interno dell'intervallo di riferimento.

Ne deriva che ogni laboratorio dovrebbe introdurre nella refertazione della creatinina la differenza critica.

Chiude il fascicolo un Caso Clinico a cura di Aterini et al. che riporta un interessante (e complicato) caso di iperparatiroidismo secondario in un paziente dializzato (20) e illustra il ruolo del laboratorio nella misura dell'ormone paratiroideo nel conseguente trattamento.

Siamo fiduciosi che la lettura di questo numero monografico possa essere di interesse per i lettori di *Biochimica Clinica*. Ci auguriamo che la rilevanza dei contributi della monografia e la diversa tipologia degli argomenti trattati possa essere di aiuto da un lato alla comprensione dei meccanismi delle diverse malattie che coinvolgono questo organo e dall'altro a migliorare gli aspetti di laboratorio connessi.

Come i nostri lettori avranno modo di apprezzare, questo volume monografico ha visto la partecipazione di Clinici di riferimento di rilevanza nazionale. Il coinvolgimento dei Clinici dovrebbe essere di stimolo per approfondire una collaborazione assolutamente necessaria (non solo in questo specifico campo) e ampliare la platea per dare spazio a lavori a più voci sui temi sempre più attuali della diagnostica integrata; siamo pertanto orgogliosi di aver intrapreso questa strada, per un migliore servizio al paziente.

Con questi auspici, auguriamo a tutti buona lettura.

BIBLIOGRAFIA

1. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, et al. A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney Int* 2019;96:1048-50.
2. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;388(10053):1459-544.
3. Marino C, Ferraro PM, Bargagli M, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the Lazio region, Italy: a classification algorithm based on health information systems. *BMC Nephrol* 2020;21-3.
4. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018;392(10159):2052-90.
5. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:607-25.
6. Santos RPD, Carvalho ARS, Peres LAB, et al. An epidemiologic overview of acute kidney injury in intensive care units. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2019;65:1094-101.
7. Shlipak MG, Tummalaipalli SL, Boulware LE, et al. The case for early identification and intervention of chronic kidney disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2021;99:34-47.
8. Samoni S, De Rosa S, Ronco C. I biomarcatori di danno renale acuto. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S8-S17.
9. La Civita E, Liotti A, Cennamo M, et al. Current trends and future directions of liquid biopsy in renal cell carcinoma. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S18-S24.
10. Basset M, Nuvolone M, Palladini G. Amiloidosi renali. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S25-S36.
11. Caprara C, Corradi V, Curioni A, et al. Rene policistico: dall'ereditarietà complessa alla terapia. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S37-S47.
12. Ceccarelli Ceccarelli D, Paleari R, Tarenzi R, et al. Malattia renale nel diabete: oltre la nefropatia diabetica. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S48-S59.
13. Jonker N, Aslan B, Boned B, et al. Critical appraisal and meta-analysis of biological variation estimates for kidney related analytes. Traduzione italiana a cura di Carobne A. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S60-S70.
14. Schirinzi A, Fontò G, Pesce F, et al. Potenziale ruolo dell'Human Epididymis Protein 4 come biomarcatore nella nefropatia mesangiale a depositi di IgA. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S71-S75.
15. Secchiero S, Sciacovelli L, Plebani M. Stato dell'arte dei biomarcatori di malattia renale osservato mediante i Programmi di VEQ del Centro di Ricerca Biomedica. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S76-S89.
16. Gambaro G. Valutazione della filtrazione glomerulare: riflessione sull'impiego clinico. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S90-S96.
17. Natali P, Trenti T. Proteinuria nel COVID-19: l'importanza di un esame consolidato in una patologia complessa. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S97-S99.
18. Giavarina D, Husain-Syed F, Ronco C. Una nuova equazione dell'European Kidney Function Consortium per la stima della filtrazione glomerulare: implicazioni cliniche delle scelte del laboratorio. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S100-S103.
19. Carobene A, Vidali M. Utilizzo della differenza critica per una corretta interpretazione dei valori di creatinina sierica. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S104-S106.
20. Aterini S, Calderini F, Marco Gallo M, et al. Remissione di iperparatiroidismo secondario dopo nefrectomia in un paziente emodializzato: ruolo di Etelcalcetide. *Biochim Clin* 2021;45 Suppl 1:S107-S110.

I biomarcatori di danno renale acuto

Sara Samoni¹, Silvia De Rosa², Claudio Ronco^{3,4}

¹Dipartimento di Nefrologia e Dialisi, ASST Lariana, Ospedale S. Anna, Como

²Dipartimento di Anestesia e Rianimazione, Ospedale San Bortolo, Vicenza

³International Renal Research Institute Vicenza (IRRV), Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale San Bortolo, Vicenza

⁴Dipartimento di Medicina (DIMED), Università di Padova, Padova

ABSTRACT

Biomarkers of acute kidney injury.

The diagnosis and follow-up of acute kidney injury (AKI) has traditionally been based on clinical parameters such as urine output, and/or biomarkers such as serum creatinine (sCr), which are not very sensitive. The identification and validation of novel biomarkers, capable of recognizing an increased risk of AKI, a renal damage before or without a functional renal loss (i.e. subclinical AKI) and a renal dysfunction prior to the increase in sCr levels, has reviewed the diagnosis and classification of AKI. Thanks to these biomarkers, a new conceptual model of AKI, that includes the full spectrum of events and conditions, has been developed. At each stage of this model, biomarkers may contribute to explain the mechanisms and to predict the clinical evolution of kidney damage. Several biomarkers have been identified. They differ in anatomical origin, physiological function, kinetics and detecting time after kidney injury. The present review describes the main biomarkers' characteristics and their role in the clinical practice.

Parole chiave: creatinina sierica, danno renale, biomarcatori

INTRODUZIONE

Il danno renale acuto (AKI, acute kidney injury) è una sindrome da disfunzione multiorganica caratterizzata da una riduzione improvvisa ma reversibile della funzione renale e del filtrato glomerulare (GFR, glomerular filtration rate) e si manifesta tradizionalmente con l'incremento della creatininemia (sCr, serum creatinine), dell'azotemia e/o con la riduzione della diuresi. La sua incidenza è in aumento, soprattutto nei pazienti ospedalizzati e ancor più nei pazienti critici ricoverati in terapia intensiva (ICU, intensive care unit). Infatti, la malattia critica, insieme all'età avanzata e ad altre comorbidità, tra cui la malattia renale cronica (CKD, chronic kidney disease), aumenta la suscettibilità renale all'esposizione a tossici e all'ipoperfusione, determinando un'aumentata incidenza di AKI in questi pazienti (1). Allo stesso tempo, l'AKI è un importante fattore di rischio di CKD e di progressione verso l'insufficienza renale cronica terminale (ESRD, End-Stage Renal Disease) (2,3). Anche per questo, la prevenzione dell'AKI e il suo trattamento precoce, finalizzato alla reversibilità del

danno d'organo, è uno dei principali obiettivi della ricerca clinica in questo ambito. Purtroppo, ad oggi la definizione, e quindi la diagnosi, di AKI si basa sul criterio clinico della diuresi e sulla variazione della sCr, parametro tutt'altro che precoce (4). Tuttavia, oggi una diagnosi precoce di AKI è possibile in diverse situazioni cliniche grazie all'impiego dei più recenti biomarcatori di danno renale i cui livelli variano prima che aumenti la sCr e anche prima che sia evidente una perdita funzionale renale, cioè allo stadio di AKI subclinica (5,6). In altre parole, con l'introduzione dei recenti biomarcatori di danno renale, l'AKI (precedentemente basata unicamente sulla riduzione acuta della funzionalità renale, "disfunzione renale") è stata ulteriormente arricchita da informazioni sul danno d'organo precoce e concomitante ("danno renale") e sulla sua risoluzione, permettendo una più puntuale descrizione del *continuum* che va da un rene normale sino alla risoluzione del quadro clinico o alla morte irreversibile dell'organo. In ciascuna di queste fasi, i biomarcatori possono contribuire a chiarire i possibili meccanismi di danno e a predire l'evoluzione clinica del danno renale (Figura 1).

Corrispondenza a: Sara Samoni, Dipartimento di Nefrologia e Dialisi, ASST Lariana, Ospedale S. Anna, via Ravona 20, 22020 San Fermo della Battaglia (CO), Italia, Telefono +39 031 5859516, E-mail sarasamoni1@gmail.com

Ricevuto: 29.12.2020

Revisionato: 25.01.2021

Accettato: 18.02.2021

Pubblicato on-line: 29.03.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.011

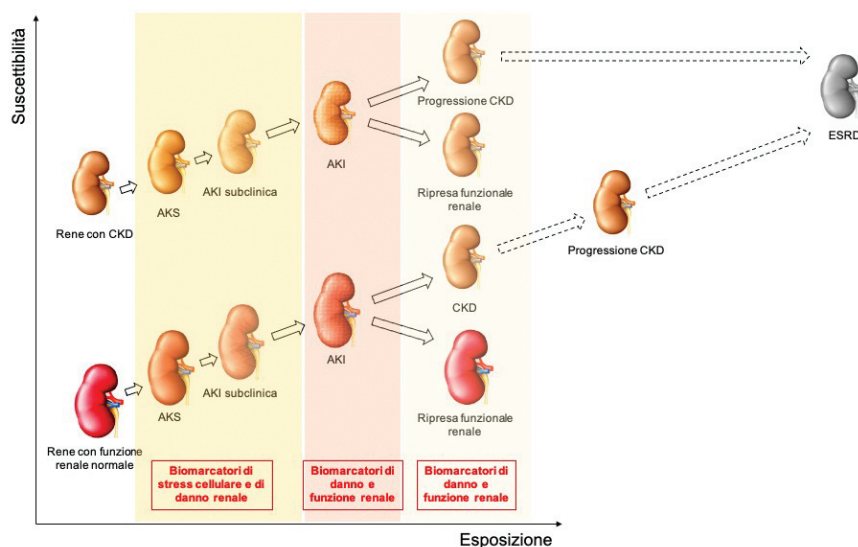


Figura 1

Continuum del danno renale acuto. Possibili stadi dell'AKI a partire da un rene sano o da un rene precedentemente compromesso, sino alla risoluzione del quadro clinico o alla morte irreversibile dell'organo. La malattia renale cronica aumenta la suscettibilità renale all'esposizione a tossici e all'ipoperfusione, determinando un'umentata incidenza di AKI in questi pazienti. In ciascuna di queste fasi, i biomarcatori possono contribuire a chiarire i possibili meccanismi di danno e a predire l'evoluzione clinica del danno renale. AKI, danno renale acuto; AKS, Stress renale acuto; CKD, malattia renale cronica; ESRD, insufficienza renale cronica terminale; GFR, velocità di filtrazione glomerulare.

La presente rassegna descrive i principali biomarcatori di AKI, distinguendo tra marcatori di stress, danno e funzione renale, il loro principale utilizzo nella pratica clinica e le prospettive future.

Dal danno renale acuto clinico al subclinico

Fino ai primi anni del 2000, la comunità scientifica internazionale si riferiva al danno renale acuto utilizzando definizioni diverse e disomogenee che non consentivano una trattazione uniforme del problema né in termini clinici né di ricerca. Nel 2002 il gruppo di consenso Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI), riunitosi a Vicenza, propose la prima definizione univoca di AKI e la sua stadiazione secondo i criteri RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, and End stage renal disease) che consideravano vari gradi di gravità della sindrome, da modesti incrementi della sCr e/o iniziali riduzioni della diuresi sino a forme gravi e conclamate (7). I criteri RIFLE furono convalidati su circa 2 milioni di pazienti e fu dimostrato che, con il progredire della gravità della sindrome in base a tali stadi, aumentava progressivamente la mortalità (8–10). Nel 2007 e nel 2012, i criteri RIFLE furono modificati prima dall'Acute Kidney Injury Network (AKIN) (11) e successivamente dal gruppo di lavoro Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) (4) fino ad arrivare all'attuale definizione di AKI e ai criteri attualmente utilizzati per la sua diagnosi e stadiazione. Tutte queste definizioni, inclusa quella attualmente in uso, si basano sull'espressione funzionale del danno renale ("disfunzione renale") a sua volta identificata con l'aumento della sCr e/o con la riduzione della diuresi. Tuttavia, la sCr, che è ancora oggi il biomarcatore più

utilizzato per misurare la funzione renale, è un indice imperfetto e tardivo di danno renale, iniziando a variare solo in caso di compromissione di più della metà dei nefroni (12), ed essendo inficiata dalla perdita di massa muscolare (13,14) e dall'iperidratazione (15–17), entrambe evenienze comuni in ambito ospedaliero e soprattutto in area critica, dove è più alta l'incidenza di AKI. Se nell'ambito della CKD, per superare queste limitazioni, sono state proposte delle formule per la stima del GFR, queste risultano tuttavia imprecise in alcune categorie di pazienti (18,19) e non sono convalidate, e quindi utilizzabili, nei pazienti con AKI (12). Infine, in merito al criterio clinico della diminuzione della diuresi, è noto che non sempre il danno renale si esprime con l'oligo-anuria. Pertanto, gli attuali criteri diagnostici di AKI non sono appropriati per la diagnosi precoce di danno né di ripresa funzionale renale.

Inoltre, l'AKI è un processo dinamico che, accanto alle alterazioni funzionali sopradescritte, indicative di "disfunzione renale", può determinare l'espressione di una serie di biomarcatori indicativi di "danno renale". Per questo, nel 2012 il gruppo ADQI ha riconsiderato la diagnosi di AKI includendo sia i biomarcatori di funzione che di danno renale; questi ultimi possono modificarsi prima che vi sia una perdita di funzione renale o anche in assenza di questa, definendo, in questo caso, un'entità denominata AKI subclinica. L'AKI subclinica include, quindi, quei casi in cui non vi sono i criteri minimi nemmeno per la diagnosi di AKI stadio 1, pur in presenza di un danno renale identificato dall'aumento dei biomarcatori, cosiddetti precoci, di danno renale. Solo se il danno prodotto è esteso e/o prolungato nel tempo

Tabella 1

Confronto dei criteri di classificazione RIFLE, AKIN e KDIGO con i recenti criteri di consenso ADQI per la diagnosi e stadiazione del danno renale acuto.

ESPRESSIONE FUNZIONALE DEL DANNO RENALE					
STADIAZIONE	sCr, GFR, eGFR			DIURESI	Biomarcatori Precoci
	RIFLE	AKIN	KDIGO		ADQI
Stadio 1S (ADQI)	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Stadio 1S: biomarcatori precoci positivi
Risk (RIFLE)	Aumento della sCr x 1,5 dal valore basale, oppure diminuzione del GFR >25%	Aumento della sCr x 1,5-2 dal valore basale, oppure aumento della sCr $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,5$ μ mol/L)	Aumento della sCr x 1,5-1,9 dal valore basale, oppure aumento della sCr $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,5$ μ mol/L)	<0,5 mL/kg/h per 6-12h	Stadio 1A: biomarcatori precoci negativi
Stadio 1 (AKIN e KDIGO)					Stadio 1B: biomarcatori precoci positivi
Injury (RIFLE)	Aumento della sCr x 2 dal valore basale, oppure diminuzione del GFR >50%	Aumento della sCr > x 2-3 dal valore basale	Aumento della sCr x 2-2,9 dal valore basale	<0,5 mL/kg/h per 6-12h	Stadio 2A: biomarcatori precoci negativi
Stadio 2 (AKIN e KDIGO)					Stadio 2A: biomarcatori precoci positivi
Failure (RIFLE)	Aumento della sCr x 3 dal valore basale, oppure sCr >4 mg/dL (>354 μ mol/L) con aumento dal valore basale $>0,5$ mg/dL (>44 μ mol/L), oppure diminuzione del GFR >50%	Aumento della sCr $>x$ 3 dal valore basale, oppure sCr ≥ 4 mg/dL (≥ 354 μ mol/L) con un aumento dal valore basale $>0,5$ mg/dL (>44 μ mol/L), oppure inizio CRRT	Aumento della sCr $\geq x$ 3 dal valore basale, oppure sCr ≥ 4 mg/dL (≥ 354 μ mol/L), oppure inizio CRRT, oppure in età <18 anni, diminuzione eGFR <35 mL/min/1,73 m ²	<0,3 mL/kg/h per ≥ 24 h, oppure anuria per ≥ 12 h	Stadio 3A: biomarcatori precoci negativi
Stadio 3 (AKIN e KDIGO)					Stadio 1B: biomarcatori precoci positivi
Loss (RIFLE)	Perdita completa della funzione renale per più di 4 settimane	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Non previsto
ESRD (RIFLE)	End Stage Renal Disease >3 mesi	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Non previsto

sCr, creatinina sierica; GFR, velocità di filtrazione glomerulare; eGFR, velocità di filtrazione glomerulare stimata; RIFLE, Risk-Injury-Failure-Loss-End stage renal disease; AKIN, Acute Kidney Injury Network; KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcome; ADQI, Acute Dialysis Quality Initiative; CRRT, Continuous Renal Replacement Therapy

(tanto da superare la riserva funzionale renale del paziente), la conseguente riduzione del GFR si manifesta clinicamente con una variazione diagnostica della sCr e/o della diuresi (20). Nel 2020, lo stesso gruppo di consenso ha proposto di modificare lo stadio 1 e gli stadi 2 e 3 di AKI definiti dai criteri KDIGO, suddividendoli, rispettivamente, in 3 sotto-stadi (AKI 1S, AKI 1A e AKI 1B) e in 2 sotto-stadi (AKI 2A, AKI 2B e AKI 3A, AKI 3B), in base alla positività o meno dei biomarcatori. In particolare, lo stadio 1S identifica una fase iniziale in cui il danno renale è documentato dalla positività dei

biomarcatori precoci in assenza di aumento della sCr e/o di riduzione della diuresi. Gli stadi 1A, 2A e 3A includono i pazienti in cui sono soddisfatti i criteri KDIGO per la diagnosi di AKI di stadio, rispettivamente 1, 2 e 3, senza un aumento significativo dei biomarcatori precoci. Infine, negli stadi 1B, 2B e 3B, vi è la contemporanea presenza dei criteri KDIGO per la diagnosi di AKI di stadio, rispettivamente 1, 2 e 3 e della positività dei biomarcatori (Tabella 1) (21). La necessità di tale modifica origina dall'osservazione che, al pari dell'AKI clinica, anche l'AKI subclinica si associa ad outcome peggiori (6,22). Per

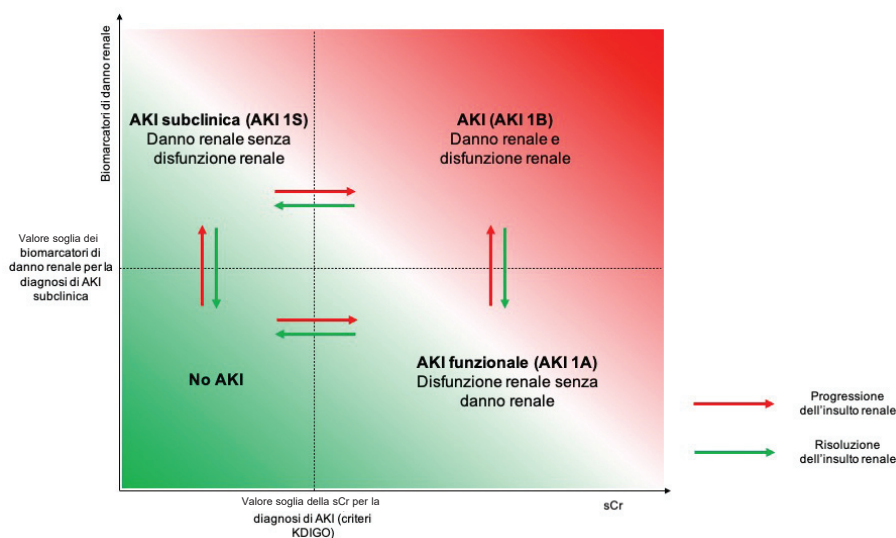


Figura 2

Modello concettuale di danno/disfunzione renale acuta.

Il gruppo di consenso Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) ha riconsiderato la diagnosi di danno renale acuto includendo sia i biomarcatori di funzione che di danno renale e ha individuato 4 possibili quadri. Sull'asse delle ascisse è riportato l'andamento dei valori della creatinina sierica, mentre sull'asse delle ordinate quello dei biomarcatori di danno renale. Le linee tratteggiate verticale e orizzontale rappresentano, rispettivamente, il valore soglia della creatinina sierica per la diagnosi di danno renale acuto secondo i criteri KDIGO e il valore soglia dei biomarcatori per la diagnosi di danno renale acuto subclinico. Il superamento dei valori soglia determina il passaggio da uno all'altro dei 4 possibili quadri identificati.

- in basso a sinistra, "no AKI": biomarcatori di danno renale inferiori al valore soglia e assenza dei criteri minimi KDIGO per la diagnosi di danno renale acuto;
- in basso a destra, "AKI 1A" (disfunzione renale senza danno renale): biomarcatori di danno renale inferiori al valore soglia, e presenza di criteri minimi KDIGO per la diagnosi di AKI;
- in alto a sinistra, "AKI subclinica" o "AKI 1S" (danno renale senza disfunzione renale): biomarcatori di danno renale superiori al valore soglia e assenza dei criteri minimi KDIGO per la diagnosi di AKI;
- in alto a destra, "AKI" o "AKI 1B" (danno renale e disfunzione renale): biomarcatori di danno renale superiori ai valori soglia e presenza dei criteri KDIGO per la diagnosi di AKI.

Le frecce rosse indicano la progressione del danno renale dovuta all'esposizione ex novo o protratta, ad agenti nefrotossici. Le frecce verdi indicano il miglioramento del danno renale grazie alla risoluzione dell'insulto renale.

AKI, danno renale acuto; KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcome; sCr, serum creatinine

questo e poiché un'identificazione e un conseguente approccio terapeutico precoce può prevenire o limitare lo sviluppo di AKI, il gruppo ADQI ha suggerito l'utilizzo, nella pratica clinica, dei biomarcatori precoci di stress, danno e disfunzione renale. La classificazione di un paziente in stadio 1S o 1A, ovvero in uno stadio estremamente precoce e quindi potenzialmente reversibile di danno/disfunzione renale, è di grande utilità clinica. Infatti, a fronte di una sostanziale carenza di terapie efficaci in caso di AKI conclamata, le strategie preventive per arrestare o ridurre la progressione del danno renale sono diverse e di convalidata efficacia (monitoraggio e ottimizzazione dello stato emodinamico, limitazione/sospensione degli agenti nefrotossici, e così via.) (4) (Figura 2).

I biomarcatori identificati e utilizzati a scopo clinico e/o di ricerca sono numerosi e differiscono tra loro per origine anatomica, funzione fisiologica, cinetica e tempo di picco. Questi sono in genere proteine prodotte dall'epitelio tubulare o da cellule infiammatorie migrate nel tubulo durante un insulto parenchimale, ovvero molecole a basso peso molecolare fisiologicamente filtrate

attraverso la barriera glomerulare e non più riassorbite dal tubulo renale danneggiato e sono espressione di un danno renale; ovvero molecole che, pur piccole, non vengono più filtrate liberamente dal glomerulo per una riduzione del GFR, accumulandosi nel sangue ed esprimendo quindi una disfunzione renale. Vi sono, infine, i più recenti biomarcatori di arresto del ciclo cellulare che sono in grado di valutare lo stress cellulare non solo prima della disfunzione, ma anche del danno renale e che stanno dando risultati promettenti (Figura 3). Nella Tabella 2 sono elencati i principali biomarcatori, le loro caratteristiche e il loro significato clinico.

BIOMARCATORI DI DANNO RENALE ACUTO

Biomarcatori di danno renale

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)

NGAL è una glicoproteina di 25 kDa secreta dai neutrofili in risposta alle infezioni batteriche (23,24). Una volta secreta, NGAL lega i siderofori prodotti dai batteri e impedisce l'approvvigionamento di ferro necessario

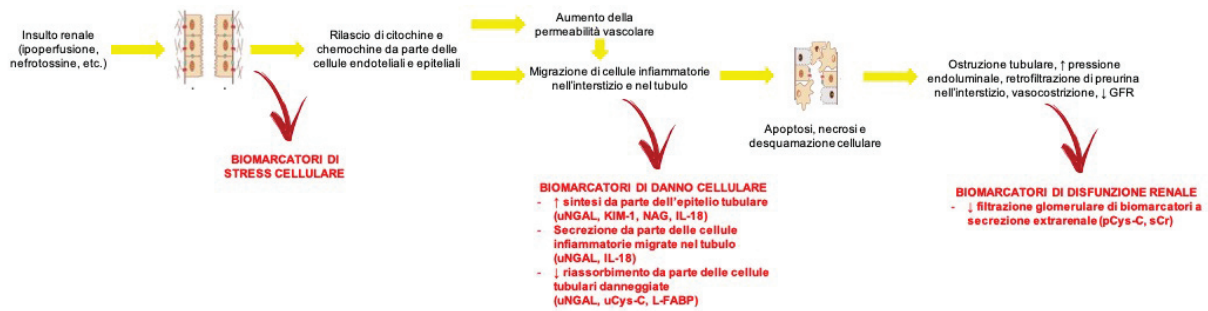


Figura 3

Biomarcatori di stress, danno e disfunzione renale.

Un qualsiasi insulto renale (ischemico, nefrotossico) induce la secrezione di citochine e chemochine da parte delle cellule endoteliali e tubulari. Le chemochine determinano la migrazione di cellule infiammatorie nell'interstizio e nel tubulo interessato dall'insulto renale. Anche le citochine, mediante l'induzione di un'aumentata permeabilità vascolare, contribuiscono a richiamare cellule infiammatorie nel sito di danno. In entrambi i casi, i globuli bianchi si radunano nel lume e nell'interstizio renale determinando apoptosi e necrosi cellulare e conseguente desquamazione cellulare. Questo causa ostruzione tubulare, aumento della pressione endoluminale e retrofiltrazione di preurina nell'interstizio, vasocostrizione e riduzione della filtrazione glomerulare. I biomarcatori di stress cellulare, che indicano un aumentato rischio di danno renale acuto aumentano poche ore dopo l'insulto renale. I biomarcatori di danno renale acuto aumentano appunto in seguito a danno renale e hanno una diversa origine; infatti, possono essere prodotti dall'epitelio tubulare danneggiato, o non riassorbiti dallo stesso, o ancora, possono essere secreti dalle cellule infiammatorie migrate nel tubulo. I biomarcatori di disfunzione renale hanno una produzione extrarenale e aumentano nel sangue per ridotta filtrazione glomerulare. GFR, velocità di filtrazione glomerulare; IL-18, Interleukin-18; KIM-1, Kidney injury molecule-1; L-FABP, Liver fatty acid-binding protein; NAG, N-Acetyl-β-D-glucosamine; pCys-C, plasma Cystatin C; sCr, serum creatinine; uCys-C, urinary Cystatin C; uNGAL, urinary Neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

Tabella 2

Caratteristiche e significato dei principali biomarcatori renali.

Biomarcatore	Produzione e clearance renale	Campione	Tempo di rilevamento dopo insulto renale	Significato
uNGAL	È filtrato dal glomerulo e riassorbito dal tubulo prossimale. È secreto dal tubulo distale in corso di danno renale. In questo caso, aumenta nelle urine per secrezione e ridotto riassorbimento da parte del tubulo.		2-4h	
NAG	Non è filtrato dal glomerulo. È rilasciato dal tubulo in caso di danno renale e di aumentata attività lisosomiale.		12h	
KIM-1	Il suo dominio extracellulare è secreto nelle urine in caso di danno renale.	urine	12-24h	Danno renale
L-FABP	L-FABP è secreto dal tubulo prossimale nelle urine in risposta. A diversi stimoli, tra cui il danno renale.		1h	
IL-18	È rilasciata nelle urine dai neutrofili attivati migrati nel tubulo.		6-24h	
uCys-C	È filtrata dal glomerulo e riassorbita dal tubulo prossimale. Aumenta nelle urine a seguito di danno renale per ridotto riassorbimento tubulare.		12-24h	
pNGAL	È filtrata dal glomerulo. Aumenta per ridotta filtrazione in caso di disfunzione renale.	sangue	2-4h	Disfunzione renale
pCys-C	È filtrata dal glomerulo. Aumenta per ridotta filtrazione in caso di disfunzione renale.		12-24h	
TIMP-2	Up-regolati e rilasciati nelle urine durante le fasi iniziali del danno cellulare del tubulo prossimale.	urine	Non disponibile	Stress tubulare
IGFBP7				

uNGAL, urinary Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NAG, N-Acetyl-β-D-glucosamine; KIM-1, Kidney injury molecule-1; L-FABP, Liver fatty acid-binding protein; IL-18, Interleukin-18; uCys-C, urinary Cystatin C; pCys-C, pNGAL, plasma Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; plasma Cystatin C; TIMP-2, Tissue inhibitor of metalloproteinase 2; IGFBP7, Insulin-like growth factor-binding protein 7.

alla loro crescita, agendo di fatto come un agente batteriostatico endogeno (25). NGAL è stata rinvenuta in numerosi tessuti, tra cui quello polmonare, gastrico e renale (26) e la sua secrezione è stata correlata a diverse condizioni patologiche (27). Il ruolo biologico di NGAL sul rene potrebbe essere quello di limitare la tossicità ferro-mediata in una fase precoce di danno renale e di favorire il trasporto di ferro alle cellule inducendo la differenziazione delle cellule progenitrici renali in cellule dell'epitelio tubulare in una fase tardiva, partecipando, quindi, al processo di riparazione dopo un episodio di AKI (28). NGAL viene liberamente filtrata dal glomerulo e riassorbita a livello del tubulo prossimale renale. In risposta ad un insulto renale, NGAL viene rapidamente secreta dalle cellule dell'epitelio tubulare distale sia in direzione apicale che baso-laterale, determinando un aumento della sua concentrazione urinaria e plasmatica. In corso di danno renale, la concentrazione urinaria di NGAL aumenta anche come conseguenza del mancato riassorbimento tubulare da parte del tubulo prossimale danneggiato. In corso di AKI, la concentrazione plasmatica di NGAL aumenta per riduzione della sua filtrazione glomerulare (29).

Dopo il riscontro di alti livelli di NGAL nel plasma, nelle urine (28) e nei preparati biotici renali di pazienti con AKI, numerosi studi, condotti in diversi contesti clinici, ne hanno indagato il potenziale ruolo come biomarcatore precoce di AKI (30). Questi hanno descritto il valore predittivo positivo e negativo di NGAL in merito alla diagnosi e alla stadiazione di AKI, al sito di danno, alla necessità di terapia renale sostitutiva (RRT, renal replacement therapy) e di ripresa funzionale renale o di progressione verso la CKD (31). Purtroppo, i livelli di NGAL aumentano non solo nell'AKI, ma anche in presenza di altre patologie come la sepsi (32), il diabete mellito (33), la CKD (34) e nella circolazione extracorporea (35). Inoltre, data la varietà dei meccanismi fisiopatologici dell'AKI e dei contesti clinici in cui questa può verificarsi, questi studi presentano un alto grado di eterogeneità, limitando la possibilità di meta-analisi che giungano a conclusioni significative. Una soluzione è identificare un cluster di meccanismi di AKI o di ambiti clinici che possono permettere di migliorare l'omogeneità dei dati analizzati e arrivare a conclusioni utili almeno all'interno di popolazioni selezionate. In linea con questo approccio, una meta-analisi di Zhang et al., ha concluso che i livelli di NGAL (sia urinari che plasmatici) predicono AKI, necessità di RRT e mortalità nei pazienti settici (36). De Geus et al. hanno studiato il ruolo di NGAL nei pazienti cardiocirurgici, documentando come, anche in questa popolazione, NGAL sia un buon indicatore predittivo di AKI. Gli stessi autori hanno elaborato uno score, definito "NGAL score", al fine di identificare i valori soglia e le loro variazioni significative sia nel plasma che nelle urine; il punteggio contiene livelli ben definiti di NGAL utili ad escludere AKI o a quantificare il livello di danno a livello tubulare (37). Attualmente, sono in corso numerosi studi mirati ad indagare il valore predittivo di NGAL nella diagnosi e nella prognosi di AKI in ulteriori contesti clinici.

N-Acetyl-β-D-glucosamine (NAG)

NAG è un enzima lisosomiale di oltre 130 kDa rinvenuto in molte cellule umane tra cui quelle del tubulo prossimale renale. Agisce come glucosidasi e catalizza l'idrolisi del residuo terminale di glucosio delle glicoproteine (38). Dato l'alto peso molecolare, NAG non viene filtrato dal glomerulo, pertanto tutto il NAG rilevato nelle urine ha origine tubulare. I livelli urinari di NAG aumentano in corso di danno cellulare renale, ma anche di aumentata attività lisosomiale in corso di nefropatia diabetica, malattia glomerulare cronica e ripresa ritardata della funzione renale dopo trapianto (39).

Alcuni studi hanno investigato il valore predittivo di AKI, di necessità di RRT e di mortalità, di NAG in diverse popolazioni (40,41) e altri sono ad ora in corso.

Kidney injury molecule-1 (KIM-1)

KIM-1 è una glicoproteina transmembrana di 104 kDa presente sul versante apicale delle cellule del tubulo contorto prossimale. In risposta ad un danno tubulare renale, il suo dominio extracellulare viene separato dal dominio transmembranario per proteolisi enzimatica e rilasciato nelle urine (42). KIM-1 e il suo dominio solubile sembrano avere un ruolo nei processi di rigenerazione tubulare (30).

In condizioni normali, KIM-1 non è misurabile nelle urine, ma aumenta dopo necrosi tubulare acuta. Sebbene gli studi su modelli animali abbiano dato risultati molto promettenti (43), i risultati degli studi clinici non sono stati, invece, uniformi (40,44). Sono in corso ulteriori studi volti a chiarire il ruolo predittivo di KIM-1, da solo o inserito in un pannello con altri biomarcatori, nella diagnosi e nella prognosi di AKI.

Liver fatty acid-binding protein (L-FABP)

L-FABP è una proteina legante gli acidi grassi di circa 14 kDa sintetizzata dal fegato, dall'intestino e dall'epitelio del tubulo renale prossimale. La sua funzione è di legare gli acidi grassi e trasportarli ai mitocondri e ai perossisomi; legandosi ai prodotti dell'ossidazione lipidica, protegge le cellule renali dallo stress ossidativo (45). L-FABP è localizzata nel tubulo prossimale ed è secreta nelle urine in risposta a diversi stimoli, come la proteinuria, l'ipossia, l'iperglicemia, l'ipertensione e lo stress ossidativo (46). Sembra essere un promettente biomarcatore per la diagnosi precoce e la prognosi di AKI nei pazienti critici (47,48).

Interleukin-18 (IL-18)

IL-18 è una citochina proinfiammatoria di 22 kDa prodotta dai macrofagi e dalle cellule tubulari renali. Interviene in diversi processi patologici renali, quali il danno da ischemia/riperfusion, il rigetto, i disordini autoimmuni (30).

Tra i biomarcatori proposti, sembra essere, insieme ad NGAL, il più sensibile nella diagnosi precoce di AKI nei pazienti sottoposti ad interventi di cardiocirurgia

(49). Il suo ruolo è allo studio anche per la diagnosi precoce di AKI da mezzo di contrasto. Purtroppo, IL-18 non aumenta solo nell'AKI, ma anche in numerose altre condizioni patologiche, quali la sepsi, l'endotossinemia e nelle malattie infiammatorie e autoimmuni.

Urinary cystatin C (uCys-C)

Cys-C è un inibitore della cisteina proteasi, di 13 KDa sintetizzato da tutte le cellule nucleate. Viene liberamente filtrata dal glomerulo ed è quasi completamente riassorbita nel tubulo prossimale per endocitosi recettore-mediata, tanto che, in condizioni normali, è rilevata nelle urine solo in minima quantità. A seguito di un danno renale e della conseguente riduzione del riassorbimento tubulare, la concentrazione di Cys-C nelle urine aumenta (30).

uCys-C sembra avere un buon valore predittivo di necessità di RRT nei pazienti con AKI in ICU (50). Purtroppo, Cys-C e albumina competono nel riassorbimento tubulare (51), riducendo così la sensibilità dei livelli di uCys-C nella diagnosi e nella prognosi dell'AKI in tutte le condizioni cliniche associate ad albuminuria (come ad esempio nella sepsi) (52).

Biomarcatori di funzione renale

Plasma cystatin C (pCys-C)

pCys-C è da sempre considerata un buon marcatore di funzione renale. Le sue dimensioni, maggiori di quelle della sCr, hanno fatto ipotizzare una sua più precoce ritenzione e, di conseguenza, un suo più precoce aumento in caso di danno renale. Tale ipotesi, però, non è supportata dai risultati degli studi clinici che non hanno documentato una superiorità della pCys-C sulla sCr nella diagnosi precoce di AKI (53,54). Tuttavia, la pCys-C potrebbe avere un ruolo nel monitoraggio della funzione renale nei pazienti ricoverati in ICU, laddove la sensibilità della sCr è fortemente ridotta dalla frequente presenza di iperidratazione e perdita di massa muscolare (55,56). Infine, livelli elevati di pCys-C in pazienti che ricevevano RRT sono risultati predittori indipendenti di necessità di RRT cronica (57).

Biomarcatori di arresto del ciclo cellulare

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP-2) e Insulin-like Growth Factor-binding Protein 7 (IGFBP7)

Le fasi del ciclo cellulare sono controllate da cicline, chinasi ciclina-dipendenti e inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti attraverso complessi meccanismi solo in parte chiariti. Alterazioni nel passaggio da una fase cellulare all'altra modificano il processo proliferativo producendo riparazioni maladattative (come ad esempio proliferazione fibroblastica e aumentata produzione di collagene che esitano in glomerulosclerosi e fibrosi interstiziale) (58). Al contrario, l'arresto temporaneo del ciclo cellulare in G1

previene la divisione di cellule con DNA danneggiato fino alla sua riparazione, inibendo la proliferazione cellulare durante l'esposizione a stress e lesioni; tale meccanismo protettivo favorisce una riparazione adeguata prevenendo la comparsa di esiti (59).

Le metalloproteasi sono peptidasi che degradano la matrice extracellulare. TIMP-2 è una proteina di 21 kDa che sopprime la proliferazione delle cellule endoteliali in risposta a fattori angiogenici e inibisce l'attività delle proteasi nei tessuti sottoposti a rimodellamento della matrice extracellulare (60). IGFBP7 è una proteina di 29 kDa con numerose funzioni biologiche, tra cui la regolazione della disponibilità dei fattori di crescita insulino-simili e il loro legame ai recettori (61). Sia TIMP-2 che IGFBP7 sono coinvolti nella fase di arresto del ciclo cellulare in G1 che si verifica durante le primissime fasi di stress cellulare (62).

Nel rene, TIMP-2 e IGFBP7 sono espressi dalle cellule tubulari in risposta al danneggiamento del DNA e ad altre forme di lesione. Il meccanismo d'azione proposto suggerisce che TIMP-2 e IGFBP7 blocchino l'effetto dei complessi proteina-chinasi ciclina-dipendenti sulla promozione del ciclo cellulare, che si traduce in un arresto temporaneo del ciclo cellulare in G1 per evitare che le cellule danneggiate si dividano (60). In realtà, i precisi meccanismi d'azione di TIMP-2 e IGFBP7, così come il loro ruolo biologico nella protezione dal danno renale sono ad oggi ancora poco compresi (63). Più corroborata è invece la loro funzione nella rilevazione dell'arresto del ciclo cellulare e quindi come biomarcatori di imminente danno tubulare nell'AKI (64).

Il primo grande studio clinico che ha indagato il ruolo del parametro (TIMP-2 x IGFBP7) nella diagnosi precoce di AKI, lo studio SAPPHIRE, ha dimostrato la superiorità dei biomarcatori di arresto del ciclo cellulare sui biomarcatori fino ad allora utilizzati, inclusi NGAL e KIM-1 (65). Lo stesso studio ha individuato due valori soglia di questo parametro ($>0,3 \text{ ng/mL}^2/1000$ e $>2 \text{ ng/mL}^2/1000$), poi convalidati nell'OPAL STUDY, con elevata sensibilità e specificità, rispettivamente, nel predire l'insorgenza di AKI nelle successive 12 ore (65,66). I biomarcatori di arresto del ciclo cellulare sono stati oggetto di numerosi studi successivi volti ad indagare il loro ruolo predittivo di AKI (67), ma anche di mortalità (68), necessità di RRT (68) e ripresa funzionale renale (69).

Nel 2014, la Food and Drug Administration ha approvato l'uso del NephroCheck® (Astute Medical, San Diego, CA, USA), un dispositivo Point-of-Care che misura quantitativamente (TIMP-2x IGFBP7) nelle urine, per individuare i pazienti critici ad alto rischio di AKI. Mentre l'impiego, supportato dai risultati degli studi clinici, del NephroCheck® è sempre più diffuso nelle ICU e come biomaratore di rischio di AKI peri-operatoria, i dati sulle altre popolazioni di pazienti non sono ancora conclusivi e numerosi studi condotti in diversi ambiti clinici sono ad ora in corso (64).

PROSPETTIVE FUTURE

Il biomarcatore ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- essere prodotto dalle cellule danneggiate ed esprimere specificità d'organo;
- avere una concentrazione che varia in risposta all'estensione del danno;
- essere determinabile precocemente dopo l'insulto e, in particolare, in una fase in cui il danno sia ancora reversibile;
- decrescere rapidamente in concentrazione quando vi sia una ripresa funzionale;
- poter essere misurato in maniera semplice, rapida e con costi limitati.

Un rapido rilevamento del biomarcatore dopo un insulto renale, e quindi una diagnosi precoce di danno renale o, addirittura, di rischio di danno renale (quest'ultima consentita dai biomarcatori di stress cellulare) è un obiettivo fondamentale. Infatti, ancora oggi, le strategie terapeutiche per l'AKI sono limitate e riguardano perlopiù la sospensione di tutti gli agenti nefrotossici e l'ottimizzazione della gestione del paziente a rischio di AKI, interventi utili se attuati nella fase precoce (e reversibile) del danno renale. A tale scopo, lo sviluppo di biomarcatori utilizzabili nella stratificazione del rischio di AKI prima di un eventuale insulto, sarebbe auspicabile, ma ancora irrealizzato.

Ad oggi, l'elenco dei nuovi biomarcatori renali è in costante aumento. Alcune molecole attualmente allo studio sono il Dickkopf-3 (DKK3), un marcatore di stress tubulare renale che sta dando risultati promettenti nell'identificazione dei pazienti a rischio di AKI dopo interventi di cardiocirurgia (70); la proencefalina-A plasmatica che ha dimostrato un buon valore predittivo di ripresa funzionale renale in pazienti settici con AKI (71,72). La clusterina, la calbindina, la copeptina sono molecole allo studio per la diagnosi precoce di AKI in diversi contesti clinici [come ad esempio AKI post-operatoria (73,74), AKI indotta da farmaci (75)]. Alcune citochine, quali l'interleuchina plasmatica 8 (IL-8) e il recettore del fattore di necrosi tumorale di tipo 1 (TNFR-1, tumor necrosis factor-1 receptor), i cui livelli sono stati associati ad una diversa rapidità del recupero funzionale dopo AKI (76).

Tuttavia, data la complessità della sindrome AKI, le diverse varianti eziologiche e l'eterogeneità dei meccanismi fisiopatologici alla base di ogni sua fase, è difficile ipotizzare che un unico biomarcatore possa riassumere tutte le informazioni utili ed essere impiegabile in tutti i contesti clinici e le fasi dell'AKI. Per questo, ormai da alcuni anni siamo abituati a pensare, più che ad un unico biomarcatore, ad un pannello di biomarcatori che utilizzati insieme potrebbero dare informazioni complementari, utili a migliorare la gestione clinica dell'AKI (21). I risultati finora ottenuti indicano che l'approccio basato sull'integrazione dei dati clinici con i livelli dei biomarcatori offre benefici significativi nella gestione del paziente a rischio o con AKI (77). Le analisi di costo-efficacia condotte fino a questo momento

suggeriscono che l'utilizzo dei nuovi biomarcatori in popolazioni selezionate di pazienti possa determinare una riduzione dei costi complessivi dell'AKI, legata principalmente alla riduzione della necessità di RRT, della durata del ricovero ospedaliero e in ICU e dei tassi di riammissione a 30 giorni (78,79). Tali risultati non sono tuttavia conclusivi e necessitano di essere confermati da ulteriori studi.

CONCLUSIONI

La scoperta e la convalida di nuovi biomarcatori in grado di identificare uno stress cellulare, un danno senza disfunzione renale e una disfunzione renale precoce, prima dell'aumento della sCr, ha ridefinito i criteri diagnostici e di stadiazione dell'AKI. Inoltre, ha consentito la costruzione di un modello concettuale di AKI che include l'intero spettro di eventi e situazioni che vanno dal rene normale, o già interessato da CKD, sino alla risoluzione del quadro clinico o alla morte irreversibile dell'organo. Per ogni stadio di questo modello, i biomarcatori possono contribuire a chiarire i possibili meccanismi di danno e a predire l'evoluzione clinica del danno renale.

Oggi, con l'aumento del numero dei biomarcatori disponibili, sono parallelamente in aumento gli studi in corso. Questi hanno finora dimostrato la superiorità dei modelli di integrazione dei dati clinici con i livelli dei biomarcatori nella gestione del paziente a rischio o con AKI. Ulteriori studi sui nuovi biomarcatori, da soli o più probabilmente riuniti in un pannello, potranno arricchire ulteriormente le nostre conoscenze sull'AKI e fornire strumenti utili per la sua diagnosi precoce, ma anche per la stratificazione del rischio di AKI e per la valutazione della ripresa funzionale renale.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med* 2015;41:1411-23.
2. Xu J, Zhu J, Jiang J, et al. Risk factors for long-term mortality and progressive chronic kidney disease associated with acute kidney injury after cardiac surgery. *Med (United States)* 2015;94:1-6.
3. Zager RA. Progression from Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease: Clinical and Experimental Insights and Queries. *Nephron - Clin Pract* 2014;127:46-50.
4. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 2012;2:1-141. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4089764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4089619&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender>. Ultimo accesso: gennaio 2021.

5. Murray TP, Mehta RL, Shaw A, et al. Current use of biomarkers in Acute Kidney Injury: Report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Kidney Int* 2014;85:513-21.
6. Haase M, Devarajan P, Haase-fielitz A, et al. The outcome of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)-positive Subclinical Acute Kidney Injury: A Multicenter Pooled Analysis of Prospective Studies. *J Am Coll Cardiol* 2016;57:1752-61.
7. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-12.
8. Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, et al. Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database. *Intensive Care Med* 2009;35:1692-702.
9. Thakar CV, Christianson A, Freyberg R, et al. Incidence and outcomes of acute kidney injury in intensive care units: a Veterans Administration study. *Crit Care Med* 2009;37:2252-8.
10. Ostermann M, Chang RWS. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE. *Crit Care Med* 2007;35:1837-43.
11. Mehta RL, Kellum JA, Shah S V, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:1-8.
12. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A New equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
13. Larsson L. Acute quadriplegic myopathy: an acquired "myosinopathy". *Adv Exp Med Biol* 2008;642:92-8.
14. Puthuchery ZA, Rawal J, Mcphail M, et al. Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA* 2013;310:1591-600.
15. Moore E, Tobin A, Reid D, et al. The impact of fluid balance on the detection, classification and outcome of Acute Kidney Injury after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2015;29:1229-35.
16. Basu RK, Andrews A, Krawczeski C, et al. Acute kidney injury based on corrected serum creatinine is associated with increased morbidity in children following the arterial switch operation. *Pediatr Crit Care Med* 2013;14:218-24.
17. Liu KD, Thompson BT, Ancukiewicz M, et al. Acute Kidney Injury in patients with acute lung injury: impact of fluid accumulation on classification of acute kidney injury and associated outcomes. *Crit Care Med* 2011;39:2665-71.
18. Gaspari F, Ruggenenti P, Porrini E, et al. The GFR and GFR decline cannot be accurately estimated in type 2 diabetics. *Kidney Int* 2013;84:164-73.
19. Cartet-Farnier E, Goutelle-Audibert L, Maire P, et al. Implications of using the MDRD or CKD-EPI equation instead of the Cockcroft-Gault equation for estimating renal function and drug dosage adjustment in elderly patients. *Fundam Clin Pharmacol* 2017;31:110-9.
20. Okusaa MD, Jaber BL, Doranc P, et al. Physiological biomarkers of Acute Kidney Injury: A conceptual approach to improving outcomes. *Contrib Nephrol* 2013;182:1-17.
21. Ostermann M, Zarbock A, Goldstein S, et al. Recommendations on Acute Kidney Injury biomarkers from the acute disease quality initiative consensus conference. A Consensus Statement. *JAMA* 2020;3:1-17.
22. Fang F, Hu X, Dai X, et al. Subclinical acute kidney injury is associated with adverse outcomes in critically ill neonates and children. *Crit Care* 2018;22:1-12.
23. Kjeldsens L, Johnsen H, Sengelbv H. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with Human Neutrophil Gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425-32.
24. Xu SU, Carlson M, Engström A, et al. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:365-76.
25. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The Neutrophil Lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002;10:1033-43.
26. Cowland JB, N B. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45:17-23.
27. Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:298-307.
28. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115:610-21.
29. Singer E, Markó L, Paragas N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *acta physiol.* 2013;207:663-72.
30. Mårtensson J, Martling CR, Bell M. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: Clinical applicability. *Br J Anaesth* 2012;109:843-50. doi 10.1093/bja/aes357.
31. Agarwal A, Dong Z, Harris R, et al. Cellular and molecular mechanisms of AKI. *J Am Soc Nephrol* 2016;127:1288-99.
32. Bagshaw SM, Bennett M, Haase M, et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med* 2010;36:452-61.
33. Nauta FL, Boertien WE, Bakker SJL, et al. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:975-81.
34. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:211-9.
35. Cai L, Borowiec J, Xu S, et al. Assays of urine levels of HNL/NGAL in patients undergoing cardiac surgery and the impact of antibody configuration on their clinical performances. *Clin Chim Acta* 2009;403:121-5.
36. Zhang A, Cai Y, Wang P, et al. Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2016;20:1-13.
37. De Geus HRH, Ronco C, Haase M, et al. The cardiac surgery – associated neutrophil gelatinase-associated lipocalin (CSA-NGAL) score: A potential tool to monitor acute tubular damage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016;151:1476-81.
38. Tucker SM, Pierce RJ, Price RG. Characterisation of human N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes as an indicator of tissue damage in disease. *Clin Chim Acta* 1980;102:29-40.
39. Price RG. The role of NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 1992;38(S1):14-9.
40. Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, et al. Urinary N-Acetyl-beta-(D)-Glucosaminidase activity and Kidney Injury Molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:904-12.
41. Fan H, Zhao Y, Sun M, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin, kidney injury molecule-1, N-acetyl-β-D-glucosaminidase levels and mortality risk in septic patients with acute kidney injury. *Arch Med Sci*

- 2018;14:1382-6.
42. Milani P, Graziani MS, Merlini G. Marcatori biochimici di danno renale acuto. *Biochim Clin.* 2010;34:585-90.
 43. Vaidya VS, Ozer JS, Frank D, et al. Kidney Injury Molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in multi-site preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* 2010;28:478-85.
 44. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci* 2008;1:200-8.
 45. Kashani K, Cheungpasitporn W, Ronco C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1074-89.
 46. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L-Type Fatty Acid – Binding Protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2894-902.
 47. Liu X, Guan Y, Jiang C, et al. Early predictors of acute kidney injury: a narrative review. *Kidney Blood Press Res* 2016;41:680-700.
 48. Oh D. A long journey for acute kidney injury biomarkers. *Ren Fail* 2020;42:154-65.
 49. Mutlu H, Gündüz E, Titiz TA, et al. Investigation of AKI with early biomarkers after cardiac surgery. *Braz J Cardiovasc Surg* 2020;35:722-31.
 50. Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hu J, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 2004;50:552-8.
 51. Thielemans N, Lauwerys R, Bernard A. Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron* 1994;66:453-8.
 52. Richmond JM, Sibbald WJ, Linton AM, et al. Patterns of urinary protein excretion in patients with sepsis. *Nephron* 1982;31:219-23.
 53. Korevaar JC, Kuiper MA, Spronk PE, et al. Serum and urine Cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury and renal replacement therapy. *Intensive Care Med* 2011;37:493-501.
 54. Perianayagam MC, Seabra VF, Tighiouart H, et al. Serum Cystatin C for prediction of dialysis requirement or death in acute kidney injury: a comparative study. *Am J Kidney Dis* 2009;54:1025-33.
 55. Mårtensson J, Martling C, Oldner A, et al. Impact of sepsis on levels of plasma cystatin C in AKI and non-AKI patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:576-81.
 56. Rosa S De, Samoni S, Ronco C. Creatinine-based definitions: from baseline creatinine to serum creatinine adjustment in intensive care. *Crit Care* 2016;20:1-5.
 57. Yang T, Sun S, Lin L, et al. Predictive factors upon discontinuation of renal replacement therapy for long-term chronic dialysis and death in acute kidney injury patients. *Artif Organs* 2017;41:1127-34.
 58. Shankland SJ, Al'Douhaji M. Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease. *Exp Nephrol* 1999;7:207-11.
 59. Lameire N, Vanmassenhove J, Van Biesen W, et al. The cell cycle biomarkers: promising research, but do not oversell them. *Clin Kidney J* 2016;9:353-8.
 60. Edelstein CL. Chapter Six - Biomarkers in Acute Kidney Injury. In: Edelstein CL, ed. *Biomarkers of Kidney Disease (Second Edition)*. Academic Press, 2017;241-315.
 61. Evdokimova V, Tognon CE, Benatar T, et al. IGFBP7 Binds to the IGF-1 receptor and blocks its activation by Insulin-Like Growth Factors. *Cell Biol* 2012;5:1-12.
 62. Ortega LM, Heung M. The use of cell cycle arrest biomarkers in the early detection of acute kidney injury. Is this the new renal troponin? *Nefrologia* 2018;38:361-7.
 63. Vijayan A, Faubel S, Askenazi DJ, et al. Clinical use of the urine biomarker [TIMP-2] × [IGFBP7] for Acute Kidney Injury Risk assessment. *Am J Kidney Dis* 2016;68:19-28.
 64. Fan W, Ankawi G, Zhang J, et al. Current understanding and future directions in the application of TIMP-2 and IGFBP7 in AKI clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:567-76.
 65. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care* 2013;17(R25):1-12.
 66. Hoste EAJ, McCullough PA, Kashani K, et al. Original articles derivation and validation of cutoffs for clinical use of cell cycle arrest biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:2054-61.
 67. Gocze I, Koch M, Renner P, et al. Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS One.* 2015;10:1-11.
 68. Koyner JL, Shaw AD, Chawla LS, et al. Tissue Inhibitor Metalloproteinase-2 (TIMP-2) IGF-Binding Protein-7 (IGFBP7) levels are associated with adverse long-term outcomes in patients with AKI. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1747-54.
 69. Meersch M, Schmidt C, Aken H, et al. Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PLoS One.* 2014;9:1-9.
 70. Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, et al. Association between urinary dickkopf- 3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet* 2019;394(10197):488-96.
 71. Caironi P, Latini R, Struck J, et al. Circulating Proenkephalin, acute kidney injury, and its improvement in patients with severe sepsis or shock. *Clin Chem* 2018;64:1361-9.
 72. Penkid PA, Hollinger A, Wittebole X, et al. Proenkephalin A 119-159 (Penkid) is an early biomarker of septic acute kidney injury: The Kidney in Sepsis and Septic Shock (Kid-SSS) Study. *Kidney Int Reports* 2018;3:1424-33.
 73. Lane BR, Babitz SK, Vlasakova K, et al. Evaluation of urinary renal biomarkers for early prediction of acute kidney injury following partial nephrectomy: a feasibility study. *Eur Urol Focus* 2020;6:1240-7.
 74. Yamashita K, Abe T, Hayata Y, et al. Copeptin concentration following cardiac surgery as a prognostic marker of postoperative acute kidney injury: a prospective cohort study. *J Thorac Dis* 2020;12:6609-17.
 75. Da Y, Akalya K, Murali T, et al. Serial quantification of urinary protein biomarkers to predict drug-induced acute kidney injury. *Curr Drug Metab* 2019;20:656-64.
 76. Murugan R, Wen X, Keener C, et al. Associations between intensity of RRT, Inflammatory mediators, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:926-33.
 77. Guzzi LM, Bergler T, Binnall B, et al. Clinical use of [TIMP-2] • [IGFBP7] biomarker testing to assess risk of acute kidney injury in critical care: guidance from an expert panel. *Crit Care* 2019;23:1-9.
 78. Berdugo MA, Kirson NY, Zimmer L, et al. Economic and clinical benefits of early identification of acute kidney injury using a urinary biomarker. *J Med Econ* 2019;22:1281-9.
 79. Petrovic S, Bogavac-Stanojevic N, Lacic D, et al. Cost-effectiveness analysis of acute kidney injury biomarkers in pediatric cardiac surgery. *Biochem Medica* 2015;25:262-71.

Current trends and future directions of liquid biopsy in renal cell carcinoma

Evelina La Civita, Antonietta Liotti, Michele Cennamo, Lia Conte, Erminia Grassia, Daniela Terracciano

Department of Translational Medical Sciences, University of Naples "Federico II"

ABSTRACT

Metastatic clear cell renal cell carcinoma is a high vascularized and aggressive tumor characterized by a high intra-tumoral and inter-tumoral heterogeneity. For this reason, despite the wide range of therapy available, these patients often show resistance to chemotherapy. In this scenario, it could be of great benefit the discovery of biomarkers to identify the most suitable treatment for first and second line therapy and the early determination of outcome. Once identified, circulating biomarkers could be introduced in clinical practice and integrated with patient's clinical features for building a decision algorithm usable by clinicians. The liquid biopsy, defined as the determination in fluids like blood of tumor-released product such as DNA, RNA and protein, exhibits several advantages over tissue biomarkers including a real time correlation with tumor features, lower cost and lower risk for the patient. Our understanding of the liquid biopsy has raised rapidly in the last few years accordingly with the development of new molecular biology techniques. Efforts are under way for the identification of robust and reproducible liquid biopsy assays that could improve soon overall survival (OS) and quality of life of metastatic renal cell carcinoma.

Key words: renal neoplasia, therapy monitoring, circulating nucleic acids

INTRODUZIONE

Renal cell carcinoma (RCC) is a large group of different type of cancers derived from renal tubular epithelial cells; the clear cell RCC is the most common of them (1). Clear cell RCC accounts for 3% of cancer diagnosis and cancers death worldwide. Incidence rate is higher in developed countries due to high average age and obesity rate, two of the major risk factors for kidney cancer. Additional risk factors are smoking, hypertension, diabetes, sex (RCC incidence is higher in men than women) and the presence of other kidney diseases such as chronic kidney diseases, acquired kidney cystic disease and kidney transplantation (2).

Genetic factors also contribute to RCC risk; to date, at least 10 genes (*BAP1*, *FLCN*, *FH*, *MET*, *PTEN*, *SDHB*, *SDHC*, *TSC1*, *TSC2* and *VHL*) related with familial RCC are known. These genes have also been involved in sporadic RCC development (3).

In the sporadic RCC, the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene (*VHL*) is the most frequently mutated. The *VHL* gene product is the substrate recognition

component of an E3 ligase complex that ubiquitylates Hypoxia-Inducible Factor 1- α (HIF1 α) and Hypoxia-Inducible Factor 2- α (HIF2 α) for proteasome mediated degradation. Under condition of hypoxemia or in the absence of VHL protein, HIF1 α accumulates and dimerizes with hypoxia inducible factors β . This complex acts as transcription factor inducing an increase of mRNA levels encoding angiogenesis-related proteins like Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor α (TGF α) (4,5). Furthermore, also the dysregulation of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) pathway leads increasing cellular HIF1 α levels and, consequently, increase of *VEGF*, *PDGF* β and *TGF α* gene transcription (6). The upregulation of these proteins results in uncontrolled cell proliferation and growth of blood vessels, condition that promote the tumor growing and the dissemination of metastasis (7).

Generally, less than 10% of patients with RCC are diagnosed with the classic triad of flank pain, hematuria and palpable mass (8), more often the diagnosis results from incidental findings during ultrasonography or

Corrispondenza a: Daniela Terracciano, Via S. Pansini, 5 - 80131 Naples, Italy, Tel +39817463617, E-mail daniela.terracciano@unina.it

Ricevuto: 28.01.2021

Revisionato: 15.02.2021

Accettato: 17.02.2021

Pubblicato on-line: 25.03.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.012

abdominal computerized tomography (CT) performed for other diagnostic investigations (9).

Hence, about 25% of patients present with distant metastatic disease at diagnosis. Whereas for patients with organ-confined RCC, the surgical resection by partial or radical nephrectomy is potentially curative, unfortunately, approximately 40% of patients surgically resected eventually develop recurrence (10).

Currently, available therapies for metastatic RCC consist in targeted therapeutic agents, which include VEGF and mTOR inhibitors or immunotherapy. Sorafenib, Pazopanib, Axitinib, Lenvatinib and Sunitinib are tyrosine kinase inhibitors targeting the VEGF signalling axis that have been approved in the first-line and second-line settings for the treatment of metastatic RCC in the United States and the European Union (11). mTOR inhibitors, Everolimus and Temozolimus have been approved in the first-line and second-line settings in patients with poor risk status (12).

Cytokines such as Interferon- α and Interleukin-2, that intensify antitumor immune activity, were standards of care before the introduction of Sunitinib in the 1990s (13). The new generation of immunotherapy agents are T cell immune checkpoint inhibitors, that consist of antibodies against Programmed cell Death protein 1 Ligand 1 (PD-L1), such as Atezolizumab and Avelumab, and antibodies against Programmed cell Death protein 1 (PD-1), like Pembrolizumab and Nivolumab. These antibodies prevent the interaction between PD-1 on tumor specific T cell and PD-L1 expressed on either cancer cells and myeloid cells in the tumor tissue. The expression of PD-1 by cancer cells is one of mechanisms that allow tumor to escape the host immune surveillance; blocking the immune checkpoint stimulates the activation of immune response through the activity of T cells and, so, the immune killing of cancer.

Despite the wide range of therapy available for the treatment of metastatic RCC, the five years survival rate does not exceed 20% (5). In most cases, in fact, patients develop resistance to first line chemotherapeutic agents due to a high inter-tumoral and intra-tumoral heterogeneity characteristic of RCC. As already demonstrated more than forty years ago (14), genetic diversity within tumors can allow chemotherapy resistance by selecting non-responsive subclones during the natural history of cancer through mutation on key genes within the target pathway that bypass the site of inhibition (14). Despite that, more recently, multiregional tumor analyses suggest that tumor evolutionary course is mostly limited, making the evolutionary routes of metastatic RCC predictable and, therefore, therapeutically tractable (9).

In this scenario, to further improve clinical outcomes, the identification of new biomarkers to obtain information regarding genetic and microenvironmental tumor assessment could be critical. Circulating biomarkers could be the most advantageous tool to obtain this kind of information. In a high vascularized tumor like metastatic RCC, RNA, DNA and proteins released in the

bloodstream may reflect specific genetic changes that occur in the clear cell RCC cells such as activation of HIF pathway and the corresponding increase in expression angiogenesis-related protein, which are direct consequence of *VHL* inactivation (15) (Figure 1).

The liquid biopsy could lead the clinicians to plan the most suitable therapy for the patient by the accurate recognition of patients in term of risk identification and early detection of recurrence after first line treatment.

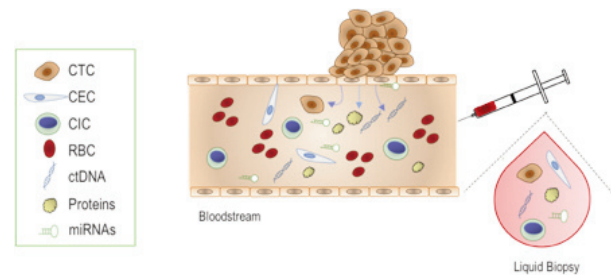


Figure 1
RNA, DNA, proteins and circulating cells released in the bloodstream by tumor cell.

CECs, circulating endothelial cells; CICs, circulating immune cells; CTCs, circulating tumor cells; ctDNA, circulating tumor DNA; RBC, miRNA; micro RNA, red blood cells.

PROTEIN BIOMARKERS

Because of the pivotal role of VEGF in the pathophysiology of kidney cancer and consequently in the pharmacological mechanism of target therapy, many studies propose serum levels of VEGF and soluble VEGFR (sVEGFR) as prognostic and predictive marker in patients with metastatic RCC. VEGF family members in mammals consist of VEGF-A, -B, -C, -D, -E and placenta growth factor (16).

VEGF-A, which is often referred to as VEGF (17), present several isoforms as a result of alternative splicing of eight-exon VEGF-A gene. In addition different isoforms of VEGFR are known: VEGFR1 and VEGFR2 expressed on vascular endothelial cells and VEGFR3 expressed on lymphatic endothelial cells. Some of alternative splicing product of *VEGFR* gene result in a soluble truncated extracellular-domain protein known as sVEGFR (16,18,19).

Higher plasma VEGF-A levels showed trends toward adverse prognostic significance in patients with metastatic colon rectal cancer, non-small lung cancer and metastatic RCC as demonstrated by Hegde et al. in 2012. Nevertheless, VEGF-A was not found to predict the response to Bevacizumab, a monoclonal antibody which selectively inhibits VEGF-A signaling (20).

Regarding the multikinase inhibitor-based therapy, Pegña et al. showed that baseline VEGF levels could be taken in consideration for the choice of suitable therapy for the metastatic RCC patients with baseline VEGF levels above the 75th percentile; really, these patients show a better progression free survival (PFS) after treatment (21).

Conversely, Harmon et al. found that the clinical outcome after Sunitinib treatment could be predicted with a high efficacy using the baseline levels of sVEGFR3 with a PFS in case of baseline plasma level of sVEGF-3 below the median (22).

Moreover, high levels of cytokine and angiogenic factor like interleukin 6, interleukin 8 (IL8) and osteopontin have been proposed as negative prognostic factor for metastatic RCC patients (20).

These markers do not seem to be comparable to prognostic markers of the standard clinical classification, but they are predictive of response to Pazopanib, a tyrosine kinase inhibitor. In fact, patients with increased level of cytokines, especially interleukin 6, have in general a worse prognosis, but a relative benefit from Pazopanib higher than patients with low level of this cytokine (20,23).

Baseline levels of some inflammation markers like serum Lactate Dehydrogenase (LDH), or neutrophil/lymphocyte ratio may be used as prognostic biomarkers for metastatic RCC patients. In recent years, it is becoming increasingly important the determination of LDH, a metabolic enzyme that catalyzes the interconversion of pyruvate in lactate during glycolysis and gluconeogenesis, as prognostic biomarker for many types of cancers such nasopharyngeal carcinoma, melanoma, prostate cancer and RCC (24). LDH expression is under regulation of HIF and it is upregulated by the activation of several oncogenic processes such as activation of PI3Ks, activation of Akt and target of rapamycin complex 1.

Interesting, high baseline LDH type C levels as prognostic biomarkers is more accurate for metastatic RCC than other tumors, probably given the key role that HIF plays in the pathogenesis of this cancer (25,26). Indeed, the high LDH circulating level may reflect both tumor hypoxia and oncogenic processes activation; in this setting, cancer cell may become dependent on neovascularization and angiogenesis and therefore sensitive to target therapies like the Temsirolimus therapy, based on specific mTOR inhibitors.

In this regard, a retrospective study performed on poor risk metastatic RCC patients showed that the Temsirolimus therapy is more effective than interferon α for those patients who have baseline high circulating LDH levels (27).

Concerning the neutrophil/lymphocyte ratio, a blood index calculated dividing the neutrophil count by the lymphocytes count, Lanani et al. showed that a 25% increase of this index in the first 6 weeks of anti-PD-1/anti PD-L1 immune checkpoint inhibitors treatment, was associated with worse PFS and overall survival (28). Simonaggio et al. have recently confirmed this result by proving that any increase of neutrophil/lymphocyte ratio in the first 6 weeks of anti-PD-1 treatment was associated with worse PFS and overall survival (29).

Furthermore, the evaluation of a few chemokine such CXCL9, CXCL10 and C2D8 could be used to assess immunomodulatory effect of immune checkpoint

inhibitor in metastatic RCC patients treated with Nivolumab, a monoclonal antibody blocking the PD-1 receptor (30).

In fact, patient responsive to Nivolumab showed an increased serum concentration of CXCL9, CXCL10 and C2D8 after Nivolumab treatment; this phenomenon is in agreement with a model in which Nivolumab induces CXCL9 and CXCL10 production by myeloid cells at inflammatory sites in tumor tissue to recruit immunocompetent T cells to the tumor (30).

Montemagno et al. showed that also the soluble form of PD-1 and PD-L1 can be measured in the peripheral blood as circulating biomarkers. PD-1 is expressed on immune cells, such as activated T lymphocytes whereas PD-L1 is expressed by B cells, dendritic cells, macrophages, but also by tumor and endothelial cells. The engagement of PD-1 receptor by PD-L1 expressed by cancer cells induce immune tolerance and is one of the ways by which cancer escapes immunosurveillance.

The soluble forms of PD-1/PD-L1, probably caused by cleavage of their extracellular domains or alternative splicing product of membrane form, were correlated to a rapid metastatic progression. In addition, patients with high levels of soluble PD-1 had a shorter progression free survival after treatment with Sunitinib (31)

CIRCULATING NUCLEIC ACIDS

In the last few years the determination of circulating nucleic acids such as circulating micro RNA and circulating tumor DNA is increasingly important in liquid biopsy research.

Micro RNA (miRNA) are 18-25 nucleotides in length RNA non-protein coding that regulate gene expression in a post transcriptional manner.

As regards the metastatic RCC, it is well known that the dysregulation of several miRNAs are involved in its pathogenesis. For example, the upregulation of miR-210, whose expressions is induced by the hypoxic tumor microenvironment of RCC, occurs in renal cell carcinoma cells and is in association with epithelial mesenchymal transition (32).

Zhao et al. investigated the prognostic value of circulating miRNA showing that miR-210 serum levels decrease after nephrectomy, confirming thus the hypothesis that miRNA is released from tumor into circulation (33). Even more interesting is the prognostic value of miR-221. This miRNA, known as a downstream target of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-RAS-RAF-MEK pathway (34), is a prognostic biomarker for metastatic RCC patients with 10.9-fold increase of its expression when compared to patients with localized disease (35). Moreover, combination of plasma level of two or more miRNAs could improve the performance of miRNAs as biomarkers. Actually, ROC curve analysis revealed that miR-378 and miR-210 are effective biomarkers for differentiating RCC patients from healthy controls with an Area Under the Curve (AUC) of 0.82 and 0.74 respectively. Interestingly, the combination of

the two parameters returns a better diagnostic accuracy with an AUC of 0.85 (95% CI, 0.81-0.89, $p < 0.0001$) reaching 80% sensitivity and 78% specificity (36).

In recent years, several studies have proposed the analysis of circulating tumor circulating DNA (ctDNA) as the main instrument for the assessment of the specific patient's cancer features and a longitudinal evaluation of tumor genomics changes. In peripheral blood, ctDNA derives from tumors cells necrosis, apoptosis or lysis of circulating tumor cells (37). To date, ctDNA is applied for the assessment of EGFR and ALK mutations in patient suffering of lung cancer in order to avoid repeated tissue biopsies that are not feasible due to high cost and risk of physical harm. Regarding the prognostic and predictive value of ctDNA in metastatic RCC patients, Feng et al. showed that the quantification of plasma ctDNA could be used for the evaluation of response to Sorafenib therapy. Patients with a progression of disease after Sorafenib therapy, show increased levels of ctDNA compared to baseline, while patients responsive to Sorafenib have a completely opposite trend with a ctDNA plasma levels lower compared to pre-treatment (38).

Pala et al. analyzed genomic alteration in ctDNA extracts from blood samples of patients with metastatic RCC, showing that the most frequent genomic alteration involved *TP53*, *VHL*, *EGFR*, *NF1*, and *ARID1A* genes and that the genomic alterations increased across first- and second-line therapy based on VEGF inhibitors (39).

CIRCULATING TUMOR, ENDOTHELIAL AND IMMUNE CELLS

Circulating Tumor Cells (CTCs) are malignant cells originating from the primary tumor site and released into the bloodstream by the tumor, that eventually originates distant metastasis.

The detection and isolation of tumor cells in peripheral blood suggest the intriguing possibility to analyze the proteomic, transcriptomic and genomic characterization of tumoral cell detached from the primary tumor. Also, in this case the detection of CTCs using the minimally invasive blood collection could replace the invasive biopsies of metastatic site and be used as a clinical monitoring tool for cancer prognosis. Furthermore, numerous clinical studies have shown that the number of CTCs detected has a strong correlation to metastatic potential in breast cancer and colorectal cancer (40,41).

Regarding metastatic RCC, several studies have indicated that EpCAM, the most used capture antigen for CTCs, fails to recognize those that originate from RCC (42).

To overcome this issue, Liu et al. used the NanoVelcro System (CytoLumina Technologies Corp., Agoura, USA) (43), a nanostructured platform, in combination with the CA9-/CD147-based enrichment method to isolate CTCs with high efficiency (94.7%)

from blood samples from RCC patients with a good association between the number of CTCs isolated and the disease progression (44). Further, they showed that the CTC expression of vimentin, a mesenchymal marker, exhibits a more stringent correlation with disease progression than the CTC enumeration.

Recently, Kim et al. demonstrated that CTCs are frequently detected in patients with advanced RCC using a novel photosensitive polymer-based microfilter termed "tapered-slit filter" (TSF) [EXFO Inc. (Canada)] (45). This new method allows a high cell viability after five days on the filter; this device is thus more appropriate for further investigation of the functional and molecular properties of CTCs (46).

Moreover, the quantification of CTCs in metastatic RCC patients could be used to stratify the patient for the first line therapy; in fact the CTCs positivity at baseline significantly predicted a poorer response to tyrosine kinases inhibitors (47).

In cancer patients, elevated Circulating endothelial cells (CECs) are also detected (48). CECs were already known as biomarkers of vascular damage in patient with vasculitis or renal transplant recipients. To define the biological response to tyrosine kinase inhibitors like Sorafenib, Gruenwald et al. have proposed the evaluation of CECs as biomarkers of effectiveness of tyrosine kinase inhibitor therapy in metastatic RCC patients. Actually, patients who achieved a PFS above the median exhibit a significant increase of CECs in the initial 4 weeks of treatment, in contrast to patients with a PSF below the median which do not show any increase in CECs after the treatment (49).

The characterization of white blood cells subpopulation for monitoring metastatic RCC patients treated with Nivolumab could also be useful; Nivolumab is a checkpoint inhibitor that acts by inhibiting the PD1 receptor. The identification of circulating biomarkers able to give an immediate evaluation of patient's response to Nivolumab is particularly necessary since the standard radiologic evaluation criteria is of no help. Really, the standard radiologic evaluation criteria could detect a pseudo-progression due to a transitory tumor increase size certainly caused by an initial recruitment of immune cells (50).

In this contest, authors of NIVOREN study (51) estimated the efficacy of immune checkpoint inhibitors and assessed the pharmacodynamic immunomodulatory effect of Nivolumab, monitoring the immune circulating cells in 44 naïve metastatic kidney cancer patients. Patients non-responsive to Nivolumab showed low levels of B cells and CD4+T cells and high levels of CD244+ neutrophils and CD244+ CD4+ T cells and CD8+ T cells. CD244+, an immune checkpoint highly expressed in exhausted T cells, is a marker of tumoral immunosuppressive activity. On the other hand, patients with non-switched B cells have a better overall survival and PFS. Considering the results obtained by the NIVOREN study, the white cell characterization could be used for an early evaluation of Nivolumab response (51).

Table 1

Major biomarkers that exhibit correlation with prognosis and response to therapy of metastatic RCC patients.

References	Patient population	Biomarker(s)	Sample size	Main findings
Hegde et al. (20)	mCRC NSCLC mRCC	VEGF-A	1.816	Pretreatment total circulating VEGF-A was prognostic for outcome in mCRC, NSCLC, mRCC
Peña et al. (21)	Advanced RCC	VEGF, CAIX, TIMP-1, and Ras p21	930	Biomarkers levels were prognostic for survival
Sepe et al (23)	mRCC	IL-6, IL-8, osteopontin	25	IL-6, IL-8, and osteopontin were found to be significantly associated with treatment response
Harmon et al. (22)	mRCC	VEGF-A, VEGF-C, sVEGFR-3, IL-8	750	VEGF-A and IL-8 were prognostic for OS
Armstrong et al. (27)	mRCC	LDH	404	Serum LDH was a prognostic and a predictive biomarker for the survival
Zhang et al (25)	mRCC	LDH	Meta-analysis	LDH is associated with an adverse prognosis in mRCC
Lalani et al. (28)	mRCC	NLR	142	Early decline of NLR at 6 weeks are associated with significantly improved outcomes in mRCC patients treated with immune checkpoint blockade
Simonaggio et al (29)	mRCC mNSCLC	NLR	161	NLR increase was associated with worse PFS and OS outcomes
Choueiri et al (30)	mRCC	CXCL9, CXCL10	91	Biomarker changes from baseline reflect nivolumab pharmacodynamics in the tumor microenvironment
Montemagno et al. (31)	mRCC	sPD-L1, sPD-1	87	mccRCC patients with high plasmatic levels of sPD-L1 or sPD-1 are poor responders to Sunitinib
Fedorko et al. (36)	RCC	miRNA	255	Higher serum levels of miRNA in RCC patients than in healthy controls; miR-378 positively correlates with DFS and clinical stage

mCRC, metastatic colorectal cancer; mRCC, metastatic renal cell carcinoma; NSCLC, non-small cell lung cancer; RCC, renal cell carcinoma; VEGF, vascular endothelial growth factor; CAIX, carbonic anhydrase IX; TIMP-1, tissue inhibitors of metalloproteinases-1; IL6, interleukin 6; IL8 interleukin 8; LDH, Lactate dehydrogenase; NLR: neutrophil-lymphocyte ratio; CXCL9, Chemokine (C-X-C motif) ligand 9; CXCL10, Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; HGF, Hepatocyte growth factor; DFS, disease-free survival; CSF, cancer-specific survival; CTCs, circulating tumor cells; CECs, circulating endothelial cells; CICs, circulating immune cells; PFS, progression-free survival; ctDNA, circulating tumor DNA; GA, genomic alteration; CSS, cancer-specific survival.

CONCLUSIONS

Thanks to the ability to reflect genetic and microenvironmental tumor features in real time, the circulating biomarkers offers an appealing minimally invasive approach that allows the clinicians to design a tailored treatment strategy for the patients. The identification of the most suitable treatment for first- and second-line therapy and the early determination of outcomes are key issues for tumors like metastatic RCC characterized by a high rate of recurrence.

Several biomarkers showed a correlation with prognosis and response to therapy of metastatic clear cell RCC patients due to the highly vascular and aggressive nature of metastatic clear cell RCC (Table 1).

In this scenario, the introduction in clinical practice of the most effective among these biomarkers could certainly improve overall survival and quality of life of metastatic clear cell RCC patients through the identification the first- or second-line therapy most effective for the specific patient at the time of treatment administration.

Unfortunately, on routine clinical laboratory practice there is no diagnostic biomarker for early detection of renal cancer and no laboratory test for surveillance of recurrence. The currently available biomarkers here described can be used to orient diagnosis in adjunct to radiologic discovery, they are also prognostic indicators, and very useful in following up patients to assess response to chemotherapy.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Tannir NM, Pal SK, Atkins MB. Second-line treatment landscape for renal cell carcinoma: a comprehensive review. *Oncologist* 2018;23:540-55.
- McLaughlin JK. Epidemiologic characteristics and risk factors for renal cell cancer. *Clin Epidemiol* 2009;1:33-43.
- Haas NB, Nathanson KL. Hereditary kidney cancer syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis* 2014;21:81-90.
- Haase V. The VHL Tumor suppressor: master regulator of HIF. *Curr Pharm Des* 2009;15:3895-903.
- Nabi S, Kessler ER, Bernard et al. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Research* 2018 doi: 10.12688/f1000research.13179.1.
- Laplante M, Sabatini DM. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-93.
- Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev* 2020;86:17-35.
- Alsamman M, Draper D. Nonmetastatic renal cell carcinoma presenting with persistent cough: Case report with literature review. *Avicenna J Med* 2019;9:160-3.
- Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 2017;3:9-19.
- Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet* 2009;373(9669):1119-32.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-34.
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008;372(9637):449-56.
- McDermott DF, Regan MM, Clark JI, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:133-41.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
- Lakshminarayanan H, Rutishauser D, Schraml P et al. Liquid biopsies in renal cell carcinoma-recent advances and promising new technologies for the early detection of metastatic disease. *Front Oncol* 2020;10:843-59.
- Zhao Y, Adjei AA. Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor. *Oncologist* 2015;20:660-73.
- Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013;13:871-82.
- D'Aniello C, Berretta M, Cavaliere C et al. Biomarkers of prognosis and efficacy of anti-angiogenic therapy in metastatic clear cell renal cancer. *Front Oncol* 2019;9:1400-20.
- Roskoski R. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375:287-91.
- Hegde PS, Jubb AM, Chen D et al. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2013;19:929-37.
- Peña C, Lathia C, Shan M et al. Biomarkers predicting outcome in patients with advanced renal cell carcinoma: Results from sorafenib phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *Clin Cancer Res* 2010;16:4853-63.
- Harmon CS, Deprimo SE, Figlin RA et al. Circulating proteins as potential biomarkers of sunitinib and interferon- α efficacy in treatment-naïve patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73:151-6.
- Sepe P, Martinetti A, Mennitto A et al. Prospective translational study investigating molecular Predictors of resistance to first-line Pazopanib in Metastatic renal Cell Carcinoma (PIPELINE Study). *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials* 2020;43:621-7.
- Mishra D, Banerjee D. Lactate dehydrogenases as metabolic links between tumor and stroma in the tumor microenvironment. *Cancers* 2019;11:750-71.
- Zhang J, Yao YH, Li BG. Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015 doi:10.1038/srep09800.
- Hua Y, Liang C, Zhu J et al. Expression of lactate dehydrogenase C correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *Tumor Biol* 2017;39:1-10.
- Armstrong AJ, George DJ, Halabi S. Serum lactate dehydrogenase predicts for overall survival benefit in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with inhibition of mammalian target of rapamycin. *J Clin Oncol* 2012;30:3402-7.
- Lalani AKA, Xie W, Martini DJ, et al. Change in neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in response to immune checkpoint blockade for metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 2018;6:5-14.
- Simonaggio A, Elaidi R, Fournier L et al. Variation in neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) as predictor of outcomes in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) and non-small cell lung cancer (mNSCLC) patients treated with nivolumab. *Cancer Immunol Immunother* 2020;69:2513-22.
- Choueiri TK, Fishman MN, Escudier B et al. Immunomodulatory activity of nivolumab in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2016;22:5461-71.
- Montemagno C, Hagege A, Borchiellini D et al. Soluble forms of PD-L1 and PD-1 as prognostic and predictive markers of sunitinib efficacy in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2020;9:750-79.
- Grange C, Collino F, Tapparo M et al. Oncogenic microRNAs and renal cell carcinoma. *Front Oncol* 2014;4:49-59.
- Zhao A, Li G, Péoc'h M et al. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2013;94:115-20.
- Teixeira AL, Dias F, Gomes M et al. Circulating biomarkers in renal cell carcinoma: the link between microRNAs and extracellular vesicles, where are we now? *J Kidney Cancer VHL*. 2014;1:84-98.
- Teixeira AL, Ferreira M, Silva J et al. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients. *Tumor Biol* 2014;35:4057-66.
- Fedorok M, Stanik M, Iliev R et al. Combination of MiR-378 and MiR-210 serum levels enables sensitive detection of renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2015;16:23382-9.
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-37.
- Feng G, Ye X, Fang F et al. Quantification of plasma cell-free DNA in predicting therapeutic efficacy of sorafenib on metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Dis Markers* 2013;34:105-11.

39. Pal SK, Sonpavde G, Agarwal N et al. Evolution of circulating tumor dna profile from first-line to subsequent therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2017;72:557-64.
40. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-91.
41. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213-21.
42. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012;12:178.
43. Jan YJ, Chen JF, Zhu Y et al. NanoVelcro rare-cell assays for detection and characterization of circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;125:78-93.
44. Liu S, Tian Z, Zhang L et al. Combined cell surface carbonic anhydrase 9 and CD147 antigens enable high-efficiency capture of circulating tumor cells in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* 2016;7:877-989.
45. Kang YT, Doh I, Cho YH. Tapered-slit membrane filters for high-throughput viable circulating tumor cell isolation. *Biomed Microdevices* 2015;17:45.
46. Kim TH, Kang YT, Cho YH et al. Detection of circulating tumor cells and their potential use as a biomarker for advanced renal cell carcinoma. *Can Urol Assoc J* 2019;13:285-329.
47. Nayak B, Panaiyadiyan S, Singh P et al. Role of circulating tumor cells in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2021;39:135-75
48. Beerepoot L V., Mehra N, Linschoten F et al. Circulating endothelial cells in cancer patients do not express tissue factor. *Cancer Lett* 2004;213:241-8.
49. Gruenwald V, Beutel G, Schuch-Jantsch S et al. Circulating endothelial cells are an early predictor in renal cell carcinoma for tumor response to sunitinib. *BMC Cancer* 2010;10:695-700.
50. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol* 2017;18:143-52.
51. Desnoyer A, Larive A, Drubay D et al. Fresh blood immune cell monitoring in patients treated with nivolumab in the GETUG-AFU26 NIVOREN study: Association with toxicity and treatment outcome. *Ann Oncol* 2019; 30: 5 [Abstract]

Amiloidosi renali

Marco Basset, Mario Nuvolone e Giovanni Palladini

Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Laboratorio Biochimica - Biotecnologie e Diagnostica avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia

ABSTRACT

Renal amyloidoses.

Renal amyloidoses are a group of rare misfolding protein diseases caused by the deposition of a precursor protein in the kidney as insoluble amyloid fibrils, causing renal damage and dysfunction that can progress to end-stage renal failure requiring dialysis. This heterogeneous group includes commoner diseases as light chain (AL) and reactive (AA) amyloidosis as well as rarer entities as hereditary renal amyloidosis. Differential diagnosis is mandatory to avoid therapeutic errors and requires amyloid typing on tissue biopsy and, in selected cases, DNA analysis. In AL and AA amyloidosis, biomarkers are well-established tools that help clinicians in diagnosis, prognosis assessment and evaluation of treatment efficacy, highlighting the important role of the clinical laboratory in the management of these rare diseases. In AL amyloidosis, the identification of the monoclonal protein requires the combination of electrophoresis, immunofixation of both serum and urine, and serum free light chain (FLC) assessment. Severity of renal involvement and risk of progression to dialysis are predicted at diagnosis by 24h-proteinuria and estimated glomerular filtration rate (eGFR). Treatment efficacy is assessed with monoclonal protein studies, including serum FLC measurement; hematologic response can result in improvement of renal damage, evaluated by improvements in 24h-proteinuria and eGFR from baseline. In AA amyloidosis, a periodical evaluation of serum amyloid A (SAA) serum concentration reflects the activity of the underlying inflammatory disease and evaluates the efficacy of treatment. The severity of renal involvement can be assessed at diagnosis with 24h-proteinuria and eGFR. Only few data on prognostic markers are available on other types of renal amyloidosis.

Parole chiave: amiloidosi, danno renale, prognosi

INTRODUZIONE

Le amiloidosi sono un gruppo di malattie causate dall'alterato ripiegamento di una proteina che si deposita in organi e tessuti sotto forma di fibrille di amiloide (1). Ad oggi, sono state descritte 36 diverse proteine precursori dell'amiloide che possono essere responsabili di forme di amiloidosi sistemica o localizzata nell'uomo (2). Nell'amiloidosi localizzata, la proteina amiloidogena viene prodotta e depositata localmente formando lesioni nodulari o placche (3). Nell'amiloidosi sistemica invece, la proteina responsabile della malattia è presente in circolo e può depositarsi lontano dal sito di produzione, raggiungendo diversi organi e compromettendone il funzionamento. Quando il cuore è colpito dalla malattia, il quadro clinico è caratterizzato dalle manifestazioni

dello scompenso cardiaco e la prognosi può essere molto grave. L'amiloidosi renale, invece, è contraddistinta nella maggior parte dei casi dalla presenza di proteinuria glomerulare ed insufficienza renale che, nelle fasi avanzate di malattia, può essere terminale e richiedere l'inizio del trattamento dialitico. Pertanto, sebbene la prognosi sia migliore, l'interessamento renale può risultare in una compromissione, anche importante, della qualità della vita. Nella Tabella 1 sono riportate le principali forme di amiloidosi renale fino ad ora descritte. Tra queste, figurano forme acquisite, come l'amiloidosi da catene leggere libere (amiloidosi AL) e l'amiloidosi reattiva a flogosi cronica (amiloidosi AA), che sono le più comuni, e rare forme di amiloidosi ereditaria. Sebbene le manifestazioni cliniche possano essere simili, queste

Corrispondenza a: Giovanni Palladini, Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Viale Golgi, 19 - 27100 Pavia, Tel 0382-502994, E-mail giovanni.palladini@unipv.it

Ricevuto: 11.02.2021

Revisionato: 03.04.2021

Accettato: 09.04.2021

Publicato on-line: 10.05.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.027

Tabella 1
Amiloidosi sistemiche con coinvolgimento renale

Tipo di amiloidosi	Proteina precursore	Condizione predisponente	Frequenza relativa
AL	Catena leggera immunoglobulinica	Clone B-cellulare	La più frequente
AA	SAA	Infiammazione cronica	Comune (in declino)
ALECT2	Fattore chemotattico leucocitario 2	Sconosciuta, più frequente in alcuni gruppi etnici	Comune
AFib	Catena A α del fibrinogeno	Mutazione	Rara
AGel	Gelsolina	Mutazione	Molto rara
ALys	Lisozima	Mutazione	Molto rara
AApoA-I	Apolipoproteina A-I	Mutazione	Molto rara
AApoA-II	Apolipoproteina A-II	Mutazione	Molto rara
AApoC-II	Apolipoproteina C-II	Mutazione	Molto rara
AApoC-III	Apolipoproteina C-III	Mutazione	Molto rara
AApoA-IV	Apolipoproteina A-IV	Sconosciuta	Molto rara
ACal	Calcitonina	Carcinoma midollare della tiroide	Molto rara

AL, amiloidosi da catene leggere libere; AA, amiloidosi reattiva a flogosi cronica; SAA, siero amiloide A; ALECT2, amiloidosi da fattore chemotattico leucocitario 2; AFib, amiloidosi da catena A α del fibrinogeno; AGel, amiloidosi da gelsolina; ALys, amiloidosi da lisozima; AApoA-I, amiloidosi da apolipoproteina A-I; AApoA-II, amiloidosi da apolipoproteina A-II; AApoC-II, amiloidosi da apolipoproteina C-II; AApoC-III, amiloidosi da apolipoproteina C-III; AApoA-IV, amiloidosi da apolipoproteina A-IV; ACal, amiloidosi da calcitonina;

forme di amiloidosi renale differiscono per patogenesi e terapia. Pertanto è fondamentale una corretta diagnosi differenziale che si basa sull'identificazione della proteina precursore dell'amiloide su tessuto biotico (aspirato di grasso periombelicale, biopsia di ghiandola salivare minore labiale, biopsia renale) mediante immunoistochimica in microscopia elettronica (4) e tecniche di analisi proteomica in spettrometria di massa (5,6) e sull'analisi del DNA. Come vedremo, il laboratorio di biochimica clinica, ha un ruolo cardine nella gestione dei pazienti con amiloidosi renale, specialmente nell'amiloidosi AL e AA, dove l'utilizzo di biomarcatori è alla base della diagnosi, della prognosi e della valutazione della risposta al trattamento.

AMILOIDOSI AL

Patogenesi

Nell'amiloidosi AL sistemica, la proteina precursore dell'amiloide è una catena leggera libera immunoglobulinica (CLL) prodotta da un clone B-cellulare midollare e che può depositarsi in tutti gli

organi e tessuti con l'eccezione del sistema nervoso centrale. Gli organi più colpiti sono il cuore e il rene, rispettivamente nell'80% e nel 65% dei casi (7).

Il clone B-cellulare si presenta più frequentemente come un piccolo clone plasmacellulare (infiltrato midollare mediano <10%), rientrando così nella maggioranza dei casi nel quadro di una gammopatia monoclonale di significato renale o clinico (MGRS/MGCS) (8,9). Tuttavia, raramente può presentare le caratteristiche di un linfoma linfoplasmacitico e, in rarissimi casi, di un linfoma della zona marginale (10,11).

Le caratteristiche principali del clone plasmacellulare amiloidogenico sono la restrizione clonale per l'isotipo lambda delle catene leggere nei 3/4 dei casi, la dipendenza da un efficiente funzionamento del proteasoma (che spiega l'efficacia clinica di farmaci inibitori del proteasoma nell'amiloidosi AL) (12,13), e l'elevata frequenza di alterazioni citogenetiche (circa il 90%), in particolar modo la traslocazione t(11;14) nel 50% dei casi e l'amplificazione 1q21 nel 20% (14). Le trisomie, invece, sono meno frequenti rispetto al mieloma multiplo, mentre la delezione del cromosoma

17 e le traslocazioni t(4;14) e t(14;16) sono osservate in meno del 10% dei casi (14,15).

L'isotipo lambda delle CLL ha una maggiore propensione a formare amiloide ed è presente nel 75% dei pazienti affetti da amiloidosi AL. Sono stati eseguiti numerosi studi al fine di comprendere i meccanismi di fibrillogenosi e di tropismo d'organo. Recentemente, due studi hanno caratterizzato in microscopia crioelettronica la struttura di due catene leggere lambda isolate dal cuore di due pazienti con amiloidosi AL cardiaca ed hanno dimostrato che il processo di alterato ripiegamento proteico della catena leggera dipende dalla sequenza della sua regione variabile (16,17). È interessante notare che la maggior parte delle CLL lambda amiloidogeniche è codificata da tre geni della regione variabile delle catene leggere immunoglobuliniche (IGLV): *IGLV2-14*, *IGLV6-57* e *IGLV3-1*. È stata inoltre osservata un'associazione tra il segmento genico IGVJ impiegato e l'interessamento d'organo. In particolar modo è stata osservata un'elevata prevalenza di coinvolgimento renale in presenza di *IGLV6-57* (18).

La patogenesi del danno d'organo nell'amiloidosi AL è in parte dovuta all'alterazione strutturale che i depositi di amiloide causano a livello tissutale. Tuttavia, diversi studi in vitro e su modelli animali, hanno dimostrato una diretta tossicità delle CLL amiloidogeniche isolate da pazienti con amiloidosi AL cardiaca (19-21). Questi studi indicano che, almeno per quanto concerne il danno cardiaco, esiste una proteotossicità diretta delle CLL amiloidogeniche che causa un aumento dello stress ossidativo con attivazione delle proteinchinasi attivate dal mitogeno p38 (MAPK) con conseguente morte cellulare (22,23).

La nostra conoscenza sulla patogenesi di altri tipi di danno d'organo è limitata. Nel coinvolgimento renale, le fibrille di amiloide si depositano a livello glomerulare, sovvertendone la struttura. Alcuni studi suggeriscono che le cellule mesangiali possano avere un ruolo nella genesi del danno renale nell'amiloidosi AL (24-26).

Il ruolo del Laboratorio

Diagnosi di amiloidosi AL renale

Il sospetto di amiloidosi AL renale deve essere posto in tutti i pazienti con gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS) con comparsa di albuminuria o sindrome nefrosica. Considerando che questi pazienti eseguono periodici controlli ematologici per la discrasia plasmacellulare nota, la ricerca sistematica di albuminuria rappresenta una semplice pratica che permette di giungere alla diagnosi di amiloidosi AL renale in uno stadio ancora pre-sintomatico (27).

Tuttavia, le manifestazioni cliniche dell'amiloidosi renale possono insorgere anche in pazienti in cui non è nota la presenza di una gammopatia monoclonale. Pertanto, l'amiloidosi AL renale deve essere considerata nella diagnosi differenziale di qualunque paziente con albuminuria o sindrome nefrosica non riferibile a diabete mellito.

Considerate le piccole dimensioni del clone B-cellulare responsabile della malattia, l'identificazione della componente monoclonale amiloidogenica richiede la combinazione di diversi metodi per ottenere una sensibilità adeguata: l'elettroforesi (capillare o su supporto solido) del siero, l'immunofissazione del siero e delle urine e la quantificazione delle CLL circolanti (28,29). I metodi utilizzati per la quantificazione delle CLL circolanti nel siero al momento più utilizzati sono due: uno è un metodo immunonefelometrico che utilizza una miscela di anticorpi policlonali (Freelite®, Binding Site, UK); l'altro, più recente, impiega anticorpi monoclonali (N-latex®, Siemens Healthineers, Germania). Nonostante queste due metodiche abbiano sensibilità diagnostica comparabile, la loro concordanza è subottimale. Pertanto, questi due test non sono intercambiabili, né confrontabili (30). È importante tener presente che tutti gli studi per l'identificazione di valori soglia per la definizione della prognosi alla diagnosi e per la valutazione della risposta nell'amiloidosi AL, sono stati eseguiti con la metodica Freelite®. Cionondimeno, uno studio eseguito su campioni di pazienti con mieloma multiplo smoldering, ha mostrato che la metodica N-latex® è comparabile alla metodica Freelite® per definire il rischio di progressione verso una forma di malattia attiva (31). Inoltre, a differenza della metodica Freelite® (32), la metodica N-latex® può essere utilizzata anche nei pazienti con insufficienza renale avanzata o terminale, mantenendo gli stessi limiti di riferimento utilizzati nei pazienti con funzionalità renale normale (33,34).

Sono al momento in corso di studio nuove procedure per l'identificazione di componenti monoclonali mediante l'uso di tecniche di spettrometria di massa (35).

La proteinuria delle 24 ore è al momento il marcatore di elezione per l'identificazione del coinvolgimento renale nell'amiloidosi AL (limite decisionale: 0,5 g/24 ore, con prevalenza di albuminuria, al fine di escludere i casi con esclusiva o prevalente proteinuria di Bence Jones, in assenza di significativa glomerulopatia protido-disperdente) (36). Tuttavia, questo esame richiede la raccolta delle urine delle 24 ore che, se non eseguita in modo corretto, può introdurre un importante errore preanalitico (37). Negli ultimi anni è stato pertanto valutato l'utilizzo del rapporto albuminuria/creatininuria (UACR) come indice per la definizione di interessamento renale in corso di amiloidosi AL sistemica. Questo indice ha mostrato una correlazione molto forte con la proteinuria delle 24 ore nell'amiloidosi AL (coefficiente r di Pearson: 0,90) (38). Recentemente, i ricercatori della Mayo Clinic hanno dimostrato che UACR è un marcatore sensibile e specifico per l'identificazione del coinvolgimento renale (valore decisionale: 300 mg/g, 30 mg/mmol/L), sebbene questi risultati necessitino ancora di una convalida (39).

Prognosi del danno renale

Sebbene nell'amiloidosi AL il danno renale sia caratterizzato inizialmente da proteinuria glomerulare,

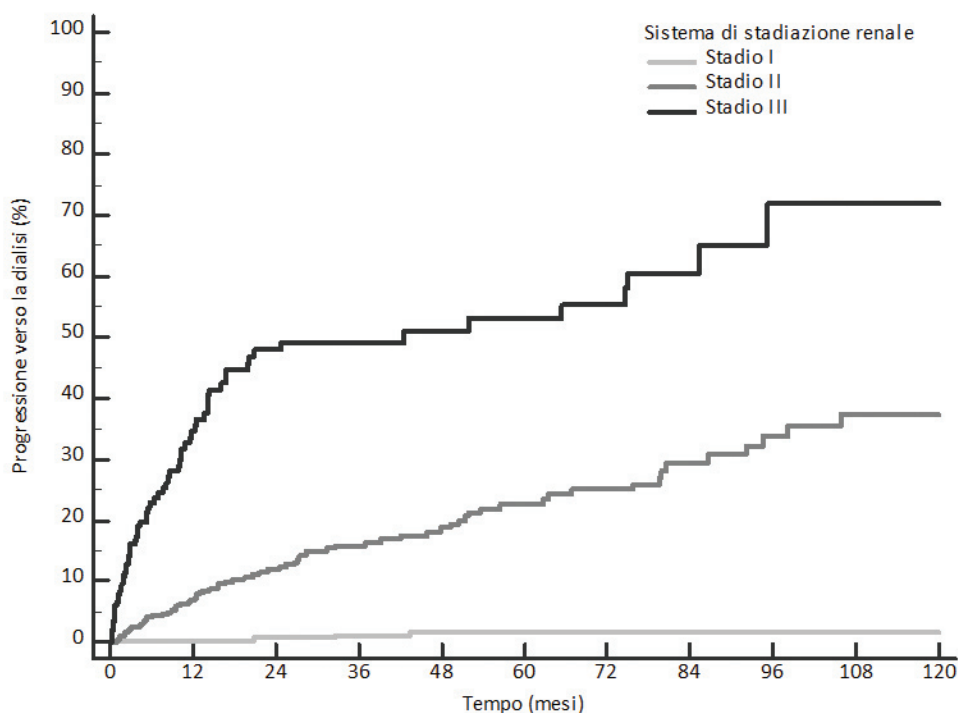


Figura 1

Sistema di stadiazione renale nell'amiloidosi AL.

Dati provenienti da 1378 pazienti con nuova diagnosi di amiloidosi AL valutati presso il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia tra il 2004 e il 2018. Lo stadio I comprende 648 pazienti, lo stadio II 528 e lo stadio III 168 (34 pazienti non sono stati inclusi per mancanza di dati). Tasso di dialisi a 2, 5 e 10 anni dalla diagnosi: 1%, 2% e 2% per lo stadio I; 12%, 23% e 37% per lo stadio II; 48%, 53% e 72% per lo stadio III.

questa può accompagnarsi nel tempo ad un'insufficienza renale che può progredire fino alla necessità di iniziare un trattamento sostitutivo. Identificare precocemente i pazienti a maggior rischio di progressione verso l'insufficienza renale terminale è importante per disegnare la corretta strategia terapeutica.

Il rischio di progressione verso l'insufficienza renale terminale nell'amiloidosi AL può essere stimato mediante un sistema di stadiazione renale basato sui biomarcatori, che comprende la proteinuria delle 24 ore e la velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) (40). I pazienti che hanno una proteinuria <5 g/24 ore e un eGFR >50 mL/min/1,73 m² (stadio I) hanno un rischio minimo di progressione verso un'insufficienza renale terminale. Questo rischio è moderatamente elevato nei pazienti in stadio II (proteinuria >5 g/24 ore o eGFR <50 mL/min/1,73 m²) e significativamente maggiore in quelli in stadio III (proteinuria >5 g/24 ore e eGFR <50 mL/min/1,73 m²; Figura 1).

Recentemente, i ricercatori della Mayo Clinic hanno proposto un sistema di stadiazione basato su UACR, sostituendo nel sistema di stadiazione attualmente in uso la proteinuria delle 24 ore con questo indice (valore decisionale: 3 600 mg/g, 360 mg/mmol) (39).

In uno studio europeo il fattore di crescita/differenziazione 15 (GDF-15) è emerso come un potenziale marcatore per definire la gravità del danno renale. La presenza di una concentrazione sierica di GDF-15 >4 000 µg/L alla diagnosi, correlava con un

aumentato rischio di progressione verso la dialisi (41).

Il laboratorio è in grado, inoltre, di identificare il grado di coinvolgimento cardiaco, grazie ad un sistema di stadiazione basato sui biomarcatori cardiaci [frammento aminotermiale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) e troponina cardiaca] (42,43). Questo sistema di stadiazione è utilizzato nella pratica clinica per identificare i pazienti più fragili e per decidere la strategia terapeutica più appropriata.

Risposta alla terapia

Principi di terapia. La terapia dell'amiloidosi AL è una chemioterapia diretta contro il clone B-cellulare ed ha l'obiettivo di raggiungere una rapida e profonda riduzione delle CLL amiloidogeniche che possa tradursi in un miglioramento della sopravvivenza e in una riduzione della disfunzione d'organo. La scelta terapeutica deve tener conto della fragilità generale dei pazienti e della gravità del danno d'organo (44,45). Inoltre, è stato dimostrato che la presenza di alterazioni citogenetiche nel clone plasmacellulare, in particolare modo della traslocazione t(11;14) e dell'amplificazione 1q21, possono influenzare l'efficacia di alcuni farmaci (46-48). Pertanto, anche queste anomalie del cariotipo possono contribuire al disegno della miglior strategia terapeutica.

I pazienti a basso rischio (20% dei casi) possono beneficiare di una terapia con l'agente alchilante melphalan ad alte dosi seguito da trapianto autologo di

cellule staminali emopoietiche (ASCT), che può essere preceduto da una terapia di induzione a base dell'inibitore del proteasoma bortezomib (49). L'induzione con bortezomib può essere parte di una strategia terapeutica sequenziale, dove l'ASCT viene proposto solo ai pazienti che non hanno ottenuto una risposta soddisfacente al bortezomib (50). I pazienti con amiloidosi AL renale, in assenza di coinvolgimento cardiaco, possono essere i pazienti ideali per una strategia terapeutica che preveda l'ASCT, purché la funzionalità renale sia ancora buona (51).

I pazienti a rischio intermedio (60-70% dei casi), non eleggibili all'autotrapianto, possono essere trattati con regimi a base di bortezomib o, in presenza di controindicazioni a questo farmaco, con uno schema a base di melphalan per os e desametasone. Dati recenti indicano che la combinazione di bortezomib e dell'anticorpo anti-CD38 daratumumab è particolarmente efficace (52,53).

I pazienti a rischio elevato (15% dei casi) sono estremamente fragili e richiedono l'impiego di schemi a dosaggi ridotti al fine di bilanciare il rischio della tossicità legata alla terapia con la necessità di ottenere una rapida risposta ematologica.

Esistono diverse terapie che possono essere proposte ai pazienti che recidivano dopo la terapia di prima linea. Tra queste, gli schemi a base di farmaci immunomodulatori (thalidomide, lenalidomide, pomalidomide) rappresentano il cardine della terapia di

salvataggio nei pazienti con amiloidosi AL refrattaria o recidivata (54). Tuttavia, la lenalidomide deve essere somministrata con cautela nei pazienti con amiloidosi AL renale, data la potenziale nefrotossicità di questo farmaco (55).

Un'altra possibilità per i pazienti recidivati è costituita dal daratumumab, un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene plasmacellulare di superficie CD38, che si è dimostrato molto efficace nei pazienti con amiloidosi AL recidivata/refrattaria (56-58). In particolare, uno studio ha mostrato un elevato tasso di risposta renale (60%) in pazienti esposti a questo farmaco (59).

Valutazione della risposta. Questa è valutata ogni due cicli al fine di poter decidere rapidamente se cambiare strategia terapeutica in caso di risposta non soddisfacente. La valutazione della risposta si basa sulla quantificazione delle CLL circolanti nel siero e sull'elettroforesi con immunofissazione del siero e delle urine.

Sono stati identificati quattro livelli di risposta ematologica, valutabili nei pazienti che alla diagnosi presentano una differenza tra l'isotipo coinvolto e non coinvolto delle catene leggere libere sieriche (dFLC) >50 mg/L: remissione completa (CR), risposta ematologica parziale molto buona, risposta parziale e non risposta (60,61). Recentemente, è stato proposto un nuovo criterio di risposta (risposta parziale con bassa dFLC), per i pazienti con dFLC compresa tra 20-50 mg/L (Tabella 2) (62,63). Questi criteri di risposta sono stati

Tabella 2

Criteri di risposta ematologica e renale nell'amiloidosi AL

Criteri di risposta	Definizione	Definizione aggiornata
CR	Assenza di componenti monoclonali all'immunofissazione del siero e delle urine e rapporto kappa/lambda delle CLL nella norma	Entrambi i criteri devono includere: - Assenza della catena leggera amiloidogena (sia libera che parte di un'immunoglobulina completa) definita da elettroforesi con immunofissazione del siero e delle urine negativa - Rapporto delle CLL nella norma o concentrazione della CLL non amiloidogena maggiore di quella amiloidogena con rapporto normale o alterato
VGPR	Raggiungimento di una dFLC <40 mg/L	Raggiungimento di una dFLC <40 mg/L
PR	Riduzione della dFLC >50% dalla diagnosi	Riduzione della dFLC >50% dalla diagnosi
PR con bassa dFLC*	Raggiungimento di una dFLC <10 mg/L	Raggiungimento di una dFLC <10 mg/L
NR	Tutti gli altri casi	Tutti gli altri casi
Risposta renale	Riduzione della proteinuria delle 24 ore >30% dalla diagnosi in assenza di una riduzione dell'eGFR >25%	Riduzione della proteinuria delle 24 ore >30% dalla diagnosi in assenza di una riduzione dell'eGFR >25%

CR, remissione completa; CLL, catene leggere libere; VGPR, risposta parziale molto buona; PR, risposta parziale; dFLC, differenza tra le catene leggere libere amiloidogeniche/non amiloidogeniche; NR, non risposta; eGFR, velocità di filtrazione glomerulare stimata.

**Sono valutabili per questo criterio di risposta i pazienti con una dFLC alla diagnosi tra 20-50 mg/L.*

identificati e convalidati in studi che hanno impiegato la metodica Freelite®. Non è noto se questi criteri siano validi anche quando la misurazione delle CLL circolanti nel siero è eseguita con la metodica N-latex® o con altri test in commercio. Pertanto, sarebbe preferibile eseguire la valutazione della risposta ematologica nell'amiloidosi AL utilizzando la metodica Freelite®.

Più profonda è la risposta ematologica, migliore è la sopravvivenza di questi pazienti. Al momento, è in corso un dibattito in merito alla valutazione della qualità della risposta ematologica. Due studi hanno recentemente riportato che una profonda riduzione della CLL amiloidogena dopo terapia (definita come una dFLC <10 mg/L o una concentrazione dell'isotipo coinvolto <20 mg/L) si associa ad una migliore sopravvivenza (64,65). Tuttavia, questi risultati provengono da singole casistiche di pazienti e mancano di una convalida esterna. Inoltre, un altro studio ha evidenziato che i pazienti che ottengono una CR (definita con elettroforesi con immunofissazione del siero e delle urine negativa e rapporto delle CLL sieriche nella norma) hanno una migliore prognosi rispetto a quelli che raggiungono una dFLC <10 mg/L o una concentrazione dell'isotipo coinvolto <20 mg/L (66). Sono al momento in corso di convalida nuove tecniche dotate di elevata sensibilità per la valutazione della profondità della risposta ematologica, come la spettrometria di massa per l'identificazione di componenti monoclonali su siero e urine (35). Inoltre, anche l'analisi di sequenziamento genetico di nuova generazione e la citofluorimetria sono stati valutati nell'amiloidosi AL per lo studio della malattia minima residua su sangue midollare (67). Recentemente, uno studio che ha impiegato tecniche di citofluorimetria di nuova generazione in pazienti con amiloidosi AL in CR dopo terapia, ha dimostrato che il 50% di questi mostrava segni di malattia minima residua a livello midollare (68).

La risposta ematologica può accompagnarsi ad un contestuale miglioramento del danno d'organo. La risposta renale può essere valutata verificando la presenza di una riduzione della proteinuria delle 24 ore dalla diagnosi, in assenza di una riduzione dell'eGFR (Tabella 2). I pazienti che raggiungono una risposta renale hanno un minor rischio di progressione verso la dialisi (40).

AMILOIDOSI AA

Patogenesi

L'amiloidosi AA è causata dalla persistenza di uno stato flogistico di lunga durata. La proteina precursore dell'amiloide, in questo caso, è la siero amiloide A (SAA), una proteina di fase acuta che ha un ruolo nella regolazione immunitaria, funge da opsonina nella fagocitosi batterica e modula il trasporto del colesterolo dai tessuti danneggiati (69). Il rene è colpito in quasi la totalità dei casi. Il secondo organo più coinvolto è il

fegato (20% dei casi), mentre l'interessamento cardiaco è molto raro (circa il 2%).

La SAA è prodotta dagli epatociti a seguito della stimolazione di diverse citochine infiammatorie, come interleuchina 1 (IL-1), interleuchina 6 (IL-6) e Tumor Necrosis Factor (TNF). Sono state identificate numerose condizioni che possono causare amiloidosi AA attraverso il sostenimento di uno stato infiammatorio prolungato (70). Tra queste figurano patologie reumatologiche/autoimmuni, patologie infettive croniche (tubercolosi, osteomielite, bronchiectasie), malattie infiammatorie gastrointestinali croniche, neoplasie ematologiche o di organo solido (malattia di Castleman) e rare malattie ereditarie [(febbre mediterranea familiare (FMF), sindrome periodica associata al recettore del TNF (TRAPS), sindrome periodica associata alle criopirine (CAPS)]. In alcuni casi, la causa del persistente stato flogistico rimane ignota. I casi in cui l'eziologia della flogosi cronica non è identificabile riguardano soggetti di età avanzata, più frequentemente di sesso femminile, che presentano un aumentato indice di massa corporea (BMI). È stato ipotizzato che l'obesità possa giocare un ruolo nel mantenimento dello stato infiammatorio nei pazienti con flogosi da causa sconosciuta (71). L'incidenza di amiloidosi AA è in calo nei Paesi occidentali, probabilmente come conseguenza dei nuovi farmaci disponibili in ambito reumatologico. Infatti, è stata osservata in particolar modo una riduzione dei casi di amiloidosi AA secondari a patologie reumatiche. È interessante notare che è stato osservato un parallelo aumento relativo dei casi secondari a patologie infettive croniche, nonché delle forme di amiloidosi AA secondaria a flogosi da causa non nota (72-74).

A prescindere dalla causa soggiacente allo stato infiammatorio, al persistere dello stato flogistico, la concentrazione di SAA può raggiungere una soglia che rende la proteina più suscettibile a depositarsi nei tessuti in forma di fibrille di amiloide (75). Le fibrille di amiloide sono costituite invariabilmente dal frammento aminotermine della SAA. Alcuni studi hanno dimostrato che il processo di fibrillogenesi richiede un rimodellamento proteolitico. Tuttavia non è chiaro se tale processo avvenga prima o dopo l'inizio del processo di alterato ripiegamento della SAA (76,77). Il processo di alterato ripiegamento proteico e di fibrillogenesi sembra inoltre favorito dalla presenza di glicosamminoglicani e dalle proteine della matrice extracellulare (78). Dal punto di vista fisiopatologico, il danno renale si presenta in tutti i casi con deposizione di amiloide a livello glomerulare. In alcuni casi possono essere osservati depositi di amiloide anche a livello interstiziale e delle pareti dei vasi sanguigni (79).

Non sono ancora del tutto definiti i fattori ambientali e genetici che possono predisporre i pazienti affetti da una patologia infiammatoria cronica a sviluppare amiloidosi AA. Tuttavia, alcuni studi indicano che il genotipo che codifica per l'isoforma 1 della SAA (SAA1)

può predisporre lo sviluppo di SAA in diversi gruppi etnici (80,81).

Il ruolo del Laboratorio

Il coinvolgimento renale nell'amiloidosi AA si presenta con proteinuria e, in alcuni casi, con insufficienza renale (82). In circa il 10% dei casi, i pazienti con amiloidosi AA sono già in uno stato di insufficienza renale terminale al momento della diagnosi. Anche in questa forma di amiloidosi, pertanto, è importante poter giungere ad una diagnosi precoce di amiloidosi AA, in modo da poter intervenire sulla malattia, prima che il danno renale sia irreversibile. Il laboratorio ha a disposizione diversi biomarcatori di danno renale, come l'albuminuria, la cistatina C e l'eGFR, che, se misurati periodicamente, possono rilevare un sospetto coinvolgimento renale nei pazienti con malattie infiammatorie croniche quando questo è ancora presintomatico (83,84). Il sospetto di amiloidosi dovrà poi essere confermato mediante dimostrazione e tipizzazione dei depositi di amiloide.

Prognosi

La valutazione dei biomarcatori di danno renale alla diagnosi identifica i pazienti in uno stato di malattia più avanzato. La presenza di una eGFR <45 mL/min/1,73 m² si associa ad una sopravvivenza ridotta. Altri fattori che

sembrano avere un impatto sulla sopravvivenza dei pazienti con amiloidosi AA sono l'età alla diagnosi (soglia: 55 anni), la presenza di una patologia infettiva alla base della flogosi e di condizioni predisponenti a infezioni ricorrenti, come le bronchiectasie. La gravità del danno renale all'esordio può essere stimata attraverso un sistema di stadiazione comprendente l'eGFR e la proteinuria delle 24 ore. Lo stadio I è definito da proteinuria delle 24 ore <4 g/24 ore e eGFR >35 mL/min/1,73 m², lo stadio II da proteinuria delle 24 ore >4 g/24 ore o eGFR <35 mL/min/1,73 m², mentre lo stadio III da proteinuria delle 24 ore >4 g/24 ore e eGFR <35 mL/min/1,73 m². I pazienti in stadio I hanno un rischio ridotto di progressione verso la dialisi, che risulta significativamente più elevato in quelli in stadio II e, in particolar modo, in stadio III (Figura 2) (85). Questo sistema di stadiazione richiede ancora di essere convalidato in una popolazione indipendente. Tuttavia, il valore prognostico di questi marcatori indica come i pazienti che giungono alla diagnosi con elevata proteinuria ed insufficienza renale avanzata siano quelli che necessitano quanto prima di una terapia efficace che possa arrestare la progressione del danno d'organo.

Risposta alla terapia

Principi di terapia. La terapia dell'amiloidosi AA si basa sul trattamento della patologia alla base della flogosi

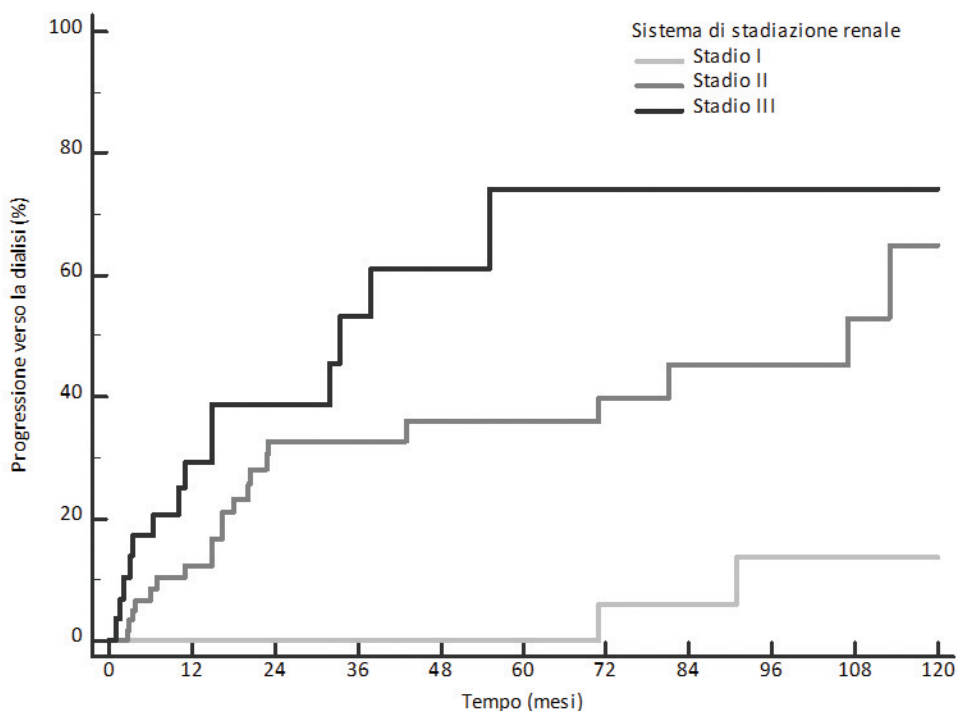


Figura 2

Sistema di stadiazione renale nell'amiloidosi AA.

Dati provenienti da 200 pazienti con nuova diagnosi di amiloidosi AA valutati presso il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia tra il 1991 e il 2016. Lo stadio I comprende 47 pazienti, lo stadio II 73 e lo stadio III 32 (48 pazienti non sono stati inclusi per mancanza di dati). Tasso di dialisi a 2, 5 e 10 anni dalla diagnosi: 0%, 0% e 14% per lo stadio I; 33%, 36% e 65% per lo stadio II; 39%, 74% e 74% per lo stadio III.

cronica ed ha come obiettivo il raggiungimento di una profonda riduzione della concentrazione di SAA che deve essere mantenuta nel tempo per evitare la progressione della malattia (82). Sebbene i dati siano limitati a piccole popolazioni di pazienti, gli agenti biologici si sono dimostrati efficaci nei pazienti con amiloidosi AA secondaria malattie reumatologiche (86,87). La colchicina è un farmaco efficace nei pazienti con FMF e amiloidosi AA (88). Nei pazienti refrattari al trattamento con colchicina, delle valide alternative terapeutiche sono costituite dall'anakinra, un antagonista del recettore di IL-1, e dal canakinumab, un anticorpo monoclonale "anti-IL-1 beta" (89,90). Nei pazienti con amiloidosi AA secondaria a flogosi di origine sconosciuta, l'anakinra rappresenta un'opzione terapeutica sicura ed efficace (91).

Valutazione della risposta. L'obiettivo della terapia per l'amiloidosi AA è il raggiungimento e mantenimento di una concentrazione di SAA quanto più bassa possibile, almeno <10 mg/L. Infatti, al di sotto di questa soglia, la malattia tende a rimanere stabile e, in alcuni casi, può essere osservata una progressiva regressione del danno d'organo, con miglioramento della sopravvivenza (82,92). Inoltre, il raggiungimento di una concentrazione di SAA

<10 mg/L dopo i primi sei mesi terapia può tradursi in un miglioramento della sopravvivenza renale (85) (Figura 3). Per questo motivo, la concentrazione di SAA dovrebbe essere misurata precocemente e continuativamente nel corso della terapia, in modo da poter cambiare strategia terapeutica se il controllo della flogosi non è soddisfacente. In assenza della possibilità di misurare la SAA, la proteina C reattiva può essere un valido biomarcatore per il monitoraggio di questi pazienti (93).

ALTRE FORME DI AMILOIDOSI RENALE

L'amiloidosi da fattore chemotattico leucocitario 2 (amiloidosi ALECT2) è una forma di amiloidosi acquisita a prevalente interessamento renale ed epatico (94). È la terza causa di amiloidosi renale negli Stati Uniti e colpisce prevalentemente alcuni gruppi etnici (ispanici, popolazioni americane autoctone, egiziani, indiani) (95-97). L'amiloidosi ALECT2 renale si manifesta con proteinuria e insufficienza renale, ma la progressione del danno renale è generalmente molto lenta.

L'amiloidosi renale da catena alfa del fibrinogeno (amiloidosi AFib) è la forma più comune di amiloidosi renale ereditaria in Europa e negli Stati Uniti (98,99). È causata da mutazioni nel gene che codifica la catena alfa

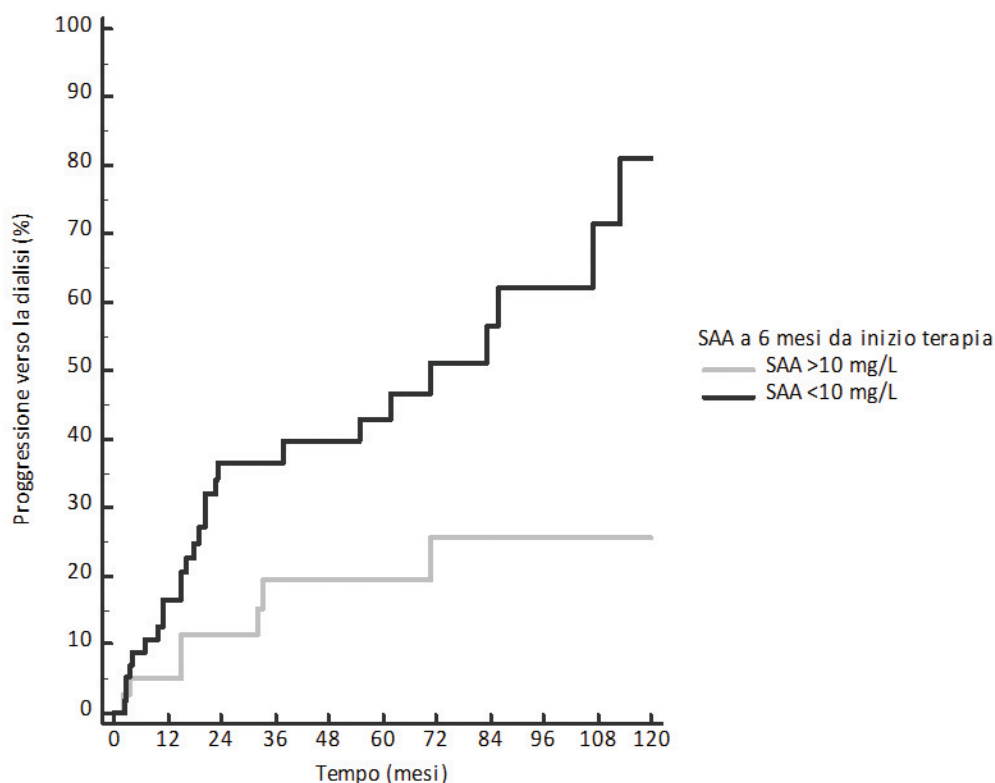


Figura 3. Progressione verso la dialisi in base alla riduzione della SAA dopo 6 mesi di terapia

Dati provenienti da 200 pazienti con nuova diagnosi di amiloidosi AA valutati presso il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia tra il 1991 e il 2016. I dati sulla concentrazione di SAA a 6 mesi dalla terapia erano disponibili il 98 pazienti. I pazienti con SAA <10 mg/L erano 39 e quelli con SAA >10 mg/L 59. Tasso di dialisi a 2, 5 e 10 anni dalla diagnosi: 12%, 20% e 25% per i pazienti con SAA <10 mg/L; 37%, 43% e 81% per i pazienti con SAA >10 mg/L.

del fibrinogeno e si presenta con proteinuria glomerulare e insufficienza renale, che può progredire rapidamente.

Le apolipoproteine sono proteine prodotte in gran parte dal fegato e deputate al trasporto di lipidi. Cinque tipi di apolipoproteine possono causare amiloidosi sistemica con coinvolgimento renale. La più frequente è l'amiloidosi da apolipoproteina A-I (amiloidosi AApoA-I). Questa è una forma di amiloidosi ereditaria autosomica dominante di cui sono state descritte più di 20 mutazioni. L'organo più frequentemente colpito è il rene e il danno renale si presenta con insufficienza renale con modestissima proteinuria (100). L'amiloidosi da apolipoproteina A-II (AApoA-II) è stata descritta per la prima volta nel 2001 e si manifesta principalmente con un interessamento renale caratterizzato da insufficienza renale, ipertensione arteriosa e proteinuria (101). L'amiloidosi da apolipoproteina C-II (amiloidosi AApoC-II) e da apolipoproteina C-III (amiloidosi AApoC-III) sono forme estremamente rare di amiloidosi renale ereditaria di cui sono stati ad oggi descritti pochi casi (102-104). L'amiloidosi da apolipoproteina A-IV si differenzia dalle altre per formare amiloidosi nel suo stato nativo, in assenza di mutazioni genetiche. La sua presentazione clinica è simile a quella dell'amiloidosi AApoA-I, con un coinvolgimento renale caratterizzato da insufficienza renale lentamente progressiva e proteinuria minima (105).

L'amiloidosi da lisozima (amiloidosi ALys) e da gelsolina (amiloidosi AGel) sono due forme molto rare di amiloidosi sistemica ereditaria. Nell'amiloidosi ALys il coinvolgimento renale si manifesta con insufficienza renale e si accompagna ad un interessamento gastrointestinale, caratterizzato da nausea, dispepsia e ulcerazioni gastriche con rischio di perforazione (106). Nell'amiloidosi AGel il coinvolgimento renale è presente nel 14% dei casi e si presenta con sindrome nefrosica che può progredire verso l'insufficienza renale terminale (107,108). Gli organi più colpiti in questa rara forma di amiloidosi sono la cornea, il sistema nervoso periferico, i nervi cranici e la cute (108).

In ultimo, l'amiloidosi da calcitonina (amiloidosi ACal) è una forma di amiloidosi che si osserva più comunemente localizzata alla tiroide in concomitanza di un tumore midollare della tiroide. Tuttavia, sono stati descritti alcuni casi in cui depositi di amiloide formati da calcitonina sono stati rilevati a livello renale, in sede di metastasi del tumore midollare della tiroide (109,110).

Non esiste una terapia specifica per queste forme di amiloidosi. In casi selezionati possono essere considerati il trapianto renale o il trapianto combinato di fegato e rene per le forme ereditarie in cui il fegato rappresenta la fonte del precursore amiloidogenico nei pazienti portatori della mutazione.

CONCLUSIONI

Le amiloidosi renali sono un gruppo di malattie rare che comprendono alcune forme più comuni, come l'amiloidosi AL e AA, e rarissime forme di amiloidosi ereditaria o acquisita. In ogni caso, queste malattie

possono presentarsi con un danno renale che può evolvere verso l'insufficienza renale terminale e limitare la qualità della vita. La diagnosi differenziale è fondamentale per iniziare quanto prima una terapia appropriata che possa preservare la funzionalità renale.

Nel contesto di queste malattie rare, l'utilizzo dei biomarcatori si è affermato per identificare la presenza di danno renale, valutarne la gravità e per verificare l'efficacia della terapia eseguita, specialmente nelle forme più comuni. Nell'amiloidosi AL, l'elettroforesi del siero, l'immunofissazione del siero e delle urine e la quantificazione delle CLL nel siero sono fondamentali per identificare la piccola componente monoclonale responsabile del danno renale. I biomarcatori di danno renale, in particolar modo la proteinuria delle 24 ore, l'eGFR e UACR, sono in grado di definire la gravità del danno renale alla diagnosi e di identificare i pazienti con un elevato rischio di progressione verso la dialisi. Nel corso della terapia specifica, la precoce misurazione delle CLL e della proteinuria delle 24 ore possono fornire importanti informazioni sull'efficacia della terapia che possono guidare la scelta terapeutica. Nell'amiloidosi AA, la quantificazione della proteinuria delle 24 ore e la valutazione dell'eGFR sono indispensabili per giudicare la gravità del danno renale alla diagnosi. Un continuo e costante monitoraggio della concentrazione della SAA è necessario nel corso della malattia e in particolar modo durante la terapia per verificarne l'efficacia.

In questo modo, il laboratorio di biochimica clinica conferma il suo ruolo insostituibile nel supportare il Clinico, fornendogli i dati necessari per poter prendere le decisioni cliniche e terapeutiche più appropriate anche nel caso di queste rare malattie renali.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:38.
2. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, et al. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 2020;27:217-22.
3. Westermarck P. Localized AL amyloidosis: a suicidal neoplasm? *Ups J Med Sci* 2012;117:244-50.
4. Fernández de Larrea C, Verga L, et al. A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidoses. *Blood* 2015;125:2239-44.
5. Vrana JA, Gamez JD, Madden BJ, et al. Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* 2009;114:4957-9.
6. Brambilla F, Lavatelli F, Di Silvestre D, et al. Reliable typing of systemic amyloidoses through proteomic analysis of subcutaneous adipose tissue. *Blood* 2012;119:1844-7.
7. Basset M, Nuvolone M, Palladini G, et al. Novel challenges in the management of immunoglobulin light

- chain amyloidosis: from the bench to the bedside. *Expert Rev Hematol* 2020;1-13.
8. Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. *Blood* 2006;108:2520-30.
 9. Dispenzieri A. Monoclonal gammopathies of clinical significance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2020;2020:380-8.
 10. Milani P, Merlini G. Monoclonal IgM-related AL amyloidosis. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016;29:241-8.
 11. Basset M, Defrancesco I, Milani P, et al. Nonlymphoplasmacytic lymphomas associated with light-chain amyloidosis. *Blood* 2020;135:293-6.
 12. Sitia R, Palladini G, Merlini G. Bortezomib in the treatment of AL amyloidosis: targeted therapy? *Haematologica* 2007;92:1302-7.
 13. Oliva L, Orfanelli U, Resnati M, et al. The amyloidogenic light chain is a stressor that sensitizes plasma cells to proteasome inhibitor toxicity. *Blood* 2017;129:2132-42.
 14. Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW, et al. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood* 2008;111:4700-5.
 15. Muchtar E, Dispenzieri A, Kumar SK, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization in untreated AL amyloidosis has an independent prognostic impact by abnormality type and treatment category. *Leukemia* 2017;31:1562-9.
 16. Rademaker L, Lin YH, Annamalai K, et al. Cryo-EM structure of a light chain-derived amyloid fibril from a patient with systemic AL amyloidosis. *Nat Commun* 2019;10:1103.
 17. Swuec P, Lavatelli F, Tasaki M, et al. Cryo-EM structure of cardiac amyloid fibrils from an immunoglobulin light chain AL amyloidosis patient. *Nat Commun* 2019;10:1269.
 18. Kourelis TV, Dasari S, Theis JD, et al. Clarifying immunoglobulin gene usage in systemic and localized immunoglobulin light-chain amyloidosis by mass spectrometry. *Blood* 2017;129:299-306.
 19. Liao R, Jain M, Teller P, et al. Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts. *Circulation* 2001;104:1594-7.
 20. Diomede L, Rognoni P, Lavatelli F, et al. Investigating heart-specific toxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chains: A lesson from *C. elegans*. *Worm* 2014;3:e965590.
 21. Mishra S, Guan J, Plovie E, et al. Human amyloidogenic light chain proteins result in cardiac dysfunction, cell death, and early mortality in zebrafish. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305:H95-103.
 22. Lavatelli F, Imperlini E, Orrù S, et al. Novel mitochondrial protein interactors of immunoglobulin light chains causing heart amyloidosis. *FASEB J* 2015;29:4614-28.
 23. Shi J, Guan J, Jiang B, et al. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4188-93.
 24. Teng J, Russell WJ, Gu X, et al. Different types of glomerulopathic light chains interact with mesangial cells using a common receptor but exhibit different intracellular trafficking patterns. *Lab Invest* 2004;84:440-51.
 25. Teng J, Turbat-Herrera EA, Herrera GA. Extrusion of amyloid fibrils to the extracellular space in experimental mesangial AL-amyloidosis: transmission and scanning electron microscopy studies and correlation with renal biopsy observations. *Ultrastruct Pathol* 2014;38:104-15.
 26. Teng J, Turbat-Herrera EA, Herrera GA. An animal model of glomerular light-chain-associated amyloidogenesis depicts the crucial role of lysosomes. *Kidney Int* 2014;86:738-46.
 27. Merlini G, Palladini G. Differential diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:595-603.
 28. Palladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. *Clin Chem* 2009;55:499-504.
 29. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1517-22.
 30. Palladini G, Jaccard A, Milani P, et al. Circulating free light chain measurement in the diagnosis, prognostic assessment and evaluation of response of AL amyloidosis: comparison of Freelite and N latex FLC assays. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1734-43.
 31. Henriot B, Rouger E, Rousseau C, et al. Prognostic value of involved/uninvolved free light chain ratio determined by Freelite and N Latex FLC assays for identification of high-risk smoldering myeloma patients. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:1397-405.
 32. Hutchison CA, Harding S, Hewins P, et al. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1684-90.
 33. Jacobs JF, Hoedemakers RM, Teunissen E, et al. N Latex FLC serum free light-chain assays in patients with renal impairment. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:853-9.
 34. Kennard A, Hawley C, Tate J, et al. Comparison of Freelite™ and N Latex serum free light chain assays in subjects with end stage kidney disease on haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1045-52.
 35. Milani P, Murray DL, Barnidge DR, et al. The utility of MASS-FIX to detect and monitor monoclonal proteins in the clinic. *Am J Hematol* 2017;92:772-9.
 36. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, et al. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis, Tours, France, 18-22 April 2004. *Am J Hematol* 2005;79:319-28.
 37. Benz-de Bretagne I, Perrier F, Piéroni L, et al. Preanalytical step of urinary protein measurement: from urine sampling to preparation for analysis of the specimen. *Ann Biol Clin (Paris)* 2018;76:609-16.
 38. Palladini G, Milani P, Basset M, et al. Urinary albumin to creatinine ratio in diagnosis and risk stratification of renal AL amyloidosis. *Amyloid* 2017;24:68-9.
 39. Visram A, Al Saleh AS, Parmar H, et al. Correlation between urine ACR and 24-h proteinuria in a real-world cohort of systemic AL amyloidosis patients. *Blood Cancer J* 2020;10:124.
 40. Palladini G, Hegenbart U, Milani P, et al. A staging system for renal outcome and early markers of renal response to chemotherapy in AL amyloidosis. *Blood* 2014;124:2325-32.
 41. Kastiris E, Papassotiriou I, Merlini G, et al. Growth differentiation factor-15 is a new biomarker for survival and renal outcomes in light chain amyloidosis. *Blood* 2018;131:1568-75.
 42. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004;22:3751-7.
 43. Wechalekar AD, Schonland SO, Kastiris E, et al. A European collaborative study of treatment outcomes in 346 patients with cardiac stage III AL amyloidosis. *Blood*

- 2013;121:3420-7.
44. Palladini G, Milani P, Merlini G. Management of AL amyloidosis in 2020. *Blood* 2020;136:2620-7.
 45. Nuvolone M, Milani P, Palladini G, et al. Management of the elderly patient with AL amyloidosis. *Eur J Intern Med* 2018;58:48-56.
 46. Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, et al. Gain of chromosome 1q21 is an independent adverse prognostic factor in light chain amyloidosis patients treated with melphalan/dexamethasone. *Amyloid* 2014;21:9-17.
 47. Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, et al. Translocation t(11;14) is associated with adverse outcome in patients with newly diagnosed AL amyloidosis when treated with bortezomib-based regimens. *J Clin Oncol* 2015;33:1371-8.
 48. Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, et al. Prognostic impact of cytogenetic aberrations in AL amyloidosis patients after high-dose melphalan: a long-term follow-up study. *Blood* 2016;128:594-602.
 49. Hwa YL, Kumar SK, Gertz MA, et al. Induction therapy pre-autologous stem cell transplantation in immunoglobulin light chain amyloidosis: a retrospective evaluation. *Am J Hematol* 2016;91:984-8.
 50. Basset M, Milani P, Nuvolone M, et al. Sequential response-driven bortezomib-based therapy followed by autologous stem cell transplant in AL amyloidosis. *Blood Adv* 2020;4:4175-9.
 51. Sidiqi MH, Nadiminti K, Al Saleh AS, et al. Autologous stem cell transplantation in patients with AL amyloidosis with impaired renal function. *Bone Marrow Transplant* 2019;54:1775-9.
 52. Palladini G, Kastiris E, Maurer MS, et al. Daratumumab Plus CyBORd for patients with newly diagnosed AL amyloidosis: safety run-in results of ANDROMEDA. *Blood* 2020;136:71-80.
 53. Kastiris E, Palladini G, Minnema CM, et al. Subcutaneous daratumumab + cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone (CyBORd) in patients with newly diagnosed light chain (AL) amyloidosis: primary results from the phase 3 ANDROMEDA study. Abstract for the EHA 2020 meeting 2020.
 54. Milani P, Palladini G. Conventional Therapy for Amyloid Light-Chain Amyloidosis. *Acta Haematol* 2020;143:365-72.
 55. Specter R, Sanchorawala V, Seldin DC, et al. Kidney dysfunction during lenalidomide treatment for AL amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:881-6.
 56. Sanchorawala V, Sarosiek S, Schulman A, et al. Safety, Tolerability, and Response Rates of Daratumumab in Relapsed AL Amyloidosis: Results of a Phase II Study. *Blood* 2020;135:1541.
 57. Roussel M, Merlini G, Chevret S, et al. A prospective phase II of daratumumab in previously treated systemic light chain amyloidosis (AL) patients. *Blood* 2020;135:1531-40.
 58. Kimmich CR, Terzer T, Benner A, et al. Daratumumab for systemic AL amyloidosis: prognostic factors and adverse outcome with nephrotic range albuminuria. *Blood* 2020;135:1517-30.
 59. Milani P, Fazio F, Basset M, et al. High rate of profound clonal and renal responses with Daratumumab treatment in heavily pre-treated patients with AL amyloidosis and high bone marrow plasma cell infiltrate. *Am J Hematol* 2020;95:900-5.
 60. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol* 2012;30:4541-9.
 61. Palladini G, Schönland SO, Sanchorawala V, et al. Clarification on the definition of complete haematologic response in light-chain (AL) amyloidosis. *Amyloid* 2021;1-2.
 62. Milani P, Basset M, Russo F, et al. Patients with light-chain amyloidosis and low free light-chain burden have distinct clinical features and outcome. *Blood* 2017;130:625-31.
 63. Dittrich T, Bochtler T, Kimmich C, et al. AL amyloidosis patients with low amyloidogenic free light chain levels at first diagnosis have an excellent prognosis. *Blood* 2017;130:632-42.
 64. Manwani R, Cohen O, Sharpley F, et al. A prospective observational study of 915 patients with systemic AL amyloidosis treated with upfront bortezomib. *Blood* 2019;134:2271-80.
 65. Muchtar E, Dispenzieri A, Leung N, et al. Optimizing deep response assessment for AL amyloidosis using involved free light chain level at end of therapy: failure of the serum free light chain ratio. *Leukemia* 2019;33:527-31.
 66. Milani P, Basset M, Nuvolone M, et al. Indicators of profound hematologic response in AL amyloidosis: complete response remains the goal of therapy. *Blood Cancer J* 2020;10:90.
 67. Kastiris E, Kostopoulos IV, Terpos E, et al. Evaluation of minimal residual disease using next-generation flow cytometry in patients with AL amyloidosis. *Blood Cancer J* 2018;8:46.
 68. Palladini G, Paiva B, Wechalekar A, et al. Minimal residual disease negativity by next-generation flow cytometry is associated with improved organ response in AL amyloidosis. *Blood Cancer J* 2021;11:34.
 69. Westermark GT, Fändrich M, Westermark P. AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annu Rev Pathol* 2015;10:321-44.
 70. Brunger AF, Nienhuis HLA, Bijzet J, et al. Causes of AA amyloidosis: a systematic review. *Amyloid* 2020;27:1-12.
 71. Blank N, Hegenbart U, Dietrich S, et al. Obesity is a significant susceptibility factor for idiopathic AA amyloidosis. *Amyloid* 2018;25:37-45.
 72. Lane T, Pinney JH, Gilbertson JA, et al. Changing epidemiology of AA amyloidosis: clinical observations over 25 years at a single national referral centre. *Amyloid* 2017;24:162-6.
 73. Laiho K, Tiitinen S, Kaarela K, et al. Secondary amyloidosis has decreased in patients with inflammatory joint disease in Finland. *Clin Rheumatol* 1999;18:122-3.
 74. Vasala M, Immonen K, Kautiainen H, et al. More evidence of declining incidence of amyloidosis associated with inflammatory rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 2010;39:461-5.
 75. Obici L, Merlini G. AA amyloidosis: basic knowledge, unmet needs and future treatments. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13580.
 76. Stix B, Kähne T, Sletten K, et al. Proteolysis of AA amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases-1, -2, and -3. *Am J Pathol* 2001;159:561-70.
 77. van der Hilst JC, Yamada T, Op den Camp HJ, et al. Increased susceptibility of serum amyloid A 1.1 to degradation by MMP-1: potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1651-4.
 78. Li JP, Galvis ML, Gong F, et al. In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6473-7.
 79. Said SM, Sethi S, Valeri AM, et al. Renal amyloidosis: origin and clinicopathologic correlations of 474 recent cases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8:1515-23.
 80. Nakamura T, Higashi S, Tomoda K, et al. Significance of SAA1.3 allele genotype in Japanese patients with

- amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:43-9.
81. van der Hilst JC. Recent insights into the pathogenesis of type AA amyloidosis. *ScientificWorldJournal* 2011;11:641-50.
 82. Lachmann HJ, Goodman HJ, Gilbertson JA, et al. Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *N Engl J Med* 2007;356:2361-71.
 83. Sato H, Kuroda T, Tanabe N, et al. Cystatin C is a sensitive marker for detecting a reduced glomerular filtration rate when assessing chronic kidney disease in patients with rheumatoid arthritis and secondary amyloidosis. *Scand J Rheumatol* 2010;39:33-7.
 84. Tishko AN, Lapin SV, Vavilova TV, et al. Early diagnostics of kidney damage in longstanding rheumatoid arthritis and amyloidosis. *Amyloid* 2011;18:217-8.
 85. Palladini G, Riva E, Basset M, et al. Prognostication of survival and progression to dialysis in AA amyloidosis. *Amyloid* 2017;24:136-7.
 86. Nakamura T, Higashi S, Tomoda K, et al. Effectiveness of etanercept vs cyclophosphamide as treatment for patients with amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:2064-9.
 87. Miyagawa I, Nakayamada S, Saito K, et al. Study on the safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor antibody, in patients with rheumatoid arthritis complicated with AA amyloidosis. *Mod Rheumatol* 2014;24:405-9.
 88. Zemer D, Pras M, Sohar E, et al. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1986;314:1001-5.
 89. Köhler BM, Lorenz HM, Blank N. IL1-blocking therapy in colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Eur J Rheumatol* 2018;5:230-4.
 90. De Benedetti F, Gattorno M, Anton J, et al. Canakinumab for the Treatment of Autoinflammatory Recurrent Fever Syndromes. *N Engl J Med* 2018;378:1908-19.
 91. Lane T, Wechalekar AD, Gillmore JD, et al. Safety and efficacy of empirical interleukin-1 inhibition using anakinra in AA amyloidosis of uncertain aetiology. *Amyloid* 2017;24:189-93.
 92. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, et al. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet* 2001;358:24-9.
 93. Stankovic Stojanovic K, Hentgen V, Fellahi S, et al. Concordance between CRP and SAA in familial Mediterranean fever during attack-free period: A study of 218 patients. *Clin Biochem* 2017;50:206-9.
 94. Benson MD, James S, Scott K, et al. Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein. *Kidney Int* 2008;74:218-22.
 95. Larsen CP, Kossman RJ, Beggs ML, et al. Clinical, morphologic, and genetic features of renal leukocyte chemotactic factor 2 amyloidosis. *Kidney Int* 2014;86:378-82.
 96. Larsen CP, Ismail W, Kurtin PJ, et al. Leukocyte chemotactic factor 2 amyloidosis (ALECT2) is a common form of renal amyloidosis among Egyptians. *Mod Pathol* 2016;29:416-20.
 97. Rezk T, Gilbertson JA, Rowczenio D, et al. Diagnosis, pathogenesis and outcome in leucocyte chemotactic factor 2 (ALECT2) amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* 2018;33:241-7.
 98. Gillmore JD, Lachmann HJ, Rowczenio D, et al. Diagnosis, pathogenesis, treatment, and prognosis of hereditary fibrinogen A alpha-chain amyloidosis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:444-51.
 99. Chapman J, Dogan A. Fibrinogen alpha amyloidosis: insights from proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2019;16:783-93.
 100. Gregorini G, Izzi C, Ravani P, et al. Tubulointerstitial nephritis is a dominant feature of hereditary apolipoprotein A-I amyloidosis. *Kidney Int* 2015;87:1223-9.
 101. Benson MD, Liepnieks JJ, Yazaki M, et al. A new human hereditary amyloidosis: the result of a stop-codon mutation in the apolipoprotein AII gene. *Genomics* 2001;72:272-7.
 102. Nasr SH, Dasari S, Hasadsri L, et al. Novel Type of Renal Amyloidosis Derived from Apolipoprotein-CII. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:439-45.
 103. Sethi S, Dasari S, Plaisier E, et al. Apolipoprotein CII Amyloidosis Associated With p.Lys41Thr Mutation. *Kidney Int Rep* 2018;3:1193-201.
 104. Valleix S, Verona G, Jourde-Chiche N, et al. D25V apolipoprotein C-III variant causes dominant hereditary systemic amyloidosis and confers cardiovascular protective lipoprotein profile. *Nat Commun* 2016;7:10353.
 105. Dasari S, Amin MS, Kurtin PJ, et al. Clinical, biopsy, and mass spectrometry characteristics of renal apolipoprotein A-IV amyloidosis. *Kidney Int* 2016;90:658-64.
 106. Sattianayagam PT, Gibbs SD, Rowczenio D, et al. Hereditary lysozyme amyloidosis -- phenotypic heterogeneity and the role of solid organ transplantation. *J Intern Med* 2012;272:36-44.
 107. Schmidt EK, Atula S, Tanskanen M, et al. Causes of death and life span in Finnish gelsolin amyloidosis. *Ann Med* 2016;48:352-8.
 108. Solomon JP, Page LJ, Balch WE, et al. Gelsolin amyloidosis: genetics, biochemistry, pathology and possible strategies for therapeutic intervention. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012;47:282-96.
 109. Koopman T, Niedlich-den Herder C, Stegeman CA, et al. Kidney Involvement in Systemic Calcitonin Amyloidosis Associated With Medullary Thyroid Carcinoma. *Am J Kidney Dis* 2017;69:546-9.
 110. Tan Y, Li DY, Ma TT, et al. Renal calcitonin amyloidosis in a patient with disseminated medullary thyroid carcinoma. *Amyloid* 2020;27:213-4.

Rene policistico: dall'ereditarietà complessa alla terapia

Carlotta Caprara^{1,2}, Valentina Corradi^{1,2}, Anna Curioni¹, Ofelia Pegoraro¹, Anna Giuliani², Fiorella Gastaldon²
e Claudio Ronco^{1,2,3}

¹International Renal Research Institute Vicenza (IRRIV), Ospedale di San Bortolo, Vicenza

²Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianti Renali, Ospedale di San Bortolo, Vicenza

³Dipartimento di Medicina (DIMED) Università di Padova

ABSTRACT

Policistic kidney disease: from genetic complexity to therapy.

Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is a major genetic disorder affecting up to 12.5 million individuals worldwide and it is the fourth most common global cause for renal replacement therapy.

ADPKD is a chronic, progressive condition characterized by the development and growth of cysts in the kidneys and other organs and by additional systemic manifestations. Two causative genes have been identified: *PKD1* and *PKD2*. ADPKD phenotype is highly variable intra and inter-family. Typically, ADPKD is an adult onset disease. However, occasionally, ADPKD manifests as very early onset disease. Heritability of ADPKD is a complex matter due to different causes such as hypomorphic alleles, digenic inheritance, mosaicism and modifier genes. The phenotypic variability of ADPKD can be explained at three genetic levels: genic, allelic and gene modifier effects. Recent advances in molecular screening for *PKD* gene mutations have generated considerable improvement regarding the knowledge of genetic basis of ADPKD. The purpose of this paper is to provide a comprehensive review of the genetics of ADPKD, focusing on new insights in genotype-phenotype correlation and explaining the tremendous heritability complexity. Evaluation of these new genetic information requires a multidisciplinary approach involving nephrologists and geneticists, taking care of patients (and their families) considering clinical and genetic aspects.

Parole chiave: rene policistico, ereditarietà complessa, variabilità genotipo-fenotipo

INTRODUZIONE

La malattia del rene policistico (Polycystic Kidney Disease, PKD) appartiene ad un gruppo eterogeneo di patologie che portano allo sviluppo di cisti renali, causate da mutazioni a carico di geni diversi il cui denominatore comune sembra rappresentato da una struttura definita "cilio primario". Per questo motivo, vengono collettivamente indicate con il termine di ciliopatie le cui caratteristiche cliniche rispecchiano l'ampia gamma di vie di segnali morfogenetici nei quali il cilio primario sembra implicato e che si manifestano quando la funzione dello stesso viene persa (1). A

seconda del meccanismo di ereditarietà, PKD, si suddivide in Rene Policistico Autosomico Dominante (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD) e Rene Policistico Autosomico Recessivo (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease, ARPKD).

ADPKD è la malattia genetica renale più frequente che colpisce la popolazione mondiale con un'incidenza di 1/1 000 nati vivi, (2) anche se una recente metanalisi (3) ha evidenziato una stima di prevalenza di 5:10 000 abitanti compatibile con la definizione di malattia rara adottata dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA). Si tratta di

Corrispondenza a: Carlotta Caprara, UOC Nephrology, Dialysis and Kidney Transplant, International Renal Research Institute (IRRIV), San Bortolo Hospital, viale Rodolfi, 3736100 Vicenza, Tel +39 0444 753889 /7712

Ricevuto: 26.02.2021

Revisionato: 08.04.2021

Accettato: 13.04.2021

Pubblicato on-line: 01.06.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.029

una malattia che coinvolge 12,5 milioni di individui nel mondo, senza distinzione di etnia e sesso anche se il sesso maschile sembra più suscettibile di una progressione più rapida (4). È una patologia caratterizzata principalmente, ma non esclusivamente, da coinvolgimento renale con sviluppo progressivo e bilaterale, età-dipendente, di cisti renali e aumento volumetrico dei reni responsabili della progressiva perdita della funzionalità che porta ad insufficienza renale cronica terminale (End Stage Renal Disease, ESRD) che determina, per il paziente, la necessità di una terapia sostitutiva. ADPKD è una malattia a penetranza completa, con esordio tardivo, tipicamente nell'età adulta, tra la terza e quarta decade di vita, nonostante siano stati identificati casi di esordio molto precoce e grave (5).

Lo sviluppo e crescita di cisti e l'aumento delle dimensioni del rene, sono progressivamente associate ad una riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) che rimane stabile fino a quando non si raggiunge un tasso di distruzione del parenchima renale di almeno il 50%. Tale stabilità, attribuibile all'effetto compensatorio e all'iper-filtrazione messa in atto dalla porzione di nefroni non colpita da ADPKD (6), consente di spiegare il caratteristico mantenimento di una GFR stabile, nella maggior parte dei pazienti ADPKD, fino alla terza/quarta decade di vita.

Le manifestazioni cliniche e le complicanze renali sono l'ipertensione arteriosa, il dolore addominale, l'infezione o emorragia delle cisti con possibile macroematuria e la nefrolitiasi (7). L'ipertensione si riscontra precocemente nell'ADPKD: nel 50-70% dei casi si manifesta prima di qualsiasi riduzione significativa della GFR (8). ADPKD è considerata una malattia sistemica che, oltre a manifestazioni cliniche renali, presenta anche un ampio spettro di manifestazioni cliniche extra-renali: gli aneurismi intracranici (ICA) e il fegato policistico (PLD) sono fra le manifestazioni più comuni. Queste, insieme alla gravità della malattia e all'età di insorgenza dell'ESRD, variano ampiamente tra gli individui affetti anche all'interno della stessa famiglia, andando a determinare la sorprendente variabilità fenotipica che la caratterizza.

ADPKD, è meno comune della forma dominante (ADPKD) e si manifesta con un'incidenza da 1:10 000 a 1:40 000 nati vivi (9). Caratterizzata dalla presenza di malattia policistica renale e da fibrosi epatica congenita, questa si distingue dalla forma dominante, oltre che per una variabilità intra-familiare meno marcata rispetto a quella inter-familiare, principalmente per il suo esordio molto precoce che tipicamente inizia già in utero e per un differente coinvolgimento genico che vede implicate, per la maggior parte dei casi di ADPKD, mutazioni a carico del gene *PKHD1* presente sul cromosoma 6 p21.1-p12 e, come descritto più recentemente, varianti patogene bialleliche nel gene *DZIP1L* (10).

ETEROGENITÀ GENETICA E ALLELICA

ADPKD è geneticamente eterogenea. Due sono i geni principalmente associati alla malattia: *PKD1* (MIM: 601313) e *PKD2* (MIM: 173910). Mutazioni nel gene *PKD1* rappresentano il 72-75% mentre quelle nel gene *PKD2* il 15-18% delle famiglie ADPKD, con una percentuale del 7-10% di casi ADPKD geneticamente non risolti (GUR).

Il locus di *PKD1* è stato identificato nel 1985 (11,12) nel cromosoma 16 (16p13.3). Successivamente, nel 1994 (13) l'individuazione di una famiglia affetta da ADPKD, caratterizzata da una traslocazione cromosomica bilanciata a livello del locus di *PKD1*, ne ha permesso la clonazione. La regione genomica di *PKD1* ha una struttura complessa: la porzione del gene che va dall'esone 1 all'esone 33 è duplicata in 6 pseudogeni (*PKD1P1-PKD1P6*) ad alta omologia di sequenza (>95%). Ne deriva che solo la porzione 3' terminale del gene, corrispondente agli esoni 34-46, non è duplicata, cosa che ha rallentato di molto il sequenziamento completo di *PKD1* e ostacola a tutt'oggi, sotto il profilo tecnico, la ricerca delle mutazioni nel gene. Il gene *PKD2* è stato identificato nel 1993 (14) nel cromosoma 4 (4q21-q23) e poi clonato nel 1996. *PKD1* codifica per una proteina di 4303 aminoacidi, la Policistina-1 (PC1) (11) una proteina integrale di membrana, caratterizzata da un'ampia regione extra-cellulare N-terminale (~ 3074 aa), una regione intracellulare C-terminale (~ 197 aa) e 11 domini transmembrana. Il gene *PKD2* codifica per una proteina che costituisce un canale cationico non selettivo permeabile al Ca⁺⁺, il Transient Receptor Potential Polycystic, TRPP2 comunemente chiamato PC2 (15) che interagisce con PC1. La struttura delle policistine è stata dedotta in base a studi di omologia con proteine già descritte in banche dati (11). Entrambe appartengono alla sub-famiglia dei TRPP che determinano variazioni transitorie di potenziale appartenenti alla famiglia dei canali TRP (Transient Receptor Potential) e insieme costituiscono il complesso delle policistine. Mentre PC2 possiede caratteristiche strutturali (sei domini transmembrana) e funzionali (permeabilità a cationi) tipiche della famiglia dei TRP, PC1 si differenzia poiché possiede una struttura tipica di un recettore o di una molecola di adesione.

La cellula dell'epitelio tubulare renale è una cellula normalmente ben differenziata, non ha processi apoptotici, ed è polarizzata. Presenta nel versante apicale un ciglio sensibile alle variazioni del flusso dell'urina. PC1 e PC2 localizzate sulla membrana e sulle ciglia del tubulo renale nella regione carbossi-terminale interagiscono tra di loro e con molte altre proteine. Studi sull'epitelio tubulare renale hanno evidenziato infatti che il ciglio è costituito da diverse proteine, tra cui PC1 e PC2, che possono intervenire nella regolazione del ciclo cellulare. In particolare PC1 localizzata sulla membrana del ciglio, agisce come meccanolettore (16,17). A seguito delle deformazioni provocate dal flusso urinario, il ciglio funge da trasduttore sensoriale, determinando

un aumento del flusso di Ca⁺⁺ all'interno della cellula, mediato dall'apertura del canale al Ca⁺⁺, ad opera del complesso PC1/PC2. Questa ipotesi è rafforzata da altri dati che indicano l'abolizione di questo flusso intracellulare in cellule in cui siano state soppresse PC1 e PC2 (16). La presenza di una mutazione patogenetica in *PKD1* o *PKD2* determina l'inattivazione o la riduzione del complesso PC1-PC2 con una conseguente diminuzione della concentrazione intracellulare del calcio; la cellula cambia fenotipo prevalentemente in secretivo e perde la sua polarità.

Recentemente altri due geni sono stati associati a casi ADPKD irrisolti: il gene *GANAB* (18) (MIM: 104160,11q12.3) e il gene *DNAJB11* (19) (MIM: 611341, 3q27.3). L'analisi genetica di famiglie ADPKD-GUR ha evidenziato varianti troncanti nel gene *GANAB* associate ad un fenotipo più lieve con l'ingrandimento renale dovuto a poche grandi cisti (18). Tredici differenti varianti da perdita di funzione nel gene *DNAJB11* (20) sono state identificate in 54 individui affetti appartenenti a 20 famiglie ADPKD con fenotipo ADPKD caratterizzato da reni policistici di normale dimensione, progressiva fibrosi interstiziale ed ESRD tardiva.

VARIABILITÀ GENOTIPO-FENOTIPO

Nell'ADPKD si osserva una variabilità clinica intra- e inter-familiare importante che si può spiegare attraverso tre aspetti (21): variabilità di locus (tipo gene coinvolto), variabilità allelica (posizione o tipo di mutazione) e variabilità dovuta altri fattori genetici e ambientali.

Ravine et al. già nel 1992 (22) hanno dimostrato che i pazienti "non-*PKD1* linked" presentavano un fenotipo più mite con una sopravvivenza maggiore e un minor rischio di ESRD, rispetto a quelli "*PKD1*-linked". Anche Hatebor et al. alla fine degli anni '90 (23) hanno evidenziato un'insorgenza più precoce di ESRD nei pazienti con mutazioni nel gene *PKD1* [età mediana 53,0 anni (intervallo di confidenza al 95%, IC95% 51,2–54,8)] rispetto a quelli con mutazioni in *PKD2* (69,1 anni; IC95% 66,9–71,3).

Nel 2002 Rossetti et al. (24) hanno dimostrato che la posizione della mutazione in *PKD1* correlava con la gravità. Pazienti con mutazioni nella regione 5' avevano un fenotipo significativamente più grave rispetto ai pazienti con mutazione nell'estremità 3' con una età mediana di ESRD rispettivamente di 53 e 56 anni. Successivamente nel 2013 Cornec-Le Gall et al. (25) con lo studio GENKYST hanno confermato l'effetto genico: l'età mediana di ESRD era di 58,1 anni, IC95%, 56,5–59,9 nei pazienti con mutazioni nel gene *PKD1* rispetto ai 79,7 anni, IC95%, 76,8–82,6 nei pazienti *PKD2*. Per quanto riguarda l'effetto allelico sul fenotipo, a differenza dei precedenti studi, lo studio GENKYST ha dimostrato come il tipo di mutazione nel gene *PKD1* fosse fortemente correlato con la sopravvivenza renale e non invece la sua posizione: l'età mediana di ESRD dei pazienti con mutazioni troncanti (frameshift, nonsense, splice mutations, e grandi riarrangiamenti) era significativamente diversa (55,6 anni, IC95%, 53,6–57,7)

rispetto ai pazienti con mutazioni non troncanti (in-frame e missenso) (età mediana di 67,9 anni, IC95%, 62,4–73,4) nel gene *PKD1*.

Altri studi hanno, inoltre, suggerito come alcune mutazioni missenso di *PKD1*, agiscano come alleli ipomorfi e siano quindi associate a forme lievi o atipiche di ADPKD (26).

Nel 2016 lo studio prospettico di coorte del Toronto Genetic Epidemiology Study of PKD (TGESP) (27), che ha esaminato 220 famiglie ADPKD non imparentate tra loro, ha confermato questo effetto allelico correlato al tipo di mutazione. Pazienti con mutazioni *PKD1* troncanti avevano un'età mediana di ESRD di 52,5 anni, IC95% 51,2–53,9 rispetto a quelli con mutazioni nel gene *PKD2* (80,0 anni, IC95% 77,1 - 82,8). Esiste una relazione genotipo-fenotipo anche per quando riguarda le manifestazioni extrarenali e a seconda del sesso. I portatori di mutazioni a carico di *PKD1* hanno generalmente una diagnosi di ipertensione più precoce, che avviene 10 anni prima rispetto ai portatori di mutazioni a carico di *PKD2*. Si è anche visto come soggetti maschi, con mutazioni in *PKD1*, presentino una sopravvivenza renale minore rispetto alle donne riportanti la medesima tipologia di mutazione (l'età media della manifestazione di ESRD risulta essere 56,1 anni per i maschi contro 59,5 anni delle donne). Tale correlazione non è, invece, stata individuata in soggetti maschi e femmine portatori di mutazioni in *PKD2* (28).

L'identificazione dei geni *PKD1* e *PKD2* ha suscitato un grande interesse relativamente alle loro varianti; nonostante le difficoltà incontrate, a causa dell'alto livello di eterogeneità allelica, nel 2007 è stato sviluppato un database (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Mutation Database: PKDB database, <http://pkdb.mayo.edu>) che racchiude tutte le varianti patogeniche germinali e somatiche, i polimorfismi e le varianti indeterminate nei geni *PKD1* e *PKD2*. Il rationale di tale database deriva dal fatto che non sono stati evidenziati hot spots e le mutazioni fino ad ora individuate nelle famiglie studiate, sono mutazioni pressochè private: per entrambi i geni è raro identificare la stessa mutazione in famiglie diverse.

La mutazione germinale, da sola, non giustifica la vasta variabilità intra-familiare che caratterizza ADPKD. Diversi fattori svolgono un ruolo fondamentale tra cui il background genetico dei soggetti.

Inoltre sono stati dimostrati diversi meccanismi, oltre all'aspetto genetico, che possono favorire la cistogenesi (effetto soglia e modello dei due colpi, come esplicitato più avanti).

Takakura et al. nel 2009 hanno osservato in un modello animale di patologia cistica umana, che il danno renale o altri danni causati da fattori genetici e non, riattivano programmi di sviluppo renale che aumentano la proliferazione cellulare che a sua volta promuove la rapida progressione delle cisti. Queste osservazioni hanno permesso di concludere che in pazienti ADPKD i danni renali acuti subclinici, possono contribuire alla rapida progressione della malattia e quindi ad un fenotipo più grave. Questo è stato definito modello del

“terzo colpo” che prevede cioè un terzo evento, oltre alla mutazione germinale e quella somatica, che contribuisce alla cistogenesi (29). Un altro gruppo ha descritto il così detto “effetto palla di neve” nel quale fattori locali che insorgono da una ciste individuale promuovono la dilatazione dei tubuli circostanti che evolvono quindi in una ciste franca e in un cluster di cisti (30), evidenziando come eventi locali possono contribuire al fenotipo individuale.

EREDITARITÀ COMPLESSA

L'elevata eterogeneità allelica del gene *PKD1* può dare origine a condizioni di eterozigosi che non sempre si associano ad un quadro classico di malattia come abbiamo già visto in parte precedentemente. Ad esempio, studi recenti hanno riportato:

- mutazioni missenso che possono agire come ipomorfe ovvero consentendo un residuo di funzionalità della proteina;
- mutazioni in trans-eterozigosi: doppia eterozigosi per due mutazioni presenti su diversi cistogeni o anche geni modificatori che sono in grado di modificare la severità della malattia;
- mosaicismo (due linee cellulari geneticamente distinte in un individuo). Ad esempio mosaicismo somatico come risultato di una mutazione patogenetica insorta durante gli stadi iniziali dell'embriogenesi che viene poi ereditata nella progenie successiva come mutazione germinale;
- altri geni coinvolti (geni che codificano per altre cistoproteine o proteine aventi un ruolo nei meccanismi di azione molecolare di *PKD1* e *PKD2* come *GANAB* e *DNAJB11* o *PKHD1*, *DZIP1L* e *HNF1β*). Mutazioni in questi geni possono determinare l'aggravamento del fenotipo clinico della malattia che ne risulta principalmente influenzata in termini di esordio precoce e gravità della presentazione o mimare il fenotipo ADPKD (fenocopie).

Alleli ipomorfi

L'elevata eterogeneità allelica del gene *PKD1* può dare origine a condizioni di eterozigosi che non sempre si associano ad un quadro classico di malattia. In studi recenti sono state riportate mutazioni missenso che possono agire come ipomorfe (26); tali mutazioni consentono un residuo di funzionalità della proteina oppure determinano una riduzione del trascritto genico e del corrispondente prodotto proteico. L'effetto fenotipico può variare da assenza di segni clinici a forme lievi di malattia. Le mutazioni ipomorfe possono inoltre modificare il quadro clinico in base alla combinazione con altre mutazioni ipomorfe sull'altro allele (in *trans*) o alla combinazione con mutazioni patogenetiche (in *cis* o in *trans*).

Rossetti et al. (31) per primi hanno descritto due famiglie di consanguinei in cui segregavano mutazioni ipomorfe in *PKD1*: i soggetti con singola mutazione

presentavano una forma lieve di malattia, mentre i soggetti che ereditavano entrambi gli alleli mutati, in omozigosi, presentavano una forma tipica o grave. Infatti gli alleli ipomorfi sono riportati in pazienti con fenotipi lievi e in individui sani, ma possono essere causa di fenotipi gravi ed esordi precoci di malattia se sono presenti in *trans* con una variante patogenetica (32).

È stato dimostrato che non è strettamente necessaria un'inattivazione biallelica completa, in quanto la cistogenesi può essere innescata da livelli inferiori al 10-20% di PC1 “wild-type” (wt), (come dettagliato successivamente). Alleli ipomorfi possono contribuire a questo fenomeno, portando ad avere anche fenotipi più lievi in pazienti ADPKD con mutazioni nel gene *PKD1* (26).

Le diverse combinazioni alleliche si possono quindi tradurre in un *continuum* che va da un fenotipo con pochi o assenti segni clinici fino ad un fenotipo di ADPKD grave ad esordio precoce che può mimare forme di rene policistico autosomico recessivo infantile (33,34).

Ereditarietà digenica o trans-eterozigotà

Un'ulteriore causa di variabilità nelle manifestazioni dell'ADPKD è rappresentata dall'ereditarietà di-genica o trans-eterozigotà. Questa condizione è la doppia eterozigosi per due mutazioni presenti su diversi cistogeni come ad esempio una mutazione non-troncante in *PKD1* in combinazione con una mutazione a carico di *HNF1β*, *PKD2* o *PKHD1* (35).

Nel 2015 Gainullin et al. (36) hanno dimostrato che la policistina 2 è essenziale per la maturazione e la giusta collocazione della policistina 1, agendo da chaperon essenziale regolandone quindi la maturazione; il livello di policistina 1 matura è determinante sia per i pazienti con mutazioni germinali in *PKD1* che *PKD2*, indicando che combinazioni di mutazioni in *PKD1* e/o *PKD2* impattano sul complesso proteico e possono modulare il fenotipo. Infatti, Koptides et al. (37), nel 2000, studiando una famiglia ADPKD con linkage *PKD*, hanno proposto un modello di trans-eterozigotà, osservando che non tutte le cisti dei pazienti analizzati erano causate da una perdita di funzione dell'allele wt di *PKD1*. La mutazione germinale in *PKD1* era associata ad una mutazione somatica in *PKD2*, generando uno stato di trans-eterozigotà con mutazioni in entrambi i geni (37).

Questo concetto della trans eterozigotà può interessare le mutazioni sia germinali che somatiche. Si possono osservare combinazioni di alleli (di cui uno ipomorfo) a livello germinale oppure innesco di cistogenesi a livello somatico in cui la mutazione germinale interessa *PKD1* o *PKD2* e la mutazione somatica l'altro gene.

Mosaicismo

Il termine mosaicismo indica la presenza di due popolazioni di cellule aventi differenti genotipi in un singolo individuo. Questo contesto potrebbe essere causa di PKD in pazienti senza una storia familiare

apparente e potrebbe essere la spiegazione per alcuni casi in cui nessuna mutazione in *PKD1* e *PKD2* viene rilevata. Inoltre, il mosaicismo viene spesso identificato come origine dei casi di *PKD* unilaterali o asimmetrici (38). Si possono distinguere tre diverse sindromi cliniche: mosaicismo somatico, mosaicismo gonadico o entrambi (39).

L'incidenza di eventi di mosaicismo nel corpo umano è sottostimata, ma il mosaicismo deve essere considerato in un paziente con una patologia lieve e genitori sani o con un pattern di trasmissione non chiaro. Inoltre, una mutazione apparentemente *de novo* potrebbe essere la conseguenza di un mosaicismo somatico/germinale in un genitore sano (32).

Mantovani et al. (32) hanno osservato in una coorte di 212 pazienti che tra i pazienti senza storia familiare apparente (23,3%), un paziente era un mosaico, non mostrando mutazioni o riarrangiamenti in *PKD1* o *PKD2*. Tuttavia, è stata rilevata una delezione di 2 bp nell'esone 30 del gene *PKD1* in 40 delle 252 sequenze analizzate. Un altro paziente presentava un mosaico di cellule: la madre di un figlio affetto (con una mutazione splicing in eterozigosi in *PKD1* e che presentava la forma grave della malattia) mostrava la sua stessa mutazione in *PKD1* in 156 di 2 139 sequenze, rivelando il 6,9% di mosaicismo nel sangue periferico.

Hopp et al. (38) hanno mostrato in una coorte di 106 famiglie studiate che il mosaicismo era gonadico e somatico in 5 famiglie, mentre 15 presentavano mosaicismo somatico in *PKD1*. L'analisi dell'eGFR (estimated glomerular filtration rate) e HtTKV (height adjusted total kidney volume) nei casi di mosaico rispetto a quelli che non presentano mosaico (presi da una popolazione *PKD1* della Mayo Clinic con mutazioni simili) ha rivelato che il primo di questi parametri è più elevato nei mosaici. Ciò suggerisce che i mosaici mostrino generalmente la forma meno grave della malattia, anche se il livello dell'allele mutante nel rene può variare rispetto a quello presente nelle cellule del sangue. Basandosi sulla metodologia utilizzata, è stato stimato che in una tipica popolazione ADPKD circa l'1% è un mosaico, mentre tra i casi irrisolti senza storia familiare apparente di *PKD*, il 10% potrebbe essere spiegato da mosaicismo (38).

In un altro studio, Iliuta et al. (39) hanno diagnosticato il mosaicismo in 3 famiglie tra 32 casi *de novo* rilevati in una popolazione di 210 probandi affetti. Due famiglie presentavano mosaicismo gonadico, in una delle quali due fratelli affetti avevano genitori sani. Una famiglia presentava mosaicismo somatico. Per 7 su 34 pazienti con manifestazione atipica della malattia, si è ipotizzato o confermato mosaicismo somatico.

La diagnosi non è semplice in quanto il sequenziamento Sanger spesso non è in grado di rilevare la mutazione patogenetica a causa del basso rapporto segnale-rumore derivante dalla diluizione delle cellule mutanti e dal grado variabile di tessuto coinvolto nell'individuo affetto (39).

Fenocopie e geni modificatori

Per fenocopie di ADPKD si intendono quelle patologie cistiche che hanno una presentazione con quadri clinici simili o sovrapponibili ad ADPKD ma che sono determinate da genotipi differenti. Il quadro clinico tipico di ADPKD può essere mimato da mutazioni in altri geni, che potrebbero essere scoperti e associati in un secondo momento poiché la ricerca sempre più ad ampio spettro mediante Next Generation Sequencing (NGS) permette l'analisi contemporanea di moltissimi geni. A questo complesso quadro, si possono aggiungere eventuali mutazioni in geni modificatori che contribuiscono al quadro clinico. Queste considerazioni sottolineano come sia necessaria una considerazione *ad hoc* per quei pazienti che non presentano mutazioni nei geni *PKD1* e *PKD2*, e per i quali sono state individuate mutazioni in altri geni in qualche modo associati ad ADPKD. Si ritiene infatti che lo 0,3% dei casi totali sia dovuto a mutazioni nei geni *GANAB* e *DNAJB11* (32).

Anche il gene *ALG9* è coinvolto nelle manifestazioni lievi di ADPKD. Esso codifica per l' α -1,2-mannosiltransferasi, un enzima utile per la N-glicosilazione delle proteine nascenti nel reticolo endoplasmatico (40). Mutazioni in questi geni possono ridurre la quantità utile di policistina 1, proteina codificata dal gene *PKD1*, compromettendo le modificazioni post-traduzionali e il trasporto verso la membrana cellulare e modificando, di conseguenza, la gravità delle cisti in un contesto ADPKD. Un referto ecografico atipico si osserva nel 16% dei pazienti con sospetta ADPKD. Per i pazienti con disfunzione renale avanzata ma cisti ridotte e per tutti i casi in cui non si riscontra ingrossamento del rene, la diagnosi differenziale dovrebbe includere PKD causata da mutazioni in *DNAJB11* o *ALG9* (40).

Le manifestazioni prenatali di ADPKD sono rare ma ricorrenti in alcune famiglie, suggerendo un substrato genetico comune. Alcuni pazienti portano infatti mutazioni in *HNF1 β* o *PKHD1* (41). *HNF1 β* è un'omeoproteina espressa principalmente negli epitelii renale, pancreatico ed epatico. Nel rene, l'inattivazione del gene che codifica per questa proteina porta alla formazione di cisti (42).

PATOGENESI-CISTOGENESI

ADPKD presenta un'enorme variabilità di espressione (genetica e fenotipica). Nonostante tutte le cellule dell'individuo affetto presentino la mutazione germinale, le cisti si formano nel 5% dei tubuli renali indicando come il processo di formazione delle cisti sia un processo focale (43). Nonostante ADPKD sia una malattia a trasmissione autosomica dominante a livello germinale, essa possiede un differente meccanismo patogenetico somatico di tipo recessivo e focale a livello della cellula tubulare renale (34).

Il meccanismo genetico alla base del processo focale

di ADPKD è ancora oggi oggetto di discussione. Tra le diverse ipotesi che sono state formulate, quella più accreditata sembra essere quella del modello dei “due colpi”. Secondo questo modello, perché la malattia si manifesti, non è sufficiente la sola mutazione germinale nel gene ma è necessaria una seconda mutazione (somatica) a livello dell'allele wt di quel gene con sua conseguente inattivazione (43). A supporto di tale modello vi è la caratteristica clonale delle cisti renali che è coerente con l'origine delle stesse a partire da una singola cellula che ha subito una mutazione somatica (44).

Nel modello dei “due colpi”, un gene mutato (*PKD1* o *PKD2*) viene ereditato dal genitore affetto e un gene wt viene ereditato dal genitore sano. Durante la vita dell'individuo il gene wt va incontro a mutazione somatica spontanea e viene inattivato; si ha pertanto una perdita di eterozigosità dovuta alla nuova mutazione dell'allele wt. Le mutazioni somatiche sono rare e si verificheranno in un numero relativamente limitato di cellule; da qui la caratteristica focale della distribuzione delle cisti nell'ADPKD (45,46). Ogni cisti renale origina da un “secondo colpo”, pertanto nella malattia policistica è necessario un alto numero di mutazioni somatiche perché si manifesti la malattia; si stima che il tessuto renale abbia un tasso di mutazione somatica pari a circa 10 volte quello di altri tessuti (34,47).

È stato però dimostrato che non è necessaria la completa inattivazione di entrambe le copie di *PKD1* o *PKD2* per innescare la cistogenesi. La formazione delle cisti avviene infatti con un basso livello di policistina (circa il 20%) concetto che caratterizza il “modello soglia” (48). Il ridotto livello della policistina 1 che può avere diverse cause, dalla completa inattivazione delle due copie del gene supportata dal modello dei “due colpi”, al tipo di mutazione e ad altri fattori stocastici locali, sembra guidare la cistogenesi. Il modello soglia di fatto comprenderebbe anche il modello “due colpi” che risulterebbe esserne tra le cause principali, ma non l'unica spiegazione.

Varianti in altri geni legati a *PKD* o in geni modificatori non ancora individuati, così come fattori ambientali quali il danno renale acuto, possono modulare la formazione delle cisti e la progressione della malattia, aumentando la probabilità di cistogenesi allo scemare dei livelli di PC1 e PC2 sotto livelli soglia (40,48,49); in particolare, questo si verifica con mutazioni nei geni che sono implicati nella via di segnale di maturazione e trasporto delle policistine (vedi paragrafo Fenocopie e geni modificatori).

Anche il tipo di mutazione, combinata alla quantità di PC1 o PC2 funzionante influisce sulla probabilità della formazione delle cisti e progressione della malattia (50).

Come spiegato nel paragrafo dedicato agli alleli ipomorfi, diverse combinazioni alleliche come ad esempio un allele ipomorfo e un allele mutato, ereditati in *trans*, possono contribuire al sensibile calo di PC1 funzionante e quindi all'insorgere precoce dei sintomi di ADPKD.

Studi recenti hanno dimostrato come mutazioni in

diversi geni coinvolti nella maturazione delle policistine causano la Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease (ADPLD) modulando il livello della policistina 1 impattando sulle sue modifiche post traslazionali o il traffico alla membrana cellulare, e questo può influenzare la gravità dell'ADPKD (41).

Ci sono inoltre altri fattori che non coinvolgono direttamente le policistine, che possono contribuire al fenotipo, come il sopracitato modello “terzo colpo” e altri fattori ambientali, in cui anche il fattore temporale sembra essere importante.

MUTAZIONI: TIPOLOGIA, SIGNIFICATO E RUOLO

Le mutazioni ADPKD sono dovute a mutazioni “perdita di funzione” disperse nei due geni causativi.

La maggior parte delle mutazioni in *PKD1*, sono caratterizzanti ogni singola famiglia. A rendere conto di questo elevato numero di nuove varianti progressivamente trovate, vi è l'alto tasso di mutazione che caratterizza il gene *PKD1* che si stima essere da $1,8 \times 10^{-5}$ a $6,9 \times 10^{-5}$ per gamete ad ogni divisione (51); questo alto tasso di mutazione rende difficile l'interpretazione del ruolo patogenetico delle varianti identificate.

È possibile suddividere macroscopicamente le mutazioni in due grandi gruppi.

- Mutazioni troncanti: mutazioni non senso, mutazioni frame-shift, grandi riarrangiamenti e mutazioni nelle sequenze consenso dello splicing che generano proteine tronche.
- Mutazioni non troncanti: mutazioni missenso, mutazioni missenso sinonime, mutazioni in frame di un numero di bp che è 3 o un multiplo di 3 e mutazioni di splicing atipiche (34), il cui ruolo patogenetico è chiaro solo se la variante è già riportata in letteratura, poiché non è possibile determinare l'impatto che queste varianti hanno sulla struttura del complesso delle policistine.

Numerosi studi di screening mutazionale dei geni *PKD1* e *PKD2*, hanno rilevato come in circa il 61% dei casi le mutazioni siano troncanti, in circa il 26% dei casi siano non troncanti (la maggior parte delle quali risultano essere mutazioni missenso) e come un ulteriore 4% presenti ampie delezioni o duplicazioni (52).

Inoltre, in un'indagine svolta dal Consortium of Radiology Imaging Study of PKD (CRISP) in cui è stato effettuato lo screening delle mutazioni in 202 probandi, solamente il 30% di queste è risultato essere ricorrente tra diversi soggetti, con un restante 70% che è quindi, risultato essere caratterizzato da mutazioni private, ovvero uniche di una singola famiglia.

La sezione del Toronto Genetic Epidemiology Study of PKD, volto ad analizzare la relazione tra il tipo di mutazione e la sopravvivenza renale, ha dimostrato come i pazienti portatori di mutazioni troncanti in *PKD1* hanno una probabilità di sviluppare ESRD che è 2,74 volte maggiore rispetto a coloro che presentano, invece, mutazioni non troncanti in *PKD1* (27).

ANALISI GENETICA

Nella maggior parte dei pazienti affetti da ADPKD i criteri clinici (53) sono sufficienti per porre diagnosi di malattia. Il test genetico è invece una risorsa pressoché indispensabile di diagnosi in alcune condizioni cliniche specifiche (54-56):

- quando l'imaging renale è equivoco e non permette di chiarire in maniera definitiva la diagnosi, specialmente nei soggetti con età <30 anni;
- nella diagnosi presintomatica in familiari a rischio, nel caso in cui in una famiglia affetta sia nota la variante patogenetica. Ad esempio nei soggetti giovani-adulti senza segni di malattia, l'analisi genetica permette di escludere o confermare la diagnosi e nell'ultimo caso di avviare programmi di screening e prevenzione. In questo caso è necessario aver identificato la mutazione familiare (test primariamente eseguito su un membro affetto della famiglia). Nel caso invece di esclusione di malattia si possono interrompere gli accertamenti clinici di screening poiché fino ai 40 anni un'ecografia negativa per cisti renali non permette di escludere la patologia;
- nei trapianti da viventi all'interno dello studio di un potenziale donatore di rene familiare con imaging dubbio, in cui è richiesta una diagnosi definitiva;
- nei soggetti con storia familiare negativa per ADPKD, specie se esistono elementi che pongano in diagnosi differenziale l'ADPKD con altre malattie cistiche renali;
- in presenza di una forma atipica di PKD, come nei casi di PKD ad esordio precoce e grave, condizione in cui possono giocare un ruolo determinante alleli ipomorfi o una eredità oligogenica; in presenza di un PKD con marcata asimmetria renale; in presenza di una insufficienza renale senza un significativo ingrandimento renale; in presenza di una notevole e discordante variabilità fenotipica della malattia all'interno della stessa famiglia; nel paziente pediatrico, se sintomatico, in cui la malattia policistica renale può essere secondaria, oltre che ad ADPKD, ad ARPKD o ad altre rare malattie genetiche con fenotipo cistico renale (in genere altre ciliopatie) associato a caratteristiche sindromiche;
- in pazienti che necessitano di consulenza genetica prenatale e/o in coppie che richiedano una diagnosi genetica pre-impianto (Preimplantation Genetic Diagnosis, - PGD) per selezionare embrioni sani prodotti tramite fecondazione in vitro per l'impianto (57). La decisione di una coppia di sottoporsi a PGD deve essere attentamente valutata e discussa in ambito di consulenza genetica. Per la PGD il presupposto fondamentale è quindi la conoscenza della o delle mutazioni familiari causative per la malattia.

Oggi il metodo d'elezione per la diagnosi molecolare di ADPKD è rappresentato dallo screening mutazionale mediante sequenziamento di tutti gli esoni e dei siti di splicing di entrambi i geni principalmente correlati (*PKD1* e *PKD2*). L'analisi di linkage invece è oggi eseguita di

rado, eccetto che per lo screening di embrioni nella PGD. I metodi impiegati per la ricerca di mutazioni puntiformi e piccole inserzioni/delezioni sono il sequenziamento diretto mediante metodica Sanger e il NGS. Con questo metodo è anche possibile identificare la presenza di mosaicismi somatici e dei grandi riarrangiamenti genomici, pur non essendo il metodo di elezione per questi scopi.

L'NGS diventa strumento ideale per il sequenziamento simultaneo di numerosi geni: oggi molti laboratori di diagnostica propongono l'analisi contemporanea di più geni coinvolti anche in altre patologie cistiche (come *UMOD*, *REN*, *HNFB1*) o che si è dimostrato siano coinvolti nel fenotipo PKD (come *PKHD1*). L'utilizzo di questi pannelli ha reso possibile la risoluzione di quesiti diagnostici difficili, in seguito alla caratterizzazione di genotipi complessi e all'identificazione di condizioni di eterozigosi composta o di doppia eterozigosi e anche di individuare pazienti con particolari combinazioni di mutazioni in *PKHD1* che avevano un quadro associabile ad ADPKD e che sono invece risultati essere pazienti ARPKD (58).

La tecnica di elezione per l'identificazione dei grandi riarrangiamenti genici è Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Mediante tale metodica è possibile infatti analizzare contemporaneamente la maggior parte degli esoni di *PKD1* e *PKD2* per l'identificazione di grandi riarrangiamenti quali duplicazioni/delezioni coinvolgenti uno, più esoni o l'intero gene (59), non evidenziabili mediante le tecniche di sequenziamento. Si stima che la percentuale di grandi riarrangiamenti a carico dei geni *PKD1* e *PKD2* sia variabile dal 2 al 13% circa (60).

Si ritiene che la sensibilità analitica del test per la ricerca di mutazioni patogenetiche in *PKD1* e *PKD2*, ottenuta applicando le tecniche analitiche sopra descritte, sia circa del 90%. Questo significa che siamo in grado di identificare la mutazione causativa in 90 soggetti su 100 che vengono clinicamente identificati come ADPKD. Rimane un 10% di pazienti che pur avendo diagnosi clinica di ADPKD non vede identificata la mutazione causativa. Questo può avere diverse motivazioni sia tecniche che di stato attuale di conoscenza sulla relazione genotipo-fenotipo come: una mutazione che cada nelle regioni regolatorie non analizzate routinariamente, la difficoltà di definire alcune varianti che potrebbero avere in realtà un ruolo patogenetico (mutazioni che hanno un effetto non ancora noto su stabilità mRNA o mutazioni non associabili a patogenicità sulla base del fenotipo), una possibile errata diagnosi clinica (61).

La maggior parte delle mutazioni identificate (dal 50 al 70%) risultano mutazioni private familiari e in una buona percentuale dei casi (30% per *PKD1* e 15% per *PKD2*) si tratta di mutazioni missenso di non chiaro significato, per questo è spesso difficile dimostrare la patogenicità della variante identificata (52).

Per l'interpretazione delle varianti ci si affida alle linee guida dell'American College of Medical Genetics (ACMG) (62) che raccomanda di consultare i database

pubblici specifici per la patologia. Nel caso dell'ADPKD il database specifico è PKDB <https://pkdb.mayo.edu/>, mentre per ARPKD è <http://www.humgen.rwth-aachen.de/>. Inoltre si valutano i siti predittori di patogenicità e dove possibile si effettua la segregazione della variante nella famiglia, in individui sia sani che malati. La complessità di interpretazione, oltre alla grande variabilità, è la presenza di varianti missenso a penetranza incompleta (varianti o mutazioni ipomorfe) (25).

I test genetici, per le loro peculiarità e le implicazioni, che riguardano l'identità biologica della persona e della famiglia, devono essere effettuati all'interno di un percorso diagnostico, su indicazione clinica e devono essere interpretati nell'ambito della consulenza genetica con un genetista. Le strutture di laboratorio che li eseguono devono essere accreditate e prevedere la presenza dello specialista in Genetica Medica.

Particolare attenzione viene riservata alla consulenza genetica riproduttiva. È fondamentale che una paziente affetta da ADPKD conosca i rischi legati ad una gravidanza, soprattutto se essa ha già cominciato a manifestare la malattia renale cronica. È importante, inoltre, che un paziente affetto da ADPKD sia consapevole del rischio di trasmettere ai figli la patologia nel 50% dei casi ad ogni gravidanza e devono essere informati della possibilità di intraprendere un percorso di fecondazione medicalmente assistita e di diagnosi preimpianto.

TERAPIE

Sul sito <https://clinicaltrials.gov/> ad oggi (Marzo 2021) sono presenti più di 127 studi per il trattamento di ADPKD. Si tratta in parte di farmaci di nuova sintesi o per lo più di farmaci riproposti, agenti su obiettivi molecolari e vie di segnale cellulari diversi e specifici per ciascuno di essi, ma tutti accomunati da un'azione finale

volta al rallentamento della progressione della patologia stessa che possiamo riassumere macroscopicamente così:

- vaptani o inibitori della vasopressina (Tolvaptan e Lixivaptan);
- inibitori di mTOR (Everolimus e Sirolimus);
- analoghi della somatostatina (Ocrotide, Lanreotide e Pasireotide);
- inibitore della glucosilceramide sintasi (Venglustat);
- approccio metabolico e dietetico (Metformina, 2-Deossi Glucosio 2DG e Plioglitazone);
- inibitori della Tirosin chinasi (Bosutinib SK1-606 e Tesevatinib);
- restrizione calorica e dieta chetogenica

Per capire le possibilità terapeutiche nell'ADPKD è necessario comprendere la sua patogenesi e la sua evoluzione. Diverse vie di segnale e fattori di trascrizione controllano la progressione e lo sviluppo della citogenesi (63) e ogni meccanismo chiave studiato nella patogenesi diventa un potenziale obiettivo terapeutico. La via di trasduzione del segnale del calcio è una delle vie più studiate nel campo dell'ADPKD. Come descritto più sopra, il PC2 è un canale cationico non selettivo permeabile al calcio che è abbondantemente espresso nell'endotelio (ER) e che interagisce con altre proteine del canale del calcio. In contrasto con PC2, PC1 accelera il decadimento della risposta intracellulare del calcio all'ATP aumentando l'assorbimento del calcio nell'ER. Tutto ciò suggerisce un ruolo importante delle policistine nell'omeostasi del calcio intracellulare (64). Le cellule epiteliali cistiche hanno un "cross talk" aberrante tra il calcio intracellulare e la segnalazione di AMP ciclico (cAMP), poiché livelli elevati di cAMP stimolando la secrezione di liquido cistico, possono accelerare la crescita della cisti e l'allargamento renale complessivo nei pazienti con PKD (65). Studi sperimentali ed epidemiologici hanno evidenziato che l'attivazione del

Tabella 1

Indicazioni per la prescrizione del Tolvaptan in Italia secondo le indicazioni AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco)

Età	>18 e <55 anni
Stadio CKD 1-4	eGFR tra 89-25 ml/min/1,73 m ² , valutato con eGFR misurato con l'equazione CKD-EPI
Diagnosi certa di ADPKD tipico con	1) Criteri di Pei aggiustati con storia familiare positive e età 2) In caso di storia familiare negativa, test genetico positivo
Nefromegalia	1) MR/CT: TKV>750 cc o htTKV >600 cc/m o diametro bipolare dei reni >16,7 cm 2) US: diametro bipolare >16,8 cm
Malattia rapidamente progressiva	1) Perdita di eGFR >5ml/min/1,73m ² per anno 2) Perdita di eGFR >2,5 ml/min/1,73m ² annuale negli ultimi 5 anni 3) Classificazione della Mayo clinic 1C-15 4) PROPKD-score >6

CKD, Chronic Kidney Disease; eGFR, Estimated Glomerular Filtration Rate; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; ADPKD, Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease; MR/CT, Magnetic Resonance/Computed Tomography; TKV, Total Kidney Volume; htTKV, Height Adjusted Total Kidney Volume; US, Ultra Sound; PROPKD, Predicting Renal Outcomes in ADPKD.

recettore Vasopressin V2 Receptor (VPV2R), dell'ormone antidiuretico vasopressina (AVP) *in vitro* aumenta i livelli intracellulari di cAMP, e conseguentemente porta a formazione e successiva crescita delle cisti. Inoltre, gli antagonisti del recettore V2 (Tolvaptan) migliorano la progressione dell'ADPKD mediante l'inibizione della via di segnalazione del cAMP (66).

La via mTOR è altamente attivata nei tessuti cistici indipendentemente dalle mutazioni dei geni *PKD* (67). Studi pre-clinici con Sirolimus ed Everolimus hanno bloccato la progressione cistica in un modello di roditori di ADPKD (68). Inoltre, gli analoghi della somatostatina hanno ridotto l'espansione del volume epatico e renale nell'ADPKD (69). Anche il trattamento con 2-desossiglucosio (un analogo del glucosio) di modelli animali PKD, che hanno un metabolismo del glucosio difettoso associato all'espansione cistica, determina una ridotta progressione cistica (70).

Tra tutti questi trattamenti che mirano a rallentare la progressione di ADPKD, l'unica molecola ad aver ottenuto, ad oggi, l'autorizzazione da parte dell'EMA nel 2015, della Technical Scientific Advisory Board dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)-CTS nel 2017 e dalla FDA nel 2018 ed essere quindi disponibile, è il Tolvaptan, secondo alcuni criteri specifici di eleggibilità. Rientrando nella famiglia dei Vaptani o Inibitori della Vasopressina, il Tolvaptan agisce come antagonista del recettore VPV2R della vasopressina. La vasopressina si lega ai VPV2R, accoppiati a proteine G stimolatorie, situati sulla membrana basolaterale delle cellule del tubulo contorto distale. Le proteine G stimolatorie attivano l'enzima Adenilato Ciclastasi con conseguente formazione di cAMP. Studi successivi hanno dimostrato che il blocco di questi recettori ha come effetto l'inibizione della crescita delle cisti nel rene (non si hanno effetti sulle cisti epatiche data l'assenza dei VPV2R nel fegato) e di rallentare il declino della funzionalità renale. Lo studio clinico randomizzato TEMPO3:4 ha valutato gli effetti del Tolvaptan in 1445 pazienti con ADPKD con e-GFR ≥ 60 mL/min e TKV ≥ 750 mL dimostrando un effetto beneficio significativo sulla crescita del TKV (-48%) e sul declino dell'e-GFR (-26%) nei pazienti con ADPKD trattati con il farmaco (71). Sulla base dei risultati ottenuti dal TEMPO 3:4 (71), l'EMA ha quindi approvato l'uso del Tolvaptan come farmaco per rallentare la progressione dello sviluppo di cisti e della insufficienza renale di (ADPKD) solo in pazienti adulti con uno stadio di malattia renale cronica (CKD) compreso tra 1 e 3, all'inizio del trattamento, e con evidenza di malattia in rapida progressione.

A tale scopo, l'ERA-EDTA Working Group of Inherited Kidney Disorders and European Renal Best Practice (72), e AIFA hanno fornito una serie di raccomandazioni e un algoritmo decisionale gerarchico che, valutando diversi fattori, mira ad una identificazione e classificazione dei pazienti stessi come soggetti ADPKD con dimostrata rapida progressione di malattia (Tabella 1). È importante sottolineare che la decisione di iniziare il trattamento richiede di considerare molti fattori al di là

dell'eleggibilità, quali controindicazioni, potenziali eventi avversi, e anche motivazione e aspetti dello stile di vita del paziente, che richiedono un processo decisionale condiviso con lo stesso.

Recentemente, sulla base dello studio Reprise, sono stati ampliati i criteri di eleggibilità a pazienti di 55 anni e un eGFR >25 mL/min/1,73 m².

CONCLUSIONI

L'ADPKD è caratterizzata da un'ereditarietà complessa (mutazioni ipomorfe, mutazioni in trans-eterozigosi, mosaicismo, geni modificatori) e da una grande variabilità fenotipica sia intra- che inter-familiare.

Per migliorare la comprensione e l'abilità nel predire meglio la progressione dell'ADPKD è necessario integrare tutte le diverse componenti che contribuiscono all'eterogeneità della stessa quali: geni coinvolti, la tipologia di mutazioni e la coesistenza di mutazioni in geni modificatori, nonché l'anamnesi personale e familiare.

Il test genetico ha un ruolo sempre più cruciale, sia dal punto di vista della terapia (per l'identificazione dei rapidi progressori) che della prognosi, individuando ad esempio pazienti suscettibili di alcune manifestazioni extrarenali (come gli aneurismi), associati a specifiche mutazioni, permettendo loro uno stretto monitoraggio.

La caratterizzazione del genotipo potrebbe permettere in un futuro non troppo lontano di classificare i pazienti in categorie più suscettibili ad alcune terapie o di identificare i non-responder, così come potrebbe orientare lo sviluppo di nuovi farmaci.

Uno screening mutazionale comprensivo di *PKD1*, *PKD2*, *PKHD1* e di altri cistogeni può essere in grado di spiegare almeno in parte la variabilità dell'andamento della progressione della malattia, fornendo elementi sempre più utili per la correlazione genotipo-fenotipo e per la prognosi clinica.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, et al. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006;7:125-48.
2. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 2009;76:149-68.
3. Solazzo A, Testa F, Giovanella S, et al. The prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): A meta-analysis of European literature and prevalence evaluation in the Italian province of Modena suggest that ADPKD is a rare and underdiagnosed condition. *PloS One* 2018;13:e0190430.
4. Orskov B, Christensen KB, Feldt-Rasmussen B, et al. Low birth weight is associated with earlier onset of end-stage renal disease in Danish patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2012;81:919-24.
5. Bergmann C, von Bothmer J, Ortiz Bruchle N, et al. Mutations in multiple PKD genes may explain early and

- severe polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:2047-56.
6. Ronco C, La Manna G. Current Perspectives in Kidney Diseases. *Blood Purification* 2017;44:311-3.
 7. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007;369(9569):1287-301.
 8. Ecker T, Schrier RW. Hypertension in autosomal-dominant polycystic kidney disease: early occurrence and unique aspects. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(1):194-200. Epub 2001/01/03.
 9. Adeva M, El-Youssef M, Rossetti S, et al. Clinical and molecular characterization defines a broadened spectrum of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Medicine (Baltimore)* 2006;85:1-21.
 10. Lu H, Galeano MCR, Ott E, et al. Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2017;49:1025-34.
 11. Hughes J, Ward CJ, Peral B, et al. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995;10:151-60.
 12. Germino GG, Barton NJ, Lamb J, et al. Identification of a locus which shows no genetic recombination with the autosomal dominant polycystic kidney disease gene on chromosome 16. *Am J Hum Genet* 1990;46:925-33.
 13. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 1994;77:881-94.
 14. Peters DJ, Spruit L, Saris JJ, et al. Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genetics* 1993;5:359-62.
 15. Cai Y, Maeda Y, Cedzich A, et al. Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem* 1999;274:28557-65.
 16. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature genetics* 2003;33:129-37.
 17. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, et al. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation* 2008;117:1161-71.
 18. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, et al. Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase Ialpha subunit, cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am J Hum Genet* 2016;98:1193-207.
 19. Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, et al. Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Hum Genet* 2018;102:832-44.
 20. Huynh VT, Audrezet MP, Sayer JA, et al. Clinical spectrum, prognosis and estimated prevalence of DNAJB11-kidney disease. *Kidney Internat* 2020;98:476-87.
 21. Rossetti S, Harris PC. Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1374-80.
 22. Ravine D, Walker RG, Gibson RN, et al. Phenotype and genotype heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 1992;340(8831):1330-3.
 23. Hateboer N, van Dijk MA, Bogdanova N, et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 1999;353(9147):103-7.
 24. Rossetti S, Burton S, Strmecki L, et al. The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1230-7.
 25. Cornec-Le Gall E, Audrezet MP, Chen JM, et al. Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1006-13.
 26. Pei Y, Lan Z, Wang K, et al. A missense mutation in PKD1 attenuates the severity of renal disease. *Kidney Int* 2012;81:412-7.
 27. Hwang YH, Conklin J, Chan W, et al. Refining genotype-phenotype correlation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:1861-8.
 28. Pei Y, Hwang YH, Conklin J, et al. Imaging-based diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:746-53.
 29. Torres JA, Rezaei M, Broderick C, et al. Crystal deposition triggers tubule dilation that accelerates cystogenesis in polycystic kidney disease. *J of Clin Invest* 2019;129:4506-22.
 30. Leonhard WN, Zandbergen M, Veraar K, et al. Scattered deletion of PKD1 in kidneys causes a cystic snowball effect and recapitulates Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1322-33.
 31. Rossetti S, Kubly VJ, Consugar MB, et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2009;75:848-55.
 32. Mantovani V, Bin S, Graziano C, et al. Gene panel analysis in a large cohort of patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease allows the identification of 80 potentially causative novel variants and the characterization of a complex genetic architecture in a subset of families. *Front Genet* 2020;11:464.
 33. Vujic M, Heyer CM, Ars E, et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles mimic the renal manifestations of ARPKD. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1097-102.
 34. Izzi C, Liut F, Dallera N, et al. Genetica e counseling genetico. *G Ital Nefrol* 2016;33.
 35. Schaffer AA. Digenic inheritance in medical genetics. *J Med Genet* 2013;50:641-52.
 36. Gainullin VG, Hopp K, Ward CJ, et al. Polycystin-1 maturation requires polycystin-2 in a dose-dependent manner. *J Clin Invest* 2015;125:607-20.
 37. Koptides M, Mean R, Demetriou K, et al. Genetic evidence for a trans-heterozygous model for cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2000;9:447-52.
 38. Hopp K, Cornec-Le Gall E, Senum SR, et al. Detection and characterization of mosaicism in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2020;97:370-82.
 39. Iliuta IA, Kalatharan V, Wang K, et al. Polycystic Kidney Disease without an apparent family history. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:2768-76.
 40. Lanktree MB, Haghghi A, di Bari I, et al. Insights into Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease from genetic studies. *Clin J Am Soc Nephrol*.
 41. Audrezet MP, Corbiere C, Lebbah S, et al. Comprehensive PKD1 and PKD2 mutation analysis in prenatal Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:722-9.
 42. Gresh L, Fischer E, Reimann A, et al. A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J* 2004;23:1657-68.
 43. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, et al. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 1996;87:979-87.
 44. Tan AY, Zhang T, Michael A, et al. Somatic mutations in renal cyst epithelium in Autosomal Dominant Polycystic

- Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2018;29:2139-56.
45. Pei Y. A "two-hit" model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease? *Trends Mol Med* 2001;7:151-6.
 46. Harris PC. What is the role of somatic mutation in autosomal dominant polycystic kidney disease? *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1073-6.
 47. Colgin LM, Hackmann AF, Emond MJ, et al. The unexpected landscape of in vivo somatic mutation in a human epithelial cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1437-42.
 48. Lantinga-van Leeuwen IS, Dauwerse JG, Baelde H, et al. Lowering of PKD1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2004;13:3069-77.
 49. Hopp K, Ward CJ, Hommerding C, et al. Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J Clin Invest* 2012;122:4257-73.
 50. Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, et al. Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:50.
 51. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, et al. Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 2001;68:46-63.
 52. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, et al. Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2143-60.
 53. Pei Y, Obaji J, Dupuis A, et al. Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:205-12.
 54. Ars E, Bernis C, Fraga G, et al. Spanish guidelines for the management of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*.2014;29 Suppl 4:iv95-105.
 55. Chapman AB, Devuyst O, Eckardt KU, et al. Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): executive summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2015;88:17-27.
 56. Harris T, Sandford R. European ADPKD Forum multidisciplinary position statement on autosomal dominant polycystic kidney disease care: European ADPKD Forum and Multispecialist Roundtable participants. *Nephrol Dial Transplant*2018 Apr 1;33:563-573.
 57. Zhao X, Paterson AD, Zahirieh A, et al. Molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease: utility and limitations. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:146-52.
 58. Eisenberger T, Decker C, Hiersche M, et al. An efficient and comprehensive strategy for genetic diagnostics of polycystic kidney disease. *PLoS One* 2015;10:e0116680.
 59. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* 2012;13:3245-76.
 60. Consugar MB, Wong WC, Lundquist PA, et al. Characterization of large rearrangements in autosomal dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome. *Kidney Int* 2008;74:1468-79.
 61. Paul BM, Consugar MB, Ryan Lee M, et al. Evidence of a third ADPKD locus is not supported by re-analysis of designated PKD3 families. *Kidney Int* 2014;85:383-92.
 62. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.
 63. Harris PC, Torres VE. Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 2014;124:2315-24.
 64. Nakajima I, Chu TM. Synergistic antitumor activity of interleukin-2 and cimetidine against syngeneic murine tumor. *Cancer Immunol Immunother* 1991;33:9-14.
 65. Belibi FA, Reif G, Wallace DP, et al. Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int* 2004;66:964-73.
 66. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*2012;367:2407-18.
 67. Ibraghimov-Beskrovnaia O, Natoli TA. mTOR signaling in polycystic kidney disease. *Trends Mol Med* 2011;17:625-33.
 68. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5466-71.
 69. Hogan MC, Masyuk TV, Page L, et al. Somatostatin analog therapy for severe polycystic liver disease: results after 2 years. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:3532-9.
 70. Rowe I, Chiaravalli M, Mannella V, et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nature Med* 2013;19:488-93.
 71. Torres VE, Higashihara E, Devuyst O, et al. Effect of Tolvaptan in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease by CKD Stage: Results from the TEMPO 3:4 Trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:803-11.
 72. Gansevoort RT, Arici M, Benzing T, et al. Recommendations for the use of tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: a position statement on behalf of the ERA-EDTA Working Groups on Inherited Kidney Disorders and European Renal Best Practice. *Nephrol Dial Transplant* 2016;31:337-48.

Malattia renale nel diabete: oltre la nefropatia diabetica

Daniela Ceccarelli Ceccarelli¹, Renata Paleari², Roberto Tarenzi¹, Andrea Mosca², Bruno Solerte¹

¹Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Università degli Studi di Pavia

²Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano

ABSTRACT

Kidney disease in diabetes: beyond diabetic nephropathy.

Chronic kidney disease is a major type of kidney disease where a gradual loss of kidney function over a period of months to years can be observed. Its early detection is critical in improving the clinical outcome. It may be associated to diabetes, the illness being cause of the nephropathy, and then the condition is known as diabetic kidney disease (DKD). However, it may be associated to diabetes, but the pathogenesis arising could be attributable to other reasons, and then the condition is known as non diabetic kidney disease (NDKD). In this review we will focus on these two conditions, and we will briefly outline the state of the art of some traditional biomarkers (the quantitative determination of albumin in urine, eGFR), the role and the interpretation of some established biomarkers for the evaluation of glycemic control (glycated hemoglobin and glycated albumin) and the potential use of other new biomarkers useful to predict the development of the nephropathy.

Parole chiave: diabete, albuminuria, nefropatia

UNA NUOVA DEFINIZIONE DI MALATTIA RENALE NEL DIABETE

La nefropatia diabetica è una complicanza microvascolare del diabete caratterizzata dalla presenza di albuminuria e progressivo declino della funzionalità renale, che si manifesta clinicamente con riduzione del filtrato glomerulare, stimato mediante equazioni (estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) (1).

Né l'albuminuria né la riduzione del eGFR sono indicatori specifici di nefropatia diabetica. La diagnosi di nefropatia diabetica continua ad essere di probabilità ed è confermata soltanto attraverso l'esame biptico. Una limitazione intrinseca alla definizione "nefropatia diabetica" è la possibilità che vi siano altre forme di malattia renale non diabetica che possono presentarsi nel soggetto con diabete mellito (DM); infatti, non tutti i pazienti in cui si pone diagnosi di nefropatia diabetica hanno una patologia renale che è diretta conseguenza del diabete. In questa rassegna, utilizzeremo il termine malattia renale cronica (Chronic Kidney Disease, CKD) in riferimento al danno renale indipendentemente dalle

sue cause. La CKD nel diabete può essere causata dal diabete o meno, per cui utilizzeremo, rispettivamente, i termini "diabetic kidney disease" (DKD) e "non diabetic kidney disease" (NDKD). La terminologia DKD quindi, che peraltro è ormai la più utilizzata in molte pubblicazioni, è quella che meglio descrive la nefropatia diabetica. In un paziente con DM e CKD accertata, quest'ultima potrebbe quindi essere classificata come: DKD "vera", NDKD o una combinazione di entrambi i quadri patologici.

Tipicamente, la diagnosi di DKD si basa sia sulla determinazione dell'albuminuria che dell'eGFR (preferibilmente calcolato con la formula CKD-EPI). L'eziologia della CKD nel paziente diabetico, non limitata quindi alla sola conferma o esclusione della DKD, è sicuramente utile per l'individuazione delle priorità cliniche e terapeutiche sia nel paziente diabetico a rischio di sviluppare DKD sia nel paziente con CKD già confermata. Tali priorità, infatti, vengono spesso sottovalutate quando si focalizza l'attenzione sui soli indicatori di screening della DKD: eGFR e albuminuria.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 200290 Segrate (MI), andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 19.02.2021

Revisionato: 22.04.2021

Accettato: 27.04.2021

Pubblicato on-line: 08.06.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.035

MALATTIA RENALE CRONICA NEL DIABETE: DALLA DIAGNOSI ALLE PRIORITÀ DI INTERVENTO

Le alterazioni microvascolari che avvengono nel rene del paziente con DKD sono caratterizzate principalmente da ispessimento della membrana basale del glomerulo (GBM), espansione della matrice mesangiale, glomerulosclerosi nodulare e ialinosi arteriolare. Questo quadro istologico è caratteristico del soggetto con diabete tipo 1 (type-1 Diabetes Mellitus, T1DM). Nel paziente con diabete tipo 2 (type-2 Diabetes Mellitus, T2DM) in età più avanzata, invece, i campioni biotici mostrano di frequente, oltre ai reperti classici descritti poco sopra, i segni di concomitanti lesioni renali di altra natura: nefropatia età-correlata, pregressi episodi di danno renale acuto (Acute Kidney Injury, AKI) od altre glomerulopatie (2). Pertanto, la definizione di nefropatia diabetica manca di accuratezza anche nel descrivere l'eterogeneità dei riscontri istologici della malattia renale nel paziente diabetico.

Nella pratica clinica, in mancanza di biopsia renale, si pone spesso diagnosi erronea di DKD. Attualmente non ci sono dati da studi sufficientemente ampi che mostrino quanti pazienti con diagnosi pre-biotica di probabile DKD siano affetti, invece, da NDKD o da una combinazione di NDKD e DKD.

Anders et al. (3) analizzano la CKD nel diabete da un interessante punto di vista. Lo sforzo più importante non è rivolto a raggiungere un'accuratezza diagnostica che differenzi la NDKD dalla DKD (specie in assenza di biopsia), ma a individuare priorità di intervento nel paziente con diabete e CKD. Gli autori classificano tali priorità per chiarezza concettuale, ma si tratta di fenomeni interdipendenti nella storia naturale della CKD

nel diabete. Tali priorità sono: la mortalità globale e cardiovascolare e la progressione alla malattia renale terminale (end stage renal disease, ESRD). La Figura 1 riassume i principali rilievi clinici nella evoluzione temporale della CKD.

Mortalità globale e cardiovascolare

Le principali cause di mortalità nel paziente con diabete e CKD sono quelle cardiovascolare e cerebrovascolare (ictus, infarto miocardico acuto, scompenso cardiaco, cardiomiopatia diabetica). Numerosi studi hanno evidenziato l'associazione tra accelerato invecchiamento vascolare e cardiaco e aumento della mortalità nel soggetto con CKD e DM (4).

La maggior parte di questi pazienti muore per cause cerebro o cardiovascolari prima che la CKD progredisca a ESRD. Fino a pochi anni fa la metformina era la sola molecola ad aver dimostrato riduzione della mortalità da tutte le cause nel paziente diabetico e, in particolare, del 36% nel paziente con DM2 e sovrappeso (lo studio UKPDS, 1998) (5). Degni di nota sono anche i risultati dello studio RENAAL: farmaci che inibiscono il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAA) (ACE-inibitori e sartani) non riducono la mortalità globale del paziente diabetico con CKD ma rallentano la progressione del danno microvascolare e della proteinuria (6). Negli ultimi anni due promettenti classi di farmaci ipoglicemizzanti hanno mostrato benefici sulla riduzione della mortalità cerebro e cardiovascolare nel DM: i glicosurici o inibitori del Sodium-Glucose co-Transporter 2 (SGLT2) e i Glucagon-like Peptide-1receptor agonists (GLP1-RA).

In particolare gli studi EMPAREG-OUTCOME e CANVAS hanno dimostrato che empagliflozin e canagliflozin riducono la mortalità cardiovascolare rispettivamente del 38% (7) e del 14% (8). Lo studio

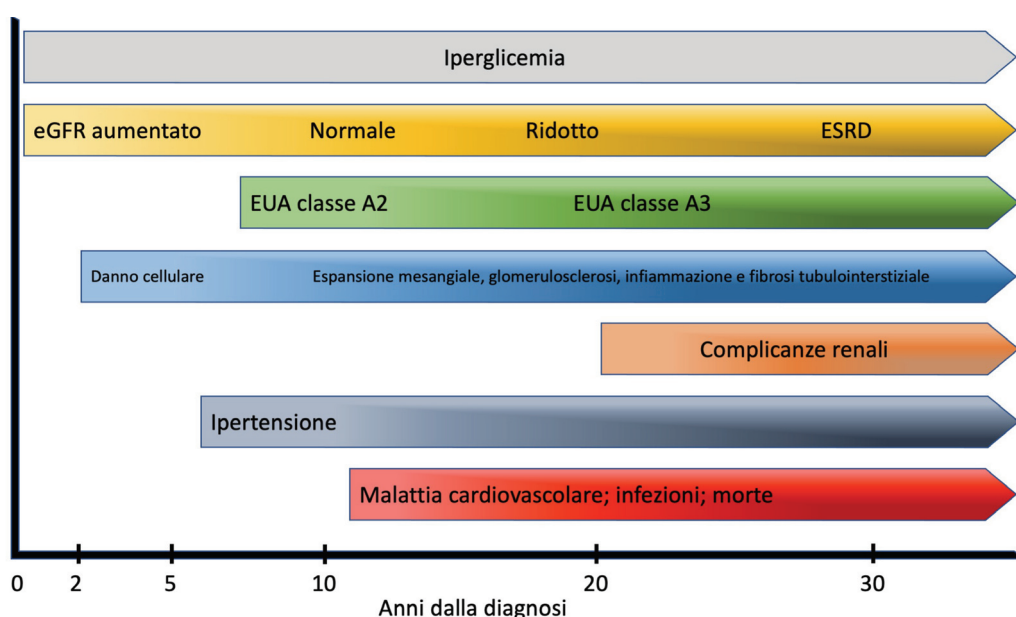


Figura 1

Evoluzione temporale della malattia renale diabetica in relazione a vari meccanismi patogenetici (modificata da Pugliese et al, rif. 20).

LEADER ha confermato che liraglutide riduce la mortalità cardiovascolare del 22% (9); lo studio SUSTAIN-6 (10) ha mostrato che semaglutide riduce la mortalità cardiovascolare del 26%.

Progressione della CKD a ESRD

Il rallentamento della progressione della CKD a ESRD riduce anche la mortalità cardiovascolare. La velocità di progressione della CKD a ESRD nel diabete mellito è rimasta invariata negli ultimi 20 anni con 25 pazienti su 10 000 che sviluppano ESRD (11). Negli ultimi 25 anni la principale strategia per rallentare tale progressione è stata la terapia con ACE-inibitori o sartani. Oltre al loro ruolo cardioprotettivo, gli studi EMPAREG-OUTCOME (12) e CANVAS (5) hanno dimostrato un'azione nefro-protettiva di empagliflozin e canagliflozin, i quali riducono rispettivamente il declino della eGFR del 44% e del 40% nei pazienti con T2DM. Anche LEADER ha dimostrato che la liraglutide riduce del 43% la progressione da albuminuria moderatamente aumentata a albuminuria notevolmente aumentata nel T2DM.

MECCANISMI PATOGENETICI DELLA MALATTIA RENALE NEL DIABETE

La più precoce manifestazione della DKD è la escrezione urinaria moderatamente aumentata di albumina, tipicamente compresa tra 30 e 300 mg/g (3-30 mg/mmol) di creatinina (ACR), condizione per lungo tempo nota come "microalbuminuria" e attualmente graduata come A2 (13). In assenza di interventi clinici, il 50% dei pazienti con T2DM e albuminuria moderatamente aumentata progrediscono ad un livello di escrezione urinaria di albumina notevolmente aumentata (>300 mg/g (>30 mg/mmol); ex "macroalbuminuria"). In uno studio di Berhane et al. (14) la albuminuria moderatamente aumentata si associa a rischio di progressione a ESRD 9,3 volte superiore rispetto a pazienti diabetici con normoalbuminuria.

L'incidenza della albuminuria moderatamente aumentata nel T1DM è del 30%; nel T2DM è del 40%, ma si associa frequentemente ad ipertensione arteriosa che ne è concausa. In ambedue i tipi di diabete il controllo glicemico è il principale determinante della progressione da albuminuria moderatamente aumentata a DKD. A breve termine, l'eccesso di glucosio filtrato induce un aumento del riassorbimento a livello del tubulo renale prossimale. Tale iperlavoro aumenta la richiesta di ossigeno con fenomeni di ischemia relativa che si associano all'incremento di biomarcatori di tale stress, quali Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) e Kidney Injury Molecule-1 (KIM1). Nel tempo, se non corretto, tale fenomeno causa ipertrofia delle cellule del tubulo prossimale, iperfiltrazione glomerulare e ipertensione glomerulare; ciascuno di questi fenomeni è mitigato dalla nefroprotezione esercitata da inibitori SGLT2.

A lungo termine, si sviluppano: disfunzione

endoteliale, ispessimento della GBM e espansione mesangiale, danno dei podociti, infiammazione asettica e fenomeni di memoria metabolica.

Disfunzione endoteliale

Esiste un legame tra albuminuria moderatamente aumentata e rischio cardiovascolare. Questa relazione trova un substrato patologico nel danno endoteliale, che costituisce anche il primo evento nell'aterogenesi (15). È pertanto indicato utilizzare la albuminuria moderatamente aumentata non solo come biomarcatore di DKD, ma anche come espressione di probabile presenza di disfunzione endoteliale sistemica, spesso associata a concomitante ipertensione arteriosa. Se nel T1DM la albuminuria moderatamente aumentata è un miglior fattore predittivo di sviluppo di DKD, nel T2DM tale ruolo predittivo è minore poiché potrebbe essere espressione di danno secondario ad altre cause, quali ipertensione arteriosa e aterosclerosi sistemica. Alcuni pazienti con T2DM e albuminuria moderatamente aumentata non progrediscono a albuminuria notevolmente aumentata; tale assenza di progressione indica spesso glomerulosclerosi ad eziopatogenesi ipertensiva, mentre in presenza di progressione è più probabile una glomerulosclerosi diabetica (16).

Danno dei podociti

La progressiva riduzione del numero dei podociti nel T2DM è proporzionale alla riduzione dell'eGFR e all'entità della albuminuria moderatamente aumentata. In modelli animali è evidente come il glucosio in eccesso inneschi apoptosi dipendente da segnali del Transforming Growth Factor β (TGF- β) e danno diretto dell'integrina $\alpha 3 \beta 1$ e, quindi, dell'integrità strutturale del podocita (17). La progressiva riduzione del numero di podociti si manifesta clinicamente con la comparsa di proteinuria; il fenomeno, tuttavia, non è specifico della DKD.

Infiammazione asettica

Nella DKD si evidenzia infiltrazione di monociti e macrofagi nel rene con alterazione della risposta alle chemochine che sembrerebbe essere caratteristica della DKD. In modelli animali con DKD, l'aumento dell'Interleuchina 1 (IL-1) circolante precipita l'apoptosi. In modelli murini, sia con T1DM che T2DM, gli inibitori del recettore dell'IL 1 β sono in grado di migliorare i marcatori di DKD.

Memoria metabolica

Studi sugli effetti dell'iperglicemia a lungo termine dimostrano che complicanze microvascolari quali DM e retinopatia diabetica (RD) persistono anche dopo il ripristino di adeguato controllo glicemico a causa di variazioni trascrizionali e di riprogrammazione epigenetica (18). Tali variazioni trascrizionali sono presenti anche nei processi che causano perdita dei podociti.

Questo modello degli effetti a breve e lungo termine dell'iperglicemia ripercorre la classificazione in 5 stadi di Mogensen (19), che costituisce un modello di progressione che riassume la storia naturale della DKD.

- Stadio I: ipertrofia e iperfiltrazione glomerulare. In questo stadio si verifica un aumento del eGFR e non sono presenti lesioni istopatologiche del glomerulo.
- Stadio II: Compaiono le lesioni morfologiche glomerulari: l'ispessimento della GBM e l'espansione mesangiale. Questa fase è ancora clinicamente silente; può, tuttavia, presentarsi albuminuria moderatamente aumentata transitoria nelle fasi di scompenso glicometabolico o dopo esercizio fisico.
- Stadio III: corrisponde alla comparsa di albuminuria moderatamente aumentata (non reversibile).
- Stadio IV: compare proteinuria superiore a 0,5 g/24 ore. In questa fase la progressione verso la ESRD è rapida (1 ml/min/1,73 m² al mese). Alcuni studi dimostrano che l'intervento con anti ipertensivi attivi sul sistema RAA rallentano tale progressione del 66% (18).
- Stadio V: è lo stadio della ESRD.

Sebbene l'iperglicemia abbia un ruolo fondamentale nello sviluppo della DKD, è utile tenere in considerazione altri fattori modificanti che influenzano la comparsa e la progressione della DKD. Fattori che si associano al diabete, indipendenti dal controllo glicemico, che contribuiscono alla comparsa e alla progressione della DKD possono essere: obesità, gravidanza, ipertensione

arteriosa e infezioni urinarie croniche o ricorrenti. L'obesità si associa a iperfiltrazione renale, aumento delle adipochine circolanti e conseguente ipertrofia del nefrone. Infezioni urinarie ricorrenti, più frequenti nei pazienti diabetici, possono determinare AKI, anche subclinico, con conseguente danno renale (ischemia silente) non correlabile al DM.

Recenti studi epidemiologici hanno mostrato quadri eterogenei di DKD. Infatti, oltre al classico fenotipo con presenza di albuminuria sono stati identificati due nuovi fenotipi: danno renale senza albuminuria (in cui il calo dell'eGFR non è preceduto dallo sviluppo e dalla progressione della albuminuria moderatamente aumentata) e progressivo declino della funzione renale senza albuminuria (nel quale il declino dell'eGFR rappresenta la principale alterazione che si sviluppa e progredisce indipendentemente dalla presenza e dall'entità dell'albuminuria) (20) (Figura 2).

Paragonato al classico fenotipo albuminurico, il fenotipo non albuminurico si associa ad un uguale rischio cardiovascolare, mentre il rischio di progressione a ESRD è minore.

Lo studio NHANES, condotto dal 1988 al 2014, ha evidenziato che la prevalenza della DKD è rimasta stabile nelle ultime decadi. Tuttavia, si osserva una tendenza opposta per quanto riguarda la prevalenza di albuminuria e declino dell'eGFR: la prevalenza dell'albuminuria si è ridotta del 24%, mentre la albuminuria notevolmente aumentata è rimasta stabile; si è osservato inoltre un

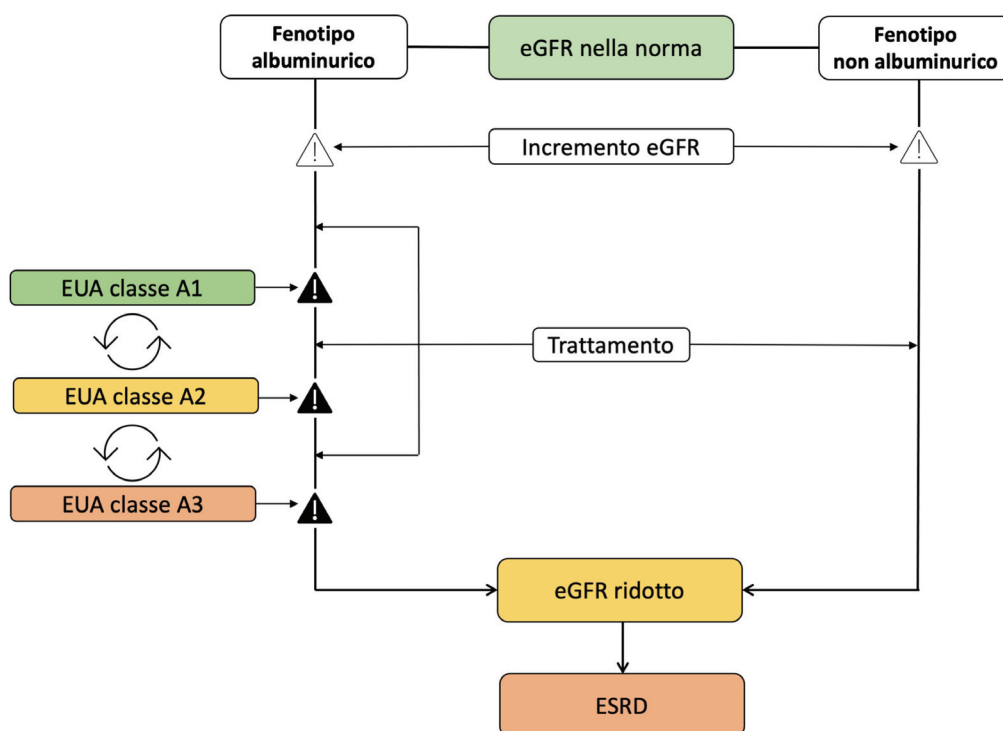


Figura 2
Evoluzione della malattia renale in presenza ed assenza di fenotipo albuminurico (modificata da Pugliese et al, rif. 20).
EUA, escrezione urinaria di albumina; eGFR, velocità di filtrazione glomerulare stimata; ESRD, malattia renale allo stadio terminale.

aumento dei pazienti che presentano netto declino del eGFR (<30 ml/min/1,73 m²).

Albuminuria moderatamente aumentata

La rassegna di Ioannou (1) invita a considerare la albuminuria moderatamente aumentata non solo come marcatore di DKD, ma come indicatore di "stress renale acuto", talvolta reversibile. Inoltre, citando Perkins et al. (21), è stato evidenziato il 19% di progressione a 6 anni e almeno il 60% dei pazienti che regrediscono a normoalbuminuria. I casi di albuminuria moderatamente aumentata transitoria e reversibile riguardano specialmente i pazienti con controllo glicemico subottimale (HbA_{1c} >64 mmol/mol; >8%) e successivamente corretto e ipertensione arteriosa non controllata. Il ripristino di un adeguato compenso glicemico e di valori normali di pressione arteriosa può spesso associarsi al ritorno alla normoalbuminuria, ma non in tutti i casi. Quei pazienti in cui, malgrado adeguati valori glicemici e adeguato controllo della pressione arteriosa, non si verifica la riduzione o la scomparsa della albuminuria moderatamente aumentata hanno spesso una malattia aterosclerotica sistemica più avanzata, anamnesi di tabagismo, ipertensione arteriosa di lungo decorso o dislipidemia. Al primo riscontro di albuminuria moderatamente aumentata le priorità, dopo la definizione di una diagnosi eziologica, sono correggere lo scompenso glicometabolico e la dislipidemia, impostare o ottimizzare la terapia antiipertensiva e verificare se tale albuminuria moderatamente aumentata fosse transitoria con un controllo a 3-6 mesi.

Secondo le linee guida tuttora utilizzate (22) la presenza di albuminuria moderatamente aumentata superiore a 30 mg/24 ore o un ACR >30 mg/g (>3 mg/mmol) è necessaria, sebbene aspecifica e non sufficiente, a porre sospetto diagnostico di DKD. La albuminuria moderatamente aumentata è considerata l'espressione clinica di danno glomerulare. In alcuni casi si può avere albuminuria moderatamente aumentata in assenza di danno glomerulare. Due esempi sono:

- variazione interindividuale dei livelli di albumina sierica (introito di proteine nella dieta, disfunzione epatica, sindromi da malassorbimento o enteropatia proteino-disperdente).
- danno delle cellule del tubulo renale prossimale. È noto come l'albumina filtrata sia prevalentemente riassorbita dalle cellule del tubulo renale prossimale. Un danno a tali cellule causa secondario difetto nel riassorbimento dell'albumina. Nel paziente diabetico con iperglicemia non adeguatamente trattata, le cellule del tubulo renale prossimale incrementano il riassorbimento del glucosio filtrato attraverso i co-transportatori sodio-glucosio a bassa affinità e alta capacità. Le cellule del tubulo prossimale non hanno un meccanismo di inibizione intrinseca per cui, in caso di iperglicemia costante, l'aumentato lavoro renale necessario al riassorbimento del glucosio si manifesta in quella che è definita come precoce

iperplasia e ipertrofia del tubulo prossimale (early diabetic proximal tubule hyperplasia and hypertrophy) (23).

Terapia con ACE inibitori o sartani

È stato dimostrato che tali agenti anti-ipertensivi prevengono o rallentano la progressione della albuminuria moderatamente aumentata o ne causano regressione a normoalbuminuria. La terapia con inibitori del sistema RAA influenza, pertanto, i risultati dell'esame urine, talvolta mascherando un iniziale danno glomerulare.

Possiamo concludere che per una data entità di albuminuria moderatamente aumentata, l'entità del danno glomerulare è variabile e la diagnosi di DKD ancor più complessa e da determinare con diversi gradi di sicurezza secondo il singolo contesto clinico.

MALATTIA RENALE NON-DIABETICA: CARATTERISTICHE E INDICATORI NEL PAZIENTE AFFETTO DA DIABETE MELLITO

La prevalenza globale di CKD, indipendentemente dalle cause, è stimata attorno al 7-12% (24).

I dati che provengono da biopsie su pazienti con diabete mellito suggeriscono che la prevalenza di CKD da NDKM nel T2DM varia tra il 33 e il 72,5%. Tale variabilità in parte dipende dalla eterogeneità delle aree geografiche ed etnie incluse nella statistica. È anche verosimile che il dato sia sovrastimato da un bias nella selezione: in genere, l'indicazione a biopsia renale in un paziente diabetico segue l'identificazione di caratteristiche cliniche "atipiche" non riferibili a DKD quali peggioramento rapido dell'eGFR, proteinuria in ambito nefrosico, anomalie nel sedimento urinario. Il correlato istopatologico aspecifico più frequente nella NDKD è la glomerulosclerosi focale e segmentaria (diversamente dalla nodulare diffusa della DKD); talvolta si riconoscono aspetti patologici della causa o concausa precipitante (ischemia in AKI ricorrente, nefropatia legata all'età). La biopsia rimane tuttora l'unica indagine per determinare se la CKD è conseguenza diretta del diabete o se le cause siano altre e il diabete agisca da concausa o da evento scatenante.

Fiorentino et al. hanno condotto una metanalisi di 48 studi in pazienti diabetici sottoposti a biopsia renale. Nei 48 studi inclusi nella metanalisi, la prevalenza di DKD variava da 6,5% a 94%, per la NDKD da 3% a 82,9% e per le forme miste da 4% a 45,5% (25). Lo studio nasce dall'esigenza di definire l'utilità della biopsia renale in pazienti diabetici con malattia renale rapidamente progressiva. Questa categoria viene spesso definita come DKD sulla base della sola valutazione clinica ma, in molti casi, l'indagine biopsica rivela NDKD o quadri istologici misti. L'analisi degli autori ha mostrato che nei pazienti diabetici con "sospetta DKD" sottoposti a indagine istologica, la prevalenza di danno renale non conseguente a diabete, ossia dei casi NDKD, è notevole e raggiunge l'82,9% dei casi.

Sia il valore predittivo positivo per la NDKD e le forme miste, considerato separatamente per ciascuna forma (36,9% e 19,7% rispettivamente), che il valore predittivo positivo combinato (NDKD + forme miste, 49,2%), confermano l'ipotesi che il danno renale non correlato a diabete non sia affatto di raro riscontro in queste biopsie renali.

Tra le forme di NDKD, largamente eterogenee, la nefropatia IgA era la più frequente (3-59%). Gli autori specificano che la variabilità istologica tra le forme di NDKD sia in parte dovuta a criteri di selezione del paziente da sottoporre a biopsia, molto diversi tra gli studi inclusi.

I principali determinanti dell'eterogeneità istologica nelle NDKD erano pressione arteriosa sistolica, HbA_{1c} e durata del diabete; nelle forme miste erano la creatinina sierica e l'eGFR. Il principale determinante delle differenze istologiche nella DKD era la sola creatinina.

Fiorentino et al. (25) raccomandano una stratificazione del rischio per ciascun paziente che guidi la selezione dei casi da sottoporre a biopsia renale; l'identificazione di una forma NDKD permetterebbe di iniziare un'adeguata strategia terapeutica, spesso divergente dagli interventi clinici che si attuano nel paziente diabetico (ad esempio, terapia immunosoppressiva nella nefropatia IgA). Gli autori sottolineano anche il ruolo prognostico della biopsia, nel delineare una progressione temporale della malattia renale. La progressione a ESRD si verifica nel 44% delle DKD, nel 18,2% delle forme miste e solo nel 12,3% delle NDKD.

Soni et al. (26) hanno condotto uno studio su pazienti affetti da diabete che, sulla base di un elevato sospetto clinico di nefropatia da altra causa, sono stati sottoposti a biopsia renale. In questa categoria di pazienti i più comuni quadri istologici di malattia renale non correlata a diabete (il cui riscontro biotico è la glomerulosclerosi nodulare e diffusa) erano: nefrite acuta interstiziale (18%), glomerulonefrite postinfettiva (17,2%), nefropatia membranosa (11,2%) e glomerulosclerosi focale segmentaria (7,75%). Occorre ricordare che la glomerulosclerosi nodulare e diffusa tipica della malattia renale diabetica, non è patognomonica e può anche essere idiopatica, oppure associata a gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS), amiloidosi, glomerulopatie fibrillari.

Il 50% dei pazienti diabetici con CKD non presenta proteinuria/albuminuria moderatamente aumentata (27). Spesso si tratta di pazienti anziani, alcuni dei quali in terapia con ACEI/sartani. Le biopsie renali di questi pazienti mostrano reperti estremamente eterogenei. Dalla Vestra et al. (28) hanno distinto questi reperti in tre gruppi: struttura renale integra (41%), riscontro di quadro istologico tipico della nefropatia diabetica (26%) e un terzo gruppo con pattern atipici di danno renale variabile da glomerulopatia isolata lieve al danno tubulo-interstiziale.

Piccoli et al. (29) hanno identificato cinque indicatori che possono suggerire la presenza di NDKD in pazienti affetti da DM:

- tempo di esordio rispetto alla diagnosi di DM;

- velocità di progressione;
- presenza di ematuria;
- proteinuria minima o assente;
- assenza di retinopatia diabetica.

Nella pratica clinica tali indicatori non sono affidabili nella distinzione tra DKD e NDKD, specie nel T2DM.

Va rimarcata la necessità di pensare in termini di diagnosi più o meno probabile di DKD, utilizzando tali indicatori (che non sono dei criteri) come strumenti per orientarsi nella diagnosi di probabilità, ai fini, ad esempio, della selezione del paziente da sottoporre a consulenza nefrologica o biopsia renale, della scelta di interventi terapeutici e farmacologici, dell'intensità del monitoraggio clinico. Malgrado le linee guida continuano a suggerire la biopsia renale come gold standard per la diagnosi di DKD, evidenze cliniche da vari autori continuano a suggerire diversi approcci contrastanti, dall'indicazione della biopsia in tutti i casi di nuova diagnosi di CKD nel diabete ad un'attenta e ristretta selezione di tali pazienti (30).

In attesa di poter utilizzare nuovi biomarcatori precoci, chiaramente meno invasivi di una biopsia renale ma comunque specifici per danno renale da DKD, un approccio che consideriamo ragionevole è la valutazione nefrologica solo in alcuni pazienti diabetici con danno renale in cui siano presenti più indicatori che suggeriscono NDKD e in cui sia stata esclusa la albuminuria moderatamente aumentata reversibile dopo adeguato monitoraggio nel tempo.

Un'altra strategia potrebbe essere quella di effettuare la biopsia solo in coloro in cui, a prescindere da una diagnosi differenziale tra DKD e NDKD, l'esito istologico potrebbe fare la differenza nella scelta terapeutica e nella prognosi, considerando le caratteristiche specifiche del paziente quali, ad esempio, età e aspettativa di vita.

Tempo di esordio della CKD rispetto alla diagnosi di DM

Le condizioni temporali di esordio rispetto alla diagnosi possono essere così raggruppate:

- CKD precedente alla diagnosi di DM: il più comune indicatore di NDKD è la presenza di compromissione renale antecedente alla diagnosi di diabete. Tali forme di CKD possono essere genetiche, seguire uno o più episodi di AKI o associarsi ad altre patologie sistemiche, ad esempio autoimmuni come Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e artrite reumatoide.
- CKD contestuale alla diagnosi DM: specialmente nel caso di T2DM, la diagnosi contestuale di diabete e CKD è lo scenario più complesso. La DKD si sviluppa anni dopo l'esordio del T2DM. Pertanto tale evenienza deve far pensare in primo luogo a CKD non correlata a diabete, dunque a NDKD, con eccezione dei casi di T2DM in cui si sospetta una diagnosi tardiva rispetto all'esordio. Nel caso del T1DM escludere la DKD è più semplice, in quanto compare in media almeno 5 anni dopo l'esordio.
- CKD successiva alla diagnosi di DM: tale scenario

aumenta la probabilità che la CKD sia ascrivibile a DKD, specie nei casi con lunga durata di malattia e compenso glicemico subottimale. Tuttavia, una diagnosi di CKD successiva a quella di diabete non significa necessariamente che la CKD fosse assente alla diagnosi di DM. Molti pazienti alla diagnosi hanno esame urine, proteinuria ed eGFR nella norma con iniziale danno renale clinicamente silente. Lo stadio I e II della CKD hanno eGFR, stimati a partire dalla creatinina sierica, nell'intervallo di normalità. In secondo luogo, nefropatie secondarie a malattia del rene policistico, ipoplasia renale, nefropatia età-correlata, si associano a normale eGFR e, spesso, all'assenza di anomalie all'esame urine. CKD di grado I e II possono spesso essere già presenti al momento della diagnosi di diabete, ma presentarsi all'attenzione clinica soltanto successivamente.

Per consentire un intervento terapeutico immediato è utile affrontare gli aspetti qui di seguito illustrati.

Entro che limiti si può porre diagnosi differenziale tra DKD e NKDK con ragionevole probabilità pre-biottica: Anders et al. (2) raccomandano che tutti i pazienti con DM e CKD seguano lo stesso iter diagnostico del paziente con riscontro di CKD non diabetico: accurata diagnosi familiare per escludere eventuali forme genetiche (quali la malattia del rene policistico); indagare eventuali precedenti episodi di AKI singola o ricorrente; esposizioni a tossine o farmaci nefrotossici; considerare comorbidità quali infezioni croniche (HIV, epatiti virali), autoimmunità (LES, vasculiti), malattie ematologiche concomitanti quali mieloma multiplo, linfomi, gammopatie monoclonali o tumori solidi.

Come ridurre la mortalità cardiovascolare: rigoroso intervento su controllo glicemico, calo ponderale, cessazione del tabagismo, correzione della dislipidemia e controllo della pressione arteriosa; il controllo della pressione arteriosa è da ottenersi preferibilmente con uso di inibitori del sistema RAA. Tra gli antidiabetici orali, quelli con dimostrato beneficio sul rischio cardiovascolare sono metformina, SGLT2 inibitori e analoghi del GLP1. La gestione del rischio cardiovascolare prescinde dalla sottostante diagnosi di DKD, NKDK o una combinazione dei due casi.

Come rallentare la progressione a ESRD: la mancata diagnosi di NKDK rappresenta anche la mancata opportunità di interventi che ne rallentino la progressione a ESRD, specie quando sono presenti amiloidosi, glomerulonefriti, gammopatie monoclonali e processi indipendenti dall'aumento del GFR. L'uso di SGLT2 e ACEI/sartani per ridurre l'iperfiltrazione glomerulare è raccomandato e definito essenziale da Anders et al. (2) per ridurre il declino dell' eGFR. A tal proposito ricordiamo le recenti variazioni alla prescrizione di SGLT2 secondo eGFR: tutti i farmaci della classe possono essere prescritti fino a 45 ml/min/1,73 m²; canagliflozin è stato approvato per valori di eGFR fino a 30 ml/min/1,73 m². Liraglutide ha mostrato effetti nefroprotettivi ma non ha mostrato effetti sulla riduzione del declino del eGFR. Anche se non secondaria a

diabete, la NKDK nel paziente obeso è positivamente influenzata dal calo ponderale che induce una riduzione dell'iperfiltrazione glomerulare nel paziente con DM e NKDK.

ALCUNI ASPETTI DI LABORATORIO

Ci limitiamo qui, in considerazione del fatto che vari parametri sono trattati anche da altri autori all'interno di questo stesso numero monografico, a fare il punto su alcuni esami che più da vicino interessano la nefropatia diabetica, e in particolare tratteremo la misura dell'albuminuria, l'interpretazione dell'emoglobina e dell'albumina glicata nei pazienti nefropatici, e faremo quindi un cenno a nuovi possibili biomarcatori di nefropatia diabetica.

Determinazione dell'escrezione urinaria di albumina

L'escrezione urinaria di albumina (UAE) può essere incrementata da fattori fisiologici quali esercizio fisico, postura, diuresi e i campioni non dovrebbero essere raccolti dopo uno sforzo fisico intenso (fino a 2/3 giorni precedenti l'esame), in presenza di infezione urinaria, durante un periodo di convalescenza o in seguito a un intervento chirurgico (31). Risulta idoneo il campione di urina dalla raccolta delle 24 ore, il campione temporizzato del riposo notturno e il primo campione del mattino (sul quale eseguire la misura di albumina e creatinina). La raccolta del primo campione del mattino è preferibile perché risente in minor misura della variabilità biologica rispetto agli altri metodi elencati e perché durante la giornata l'albumina nelle urine potrebbe aumentare per effetto della postura o dell'esercizio fisico (32). Inoltre la variabilità intra-individuale sull'urina del mattino è significativamente minore di quella durante la giornata. A causa dell'alta variabilità individuale e giornaliera, per avere una stima robusta della UAE, dovrebbero essere fatte almeno 3 raccolte di urina diverse, in 3 giorni diversi. Il campione di urina deve poi essere conservato a 4°C (stabile fino a 2 settimane) o a -80°C, nel caso di necessità di conservazione prolungata (stabile fino a 5 mesi). Il congelamento a -20°C è invece sconsigliato perché può portare ad un decremento di albumina. Infatti la proteina è abbastanza fragile e può andare incontro a polimerizzazione o frammentazione dopo cicli di congelamento e scongelamento, o se viene liofilizzata. I campioni che all'ispezione visiva risultano torbidi devono essere centrifugati per eliminare precipitati e componenti cellulari. (32).

Per la determinazione della UAE sono disponibili metodi di misura sia semiquantitativi che quantitativi. Le determinazioni semiquantitative, sono consigliate solo nei programmi di screening in quanto presentano bassa sensibilità e non sono in grado di rilevare modesti aumenti dell'escrezione urinaria dell'albumina, che caratterizzano gli stadi precoci della nefropatia diabetica. Di contro, i saggi di tipo quantitativo risultano invece avere un'alta sensibilità. Sono disponibili diversi metodi

di analisi, e quelli immunologici basati sulla turbidimetria e la nefelometria sono i più utilizzati a livello di laboratorio, mentre il radioimmunoassay (RIA), l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e l'immunodiffusione radiale sono forse ancora utilizzati in pochi laboratori di ricerca. I dati del 2020 di una delle VEQ più utilizzate sul territorio nazionale (Ospedale Careggi, Firenze) dimostrano una variabilità globale attorno al 10%, con una variabilità inter-laboratorio attorno al 16% per le metodiche nefelometriche e attorno all'8% per quelle turbidimetriche. Tali risultati sono vicini ai criteri di accettabilità, che sono CV <15% e limite di rilevabilità di circa 2 mg/L (33). Altre indicazioni, basate su studi clinici osservazionali, suggeriscono per l'imprecisione, un valore più stringente: CV <13% per l'albumina e CV <6% per il rapporto albumina/creatinina (34).

I valori decisionali sono diversi per tipologia di raccolta del campione e sono riportati in Tabella 1. Il suggerimento per la decisione dell'unità di misura da adottare è quello di stabilire un'omogeneità di refertazione tra laboratori della stessa area geografica, cercando di rispondere ad una raccomandazione IFCC sulla necessità di riportare al litro, ove possibile, le unità misurate, evitando quindi unità tipo mg/mL (35). Non sono previsti livelli decisionali diversi per quanto riguarda il sesso del paziente diabetico, mentre per l'associazione albuminuria/rischio cardiovascolare i livelli decisionali sono ancora oggetto di studio, ma studi epidemiologici propendono per una concentrazione inferiore rispetto a quella decisa per la nefropatia diabetica (36).

Infine, per quanto riguarda la standardizzazione, è operativo un gruppo di lavoro della IFCC, (Working Group for standardization of albumin assays in urine) che, ha come obiettivo primario, lo sviluppo di un sistema di riferibilità metrologica in accordo con lo standard ISO 17511. Lo scopo finale è di standardizzare le misure di laboratorio per produrre risultati equivalenti per la misura dell'albumina e della creatinina nelle urine, e

quindi anche del rapporto albumina/creatinina. I materiali di riferimento per la creatinina sono già disponibili, mentre per l'albumina è disponibile, a partire dal 2020, un materiale secondario di riferimento presso il National Institute of Standards and Technology (NIST). È stato sviluppato un metodo di riferimento basato sulla diluizione isotopica applicata alla spettrometria di massa (ID-LC-MS/MS) (37), che è stato sottoposto al Joint Committee for Traceability in laboratory Medicine (JCTLM) per l'inserimento nel database; di questo materiale è in corso la convalida presso la University of Minnesota e la Mayo Clinic. L'obiettivo è di arrivare ad ottenere una riproducibilità con CV <5,0%. Uno studio pilota effettuato confrontando 17 metodi commerciali rispetto al metodo candidato di riferimento aveva evidenziato uno scostamento di $\pm 20\%$ a livelli di albumina di 30 mg/L, e $\pm 10\%$ a livelli di 300 mg/L (38).

Emoglobina e albumina glicata

La misura dell'HbA_{1c} è ormai un indicatore consolidato del controllo glicemico nei 2-3 mesi antecedenti al prelievo ma, nel caso dei pazienti con nefropatie, l'interpretazione del risultato può essere complicata dal fatto che i globuli rossi possono essere più fragili e avere una vita media ridotta, rispetto ai pazienti non nefropatici. Se poi al paziente viene somministrata eritropoietina, la vita media eritrocitaria è ulteriormente ridotta e quindi il tempo medio di esposizione alle fluttuazioni glicemiche è ridotto, con la logica conseguenza che, a parità di controllo glicemico, il paziente diabetico nefropatico avrà dei valori di HbA_{1c} più bassi rispetto a quello che ha mantenuto una funzionalità renale fisiologica (39). L'abbassamento della HbA_{1c}, a parità di controllo glicemico, si manifesta tipicamente allo stadio IV della classificazione di Mogensen prima ricordata (13,40). Non sono disponibili oggi fattori di correzione di sorta per cercare di compensare questa minore finestra temporale. Alcuni hanno proposto che la misura della creatinina eritrocitaria

Tabella 1

Valori soglia per l'albumina nelle urine

Tipo di campione unità di misura	Escrezione urinaria di albuminuria		
	da fisiologica a lievemente aumentata (Classe A1)	moderatamente aumentata (ex "microalbuminuria") (Classe A2)	Notevolmente aumentata (ex "macroalbuminuria") (Classe A3)
Primo campione del mattino ^(a) mg/g creatinina	<30	30-300	>300
mg/mmol creatinina	<3	3-30	>30
Raccolta delle 24 h mg/24h	<30	30-300	>300
Campione temporizzato µg/min	<20	20-200	>200

^(a) Secondo le linee di guida pratiche KDIGO 2020 (rif. 13)

possa permettere di effettuare una correzione, dal momento che la concentrazione di creatina progressivamente diminuisce all'interno del globulo rosso con il progressivo invecchiamento in circolo (41). La misura della creatina può essere facilmente automatizzata ma sembra che pochi autori utilizzino questo ulteriore indicatore (42).

Per quanto riguarda l'albumina glicata, oggi facilmente misurabile con metodica enzimatica su diversi tipi di analizzatori automatici (43,44), è noto che i pazienti nefropatici allo stadio III, che presentano ipoalbuminemia causata da una accentuata perdita dell'albumina a livello glomerulare, possono mostrare valori più bassi di albumina glicata, a causa di un aumentato turnover epatico dell'albumina. Col peggiorare del danno renale la riduzione della diuresi è tale che la proteinuria si riduce e quindi l'albumina glicata torna a riflettere bene il controllo glicemico. Recentemente è stato infine provato che i valori di HbA_{1c} o di glicemia a digiuno prima della dialisi non abbiano particolare rilievo per la prognosi dei pazienti diabetici che ricevono l'emodialisi, mentre invece i valori di albumina glicata rappresentano a tal fine un fattore importante (45). Di fatto, le linee guida della Società giapponese di dialisi raccomandano la misura della albumina glicata per la valutazione del controllo glicemico nei pazienti nefropatici, prima della seduta dialitica (46). Infine, uno studio retrospettivo longitudinale su oltre 350 pazienti, ha dimostrato che un cattivo controllo glicemico unito a livelli elevati di albumina glicata nel siero e ad alterazioni nella funzionalità renale, erano in grado di predire la progressione verso la retinopatia in soggetti con T2DM (47).

Da un punto di vista analitico, la misura di entrambi questi parametri è ormai sufficientemente convalidata, con una affidabilità adeguata rispetto ai traguardi calcolati sulla base della variabilità biologica, come documentato dal lavoro di Montagnana et al. (48). Per lo stato dell'arte delle misure dell'HbA_{1c}, da una nostra precedente analisi effettuata sui risultati di VEQ con campioni di sangue fresco, era emerso che nella grande maggioranza dei casi (anche più del 95%) la qualità delle misure era più che adeguata rispetto ai traguardi stabiliti sulla base dei dati aggiornati di variabilità biologica (49).

Altri potenziali marcatori

Molta attenzione è stata rivolta negli ultimi anni alla ricerca di nuove strategie per l'identificazione precoce del danno e del progressivo declino della funzionalità renale. Dai numerosi studi condotti a questo scopo, sono emersi molti possibili marcatori sia urinari che sierici che, rispetto ai marcatori tradizionali, sembrerebbero possedere una maggiore sensibilità nell'evidenziare le fasi precoci della malattia renale e nel predire la sua progressione verso lo stadio finale. A tal fine, diverse rassegne sono state prodotte su questo argomento (50, 51) e da esse è stato ricavato un elenco dei biomarcatori che ultimamente hanno richiamato maggiori attenzioni, e

che è riportato nella Tabella 2. Per quanto riguarda le evidenze scientifiche pubblicate negli ultimi 10 anni (da inizio 2010 a gennaio 2021), è stata effettuata una ricerca in banche dati (Medline) usando come parole chiave "Diabetes mellitus, Type-1 diabetes, Type-2 diabetes" e incrociandole con "Diabetic nephropathy" e col nome del biomarcatore. Di seguito vengono brevemente commentati quelli che sembrerebbero avere un potenziale vantaggio rispetto al solo uso combinato della misura quantitativa dell'albumina nelle urine, e dell'eGFR.

Partendo dalla patogenesi della nefropatia, dal momento che un gran numero di leucociti invadono il tessuto renale fin dall'inizio della patologia, si è pensato che alcune citochine pro-infiammatorie e alcune chemochine potessero essere dei validi biomarcatori. Tra queste, Khan et al. (51) avevano rilevato che l'interleuchina 8 (IL-8), il tumor necrosis factor alfa e altre chemochine erano significativamente più elevate nei nefropatici rispetto ai soggetti controllo. Successivamente, in considerazione del fatto che la fibrosi è uno dei segni patologici nella matrice extracellulare, e tenendo presente che la iperglicemia modula positivamente l'espressione del fattore di trasformazione di crescita TGF- β 1, l'attenzione si è rivolta verso questa proteina. Si è visto che i livelli urinari di TGF- β 1 erano già elevati nei soggetti con albuminuria fisiologica e che gradualmente aumentavano parallelamente alla progressione della nefropatia diabetica (52).

Relativamente a IL-8, si è riscontrato, che delle 15 voci bibliografiche esaminate, solo 2 erano relative a studi clinici, 4 erano su modelli animali/cellule/tessuti e per la maggior parte delle altre, la ripartizione dei pazienti era fatta in base ai valori di escrezione urinaria di albumina, fatto che di per sé introduce un bias di selezione.

Per quanto riguarda i difetti glomerulari, si è visto che oltre all'albumina le alterazioni funzionali nella filtrazione glomerulare possono provocare la comparsa di transferrina, ceruloplasmina e immunoglobuline G (IgG) nelle urine. Sembrerebbe che le IgG possano rilevare cambiamenti nella funzionalità di filtrazione glomerulare in maniera più precoce della albumina nelle urine (53). Degli altri marcatori elencati nella tabella 2 probabilmente solo il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e il collagene di tipo IV hanno ricevuto sufficienti evidenze per potere essere eventualmente ripresi in studi futuri (54,55).

Nel campo dei marcatori di alterazioni della funzionalità dei tubuli renali, circa un terzo dei pazienti con diabete manifesta tale tipo di alterazione prima della comparsa di proteinuria. Pertanto tali marcatori sono stati molto studiati al fine di permettere una diagnosi e un trattamento precoce della nefropatia nei soggetti con diabete. Senza dubbio la cistatina C è fra marcatori che sono stati più studiati: la sua misura nel siero è utile per stimare la filtrazione glomerulare con una equazione simile a quella per il eGFR a partire dalla creatinina. Una

Tabella 2

Possibili biomarcatori di danno renale, ripartiti per patogenesi e supportati da evidenze pubblicate negli ultimi 10 anni

Tipo di danno	Marcatore	Campione	No. di evidenze
Infiammazione	Interleuchina 8 (IL-8)	S/U	15
	Tumor necrosis factor (TNF- α)	S/U	209
Espansione mesangiale e fibrosi	Trasforming growth factor β -1 (TGF- β 1)	S/U	84
Glomerulare			
Danni di filtrazione	Immunoglobuline G	U	22
	Ceruloplasmina	U	1
	Transferrina	U	9
Danni ai podociti e relativa riduzione del loro numero	Nefrina	U	156
	Podocina	S/U	75
	Podocalixina	U	21
	Sinaptopodina	U	27
	Wilms' Tumor-1 (WT1)	U	15
Danno endoteliale	Glicosaminoglicani (GAG)	U	14
	Von Willebrand factor (vWF)	U	10
	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	P P/U	48
Danno membrana basale	Collagene tipo IV	U	38
	Fibronectina	U	234
	Metalloproteinasi della matrice (MMP)-9	U	26
Tubulare	Cistatina C	P/U	67
	Kidney injury molecule (KIM-1)	S/U	33
	α 1-microglobulina	U	1
	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)	B/P/U	40
	Proteina legante il retinolo 4 (RBP4)	U	13

S, siero; U, urine; P, plasma; B, sangue intero.

meta-analisi pubblicata nel 2016, che ha coinvolto 9 studi compiuti su oltre 1400 pazienti, ha dimostrato chiaramente che la misura della cistatina C nel siero è un predittore precoce di nefropatia diabetica (56). Tra gli altri marcatori, vanno ricordate la alfa1-microglobulina e la lipocalina dei neutrofili associata alla gelatinasi (NGAL) (57,58).

Infine, in uno studio sperimentale recente (59) particolarmente elegante, gli autori hanno utilizzato un approccio multiplo, studiando un pannello di biomarcatori e valutando la loro interrelazione. Su quasi 900 pazienti diabetici di tipo 2 appartenenti alla casistica del Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study sono stati studiati i livelli plasmatici di marcatori coinvolti nei processi infiammatori, fibrotici e nel danno tubulare, in particolare tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR-1), tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), chitinase-like protein YKL-40 (YKL-40), soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR), KIM-1, al fine di verificare se fossero associati alla progressione della DKD e al declino della funzionalità renale. Purtroppo non è stato valutato se i biomarcatori associati alla progressione della DKD avessero un valore predittivo superiore ai marcatori clinici tradizionali, prerequisito

indispensabile affinché possano essere introdotti nella pratica clinica.

Per quanto riguarda le metodiche analitiche, nella grande maggioranza dei casi si tratta di metodiche immunochimiche, principalmente di tipo ELISA. Per taluni sono anche disponibili metodiche di tipo immunoturbidimetrico e nefelometrico, facilmente automatizzabili e spesso rese disponibili da parte di diversi produttori. Gli intervalli di riferimento e i valori decisionali sono metodo-dipendenti, in assenza di sistemi di riferibilità metrologica universalmente validi.

In conclusione, solo se si considerano gli ampi studi longitudinali nei quali i biomarcatori candidati sono associati ad esiti renali rilevanti indipendentemente dai fattori di rischio noti, il numero di potenziali nuovi biomarcatori si riduce moltissimo. Ulteriori studi di convalida saranno pertanto necessari per rafforzare il loro valore prognostico per una futura applicazione clinica.

CONCLUSIONI

L'albuminuria moderatamente aumentata è da anni utilizzata come indicatore precoce di nefropatia diabetica, oggi meglio definita come malattia renale

cronica diabetica (DKD). Il marcatore presenta peraltro importanti limitazioni in quanto influenzata da concomitanti quadri clinici e da variabili correlate al singolo paziente. La metà dei pazienti diabetici con CKD non presenta proteinuria e occorre comprendere se questi pazienti abbiano DKD ad uno stadio precoce con normoalbuminuria, o piuttosto, patologia renale non correlata a diabete (NDKD). Ad oggi, purtroppo, le basi fisiopatologiche del fenotipo con normo-albuminuria restano ancora da chiarire.

Sebbene siano stati individuati marcatori urinari alternativi alla albuminuria moderatamente aumentata, questi non sono ancora utilizzati nella routine clinica. Fino ad un aggiornamento delle linee guida che tenga conto di tali biomarcatori, si continuerà ad utilizzare la albuminuria moderatamente aumentata consapevole delle sue limitazioni, dei fattori confondenti e della necessità di monitoraggio nel tempo.

È opportuno prestare attenzione a indicatori di NDKD, sebbene questi non siano da utilizzare come criteri nella diagnosi differenziale. Le linee guida internazionali continuano a considerare la biopsia renale il gold standard nella diagnosi di DKD. In attesa di nuovi biomarcatori precoci meno invasivi e specifici di DKD vera, un approccio ragionevole è la valutazione nefrologica solo in alcuni pazienti diabetici con CKD in cui siano presenti più indicatori di NDKD e in cui sia stata esclusa la albuminuria moderatamente aumentata reversibile dopo adeguato monitoraggio nel tempo.

Un'altra strategia potrebbe essere quella di effettuare la biopsia solo in coloro in cui, a prescindere da una diagnosi differenziale tra DKD e NDKD, l'esito istologico potrebbe fare la differenza nella scelta terapeutica e nella prognosi.

Rimane comunque importante considerare le caratteristiche del paziente, quali ad esempio, età e aspettativa di vita e, come raccomandato da Anders et al. (3), la gestione del rischio cardiovascolare e della progressione a ESRD sono da considerarsi priorità di intervento assoluto che esulano dalla distinzione patogenetica di DKD e NDKD.

Ringraziamenti

Ringraziamo sentitamente il Dott. Alessandro Terreni (S.O.D. Sicurezza e Qualità, Centro Re-gionale di Riferimento VEQ, A.O.U. Careggi, Firenze) per aver condiviso con noi il rapporto della VEQ 2020 sulla misura della albumina nelle urine.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Ioannou K. Diabetic Nephropathy: is it always there? Assumptions, weaknesses and pitfalls in the diagnosis. *Hormones* 2017;16:351-61.
- Winocour PH. Diabetes and chronic kidney disease: an

- increasingly common multi-morbid disease in need of a paradigm shift in care. *Diabet Med* 2018;35:300-5.
- Anders HJ, Huber TB, Isermann B, et al. CKD in Diabetes: Diabetic Kidney Disease versus Nondiabetic Kidney Disease. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:361-77.
- Navaneethan SD, Schold JD, Jolly SE, et al. Diabetes control and the risks of ESRD and mortality in patients with CKD. *Am J Kid Dis* 2017;70:191-8.
- Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;359:1577-89.
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861-9.
- Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015;373:211-28.
- Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2017;377:644-57.
- Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016;375:311-22.
- Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016;375:1834-44.
- Gregg EW, Li Y, Rios Burrows N, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990–2010. *N Engl J Med* 2014;370:1514-23.
- Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, et al. Empagliflozin and progression of kidney disease in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016;375:323-34.
- KDIGO 2020 Clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2020;98:S1–S115.
- Berhane AM, Weil EJ, Knowler WC, et al. Albuminuria and estimated glomerular filtration rate as predictors of diabetic end-stage renal disease and death. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:2444-51.
- Goligorsky MS. Vascular endothelium in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017;312:266-75.
- Zeni L, Norden AGW, Cancarini G, Unwin RJ. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J Nephrol* 2017;30:701-17.
- Wang XX, Levi J, Luo Y, et al. SGLT2 protein expression is increased in human diabetic nephropathy: SGLT2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice. *J Biol Chem* 2017;292:5335-48.
- Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia* 2015;58:443-5.
- Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease: with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983;32:64-78.
- Pugliese G, Penno G, Natali A, et al. Diabetic Kidney Disease: new clinical and therapeutic issues. Joint Position Statement of the Italian Diabetes Society and the Italian Society of Nephrology on 'The natural history of diabetic kidney disease and treatment of hyperglycemia in patients with Type 2 Diabetes and impaired renal function. *NutrMetab Cardiovasc Dis* 2019;29:1127-50.
- Perkins BA, Ficociello LH, Silvs KH, et al. Regression of albuminuria in Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* 2003;348:2285-93.
- Standards of Medical Care in Diabetes—2017: Summary of Revisions. *Diabetes Care* 2017;40 (Suppl 1):S4-S5.

23. Thomson SC, Deng A, Bao D, et al. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest* 2001;107:217-24.
24. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2016;11:e0158765.
25. Fiorentino M, Bolignano D, Tesar V et al. Renal biopsy in patients with diabetes: a pooled meta-analysis of 48 studies. *Nephrol Dial Transplant* 2017;32:97-110.
26. Soni SS, Gowrishankar S, Kishan AG, et al. Non Diabetic Renal Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nephrology* 2006;11:533-7.
27. Halimi JM. The emerging concept of chronic kidney disease without clinical proteinuria in diabetic patients. *Diabetes Metab* 2012;38:291-7.
28. Dalla Vestra M, Fioretto P. Diabetic Nephropathy: renal structural studies in Type 1 and Type 2 diabetic patients. *InteCongr Ser* 2003;1253:163-9.
29. Piccoli GB, Grassi G, Cabiddu G, et al. Diabetic Kidney Disease: A syndrome rather than a single disease. *Rev Diabet Stud* 2015;12:87-109.
30. Di Paolo S, Fiorentino M, De Nicola L, et al. Indications for renal biopsy in patients with diabetes. Joint position statement of the Italian Society of Nephrology and the Italian Diabetes Society. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020;30:2123-32.
31. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Sixth edition. Elsevier, St. Louis, 2018.
32. Graziani MS. Un aggiornamento delle linee guida internazionali per la valutazione e la gestione della malattia renale cronica. *Biochim Clin* 2014;38:32-8.
33. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011;57:e1-e47.
34. Mosca A, Paleari R, Ceriotti F et al. Biological variability of albumin excretion rate and albumin to creatinine ratio in hypertensive type 2 diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1229-33.
35. Hansen YBL. Recommendations on measurement units – why and how. *EJIFCC* 2019;30:270-5.
36. Graziani MS, Caldini AL per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMEI Diabete Mellito. Indicazioni per la misura dell'albumina nelle urine per l'accertamento e il monitoraggio della nefropatia diabetica. *Biochim Clin* 2011;35:127-30.
37. Beasley-Green A, Burris NM, Bunk DM, et al. Multiplexed LC-MS/MS assay for urine albumin. *J Proteome Res* 2014;13:3930-9.
38. 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.
39. Freedman BI, Shenoy RN, Planer JA, et al. Comparison of glycosylated albumin and hemoglobin A1c concentrations in diabetic subjects on peritoneal and hemodialysis. *Perit Dial Int* 2010;30:72-9.
40. Shima K, Chujo K, Yamada M, et al. Lower value of glycosylated haemoglobin relative to glycaemic control in diabetic patients with end-stage renal disease not on haemodialysis. *Ann Clin Biochem* 2012;49:68-74.
41. Jiao Y, Okumiyama T, Saibara T, et al. Abnormally decreased HbA1c can be assessed with erythrocyte creatine in patients with a shortened erythrocyte age. *Diabetes Care* 1998;21:1732-5.
42. Beyer C, Alting IH. Enzymatic measurement of creatine in erythrocytes. *Clin Chem* 1996;42:313-8.
43. Kouzuma T, Uemastu Y, Usami T, et al. Study of glycosylated amino acid elimination reaction for an improved enzymatic glycosylated albumin measurement method. *Clin Chim Acta* 2004;346:135-43.
44. Paleari R, Bonetti G, Callà C, et al. Multicenter evaluation of an enzymatic method for glycosylated albumin. *Clin Chim Acta* 2017;469:81-6.
45. Freedman BI, Andries L, Shihabi ZK, et al. Glycosylated albumin and risk of death and hospitalizations in diabetic dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1635-43.
46. Nakao T, Inaba M, Abe M, et al. Japanese Society for Dialysis Therapy. Best practice for diabetic patients on hemodialysis 2012. *Ther Apher Dial* 2015;9(Suppl 1):40-66.
47. Pan J, Li Q, Zhang L, et al. Serum glycosylated albumin predicts the progression of diabetic retinopathy—a five year retrospective longitudinal study. *J Diabetes Complications* 2014;28:772-8.
48. Montagnana M, Paleari R, Danese E, et al. Evaluation of biological variation of glycosylated albumin (GA) and fructosamine in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2013;423:1-4.
49. Mosca A, Quercioli M, Paleari R. The analytical performance of laboratory plasma glucose and HbA1c measurements are largely acceptable. *Acta Diabetologica* 2020;57:215-9.
50. Lee S, Choi ME. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. *Pediatr Nephrol* 2015;30:1063-75.
51. Khan NU, Lin J, Liu X, et al. Insights into predicting diabetic nephropathy using urinary biomarkers. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2020;1868:140475.
52. Xie F. Significance of serum and urinary TGF-β1 to the early diagnosis of diabetic nephropathy. *Strait Pharmaceutical J* 2009;21:145-6.
53. Narita T, Sasaki H, Hosoba M, et al. Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004;27:1176-81.
54. Kim NH, Oh JH, Seo JA et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:167-77.
55. Morita M, Uchigata Y, Hanai K, et al. Association of urinary type IV collagen with GFR decline in young patients with type 1 diabetes. *Am J Kidney Dis* 2011;58:915-20.
56. Zhou B, Zou H, Xu G. Clinical utility of serum cystatin c in predicting diabetic nephropathy among patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Kidney Blood Press Res* 2016;41:919-28.
57. Hong CY, Hughes K, Chia KS, et al. Urinary alpha1-microglobulin as a marker of nephropathy in type 2 diabetic Asian subjects in Singapore. *Diabetes Care* 2003;26:338-42.
58. Mishra J, Ma Q, Prada A et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2534-43.
59. Schrauben SJ, Haochang S, Zhang X, et al. on behalf of the CKD Biomarkers Consortium and the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Investigators. Association of multiple plasma biomarker concentrations with progression of prevalent diabetic kidney disease: findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *JASN* 2021; doi: 10.1681/ASN.2020040487.

Valutazione critica e meta-analisi delle stime di variabilità biologica degli analiti relativi alle patologie renali

Niels Jonker¹, Berna Aslan², Beatriz Boned³, Fernando Marqués-García⁴, Carmen Ricós⁵, Virtudes Alvarez⁵, William Bartlett⁶, Federica Braga⁷, Anna Carobene⁸, Abdurrahman Coskun⁹, Jorge Diaz-Garzón¹⁰, Pilar Fernández-Calle¹⁰, Elisabet Gonzalez-Lao¹¹, Joana Minchinela¹², Carmen Perich⁵, Margarita Simón¹³, Sverre Sandberg¹⁴, Aasne K. Aarsand¹⁵, on behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Biological Variation and Task Group for the Biological Variation Database

¹Certe-Wilhelmina Ziekenhuis Assen, Europaweg-Zuid 1, 9401 RK, Assen, The Netherlands

²Institute for Quality Management in Healthcare (IQMH), Centre for Proficiency Testing, Toronto, Ontario, Canada

³Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML), Analytical Quality Commission, Barcelona, Spain; Royo Villanova Hospital, Zaragoza, Spain

⁴Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML), Analytical Quality Commission, Barcelona, Spain; Department of Clinical Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁵Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML), Analytical Quality Commission, Barcelona, Spain

⁶School of Medicine, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK

⁷Research Centre for Metrological Traceability in Laboratory Medicine (CIRME), University of Milan, Milan, Italy

⁸Servizio Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milan, Italy

⁹Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University, School of Medicine, Atasehir, Istanbul, Turkey

¹⁰Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML), Analytical Quality Commission, Barcelona, Spain; Department of Laboratory Medicine, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

¹¹Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML), Analytical Quality Commission, Barcelona, Spain; Quality Healthcare Consulting, Grupo ACMS, Madrid, Spain

¹²Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML), Analytical Quality Commission, Barcelona, Spain; Metropolitana Nord Unified Laboratory (LUMN), Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain

¹³Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML), Analytical Quality Commission, Barcelona, Spain; Consortium of Laboratory Intercomarcal Alt Penedès and Garraf l'Anoia, Vilafranca del Penedès, Spain

¹⁴Norwegian Porphyria Centre, Department of Medical Biochemistry and Pharmacology, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway; Norwegian Organization for Quality Improvement of Laboratory Examinations (NOKLUS), Haralds plass Deaconess Hospital, Bergen, Norway; and Department of Global Health and Primary Care, Faculty of Medicine, University of Bergen, Bergen, Norway

¹⁵Norwegian Porphyria Centre, Department of Medical Biochemistry and Pharmacology, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway; Norwegian Organization for Quality Improvement of Laboratory Examinations (NOKLUS), Haralds plass Deaconess Hospital, Bergen, Norway

Traduzione a cura di Anna Carobene (Ospedale San Raffaele, Milano)

This is the Italian translation of the Critical appraisal and meta-analysis of biological variation estimates for kidney related analytes Clin Chem Lab Med 2020 doi 10.1515/cclm-2020-1168. Biochimica Clinica (the official journal of SIBioC) prepared this translation. The EFLM has not endorsed nor approved the contents of this translation. The official version of the Document is located at www.EFLM.eu. Users should cite the original source when citing the document.

Questo articolo è la traduzione di Critical appraisal and meta-analysis of biological variation estimates for kidney related analytes Clin Chem Lab Med 2020 doi 10.1515/cclm-2020-1168. Il materiale supplementare dell'articolo è disponibile on line (1S). EFLM non è responsabile della accuratezza della traduzione. In caso di citazione, riferirsi alla pubblicazione originale.

Ricevuto: 27.01.2021

Accettato: 28.01.2021

Publicato on-line: 10.03.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.005

ABSTRACT**Critical appraisal and meta-analysis of biological variation estimates for kidney related analytes.**

Objective: Kidney markers are some of the most frequently used laboratory tests in patient care, and correct clinical decision making depends upon knowledge and correct application of biological variation (BV) data. The aim of this study was to review available BV data and to provide updated BV estimates for the following kidney markers in serum and plasma; albumin, creatinine, cystatin C, chloride, potassium, sodium and urea.

Content: Relevant studies were identified from a historical BV database as well as by systematic literature searches. Retrieved publications were appraised by the Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist (BIVAC). Metaanalyses of BIVAC compliant studies with similar design were performed to deliver global estimates of within-subject (CV_i) and between-subject (CV_e) BV estimates. Out of the 61 identified papers, three received a BIVAC grade A, four grade B, 48 grade C, five grade D grade and one was not appraised as it did not report numerical BV estimates. Most studies were identified for creatinine (n=48). BV estimates derived from the meta-analysis were in general lower than previously reported estimates for all analytes except urea. For some measurands, BV estimates may be influenced by age or states of health, but further data are required.

Summary: This review provides updated global BV estimates for kidney related measurands. For all measurands except for urea, these estimates were lower than previously reported.

Outlook: For the measurands analyzed in this review, there are sufficient well-designed studies available to publish a trustworthy estimate of BV. However, for a number of newly appearing kidney markers no suitable data is available and additional studies are required.

Parole chiave: prestazioni analitiche, biomarcatori, variabilità biologica

INTRODUZIONE

Una funzionalità renale ridotta correla fortemente con un aumento di morbosità e di mortalità, e le misure di alcuni parametri biochimici, hanno un ruolo centrale nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie renali e sulla efficacia del trattamento. La conoscenza della variabilità biologica (VB) intra-individuale (CV_i), è essenziale per la interpretazione dei risultati degli esami di laboratorio. I dati di VB, sia CV_i sia di VB interindividuale (CV_e), possono essere usati per esempio per la definizione degli obiettivi di qualità analitica (APS) (1), per il controllo di qualità interno (2) e per i programmi di valutazione esterna di qualità (3,4). La creatinina sierica e l'urea sono utilizzate sia per valutare il rischio del paziente a sviluppare malattie renali, sia per il monitoraggio del paziente con malattia renale cronica (*chronic kidney disease*, CKD). Per valutare se una differenza tra due misure seriali è potenzialmente di significato clinico o è coerente con la VB normale, è importante valutare la VB in un contesto che sia paragonabile al contesto clinico, fornendo così un valido punto di riferimento che garantisca un sicuro utilizzo dei dati. Questo significa che se un paziente, per monitorare la sua funzionalità renale, effettua le analisi ogni tre mesi, stime di VB ottenute da misure settimanali potrebbero non essere adeguate allo scopo.

Quindi, le stime di CV_i usate per calcolare i valori di differenza critica (DC)¹ (1), devono essere appropriate. La DC, nel descrivere la massima differenza attesa tra due misure seriali ad una data probabilità, tiene conto anche della variabilità analitica (CV_A) del metodo di misura. Differenze tra misure seriali maggiori del valore di DC,

calcolato dalle stime di CV_i e di CV_A , potrebbero quindi rappresentare importanti cambiamenti nella funzionalità renale del paziente.

I dati di VB hanno anche altre importanti applicazioni, che però dipendono dalla disponibilità di stime affidabili, ben caratterizzate, e che siano di sufficiente qualità, così da essere trasferibili alla popolazione per la quale l'esame di laboratorio deve essere utilizzato. A questo proposito, sono stati sollevati alcuni dubbi sulla affidabilità dei dati esistenti di VB e sulla veridicità delle stime di VB pubblicate sul database storico di VB, revisionato nel 2014 (5,6).

Con queste premesse, il gruppo di studio di VB della Società Europea di Chimica Clinica e di Medicina di Laboratorio (EFLM), insieme alla Task force sul database di VB, hanno sviluppato e pubblicato di recente la lista di controllo denominata BIVAC "Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist" (7). La lista BIVAC permette di valutare la qualità delle pubblicazioni di VB verificando se negli studi sono presenti gli elementi essenziali che potrebbero influenzare la veridicità, e quindi l'utilità, delle stime di VB da essi derivate (7,8). La lista BIVAC è quindi uno strumento che permette sia di revisionare le stime storiche di VB, sia di valutare nuovi studi di VB, e in questo lavoro è stata utilizzata per un processo di revisione sistematica dei lavori di VB per i misurandi comunemente utilizzati nella medicina renale.

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

- effettuare una rassegna sistematica della letteratura di studi di VB pubblicati per i misurandi utilizzati nella diagnosi e nella gestione delle patologie renali: albumina, cistatina C, cloro, creatinina, potassio, sodio e urea, in siero e in plasma;

¹NdT. In inglese è meglio nota come "reference change values", (RCV)

- valutare criticamente le pubblicazioni su questi marcatori utilizzando la lista BIVAC (7);
- verificare l'effetto che sia le caratteristiche delle popolazioni sia l'intervallo di campionamento hanno sulle stime associate di VB;
- calcolare le stime globali di VB per i misurandi renali, effettuando la meta-analisi tra le stime di VB degli studi che hanno un disegno sperimentale comparabile tra loro e che siano conformi a BIVAC.

METODI

Il database storico di VB² è stato identificato come iniziale risorsa di materiale di dati sulla VB e da lì sono state recuperate le pubblicazioni correlate ai marcatori renali (voci bibliografiche 7-246 nella Tabella 1 dei dati supplementari) (2S) (5,6). Inoltre, come descritto in dettaglio in (7), sono state fatte ulteriori ricerche bibliografiche in PubMed fino al 7 febbraio 2020, grazie a cui sono state identificate altre 200 pubblicazioni, 26 delle quali relative a marcatori renali (voci bibliografiche 248-483 Tabella 1 dati supplementari). Le pubblicazioni qui considerate sono identificate dal numero che è stato loro assegnato nel database di VB della EFLM (9) (Tabella 1, dati supplementari) (2S).

Quando uno studio include più stime di VB per diversi sottogruppi di popolazione, come per esempio sottogruppi differenziati per sesso, età, stato di salute, al numero che identifica l'articolo viene aggiunta anche una lettera (a, b, c etc.), come illustrato nella Tabella 1 dei dati supplementari (2S). Tutte le pubblicazioni, separatamente per ogni misurando e/o sottogruppo della stessa pubblicazione, sono state valutate indipendentemente da gruppi di due valutatori. Utilizzando la lista BIVAC, ogni pubblicazione è valutata in base a 14 diversi criteri di qualità (QI) che includono le procedure pre-analitiche, la

procedura analitica, i metodi statistici utilizzati e la presentazione dei dati (7).

Ai singoli QI viene assegnato un punteggio di qualità che può essere A (ottima qualità, pienamente conforme al criterio), B (buona), C (sufficiente) o D (inaccettabile). Basandosi su ognuno dei 14 QI, alla pubblicazione viene poi assegnato un punteggio globale BIVAC, che corrisponde al valore più basso del punteggio assegnato ai singoli QI. Quando i due valutatori sono in disaccordo sul punteggio dei singoli QI, tutti i valutatori del gruppo prendono in esame la pubblicazione fino a quando il consenso viene raggiunto. I risultati di queste valutazioni BIVAC, con anche i dati sulla popolazione degli studi, le caratteristiche degli studi sperimentali, e le stime di VB a loro associate, vengono inseriti in un file Excel (vedi l'esempio della Cistatina C nella Tabella 2, dati supplementari) (3S).

Con i dati relativi al numero dei soggetti, al numero dei campioni analizzati e del CV analitico (CV_A), quando disponibili, sono stati calcolati gli intervalli di confidenza (IC) intorno alle stime di VB di CV_I e di CV_G al livello di probabilità del 95% (IC95%), utilizzando il metodo descritto da Burdick (10) e Sahai (11). Le stime globali di CV_I e CV_G sono poi ottenute utilizzando la meta-analisi tra diverse stime di VB provenienti dalle diverse pubblicazioni. La meta-analisi combina i dati di VB considerando l'inverso dell'IC intorno ad ogni singola stima di VB e il suo peso che si basa sullo score BIVAC. In particolare, se il punteggio è A viene moltiplicato per 4, se uguale a B per 2 e se uguale a C per 1 (5).

Quando le pubblicazioni riportano diverse stime per differenti sottogruppi, queste stime vengono prima combinate tra di loro per ottenere una unica stima comune, utilizzando la media pesata delle singole stime di VB con i loro corrispondenti IC. Infine, per indicare l'IC intorno alla stima globale di CV_I, viene utilizzato il metodo bootstrap³ (12).

Tabella 1

Panoramica del numero di studi identificati dalla ricerca sistematica per ciascun misurando, con il punteggio BIVAC (A,B,C,D) associato e il numero di sottogruppi. I sottogruppi sono basati su età, sesso, stato di salute, intervallo di campionamento e, nel caso della creatinina, sul metodo analitico.

Misurando	N° studi	A	B	C	D	N° sottogruppi
Albumina	35	1	1	29	3	56
Creatinina	49	1	4	40	4	78
Cistatina C	11	1	1	8	1	18
Cloro	27	1	1	22	2	33
Potassio / Sodio	31	1	1	26	2	34
Urea	33	1	2	27	2	40
Totale	61*	3	4	48	5	259

BIVAC, Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist.

**Uno studio non ha fornito stime numeriche di Variabilità Biologica e pertanto non è stato incluso*

²NdT. Ci si riferisce al database di Ricos et al. www.westgard.com

³NdT. Per informazioni ulteriori sul metodo bootstrap vedi anche Vidali M. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1: S79-85.

Tabella 2

Stime di CV_i e di CV_e ottenute dalla meta-analisi degli studi conformi a BIVAC di simile disegno sperimentale, confrontate con le stime riportate sul database storico di VB

Misurando	No di studi inclusi nella meta-analisi	Stime di VB ottenute dalla meta-analisi		Database storico di Variabilità Biologica*	
		CV _i (IC95%)	CV _e (IC95%)	CV _i	CV _e
Albumina	10	2.6 (2.2 - 3.9)	5.1 (2.2 - 6.3)	3.2	4.7
Cloro	7	1.1 (0.9 - 2.1)	1.3 (0.8 - 1.4)	1.3	1.3
Creatinina	11	4.5 (4.4 - 5.7)	14.2 (7.0 - 17.4)	5.9	14.7
Cistatina C	3	4.0 (3.9 - 8.6)	12.1 (12.0 - 15.1)	5.0	13.0
Potassio	7	4.1 (3.1 - 5.4)	4.1 (4.1 - 7.7)	4.6	5.6
Sodio	7	0.5 (0.2 - 1.4)	1.2 (0.5 - 1.4)	0.6	0.7
Urea	9	13.9 (9.5 - 14.4)	19.0 (1.1 - 22.5)	12.1	18.7

CV_i, variabilità biologica intra-individuale; CV_e, variabilità biologica inter-individuale; BIVAC, Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist; IC95%, intervalli di confidenza al 95%.

* Database a cura Ricos et al. www.westgard.com

Nella meta-analisi sono inclusi solo gli studi che riportano stime di VB di soggetti adulti sani (intervallo 18-75 anni). Ulteriori criteri di esclusione sono i seguenti: studi nei quali gli IC non possono essere calcolati, studi con intervalli di campionamento più frequenti di due volte alla settimana o con frequenza superiore ad una volta al mese, e studi che includono solo due campioni per soggetto. Inoltre, sono stati esclusi gli studi che, a causa di metodi analitici non standard (come per esempio la elettroforesi sierica per l'albumina, o la chimica secca per gli elettroliti), presentano stime di VB molto differenti.

RISULTATI

Sono state incluse in totale 61 pubblicazioni con dati di VB di marcatori renali. Per la creatinina è stato identificato il numero più alto di pubblicazioni (n=48) (Tabella 1). Includendo tutti i misurandi e tutti i sottogruppi, sono state identificate in totale 259 stime di VB (Tabella 1). Dei 61 lavori valutati, soltanto tre sono stati giudicati di qualità "A" in accordo con la lista BIVAC (13-15), tutti e tre pubblicati di recente. Quattro pubblicazioni hanno ricevuto un punteggio B (16-19), mentre la maggior parte, 48 pubblicazioni, un punteggio pari a C. Le ragioni più comuni del punteggio C, in ordine di frequenza, riguardano il non avere verificato la omogeneità delle varianze (omoschedasticità, QI 10), non aver riportato il numero esatto di dati utilizzati per calcolare le stime di VB (QI 12), e il non aver effettuato, o dichiarato, una appropriata analisi statistica per l'individuazione degli outliers (QI 8). A 5 pubblicazioni (110, 220, 270, 271, 309) è stato assegnato il punteggio D, perché il tempo tra i prelievi non è stato standardizzato (QI 3) o perché lo studio è stato condotto utilizzando analizzatori diversi tra loro (QI 4). Uno studio non è stato considerato (288) perché non riportava dati numerici di VB.

Le stime di CV_i con i rispettivi IC95%, per ogni analita e per ogni sottogruppo, sono rappresentate nelle Figure 1-6. Il numero di lavori che sono stati inclusi nel calcolo di meta-analisi, varia da un minimo di tre per la cistatina, ad un massimo di 11 per la creatinina (Tabella 2). Per diversi misurandi, in particolare per la creatinina, la stima globale calcolata con la meta-analisi risulta essere leggermente inferiore al valore riportato nel database storico (6) (Tabella 2). Occorre però tenere conto che è difficile confrontare direttamente i dati calcolati con la meta-analisi con i dati storici, perché le stime di VB nel database storico non sono presentate con i rispettivi IC.

DISCUSSIONE

La disponibilità di stime di VB robuste e adeguate è un requisito essenziale perché queste ultime possano essere utilizzate efficacemente sui risultati di laboratorio. La lista BIVAC, specificando i criteri che gli studi di VB devono soddisfare per produrre dati affidabili di VB, rispetto ai precedenti approcci, potrebbe rappresentare un importante progresso nella valutazione dei lavori di VB (20). BIVAC, inoltre, fornisce lo schema da seguire per pianificare uno studio di VB, per produrre stime affidabili di VB, che siano quindi utilizzabili in pratica clinica. Inoltre, studi prodotti in accordo a BIVAC, sarebbero immediatamente idonei per essere inclusi nel database online pubblicato da EFLM (9).

L'utilizzo di BIVAC sulle pubblicazioni storiche, ha messo in luce che diversi criteri di qualità spesso non sono stati rispettati. Ad esempio, il metodo classico proposto da Fraser e Harris (21) richiede che i risultati ottenuti, siano sottoposti all'analisi della omogeneità delle varianze prima di ulteriori analisi statistiche dei dati, e a test di identificazione degli outliers. Tuttavia molti autori di studi di VB pare non abbiano recepito questo requisito.

Gli utilizzatori dei dati di VB potrebbero non essere al corrente della qualità dei dati prodotti, ma ora, con l'utilizzo di BIVAC, i criteri di qualità sono chiaramente identificati e i punteggi relativi ai 14 QI che soddisfano i requisiti fondamentali, sono comunicati in modo chiaro, come viene fatto in questa rassegna sistematica.

Questa rassegna sistematica della letteratura, ha identificato solo tre pubblicazioni di ottima qualità (punteggio BIVAC "A") con dati di VB di importanti misurandi per la diagnosi la gestione e il monitoraggio delle malattie renali. Gli altri studi inclusi sono stati giudicati B e C, o D per non aver soddisfatto uno, o più, QI della lista BIVAC. La maggior parte degli studi considerati in questa rassegna, sono stati condotti su soggetti sani, mentre un più piccolo numero di studi è stato condotto in gruppi di soggetti in differenti stato di salute, o in gruppi di età diversi, come viene dettagliato qui di seguito

Albumina

La maggior parte degli studi riporta valori di VB ottenuti da misure dell'albumina nel siero. Tra tutte le pubblicazioni valutate, solo la pubblicazione dello studio europeo di variabilità biologica (EuBIVAS) ha ricevuto un punteggio in accordo con BIVAC pari ad A (15). La pubblicazione 53 è stata esclusa dalla meta-analisi perchè riportava un valore di CV_i che era un evidente outliers, probabilmente dovuto al fatto che le analisi erano state eseguite con un differente metodo di misura (elettroforesi proteica). La maggior parte degli studi hanno usato sia immunodosaggi, sia metodi colorimetrici (bromocresolo verde/porpora)

Sono stati identificati quattro studi su individui non sani, con le seguenti patologie: malattia epatica cronica, diabete mellito, infarto del miocardio e malattie renali. Le stime di CV_i derivate da queste popolazioni di individui non sani, non differiscono significativamente dalle stime di VB ottenute da soggetti sani.

Non ci sono sufficienti dati per trarre conclusioni sull'influenza dell'età nelle stime di VB per l'albumina, anche se, uno studio (pubblicazione 246, con punteggio BIVAC pari a C) eseguito su soggetti anziani (80-92 anni), riportava stime di CV_i % leggermente più alte, 4,0% (IC95% 3,9-4,8) nei maschi, e 4,5% (4,1-5,0) nelle femmine, se confrontate con i valori di 3,4% (3,1-3,8) e 3% (2,7-3,4) ottenuti negli adulti sani.

È stato identificato un solo studio effettuato sui bambini (pubblicazione 248a), che riportava un valore di CV_i pari a 2,3%, con prelievi effettuati in un giorno solo ogni due ore. È da tener presente però che questo studio rappresenta una VB a breve termine, per cui stime di VB pediatriche ottenute da campionamenti con intervalli temporali più lunghi, potrebbero essere diverse.

Creatinina

La maggioranza degli studi è stata eseguita su creatinina sierica (48 lavori su 68). Un confronto con gli studi eseguiti su plasma non è stato possibile, in

quanto questi ultimi sono stati esclusi dalla meta-analisi per diverse ragioni, come per esempio il fatto di aver misurato solo due campioni per soggetto, di aver effettuato studi a breve termine in un singolo giorno, o di avere incluso soggetti non sani. L'unico studio giudicato A (numero 333), riporta stime di VB ottenute con due diversi metodi analitici, sia per l'intera popolazione sia per sottogruppi maschi e femmine, con valori di CV_i che sono più bassi e che hanno gli intervalli di confidenza più stretti di tutti gli altri.

Questo studio è frutto del progetto EuBIVAS, uno studio, avviato dal gruppo di studio sulla VB della EFLM, che si è svolto secondo un protocollo molto dettagliato e rigoroso, nel quale sono stati inclusi 91 soggetti sani. Questo lavoro, avendo IC stretti e un alto peso dovuto al punteggio A BIVAC, riportando un CV_i di 4,2% per il sottogruppo dei maschi, e un 4,6% per le femmine, ha una grande influenza sulla stima globale di CV_i (4,5%) ottenuta dalla meta-analisi, valore che è risultato inferiore a quello che veniva usato precedentemente di 5,9%, presente nel database storico di VB.

Alcune pubblicazioni, sia B che C, con dati ottenuti su soggetti sani, riportano simili valori di CV_i o anche inferiori a quelli di EuBIVAS; ma, considerando che sono stati condotti su un disegno sperimentale di piccola scala, i loro IC sono più ampi, e quindi hanno un peso inferiore nella meta-analisi (Figura 2). Relativamente al metodo analitico, la maggior parte dei lavori utilizza un metodo Jaffe (picrato alcalino), mentre solo 5 lavori utilizzano un metodo enzimatico, metodo di misura raccomandato per la creatinina (22,23).

In ogni caso sembrerebbe che non ci siano differenze nelle stime di CV_i ottenute con i due diversi metodi analitici, come mostrato da EuBIVAS, dove le stime di VB sono state ottenute con entrambi i metodi (14). Nella meta analisi sono stati inclusi 6 studi che sono stati eseguiti dopo la standardizzazione della creatinina del 2009 (NIST SRM 967a). Considerando che la standardizzazione ha provocato una diminuzione dei valori di creatinina, teoricamente ci saremmo potuti aspettare valori di VB più alti dei valori pre-standardizzazione, ma in realtà questo effetto non si è osservato. Infatti, escludendo dalla meta-analisi gli studi effettuati nel periodo pre-standardizzazione, non si osservano differenze significative tra le stime di VB pre e post standardizzazione, che mostrano sovrapposizione dei relativi IC.

La produzione di creatinina è correlata alla massa muscolare che cambia in funzione dell'età e dell'esercizio fisico, fatto che, teoricamente, potrebbe avere un impatto sulle stime di VB nei sottogruppi. Due degli studi valutati riportano stime di VB nei bambini ma entrambi sono studi di VB all'interno di un singolo giorno (248a, 270a,b). Tre lavori sono studi su soggetti anziani (>75 anni) (riferimenti 49, 246 e 263). Le stime di CV_i [rispettivamente 4,3% (49), 3,8% (246) e 7,1% per i maschi; 7,0% per le femmine (263)], sembrano

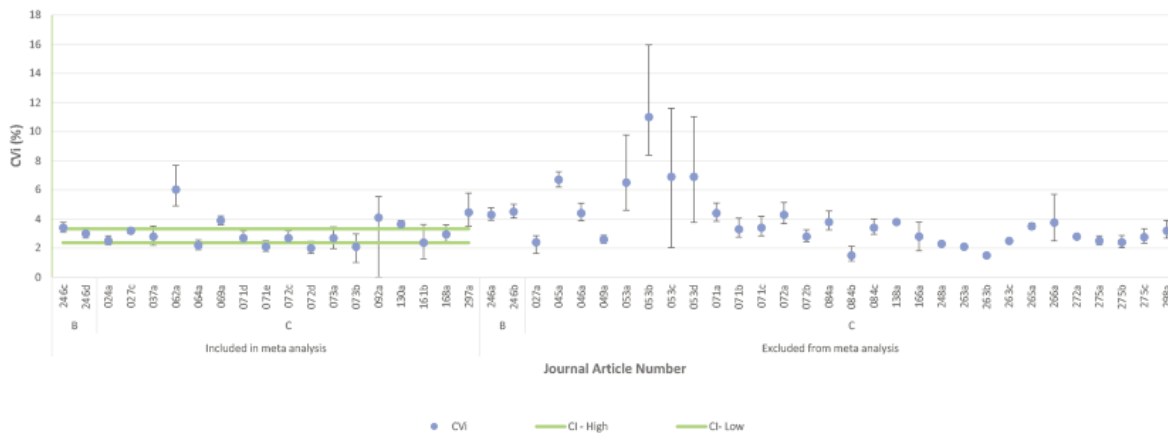


Figura 1

Stime della variabilità biologica intra-individuale (CV) per l'albumina. Gli intervalli di confidenza (IC) dei singoli studi sono mostrati come barre di errore attorno al punto di CV. I numeri sull'asse delle x rappresentano il numero identificativo del riferimento del database di EFLM sulla variabilità biologica (elencati in Tabella 1 del materiale supplementare); le lettere vicino al numero rappresentano i diversi sotto-gruppi. I limiti dei IC al 95% della stima globale della variabilità biologica sono rappresentati dalle due linee verdi.

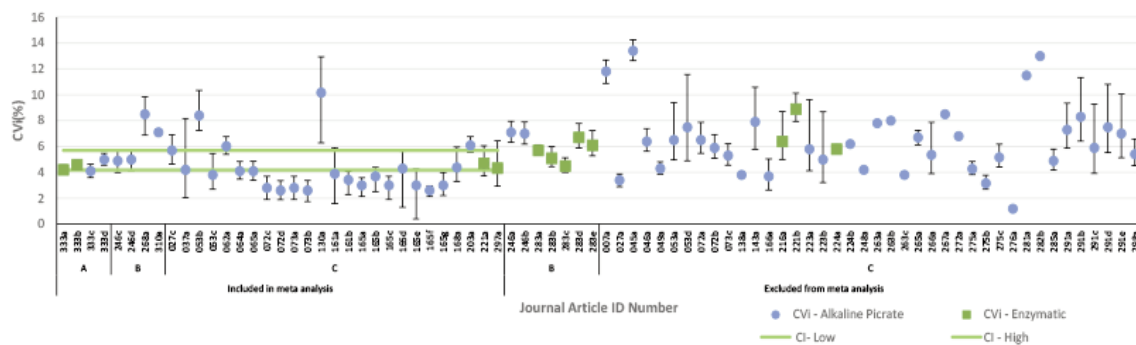


Figura 2

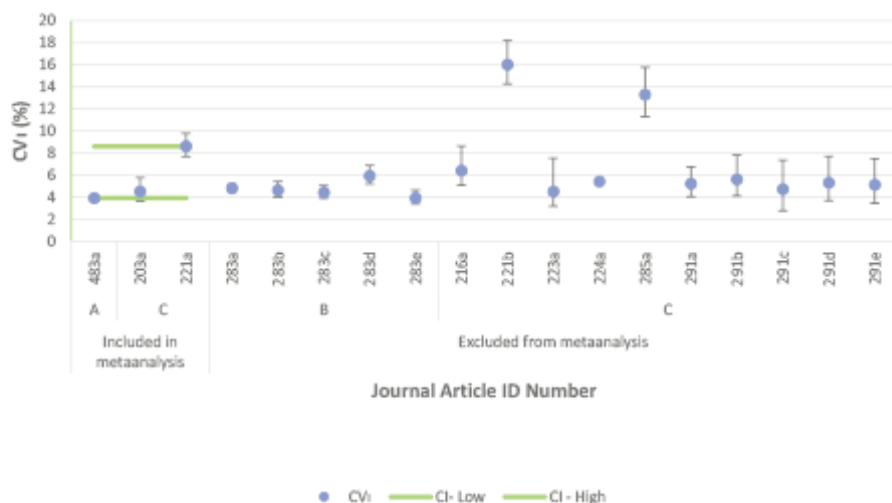
Stime della variabilità biologica intra-individuale (CV) per la creatinina. Gli intervalli di confidenza (IC) dei singoli studi sono mostrati come barre di errore attorno al punto di CV. I numeri sull'asse delle x rappresentano il numero identificativo del riferimento del database di EFLM sulla variabilità biologica (elencati in Tabella 1 del materiale supplementare); le lettere vicino al numero rappresentano i diversi sotto-gruppi. I limiti dei IC al 95% della stima globale della variabilità biologica sono rappresentati dalle due linee verdi.

non differire significativamente dalle stime dei non anziani, anche se la uguaglianza deve essere ancora provata.

La creatinina è l'analita che è stato studiato per lo più in popolazioni di soggetti non sani (Tabella 1 e 2). Considerando che la creatinina è usata spesso nel monitoraggio, l'impatto di diverse patologie sui dati di VB, come nei soggetti con malattie renali, nei pazienti post trapianto renale, con diabete mellito, o infarto del miocardio è di una certa importanza. Alcune patologie, sembrano avere effetto sui dati di CV_i: per esempio il riferimento 7 (punteggio BIVAC C) effettuato su pazienti post trapianto renale, così come il 45 (punteggio BIVAC C), su pazienti che hanno avuto un infarto del miocardio, presentano stime di CV_i più alte. Non è chiaro però se i pazienti di questi studi fossero

in una condizione stabile, o come si possa definire adeguatamente una condizione di stabilità per questi gruppi di pazienti.

Tra i diversi fattori di uno studio di VB, anche la frequenza di campionamento, potrebbe avere un impatto sulle stime di VB. Considerando che la creatinina può essere misurata più volte al giorno nei pazienti ospedalizzati e meno frequentemente nei pazienti monitorati per una progressione di CKD (per esempio ogni tre mesi) (22), questo fattore va tenuto in considerazione. La figura 3 mostra che, negli studi identificati nella nostra rassegna, non sembrerebbero esserci differenze tra i valori di CV_i ottenuti da studi con brevi (uno a settimana o anche più breve) e con più lunghi intervalli di campionamento (uno al mese o anche maggiore).

**Figura 4**

Stime della variabilità biologica intra-individuale (CV₁) per la Cistatina C. Gli intervalli di confidenza (IC) dei singoli studi sono mostrati come barre di errore attorno al punto di CV₁.

I numeri sull'asse delle x rappresentano il numero identificativo del riferimento del database di EFLM sulla variabilità biologica (elencati in Tabella 1 del materiale supplementare); le lettere vicino al numero rappresentano i diversi sotto-gruppi. I limiti dei IC al 95% della stima globale della variabilità biologica sono rappresentati dalle due linee verdi.

Sodio e potassio

Per sodio e potassio le stime di VB, nel siero e nel plasma, ottenute dalla meta-analisi, sono leggermente inferiori a quelle riportate dal database storico (6) (Tabella 2), sebbene i valori storici siano all'interno dell'IC dei valori globali della meta-analisi. Sulla base del documento 246, l'età avanzata (>75 anni) non sembra avere influenza sui valori di CV₁ per sodio e potassio.

Due studi hanno valutato la VB di questi elettroliti nei bambini (248, 270a,b), ma lo studio 248 era uno studio a breve termine, prelievi in giornata, e lo studio 270 includeva solo due campioni per soggetto. Considerando studi di soggetti non sani; due articoli (72 e 74) hanno riportato dati per sodio e potassio che non differivano dalle stime di VB derivate da individui sani. Al contrario, nei lavori che studiavano pazienti con trapianto renale (articolo 7), infarto del miocardio (articolo 45) e malattia renale (articolo 46) sono stati osservati valori di CV₁ più elevati rispetto ai soggetti sani.

Queste osservazioni valgono sia per gli studi sul sodio che per il potassio (Figura 5). Due studi condotti su adulti sani sulla base di campionamenti giornalieri, hanno riportato risultati per il sodio (articolo 46; CV₁ 2,4% e 266; CV₁ 2,2%) che non erano all'interno dell'IC al IC95% della stima globale derivata dalla meta-analisi (Tabella 2). Ciò potrebbe essere rilevante per le impostazioni cliniche per le quali le analisi degli elettroliti sono eseguite con alta frequenza.

Urea

Gli studi di VB dell'urea, condotti su individui sani in un unico giorno (27, 248), hanno dimostrato differenze

significative nel CV₁ (4,8 e 7,5%) rispetto alle stime basate su campionamenti bisettimanali o mensili (Figura 6). Come per la creatinina, l'urea nei pazienti viene frequentemente misurata con intervalli di campionamento diversi a seconda del contesto clinico, e potrebbe essere necessario quindi tenerne conto durante il monitoraggio dei pazienti. Tuttavia, per trarre conclusioni chiare su questo punto, sono necessari studi standardizzati. La stima di CV₁ derivata dalla meta-analisi del 13,9% (IC95% 9,5-14,4) è fortemente influenzata dalla stima di EuBIVAS di punteggio A, e questo potrebbe essere il motivo principale per cui le stime della meta-analisi sono leggermente superiori alla stima riportata nel database storico (CV₁ 12%) (6).

Opportunità per ulteriori ricerche

Sebbene Kashani et al. (25) affermino che ci sono anche altri importanti biomarcatori di malattia renale acuta, come la lipocalina associata alla gelatinasi neutrofila (NGAL), la molecola di danno renale (KIM-1), la proteina legante gli acidi grassi degli adipociti (L-FABP), l'interleuchina 18 (IL-18), il fattore di crescita insulino simile 7, l'inibitore tissutale della metalloproteinasi 2 (TIMP-2) e la calprotectina, in questa rassegna non sono state inclusi perché per questi analiti non sono disponibili studi di VB, o al massimo solo uno (18).

Per tutti questi marcatori, che sono candidati per la diagnosi precoce di danno renale acuto, sono necessari studi appropriati sulla VB.

Anche le misurazioni degli elettroliti offrono un'opportunità per ulteriori ricerche. Gli elettroliti vengono comunemente misurati più volte al giorno nelle terapie intensive, spesso come parte standard dell'emogasanalisi. Considerando la stretta

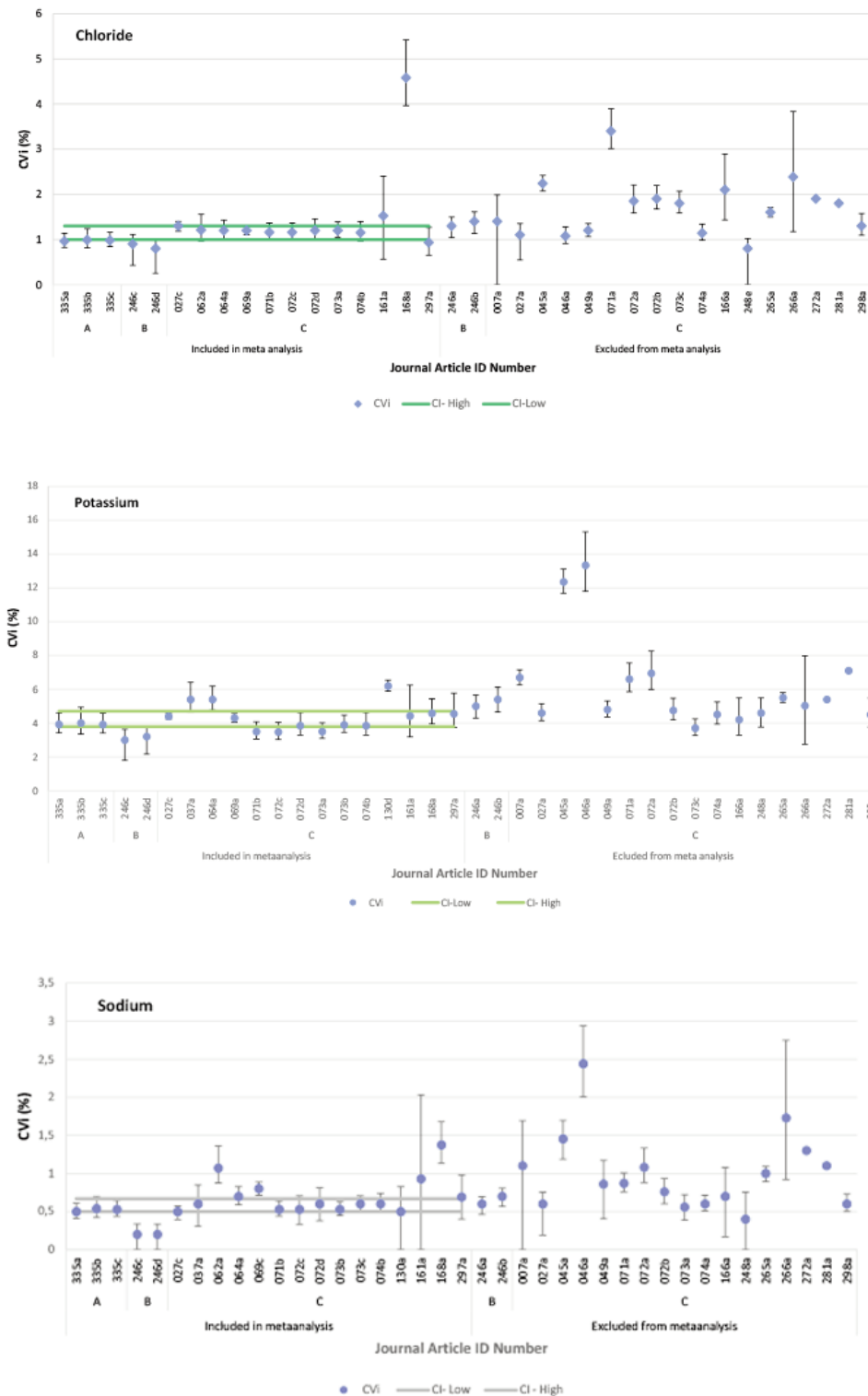


Figura 5

Stime della variabilità biologica intra-individuale (CV) per cloro, sodio e potassio. Gli intervalli di confidenza (IC) dei singoli studi sono mostrati come barre di errore attorno al punto di CV.

I numeri sull'asse delle x rappresentano il numero identificativo del riferimento del database di EFLM sulla variabilità biologica (elencati in Tabella 1 del materiale supplementare); le lettere vicino al numero rappresentano i diversi sotto-gruppi. I limiti dei IC al 95% della stima globale della variabilità biologica sono rappresentati dalle due linee verdi.

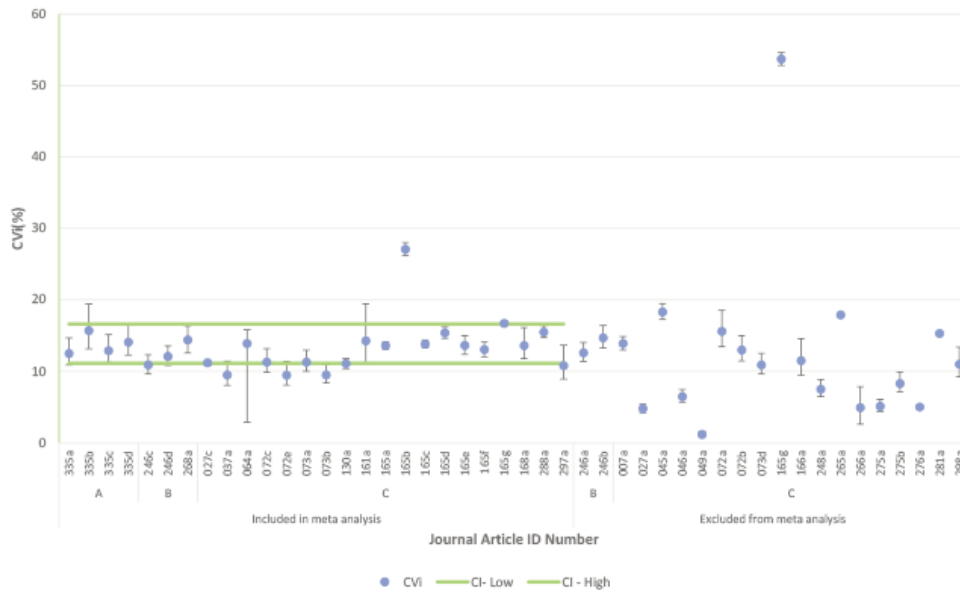


Figura 6

Stime della variabilità biologica intra-individuale (CV) per l'urea. Gli intervalli di confidenza (IC) dei singoli studi sono mostrati come barre di errore attorno al punto di CV.

I numeri sull'asse delle x rappresentano il numero identificativo del riferimento del database di EFLM sulla variabilità biologica (elencati in Tabella 1 del materiale supplementare); le lettere vicino al numero rappresentano i diversi sotto-gruppi. I limiti dei IC al 95% della stima globale della variabilità biologica sono rappresentati dalle due linee verdi.

regolazione della concentrazione di sodio nel paziente, c'è il rischio di interpretare la variazione del risultato dovuta alla variabilità analitica come un cambiamento clinicamente significativo per il paziente. Gli unici lavori che riportano variazioni giornaliere sono giunti a stime di CV_i leggermente più elevate. Nei pazienti in terapia intensiva, per fornire dati affidabili di VB del sodio di ora in ora, sono necessari studi che siano conformi a BIVAC e con adeguato potere statistico, o studi basati su un progetto di big data.

CONCLUSIONI

Per i misurandi ampiamente studiati come gli elettroliti, la creatinina e l'urea sono state prodotte molte pubblicazioni con stime di VB tra loro comparabili. Lo studio EuBIVAS, di qualità A e conforme a BIVAC, ha confermato l'accuratezza di questi dati, per tanto, per questi misurandi, ulteriori studi A non sono necessari. Al contrario per altri misurandi, come ad esempio per la cistatina C, sono necessari ulteriori dati. Alcuni dati indicano che le stime di VB possono essere diverse in alcuni gruppi di soggetti non sani rispetto alla popolazione sana. Tuttavia, dimostrare l'uguaglianza tra un gruppo di soggetti sani e non sani richiederebbe che entrambi i gruppi siano confrontati direttamente in un unico studio, che sia conforme a BIVAC. Per la maggior parte dei misurandi ci sono pochi studi sulla VB nei bambini e negli anziani. Quest'ultimo, così come altri diversi scenari clinici, sono spunto per la effettuazione di nuovi studi di VB che siano adeguatamente

progettati e conformi a BIVAC, per una gamma di misurandi vecchi e nuovi. Le variabili da considerare dovrebbero includere anziani, bambini, stati patologici specifici, analiti in scenari clinici in cui sono richiesti dati di VB entro il giorno e/o VB a lungo termine, analiti con pochi dati di VB, o con divergenze nei dati. I clinici e gli specialisti in medicina di laboratorio dovrebbero riconoscere i dati VB come dati di riferimento che possono variare in termini di qualità, e di applicabilità alle loro popolazioni locali e a diversi scenari clinici. Molte stime di VB sono il risultato di studi rigorosi ben caratterizzati riprodotti da più gruppi in tutto il mondo, ma molti misurandi sembrano richiedere studi più ampi. La recente pubblicazione del nuovo database di VB di EFLM (9), aggiornato con studi di recente pubblicazione, insieme alla futura produzione di nuovi studi con adeguato potere statistico e conformi a BIVAC, forniranno uno strumento utile per una migliore assistenza sanitaria consentendo un efficace utilizzo degli esami di laboratorio più appropriati.

BIBLIOGRAFIA

1. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington: AACCPress; 2001.
2. Fraser CG, Sandberg S. Biological variation. In: Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT, editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular biology, 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017:157–70 pp.
3. Ricós C, Baadenhuijsen H, Libeer JC, Hyltoft Petersen P, Stöckl D, Thienpont L, et al. Currently used criteria for evaluating performance in EQA in European countries and

- a proposal for harmonization. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:159–65.
4. Mina A. A new quality control model using performance goals based on biological variation in external quality assurance schemes. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:86–91.
 5. Ricós C, Álvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491–500.
 6. Minchinela J, Ricós C, Perich C, et al. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. Available from: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> [Accessed 27 Apr 2020]. Jonker et al.: Meta-analysis of biological variation estimates for kidney related analytes 9.
 7. Aarsand A, Roraas T, Fernández-Calle, et al. The biological variation data critical appraisal checklist (BIVAC): a new standard for evaluating studies on biological variation and results for critical appraisal of 128 biological variation studies. *Clin Chem* 2018;64:501–14.
 8. Bartlett WA, Braga F, Carobene A, et al. A check-list for critical appraisal studies of biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:879–85.
 9. Aarsand AK, Fernandez-Calle P, Webster C, et al. The EFLM biological variation database. Available from: <https://biologicalvariation.eu/> [Accessed 27 Apr 2020].
 10. Burdick RK, Graybill FA. Confidence intervals on variance components. *Statistics: textbooks and mono-graphs*, Vol. 127 New York (NY): Marcel Dekker; 1992:78–115 pp.
 11. Sahai H, Ojeda MM. *Analysis of variance for random models*. Boston: Birkhäuser; 2004.
 12. Tu D, Shao J. *The jackknife and bootstrap*, 1st ed. New York: Springer Series in Statistics; 1995.
 13. Carobene A, Marinol, Coskun A, et al. The EuBIVAS project: within- and between-subject biological variation data for serum creatinine using enzymatic and alkaline picrate methods and implications for monitoring. *Clin Chem* 2017;63:1527–36.
 14. Aarsand A, Diaz-Garzón J, Fernandez-Calle P, et al. The EuBIVAS: within- and between-subject biological variation data for electrolytes, lipids, urea, uric acid, total protein, total bilirubin, direct bilirubin and glucose. *Clin Chem* 2018;64:1380–93.
 15. Carobene A, Aarsand AK, Guerra E, et al. Deuropean biological variation study (EuBIVAS): within- and between-subject biological variation data for 15 frequently measured proteins. *Clin Chem* 2019;65:1031–41.
 16. Pineda-Tenor D, Laserna-Mendieta EJ, Timon-Zapata J, et al. Biological variation and reference change values of common clinical chemistry and haematologic laboratory analytes in the elderly population. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:851–62.
 17. Nunes LA, Brenzikofer R, De Macedo DV. Reference change values of blood analytes from physically active subjects. *Eur J Appl Physiol* 2010;110:191–8.
 18. Carter JL, Parker CT, Stevens PE, et al. Biological variation of plasma and urinary markers of acute kidney injury in patients with chronic kidney disease. *Clin Chem* 2016;62:876–83.
 19. Rivara MB, Zelnick LR, Hoofnagle AN, et al. Diurnal and long-term variation in plasma concentrations and renal clearances of circulating markers of kidney proximal tubular secretion. *Clin Chem* 2017;63:915–23.
 20. Perich C, Minchinela J, Ricós C, et al. Biological variation database: structure and criterion used for generation and update. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:299–305.
 21. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Lab Sci* 1989;27:409–37.
 22. Carobene A, Marino I, Coskun A, et al. The EuBIVAS project: within-and between-subject biological variation data for serum creatinine using enzymatic and alkaline picrate methods and implications for monitoring. *Clin Chem* 2017;63:1527–36.
 23. National Kidney Function. KDOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Part 5. NKF. 2002. Available from: [https:// kidneyfoundation.cachefly.net/professionals /KDOQI/guidelines_ckd/index.htm](https://kidneyfoundation.cachefly.net/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/index.htm) [Accessed on 27 Apr 2020].
 24. Young DS, Harris EK, Cotlove E. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. *Clin Chem* 1971;17:403–10.
 25. Kashani K, Cheungpasitporn W, Ronco C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1074–89.

Potenziale ruolo dell'Human Epididymis Protein 4 come biomarcatore nella nefropatia mesangiale a depositi di IgA

Annalisa Schirinzi¹, Giulia Fontò², Francesco Pesce², Angela Calamita¹, Renato Contino¹, Loreto Gesualdo², Francesca Di Serio¹

¹UOC Patologia Clinica Ospedaliera, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Bari

²UOC Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento Emergenza e Trapianti di Organi Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Bari

ABSTRACT

Potential role of Human Epididymis Protein 4 (HE4) as biomarker for IgA Nephropathy.

Introduction: Human Epididymis Secretory Protein 4 (HE4) serum concentrations have been widely investigated in patients with ovarian cancer. However, high levels of HE4 can be also found in other tumors and in renal fibrosis. The aim of this study was to assess serum HE4 levels in a cohort of patients with IgA Nephropathy (IgAN) and the correlation of this potential biomarker with the degree of fibrosis.

Methods: the study included 63 Italian patients with histological diagnosis of IgAN (41 males and 22 females) where HE4 was measured at the time of renal biopsy using a chemiluminescent assay (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany). The biopsy was scored according to the current Oxford classification using MEST score. The relationship between HE4 and each of the MEST parameters was analyzed by a non-parametric method. A ROC curve analysis was performed to assess the diagnostic accuracy of HE4 in identifying the presence of fibrosis.

Results: serum HE4 concentrations were significantly increased across the progressive degrees of fibrosis related T parameter ($p < 0.0001$) [(median; interquartile range (IQR): T0 = 57.5 pmo/L (43.7-100.7); T1 = 106.0 pmo/L (78.0-149.0); T2 = 210.5 pmo/L (148.2-320.2)]. The ROC curve analysis, after adjusting for age and sex, showed that HE4 is diagnostic for the presence of fibrosis with an Area Under the Curve of 0.79 (95%CI: 0.68-0.91).

Conclusions: the relationship between serum level of HE4 and the degree of interstitial fibrosis suggests the potential role of HE4 as useful biomarker in IgAN.

Parole chiave: nefropatia IgA, HE4, biomarcatori

INTRODUZIONE

La glomerulonefrite a depositi di IgA o Malattia di Berger rappresenta la glomerulonefrite primitiva più comune al mondo (1). È caratterizzata da un decorso clinico altamente variabile che va da una condizione incidentale e benigna ad un'insufficienza renale progressiva (2). I fattori di rischio clinico e patologico che condizionano l'evoluzione verso la malattia renale terminale includono: l'ipertensione arteriosa, la proteinuria, la velocità di filtrazione glomerulare (Estimated Glomerular Filtration Rate-eGFR) e il punteggio assegnato alle lesioni istologiche in accordo con la classificazione di Oxford (2-3). Pubblicata nel

2009 e accettata a livello internazionale nella diagnosi di IgA Nephropathy (IgAN), la classificazione di Oxford è stata formulata al fine di identificare dei parametri istologici che potessero essere interpretati in maniera riproducibile tra i patologi e che fossero predittivi dell'outcome renale. Le quattro lesioni istologiche che meglio rispondevano a questo obiettivo sono: ipercellularità Mesangiale, ipercellularità Endocapillare, glomerulosclerosi Segmentale, fibrosi interstiziale/atrofia Tubulare (MEST score). Il punteggio attribuito ad ogni campione biotico si traduce in un diverso outcome clinico (4-6). La fibrosi renale rappresenta l'endpoint finale comune di diverse patologie croniche renali. Questa è caratterizzata da un accumulo di matrice

Corrispondenza a: Annalisa Schirinzi, UOC di Patologia Clinica Ospedaliera, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Bari, Piazza Giulio Cesare 11, 70124, Bari, E-mail annalisa.schirinzi@policlinico.ba.it, Tel 080-5593051, Cel 348-3350749

Ricevuto: 13.01.2021

Revisionato: 24.01.2021

Accettato: 22.02.2021

Publicato on-line: 06.04.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.013

extracellulare, miofibroblasti e cellule infiammatorie che, alterando irreversibilmente la normale architettura renale, determinano una progressiva riduzione della funzionalità renale (7). Attualmente, il grado di fibrosi interstiziale/atrofia tubulare (IF/AT) nei pazienti con IgAN viene determinato mediante esame istologico condotto sul frustolo di parenchima renale prelevato tramite biopsia renale. L'Human Epididymis Protein 4 (HE4), una glicoproteina individuata inizialmente nell'epididimo e utilizzata insieme al Ca125 come marcatore nello screening e nel monitoraggio del carcinoma ovarico (8-10), è stata recentemente identificata come mediatore nella fibrosi renale (11). Grazie alla sua azione anti-proteasica riduce l'attività delle serin-proteasi e delle metalloproteasi della matrice extracellulare e inibisce la degradazione del collagene di tipo I, svolgendo così un ruolo fondamentale nel processo di fibrosi renale (11). Il ruolo dell'HE4 è stato valutato in diverse patologie renali quali l'insufficienza renale acuta, la nefrite lupica e la nefropatia diabetica (12-15). Due diversi valori soglia di HE4 sono stati identificati per discriminare i pazienti con nefrite lupica da quelli con malattia renale cronica (CKD) (12), mentre in pazienti con diabete mellito di tipo 2, l'aumento dei livelli sierici di HE4 correla con un incremento del rischio di nefropatia diabetica (13). L'obiettivo di questo lavoro è stato valutare l'HE4 in pazienti con IgAN e correlare questo potenziale biomarcatore con il grado di fibrosi identificato dal parametro T della classificazione di Oxford.

METODI

Sono stati reclutati per lo studio 63 pazienti con diagnosi istologica di glomerulonefrite a depositi mesangiali di IgA, 41 uomini e 22 donne in pre-menopausa, di età media pari a 39,6 anni (DS 14,9), sottoposti a biopsia renale tra il 2016 e il 2018 presso la U.O. di Nefrologia del Policlinico di Bari. La diagnosi istologica è stata effettuata da un patologo esperto, in accordo a quanto previsto dalla classificazione di Oxford per la nefropatia a depositi mesangiali di IgA. In particolare, il punteggio MEST è stato attribuito valutando quattro parametri istologici: il parametro M di ipercellularità mesangiale (M0: <50% dei glomeruli, M1: >50% dei glomeruli); il parametro E di ipercellularità endocapillare (E0: assente, E1: presente); il parametro S di sclerosi segmentaria (S0: assente, S1: presente); infine il grado di fibrosi interstiziale/atrofia tubulare (IF/AT), corrispondente al parametro T ed espresso come T0 (<25%), T1 (26-50%) e T2 (>50%) (2,3). L'eGFR è stata calcolata al momento della biopsia renale con la formula CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) (16). Tutti i soggetti arruolati nel presente studio, approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico di Bari (autorizzazione n. 0049338), hanno espresso il consenso informato. I campioni di sangue, raccolti in provette in polietilene tereftalato (PET) con barriera in gel di silicone senza anticoagulante, sono

stati centrifugati (10 minuti a 3000 rpm) e immediatamente sottoposti ad analisi. La misurazione di HE4 è stata eseguita utilizzando un metodo in chemiluminescenza applicato sull'analizzatore Architect i1000 (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany). Il metodo Architect HE4 è un metodo immunologico chemiluminescente a cattura di microparticelle (CMIA) a due fasi per la determinazione quantitativa dell'antigene HE4 in campioni di siero umano. L'intervallo di riferimento suggerito dall'azienda produttrice è riferito solo alla popolazione femminile in pre-menopausa (0-70 pmol/L) e post-menopausa (0-140 pmol/L); un recente studio ha evidenziato che nella popolazione di sesso maschile l'intervallo di riferimento è 0-57 pmol/L (17). L'azienda produttrice altresì dichiara un Limit of Detection (LoD) <15 pmol/L con un' imprecisione (CV%) <10%. L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita utilizzando il software SPSS versione 17.0. I dati sono stati espressi come media, mediana e intervallo interquartile (IQR). La differenza di HE4 tra i vari gruppi T è stata valutata con il test di Kruskal-Wallis; la correlazione tra l'eGFR e l'HE4 è stata valutata con il test di Spearman; la predittività diagnostica dell'HE4, in riferimento al parametro T, dicotomizzato in T0 (fibrosi <25%) *versus* T1/T2 (fibrosi >25%), è stata valutata mediante l'analisi della curva ROC. La curva è stata costruita usando il valore atteso di probabilità, salvato da un modello di regressione logistica includendo le covariate età e sesso insieme al valore di HE4. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con un valore $p < 0,05$.

RISULTATI

In totale sono stati analizzati 63 pazienti con diagnosi istologica di glomerulonefrite a depositi mesangiali di IgA. Nella coorte di pazienti esaminati, per il parametro M sono stati identificati 10 pazienti M0 e 53 pazienti M1; per il parametro E, 37 pazienti E0 e 26 pazienti E1; per il parametro S, 14 pazienti S0 e 49 pazienti S1; infine per il parametro T, 36 pazienti T0, 15 pazienti T1 e 12 pazienti T2. Nella popolazione maschile e femminile le concentrazioni (mediana; IQR) di HE4 erano 99,0 (47,5-178,5) e 88,0 (57,5-128,7) pmol/L rispettivamente. Non sono state osservate differenze nei valori di HE4 rispetto alle categorie M, E, e S dello score MEST. In relazione al grado IF/AT (categoria T), le concentrazioni (mediana; IQR) erano le seguenti: 57,5 (43,7-100,7); 106,0; (78,0-149,0); 210,5 (148,2-320,2) pmol/L per T0, T1 e T2 rispettivamente ($p < 0,0001$) (Figura 1). L'HE4 correlava negativamente con l'eGFR ($r: -0,79, p < 0,001$). L'analisi della curva ROC di predittività di HE4 in relazione a T0 e T1/T2 mostrava una AUC di 0,79 (95%IC: 0,68-0,91) (Figura 2). La Tabella 1 riporta l'odds ratio (OR), l'intervallo di confidenza (IC) e il valore di probabilità (p) dei predittori inseriti nel modello di regressione logistica utilizzato (HE4, età e sesso).

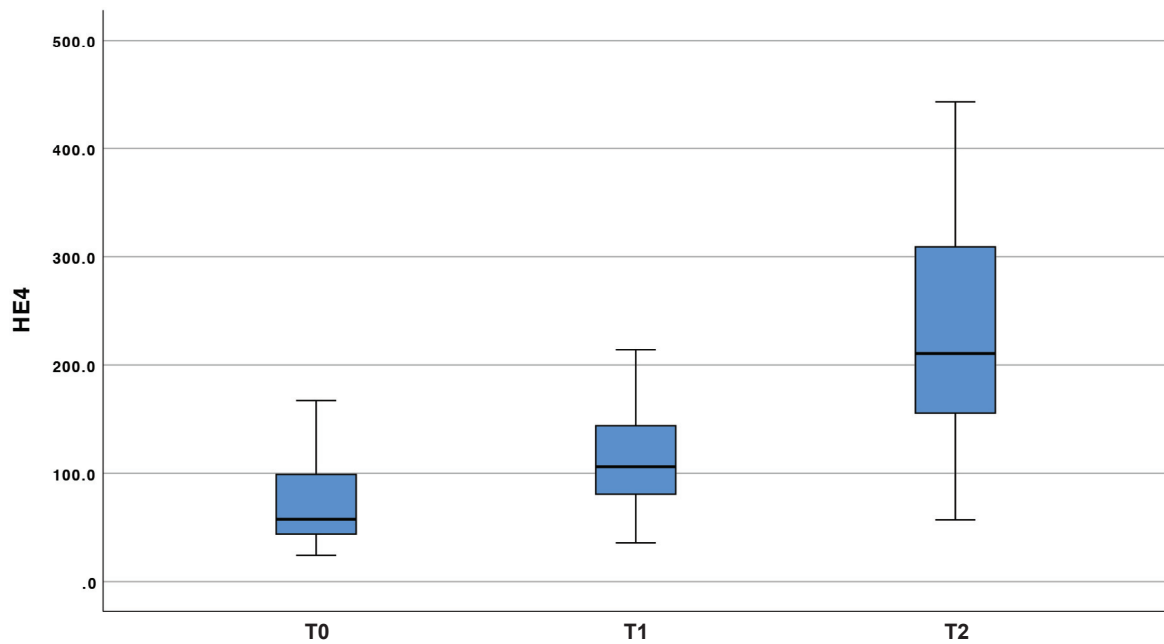


Figura 1

Diagramma a scatola e baffi delle concentrazioni di HE4 in 63 soggetti con diagnosi istologica di Glomerulonefrite a depositi mesangiali di IgA, suddivisi per il grado T0, T1, T2 di fibrosi interstiziale/atrofia tubulare (IF/AT). Le scatole rappresentano le concentrazioni di HE4 dal primo quartile (Q1, base inferiore) al terzo quartile (Q3, base superiore); la linea orizzontale all'interno della scatola indica la mediana; le linee verticali, o baffi, si estendono a includere tutte le osservazioni comprese tra $Q1-1,5 \times IQR$ e $Q3+1,5 \times IQR$, dove IQR è l'intervallo interquartile $Q3-Q1$. Le concentrazioni di HE4 incrementano all'aumentare del grado di fibrosi ($p < 0,0001$).

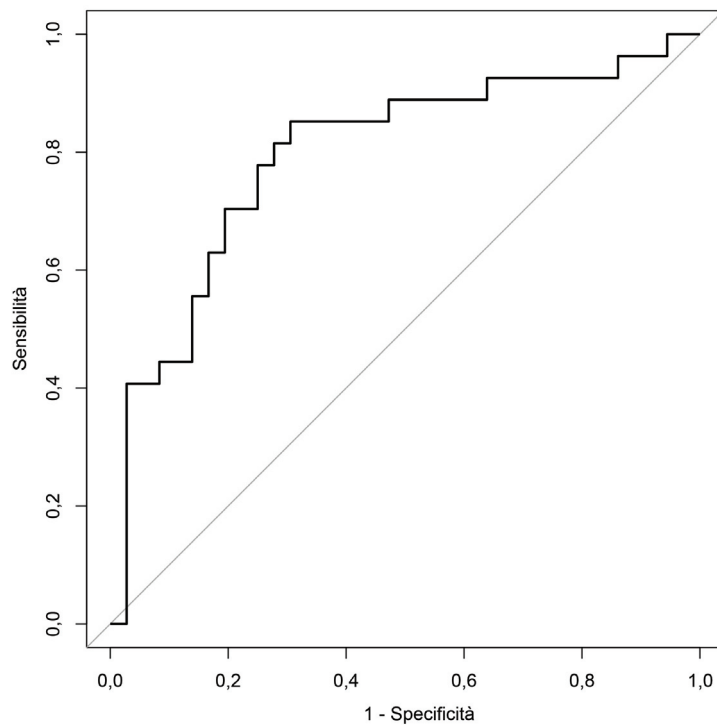


Figura 2

Predittività del parametro HE4 in relazione al diverso grado di fibrosi (T0 e T1-2). Area Under the Curve: 0,79 (95% IC: 0,68-0,91).

Tabella 1

Dati relativi ai predittori inseriti nel modello di regressione logistica utilizzato per definire la predittività di HE4 in relazione al parametro T

Predittori	OR	95% IC	p
HE4	1,009	1,002-1,016	0,012
Età	1,046	1,003-1,090	0,036
Sesso	0,619	0,185-2,066	0,435

OR, odd ratio; 95%IC, intervallo di confidenza al 95%; HE4, Human Epididymis Protein 4.

DISCUSSIONE

In questo studio è stato valutato il potenziale ruolo dell'HE4 in pazienti con glomerulonefrite a depositi di IgA correlando i valori ottenuti con il grado di fibrosi interstiziale/atrofia tubulare (IF/AT) definito dalla biopsia renale. Le concentrazioni di HE4 osservate sia nella popolazione femminile in pre-menopausa che nella popolazione maschile erano maggiori del limite superiore degli intervalli di riferimento considerati. La correlazione tra le concentrazioni di HE4 e i parametri istologici di ipercellularità mesangiale, ipercellularità endocapillare e glomerulosclerosi segmentaria (rispettivamente M, E, e S della classificazione di Oxford), non ha evidenziato alcuna variazione statisticamente significativa. Al contrario, è stata riscontrata una associazione statisticamente significativa tra le concentrazioni di HE4 e il grado di fibrosi interstiziale/atrofia tubulare (IF/AT), espresso come T0, T1 e T2. L'analisi delle curve ROC, utilizzando un modello di regressione logistica corretto per età e sesso, ha confermato la predittività del parametro HE4 in relazione al diverso grado di fibrosi (T0 e T1-2) (Figura 2). I pazienti con T1 e T2 sono stati considerati in un unico gruppo poiché è ampiamente dimostrato in letteratura che i due gruppi condividono un grado di fibrosi apprezzabile istologicamente e una maggiore correlazione con la perdita di funzionalità renale. Nella IgAN, la deposizione mesangiale di immunocomplessi contenenti IgA1 degalattosilate determina l'attivazione e la proliferazione delle cellule mesangiali che favoriscono la conversione dei fibroblasti interstiziali quiescenti in miofibroblasti attivi nella deposizione di matrice extracellulare (18-20). L'evidenza di una iper-espressione dell'HE4 nella fibrosi renale associata ai miofibroblasti, ha attribuito all'HE4 un potenziale ruolo di biomarcatore sierico e possibile obiettivo terapeutico nella fibrosi (11). La diagnostica della nefropatia a depositi di IgAN si basa essenzialmente sull'interpretazione istologica e immunostologica della biopsia renale mediante l'identificazione di quattro specifiche lesioni istologiche raggruppate dalla classificazione di Oxford (MEST), ma l'introduzione nella pratica clinica di biomarcatori sierici e urinari potrebbe rappresentare un'alternativa all'esecuzione di indagini

invasive come la biopsia renale. Inoltre, tali biomarcatori, in associazione alla biopsia, potrebbero costituire un ulteriore strumento utile nella diagnosi e nel monitoraggio. In questo scenario si potrebbe collocare l'HE4 che è già stato valutato in altre patologie renali. È necessario tuttavia tenere in considerazione una serie di variabili fisiologiche e anagrafiche che possono condizionare la concentrazione sierica dell'HE4. I livelli sierici di HE4 sono, infatti, età dipendenti e incrementano progressivamente con l'età; sono inoltre influenzati dal genere risultando maggiori nelle donne e in particolare nella post-menopausa e nella fase ovulatoria del ciclo mestruale delle donne fertili, mentre sono ridotti nel sesso maschile (17,21-24). Inoltre, considerate le sue piccole dimensioni (27 kDa), la concentrazione sierica di HE4 risulta influenzata dalla velocità di filtrazione glomerulare, con la possibilità di fornire valori falsamente positivi nei pazienti con CKD. Pertanto, in analogia a quanto già osservato nello screening del carcinoma ovarico delle pazienti con CKD, l'impiego del rapporto HE4 urinario/HE4 sierico potrebbe confermare il suo ruolo diagnostico e prognostico di biomarcatore di fibrosi renale nei pazienti con insufficienza renale cronica (25). Nella coorte di pazienti esaminata, il valore di HE4 sierico misurato al momento della biopsia renale correla in maniera statisticamente significativa con il parametro T di fibrosi renale. Questo incremento progressivo con il grado di fibrosi supporta ciò che in altri studi è stato osservato.

I limiti di questo studio sono legati alla mancata determinazione dell'HE4 nelle urine e all'indisponibilità di valori di HE4 sierico seriati acquisiti durante il monitoraggio dei pazienti arruolati.

In conclusione, premesso che il gold standard per la diagnostica dei pazienti IgAN resta la biopsia renale, tuttavia la facilità di acquisizione del campione su cui effettuare la misurazione dell'HE4 (prelievo di sangue), la possibilità di misurazioni seriate, la semplicità e il basso costo della metodica nonché la correlazione con l'entità della fibrosi renale suggeriscono che l'HE4 possa diventare un biomarcatore per il monitoraggio dei pazienti IgAN, confermando in tal senso il ruolo essenziale della medicina di laboratorio nelle patologie nefrologiche.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. D'Amico G. The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *Q J Med* 1987;64:709-27.
2. Wyatt RJ, Julian BA. IgA nephropathy. *N Engl J Med* 2013;368:2402-14.
3. Barbour SJ, Reich HN. Risk stratification of patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2012;59:865-73.
4. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int* 2009;76:534-45.
5. Markowitz G. Glomerular disease: Updated Oxford Classification of IgA nephropathy: a new MEST-C score. *Nat Rev Nephrol* 2017;13:385-6.
6. Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, et al. IgAN Classification Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society; Conference Participants. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. *Kidney Int* 2017;91:1014-21.
7. Boor P, Ostendorf T and Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 2010;6:643-56.
8. Kappelmayer J, Antal-Szalmás P, Nagy B Jr. Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders. *Clin Chim Acta* 2015;438:35-42.
9. Kirchoff C, Habben I, Ivell R et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45:350-7.
10. Hellström M, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3695-700.
11. LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, et al. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nat Med* 2013;19:227-31.
12. Yang Z, Zhang Z, Qin B, et al. Human Epididymis Protein 4: a novel biomarker for lupus nephritis and chronic kidney disease in systemic lupus erythematosus. *J Clin Lab Anal* 2016;30:897-904.
13. Zhang M, Zhao B, Xie J, et al. Serum Human Epididymis Protein 4 is associated with renal function and diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Biomed Res Int* 2019;19:4831459.
14. Wan J, Wang Y, Cai G et al. Elevated serum concentrations of HE4 as a novel biomarker of disease severity and renal fibrosis in kidney disease. *Oncotarget* 2016;7:67748-59.
15. Tajima S, Fu R, Shigematsu T, et al. Urinary Human Epididymis Secretory Protein 4 as a useful biomarker for subclinical acute rejection three months after kidney transplantation. *Int J Mol Sci* 2019;20:4699.
16. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH et al. A new equation to estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
17. Schirinzi A, Cazzolla AP, Mascolo E, et al. Determination of the upper reference limit of Human epididymis secretory protein 4 (HE4) in healthy male individuals and correlation with renal and fertility markers. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020 doi: 10.2174/1871530320666200807121050.
18. Paunas, FTI, Finne K, Leh S et al. Characterization of glomerular extracellular matrix in IgA nephropathy by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli. *BMC Nephrol* 2019;20:410.
19. Strutz F, Muller GA. Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3368-70.
20. Zeisberg M, Strutz F, Muller GA. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 2000;13Suppl 3:S111-20.
21. Hertlein L, Stieber P, Kirschenhofer A, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:2181-8.
22. Bolstad N, Øijordsbakken M, Nustad K, et al. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population. *Tumour Biol* 2012;33:141-8.
23. Urban N, Thorpe JD, Bergan LA, et al. Potential role of HE4 in multimodal screening for epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1630-4.
24. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, et al. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206(349):e1-7.
25. Fan Q, Luo G, Yi T, et al. Diagnostic value of urinary-to-serum human epididymis protein 4 ratio in ovarian cancer. *Biomed Rep* 2017;7:67-72.

Stato dell'arte dei biomarcatori di malattia renale osservato mediante i Programmi di VEQ del Centro di Ricerca Biomedica

Sandra Secchiero¹, Laura Sciacovelli¹, Mario Plebani^{1,2}

¹Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università, Padova

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università, Padova

ABSTRACT

The quality of laboratory tests for the Chronic Kidney Disease in Italy through EQA programs.

Introduction: the diagnosis and classification of Chronic Kidney Disease (CKD) are based on laboratory tests. The aim of this paper is to verify their harmonization at national level, through the examination of participants' results to EQA programs of the Centre of Biomedical Research.

Methods: we considered results of creatinine and eGFR of the last 8 EQA cycles (2013-2020) for a total of 80 lyophilized control samples and results of albumin and albumin/creatinine ratio (ACR) in urine of the last 3 EQA cycles (2018-2020) for a total of 24 lyophilized control materials.

Results: for creatinine measurement, enzymatic assays show the best accuracy, but only 40% of participants use them. For eGFR the 64% of participants use the equation derived by the CKD-Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) study and this formula applied to enzymatic creatinine shows the best performances. For urine albumin, analytical variability (median CV%) is lower for all diagnostic systems at pathological concentrations than at concentrations below the cut-off. Important bias still exists between different methods and overall 12% of the albumin results provided by the participating laboratories did not reach the minimum quality level for the clinical use of the measure and for value <30.0 mg/L the number of unacceptable performances increases to 24%. Similar results were found for ACR: overall 14% of the results were unacceptable and for value <3.4 mg/mmol the number of unacceptable performances increases to 21%.

Conclusion: even if some improvements can be observed during the recent years, efforts for a better alignment to international recommendations are needed. A Reference system of higher order is needed to enable standardization of urine albumin measurement results. The participation in specific External Quality Programs is a valuable tool to assess the harmonization of laboratory tests for CKD diagnosis in our country.

Parole chiave: Programmi di Valutazione Esterna di Qualità, creatinina, albuminuria

INTRODUZIONE

La malattia renale cronica (CKD) è un problema sanitario di primaria importanza in tutto il mondo: secondo un'indagine della International Society of Nephrology il 10% della popolazione mondiale è affetta da CKD, e nove malati su dieci non sanno di essere malati (1,2).

Il laboratorio ha un ruolo fondamentale nella diagnosi della malattia renale e nella definizione della sua severità, entrambe basate su due esami: la stima della

velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) e la misura dell'albuminuria (3,4).

La determinazione della creatinemia e il calcolo con formule appropriate della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) consentono una stima clinicamente affidabile (3-6). È quindi di fondamentale importanza che la misura della creatinina sierica sia accurata (7). Da molti anni è in corso uno sforzo importante a livello internazionale volto alla standardizzazione della misura mediante l'implementazione di un sistema metrologico di riferimento (8-13). In particolare, il metodo di riferimento,

Corrispondenza a: Sandra Secchiero, Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio c/o UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova, Via Nicolò Giustiniani, 2, 35128 Padova, Italy, Tel 049 8214491, E-mail sandra.secchiero@aopd.veneto.it

Ricevuto: 04.06.2021

Revisionato: 13.07.2021

Accettato: 21.07.2021

Pubblicato on-line: 02.08.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.059

secondo le raccomandazioni emanate nel 2006 dal Laboratory Working Group del National Kidney Disease Education Program (NKDEP) (7), è la spettrometria di massa a diluizione isotopica (IDMS) ed il materiale di riferimento IDMS tracciabile, rilasciato nel 2007, è lo Standard Reference Material (SRM) 967 (14). Da allora, i produttori dei sistemi diagnostici hanno cercato di standardizzare i propri metodi di determinazione della creatinina e i due tipi di metodi IDMS tracciabili attualmente in commercio sono metodi enzimatici o al picrato alcalino con compensazione (allo scopo di eliminare le aspecificità dovute ai cromogeni). Tuttavia lo stato dell'arte della misura della creatinina sierica riportato in numerosissime pubblicazioni, indica che molti laboratori che utilizzano metodi al picrato alcalino non forniscono prestazioni analitiche adeguate, specialmente a concentrazioni fisiologiche o leggermente aumentate di creatininemia e solo i laboratori che utilizzano metodi basati su reazioni enzimatiche sono in grado di ottenere risultati accurati a tutte le concentrazioni (15-17).

Le formule proposte per il calcolo dell'eGFR sono svariate e le raccomandazioni su quale di queste utilizzare si sono modificate nel tempo. In particolare, il suggerimento iniziale circa l'utilizzo della formula derivata dallo studio Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) (5,7,18) è stato successivamente modificato in favore dell'impiego della formula Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) (3,4,19,20). La linea guida Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (3), inoltre, suggerisce per la stima dell'eGFR l'utilizzo della formula CKD-EPI che includa, oltre alla creatinina, anche il valore della cistatina C (eGFR_{crea-cys}) (3,21,22). Recentemente, infine, è stata proposta la nuova formula EKFC (European Kidney Function Consortium) che presenta una migliore accuratezza e precisione rispetto alle altre (23).

La dimostrazione della presenza di significativa albuminuria è l'altro parametro cardine per la definizione della malattia renale (3,4). Nonostante tale rilevanza clinica, esistono ancora importanti problemi che riguardano tutto il processo di determinazione dell'albuminuria, a partire dalla fase preanalitica fino alla refertazione dei risultati (24). Relativamente alla fase analitica alcuni sistemi commerciali presentano una scarsa standardizzazione con bias importanti a differenti concentrazioni di analita, tendendo ad aumentare alle concentrazioni più basse; inoltre alcuni metodi mostrano una imprecisione inaccettabilmente elevata (25,26). Ciò è dovuto alla mancanza di un sistema di riferimento internazionalmente accettato e implementato (27,28). Solo recentemente infatti è stato proposto un sistema di riferimento completo e si spera di rendere presto disponibile un materiale di riferimento a matrice biologica (NIST SRM 3666) col quale calibrare i sistemi commerciali (29,31).

I programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ), di tipo educativo, hanno un ruolo fondamentale nel promuovere l'armonizzazione dei risultati dei laboratori, soprattutto quando questi appartengono alla classe 1

(32). Il Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB), Centro Specializzato della Regione Veneto, dal 2013, nell'ambito dei programmi di VEQ per biochimica clinica su siero e su urina e del programma di VEQ per l'esame chimico-fisico delle urine, ha focalizzato l'interesse in particolar modo sul livello di qualità con cui sono erogati i biomarcatori coinvolti nella patologia renale: creatinina, eGFR, albuminuria e rapporto albumina/creatinina (ACR) (33,34).

Scopo di questo lavoro è quello di presentare e commentare lo stato dell'arte della diagnostica di laboratorio della malattia renale, sulla base dei risultati dei partecipanti ai programmi di VEQ del CRB.

METODI

I materiali di controllo utilizzati nei programmi di VEQ sono: per creatinina e eGFR sieri liofilizzati a matrice umana; per albuminuria e ACR urine umane liofilizzate.

Creatinina e eGFR

Sono stati analizzati i risultati degli ultimi 8 cicli di VEQ (2013-2020) per un totale di 80 campioni di controllo liofilizzati, in un intervallo di concentrazione compreso tra 64,9 e 499,0 $\mu\text{mol/L}$, dei partecipanti al programma di VEQ per biochimica clinica su siero del CRB (partecipanti n 144 \pm 18). I risultati di eGFR dei partecipanti sono calcolati dal valore di creatininemia, ottenuto sul campione di controllo con il metodo in uso applicando la formula utilizzata nel laboratorio, in riferimento a un soggetto di sesso maschile di 50 anni di età e di etnia caucasica.

Il valore di creatinina dei materiali di controllo viene assegnato mediante procedura di riferimento (GC-IDMS) da un laboratorio di riferimento accreditato (Instand e.V.). Il Valore Target (VT) di eGFR, viene calcolato, sia mediante formula MDRD che CKD-EPI, utilizzando il valore di riferimento della creatinina.

L'inesattezza (bias%) e l'imprecisione (CV%) dei sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti alla VEQ e le prestazioni dei laboratori, sono state valutate in confronto a goal analitici definiti sulla base delle specifiche di qualità (APS) della European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM), basate sulla Variabilità Biologica (VB) (35).

In particolare sono state applicate le APS relative al livello di qualità minimo: bias% <5,6%, CV% <3,4% e errore totale% (ET) <11,1%. Per valutare l'inesattezza di ogni sistema analitico è stato calcolato, per ciascun campione con una numerosità di risultati ≥ 7 , il valore di consenso (mediana) ed il relativo bias% dal VT.

Sono state inoltre valutate le prestazioni dei laboratori partecipanti agli ultimi 5 anni di VEQ (2016-2020) su un totale di 45 campioni di controllo, utilizzando il limite di accettabilità di $\pm 11,1\%$. Per ogni metodo è stato calcolato il numero di prestazioni non accettabili (PNA) riscontrato in 4 intervalli di concentrazione di

creatinina e per valori di eGFR appartenenti alle 6 classi di rischio per l'insufficienza renale cronica.

Albumina e rapporto Albumina/Creatinina

Nell'ambito del programma di VEQ per biochimica clinica su urina del CRB (partecipanti: $n\ 82 \pm 8$) sono stati analizzati i risultati degli ultimi 3 cicli (2018-2020), per un totale di 24 campioni di controllo liofilati preparati *ad hoc* per il CRB, in un intervallo di concentrazione compreso tra 10,0 e 478,0 mg/L di albumina e tra 1,7 e 35,5 mg/mmol (15,0-314,0 mg/g) di ACR.

Per valutare la variabilità interlaboratorio (CV%) è

stato calcolato per ciascun sistema analitico con una numerosità di risultati ≥ 4 , il CV% mediano fra i 24 campioni presi in considerazione.

Per indagare il grado di armonizzazione è stato messo a confronto il valore mediano di ciascun sistema analitico per ogni campione con una numerosità di risultati ≥ 7 .

Sono state inoltre valutate le prestazioni dei laboratori partecipanti secondo il modello basato sullo stato dell'arte. In particolare, per valori di albumina $<25,0$ mg/L sono stati ritenuti soddisfacenti valori con uno scostamento $<3,0$ mg/L dal valore assegnato (mediana dei risultati forniti dal gruppo di laboratori che

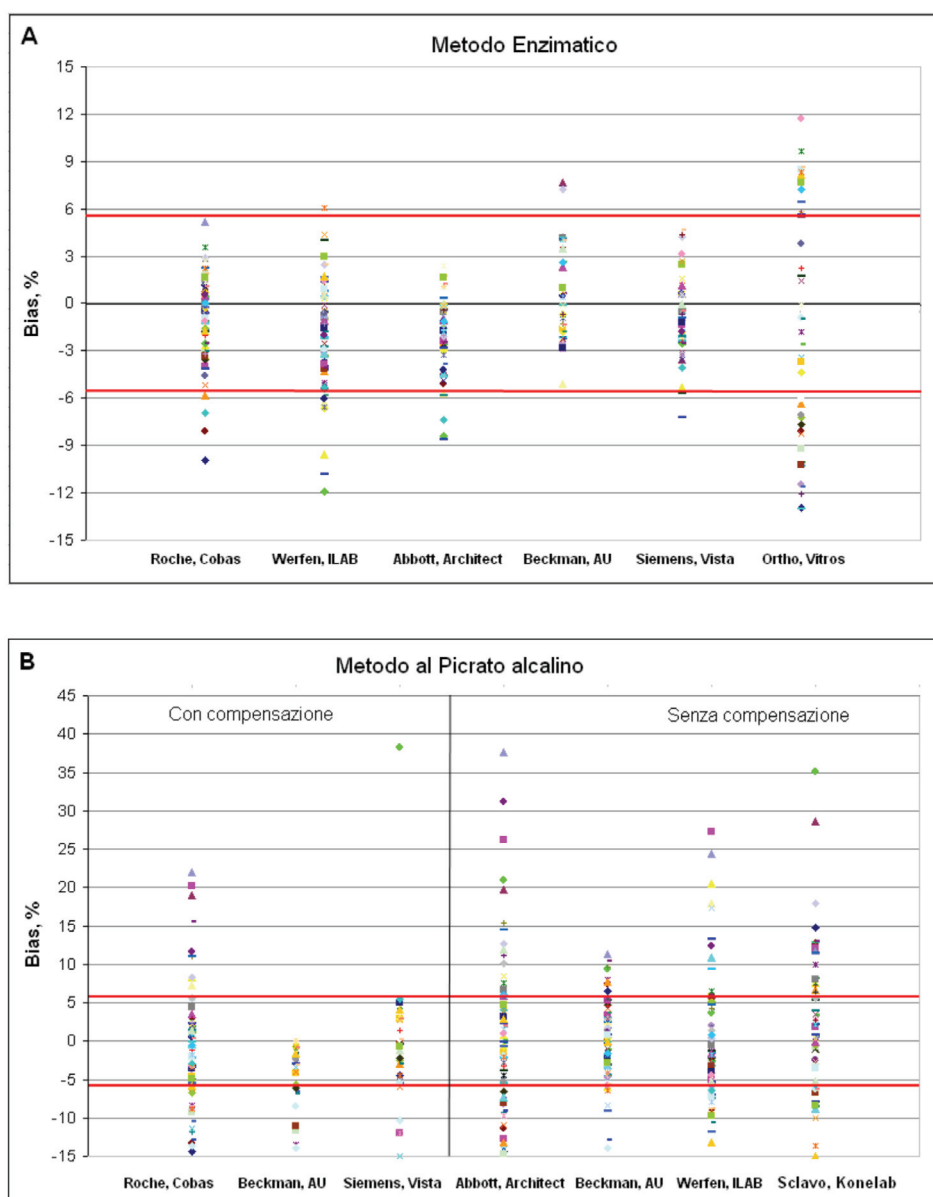


Figura 1
Creatinina: bias% dal valore di riferimento calcolato per ciascun campione (indicato da un diverso simbolo colorato) e sistema analitico. Le linee rosse indicano l'obiettivo di qualità minimo per l'inesattezza (5,6%), definito sulla base delle specifiche di qualità della European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM), basate sulla Variabilità Biologica.

utilizzano lo stesso principio analitico). Per valori di albumina $\geq 25,0$ mg/L le prestazioni sono state definite ottime con un ET $< 5,5\%$, buone con un ET compreso tra $5,5\%$ e $11,0\%$, accettabili con un ET compreso tra $11,0\%$ e $16,5\%$ e inaccettabili con un ET $> 16,5\%$. Gli stessi criteri sono stati adottati per valutare le prestazioni dei laboratori per valori di ACR $> 2,0$ mg/mmol, mentre per valori $< 2,0$ mg/mmol sono stati ritenuti soddisfacenti valori con uno scostamento $< 0,4$ mg/mmol.

RISULTATI

Creatinina

La percentuale dei metodi enzimatici rispetto ai metodi al picrato alcalino utilizzati dai partecipanti alla VEQ è stata: $22,6\%$ nel 2013, $\sim 28\%$ nel 2014 e 2015, $\sim 38\%$ nel 2016 e 2017 e $\sim 40\%$ dal 2018 al 2020.

Nella Figura 1 è riportato il bias% calcolato per ciascun campione e sistema analitico. La percentuale di valori che non soddisfa il goal analitico (minimo) per l'inesattezza ($5,6\%$), è la seguente:

- tra i metodi enzimatici (pannello A) va da un minimo del $3,7\%$ per Dimension Vista, ad un massimo del $11,7\%$ per Werfen ILAB;
- per i metodi al picrato alcalino (pannello B) con compensazione, è pari al 22% , 37% e 38% per Siemens Vista, Beckman AU e Roche Cobas, rispettivamente; mentre tra i metodi al picrato alcalino senza compensazione è del 24% , 44% , 49% e 56% dei casi per i sistemi Beckman AU, Werfen ILAB, Abbott Architect e Sclavo Konelab, rispettivamente. Per il metodo enzimatico utilizzato in chimica secca solo nel 31% dei casi è stato soddisfatto il goal analitico.

Nella Figura 2A sono graficati in box-plot i risultati ottenuti su 4 campioni di controllo a diverse concentrazioni di creatinina, suddivisi per metodo. La mediana del metodo enzimatico risulta per tutti i campioni sovrapponibile al VT, mentre il metodo al picrato alcalino senza compensazione, oltre ad avere una mediana lontana dal VT per tutti i campioni ad eccezione del BS10, presenta un'ampia dispersione dei risultati.

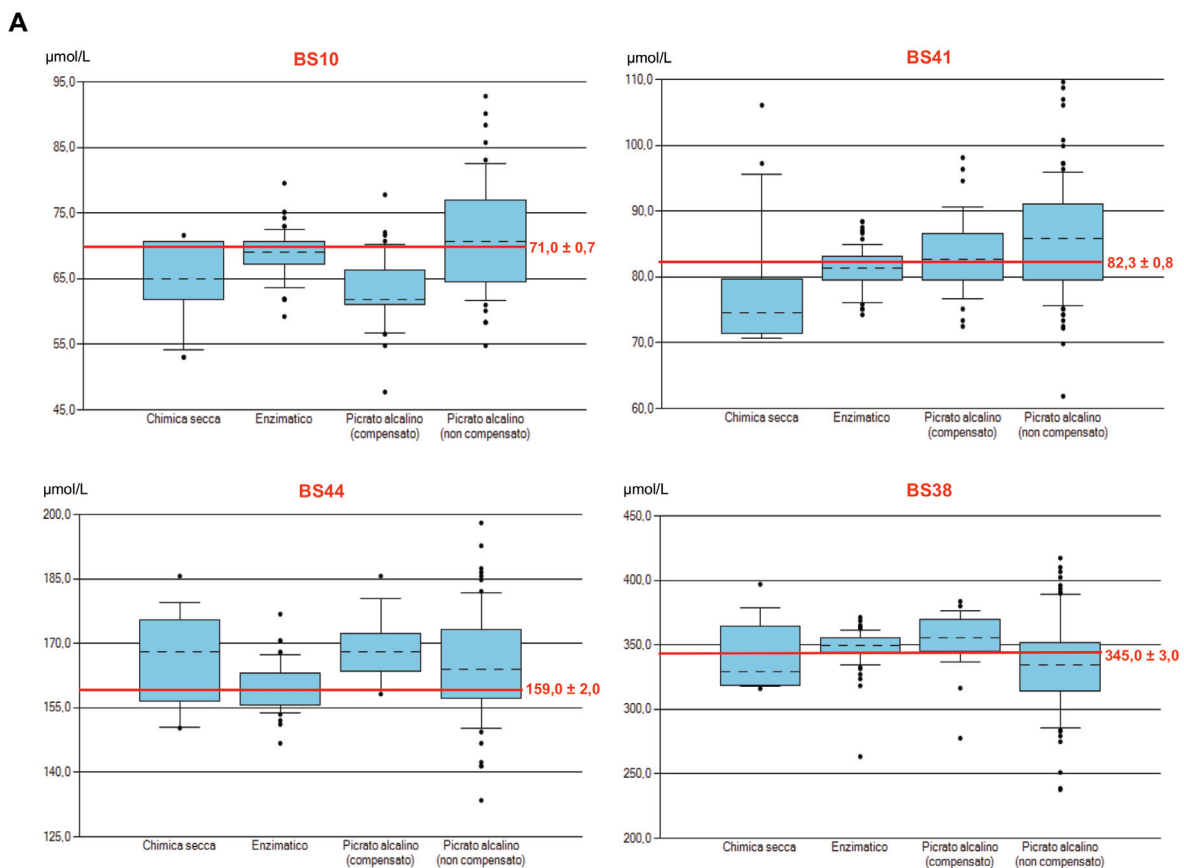
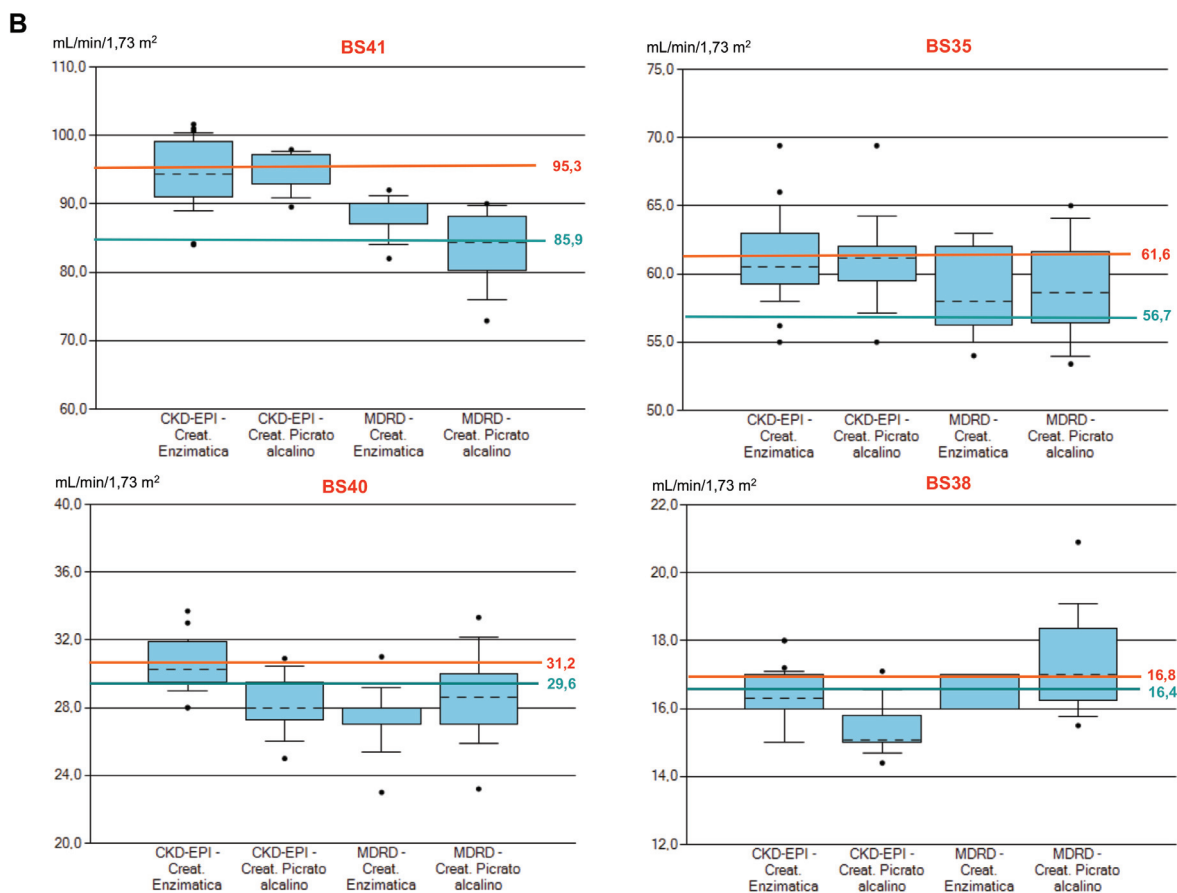


Figura 2A

Creatinina: box-plot (diagramma a scatola e baffi) dei risultati ($\mu\text{mol/L}$), ottenuti con i diversi metodi utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ per Biochimica Clinica su siero del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB), relativi a 4 campioni di controllo a diverse concentrazioni.

La scatola contiene i valori compresi tra il 25° ed il 75° percentile; i baffi indicano il 10° e il 90° percentile; la linea tratteggiata indica la mediana; la linea rossa indica il Valore Target.

**Figura 2B**

eGFR: box-plot (diagramma a scatola e baffi) dei risultati (mL/min/1,73m²), calcolati con l'utilizzo delle 2 formule (MDRD e CKD-EPI) applicate ai valori di creatinina ottenuti con i metodi enzimatico e al picrato alcalino utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ per biochimica clinica su siero del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB), relativi a 4 campioni di controllo.

I Valori Target (VT) della creatinina sono BS41 = 82,3±0,8; BS35 = 118±1,0; BS40 = 207±2,0; e BS38 = 345±3,0 μmol/L.

La linea rossa indica il valore di eGFR calcolato con formula CKD-EPI dal VT della creatinina; la linea verde indica il valore di eGFR calcolato con formula MDRD dal VT della creatinina.

CKD-EPI: BS40 = bias medio -3,1% (creatinina enzimatica), -10,3% (creatinina al picrato alcalino). BS38 = bias medio -2,6% e -10,9% rispettivamente.

eGFR, velocità di filtrazione glomerulare stimata; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboraion; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease.

La variabilità interlaboratorio dei diversi sistemi analitici è riportata nella Tabella 1. Tra i metodi enzimatici, tutti i sistemi analitici ad eccezione di Werfen, ILAB presentano un CV% mediano <3,4% (goal analitico minimo per l'imprecisione). Tra i sistemi al picrato alcalino, invece, 4 su 8 presentano un CV% mediano >3,4%.

Nella Tabella 2 è riassunto il numero di PNA riscontrate su un totale di 6 969 risultati, suddivisi per metodo. Complessivamente il 16% dei risultati forniti dai partecipanti non raggiunge il livello di qualità minimo (ET% <11,1%). Per concentrazioni di creatinina <75,0 μmol/L, questa percentuale incrementa mediamente al 27%. Il minor numero di PNA si è osservato per i metodi enzimatici (5,4%) e per il metodo al picrato alcalino compensato (14%) mentre circa un quarto dei risultati

ottenuti con il metodo al picrato alcalino non compensato e con la chimica secca non raggiunge il goal analitico minimo.

eGFR

Nella Figura 2B sono graficati in box-plot i valori di eGFR, calcolati con l'utilizzo delle 2 formule, su 4 campioni di controllo con concentrazioni crescenti di creatinina.

Nella Tabella 3 è riassunto il numero di PNA riscontrate su un totale di 2 217 risultati, suddivisi per metodo utilizzato per la determinazione della creatinina (enzimatico o al picrato alcalino) e per formula utilizzata per il calcolo dell'eGFR, nelle 6 classi di rischio per l'insufficienza renale cronica.

Tabella 1*Creatinina: variabilità inter-laboratorio dei principali sistemi utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ*

Sistema analitico	Tracciabilità	Metodo	N campioni	CV% mediano (intervallo)	N risultati media \pm DS
Roche, Cobas	IDMS	Enzimatico	79	2,96 (0,86–9,69)	15 \pm 2
		Picrato alcalino con compensazione	79	3,86 (1,23–7,57)	17 \pm 4
Beckman, AU	SRM 967a	Enzimatico	50	2,17 (1,23–7,57)	8 \pm 2
		Picrato alcalino con compensazione	36	3,19 (0,55–14,13)	7 \pm 2
	SRM 909b	Picrato alcalino senza compensazione	78	4,15 (0,76–16,47)	13 \pm 5
Beckman, CX/DXc	SRM 909b	Picrato alcalino senza compensazione	29	3,91 (0,85–10,25)	9 \pm 3
Werfen, ILAB	SRM 909b	Enzimatico	78	3,69 (0,76–12,04)	10 \pm 2
		Picrato alcalino senza compensazione	73	5,29 (1,02–12,24)	7 \pm 3
Abbott, Architect	SRM 967a	Enzimatico	53	2,93 (0,89–6,96)	10 \pm 2
		Picrato alcalino senza compensazione	76	3,19 (0,61–8,94)	9 \pm 3
Siemens, Dimension Vista	SRM 914a	Enzimatico	55	2,31 (0,21–13,54)	7 \pm 2
		Picrato alcalino con compensazione	43	3,28 (0,82–10,84)	7 \pm 2
Sclavo, Konelab	IDMS	Picrato alcalino senza compensazione	66	6,54 (1,75–13,95)	20 \pm 9
Ortho Clinical Diagnostics, Vitros	SRM 914a	Enzimatico, chimica secca	36	3,33 (0,56–8,74)	7 \pm 2

*IDMS, diluizione isotopica-spettrometria di massa; SRM, standard reference material***Tabella 2***Creatinina: Numero di Prestazioni Non Accettabili (PNA) riscontrate negli ultimi 5 anni del programma di VEQ (2016-2020)*

	<75 $\mu\text{mol/L}$ (n=7)			75-100 $\mu\text{mol/L}$ (n=7)			100-200 $\mu\text{mol/L}$ (n=12)			200-500 $\mu\text{mol/L}$ (n=16)			Totale		
	n PNA	n risultati	% PNA	n PNA	n risultati	% PNA	n PNA	n risultati	% PNA	n PNA	n risultati	% PNA	n PNA	n risultati	% PNA
Tutti i metodi	287	1079	26,5	201	1222	16,4	260	1973	13,2	389	2695	14,4	1137	6969	16,3
Enzimatico	52	399	13,0	21	438	4,8	31	716	4,3	32	952	3,4	136	2505	5,4
Chimica secca	26	64	40,6	31	86	30,6	24	105	22,9	22	146	15,1	103	401	25,7
Picrato alcalino con compensazione	78	217	35,9	31	223	13,9	33	361	9,1	36	464	7,8	178	1265	14,1
Picrato alcalino senza compensazione	131	399	32,8	118	475	24,8	172	791	21,7	299	1133	26,4	720	2798	25,7

Tabella 3
eGFR: Numero di Prestazioni Non Accettabili (PNA) riscontrate negli ultimi 5 anni del programma di VEQ (2016-2020)

eGFR, mL/min/1,73 m ²	<15 (n=7)		15-29 (n=7)		30-44 (n=7)		45-59 (n=7)		60-89 (n=5)		>90 (n=12)		Totale								
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%							
Valore Target CKD-EPI	10,8-14,7		16,8-8,9		31,2-45,0		53,8-59,2		61,6-80,5		92,4-108		10,8-108								
Valore Target MDRD	10,7-14,5		16,4-27,5		29,6-42,0		49,8-54,5		56,7-73,1		83,4-113		10,7-113								
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%							
	PNA risultati	PNA	PNA risultati	PNA	PNA risultati	PNA	PNA risultati	PNA	PNA risultati	PNA	PNA risultati	PNA	PNA risultati	PNA							
CKD-EPI Creatinina enzimatica	5	169	3,0	6	175	3,4	2	165	1,2	7	155	4,5	4	118	3,4	9	228	3,9	33	1010	3,3
CKD-EPI Creatinina al picrato alcalino	13	81	16,0	8	50	16,0	12	57	21,1	20	80	25,0	7	45	15,6	13	134	9,7	73	447	16,3
MDRD Creatinina enzimatica	12	55	21,8	3	47	6,4	6	49	12,2	8	53	15,1	8	35	22,9	25	95	26,3	62	334	18,6
MDRD Creatinina al picrato alcalino	14	76	18,4	16	64	25,0	18	68	26,5	10	61	16,4	16	51	31,4	42	105	40,0	116	425	27,3
Totale	44	381	11,5	33	337	9,8	38	339	11,2	45	349	12,9	35	249	14,1	89	562	15,8	284	2217	12,8

eGFR, velocità di filtrazione glomerulare stimata; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboraion; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease

Complessivamente il 13% dei risultati forniti dai partecipanti non raggiunge il livello di qualità minimo per l'impiego clinico dell'eGFR. Il minor numero di PNA si è osservato per i valori di eGFR calcolati con la formula CKD-EPI e basati su valori di creatinina ottenuti con metodi enzimatici (3,3%), mentre il 27% dei risultati di eGFR calcolati con la formula MDRD e basati su valori di creatinina ottenuti con metodi al picrato alcalino, sono stati classificati come PNA.

Albumina urinaria e ACR

Più del 90% dei laboratori utilizza metodi immunoturbidimetrici. Nella Tabella 4 sono riportati i CV% mediani di ciascun sistema analitico. Relativamente all'albumina, la variabilità interlaboratorio è risultata <8,0% sia per i metodi nefelometrici sia per quelli turbidimetrici e <6,5% se si considerano i CV% di ciascun sistema analitico. La variabilità analitica è in funzione della concentrazione: per campioni con valori di albumina di ~20 mg/L i CV% mediani salgono al 18% e al 14% per i metodi turbidimetrici e nefelometrici, rispettivamente.

Anche la variabilità analitica dell'albumina espressa in rapporto alla creatinina risulta più elevata per valori bassi (<3,4 mg/mmol), proprio i più utili da un punto di vista diagnostico. Per esempio per campioni con ACR di ~2 mg/mmol (~18 mg/g) i CV% mediani salgono al 17% e al 11% per i metodi turbidimetrici e nefelometrici, rispettivamente.

Nella Figura 3A sono riportati i valori di consenso (mediana) calcolati sui risultati di ciascun sistema

analitico in funzione della concentrazione. I valori sistematicamente più elevati si sono riscontrati per il sistema Siemens Dimension Vista (metodo nefelometrico) e quelli più bassi per Siemens Advia (metodo turbidimetrico). Risultati analoghi si osservano per ACR (Figura 3B).

Negli ultimi 3 anni di VEQ, complessivamente il 12% dei risultati di albumina non ha raggiunto il goal analitico minimo, il 9% dei partecipanti ha ottenuto prestazioni di qualità minima e il 79% prestazioni soddisfacenti (con il 49% dei laboratori che ha fornito prestazioni ottimali). Per valori <30,0 mg/L il numero di prestazioni non accettabili sale al 24%, per concentrazioni comprese tra 30,0 e 60,0 mg/L è risultato pari al 14% mentre per valori di albumina >80,0 mg/L scende al 4,8% (Figura 4).

Relativamente all'albumina espressa in rapporto alla creatinina (ACR), complessivamente il 14% dei laboratori non ha raggiunto il goal analitico minimo, il 11% ha ottenuto prestazioni di qualità minima e il 75% ha ottenuto prestazioni soddisfacenti (con il 37% dei laboratori che ha fornito prestazioni ottimali). Per valori di ACR <3,0 mg/mmol il numero di PNA aumenta al 21%; per concentrazioni comprese tra 5,0 e 20,0 mg/mmol è risultato pari al 15%; mentre per valori >25,0 mg/mmol scende al 7% (Figura 4).

Relativamente agli intervalli di riferimento (IR) adottati dai partecipanti alla VEQ, riferiti ad un maschio adulto, si sono riscontrati 11 differenti IR considerando sia il valore minimo sia il valore massimo. Il 53% dei laboratori utilizza come IR 0-30 mg/L; il 25% utilizza invece 0-20 mg/L e un altro 7% adotta come IR 0-19 mg/L (Figura 5).

Tabella 4

Albumina: variabilità inter-laboratorio dei metodi e dei principali sistemi utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ

Metodo/ Sistema analitico	N campioni	Albumina		ACR	
		CV% mediano (intervallo)	N risultati media ± DS	CV% mediano (intervallo)	N risultati media + DS
Nefelometria Beckman Beckman, Immage	8	4,82 (3,92–11,04)	4 ± 1	–	–
Nefelometria Siemens	24	7,48 (3,15–16,36)	11 ± 3	7,39 (3,79–14,09)	9 ± 2
Siemens, BN	14	5,46 (2,12–14,91)	4 ± 1	–	–
Siemens, Vista	24	4,01 (1,85–9,52)	8 ± 2	5,16 (2,00–11,70)	6 ± 1
Turbidimetria	24	7,93 (5,75–27,17)	65 ± 21	10,17 (6,17–29,13)	49 ± 16
Abbott, Architect	24	4,98 (1,24–14,16)	10 ± 3	4,60 (1,40–11,16)	5 ± 1
Beckman, AU	24	4,28 (1,80–16,59)	15 ± 5	5,75 (2,52–17,32)	15 ± 5
Roche, Cobas	24	6,20 (3,94–11,30)	28 ± 11	7,61 (2,73–13,78)	19 ± 7
Siemens, Advia	22	4,16 (1,05–10,66)	7 ± 3	5,27 (1,88–11,29)	6 ± 2

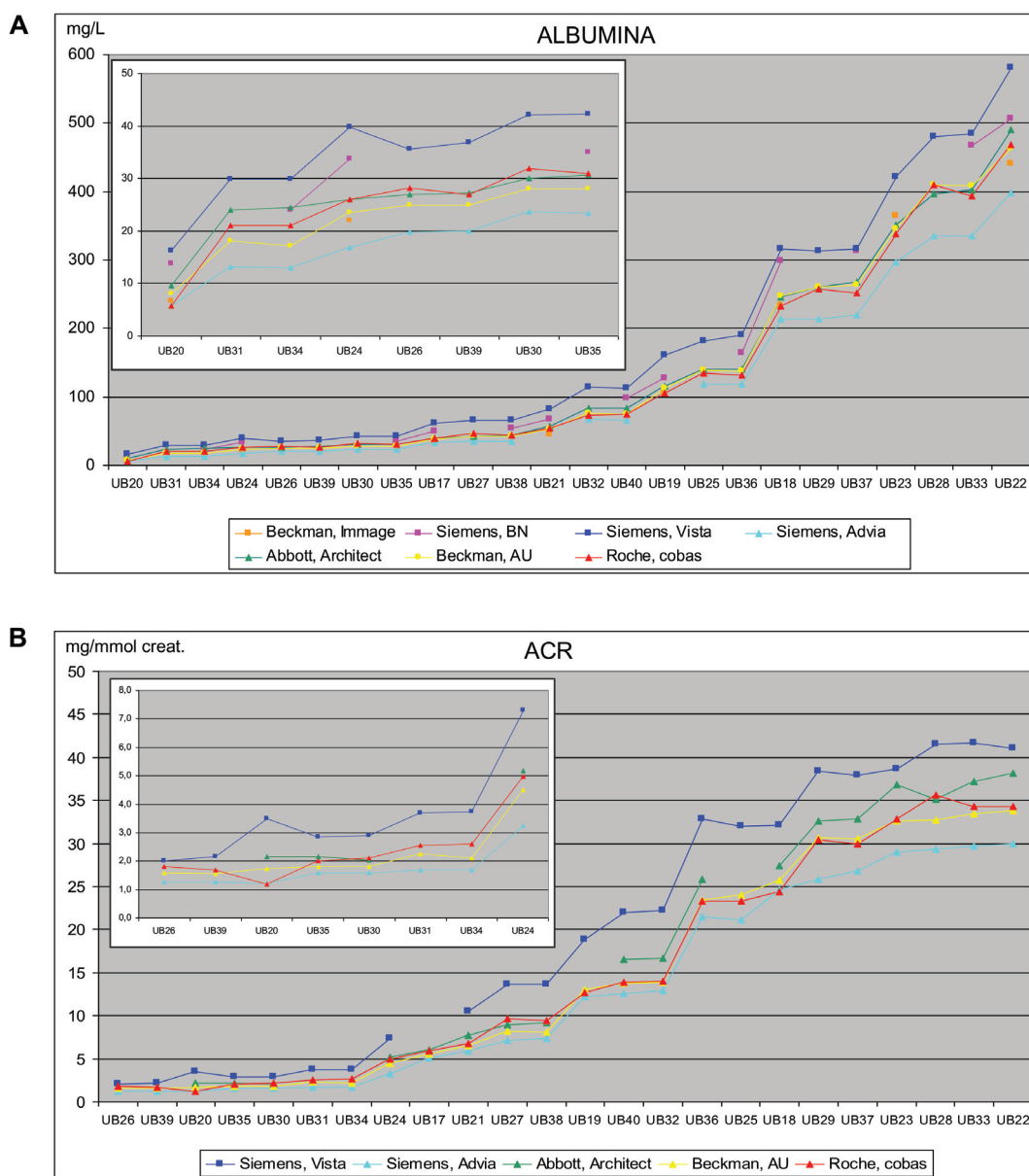


Figura 3

A) Valori mediiani di albumina urinaria (mg/L) dei diversi sistemi analitici utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ per Biochimica Clinica su urina del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB), relativi a 24 campioni di controllo, rappresentati in funzione della concentrazione crescente.

Nel riquadro un dettaglio relativo a campioni di controllo con concentrazioni <50 mg/L.

B) Valori mediiani di ACR (mg/mmol creatinina) dei diversi sistemi analitici, relativi a 24 campioni di controllo, rappresentati in funzione della concentrazione crescente.

Nel riquadro un dettaglio relativo a campioni di controllo con ACR <8 mg/mmol crea.

Creatininuria

La variabilità analitica interlaboratorio è risultata sufficientemente contenuta: CV% mediano (intervallo) = 4,2% (3,0% - 5,4%) per i metodi enzimatici e 4,4% (3,0%

- 5,9%) per i metodi al picrato alcalino. Anche la qualità delle prestazioni analitiche è risultata ampiamente soddisfacente: mediamente solo un 4,2% dei laboratori non raggiungeva il goal analitico minimo utilizzato nella VEQ (corrispondente ad un ET pari a 11,1%).

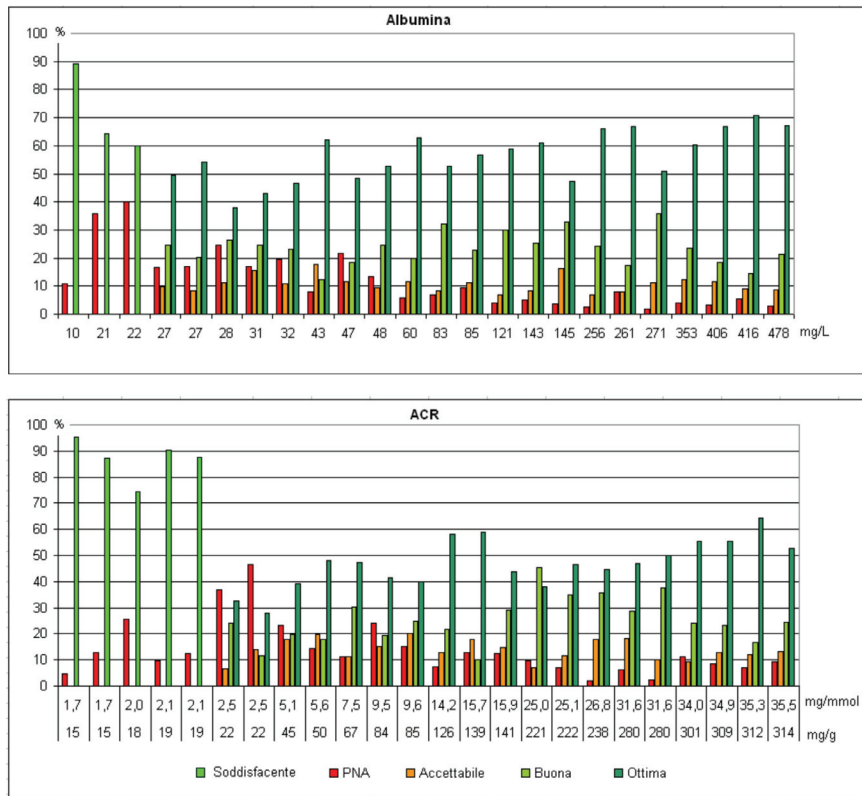


Figura 4
Albumina urinaria e rapporto Albumina/Creatinina (ACR): numero di Prestazioni Non Accettabili (PNA) riscontrate negli ultimi 3 anni di VEQ (2018-2020) relative a 24 campioni di controllo, in funzione della concentrazione.

Albumina (mg/24h)

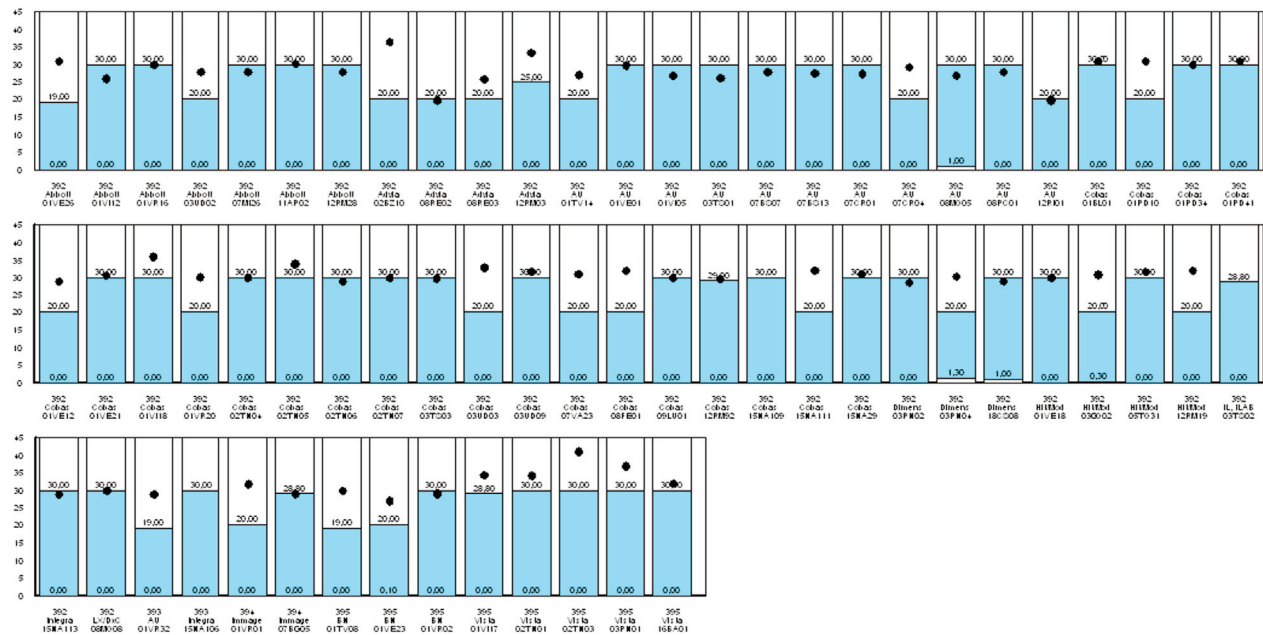


Figura 5
Albumina urinaria: Intervalli di Riferimento (IR) riferiti ad un maschio adulto di 50 anni, adottati dai laboratori partecipanti al programma VEQ per Biochimica Clinica su urina del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB). Ciascun rettangolo indica l'IR fornito dal laboratorio, mentre il pallino nero indica il risultato ottenuto su un campione di controllo distribuito nel ciclo di VEQ 2020.

DISCUSSIONE

Creatinina

I risultati della VEQ dimostrano che i metodi enzimatici sono più accurati rispetto ai metodi al picrato alcalino in tutto l'intervallo di concentrazione studiato.

È noto (36) che lo stesso calibratore sullo stesso sistema analitico (ad esempio, Roche Cobas o Siemens Advia) associa diversa incertezza in funzione di quale metodo venga utilizzato per la misura della creatinina: i metodi al picrato alcalino mostrano incertezze più elevate del calibratore rispetto a quelle associate con i metodi enzimatici. È noto inoltre che l'implementazione della riferibilità nei confronti del sistema di riferimento non corregge l'aspecificità dei metodi di misura. Di conseguenza, l'approccio applicato dai produttori per cercare di ovviare a questo problema tipico dei metodi basati sulla reazione al picrato (introducendo modifiche nelle procedure di calibrazione, come ad esempio fattori di "compensazione") porta a una maggiore incertezza associata ai valori dei calibratori, che si traduce in una maggiore variabilità dei risultati sui campioni dei pazienti. Anche i risultati del nostro studio dimostrano la superiorità dei metodi enzimatici rispetto ai metodi al picrato alcalino in termini di esattezza: per tutti i sistemi analitici ad eccezione della chimica secca, i bias% nei confronti del valore di riferimento rientrano per la quasi totalità dei campioni nell'obiettivo di qualità minimo basato sulla VB. I metodi enzimatici inoltre presentano una variabilità interlaboratorio più contenuta con CV% che rientrano per tutti i sistemi analitici nell'obiettivo di qualità minimo di imprecisione. Anche i risultati ottenuti in programmi di VEQ con l'utilizzo di sieri freschi congelati (commutabili) hanno dimostrato un bias fortemente positivo per la creatinina determinata con metodi al picrato alcalino (Jaffe), causato probabilmente da sostanze interferenti (37-39).

L'utilizzo dei metodi enzimatici, anche se è andato via via aumentando dopo la campagna di sensibilizzazione promossa in tutta Europa dalle Società Scientifiche di Medicina di Laboratorio e in Italia da SIBioC in particolare, negli ultimi 3 anni si è assestato su un 40% del totale. È pertanto fondamentale continuare a promuovere l'implementazione di questi metodi nei laboratori italiani sia da parte della comunità scientifica sia da parte dei provider di programmi di VEQ.

Inoltre è importante che i laboratori partecipino a programmi di VEQ che utilizzino materiali di controllo commutabili e con VT assegnati ai materiali di controllo. Solo se il programma ha queste caratteristiche, infatti, si ottengono informazioni univoche relative all'esattezza dei diversi sistemi analitici, come evidenziato da un recente lavoro in cui sono stati aggregati i dati di 4 Programmi di VEQ internazionali (40).

eGFR

Le indagini condotte in Italia una decina di anni fa (34,41), deponevano per una forte eterogeneità nel

comportamento tenuto dai laboratori circa l'eventuale utilizzo dell'eGFR e sulle modalità di refertazione. Nel 2013, anno in cui per la prima volta il CRB ha inserito questo parametro nel pannello di analiti, solo il 27% dei partecipanti riportava il risultato dell'eGFR; dal 2014 al 2017 questa percentuale è aumentata progressivamente (36%, 39%, 55%, 56%) fino a stabilizzarsi al 58% negli ultimi 3 cicli di VEQ.

Nel 2013 solo il 28% dei partecipanti utilizzava la formula CKD-EPI, nel 2014 il 37%, nel 2015 l'utilizzo delle 2 formule era ripartito in ugual misura, dal 2016 è iniziato a prevalere l'utilizzo di CKD-EPI rispetto a MDRD (56% *versus* 44%) e nel 2020 solo il 36% dei partecipanti utilizzava la formula MDRD.

La differenza tra i VT calcolati con le due formule si riduce all'aumentare della concentrazione di creatinina. Per valori di eGFR <60 mL/min/1,73m² i risultati calcolati con formula CKD-EPI e creatinina determinata con metodo enzimatico, presentano un bias% contenuto mentre i risultati di eGFR calcolati con la stessa formula e creatinina determinata con metodo al picrato alcalino, presentano un bias% elevato a causa del quale la CKD potrebbe essere inquadrata in modo errato:

- grave (<30 mL/min/1,73m²) invece di moderata, nell'esempio del BS40;
- insufficienza renale (<15 mL/min/1,73m²) invece di grave, nell'esempio del BS38.

Per valori di eGFR >60 mL/min/1,73m² i risultati calcolati con formula MDRD risultano inferiori rispetto a quelli calcolati con formula CKD-EPI. In entrambi i campioni riportati nella Figura 1 (BS35 e BS41) lo scostamento rispetto al proprio VT risulta contenuto (CKD-EPI <1%; MDRD <3,5%). Tuttavia il differente uso delle due formule inquadrebbe il paziente in modo diverso:

- CKD lieve (<90 mL/min/1,73m²) con MDRD e soggetto normale con CKD-EPI, nell'esempio BS41;
- CKD moderata (<60 mL/min/1,73m²) con MDRD e patologia lieve con CKD-EPI, nell'esempio BS35.

Complessivamente, il minor numero di PNA si è osservato per i valori di eGFR calcolati con la formula CKD-EPI e basati su valori di creatinina ottenuti con metodi enzimatici, come già dimostrato in altri studi (42).

L'introduzione del valore della eGFR nei referti dei laboratori clinici, pertanto, deve essere effettuata seguendo con attenzione tutte le indicazioni e raccomandazioni disponibili in modo da fornire al paziente e al clinico che l'ha in cura un messaggio omogeneo e standardizzato (43).

Dato che la stima del filtrato glomerulare presenta un'incertezza di misura dovuta all'imprecisione e alla VB della creatinina, sarebbe opportuno in primo luogo che tutti i laboratori cominciasse ad eseguire la determinazione della creatinina in condizioni ottimali e calcolassero l'incertezza del proprio laboratorio nella determinazione della creatinina (44). Una volta introdotto il valore di eGFR nei referti, il laboratorio dovrebbe tenerlo sotto controllo al pari di qualsiasi altro analita e partecipare ad uno specifico programma di VEQ.

Albuminuria

Le linee guida KDIGO (3) indicano come la presenza di albumina nelle urine rappresenti un fattore prognostico negativo sia per lo sviluppo di CKD sia per il rischio cardiovascolare, già a concentrazioni considerate "fisiologiche", comprese tra 10 e 30 mg/L di albumina, e quando ancora l'eGFR risulti normale. Raccomandano inoltre di refertare l'albumina in rapporto alla creatinina (ACR). Anche nella proposta di linee guida del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU), l'albumina viene indicata come parametro fondamentale nell'esame chimico-fisico e morfologico delle urine e viene fortemente raccomandata la partecipazione ad un programma di VEQ specifico (45). Tuttavia, solo una minima parte dei laboratori presenti sul territorio nazionale segue uno schema di VEQ per la chimica clinica quantitativa su urina (34).

Il Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program (NKDEP) ed il Working Group for Standardization of Albumin in urine della IFCC raccomandano bias <13% e <7%, rispettivamente, come goals desiderabile e ottimale *versus* il metodo di riferimento e una variabilità analitica <6% (29).

Dai risultati del nostro studio è emersa una variabilità analitica che soddisfa il goal di imprecisione per quasi tutti i sistemi analitici ma scostamenti tra un sistema e l'altro molto importanti.

Pur non potendo valutare l'esattezza nella misura dell'albumina, non disponendo di un valore assegnato con metodo di riferimento, gli scostamenti osservati tra i vari sistemi analitici, nell'intero intervallo di concentrazione, sono simili a quelli riportati dal College of American Pathologists (CAP) nell'indagine del 2017 (29).

È auspicabile che al più presto sia possibile implementare un sistema metrologico di riferimento, che includa sia un metodo di riferimento, sia materiali di riferimento certificati, con cui poter standardizzare le procedure di determinazione e rendere possibile l'utilizzo di IR comuni (29).

Le indagini sulle modalità di refertazione utilizzate dai laboratori italiani (3) e i risultati di questo studio indicano inoltre che occorre armonizzare anche aspetti della fase pre-analitica (modalità di raccolta del campione) e della fase post-analitica (unità di misura e IR).

ACR

L'esattezza della misurazione dell'albumina e della creatinina urinarie è ancora un problema aperto e l'IFCC è da lungo impegnata per superare queste criticità insieme alle Società di Medicina di Laboratorio affiliate, tra cui SIBioC (46). Dai risultati degli ultimi 3 anni di VEQ, non sono emersi scostamenti significativi tra i metodi di determinazione della creatinina urinaria e l'imprecisione è risultata contenuta. Quindi, anche i metodi al picrato alcalino su urina possono fornire una misura armonizzata a quella dei metodi enzimatici, al contrario di quanto avviene per la determinazione della creatininemia. Pertanto nel rapporto albumina/

creatinina, sembra essere la qualità della determinazione dell'albumina il fattore prevalente.

Dal nostro studio emerge pertanto, una scarsa armonizzazione dei risultati di ACR, soprattutto a valori clinicamente utili, dovuta principalmente alla scarsa armonizzazione della misura dell'albuminuria. Analoghi risultati sono stati riportati in uno studio basato sui dati dei laboratori partecipanti ad un programma di VEQ in Polonia (47). Incoraggianti risultati sono emersi da un recente lavoro dove è stato proposto un metodo di riferimento candidato, basato sulla cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa con diluizione isotopica (LC-IDMS/MS), e il suo utilizzo per assegnare i valori target ai materiali di controllo della VEQ (48).

Limiti dello studio

Non è stata valutata la commutabilità di tutti i materiali di controllo distribuiti nei diversi programmi di VEQ, tuttavia i risultati ottenuti sono in linea con i dati di programmi di VEQ che utilizzano campioni freschi, riportati in letteratura.

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati riportati in questa analisi evidenziano come la partecipazione a Programmi di VEQ, gestiti da Provider professionali, permetta di ricavare importanti informazioni relativamente all'affidabilità dei sistemi diagnostici in commercio, il livello di comparabilità dei risultati ottenuti su piattaforme analitiche differenti, il grado di tracciabilità delle procedure analitiche ai sistemi di riferimento, nonché le modalità operative utilizzate dai laboratori partecipanti. Nell'ambito del sistema di gestione per la qualità, la VEQ rappresenta uno strumento indispensabile nei processi di assicurazione della qualità che, se adeguatamente gestito, promuove ed assicura il continuo miglioramento delle prestazioni dei laboratori. La mera partecipazione a programmi di VEQ, peraltro, senza l'implementazione di adeguate procedure di analisi dei dati e ricerca di appropriate azioni di miglioramento da parte dei professionisti di laboratori, non garantisce il corretto monitoraggio delle prestazioni ed il loro miglioramento.

Specifici rapporti e relazioni sull'analisi di dati di VEQ, inoltre, evidenziano gli aspetti critici di cui la professione e le Società Scientifiche devono farsi carico per la loro risoluzione, mediante la pubblicazione di documenti di consenso che descrivano la pratica da essere attuata.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of

- Disease Study 2017. *Lancet* 2020;395:709-33.
2. Bello AK, Levin A, Lunney M, et al. Status of care for end stage kidney disease in countries and regions worldwide: international cross sectional survey. *BMJ Open* 2019;367:15873. doi: 10.1136/bmj.15873.
 3. 3KDIGO 2012. Clinical Practice Guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Supp* 2013;3:1-150.
 4. Graziani MS. Un aggiornamento delle linee guida internazionali per la valutazione e la gestione della malattia renale cronica. *Biochim Clin* 2014;38:32-8.
 5. Zoccali C, Cappelletti P, Plebani M. Valutazione di laboratorio della funzionalità renale. *Biochim Clin* 2009;33:144-5.
 6. Levey AS, Inker LA, Coresh J. GFR estimation: from physiology to public health. *Am J Kidney Dis* 2014;63:820-34.
 7. Myers GL, Miller WG, Coresh J, et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem* 2006;52:5-18.
 8. Panteghini M, Myers GL, Miller WG, et al. for the IFCC Working Group on Standardization of Glomerular Filtration Rate Assessment (WG-GFRA). The importance of metrological traceability on the validity of creatinine measurement as an index of renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1287-92.
 9. Panteghini M. Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:567-72. *Biochim Clin* 2008;32:203-8.
 10. Delanghe JR, Cobbaert C, Galteau MM, et al. Trueness verification of actual creatinine assays in the European market demonstrates a disappointing variability that needs substantial improvement. An International study in the framework of the EC4 creatinine standardization working group. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1319-25.
 11. Delanghe JR, Cobbaert C, Harmoinen A, et al. Focusing on the clinical impact of standardization of creatinine measurements: a report by the EFCC Working Group on Creatinine Standardization. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:977-82.
 12. Carobene A, Ceriotti F, Infusino I, et al. Evaluation of the impact of standardization process on the quality of serum creatinine determination in Italian laboratories. *Clin Chim Acta* 2014;427:100-6.
 13. Pièroni L, Bargnoux AS, Cristol JP et al. Did creatinine standardization give benefits to the evaluation of glomerular filtration rate? *eJIFCC* 2017;28:251-7.
 14. Dodder NG, Tai SS, Sniegoski LT, et al. Certification of creatinine in a human serum reference material by GC-MS and LC-MS. *Clin Chem* 2007;53:1694-9.
 15. Pièroni L, Delanaye P, Boutten A, et al. A multicenter evaluation of IDMS-traceable creatinine enzymatic assays. *Clin Chim Acta* 2011;412:2070-5.
 16. Boutten A, Bargnoux AS, Carlier MC, et al. Enzymatic but not compensated jaffe methods reach the desirable specifications of NKDEP at normal levels of creatinine. Results of the French multicenter evaluation. *Clin Chim Acta* 2013;419:132-5.
 17. Drion L, Cobbaert C, Groenier K, et al. Clinical evaluation of analytical variations in serum creatinine measurements: why laboratories should abandon Jaffe techniques. *BMC Nephrol* 2012;13. doi: 10.1186/1471-2369-13-133.
 18. Levey AS, Coresh J, Greene T, et al. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study Equation for estimating Glomerular Filtration Rate with standardized serum creatinine values. *Clin Chem* 2007;53:766-72.
 19. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
 20. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, et al. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m². *Am J Kidney Dis* 2010;56:486-95.
 21. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *Engl J Med* 2012;367:20-9.
 22. Delanaye P, Cavalier E, Cristol JP, et al. Calibration and precision of serum creatinine and plasma cystatin C measurement: impact on the estimation of glomerular filtration rate. *J Nephrol* 2014;27:467-75.
 23. Pottel H, Björk, Courbebaisse M, et al. Development of a modified full age spectrum creatinine-based equation to estimate glomerular filtration rate: a cross-sectional analysis of pooled data. *Ann Intern Med* 2021;174:183-91.
 24. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, et al. Current issues in measurements and reporting of urinary albumin excretion. *Clin Chem* 2009;55:24-39.
 25. 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.
 26. Jacobson BE, Secombe DW, Katayev A, et al. A study examining the bias of albumin and albumin/creatinine ratio measurements in urine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1737-43.
 27. Lieske JC, Bondar O, Miller WG, et al. A reference system for urinary albumin: current status. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:981-9.
 28. Graziani MS, Plebani M. The standardization of the urine albumin assays: no longer deferrable. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1657-9.
 29. Seegmiller JC, Miller WG, Bachmann LM. Moving towards standardization of urine albumin measurements. *eJIFCC* 2017;28:258-67.
 30. Miller WG, Seegmiller JC, Lieske JC, et al. Standardization of urine albumin measurements: status and performance goals. *J Applied Lab Med* 2017;2:423-9.
 31. Beasley-Green A, Burris NM, Bunk DM, et al. Multiplexed LC-MS/MS Assay for Urine Albumin. *J Proteome Res* 2014;13:3930-9.
 32. Miller WG, Jones GR, Horowitz GL, et al. Proficiency testing/external quality assessment: current challenges and future directions. *Clin Chem* 2011;57:1670-80.
 33. Secchiero S, Sciacovelli L, Faggian A, et al. Gli strumenti di assicurazione della Qualità in Medicina di Laboratorio: i Programmi di VEQ e gli Indicatori di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica. *Ligand Assay* 2013;18,2:41-53.
 34. Graziani MS, Secchiero S, Terreni A, et al. La diagnostica di laboratorio nella malattia renale cronica in Italia: armonizzare è d'obbligo. *Biochim Clin* 2015;39:617-26.
 35. EFLM Biological Variation Database. <https://biologicalvariation.eu> (ultimo accesso marzo 2021).
 36. Braga F, Infusino I, Panteghini M. Performance criteria for combined uncertainty budget in the implementation of metrological traceability. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:905-12.
 37. González-Lao E, Díaz-Garzón J, Corte Z, et al. Category 1 external quality assessment program for serum creatinine. *Ann Transl Med* 2017;5:133-40.
 38. Weykamp C, Secchiero S, Plebani M, et al. Analytical performance of 17 general chemistry analytes across countries and across manufacturers in the INPUS project of EQA organizers in Italy, the Netherlands, Portugal, United Kingdom and Spain. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:203-11.
 39. Jassam N, Weykamp C, Thomas A, et al. Post-

- standardization of routine creatinine assays: are they suitable for clinical applications? *Ann Clin Biochem* 2017;54:386-94.
40. van der Hagen EAE, Weykamp C, Sandberg S, et al. Feasibility for aggregation of commutable external quality assessment results to evaluate metrological traceability and agreement among results. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:117-25.
 41. Grillo C, Patrucco G. Creatinina e determinazione del filtrato glomerulare: un'indagine regionale. *Biochim Clin* 2010;34:269-72.
 42. Kuster N, Cristol JP, Cavalier E, et al. Enzymatic creatinine assays allow estimation of glomerular filtration rate in stage 1 and 2 chronic kidney disease using CKD-EPI equation. *Clin Chim Acta* 2014;428:89-95.
 43. Miller WG, Jones GRD. Estimated glomerular filtration rate; laboratory implementation and current global status. *Adv Chronic Kidney Dis* 2018;25:7-13.
 44. Badrick T, Turner P. The uncertainty of the eGFR. *Ind J Clin Biochem* 2013;28;242-7.
 45. Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, et al. Esame fisico, chimico e morfologico delle urine. Proposta di Linee Guida per la Fase analitica del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU). *Biochim Clin* 2016;40,4:353-82.
 46. Ruiz-Arenas R, Sierra-Amor R, Seccombe D, et al. A summary of worldwide National activities in Chronic Kidney Disease (CKD) testing. *eJIFCC* 2017;28:302-14.
 47. Ćwiklińska A, Dąbrowska H, Kowalski R, et al. Harmonization of urine albumin/creatinine ratio (ACR) results: a study based on an external quality assessment program in Polish laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1728-33.
 48. Chen Y, Liu H, Loh TP, et al. Measurement of urine albumin by liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry and its application to value assignment of external quality assessment samples and certification of reference materials. *Clin Chem Lab Med* 2020;doi: 10.1515/cclm-2020-0969.

Valutazione della filtrazione glomerulare: riflessione sull'impiego clinico

Giovanni Gambaro

Divisione di Nefrologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Dipartimento di Medicina, Università di Verona

ABSTRACT

Evaluation of the glomerular filtration rate from the clinical point of view.

In this paper I briefly discuss what the nephrologist means by "renal function" from a clinical point of view, and what can be inferred from the determination of the Glomerular Filtration Rate (GFR). Furthermore, I illustrate the use of serum biomarkers: serum creatinine, and GFR (measured and estimated GFR with different formulas), together with their limitations in different clinical conditions (acute kidney injury *versus* chronic kidney disease), different ages, different patients (obese, HIV patients, different ethnic groups). Forthcoming new methods for the point-of-care, rapid GFR determination are described with their possible implications in the acute kidney injury setting.

Parole chiave: *funzione renale, clearance della creatinina, velocità di filtrazione glomerulare*

FUNZIONE RENALE: SIGNIFICATO IN CLINICA

La valutazione della funzione renale è un aspetto centrale in clinica. In realtà non esiste una funzione renale ma ne esistono molte: le funzioni tubulari (acidificazione, concentrazione, riassorbimento e secrezione di vari soluti), le funzioni endocrine (sintesi di eritropoietina, prostaglandine, idrossilazione in posizione 1 della vitamina D), la filtrazione glomerulare, la selettività di filtrazione della membrana glomerulare. È peraltro ai metodi di misura della velocità di filtrazione glomerulare (glomerular filtration rate, GFR) a cui generalmente ci si riferisce quando si parla di valutazione della funzione renale. La GFR viene infatti considerata come il migliore indice di funzionalità renale sia nel soggetto sano che in quello nefropatico. In un certo senso, essa riassume in un'unica misurazione sia il danno glomerulare che quello tubulare. Non che non esistano patologie puramente tubulari in cui la GFR è perfettamente normale e si mantiene normale nel tempo (si pensi ad esempio ad alcune tubulopatie: la malattia di Gitelman, le acidosi tubulari distali incomplete, la glicosuria normoglicemica, e altre). Tuttavia quando c'è un danno glomerulare come nelle glomerulonefriti, nelle glomerulosclerosi, coesiste anche un danno tubulointerstiziale (indotto dagli stessi meccanismi patogenetici o secondario al danno glomerulare). Non solo, le tubulointerstiziopatie si associano, probabilmente

inducendolo, a danno glomerulare (glomerulosclerosi). Per questi motivi nelle nefropatie croniche, in particolare in quelle che hanno tendenza evolutiva verso l'insufficienza renale (dove cioè maggiore è il danno glomerulare, maggiore è quello tubulointerstiziale e viceversa), la GFR viene *tout court* considerata l'indicatore più accurato, anzi, "l'indicatore" di quanto funzioni un rene.

LA DETERMINAZIONE DELLA FUNZIONE RENALE

Limitazioni della misura della creatinina plasmatica

Con il declinare della funzione renale la concentrazione plasmatica di qualsiasi analita endogeno sia prodotto ad una velocità costante e sia rimosso esclusivamente per filtrazione glomerulare, aumenta secondo il reciproco della GFR. È evidente perciò che un semplice biomarcatore plasmatico con le caratteristiche suddette, quali la creatinina e la cistatina C, è estremamente attraente per la determinazione routinaria della GFR.

Tuttavia, la creatininemia come parametro di funzionalità renale soffre di importanti limitazioni.

La prima di queste è il fatto che essa ha anche una secrezione tubulare che gioca circa per il 20% della sua

Corrispondenza a: Giovanni Gambaro, Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Medicina, Università di Verona, Ospedale Maggiore, Piazzale A. Stefani 1, 37126 Verona, Tel +39 045 812 2528, E-mail giovanni.gambaro@univr.it

Ricevuto: 26.04.2021

Revisionato: 20.05.2021

Accettato: 20.05.2021

Pubblicato on-line: 19.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.041

clearance. Ecco quindi che la clearance misurata della creatinina tende a sovrastimare la GFR fino a circa il 20%. È per questa ragione che la clearance della creatinina è stata definita come misura surrogata della GFR. Un farmaco che competa con la creatinina per gli stessi carrier secretori ne ridurrà la clearance, avvicinandola al valore effettivo della GFR, come avviene somministrando la cimetidina come strumento per una più precisa misura della GFR (1).

La concentrazione plasmatica della creatinina è inoltre influenzata da alcuni fattori. Le variazioni della massa muscolare, come ad esempio la sarcopenia, come accade negli anziani, ma anche nei pazienti con scompenso cardiaco (2) e le amputazioni, riducono la concentrazione ematica della creatinina; il contrario avviene in caso di ipertrofia muscolare. Alcuni farmaci (come il Growth Hormone e il fenofibrato) modificando la produzione endogena di creatinina e quindi la creatininemia (3), ne inficiano la validità come biomarcatore di funzione renale per sé o nel caso la si impieghi nelle formule di stima della GFR. Diverso è il caso se si misura la clearance della creatinina perché consensualmente all'aumento della concentrazione nel sangue, si ha un aumento dell'escrezione urinaria.

Un terzo elemento di criticità è il cosiddetto "creatinine blind range", cioè quella fase nella progressione di una nefropatia in cui la creatininemia continua a rientrare nell'intervallo dei valori di riferimento dando la falsa percezione che non vi sia una decurtazione funzionale (Figura 1). Ciò dipende dal fatto che nelle fasi meno avanzate, grossolanamente fino ad una perdita di nefroni di circa il 50%, i nefroni residui intervengono compensandone la perdita; è il fenomeno dell'iperfiltrazione (vedi paragrafo successivo).

Si tratta però di una falsa percezione. La creatininemia, se anziché essere valutata dicotomicamente, cioè come all'interno o all'esterno dell'intervallo di riferimento, fosse valutata come variabile continua, si rivelerebbe egualmente adeguata alla misurazione reale della GFR (4).

Anche come indice prognostico di perdita di funzione renale cronica, la creatininemia si comporta ottimamente rispetto a biomarcatori ben titolati, ad esempio la cistatina C e la stima della GFR (eGFR) (4). Lo stesso si osserva nel caso di perdita acuta di GFR come nella nefropatia da mezzo di contrasto (C-AKI) ove le sue variazioni a 12 ore dalla infusione del mezzo di contrasto sono predittive di C-AKI ben più delle variazioni di cistatina C (5).

L'ottima prestazione della creatininemia per sé come indice di funzione renale rispetto alla cistatina C è spiegata dalla sua minore variabilità intraindividuale (4% *versus* 10%) che la rende più appropriata nel monitoraggio di uno stesso soggetto. Al contrario essa, avendo maggiore variabilità interindividuale e quindi un indice di individualità (rapporto tra variabilità intraindividuale e variabilità interindividuale) inferiore alla cistatina C (0,3 *versus* 0,9) è meno adeguata nella definizione di una categoria (ad esempio patologico *versus* normale, oppure classificazione negli stadi della CKD) (6,7).

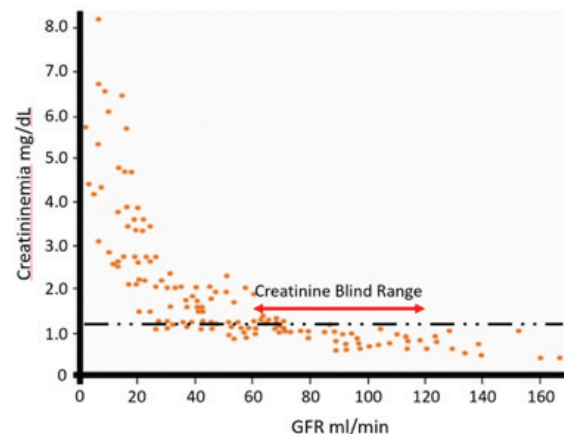


Figure 1

Illustrazione del "Creatinine Blind Range", l'intervallo di valori di creatininemia in cui in presenza di una nefropatia evolutiva con riduzione della GFR, la funzione renale stimata con la creatininemia appare normale.

Limitazioni della determinazione della velocità di filtrazione glomerulare

La GFR è una misura della funzione renale globale anche in quanto è la risultante di due distinte GFR essendo due normalmente i reni. È una misura che perciò nulla dice sulla funzionalità separata dei due reni, né ci dice se si abbia a che fare con un solo rene. Per la valutazione separata si utilizza la scintigrafia renale con marcatori radioattivi di filtrazione glomerulare (^{125}I -iotalamato e ^{51}Cr -EDTA). È richiesto in tal caso che l'area di captazione renale venga tracciata nel monitor di rilevazione, una procedura non esatta che introduce un errore nella determinazione della GFR singola. Tale tipo di metodo è perciò utile quando sia necessario conoscere come si distribuisca percentualmente la funzione tra i due reni, mentre non è accurato quando si voglia conoscere la GFR singola e/o globale in quanto prevede come si è detto un'operazione, la delimitazione dell'area di captazione, suscettibile di errore.

Il rene ha inoltre una certa capacità di iperfiltrare che viene valutata con test specifici (8) e che è denominata "riserva funzionale" (9). Si tratta di quella flessibilità funzionale, quell'incremento della GFR, che si osserva in reni sani nelle prime settimane di gravidanza, all'insorgenza del diabete mellito, oppure nel rene residuo dopo nefrectomia del controlaterale.

L'iperfiltrazione glomerulare però è anche un meccanismo compensatorio che viene messo in atto dai glomeruli/nefroni residui quando vi sia la perdita di un certo numero di essi come accade nelle nefropatie croniche (10). Perciò, in teoria, finché non si esaurisca, l'iperfiltrazione glomerulare maschera, sottostimandolo, la reale entità del danno renale. In pratica però, è una variazione funzionale che può essere indotta da uno stimolo (ad esempio un carico di aminoacidi) la cui standardizzazione è complessa e ciò può spiegare alcune osservazioni incongruenti con la teoria, come il

fatto che la riserva funzionale possa in taluni casi essere negativa (10).

La GFR non è però valutata solamente in relazione a reni normali o a reni affetti da nefropatie croniche. I metodi di misurazione della vera GFR richiedono raccolte urine di ore o determinazioni ematiche per misurare la scomparsa di un marcatore esogeno [inulina, ioexolo, acido dietilamminopentacetico (99mTc-DTPA), e altri] a distanza anch'essi di ore (generalmente almeno 6). Inoltre richiedono l'impiego di metodi di laboratorio più complessi [come la cromatografia liquida (HPLC) o la spettrofotometria di massa] e con tempi di risposta non compatibili con l'urgenza/emergenza. Anche la misurazione del surrogato della GFR, la clearance della creatinina, richiede raccolte urine di ore. Non è possibile quindi una determinazione in tempo reale (o quasi) come potrebbe essere utile per il clinico che abbia di fronte un paziente che sta sviluppando una insufficienza renale acuta (oggi compresa nel termine Acute Kidney Injury, AKI).

Sebbene attualmente non siano disponibili terapie specifiche che mitighino, o favoriscano e accelerino il recupero/guarigione del danno tubulare che generalmente caratterizza la AKI, conoscerne precocemente la gravità sarebbe comunque utile per mettere in atto tempestivamente misure generiche di nefroprotezione e per programmare le terapie sostitutive (continuous replacement renal therapy, CRRT).

Pertanto i metodi attualmente disponibili di misurazione della GFR sono applicabili (e validi) solo nelle condizioni di stabilità (almeno nel medio termine, cioè mesi) della filtrazione glomerulare. Così pure solo a questa condizione sono applicabili tutte le formule di stima di GFR in quanto derivate da casistiche di soggetti con relativa stabilità della filtrazione. Non sono invece applicabili quando la filtrazione glomerulare cambi rapidamente (ore, pochi giorni) come accade nell'AKI. In questa situazione infatti, la creatininemia non resta costante ma aumenta raggiungendo un plateau in un arco di tempo più o meno lungo secondo i livelli iniziali di GFR e l'entità del danno, anche in oltre 7 giorni (11).

È per queste ragioni che la definizione di AKI oggi si basa sulle variazioni della creatininemia (12) e non anche di eGFR come nel "Risk, Injury, Failure, Loss, and End stage renal disease" (RIFLE), il primo sistema classificativo dell'AKI proposto (13).

Formule per la stima della velocità di filtrazione glomerulare

Dalla più antica formula di Cockcroft & Gault numerose altre formule sono state proposte, una dimostrazione del fatto che nessuna di esse è veramente soddisfacente: vi possono essere specifiche classi di pazienti, specifiche patologie, gruppi etnici-razziali, condizioni fisiologiche, classi di età in cui la stima risulta inaccurata. La ragione principale di ciò è che esse sono state sviluppate partendo da coorti di soggetti con specifiche caratteristiche. Ad esempio, la formula MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) è

stata realizzata in una coorte di soggetti con CKD stadio 3-4, la CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) da coorti con GFR >60 mL/min/1,73m², entrambe con soggetti >18 anni di età e con scarsa rappresentazione di quelli >70 anni di età. Altre ragioni, che almeno in parte dipendono dalle caratteristiche della popolazione di origine, sono l'effetto sulla variabilità dei livelli ematici di creatinina di fattori diversi dalla filtrazione glomerulare nonché problemi legati alle diverse modalità di determinazione della GFR misurata nelle coorti da cui le formule sono derivate (14).

Di qui l'indicazione ad impiegare queste formule solo negli ambiti specifici di età e/o di GFR in cui sono state sviluppate, e la proposta di formule non "generaliste" ma indirizzate a certi pazienti o a certe classi di età. In relazione all'età, le Linee Guida KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) suggeriscono di applicare l'equazione CKD-EPI negli adulti e la formula CKiD nei bambini-adolescenti. Tuttavia, nella fascia di età di passaggio tra adolescenza ed età adulta giovane, i valori di GFR stimati con le due equazioni divaricano. Per superare questa discontinuità, recentemente è stata proposta la formula EKFC che copre l'intervallo 2-90 anni di età (15). Tuttavia, il problema della generalizzabilità di questa formula a popolazioni non di origine Europea è stato sollevato in quanto essa è derivata solo da coorti di soggetti con questa origine (16). Inoltre, essa, rispetto alla formula CKD-EPI, tende a sottostimare la GFR negli anziani con GFR conservata (specie >70 anni) portando ad una sovra-diagnosi della CKD (17), un problema molto dibattuto e che sarà discusso più avanti in questa rassegna.

Valutazione della funzione renale nell'insufficienza renale acuta

Waikar et al. hanno indagato come la gravità dell'AKI possa essere sottostimata valutando le variazioni della creatininemia sulla base dei diversi livelli di precedente riduzione cronica della GFR (è la frequente situazione clinica dell'AKI sovrapposta a una preesistente CKD di diverso stadio) (18). Gli Autori utilizzando un modello di cinetica bicompartimentale della creatinina hanno ottenuto i risultati illustrati nella Tabella 1. Come si può vedere, un paziente CKD stadio 2, cioè con una GFR compresa tra 89 e 60 mL/min/1,73m², nelle prime 12 ore dall'insorgenza di AKI per un danno inferiore al 50% di riduzione ulteriore della GFR, potrebbe non essere identificato pur avendo un incremento della creatininemia, ma inferiore al 50% richiesto dalla classificazione KDIGO. Lo stesso accadrebbe per un soggetto CKD stadio 3 (GFR cronicamente ridotta tra 59 e 30 mL/min/1,73m²) che subisca un danno acuto ben più grave, determinante cioè il 90% della riduzione della GFR. In quest'ultimo caso per avere un'idea precisa della gravità del danno acuto sarebbe necessario attendere 24 ore. Infine, solo alla 36^{ma} ora sarebbe possibile realizzare la gravità del danno funzionale in un paziente CKD stadio 3 che subisca un'AKI compromettente il 50% della GFR.

Tabella 1

Stadio AKI raggiunto ai tempi indicati per riduzioni al tempo 0 della GFR del 90% e del 50% per stadi diversi di CKD

	Ore dopo AKI				
	12	24	36	48	72
Riduzione del 90% di GFR					
No CKD	AKI stadio 2	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3
CKD stadio 2	AKI stadio 1	AKI stadio 2	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3
CKD stadio 3	Nessuno	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3
CKD stadio 4	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3
Riduzione del 50% di GFR					
No CKD	AKI stadio 1	AKI stadio 1	AKI stadio 1	AKI stadio 1	AKI stadio 2
CKD stadio 2	Nessuno	AKI stadio 1	AKI stadio 1	AKI stadio 1	AKI stadio 1
CKD stadio 3	Nessuno	Nessuno	AKI stadio 1	AKI stadio 1	AKI stadio 1
CKD stadio 4	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3	AKI stadio 3

AKI, acute kidney disease; GFR, glomerular filtration rate; CKD, malattia renale cronica.

La classificazione di AKI stadio 1, stadio 2 e stadio 3 si ha per un incremento della creatinemia sul valore basale rispettivamente di oltre il 50%, 100% e 200%.

Modificata dal ref (14).

Benché non ci sia evidenza di alcuna terapia in grado di accelerare la risoluzione del danno tubulare, se ci fosse è probabile che essa sarebbe più efficace se somministrata precocemente.

Di qui l'esigenza di avere metodi e strumenti per una precoce diagnosi dell'AKI. Dalla prima definizione di AKI nel 2004 (13) vi è stato un grande impegno sulla sua diagnosi precoce utilizzando i biomarcatori di danno tubulare, NGAL, KIM1 e molti altri. Tuttavia il loro trasferimento "bench to bedside" non è ancora avvenuto per i costi, per le numerose condizioni che ne influenzano i livelli e quindi, in ultima analisi, per l'ancora inadeguata prestazione diagnostica (19).

La compromissione della GFR in corso di AKI non va immaginata necessariamente come la conseguenza di una grave sofferenza macroscopica del tubulo (prevalentemente) e/o del glomerulo. Infatti, è sufficiente anche solo una modesta sofferenza tubulare prossimale e spesso del tratto ascendente dell'ansa di Henle, il segmento del nefrone più frequentemente e talvolta esclusivamente interessato, per avere una riduzione della GFR. L'alterata capacità riassorbitiva del sodio determina infatti che una quantità maggiore di questo ione e del suo principale anione di accompagnamento, il cloro, arrivi nel nefrone distale, a livello della *macula densa* dell'apparato iuxtaglomerulare. Questo fatto induce la vasocostrizione dell'arteriola afferente

glomerulare con conseguente riduzione della GFR. Ciò avviene pressoché immediatamente (20), ma le variazioni della creatinemia sono osservabili solo nell'arco di 12-24 ore successive e l'entità complessiva del danno renale non è valutabile appieno se non in genere dopo un periodo più lungo, anche di alcuni giorni. Avere a disposizione un metodo che consentisse di determinare la GFR rapidamente e in maniera non invasiva, magari uno strumento point-of-care, sarebbe di estrema utilità in tutte le condizioni di acuzie, in particolare nei reparti di terapia intensiva, ma anche nei pazienti cronici per una più rapida e precisa valutazione della GFR rispetto alla sua stima.

Sono in fase avanzata di studio almeno 2 metodi che si avvalgono di biomarcatori fluorescinati di filtrazione glomerulare le cui curve di scomparsa dopo un singolo bolo possono essere valutate con misurazioni per via transdermica della loro concentrazione consentendo così, con l'impiego di opportuni algoritmi, la determinazione della GFR in 3-6 ore (21). In uno dei due metodi si impiega l'agente fluorescinato Relmapirazin. Nel secondo si somministrano due molecole di destrano diversamente fluorescinate, una di basso peso molecolare (5kD) che si comporta come l'inulina, l'altra di maggior peso molecolare (150 kD) che non viene filtrata ma serve per misurare il volume intravascolare, e che consente perciò una più rapida misurazione della GFR.

Valutazione della GFR nell'anziano, in specifiche condizioni fisiologiche e patologiche e in gruppi etnici diversi

La ridotta produzione endogena di creatinina legata alla riduzione delle masse muscolari tipica dell'anziano, rende ragione del fatto che nell'anziano la creatininemia non aumenti o aumenti meno dell'atteso, nonostante la riduzione della GFR. D'altra parte la determinazione della clearance della creatinina può essere particolarmente difficile nell'anziano (ad esempio per incontinenza, mancata o incompleta raccolta di singole minzioni). Per questo motivo la stima del GFR con le formule è preferita. Tuttavia la gran parte delle formule disponibili non sono del tutto appropriate nell'anziano poiché sono state sviluppate in coorti in cui gli anziani erano poco rappresentati. Per ovviare a questo limite nell'ambito del "Berlin Initiative Study" sono state realizzate due formule, la BIS 1 (che utilizza i livelli sierici di creatinina) e la BIS2 (che utilizza i livelli sierici di creatinina e di cistatina C) che nell'anziano con CKD stadio 1-3 avrebbero una accuratezza migliore rispetto ad altre formule (22). Tuttavia non tutti gli studi condotti su altre popolazioni ne hanno confermato la maggior accuratezza.

In gravidanza, le formule MDRD e CKD-EPI sono inaccurate in quanto sottostimano la GFR di circa il 20%. È stata anche proposta una formula specifica da usare nelle donne pre-eclamptiche che presenta migliori prestazioni rispetto alle precedenti (23). Tuttavia, è la natura dinamica delle variazioni della GFR in gravidanza che in linea di principio preclude l'impiego delle formule in quanto queste, per essere applicate, richiedono la stabilità della GFR. Per questi motivi, le Clinical Practice Guidelines Britanniche sulla gravidanza nelle donne nefropatiche raccomandano di non impiegare le formule ma solo le variazioni della creatininemia per valutare la funzione renale (24).

Altri gruppi di soggetti in cui l'impiego delle formule standard di stima della GFR è stato analizzato e si è dimostrato inaccurato, sono i pazienti affetti da HIV (25), gli obesi (26), gli epatopatici gravi (27). Infine, nei pazienti oncologici e che devono essere sottoposti a chemioterapie, il problema di come valutare la funzione renale per evitare sovradosaggi dei farmaci con la conseguente tossicità, è molto importante. Tradizionalmente viene usata la formula di Cockcroft & Gault ma questa, in studi recenti, si è rivelata nettamente meno adeguata rispetto alla CKD-EPI (28). La GFR stimata con formula di Janowitz-Williams, specificamente sviluppata in questa popolazione, ha dimostrato ottima concordanza con la GFR misurata nelle popolazioni studiate (29). Essa però non è ancora stata validata in altre coorti di pazienti oncologici. CKD-EPI dovrebbe quindi essere impiegata in questi pazienti, salvo che in quelli con obesità grave, negli amputati/paraplegici, negli epatopatici ove per una precisa determinazione della GFR ai fini dell'aggiustamento posologico dei chemioterapici, è necessaria la misurazione della GFR (clearance di

ioexolo, o di ^{99m}Tc -DTPA).

Le formule di più comune uso per eGFR, MDRD e CKD-EPI includono una correzione per l'origine africana. Vi sono stati vari altri adattamenti dei coefficienti considerati da queste formule per le popolazioni asiatiche (30,31), e per altri gruppi etnici (32). Il problema comunque è importante e ancora aperto (33), tant'è che la National Kidney Foundation (NKF) e l'American Society of Nephrology (ASN) hanno da poco promosso una Task Force on Reassessing the Inclusion of Race in Diagnosing Kidney Diseases. Questa iniziativa è stata seguita da una call per raccogliere studi e dati su coorti inclusive di diversi gruppi etnici al fine di migliorare la precisione delle formule di stima della GFR (34).

Velocità di filtrazione glomerulare e classificazione della malattia renale cronica

I valori di GFR sono indicatori della funzione renale e sono impiegati per categorizzare la CKD. Gli attuali criteri per la definizione della CKD nell'adulto si basano su combinazioni variabili di

- segni di danno renale cronico osservato con le tecniche di imaging, in una biopsia renale, oppure, più comunemente, la proteinuria e, specie negli studi epidemiologici, l'albuminuria abnormemente elevate;
- riduzione dell'eGFR sotto determinati valori: 90, 60, 45, 30, 15 mL/min/1,73m².

Si tratta di valori soglia di GFR fissi, cioè indipendenti dall'età e dal sesso benché ci siano varie dimostrazioni che le curve di distribuzione della GFR sono diverse tra le varie classi di età e tra maschi e femmine (35). I vantaggi dell'attuale classificazione della CKD sono indubbi, ma ne vanno riconosciuti alcuni limiti, il più importante dei quali è probabilmente la definizione rigida della soglia di 60 mL/min/1,73m² come discriminante netto tra insufficienza renale cronica, (<60 mL/min/1,73m², SI; >60 mL/min/1,73m², NO)

Questo valore, è infatti tradizionalmente assunto come valore soglia della GFR per la definizione di CKD. Si tratta però di un rilievo assai frequente nell'anziano. L'attuale dibattito riguarda il fatto se questa condizione così frequente tra gli anziani possa realmente aumentare il rischio di insufficienza renale terminale (ESKD) e di morte e se abbia un impatto sullo stato clinico dell'anziano, come invece avviene nelle fasce più giovani. È chiaro che se così fosse, tale condizione dovrebbe essere considerata anche nell'anziano come un vero stato di malattia. Altrimenti sarebbe solo una condizione parafisiologica di cui tenere conto soltanto in relazione alla maggior vulnerabilità dell'organo in condizioni di stress e alla necessità di adeguamenti posologici per i farmaci ad eliminazione renale. È evidente quindi come chiarire questo punto abbia in ambito di salute pubblica un significato tutt'altro che accademico poiché, secondo le Linee Guida, questi livelli di filtrato glomerulare imporrebbero una sorveglianza stretta del paziente e un atteggiamento terapeutico più o meno aggressivo nei confronti di una

enorme massa di popolazione.

Nelle persone <65 anni di età, la mortalità generale aumenta per valori di GFR <75 mL/min/1,73m². Al contrario, sopra i 65 anni il rischio di mortalità aumenta sensibilmente solo quando il GFR si riduce al di sotto di 45 mL/min/1,73m² (36). Vari studi inoltre hanno messo in luce come nei soggetti con GFR <60 mL/min/1,73m², la progressione verso l'ESKD avvenga quasi esclusivamente in quelli che presentano proteinuria (37), quindi non propriamente in chi ha un rene senile. Infatti, la proteinuria che denota in genere l'esistenza di una glomerulopatia, non fa parte del quadro dell'invecchiamento fisiologico del rene. Nell'anziano, in assenza di proteinuria, è stato pertanto proposto il valore di GFR di 45 mL/min/1,73m² per definire la condizione di insufficienza renale cronica (36).

CONCLUSIONI

La ricerca di un metodo semplice e con una buona prestazione diagnostica per determinare la GFR è, come visto, un tema importante di ricerca clinica. Infatti, i valori della GFR concorrono alla diagnosi della presenza di una nefropatia e alla stima del rischio di progressione verso l'ESKD e di mortalità generale e cardiovascolare *in primis*. Tuttavia la precisione richiesta nella determinazione della GFR per queste finalità non è così alta come si potrebbe essere portati a ritenere sulla base della proposizione in letteratura di equazioni "generaliste" di stima con prestazioni sempre maggiori. A dimostrazione di ciò, si consideri la recente pubblicazione di uno studio in cui è stata valutata l'effetto della correzione per il fattore etnico (Black) nella formula CKD-EPI, sulla prevalenza della CKD nella popolazione Statunitense (38). La rimozione della correzione nella stima, una variazione cioè di circa il 15% del GFR, porterebbe al raddoppio della prevalenza negli afroamericani dei casi di CKD, senza però pregiudicare l'accuratezza nella predizione del rischio di progressione. Ben più importanti sarebbero invece le implicazioni riguardo all'impiego di vari farmaci di uso corrente. Infatti, ad esempio, il 33% e il 24% di chi assumeva rispettivamente ciprofloxacina e metformina veniva riclassificato ad una classe di GFR in cui la riduzione della posologia o la sospensione del farmaco è necessaria.

In relazione alla dose dei farmaci, al clinico dovrebbero essere forniti anche i valori di eGFR indicizzati dalla superficie corporea, il cui uso è raccomandato dalla Agenzia Europea del Farmaco quando si debba impiegare un farmaco ad escrezione renale nel paziente con CKD (39). In questo ambito l'introduzione di altri biomarcatori di filtrazione quali la cistatina C potrebbe migliorare la precisione della eGFR (16,40). Tuttavia, per farmaci a strettissimo margine terapeutico può essere ancora consigliabile effettuare una vera misurazione della GFR con un marcatore esogeno (28) e, quando saranno disponibili, con i biomarcatori fluorescinati di filtrazione di cui si è fatto cenno. In riferimento a quest'ultimi e all'ambito dell'AKI,

quandanche questi strumenti fossero disponibili, eventualmente associati a biomarcatori urinari ed ematici con buone prestazioni diagnostiche, è verosimile che il loro trasferimento alla clinica non si realizzerebbe fintanto che non fossero anche disponibili terapie specifiche per l'AKI.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1832-43.
2. Brisco MA, Hale A, Heyward D, et al. Decreased creatinine production in heart failure patients undergoing LVAD placement leads to overestimates of renal function. *J Card Fail* 2014; 20(8S):S34.
3. Samra M, Abcar AC. False estimates of elevated creatinine. *Perm J* 2012;16:51-2.
4. Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, et al. Serum creatinine, cystatin c, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem* 2010;56:740-9.
5. Ribichini F, Graziani MS, Gambaro G et al. Early creatinine shifts predict contrast-induced nephropathy and persistent renal damage after angiography. *Am J Med* 2010;123:755-63.
6. Dalton RN. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. *Clin Chem* 2010; 56:687-9.
7. Gambaro G, Graziani MS, Ribichini F. Diagnosis of acute renal injury by serum creatinine: negative perception vs evidence. *G Ital Nefrol* 2012;29:4-6.
8. De Moor B, Vanwalleghem JF, Swennen Q, et al. Haemodynamic or metabolic stimulation tests to reveal the renal functional response: requiem or revival? *Clin Kidney J* 2018;11:623-54.
9. Thomas DM, Coles GA, Williams JD. What does the renal reserve mean? *Kidney Int* 1994;45:411-6.
10. Barai S, Gambhir S, Prasad N, et al. Functional renal reserve capacity in different stages of chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2010;15:350-3.
11. Waikar SS, Bonventre JV. Creatinine kinetics and the definition of Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:672-9.
12. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Inter, Suppl* 2012;2:1-138.
13. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-R12.
14. Levey AS, Coresh J, Tighiouart H, et al. Measured and estimated glomerular filtration rate: current status and future directions. *Nature Rev Nephrol* 2020;16:51-64.
15. Pottel H, Bjork J, Courbebaisse M, et al. Development and validation of a modified full age spectrum creatinine-based equation to estimate glomerular filtration rate: a cross-sectional analysis of pooled data. *Ann Intern Med* 2020;174:183-91.
16. Levey AS, Tighiouart H, Inker LA. Improving glomerular

- filtration rate estimation-across the age and diversity spectrum. *Ann Intern Med* 2021;174:265-7.
17. Buchkremer F, Segerer S. Estimating glomerular filtration rate: a systematic comparison of the new European Kidney Function Consortium equation with the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation. *Clin Kidney J* 2020;14:448-50.
 18. Waikar SS, Bonventre JV. Creatinine kinetics and the definition of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:672-9.
 19. Kashani K, Cheungpasitporn W, Ronco C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1074-89.
 20. Hall AM, Crawford C, Unwin RJ, et al. Multiphoton imaging of the functioning kidney. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1297-304.
 21. Schneider AG, Molitoris BA. Real-time glomerular filtration rate: improving sensitivity, accuracy and prognostic value in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 2020;26:549-55.
 22. Schaeffner ES, Ebert N, Delanaye P, et al. Two novel equations to estimate kidney function in person aged 70 years or older. *Ann Intern Med* 2012;157:471-81.
 23. Alper AB, Yi Y, Rahman M, et al. Performance of estimated glomerular filtration rate prediction equations in preeclamptic patients. *Am J Perinatol* 2010;28:425-30.
 24. Wiles K, Chappell L, Clark K, et al. Clinical practice guideline on pregnancy and renal disease. *BMC Nephrol* 2019;20:401-43.
 25. Isnard Bagnis C, Pieroni L, Inaoui R, et al. Impact of lean mass and bone density on glomerular filtration rate estimation in people living with HIV/AIDS. *PLoS One* 2017;12:e0186410.
 26. Guebre-Egziabher F, Brunelle C, Thomas J, et al. Estimated glomerular filtration rate bias in participants with severe obesity regardless of deindexation. *Obesity (Silver Spring)* 2019;27:2011-7.
 27. Asrani SK, Jennings LW, Trotter JF, et al. A Model for glomerular filtration rate assessment in liver disease (GRAIL) in the presence of renal dysfunction. *Hepatology* 2019;69:1219-30.
 28. Tsang C, Akbari A, Frechette D, et al. Accurate determination of glomerular filtration rate in adults for carboplatin dosing: Moving beyond Cockcroft and Gault. *J Oncol Pharm Practice* 2021;27:368-75.
 29. Janowitz T, Williams EH, Marshall A, et al. New model for estimating glomerular filtration rate in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2017;35:2798-805.
 30. Imai E, Horio M, Nitta K, et al. Estimation of glomerular filtration rate by the MDRD study equation modified for Japanese patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2007;11:41-50.
 31. Liu X, Gan X, Chen J, et al. A new modified CKD-EPI equation for Chinese patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2014;9:e109743.
 32. Stevens LA, Claybon MA, Schmid CH, et al. Evaluation of the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation for estimating the glomerular filtration rate in multiple ethnicities. *Kidney Int* 2011;79:555-62.
 33. Vyas DA, Eisenstein LG, Jones DS. Hidden in plain sight - reconsidering the use of race correction in clinical algorithms. *N Engl J Med* 2020;383:874-82.
 34. <https://www.kidney.org/newsletter/nkf-and-asn-form-joint-task-force-to-focus-use-race-egfr> (ultimo accesso: aprile 2021).
 35. Gambaro G, Yabarek T, Graziani MS, et al. Prevalence of CKD in northeastern Italy: results of the INCIPE study and comparison with NHANES. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1946-53.
 36. Delanaye P, Jager KJ, Bökenkamp A, et al. CKD: a call for an age-adapted definition. *J Am Soc Nephrol* 2019;30:1785-805.
 37. Tangri N, Stevens LA, Griffith J, et al. A predictive model for progression of chronic kidney disease to kidney failure. *JAMA* 2011;305:1553-9.
 38. Duggal V, Thomas IC, Montez-Rath ME, et al. National estimates of CKD prevalence and potential impact of estimating glomerular filtration rate without race. *J Am Soc Nephrol* 2021 doi: 10.1681/ASN.2020121780.
 39. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-evaluation-pharmacokinetics-medicinal-products-patients-decreased-renal-function_en.pdf (ultimo accesso: maggio 2021).
 40. Peters BJ, Rule AD, Kashani KB, et al. Impact of serum cystatin c-based glomerular filtration rate estimates on drug dose selection in hospitalized patients. *Pharmacotherapy* 2018;38:1068-73.

Proteinuria nel COVID-19: l'importanza di un esame consolidato in una patologia complessa

Patrizia Natali, Tommaso Trenti

Dipartimento Interaziendale Integrato di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica – Azienda USL e Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Modena

Parole chiave: danno renale acuto, proteinuria, SARS-CoV-2

Caro Editore,

Il virus SARS-CoV2 (grave sindrome respiratoria acuta da Coronavirus 2) provoca una patologia conosciuta come COVID-19 (acronimo dell'inglese CoronaVirus Disease 19 o malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2) che si contraddistingue, dal punto di vista clinico, prevalentemente per le sue manifestazioni respiratorie. COVID-19 è caratterizzata da un ampio spettro di sintomi clinici o sub-clinici che dall'infezione asintomatica o da lieve malattia delle vie aeree superiori, arrivano alla polmonite grave con insufficienza respiratoria fino all'*exitus*. Il virus, tuttavia non si limita a colpire l'apparato respiratorio, ma può causare gravi complicazioni in altri distretti provocando sindromi tromboemboliche, coagulopatie, lesioni cardiache acute, sintomi neurologici e non ultimo un coinvolgimento renale (1).

Fin dai primi studi condotti in Wuhan è descritta la presenza di proteinuria ed ematuria in pazienti affetti da SARS-CoV2 suggerendo uno specifico danno a carico del rene provocato dal virus (1). Benché il danno renale acuto sia un evento raro (<5%) (2) se riferito all'intera popolazione che ha contratto l'infezione, questa complicità aumenta considerevolmente nei pazienti ricoverati in terapia intensiva fino a raggiungere il 65% (3). In una revisione sistematica su 20 coorti di pazienti affetti da COVID-19, il danno renale acuto (AKI) risulta essere presente nel 17% dei pazienti studiati con un intervallo che va dallo 0,5 all'80% nei pazienti che hanno contratto l'infezione (4) e tale da richiedere in alcuni casi il trattamento emodialitico (5,6). L'incidenza di proteinuria, con o senza concomitante AKI, varia invece dal 28 all'84% (6,7).

Meccanismo fisiopatologico

Il meccanismo fisiopatologico con cui si verifica il danno renale in seguito all'infezione da SARS-CoV2 è duplice. Il primo è un effetto diretto dovuto all'attacco del virus stesso alla cellula. Il SARS-CoV-2, come noto, penetra nell'organismo attraverso il legame della proteina spike con il recettore cellulare angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). È da rilevare come il recettore ACE2 non sia espresso soltanto sulla membrana cellulare degli pneumociti ma sia quasi ubiquitario, essendo stato isolato sulla mucosa orale e nasale, faringea, nell'intero tratto gastrointestinale, nei linfonodi, timo, midollo osseo, milza, fegato, reni, cervello, vasi e cuore. In particolare il recettore ACE2 è espresso a livello renale in sede apicale nelle cellule tubulari prossimali e, in minor misura, sulla superficie dei podociti (8,9).

Il secondo meccanismo di danno renale è un effetto indiretto dovuto alla tempesta citochinica che causa una grave reazione infiammatoria sistemica che può avere ripercussioni, oltre che in sede polmonare, anche a livello renale. Nelle autopsie dei pazienti deceduti di COVID-19 si sono evidenziati infiltrati infiammatori a livello del rene, segni di attivazione della cascata del complemento e un importante danno endoteliale, lesioni queste potenzialmente riconducibili all'azione delle citochine pro-infiammatorie presenti in circolo. Questi mediatori circolanti possono, però, danneggiare il rene anche indirettamente attraverso lo sviluppo di patologie riconducibili a ipossia, shock e rhabdmiolisi (9,10).

Alla microscopia ottica i campioni analizzati presentano necrosi tubulare acuta prossimale di vario grado, caratterizzata da perdita dell'orletto a spazzola e da degenerazione vacuolare. Si osservano inoltre particelle virali nel citoplasma delle cellule tubulari prossimali e dei podociti, mentre sono meno evidenti a livello delle cellule tubulari distali (6,8,9).

Corrispondenza a: Patrizia Natali, Ospedale Civile di Baggiovara (MO), Via P. Giardini, 1355, 41126 Modena (MO), Tel +39 347 4330775, E-mail p.natali@ausl.mo.it

Ricevuto: 10.05.2021

Revisionato: 07.06.2021

Accettato: 08.06.2021

Pubblicato on-line: 01.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.050

Il ruolo della proteinuria

Se è noto come proteine nelle urine si riscontrino più spesso nei pazienti con pregresso AKI (6), una proteinuria, talora di basso grado non necessariamente associata ad aumento della creatinina sierica e/o diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare, può essere rilevata anche in pazienti senza storia di danno renale quale sintomo di un coinvolgimento subclinico del rene che può condurre ad un'evoluzione verso AKI. In alcuni pazienti ospedalizzati senza pregresse patologie renali, la proteinuria può avere un carattere transitorio e risolversi nel giro di pochi giorni a seguito della guarigione senza particolari conseguenze (8,11). Pazienti caratterizzati da un'elevata proteinuria, tuttavia, presentano un aumentato rischio di sviluppare una patologia renale grave con il conseguente ricovero in terapia intensiva e una maggiore durata dell'ospedalizzazione (Figura 1). La proteinuria assume quindi un ruolo prognostico ed è un indicatore indipendente di progressione di malattia (10). Pur rimanendo l'insufficienza respiratoria la prima causa di morte dei pazienti COVID-19, una proteinuria di nuovo riscontro si associa ad un aumento della probabilità di morte fino a 9 volte superiore rispetto a quella nei pazienti senza proteinuria (Figura 2) (6,12).

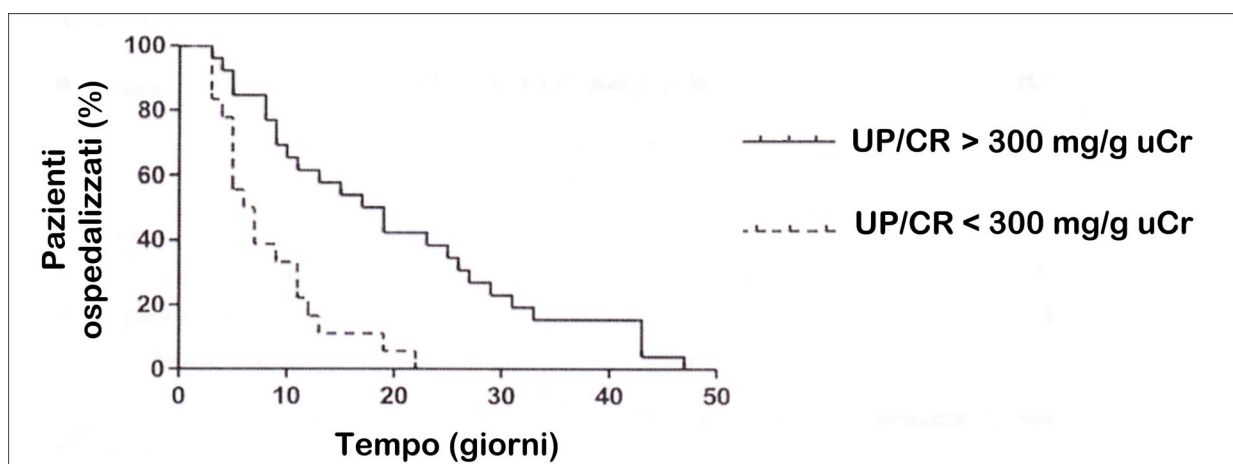


Figura 1

Effetti della proteinuria in pazienti COVID-19 ospedalizzati. Con rapporto Proteine Totali/Creatinina (UP/CR) >300 mg/g di creatinina è più elevato il rischio di un allungamento dei giorni di degenza e ricorso alla terapia intensiva rispetto a UP/CR <300 mg/g di creatinina (analisi di Kaplan-Meier, $p=0,0002$). Adattato da Ouahmi H, et al. *Front Physiol*, 2021 (10).

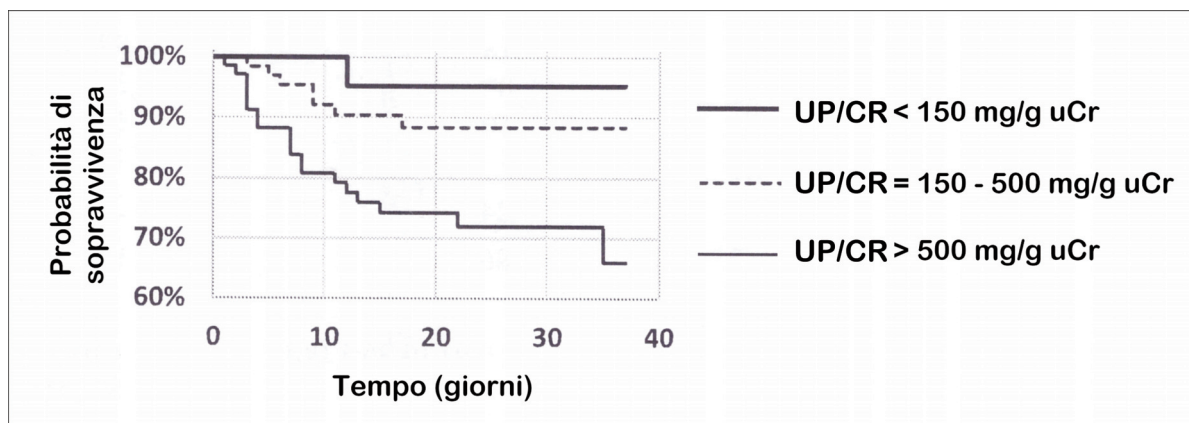


Figura 2

Effetti della proteinuria in pazienti COVID-19 ospedalizzati. All'aumento del rapporto Proteine Totali/Creatinina (UP/CR) UP/CR corrisponde un minor numero di giorni di sopravvivenza (test dei ranghi logaritmici, $p=0,008$). Adattato da Huart J, et al. *J Nephrol*, 2021 (12).

La proteinuria è il risultato del bilanciamento tra la permeabilità della membrana glomerulare e la capacità di riassorbimento dell'epitelio del tubulo prossimale. In condizioni fisiologiche proteine di basso peso molecolare quali alfa1-microglobulina, beta2-microglobulina, proteina legante il retinolo e in parte, anche proteine a medio peso molecolare come albumina, una volta superata la barriera glomerulare sono completamente riassorbite dal

tubulo prossimale. Nel danno glomerulare si ritrovano nelle urine prevalentemente proteine di medio/alto peso molecolare, mentre nel danno tubulare sono maggiormente presenti proteine a basso peso (6,9).

A seguito della necrosi tubulare acuta indotta da SARS-CoV2, le proteinurie, anche elevate, sono costituite da un insieme di proteine tipiche del danno tubulare caratterizzate da ridotta quantità di albumina. Un rapporto albuminuria/proteinuria >50%, tipico del danno glomerulare, si verifica solo nell'8% di pazienti che evidenziano un rapporto proteinuria/creatininuria (UP/CR) ≥ 1000 mg/g, mentre prevale la concentrazione di molecole di basso peso molecolare (8).

Molti studi osservazionali (6-8,10,12) sono stati condotti sulla proteinuria in pazienti COVID-19 con manifestazioni riconducibili ad AKI che sono tuttavia caratterizzati da una importante eterogeneità per le differenti coorti di pazienti considerate e la difformità dei metodi di misurazione della proteinuria. Diverso è misurare la proteinuria con metodiche basate su strisce reattive in chimica secca, maggiormente sensibili all'albuminuria, rispetto alla determinazione mediante metodiche colorimetriche, più spesso riservate ai pazienti ospedalizzati, in grado di rilevare uno spettro più ampio di proteine urinarie (13). Tale misurazione, infine, a seconda dei centri può essere espressa come proteinuria nelle 24 ore o come UP/CR valutata in mg/g o mg/mmol ingenerando ulteriore difficoltà e confusione nel confronto tra i dati (12). Le stesse problematiche analitiche sono presenti quando si determinino le proteine a basso peso molecolare, note biomarcatori di proteinuria tubulare. Alcuni Autori (6,12) utilizzano per questa diagnostica l'alfa1-microglobulina e/o la beta2-microglobulina urinaria, mentre altri (8) impiegano la proteina legante il retinolo urinaria, rendendo in tal modo scarsamente comparabili i risultati ottenuti nelle ricerche proposte.

Conclusioni

Dagli studi effettuati emerge come la misurazione della proteinuria, esame di base, consolidato nella pratica di laboratorio, possa rivestire un ruolo cruciale nella gestione dei pazienti COVID-19. Una proteinuria di nuovo riscontro infatti può precedere la comparsa di AKI divenendo così un indicatore prognostico negativo associato positivamente al tasso di mortalità.

Ancora una volta si conferma il ruolo determinante del laboratorio nel fornire al clinico un dato diagnostico e prognostico importante, di semplice esecuzione, poco costoso ma di grande utilità nella valutazione del paziente COVID-19.

I diversi metodi di misura della proteinuria, le modalità d'espressione dei risultati ottenuti e la scelta stessa dei marcatori di proteinuria tubulare pongono all'attenzione del laboratorista la necessità di una condivisa politica di armonizzazione di metodi, misure e procedure diagnostiche.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Cheng Y, Luo R, Wang K, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int* 2020;97:829-38.
2. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020 doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
3. Fanelli V, Fiorentino M, Cantaluppi V, et al. Acute kidney injury in SARS-CoV-2 infected patients. *Critical Care* 2020 doi: 10.1186/s13054-020-02872-z.
4. Robbins-Juarez SY, Qian L, King KL, et al. Outcomes for Patients With COVID-19 and Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Kidney Int Reports* 2020 doi: 10.1016/j.ekir.2020.06.013.
5. Farouk SS, Fiaccadori E, Cravedi P, et al. COVID-19 and the kidney: what we think we know so far and what we don't. *J Nephrol* 2020 doi: 10.1007/s40620-020-00789-y.
6. Mohamed MMB, Velez JCQ. Proteinuria in COVID-19. *Clin Kidney J.* 2021;14(Supplement_1):i40-7 doi: 10.1093/ckj/sfab036.
7. Chaudhri I, Moffitt R, Taub E, et al. Association of Proteinuria and Hematuria with Acute Kidney Injury and Mortality in Hospitalized Patients with COVID-19. *Kidney Blood Press Res* 2020 doi: 10.1159/000511946.
8. Karras A, Livrozet M, Lazareth H, et al. Proteinuria and Clinical Outcomes in Hospitalized COVID-19 Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2021;16:514-21.
9. Tsalouchos A, Salvadori M. Nefropatia associata al SARS-CoV-2: cosa sappiamo finora. *GCND* 2020;32:102-6.
10. Ouahmi H, Courjon J, Morand L, et al. Proteinuria as a biomarker for COVID-19 severity. *Front Physiol* 2021;12:1-8.
11. Pei G, Zhang Z, Peng J, et al. Renal involvement and early prognosis in patients with COVID-19 pneumonia *J Am Soc Nephrol* 2020 doi: 10.1681/ASN.2020030276.
12. Huart J, Bouquegneau A, Lutteri L, et al. Proteinuria in COVID-19: prevalence, characterization and prognostic role. *J Nephrol* 2021;34:355-64.
13. Résimont G, Piéroni L, Bigot-Corbel E, et al. Urinary strips for protein assays: easy to do but difficult to interpret! *J Nephrol* 2021 doi: 10.1681/ASN.2020030276.

Una nuova equazione dell'European Kidney Function Consortium per la stima della filtrazione glomerulare: implicazioni cliniche delle scelte del laboratorio

Daide Giavarina¹, Faeq Husain-Syed², Claudio Ronco^{3,4}

¹Medicina di Laboratorio, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza, Italia

²Dipartimento di Medicina Interna II, Università ospedale di Giessen, Justus Liebig University Giessen, Germania

³Istituto Internazionale di Ricerca Renale (IRRIV) di Vicenza, Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza, Italia

⁴Università di Padova, Dipartimento di Medicina (DIMED), Padova, Italia

Parole chiave: velocità di filtrazione glomerulare, funzione renale, formule per la stima della GFR

Caro Editore,

La velocità di filtrazione glomerulare (Glomerular Filtration Rate - GFR) è a tutt'oggi considerata il miglior indice di funzionalità renale ed è anche un indicatore prognostico indipendente di insufficienza renale e cardiaca, nonché di morte per ogni causa (1,2). La GFR può essere misurata attraverso la clearance urinaria di marcatori esogeni di filtrazione, come l'inulina, l'iotalamato, l'acido dietilentriamminopentacetico (DTPA) o l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) (3). Purtroppo, tali procedure sono costose e complicate da eseguire. La GFR può anche essere stimata dalla clearance urinaria di marcatori endogeni, come la creatinina o la cistatina C. La determinazione della creatinina è un esame veramente poco costoso, disponibile ovunque in pochi minuti. Tuttavia, ci sono due errori principali che possono limitare l'esattezza della misura della creatinina: un'accurata raccolta di urina e l'aumento della sua secrezione tubulare quando la GFR diminuisce (4). Questi due fattori, associati alla scomodità e perdita di tempo per una raccolta urine di 24 ore, hanno spinto la comunità scientifica a ricercare formule semplici ed accurate, che permettessero di stimare la GFR dalla sola concentrazione sierica/plasmatica di creatinina, assieme a parametri facilmente reperibili come l'età, il genere, le etnie.

Le prime equazioni proposte necessitavano anche di qualche misura antropometrica, in particolare del peso, come nel caso della molto nota e diffusa formula di Cockcroft-Gault (5). Questa formula in particolare non stimava la GRF, come le successive, ma solo la clearance della creatinina, quindi era una stima di una stima della GFR.

Per evitare la complicazione della misura del peso e diffondere l'uso della stima della GFR (eGFR), nel 1999 il National Kidney Disease Education Program (NKDEP) raccomandò per la prima volta di fornire la eGFR utilizzando l'equazione dello studio Modified Diet for Renal Disease (MDRD) in ogni referto di laboratorio e per ogni misura di creatinina sierica/plasmatica (6). Nel 2002 le linee guida della Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K-DOQI) proposero l'uso di una forma semplificata della formula MDRD per la classificazione dell'insufficienza renale cronica (Chronic Kidney Disease - CKD) (7).

La formula MDRD si è quindi rapidamente diffusa e la refertazione della eGFR è divenuta negli anni sempre più comune. Tuttavia, la formula MDRD presentava alcune limitazioni. Ad esempio, essa sottostima la reale GFR per valori tra 60 e 120 mL/min/1,73m², per cui veniva da più parti raccomandato di refertare solamente ≥ 60 mL/min/1,73m², per ogni valore maggiore di 60. Ciò rappresenta una importante limitazione per i programmi di screening, perché non consente di valutare i primi livelli di insufficienza renale, quelli con eGFR in diminuzione, da 90 a 60 mL/min/1,73m².

Nel 2009, la Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) propose e convalidò una nuova equazione, che mostrava uno scostamento minore, un'augmentata precisione e una maggiore accuratezza rispetto alla formula MDRD (8). La formula era sviluppata su un numero molto elevato di studi con GFR misurata attraverso marcatori di filtrazione esogeni ed in un ampio spettro di età e di condizioni fisio-patologiche. Inoltre, i valori di creatinina di tali studi furono ricalcolati verso una misura standardizzata della creatinina (9).

Le stime ottenute con l'equazione CKD-EPI hanno da subito dimostrato di essere più esatte di quelle ottenute con MDRD, anche per valori di GFR >60 mL/min/1,73m², e per età anche avanzate.

Corrispondenza a: Davide Giavarina, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Berica, Via Rodolfi, 37 - 36100 Vicenza, Italia, Tel 0444 753254 - 333 3929539, E-mail davide.giavarina@aulss8.veneto.it

Ricevuto: 15.05.2021

Revisionato: 07.06.2021

Accettato: 08.06.2021

Pubblicato on-line: 08.07.2021

DOI:10.19186/BC_2021.052

Tabella 1

Percentili (p) di GFR stimata (eGFR) calcolati su una popolazione ambulatoriale di 38 188 soggetti consecutivi non ricoverati, afferenti con una richiesta di determinazione di creatinina plasmatica per qualsiasi motivo. I dati sono rappresentati per gruppi di età, calcolati con le equazioni MDRD, CKD-EPI, EKFC. La eGFR è espressa in mL/min/1,73m²

Età (anni)	18-30			31-40			41-50		
Formula	MDRD	CKD-EPI	EKFC	MDRD	CKD-EPI	EKFC	MDRD	CKD-EPI	EKFC
	N 4 606			N 6 345			N 7 635		
Minimo	3	3	4	3	3	3	3	3	3
2,5p	70	81	75	62	71	71	57	64	64
5p	76	88	80	68	78	78	64	72	72
10p	81	94	86	75	86	85	70	79	79
25p	91	105	95	84	97	95	79	89	88
Mediana	102	118	106	94	109	106	89	101	99
75p	116	125	111	107	115	111	100	107	105
90p	133	131	115	122	121	115	112	111	109
95p	147	134	119	133	124	118	121	114	111
97,5p	162	139	122	146	128	121	131	117	114
Massimo	566	213	174	409	172	161	515	189	164
Età (anni)	51-60			61-70			71-75		
Formula	MDRD	CKD-EPI	EKFC	MDRD	CKD-EPI	EKFC	MDRD	CKD-EPI	EKFC
	N 7 422			N 8 683			N 3 427		
Minimo	3	3	3	3	3	3	4	3	4
2,5p	47	51	50	35	36	35	27	27	26
5p	57	62	61	47	49	47	39	39	37
10p	65	70	68	56	59	55	48	49	46
25p	74	81	78	67	71	67	61	63	58
Mediana	84	93	89	79	84	78	74	76	70
75p	96	100	95	91	92	85	87	87	79
90p	108	104	98	103	96	89	99	91	82
95p	117	107	101	112	99	91	107	93	83
97,5p	130	110	103	122	102	93	115	95	85
Massimo	369	148	138	477	163	134	246	117	104

MDRD, Modified Diet for Renal Disease; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; EKFC, European Kidney Function Consortium.

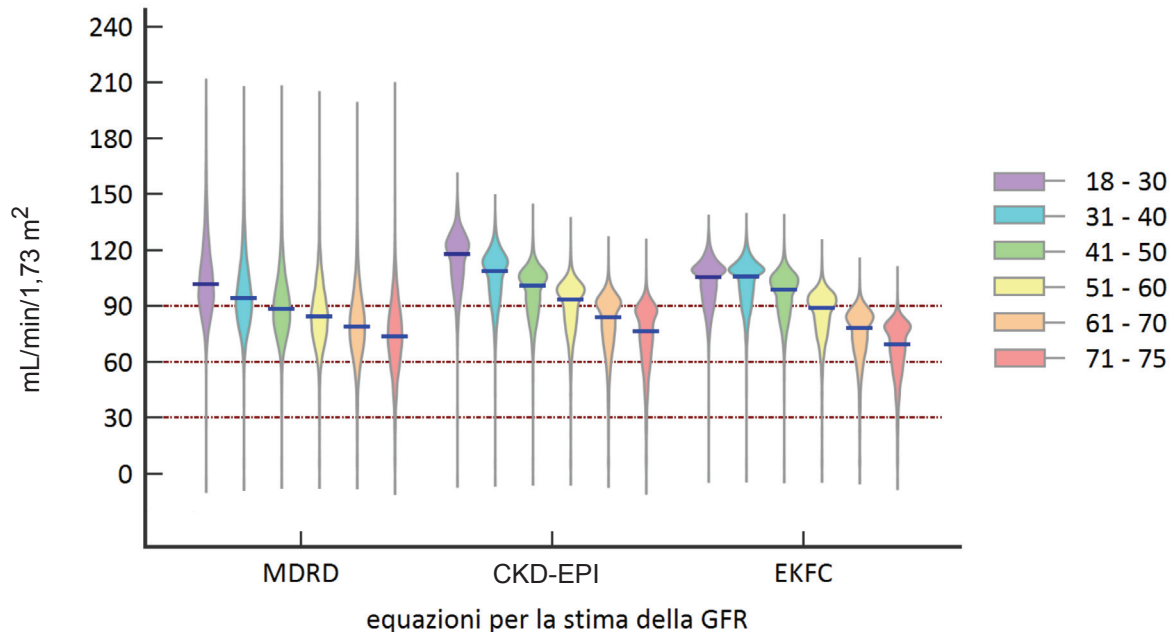


Figura 1

Grafico a violino delle distribuzioni di eGFR per classi di età, calcolate su una popolazione complessiva di 38 188 pazienti esterni consecutivi, con le equazioni MDRD, CKD-EPI, EKFC.

MDRD, Modified Diet for Renal Disease; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; EKFC, European Kidney Function Consortium.

Il processo di sostituzione della equazione MDRD con l'equazione CKD-EPI è stato tuttavia lento e non ancora del tutto compiuto. A distanza di anni, la formula MDRD trova ancora oggi qualche applicazione, anche se la migliore esattezza della CKD-EPI è ormai fuori discussione.

L'equazione CKD-EPI non può però stimare la GFR nelle età giovanili e nell'infanzia si raccomanda l'utilizzo di equazioni specifiche, come ad esempio la formula del Chronic Kidney Disease in Children Study (CKiD), calcolata però solo su soggetti da 1 a 16 anni con CKD e che necessita della variabile peso corporeo (10). Altre formule hanno tentato di "coprire" queste fasce di età per dare continuità alle stime (11,12).

Molto recentemente, l'European Kidney Function Consortium (EKFC) ha sviluppato una nuova formula con l'obiettivo di mettere assieme le potenzialità di stima della CKiD e della CKD-EPI (13).

Questa nuova equazione parrebbe migliorare ulteriormente l'esattezza della stima della GFR e soprattutto consentire continuità di valutazione durante la transizione tra l'età adolescenziale e l'età adulta. L'introduzione di una nuova formula potrebbe tuttavia determinare un altro lungo periodo di transizione e il proliferare di eGFR stimate con più equazioni diverse.

Abbiamo avuto in passato la possibilità di confrontare su oltre 38 000 soggetti consecutivi le differenze tra l'equazione MDRD e CKD-EPI (14), in soggetti adulti, e recentemente di ripetere lo stesso confronto sulla stessa popolazione anche tra CKD-EPI e EKFC (15). La Tabella 1 riassume le differenze, confrontando i diversi percentili in riferimento a gruppi di età crescenti.

La nostra valutazione "nel mondo reale" conferma una marcata differenza tra MDRD e le due formule successive, che invece sono abbastanza ravvicinate tra loro nelle stime (Figura 1). Tuttavia, con quest'ultima formula EKFC si osserva uno scostamento significativo nella classificazione dei pazienti, in particolare per gli stadi di CKD 1-2 e 2-3. Nella popolazione studiata il 19,6% dei partecipanti con una eGFR ≥ 90 mL/min/1,73 m² (corrispondente alla CKD allo stadio 1) utilizzando l'equazione CKD-EPI, aveva valori eGFR di 60-90 mL/min/1,73 m² utilizzando l'equazione EKFC (corrispondente allo stadio 2 CKD). Inoltre, il 4,8% dei partecipanti con valori di eGFR di 60-89 mL/min/1,73 m² utilizzando l'equazione CKD-EPI, aveva valori eGFR di 30-59 mL/min/1,73 m² (corrispondenti alla CKD allo stadio 3) utilizzando l'equazione EKFC.

Questi dati indicano che una percentuale significativa di pazienti potrebbe essere riclassificata al ribasso dall'EKFC rispetto all'equazione CKD-EPI, a parità di valori di creatinina sierica/plasmatica, età e sesso. Di conseguenza, occorre essere consapevoli che qualsiasi sostituzione dell'equazione EKFC può comportare un periodo di cambiamenti non plausibili nell'eGFR durante il passaggio dalla precedente alla nuova equazione.

I nostri dati si riferiscono a una popolazione italiana non selezionata senza alcuna informazione relativa all'etnia.

Tuttavia, considerando che circa il 15% della popolazione del Nord Italia proviene dall'Africa e dall'Asia, è probabile che i nostri risultati riflettano l'applicazione nel mondo reale dell'equazione EKFC in Italia e in Europa. In particolare, la popolazione di sviluppo EKFC includeva solo partecipanti europei bianchi, il che limita la sua generalizzazione a popolazioni etniche diverse (16).

In sintesi, la nuova equazione EKFC è associata a vari aspetti di novità e miglioramento. Il vantaggio concettuale dell'utilizzo di un'unica equazione per tutte le età è ovvio e potrebbe eliminare la discontinuità nell'eGFR stimata durante il passaggio dall'adolescenza all'età adulta e la sovrastima del GFR nei giovani adulti. Tuttavia, può essere importante promuovere una comprensione dei suoi punti di forza e dei suoi limiti tra i clinici poiché una percentuale significativa di pazienti potrebbe essere riclassificata verso il basso dall'EKFC rispetto all'equazione CKD-EPI. Inoltre, potrebbe essere necessaria una forte operazione di divulgazione per facilitare un rapido cambiamento e armonizzazione tra i laboratori al fine di evitare il peggioramento delle attuali stime del GFR. Infine, sono necessari dati sulle prestazioni dell'equazione EKFC in diverse popolazioni etniche per consentirne un'applicazione diffusa.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010;375(9731):2073-81.
2. Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, et al. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;80:93-104.
3. Lamb E. Assessment of kidney function in adults. *Medicine* 2007;35:359-64.
4. Bazari H. Approach to the patient with renal disease; in: Goldman L, Ausiello D (eds). *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007, chap 115.
5. Drinka PJ, Langer E. The Cockcroft-Gault formula. *J Am Geriatr Soc* 1989;37:820.
6. 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 Intern Med* 1999;130:461-70.
7. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation classification, and stratification. *Kidney Disease Outcome Quality Initiative*. *Am J Kidney Dis* 2002;39:1-246.
8. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration): A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-32.
9. Myers GL, Miller WG, Coresh J, et al. National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem* 2006;52:5-18.
10. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:629-37.
11. Hoste L, Dubourg L, Selistre L, et al. A new equation to estimate the glomerular filtration rate in children, adolescents and young adults. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:1082-91.
12. Pottel H, Hoste L, Dubourg L, et al. An estimated glomerular filtration rate equation for the full age spectrum. *Nephrol Dial Transplant* 2016;31:798-806.
13. Pottel H, Bjork J, Courbebaisse M, et al. Development and validation of a modified full age spectrum creatinine-based equation to estimate glomerular filtration rate: a cross-sectional analysis of pooled data. *Ann Intern Med* 2021;174:183-91.
14. Giavarina D, Cruz DN, Soffiati G, et al. Comparison of estimated glomerular filtration rate (eGFR) using the MDRD and CKD-EPI equations for CKD screening in a large population. *Clin Nephrol* 2010;74:358-63.
15. Giavarina D, Husain-Syed F, Ronco C. Clinical implications of the new equation to estimate glomerular filtration rate. *Nephron* 2021, in press.
16. Levey AS, Tighiouart H, Inker LA. Improving glomerular filtration rate estimation-across the age and diversity spectrum. *Ann Intern Med* 2021;174:265-7.

Utilizzo della differenza critica per una corretta interpretazione dei valori di creatinina sierica

Anna Carobene¹, Matteo Vidali²

¹IRCCS Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele, Milano

²Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Parole chiave: creatinina, variabilità biologica, differenza critica

Caro Editore,

Abbiamo letto con molto interesse il contributo "Valutazione della filtrazione glomerulare: riflessione sull'impiego clinico" di Gambaro G (1). In esso, l'autore richiama l'attenzione sul corretto utilizzo e interpretazione dei valori di creatininemia, un concetto estremamente importante e, a nostro parere, non ancora sufficientemente compreso. La creatinina è stata spesso considerata un marcatore poco sensibile di perdita di funzionalità renale. Se in parte questo è dovuto ad una risposta ipercompensatoria dei nefroni residui nelle prime fasi della malattia renale, l'Autore, riprendendo il lavoro di Spanaus, et al. (2), ci ricorda che il cosiddetto "creatinine-blind range" è in realtà una falsa percezione, dovuta all'interpretazione dicotomica della creatinina (entro o fuori l'intervallo di riferimento), piuttosto che al suo utilizzo come variabile continua (1).

Lo scopo di questo contributo è reinterpretare l'osservazione di Gambaro G, entro la cornice della Medicina di Laboratorio, secondo i concetti di variabilità biologica, individualità e differenza critica.

Per un certo numero di parametri fisiologici è applicabile il cosiddetto "modello omeostatico", secondo il quale la concentrazione plasmatica di un determinato componente non è fissa ma oscilla intorno ad un valore centrale, o punto omeostatico, che generalmente rappresenta la condizione più vantaggiosa per l'organismo. Questa fluttuazione casuale che varia da individuo a individuo, è definita come variabilità biologica (VB) intra-individuale e viene espressa in termini di coefficiente di variazione % (CV_i). La variabilità tra punti omeostatici dei differenti organismi è definita, invece, variabilità biologica inter-individuale (CV_G). Al pari del CV_i, anche il CV_G varia a seconda del componente. Quando la variazione di concentrazione di un misurando intra-individuale è piccola se confrontata alla variazione dello stesso misurando tra individui diversi (CV_i << CV_G), si dice che quel componente presenta una marcata individualità. In termini statistici questo concetto può essere espresso dall'indice di individualità (II) che, secondo la formulazione originale di Harris (3), è uguale a

$$II = [CV_A^2 + CV_i^2]^{1/2} / CV_G$$

dove CV_A, CV_i e CV_G indicano rispettivamente il coefficiente di variazione analitico, intra- e interindividuale. L'II, qualora CV_A < CV_i (cioè per i metodi per i quali la variabilità analitica è piccola rispetto alla VB intra-individuale) può essere semplificato in II = CV_i/CV_G. Come è facile verificare, II piccoli corrispondono a componenti caratterizzati da marcata individualità (le VB degli individui occupano solo una piccola parte dell'intervallo di riferimento); viceversa II grandi corrispondono a componenti caratterizzati da bassa individualità, per i quali, a differenza dei primi, le VB dei singoli individui occupano buona parte dell'intervallo di riferimento. Come osservato originariamente da Harris, per misurandi con II < 0,6 (come la creatinina) l'uso degli intervalli di riferimento è di scarsa utilità per decidere se una variazione rispetto ad un risultato precedente è o meno clinicamente o statisticamente significativa.

Infatti, ad eccezione di quegli individui che hanno punti omeostatici in prossimità dei limiti dell'intervallo di riferimento, una grande variazione rispetto ad un valore precedente potrebbe comunque fornire un risultato entro i limiti dell'intervallo di riferimento e non esitare, quindi, in ulteriori accertamenti diagnostici o trattamenti. Per questi componenti, è più utile il confronto dei valori serati dell'individuo. A tal fine è conveniente introdurre il concetto di differenza critica (DC), che indica, per un determinato livello di probabilità prescelto, la differenza massima tra due risultati attribuibile alla variabilità totale.

Corrispondenza a: Anna Carobene, servizio Medicina di Laboratorio, IRCCS Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano
Tel +39 02 26432850, E-mail carobene.anna@hsr.it

Ricevuto: 12.06.2021

Revisionato: 21.06.2021

Accettato: 22.06.2021

Pubblicato on-line: 13.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.057

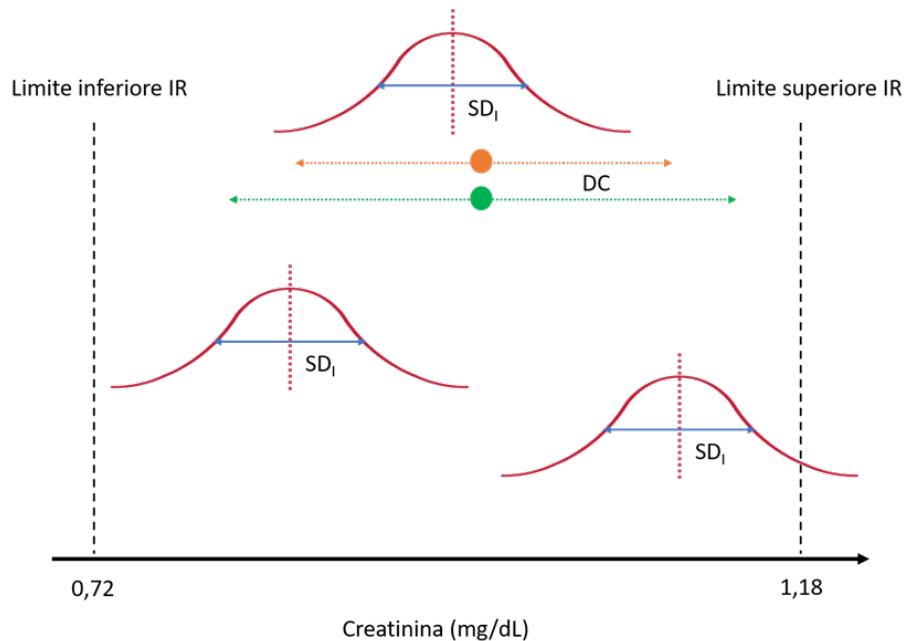


Figura 1

Esemplificazione dei concetti di variabilità biologica (VB) e differenza critica (DC) per la creatinina con i dati EuBIVAS. Le linee nere verticali tratteggiate ai lati della figura indicano l'intervallo di riferimento della creatinina (intervallo di riferimento per maschi in uso presso il laboratorio degli autori). Le curve gaussiane indicano la VB di tre soggetti (espressa in deviazione standard SD_1); la media delle curve gaussiane (linea verticale tratteggiata in rosso) rappresenta il punto omeostatico del soggetto. I due cerchi arancio e verde sotto la curva gaussiana in alto rappresentano una precedente determinazione di creatinina; le due linee colorate orizzontali ai lati dei cerchi indicano i limiti della differenza critica per il metodo enzimatico (arancione) e Jaffe (verde), calcolata con i dati EuBIVAS ($CV_I=4,5\%$, CV_A metodo enzimatico = $1,1\%$, CV_A metodo Jaffe = $4,4\%$).

Se per la variabilità totale di ogni risultato,

$$CV_T = (CV_P^2 + CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

la CV_P (variabilità pre-analitica) è minimizzata, la differenza critica risulta uguale a

$$DC = 2^{1/2} \times Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

Per un livello di probabilità pari al 95%, Z è uguale a 1,96, per cui

$$DC = 2,77 \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

Solo differenze tra due risultati maggiori della DC possono essere attribuite a variazioni delle condizioni di salute dell'individuo o a effetto di trattamenti medici. Riarrangiando la formula e calcolando

$$Z = \text{delta} / [2^{1/2} \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}]$$

con delta uguale alla differenza tra due risultati, è possibile inoltre calcolare la probabilità che una certa variazione tra due risultati sia significativa (il valore di Z ottenuto deve essere cercato nelle tabelle della relativa distribuzione gaussiana).

L'utilità della DC come ausilio diagnostico dipende strettamente dalla solidità e dall'accuratezza dei dati di VB.

A questo proposito, a seguito di alcune recenti pubblicazioni (4) che evidenziarono alcuni limiti della "storica" base di dati di VB, disponibile sul sito di Westgard (5), la European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) ha avviato due importanti progetti:

- il progetto EuBIVAS (European Biological Variation Study), uno studio sperimentale multicentrico al fine di ottenere dati affidabili di VB per un gran numero di misurandi (6);
- il progetto di una nuova base di dati di VB, che nel calcolo delle stime generali di VB riportate sul database, tenesse conto della qualità (affidabilità) dei singoli dati delle pubblicazioni scientifiche utilizzati nel calcolo, tramite un approccio di meta-analisi (7).

Come si evince dalla rassegna della letteratura di recente pubblicazione dei valori di VB per i misurandi correlati alla funzionalità renale (8), EuBIVAS ha contribuito nella ridefinizione delle nuove stime di VB, pubblicate nel sito della EFLM, con un peso proporzionale alla carenza di pubblicazioni di qualità per quello specifico misurando.

Relativamente alla creatinina sierica e alla cistatina C, le pubblicazioni considerate dalla rassegna di Jonker, et al. sono state rispettivamente 49 e 11, e per entrambi i misurandi le stime di VB ottenute dal progetto EuBIVAS sono state considerate di grado di qualità superiore rispetto alle altre, quindi con un peso più importante nel calcolo di meta-analisi (9,10). Come conseguenza, le nuove stime di CV_I basate sulla meta-analisi riportate nel sito della EFLM sono le seguenti: CV_I creatinina: 4,5% (4,4-5,7); CV_I cistatina C: 4,0% (3,9-8,6), entrambe molto vicine ai valori ottenuti da EuBIVAS [(CV_I Creatinina, metodo enzimatico 4,4% (4,2-4,7), metodo Jaffe 4,7% (4,4-5,1); CV_I cistatina C, 3,9% (3,6-4,1)] (9,10).

Ritornando al concetto di DC, è importante sottolineare che la formula include il valore di variabilità analitica, CV_A . Nel calcolare i valori di DC è quindi necessario considerare il CV_A del proprio laboratorio che dipenderà sia dalla strumentazione utilizzata, sia dal reattivo/principio analitico in uso (4).

Come esempio possiamo considerare due misure consecutive di creatinina sierica prendendo i valori di CV_A e di CV_I dello studio EuBIVAS: CV_A metodo enzimatico = 1,1%, e CV_A metodo Jaffe = 4,4% (9). Con un CV_I pari a 4,5%, le DC per il metodo enzimatico e per Jaffe saranno, rispettivamente, pari a 12,8% e 17,4%.

I concetti sopra esposti di VB e DC, utilizzando i dati EuBIVAS, sono esemplificati in Figura 1.

La differenza di CV_A tra i due metodi, come noto da anni, è dovuta alla scarsa specificità analitica dei metodi basati sulla reazione con picrato alcalino, aspecificità analitica che con i metodi enzimatici è largamente eliminata (11). Purtroppo, anche se la superiorità dei metodi enzimatici è stata chiaramente dimostrata, la maggior parte dei laboratori italiani utilizza ancora il metodo Jaffe (12).

Refertare la differenza critica per la creatinina plasmatica e cistatina C rappresenterebbe quindi un valido supporto nella interpretazione della significatività delle differenze tra risultati di misure consecutive anche per valori nei limiti dell'intervallo di riferimento.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Gambaro G. Valutazione della filtrazione glomerulare: riflessione sull'impiego clinico. *Biochim Clin* 2021;45:xxx-xxx.
2. Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, et al. Serum creatinine, cystatin c, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem* 2010;56:740-9.
3. Fraser GC. *Biological Variation: From Principles to Practice*, AACC Press 2001.
4. Carobene A. Biological variation: theoretical bases and the experience of the EFLM working groups. *La variabilità biologica: Le basi teoriche e l'esperienza dei Gruppi di Lavoro della Federazione Europea di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio*. *Biochim Clin* 2018;42:15-25.
5. Minchinela J, Ricós C, Perich C, et al. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (ultimo accesso: giugno 2021).
6. Carobene A, Aarsand AK, Bartlett WA, et al. The European Biological Variation Study (EuBIVAS): a summary report. *Clin Chem Lab Med* 2021 doi: 10.1515/cclm-2021-0370.
7. Aarsand AK, Fernandez-Calle P, Webster C, et al. The EFLM biological variation database. <https://biologicalvariation.eu/> (ultimo accesso: giugno 2021).
8. Jonker N, Aslan B, Boned B, et al. Critical appraisal and meta-analysis of biological variation estimates for kidney related analytes. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-1168.
9. Carobene A, Marino I, Coskun A, et al. The EuBIVAS project: within-and between-subject biological variation data for serum creatinine using enzymatic and alkaline picrate methods and implications for monitoring. *Clin Chem* 2017;63:1527-36.
10. Carobene A, Aarsand AK, Guerra E, et al. European biological variation study (EuBIVAS): within- and between-subject biological variation data for 15 frequently measured proteins. *Clin Chem* 2019;65:1031-41.
11. Carobene A, Ceriotti F, Infusino I, et al. Evaluation of the impact of standardization process on the quality of serum creatinine determination in Italian laboratories. *Clin Chim Acta* 2014;427:100-6.
12. Carobene A, Ceriotti F, Infusino I, et al. Valutazione dell'impatto del processo di standardizzazione sulla qualità della misura della creatinemia nei laboratori italiani. *Biochim Clin* 2012;36:414-24.

Remissione di iperparatiroidismo secondario dopo nefrectomia in un paziente emodializzato: ruolo di Etelcalcetide

Stefano Aterini¹, Francesca Calderini², Marco Gallo¹, Sandro Bandini¹, Santi Nigrelli¹, Daniela Sacchi¹,
Francesco Guzzi¹, Lorenzo Aterini¹, Fiamma Balboni²

¹UO Nefrologia e Dialisi - Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza - IFCA Firenze

²Laboratorio Analisi - Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza - IFCA Firenze

ABSTRACT

Secondary hyperparathyroidism remission after nephrectomy in a dialysis patient: role of Etelcalcetide.

Secondary hyperparathyroidism (HPT) is a common issue in dialysis patients; it contributes significantly to their morbidity and mortality. Here we describe the case of a hemodialysis patient with severe secondary HPT, treated with Etelcalcetide, the new intravenous calcimimetic agent, employed after a nephrectomy due to a renal neoplasm to reduce successfully the serum levels of parathyroid hormone (PTH) and bone specific alkaline phosphatase (BAP). No significant change in serum calcium was recorded during treatment, while the already high serum phosphorus concentrations further increased after surgery. By maintaining the calcium mimetic therapy, even if at lower doses, the concentrations of PTH and BAP remained constant over the time.

Parole chiave: iperparatiroidismo secondario, nefrectomia, Etelcalcetide

CASO CLINICO

Il paziente è un maschio caucasico di 61 anni, monorene destro dalla nascita, affetto da Malattia Renale Cronica (MRC) su base scleroipertensiva, in trattamento emodialitico trisettimanale presso il nostro Centro da cinque anni, 270 minuti per sessione, con tecnica HemoDialysis eXpanded (HDx).

Il paziente, che presentava livelli sierici di fosforo e di paratormone (PTH) persistentemente elevati, è stato avviato alla terapia con agenti calcimimetici, inizialmente Cinacalcet per via orale, poi Etelcalcetide per via endovenosa, aumentando progressivamente le dosi da 15 mg/settimana fino a 45 mg/settimana (Figura 1). Le concentrazioni sieriche di PTH (i.r. 15-88 ng/L) e fosforo (i.r. 2,5-4,5 mg/dL) sono sempre rimaste ben al di sopra dei valori accettabili. L'esame ecografico del collo mostrava una ghiandola paratiroidea moderatamente aumentata di volume. Durante un'ecografia addominale, eseguita 18 mesi dopo l'inizio della emodialisi, nel corso della valutazione per l'iscrizione in lista di trapianto renale, è stato rilevato un nodulo solido irregolare al polo

inferiore del rene unico destro. La successiva TAC ha confermato l'ipotesi di una lesione neoplastica, a cui è seguita la nefrectomia dopo venti giorni.

All'esame istologico è stato diagnosticato un carcinoma renale a cellule chiare, pT3a (AJCC TNM 8th ed.). Cinque giorni dopo l'intervento, gli esami ematici di routine hanno mostrato una riduzione delle concentrazioni sieriche di PTH e fosfatasi alcalina ossea (Bone Alkaline Phosphatase, BAP) (i.r. 3,7-20 µg/L) che si è mantenuta nei 6 mesi successivi (Figura 1). Ai controlli ematici mensili, è stata registrata un'ulteriore diminuzione delle concentrazioni di PTH e BAP, indipendentemente dai livelli sierici di fosfato, che erano anche più alti rispetto ai valori precedenti la nefrectomia (Tabella 1). Come conseguenza della riscontrata diminuzione di PTH, la dose di Etelcalcetide è stata ridotta. Il calcio sierico è rimasto invariato per tutto il tempo di osservazione (40 mesi) e non è mai stata rilevata ipercalcemia. Successivamente, PTH e BAP sono rimasti stabili. Le variazioni dei parametri con il tempo e la modifica della terapia sono presentate nella Figura 1 e nella Tabella 1.

Corrispondenza a: Fiamma Balboni, UO Nefrologia e Dialisi - Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza - IFCA Firenze, Tel 055 4296368, E-mail lab.ifca@giomi.com

Ricevuto: 13.05.2021

Revisionato: 14.06.2021

Accettato: 24.06.2021

Publicato on-line: 23.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.056

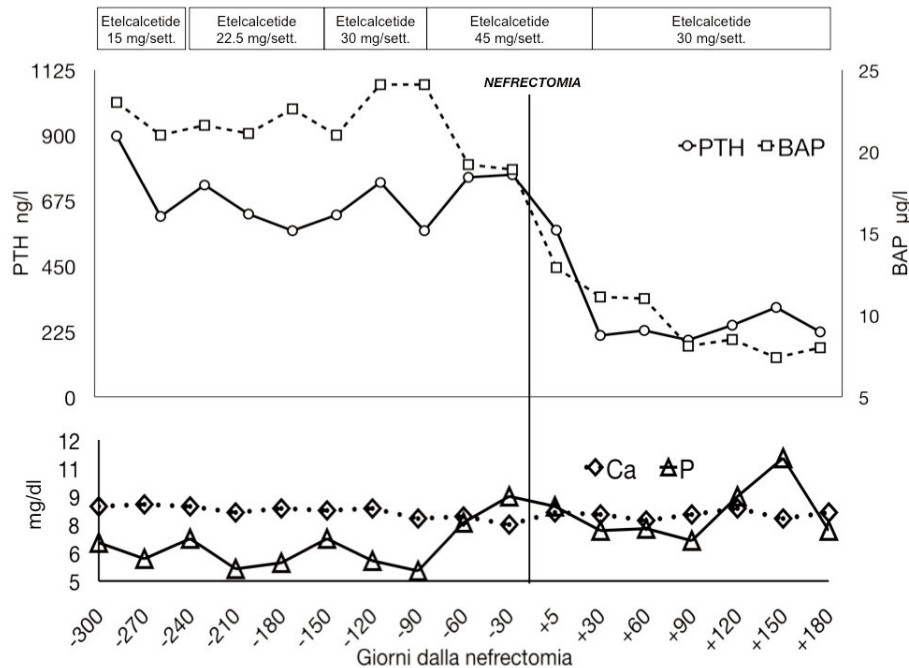


Figura 1
 Andamento temporale dei valori ematochimici del paziente, in relazione al momento della nefrectomia e al contemporaneo trattamento con Etelcalcetide (PTH, ormone paratiroideo; BAP, fosfatasi alcalina ossea).

Tabella 1
 Parametri ematochimici del paziente prima e dopo la nefrectomia. I valori sono espressi come mediana (quartili)

	Prima della nefrectomia (n=10) mediana (quartili)	Dopo la nefrectomia (n=7) mediana (quartili)	
PTH ng/L	678 (607-757)	228 (211-307)	p=0,0004
BAP µg/L	21,3 (20,5-23,3)	8,5 (8,0-11,1)	p=0,0001
Ca mg/dL	8,5 (8,2-8,7)	8,3 (8,1-8,4)	p=0,1932
P mg/dL	6,5 (5,8-7,3)	7,5 (7,0-8,7)	p=0,0878

PTH, paratormone; BAP, fosfatasi alcalina ossea (Bone Alkaline Phosphatase); Ca, calcio; P, fosforo.

Il paziente ha regolarmente proseguito il trattamento dialitico, fino ad oggi. Non è stata posta indicazione a trattamento chemioterapico e ai periodici controlli oncologici è finora risultato libero da malattia.

PTH e BAP sono stati entrambi misurati con metodi immunochemiluminescenti, Access Intact PTH e Access Ostase, su analizzatore Access II (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

I valori sierici di calcio e fosforo sono stati ottenuti con analizzatore AU (Beckman Coulter) con metodica Arsenazo III e Fosfomolibdato. I valori di calcio sono stati corretti per la concentrazione di albumina serica, variabile associata allo stato nutrizionale che risulta frequentemente inadeguato nel paziente dializzato.

L'analisi statistica è stata eseguita con SPSS per Windows, Release 6.0.1 Student Version, SPSS Inc. I

dati sono stati confrontati mediante il test non parametrico di Mann-Whitney. Valori di p<0,05 sono stati considerati significativi.

Il paziente è stato inizialmente affrontato come un comune caso di iperparatiroidismo (IPT) secondario sostenuto da iperfosfatemia persistente e incontrollata, ma la diminuzione progressiva e persistente delle concentrazioni sieriche di PTH e BAP dopo la nefrectomia hanno posto un quesito: quale è stata la relazione tra nefrectomia e riduzione del PTH? La fosforemia del paziente infatti non si è mai ridotta.

DISCUSSIONE

Il disturbo del metabolismo minerale e osseo nei pazienti in dialisi è associato ad alterazioni dell'equilibrio

di calcio, fosforo, PTH e/o Vitamina D, rimodellamento e mineralizzazione del turnover osseo e sviluppo di calcificazioni vascolari o di altri tessuti molli.

L'iperparatiroidismo secondario è un problema comune nei pazienti dializzati. Studi osservazionali riportano un aumento del rischio relativo di morte nei pazienti con MRC in stadio 5D che presentino valori di PTH eccessivamente elevati. Una volta sviluppato, un IPT grave può diventare resistente al trattamento farmacologico e può essere necessaria la paratiroidectomia.

Il PTH è un polipeptide costituito da 84 aminoacidi. Nella sua forma intatta, viene chiamato PTH 1-84. L'attività biologica dell'ormone risiede nella sequenza amminoacidica 1-34, che costituisce il frammento ammino-terminale del PTH.

La forma intatta dell'ormone rappresenta solo una parte del PTH prodotto, ma può aumentare o diminuire in base alle variazioni dei livelli ematici di calcio, il principale regolatore della secrezione di PTH, o della concentrazione di altri agenti che ne influenzano la secrezione, tra i quali l'iperfosforemia, come nel caso clinico descritto. I frammenti sono di dimensioni variabili e riguardano la porzione carbossi-terminale; esistono delle ipotesi circa una loro attività opposta a quella del PTH intatto (1).

La proteina correlata al PTH (PTHrp) presenta un alto grado di omologia con il PTH. Essa è coinvolta nella crescita ossea durante lo sviluppo scheletrico dell'età evolutiva. L'ipercalcemia in corso di neoplasia è associata all'ipersecrezione anomala di PTHrp.

La metodica di determinazione del Test Access Intact PTH permette la misura del PTH intatto. Le possibili interferenze dei frammenti del PTH e di PTHrp sul PTH intatto sono state analizzate dalla casa produttrice stessa: aggiungendo al calibratore S0 di Access Intact PTH rispettivamente PTH 1-84, PTH 7-84, PTH 44-68, PTH 53-84, PTH 39-84, PTHrp 1-34, la cross-reattività dei singoli analiti è risultata rispettivamente del 100%, 72%, e <0,1% per PTH 44-68, PTH 39-84, PTHrp 1-34.

Sebbene il calcio sierico sia il principale regolatore della secrezione di PTH, un altro importante agente secretagogico da considerare è l'iperfosforemia, ritenuta inizialmente responsabile dell'IPT secondario nel caso clinico in questione. Dopo la nefrectomia, a fronte di una fosforemia persistentemente elevata, il coinvolgimento di quest'ultima è stato escluso. È ben stabilito che valori di fosforo che rientrano o sono appena oltre gli intervalli di riferimento sono determinanti nel controllo della secrezione di PTH (2), ma in questo paziente la fosforemia è sempre stata elevata, e persino più alta, dopo l'intervento chirurgico.

Il carcinoma a cellule renali è stato associato a sindromi parananeoplastiche, inclusa grave ipercalcemia con secrezione di PTHrp (3). Nel paziente non è mai stata rilevata ipercalcemia, anche se avrebbe potuto essere mascherata o attenuata dall'azione ipocalcemizzante dell'Etelcalcetide. Inoltre PTHrp 1-34 ha mostrato una reattività crociata <0,1% nel Test Access Intact PTH, come indicato dalla casa produttrice, rendendo improbabile un ruolo di questa proteina nel caso in esame.

La secrezione ectopica di PTH è stata descritta in rari contesti clinici, principalmente nel tessuto neoplastico, e può coinvolgere meccanismi molecolari eterogenei (4). La misurazione della concentrazione di PTH nella frazione citosolica grezza del tessuto tumorale è cruciale per la stima della produzione ectopica di PTH dalle cellule tumorali. Avendo considerato il nostro paziente come un caso di IPT secondario con iperfosfatemia cronica in corso di trattamento emodialitico, il tessuto rimosso durante l'intervento non è stato conservato per ulteriori indagini: dopo aver eseguito e convalidato il consueto esame istologico e la diagnosi patologica, il tessuto renale è stato scartato. Andando a constatare la costante riduzione di PTH e BAP durante il monitoraggio, è stato chiesto agli anatomopatologi di riesaminare il materiale istologico, ma non è stata rilevata alcuna evidenza di tessuto secernente PTH. Anche se la produzione ectopica di PTH potrebbe sembrare in linea con i risultati nel caso in esame, rimarrebbe eccezionale e impossibile da confermare.

L'impressionante associazione temporale tra nefrectomia e riduzione del PTH ricorda ciò che si osserva solitamente dopo la paratiroidectomia chirurgica: le concentrazioni di PTH diminuiscono immediatamente, in associazione alla concentrazione del calcio, seguiti subito dopo dalla normalizzazione dei biomarcatori di turnover osseo, di solito entro il primo anno (5). In seguito alla nefrectomia, il tessuto paratiroideo potrebbe essere diventato più sensibile all'Etelcalcetide, con un corrispondente effetto sulla BAP, marcatore della formazione ossea in quanto prodotto dell'attività degli osteoblasti (6-7). Etelcalcetide è un calciomimetico a somministrazione endovenosa utilizzato per la terapia dell'iperparatiroidismo secondario nei pazienti in emodialisi cronica. Osservando la sua attività in due diversi modelli di uremia di roditori, è stato dimostrato che la sua somministrazione in singolo bolo in ratti con disfunzione renale acuta ha determinato una riduzione sostenuta del PTH plasmatico, mentre la somministrazione ripetuta in ratti sottoposti a nefrectomia 5/6, un modello cronico meno grave di disfunzione renale, ha portato a notevoli miglioramenti nel loro profilo metabolico, tra cui livelli inferiori di PTH, ma anche una riduzione delle calcificazioni vascolari e dell'iperplasia paratiroidea (8).

Considerando la frequenza con cui le neoplasie renali si associano a sindromi paraneoplastiche, un'alternativa interpretazione, solo ipotetica, dei presenti risultati, potrebbe vedere coinvolta la produzione di citochine da parte del tumore renale stesso. Questi mediatori sono stati associati all'incremento della fosfatasi alcalina in corso di carcinoma renale metastatico, come anche alla regolazione del recettore del calcio e allo sviluppo e diffusione del carcinoma renale stesso (9-10). Nel caso clinico descritto, la nefrectomia potrebbe aver eliminato una possibile fonte di produzione di citochine, responsabili, almeno in parte, delle manifestazioni osservate, rendendo conto della rapidità delle variazioni sierologiche successive alla rimozione della neoplasia primitiva. Trattandosi, come detto, di interpretazioni

ipotetiche, non abbiamo la disponibilità dei valori circolanti di citochine.

Tuttavia, solo dopo dieci mesi di trattamento intensivo, in coincidenza con la nefrectomia, abbiamo osservato una notevole riduzione del PTH serico e, soprattutto, della BAP, ben oltre quanto generalmente descritto durante la terapia con Etelcalcetide, e non abbiamo registrato alcun cambiamento significativo nei livelli serici di calcio. Mantenendo il trattamento con calciomimetico, anche se a dosi inferiori, le concentrazioni di PTH e BAP sono rimaste costanti nei periodi successivi.

È probabile, quindi, che a seguito della nefrectomia la somministrazione endovenosa di Etelcalcetide sia stata più efficace nel controllare i valori di PTH.

Senza dubbio il laboratorio ha svolto un ruolo chiave nella gestione del paziente e la ricerca di possibili interferenze sulla misura del PTH è stato un punto cardine nell'interpretazione del quadro clinico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. D'Amour P, Brossard JH, Rousseau L, et al. Structure of non-(1–84) PTH fragments secreted by parathyroid glands in primary and secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2005;68:998-1000.
2. Ureña-Torres PA, Vervloet M, Mazzaferro S, et al. Novel insights into parathyroid hormone: report of The Parathyroid Day in Chronic Kidney Disease. *Clin Kidney J* 2018;12:269-80.
3. Hegemann M, Kroeger N, Stenzl A, et al. Rare and changeable as a chameleon: paraneoplastic syndromes in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2018;36:849-54.
4. Kwon HJ, Kim JW, Kim H, et al. Combined hepatocellular carcinoma and neuroendocrine carcinoma with ectopic secretion of parathyroid hormone: a case report and review of the literature. *J Pathol Transl Med* 2018;52:232-7.
5. Rajeev P, Movseysan A, Baharani A. Changes in bone turnover markers in primary hyperparathyroidism and response to surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 2017;99:559-62.
6. Eidman KE, Wetmore JB. Managing hyperparathyroidism in hemodialysis: role of Etelcalcetide. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2018;11:69-80.
7. Cozzolino M, Galassi A, Conte F, et al. Treatment of secondary hyperparathyroidism: the clinical utility of Etelcalcetide. *Ther Clin Risk Manag* 2017;13:679-89.
8. Limardo M, Pontoriero G. Etelcalcetide: un nuovo calciomimetico per la terapia dell'iperparatiroidismo secondario nei pazienti in emodialisi. *Tec Nefrol Dial* 2017; 29:62-5.
9. Kamińska K, Czarnecka AM, Escudier B, et al. Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer. *Urol Oncol* 2015;33:476-85.
10. Hendy GN, Canaff L. Calcium-sensing receptor, proinflammatory cytokines and calcium homeostasis. *Semin Cell Dev Biol* 2016;49:37-43.



BIO MEDIA

La condivisione del sapere

“ Da oltre vent'anni al servizio della comunità scientifica ”



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

Biomedica progetta, organizza e coordina eventi formativi ECM medico-scientifici residenziali e a distanza. È partner di numerose Società Scientifiche, editore in ambito sanitario, ed è attiva nell'ambito della comunicazione digitale, realizzando servizi sviluppati e gestiti *in house*.