

## Standardizzazione e armonizzazione dell'albuminuria: a che punto siamo?

Michele Mussap<sup>1</sup>, Anna Carobene<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi, Cagliari

<sup>2</sup>Servizio Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

Caro Editore,

L'albuminuria è un biomarcatore di danno endoteliale e di alterazione del microcircolo largamente usato nella pratica clinica da moltissimo tempo per la diagnosi precoce ed il monitoraggio della nefropatia diabetica (1). Negli ultimi 20 anni, l'albuminuria è stata associata al filtrato glomerulare nella definizione della diagnosi e stadiazione della malattia renale cronica e nella valutazione della malattia renale acuta, ma non nel danno renale acuto (2). Un esteso studio di meta-analisi del 2010 ha dimostrato che l'albuminuria è un fattore di rischio indipendente di mortalità totale e cardiovascolare (3). Successivi studi randomizzati e meta-analisi hanno definitivamente confermato i risultati del 2010 e il ruolo dell'albuminuria come fattore di rischio associato all'ipertensione (4). Una delle conseguenze più rilevanti è stata la rivalutazione dei tradizionali valori di concentrazione che classicamente dividevano l'albuminuria in tre intervalli clinicamente significativi:

- normoalbuminuria, corrispondente a valori <30 mg/g creatinuria (<30 mg/die; <3 mg/mmol creatinuria);
- microalbuminuria, corrispondente a valori compresi tra 30 e 300 mg/g creatinuria (30-300 mg/die; 3-30 mg/mmol creatinuria);
- macroalbuminuria, corrispondente a valori >300 mg/g creatinuria (>300 mg/die; >30 mg/mmol creatinuria).

È stato infatti dimostrato che valori di albuminuria compresi tra circa 5 e 30 mg/g creatinuria (5-30 mg/die; 0,5-3 mg/mmol) sono già significativi nella definizione del rischio cardiovascolare e pertanto qualsiasi aumento di concentrazione dell'albuminuria nell'intervallo 5-30 mg/g (5-30 mg/die; 0,5-3 mg/mmol) si associa all'aumento del rischio di ipertensione e di mortalità cardiovascolare (5,6). Infine, i termini "normo-, micro- e macroalbuminuria" sono fuorvianti e devono essere sostituiti con albuminuria, come raccomandato nelle principali linee-guida internazionali e nazionali delle società di nefrologia, diabetologia e medicina di laboratorio (7,8); l'unico termine che identifica correttamente la perdita di albumina nell'urina è albuminuria, a prescindere dalla quantità (9).

Per il laboratorio, l'importanza dell'albuminuria e le recenti evidenze sul significato clinico di basse concentrazioni del biomarcatore rendono assolutamente necessari interventi per rendere affidabili misure intorno ai 3-5 mg/g creatinuria (0,3-0,5 mg/mmol) e accelerare il processo di standardizzazione dei metodi analitici, rendendoli riferibili a standard calibratori internazionali.

Per quanto riguarda il primo punto, vale la pena sottolineare che i metodi quantitativi con limiti di rilevabilità e quantificazione inadeguati (ad esempio pari a 20-25 mg/g; 0,2-0,25 mg/mmol) non consentono la misura di concentrazioni al di sotto di tali limiti; per questi motivi, è auspicabile scegliere metodi che consentano la determinazione accurata e precisa di bassi livelli di albuminuria. Inoltre, i metodi semiquantitativi in chimica secca (i cosiddetti "reagent strips" o "dipsticks") non sono in grado di soddisfare pienamente le specifiche di qualità analitiche necessarie a rendere affidabili le misure di concentrazioni basse di albuminuria (<30 mg/g; <3 mg/mmol) e pertanto queste limitazioni devono essere attentamente considerate nell'interpretazione dei risultati ottenuti con questi metodi, anche nei casi in cui siano automatizzati su piattaforme analitiche.

Per quanto riguarda la standardizzazione, da anni, il gruppo di lavoro del National Kidney Disease Education Program (Laboratory Working Group, LWG) e quello della IFCC hanno elaborato una serie di raccomandazioni per la corretta determinazione dell'albuminuria e per lo sviluppo dell'armonizzazione dei metodi (10-12). Una delle attività più importanti dei gruppi di lavoro è la collaborazione attiva con l'agenzia governativa americana National Institute of Standard and Technology (NIST), allo scopo di mettere a punto ed effettuare prove di verifica su materiali standard di riferimento primari per l'albuminuria. Nel febbraio del 2020, il NIST comunicava ufficialmente la disponibilità di un materiale standard di riferimento (SRM 2925) denominato "Primary Reference Calibrator for Urine Albumin" (calibratore primario di riferimento per l'albumina urinaria). L'annuncio del NIST creava una grande aspettativa, poiché si pensava erroneamente che questo materiale potesse finalmente rendere riferibili i metodi per l'albuminuria. Tuttavia, nella documentazione di accompagnamento del materiale SRM 2925, si legge chiaramente che si tratta di una soluzione acquosa di albumina umana plasmatica idonea a calibrare metodiche in spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per la determinazione dell'albuminuria. È evidente che questo materiale non può essere usato dalle aziende del diagnostico per ricalibrare i propri materiali standard; non è un materiale commutabile, perché

Corrispondenza a: Michele Mussap, Laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi, Cittadella Universitaria S.S. 554, 09042 Monserrato, Cagliari. E-mail: michele.mussap@unica.it; mumike153@gmail.com

Ricevuto: 05.11.2022

Revisionato: 07.11.2022

Accettato: 07.11.2022

Publicato on-line: 21.11.2022

DOI: 10.19186/BC\_2022.077



Date of Issue:  
24 June 2022

Standard Reference Material® 3667  
Creatinine in Frozen Human Urine  
CERTIFICATE OF ANALYSIS

**Purpose:** The certified values delivered by this Standard Reference Material (SRM) are intended primarily for use in evaluating the accuracy of procedures for the determination of creatinine in human urine. They are also intended for use in validating working or secondary reference materials.

**Description:** SRM 3667 was prepared from normal human urine collected from male and female donors, and the creatinine concentration has not been modified. A unit of SRM 3667 consists of one bottle of 10 mL frozen human urine.

**Certified Values:** The certified mass fraction value and mass concentration value for creatinine are provided in Table 1. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. The certified values for creatinine are based on the results from a modification of the NIST isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry (ID-LC-MS) method for the determination of creatinine in serum [2]. This method is recognized as a higher-order reference measurement procedure by the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) [3].

The uncertainty provided with each value is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence; it incorporates Type B uncertainty components related to the analyses, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1 [4,5]. The expanded uncertainty is calculated as  $U = k u_c$ , where  $u_c$  is the combined uncertainty, and  $k$  is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence for each analysis [6]. For the certified values shown below,  $k = 2$ . The measurand is the total mass fraction of creatinine as listed in Table 1. Metrological traceability is to the International System of Units (SI) derived unit for mass fraction (expressed as micrograms per gram) and mass concentration (milligrams per deciliter).

Table 1. Certified Values for Creatinine in SRM 3667

| Mass Fraction<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | Mass Concentration <sup>(a)</sup><br>( $\text{mg/dL}$ ) |
|--------------------------------------|---|
| $613 \pm 13$                         | $61.8 \pm 1.3$  |

<sup>(a)</sup> Mass concentration was calculated from the mass fraction using the measured urine density,  $1.00816 \pm 0.00001 \text{ g/mL}$  (measured value  $\pm$  standard deviation). The uncertainty in the urine density measurements was incorporated in the value that is reported relative to units of volume.

**Additional Information:** Additional Information is available in Appendix A.

**Period of Validity:** The certified values delivered by SRM 3667 are valid within the measurement uncertainty specified until 31 January 2030. The certified values are nullified if the material is stored or used improperly, damaged, contaminated, or otherwise modified.

**Maintenance of Certified Values:** NIST will monitor this SRM over the period of its validity. If substantive technical changes occur that affect the certification, NIST will issue an amended certificate through the NIST SRM website (<https://www.nist.gov/srm>) and notify registered users. SRM users can register online from a link available on the NIST SRM website or fill out the user registration form that is supplied with the SRM. Registration will facilitate notification. Before making use of any of the values delivered by this material, users should verify they have the most recent version of this documentation, available through the NIST SRM website (<https://www.nist.gov/srm>).

Carlos A. Gonzalez, Chief  
Chemical Sciences Division  
Certificate Revision History on Page 3

Steven J. Choquette, Director  
Office of Reference Materials

**Figura 1**

Standard primario di riferimento per la creatinuria (SRM 3667) costituito da creatinina in urine congelate, rilasciato dal National Institute of Standard and Technology (NIST)

la matrice è acquosa e non urinaria e perché contiene albumina plasmatica. Quest'ultimo aspetto va approfondito; non c'è dubbio che la molecola di albumina sia sempre la medesima sia in circolo che nell'urina, a parte eventuali modifiche post-traslazionali che rientrano nella variabilità inter-individuale. Tuttavia, la diversità delle matrici sangue/urina (ad esempio pH, osmolalità) può essere fonte di modificazioni chimico-fisiche della molecola, oltre al non trascurabile dettaglio che nell'urina molti cataboliti e altre sostanze comunemente presenti in elevate concentrazioni (farmaci, xenobiotici, metaboliti di origine alimentare e/o batterica) possono legarsi temporaneamente all'albumina modificandone in parte la struttura secondaria e terziaria. Infine, ma non meno rilevante, è da sottolineare che la concentrazione dell'albumina plasmatica in un soggetto adulto sano a riposo (circa 65 g/L, cioè 65 000 mg/L) è da 1 000 a 10 000 volte superiore a quella riscontrabile nell'urina (6-10 mg/L; 0,6-1 mg/mmol) e questo è anche uno dei motivi per cui non è possibile traslare direttamente l'attuale metodo riferibile su siero/plasma all'urina. In definitiva, a tutt'oggi la disponibilità dello standard SRM 2925 non consente di rendere riferibili i metodi per la determinazione dell'albuminuria, come sottolineato in una comunicazione confidenziale fatta agli scriventi da Ashley Beasley Green, il coordinatore del NIST per la preparazione degli standard primari per l'albuminuria.

E allora, a che punto è la standardizzazione dell'albuminuria? Due buone notizie all'orizzonte: anzitutto, nel giugno del 2022 il NIST ha rilasciato uno standard primario di riferimento per la creatinuria (SRM 3667) costituito da creatinina in urine congelate (Figura 1). Questo materiale dovrà essere usato per la calibrazione dello standard secondario, secondo le indicazioni del NIST.

In secondo luogo, il gruppo di lavoro LWG e il NIST stanno per rilasciare un materiale standard primario (SRM 3666) per albuminuria e creatinuria, costituito da matrice urinaria congelata contenente albumina e creatinina in ambiti di concentrazione compatibili con le misure nell'urina dei due costituenti, nella pratica clinica. Il rilascio a breve consentirà la preparazione dello standard secondario sul quale poi le aziende del diagnostico potranno finalmente ricalibrare i loro standard per albuminuria e creatinuria, consentendo quindi di armonizzare i risultati di albuminuria sia espressi come concentrazione per volume (mg/L) che come rapporto albuminuria/creatinuria (mg/g, o mg/mmol).

**BIBLIOGRAFIA**

- Mogensen CE, Keane WF, Bennett PH, et al. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet* 1995;346:1080-4.
- Levey AS, Grams ME, Inker LA. Uses of GFR and albuminuria level in acute and chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2022;386:2120-8.
- Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium.. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010;375:2073-81.
- Matsushita K, Coresh J, Sang Y, et al. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3:514-25.
- Sung KC, Ryu S, Lee JY, et al. Urine albumin/creatinine ratio below 30 mg/g is a predictor of incident hypertension and cardiovascular mortality. *J Am Heart Assoc* 2016;5:e003245.
- Kang M, Kwon S, Lee J, et al. Albuminuria within the normal range can predict all-cause mortality and cardiovascular mortality. *Kidney360*. 2021;3:74-82.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO 2022 Clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2022;102:S1-S127.
- Rossing P, Caramori ML, Chan JCN, et al. Executive summary of the KDIGO 2022 Clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease: an update based on rapidly emerging new evidence. *Kidney Int* 2022;102:990-9.
- Ruggenenti P, Remuzzi G. Time to abandon microalbuminuria? *Kidney Int* 2006;70:1214-22.
- Lieske JC, Bondar O, Miller WG, et al. A reference system for urinary albumin: current status. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:981-9.
- 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.
- Seegmiller JC, Miller WG, Bachmann LM. Moving Toward standardization of urine albumin measurements. *EJIFCC* 2017;28:258-67.