La standardizzazione della misura dell'albumina nelle urine richiede nuove conoscenze

Riccardo Albertini, Giampaolo Merlini
Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Laboratori di Ricerca di Biotecnologie, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Biochimica, Università degli Studi di Pavia

La determinazione dell'albumina nelle urine è essenziale per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti con malattie renali e per definire il rischio di malattie cardiovascolari. Non tutti i soggetti con malattie renali croniche (CKD) presentano proteinuria, ma questa sembra identificare una sottopopolazione di pazienti con CKD con aumentato rischio di progressione dell'insufficienza renale, di malattie cardiovascolari e di morte (1-8). La quantificazione dell'albumina urinaria o delle proteine totali urinarie (in paesi dell'area anglosassone) consente di rivolgere selettivamente gli interventi terapeutici verso i soggetti ad alto rischio, evitando trattamenti inutili in quelli a basso rischio.

A fronte di una chiara evidenza clinica del valore dell'esame 'albuminuria', esistono ancora importanti problemi che riguardano tutto il processo di determinazione, a partire dalla fase preanalitica fino alla refertazione dei risultati. In questo numero di *Biochimica Clinica* è riportata la traduzione di una recente rassegna sulla misura e refertazione dell'albumina urinaria, preparata da un gruppo di lavoro congiunto IFCC-NKDEP ("U.S. National Kidney Disease Education Program") per la standardizzazione dell'albuminuria (WG-SAU) (9). Il lavoro analizza i numerosi problemi che ostacolano la standardizzazione della misura di questo importante marcatore, in parte dovuti alle ancora scarse conoscenze, potenzialmente risolvibili con investimenti nella ricerca, e in parte dovuti alla intrinseca difficoltà di standardizzare la misura di un analita presente in una matrice biologica dotata di elevata variabilità, dovuta sia alle esigenze fisiologiche di mantenere l'omeostasi idro-elettrolitica a fronte di importanti variazioni dell'assunzione e perdita di liquidi e soluti, sia a possibili trattamenti terapeutici, legati al comune impiego dei diuretici nei soggetti con malattie renali, alla "clearance" renale di numerosi farmaci e alla facile contaminazione batterica.

In linea generale, il WG-SAU propone alcune raccomandazioni per gli aspetti più semplici, quali la terminologia (utilizzare 'albumina urinaria' e non più 'microalbuminuria'), il campione urinario da preferire (prima urina del mattino) e le modalità di conservazione dello stesso (a -70 °C) nel caso che il campione non possa essere processato subito, come sarebbe auspicabile. Vi è anche consenso nel ritenere il rapporto albuminuria/creatininuria un accettabile surrogato della velocità di escrezione dell'albumina nelle urine. Il documento elenca, tuttavia, ben 14 problemi ancora aperti, che richiedono definizione per poter giungere alla standardizzazione dei risultati. Questi spaziano dal tipo di contenitore da utilizzare per la raccolta delle urine, alla necessità di preparare un materiale di riferimento adeguato, fino alla definizione di equazioni età e sesso specifiche per poter convertire il rapporto albuminuria/creatininuria nella velocità di escrezione di albumina nelle urine.

Uno dei principali problemi riguarda la definizione della forma(e) molecolare(i) dell'analita presente nelle urine: un problema analogo a quello che riguarda l'albumina presente nel plasma, ma complicato dalla presenza ad alta concentrazione nelle urine di proteasi e di vari ligandi per l'albumina. Gli Autori propongono l'utilizzo della cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS) per definire natura, quantità e rilevanza clinica di queste specie molecolari, sia nei soggetti sani che in quelli affetti da malattie renali e cardiovascolari. A questo proposito, l'entusiasmo sollevato qualche anno fa dalla possibile presenza nelle urine di pazienti diabetici di consistenti quantità di albumina apparentemente non-immunoreattiva, in base alle dimensioni del picco cromatografico rilevato in corso di HPLC, è oggi del tutto ridimensionato dalle osservazioni che nel picco cromatografico possono essere coeluite altre proteine e che gli anticorpi policlonali in uso nella maggior parte dei kit commerciali sono in grado di riconoscere almeno 5 differenti epitopi presenti sulla molecola di albumina (10, 11). Uno studio recente, che ha comparato i risultati della quantificazione dell'albumina urinaria utilizzando tre metodi commerciali, due turbidimetrici utilizzanti anticorpi policlonali e uno competitivo, che utilizza un anticorpo monoclonale, con la LC-MS/MS, ha mostrato una buona concordanza dei dati ottenuti con i metodi commerciali rispetto a quest'ultimo metodo escludendo quindi la presenza di quantità significative di albumina non-immunoreattiva nelle urine (12). E' anche importante rilevare che in questo lavoro, nonostante siano stati riportati scostamenti significativi fra i metodi a varie concentrazioni di albuminuria, nell'intervallo clinicamente più importante (<200 mg/L) i quattro metodi valutati hanno fornito risultati simili. La metodica LC-MS/MS è proposta come metodo di riferimento per la misura dell'albumina urinaria perché si presuppone sia in grado di riconoscere tutte le specie di albumina presenti, evitando potenziali problemi dovuti al diverso riconoscimento degli epitopi da parte di anticorpi differenti e/o ad effetti matrice (13).

L'esattezza dei metodi per la misura dell'albumina e

della creatinina urinarie è difficile da stabilire, poiché non sono disponibili materiali di riferimento per questi due analiti urinari. Attualmente i produttori riferiscono ("tracciano") la calibrazione alla concentrazione dell'albumina certificata nel materiale di riferimento per le proteine del siero ERM-DA470 [recentemente sostituito dal ERM-DA470k/IFCC, prodotto dall' "Institute for Reference Materials and Measurements" (IRMM) in collaborazione con il "Committee on Plasma Proteins" dell'IFCC], diluito alle concentrazioni misurate nelle urine. Tuttavia, non sono definite procedure standardizzate per la diluizione del materiale, né esiste un diluente universale. Una situazione analoga esiste per la misura della creatinina nelle urine, che frequentemente utilizza lo stesso calibratore utilizzato per le determinazioni eseguite nel siero o nel plasma. Sono quindi necessari studi per giungere rapidamente alla definizione di materiali di riferimento con commutabilità validata, che vengano accettati dal "Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine" (JCTLM) e quindi proposti alle ditte per calibrare i sistemi commerciali.

Alcune linee guida, soprattutto quelle di derivazione anglosassone, menzionano la possibilità di utilizzare, al posto dell'albuminuria, il rapporto proteine totali urinarie/creatininuria per identificare un danno renale precoce. Da questo punto di vista, nella rassegna manca una discussione sulle variabili che possono influenzare l'accuratezza dei metodi di misura delle proteine totali urinarie (ad es., l'ampia variabilità nella quantità e composizione delle proteine urinarie, la presenza di sostanze interferenti, la variazione dei sali inorganici, ecc.) e gli importanti limiti dei vari metodi, basati prevalentemente sul legame con coloranti (14). In generale, questi metodi sono calibrati con soluzioni di albumina, presentano scarsa precisione a basse concentrazioni, sono relativamente poco sensibili e quindi esposti alla possibilità di generare sia risultati falsi negativi che falsi positivi. Per questi motivi, la misura dell'albumina, nonostante tutti i problemi ancora aperti, dovrebbe in ogni caso sostituire la misura delle proteine totali nelle urine quando sia richiesta l'identificazione di un danno glomerulare renale.

In conclusione, il merito maggiore della rassegna di Miller et al. (9) è quello di porre chiara evidenza sulla necessità di produrre maggiori informazioni scientifiche in numerose aree, dalla fase preanalitica alla definizione di un sistema di riferimento, per consentire la standardizzazione della misura della albumina nelle urine al fine di fornire una risposta affidabile a una chiara necessità clinica (Tabella 1).

BIBLIOGRAFIA

1. Ruggenenti P, Perna A, Mosconi L, et al. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). Kidney Int 1998;53:1209-16.
2. Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. Kidney Int 2003;63:1468-74.
3. Jafar TH, Stark PC, Schmid CH, et al. Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. Ann Intern Med 2003;139:244-52.
4. Brantsma AH, Bakker SJ, de Zeeuw D, et al. Extended prognostic value of urinary albumin excretion for cardiovascular events. J Am Soc Nephrol 2008;19:1785-91.
5. Brantsma AH, Bakker SJ, Hillege HL, et al. Cardiovascular and renal outcome in subjects with K/DOQI stage 1-3 chronic kidney disease: the importance of urinary albumin excretion. Nephrol Dial Transplant 2008;23:3851-8.
6. Cirillo M, Lanti MP, Menotti A, et al. Definition of kidney dysfunction as a cardiovascular risk factor: use of urinary albumin excretion and estimated glomerular filtration rate. Arch Intern Med 2008;168:617-24.
7. Farbom P, Wahlstrand B, Almgren P, et al. Interaction between renal function and microalbuminuria for cardiovascular risk in hypertension: the nordic diltiazem study. Hypertension 2008;52:115-22.
8. Sciarretta S, Valenti V, Tocci G, et al. Association of renal damage with cardiovascular diseases is independent of individual cardiovascular risk profile in hypertension: data from the Italy - Developing education and awareness on microalbuminuria in patients with hypertensive disease study. J Hypertens 2010;28:251-8.
9. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, et al. Principali aspetti nella misurazione e refertazione della escrezione urinaria di albumina. Biochim Clin 2010;34:337-50.
10. Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, et al. Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. Clin Chem 2006;52:389-97.
11. Sakata S, Atassi MZ. Immunochemistry of serum albumin. X. Five major antigenic sites of human serum albumin are extrapolated from bovine albumin and confirmed by synthetic peptides. Mol Immunol 1980;17:139-42.
12. Seegmiller JC, Sviridov D, Larson TS, et al. Comparison of urinary albumin quantification by immunoturbidimetry, competitive immunoassay, and protein-cleavage liquid

Tabella 1

Standardizzazione della misurazione dell'albuminuria: raccomandazioni per la ricerca (modificata da rif. 9)

- Definire l'attuale stato di comparabilità dei metodi
- Definire la variabilità biologica dell'albumina nelle urine
- Definire le forme molecolari da misurare ("misurando")
- Sviluppare una procedura di riferimento, basata sulla metodologia LC-MS/MS
- Caratterizzare e certificare appropriati materiali di riferimento
- Definire la possibile influenza preanalitica di diversi tipi di contenitori e provette
- Chiarire le possibili influenze dovute alla matrice urinaria
- Definire l'eventuale utilità dell'impiego di specifici livelli decisionali

LC-MS/MS, cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa.

chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem 2009;55:1991-4.
13. Seegmiller JC, Barnidge DR, Burns BE, et al. Quantification of urinary albumin by using protein cleavage and LC-MS/MS. Clin Chem 2009;55:1100-7.
14. Lamb EJ, MacKenzie F, Stevens PE. How should proteinuria be detected and measured? Ann Clin Biochem 2009;46:205-17.