Principali aspetti nella misurazione e refertazione della escrezione urinaria di albumina*

W. Greg Miller[1], David E. Bruns[2], Glen L. Hortin[3], Sverre Sandberg[4], Kristin M. Aakre[4], Matthew J. McQueen[5], Yoshihisa Itoh[6], John C. Lieske[7], David W. Seccombe[8], Graham Jones[9], David M. Bunk[10], Gary C. Curhan[11], Andrew S. Narva[12] per il National Kidney Disease Education Program-IFCC Working Group on Standardization of Albumin in Urine

[1]Department of Pathology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA
[2]Department of Pathology, University of Virginia Medical School, Charlottesville, VA, USA
[3]Department of Laboratory Medicine, Warren Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
[4]Laboratory of Clinical Biochemistry, Haukeland University Hospital and The Norwegian Quality Improvement of Laboratory Services in Primary Care (NOKLUS), Bergen, Norway
[5]Hamilton Regional Laboratory Medicine Program, Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Canada
[6]Department of Laboratory Medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan
[7]Mayo Clinic Renal Function Laboratory, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine, Rochester, MN, USA
[8]Canadian External Quality Assessment Laboratory and Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, Canada
[9]Department of Chemical Pathology, St Vincent's Hospital Sydney, Sydney, Australia
[10]Analytical Chemistry Division, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA
[11]Renal Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
[12]National Kidney Disease Education Program, National Institute for Diabetes and Digestive Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Traduzione a cura di Riccardo Albertini e Giampaolo Merlini

ABSTRACT

Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. Urinary excretion of albumin indicates kidney damage and is recognized as a risk factor for progression of kidney disease and cardiovascular disease. The role of urinary albumin measurements has focused attention on the clinical need for accurate and clearly reported results. The National Kidney Disease Education Program and the IFCC convened a conference to assess the current state of preanalytical, analytical, and postanalytical issues affecting urine albumin measurements and to identify areas needing improvement. The chemistry of albumin in urine is incompletely understood. Current guidelines recommend the use of the albumin/creatinine ratio (ACR) as a surrogate for the error-prone collection of timed urine samples. Although ACR results are affected by patient preparation and time of day of sample collection, neither is standardized. Considerable intermethod differences have been reported for both albumin and creatinine measurement, but trueness is unknown because there are no reference measurement procedures for albumin and no reference materials for either analyte in urine. The recommended reference intervals for the ACR do not take into account the large intergroup differences in creatinine excretion (e.g., related to differences in age, sex, and ethnicity) nor the continuous increase in risk related to albumin excretion. Clinical needs have been identified for standardization of (a) urine collection methods, (b) urine albumin and creatinine measurements based on a complete reference system, (c) reporting of test results, and (d) reference intervals for the ACR.

Questo articolo è stato tradotto con il permesso dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC). AACC non è responsabile della correttezza della traduzione. Le opinioni presentate sono esclusivamente quelle degli Autori e non necessariamente quelle dell'AACC o di Clinical Chemistry. Tradotto da Clin Chem 2009;55:24-38 su permesso dell'Editore.
Copyright originale © 2009 American Association for Clinical Chemistry, Inc. In caso di citazione dell'articolo, riferirsi alla pubblicazione originale in Clinical Chemistry.

PREMESSA

La misura dell'albumina nelle urine è ampiamente utilizzata per identificare e monitorare i pazienti con malattia renale. Una conferenza è stata organizzata dal "Laboratory Working Group" del "National Kidney Disease Education Program" (NKDEP) e dalla IFCC per fare il punto sullo stato attuale della misura dell'albumina nelle urine e sull'uso clinico di questi risultati nel trattamento della malattia renale. Gli obiettivi della conferenza erano di aumentare la conoscenza degli aspetti che devono essere affrontati per permettere la standardizzazione delle misure e la formulazione di linee guida di interesse clinico basate sull'albumina nelle urine. Questo "report" riassume le discussioni e le conclusioni della conferenza.

Storicamente, l'albuminuria è stata definita come la escrezione urinaria di albumina nella unità di tempo, in genere 24 ore. La difficoltà nella raccolta del campione di 24 ore ha indotto a misure surrogate dell'escrezione urinaria di albumina (AER): tra queste, una modalità diffusa è il rapporto delle concentrazioni urinarie di albumina e creatinina (ACR) (1). Per la determinazione del ACR sono raccolti campioni di urina "random" o "spot", spesso senza considerare il momento della giornata, ed è spesso riportato un intervallo di riferimento comune per uomini e donne. Tuttavia, è noto che il momento della raccolta influenza i risultati; inoltre, la escrezione maggiore di creatinina negli uomini rispetto alle donne influenza l'uso del ACR come alternativa al AER; in modo analogo, sono da considerare fattori confondenti la maggiore escrezione di creatinina nei soggetti afroamericani rispetto ai caucasici, la riduzione della escrezione di creatinina in corso di atrofia muscolare e gli effetti della dieta sulla escrezione di creatinina.

LINEE GUIDA RIGUARDANTI L'ALBUMINA URINARIA

Linee guida di carattere clinico sull'utilizzo dell'albumina urinaria sono state rilasciate da organizzazioni professionali in diversi paesi. Queste linee guida non sono uniformi nelle raccomandazioni a proposito del tipo di campione, del momento della giornata indicato per la sua raccolta, delle unità di misura per la refertazione, degli intervalli di riferimento o limiti decisionali e dei metodi per la misura dell'albumina e della creatinina.

La Tabella 1 elenca dieci linee guida, raccomandazioni e "position statements" rilasciati da sette organizzazioni a partire dal 2002 (2-11). Cinque linee guida riguardano il diabete e raccomandano una determinazione annuale. Tutti i documenti raccomandano l'utilizzo del ACR; otto raccomandano l'impiego della prima urina del mattino o di un campione raccolto nelle prime ore; sette raccomandano la raccolta di urine "spot" e quattro identificano come unità di misura mg/g o mg/mmol (1 mg/g = 0,113 mg/mmol). Sette menzionano, con diverso dettaglio, la necessità di eseguire degli esami di "follow-up" per confermare i dati. Due affermano esplicitamente che la raccolta delle urine delle 24 ore non è necessaria, mentre una indica la raccolta delle 24 ore come la prima di tre possibili metodi di raccolta delle urine.

Sebbene la misura del ACR sia raccomandata comunemente, la mancanza di metodi standardizzati per la raccolta dei campioni di urine, per la misura degli analiti e per la refertazione dei risultati limitano l'utilità dell'esame in campo clinico e di ricerca. I risultati riportati possono essere espressi in mg di albumina per g (o μg/mg) o per mmol di creatinina, modalità dal significato non ovvio per i non specialisti. Dal punto di vista clinico, gli operatori sanitari possono non capire il significato della albuminuria e possono avere difficoltà nell'interpretare efficacemente i risultati (ad es. identificare i risultati che indicano un aumentato rischio di malattia cardiovascolare o di progressione della malattia renale). Gli operatori possono essere confusi dalle varie possibilità di valutazione della funzione renale e dal fatto che un unico cut-off, per es. 30 mg/g (30 μg/mg, 3,4 mg/mmol o 3,4 g/mol), possa non essere utile per i pazienti di ogni età, sesso e origine etnica (1, 4). Inoltre, poiché la relazione tra escrezione di albumina nelle urine e rischio cardiovascolare o renale è continua, è probabile che sia erronea la considerazione che tutti i risultati di ACR <30 mg/g siano da considerare normali (1).

VARIABILI PREANALITICHE CHE INFLUENZANO L'ESCREZIONE DELL'ALBUMINA

La Tabella 2 elenca importanti fattori di tipo preanalitico che possono influenzare l'escrezione di albumina nelle urine (12-33).

Variabilità biologica intra-individuale

La conoscenza della variabilità biologica intra-individuale (CVi) è importante per prendere una decisione sul tipo di campione di urina che deve essere impiegato, per interpretare un esame di conferma dopo un risultato iniziale che indichi un'aumentata concentrazione e per decidere se il cambiamento nei risultati di escrezione di albumina in esami successivi sia di rilevanza clinica oppure no.

Le stime della CVi per la escrezione di albumina nelle urine indicano un intervallo tra 4% e 103%, con un terzile centrale compreso tra 28% e 47%. I fattori che spiegano la differenza in queste stime sono la durata della raccolta dei campioni (giorni, settimane, mesi), il tipo di campione (urina delle 24 ore, urina "overnight", prima urina del mattino, urina "spot"), il disegno dello studio, la concentrazione dell'albumina nelle urine, le condizioni di salute dei soggetti e il trattamento e la conservazione dei campioni. La maggior parte degli studi non descrive come il CVi veniva calcolato con dettaglio sufficiente da permettere la comprensione di queste differenze. Nondimeno, alcune conclusioni si possono trarre. Il CVi del ACR aveva il valore più basso nella maggioranza degli studi che prendevano in considerazione per il confronto la escrezione della 24 ore, la velocità di escrezione "overnight" o le semplici concentrazioni di albuminuria. Il CVi del ACR della variazione "day-to-day" in campioni raccolti "overnight" e alla mattina è in generale più

Tabella 1
Sommario delle raccomandazioni sull'impiego clinico della misura dell'albumina urinaria

Organizzazione	Indicazioni per lo screening, inclusa frequenza, modalità di raccolta del campione e metodi di analisi	Raccomandazioni sulla refertazione
American Diabetes Association (ADA) (2)	Eseguire l'esame una volta all'anno nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 da piu' di 5 anni e in tutti i pazienti con diabete di tipo 2, iniziando dal momento della diagnosi, e durante la gravidanza. Metodi: a) misurare ACR in un campione di urine "spot" (metodo preferito); b) raccolta di urine delle 24 ore, con simultanea misura della clearance della creatinina; c) raccolta di urine temporizzata (4 ore o "overnight").	Nessuna, ma in una tabella sui criteri di diagnosi è usata l'unità mg/g
International Diabetes Federation (IDF) (3)	Approccio di cura standard: controllare una volta all'anno la proteinuria con metodo "dipstick" sulla prima urina del mattino (o campione "random"). Sono raccomandati esami di conferma come ACR o PCR. Approccio di cura completo: valutazione della albuminuria con metodi di laboratorio quantitativi (ACR). Approccio minimo: valutazione annuale con metodi per la proteinuria basati su "dipstick" o sull'acido solfosalicilico su prima urina del mattino (o su campione "random"). Sono raccomandati esami di conferma, incluso PCR.	Nessuna, ma sono menzionate le unità mg/mmol e mg/g
Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (4)	E' raccomandato il dosaggio dell'albumina urinaria. I metodi di misura dovrebbero essere riferibili al materiale di riferimento CRM470. Sono disponibili diverse metodiche. Se necessario, possono essere usati metodi "dipstick" basati su reazioni immunologiche; metodi "dipstick" di tipo convenzionale su urina "spot" possono essere accettabili se rappresentano l'unica opzione disponibile. Sono raccomandati esami di conferma/ripetizione. Metodo di raccolta del campione: campioni di urina "spot" sono adatti per la valutazione iniziale. I campioni di prima urina del mattino sono preferibili, ma non indispensabili in caso di impedimento importante. La raccolta temporizzata per albumina e creatinina puo' essere eseguita se è richiesta una ridotta variabilità.	mg/g
US National Kidney Foundation (K/DOQI) (5,6)	Linee guida per adulti e bambini: nella maggior parte dei casi, campioni di urina "spot" possono essere usati per rivelare e monitorare la proteinuria. Di solito il campione temporizzato (raccolta notturna o delle 24 ore) non è necessario. E' preferibile la prima urina del mattino. Nella maggior parte dei casi, lo screening con "dipstick" è accettabile per rivelare la proteinuria. I "dipstick" convenzionali sono accettabili per rivelare una proteinuria aumentata. "Dipstick" specifici per l'albumina sono accettabili per rivelare l'albuminuria. Esami di conferma sono raccomandati, inclusi PCR o ACR. Linee guida specifiche per adulti: per lo screening di adulti a rischio elevato di CKD, l'albumina dovrebbe essere misurata con "dipstick" specifico per albumina o mediante ACR in urine "spot". Linee guida specifiche per diabetici: i diabetici dovrebbero essere sottoposti a screening per CKD una volta all'anno. Lo screening dovrebbe cominciare 5 anni dopo la diagnosi in caso di diabete mellito di tipo 1 o a partire dalla diagnosi in caso di diabete mellito di tipo 2. Lo screening dovrebbe includere la determinazione di ACR su urine "spot". Sono raccomandati esami di conferma/ripetizione.	mg/g
Caring for Australians with Renal Injury (CARI) (7)	Per popolazioni ad alto rischio, l'esame iniziale è PCR. Per i pazienti diabetici, aborigeni e abitanti di Torres Strait, l'esame iniziale è ACR. E' raccomandata la ripetizione dell'esame. Metodi di misura: il metodo dovrebbe essere scelto in base a criteri di considerazione pratica come la facilità di uso, l'accettabilità per il paziente e i costi. Per l'esame iniziale di albuminuria, il campione della prima urina del mattino è preferibile; tuttavia, ACR su campione "random" è accettabile. Esami di conferma sono raccomandati: PCR è indicato come esame accurato per la diagnosi di proteinuria significativa.	Una tabella mostra l'utilizzo di g/die, mg/dL e mg/mmol
UK Joint Specialty Committee on Renal Medicine of the Royal College of Physicians of London and the Renal Association (8)	L'albumina urinaria dovrebbe essere misurata con un metodo di laboratorio (quantitativo) sulla prima urina del mattino (campione preferito) o su urina "random" da mitto intermedio ed espressa come ACR. Se sono usati "dipstick" specifici per l'albumina urinaria, i risultati positivi dovrebbero essere confermati con esami di laboratorio. Indicazioni per la misura: pazienti diabetici con proteinuria persistente non necessitano di misure dell'albumina urinaria. Tutti gli altri pazienti diabetici dovrebbero sottoporsi, come minimo annualmente, alla determinazione dell'albuminuria. Al momento non esiste necessità documentata di screening per albuminuria in pazienti non diabetici. Non è necessaria la raccolta delle urine delle 24 ore per la quantificazione della proteinuria nell'assistenza di base. Esami di conferma e ripetizione sono raccomandati, inclusi ACR o PCR. L'analisi della proteinuria con "dipstick" è indicata come parte della valutazione iniziale in pazienti con recente evidenza di GFR <60 mL/min 1,73 m^2, recente evidenza di ematuria e diverse altre condizioni. Non si raccomanda lo screening urinario in altri gruppi.	mg/mmol
UK Renal Association Clinical Practice Guidelines (9)	Nei pazienti in valutazione o trattati per CKD, la proteinuria identificata con "dipstick" dovrebbe essere confermata con PCR o con ACR, preferibilmente su campione di prima urina del mattino.	Nessuna
UK National Institute for Clinical Excellence (NICE) (10)	In tutti i pazienti con diabete mellito di tipo 2, misurare ACR o la concentrazione di albuminuria annualmente. Usare la prima urina del mattino, dove possibile; usare metodi di laboratorio o "near-patient test" specifici per albuminuria. Sono raccomandati esami di conferma.	mg/mmol
US National Kidney Foundation (K/DOQI) (11)	Nei pazienti con CKD o ipertensione arteriosa, determinare ACR o PCR sulla prima urina del mattino o su urine "spot".	mg/g

ACR, rapporto concentrazione urinaria albumina/creatinina; PCR, rapporto concentrazione urinaria proteine/creatinina; CKD, malattia renale cronica; GFR, velocità di filtrazione gloremulare.

Tabella 2
Fattori preanalitici che possono influenzare la escrezione urinaria di albumina

Fattore	Effetto	Conseguenze sulla determinazione dell'albumina urinaria
Esercizio fisico	Aumento	La misura non dovrebbe essere eseguita dopo un esercizio fisico strenuo (l'evidenza non è del tutto univoca)
Febbre	Aumento	La misura non dovrebbe essere eseguita nei primi 3 giorni dalla scomparsa della febbre
Batteriuria asintomatica	Nessuno	La screening per batteriuria asintomatica non è necessario
Postura (ortostatismo)	Aumento	Un'escrezione aumentata di albumina in un giovane o in un adolescente dovrebbe essere confermata su un campione della prima urina del mattino

basso di quello del ACR ottenuto ad intervalli tra settimane o tra mesi. Tuttavia, la variabilità del CVi tra diversi studi è ampia ed è probabilmente dovuta a differenze tra i metodi usati (ad es., fattori preanalitici come la conservazione del campione prima della analisi) e a fattori correlati al calcolo del CVi (come la esclusione degli "outliers" e l'esame dell'omogeneità delle varianze). La omissione di questi ultimi due fattori tende ad aumentare il CVi riportato. E' interessante osservare che il CVi del ACR o della concentrazione dell'albumina non sono stati esaminati con attenzione nei campioni di urina "random", anche se ci sono studi che indicano un più alto valore di CVi in questa situazione (34, 35). E' stato dimostrato che il campione della seconda urina del mattino era confrontabile con il campione delle 24 ore in termini di CVi (36) e alcuni studi che impiegavano i campioni della seconda urina del mattino davano valori di CVi confrontabili con quelli ottenuti con la prima urina del mattino. Nessun confronto diretto tra il primo e il secondo campione del mattino è stato realizzato in uno stesso studio.

Raccolta e conservazione del campione

A basse concentrazioni di albumina nella urina l'adsorbimento sulla superficie del contenitore può portare a perdite significative della proteina. Il legame di un "monolayer" di albumina alla superficie richiede circa 0,15 μg/cm^2 (37). L'adsorbimento non specifico dell'albumina urinaria è stato calcolato pari a meno di 1 mg/L su superfici idrofiliche e a meno di 2 mg/L su superfici non-idrofiliche (38). Il legame dà anche luogo ad una certa denaturazione e sia l'adsorbimento che la denaturazione possono essere ridotte con l'uso di un contenitore di materiale idrofilico o l'aggiunta di un detergente non-ionico (39, 40). L'albumina appare sufficientemente stabile sulla interfaccia aria-liquido quando si forma schiuma per la rapida agitazione (41).

Ci sono state varie raccomandazioni riguardo la conservazione nel lungo periodo e la stabilità dei campioni per la analisi dell'albuminuria (42-46). Dati recenti suggeriscono che i campioni di urine siano stabili per lunghi periodi se conservati a -80 °C. La conservazione a temperature superiori, in particolare a -20 °C, risulta in varie modificazioni della molecola (46-50).

Per la misura nel laboratorio clinico l'urina fresca raccolta da mitto intermedio è il campione preferibile. L'albumina è in genere stabile nell'urina conservata a 2-8 °C per una settimana (36, 42). La influenza dei batteri e delle proteasi non è stata ben studiata, ma entrambi possono causare modifiche in alcuni campioni. Nell'urina refrigerata o congelata si formano spesso precipitati e il loro effetto sulla misura dell'albumina non è stato investigato a fondo. I precipitati spesso si dissolvono quando l'urina è riportata a temperatura ambiente per la analisi. Lo scongelamento dell'urina a 37 °C è stato proposto per minimizzare i precipitati (51), ma potrebbe anche aumentare la attività delle proteasi. La centrifugazione dei campioni di urina torbidi può essere necessaria per rimuovere il materiale insolubile prima dell'analisi.

Raccolta del campione di urina e procedure di misura nella pratica clinica

Indagini conoscitive sulla pratica clinica hanno mostrato un'ampia differenza nella raccolta del campione, nella scelta del metodo di misura e nei limiti decisionali impiegati. Uno studio del 2002 ha descritto le modalità di misura dell'albumina urinaria negli ospedali e negli ambulatori del Montana (Stati Uniti) e ha riportato che solo il 43% e il 46%, rispettivamente, usavano i cut-off raccomandati dalla "American Diabetes Association" o dalla "National Kidney Foundation" (52). Uno studio realizzato in Francia nel 2003 riguardante medici di medicina generale nella cura di pazienti diabetici ha dimostrato che solo il 36% eseguiva la misura dell'albumina urinaria e che solo la raccolta delle urine per 24 ore era considerata idonea (53). Un'indagine condotta nel 2005 tra i centri di diabetologia pediatrica inglesi ha riportato che la misura del ACR era prevalentemente eseguita su urina del mattino (81%), mentre le raccolte temporizzate "overnight" e 24 ore erano usate nel 14% e nel 5% dei casi, rispettivamente (54).

Nel 2006, una valutazione tramite questionario dell'impiego dell'esame dell'albumina urinaria in medicina generale è stata condotta in 9 paesi europei, con riscontri ottenuti da 2078 medici di base (55). I campioni di urina "spot" erano utilizzati prevalentemente per la prima valutazione, mentre raccolte temporizzate erano maggiormente utilizzate in seconda battuta, specialmente in laboratori ospedalieri. Solo tra il 45% e il 77% dei medici di medicina generale richiedeva una seconda valutazione in caso di primo esame positivo. La presenza di strumenti analitici per l'analisi dell'albumina urinaria presso l'ambulatorio dei medici variava dal 4% al 88% nei vari paesi, con i valori più alti in Norvegia e Svezia e più bassi in Francia. I risultati erano espressi quantitativamente come ACR, soprat-

tutto in Scandinavia, mentre lo erano in modo semiquantitativo mediante strisce reattive negli altri paesi. In tutti i paesi, tranne l'Olanda, erano utilizzati 4 diversi modi di riportare il risultato: concentrazione (mg/L), escrezione per 24 ore (mg/24h), escrezione per minuto (μg/min) e ACR (mg/mmol o mg/g). Nella maggior parte dei paesi i curanti consideravano una variazione del 33% del risultati dell'albumina urinaria come clinicamente significativa, indipendentemente dal tipo di campione che era impiegato per l'analisi.

Nel 2006, un'indagine effettuata in Australia e Nuova Zelanda su 55 laboratori ha messo in luce una marcata differenza nella tipologia di campioni raccomandati e nelle modalità di raccolta, che includevano la raccolta per 24 ore, altri campioni temporizzati, urina "spot" e prima urina del mattino (56). I valori decisionali riportati variavano da 15 a 30 mg/L per l'albumina urinaria e da 1 a 3,6 mg/mmol (9-32 mg/g) per il ACR. Non c'era una relazione tra gli intervalli di riferimento e il tipo di strumento/metodo utilizzato.

FORME MOLECOLARI DELL'ALBUMINA NELLE URINE

Il contenuto e le forme molecolari dell'albumina nell'urina possono essere diversi rispetto a quelli del plasma a causa della diversa filtrazione renale e dell'"uptake" tubulare di forme modificate di albumina; inoltre, modificazioni possono avvenire per proteolisi del campione durante il passaggio attraverso il tratto urinario. Altre modificazioni chimiche sono causate da agenti ossidanti, radicali liberi e da alcuni ligandi concentrati nella urina. Infine, possono essere rilevanti le modificazioni durante la conservazione del campione.

Struttura dell'albumina

Le proprietà strutturali dell'albumina plasmatica sono state descritte da Peters (57). Il gene per l'albumina umana codifica per un precursore, la preproalbumina, che è processato in sede intracellulare a formare la proteina plasmatica matura (585 amminoacidi), secreta dagli epatociti. Il polipeptide dell'albumina non è soggetto a modificazioni post-traduzionali in sede intracellulare. Un elevato numero di amminoacidi di carattere acido contribuisce ad una carica netta tra -15 e -20 a pH neutro, ad un pI vicino a 5 e all'elevata solubilità in acqua. La cristallografia ai raggi X mostra una proteina dalla forma simile al cuore, con tre domini globulari a forma di V (58, 59), L'albumina è stabilizzata da 17 ponti disolfuro interni e da un elevato contenuto strutturale in α-eliche, risultando in una molecola abbastanza resistente alla denaturazione (57). Dal punto di vista idrodinamico, l'albumina in soluzione si comporta come un cilindro dalla lunghezza di 14 nm. La conformazione allungata e le elevate dimensioni idrodinamiche possono essere importanti per ridurre la sua filtrazione glomerulare.

Gli alleli mutanti per l'albumina sono espressi in meno di 1 su 1000 soggetti (57) e perciò dovrebbero raramente influenzare l'analisi quantitativa dell'albumina. Alcune mutazioni puntiformi influenzano la "clearance" renale dell'albumina, producendo, in diverse proporzioni, un'albumina modificata nelle urine, piuttosto che nel siero (60).

Il pH usuale dell'urina (pH 5-8) non influenza la forma dell'albumina. Sotto il pH di 4 e sopra 8, l'albumina subisce importanti modificazioni conformazionali, la maggior parte delle quali è reversibile (57). La concentrazione massima di urea nell'urina è di 1 mol/L e non dovrebbe causare denaturazione (57).

L'albumina possiede fino a 6 siti di legame per molecola per acidi grassi liberi a catena lunga. Nel plasma vi è usualmente circa un acido grasso per molecola di albumina, ma questo rapporto può aumentare di parecchie volte con lo stress, l'esercizio fisico la terapia eparinica. La quantità di acidi grassi legati può alterare la mobilità dell'albumina nell'elettroforesi in condizioni non-denaturanti e nella isoelettrofocalizzazione (61, 62).

L'albumina è un trasportatore di numerose molecole organiche di basso PM e di ioni (57, 63-68). Il legame di queste molecole potrebbe influenzare la conformazione dell'albumina (57, 66, 69). Diversi altri composti endogeni, come il rame e la tiroxina, si legano all'albumina, ma occupano meno del 1% delle molecole di albumina nel plasma. La bilirubina occupa una piccola parte delle molecole di albumina, eccetto che negli stati di grave iperbilirubinemia, in cui più della metà dell'albumina in circolo può avere la bilirubina come ligando. Alle concentrazioni fisiologiche del plasma, 1-2 ioni calcio e 7-8 ioni cloro sono legati ad una molecola di albumina (67, 68). Il legame di questi ioni è pH-dipendente e perciò variabile nell'urina, e gli ioni potrebbero rapidamente dissociarsi o scambiarsi con altri ioni durante la analisi.

L'urina è ricca rispetto al plasma di peptidi a basso PM e di derivati amminoacidici come l'acido ippurico e la fenilacetilglutammina (47, 70, 71). Su base molare, la concentrazione urinaria di queste sostanze eccede quella dell'albumina e quindi si può verificare un legame tra queste e l'albumina (70, 71). Nel plasma, l'albumina si lega anche ad una ampia serie di peptidi con affinità e stechiometria di legame poco noti (72, 73).

L'albumina contiene due siti di legame (sito di Sudlow I e II) per numerosi farmaci e composti endogeni (63). Alcuni di questi composti, come salicilati, sulfamidici e penicilline, si trovano ad alta concentrazione nell'urina.

Forme di albumina modificate in modo covalente

L'albumina contiene in posizione 34 un residuo di cisteina in forma libera. Esso ha un pK insolitamente basso, pari a 5, che dà luogo ad una reattività e ad una cinetica aumentate nella formazione di legami disolfuro e allo scambio con altre molecole e composti del plasma contenenti gruppi tiolici (57, 74, 75). L'albumina può formare dei dimeri attraverso legami disolfuro, con due monomeri di albumina legati dal residuo cys34; in alternativa la cisteina può essere ossidata ad acido solfonico (57, 76). L'albumina, attraverso varie modificazioni della cys34, ha diverse proprietà di legame per numerosi ligandi, con la possibilità di importanti modifiche conformazionali (57, 77). Dimeri di albumina, legati soprattutto

da ponti disolfuro, sono stati osservati in campioni di urina (47, 78-82).

L'albumina ha una lunga emivita (circa 20 giorni), che le consente di andare incontro a varie modificazioni di tipo chimico (57, 83). Reazioni che coinvolgono le catene laterali degli amminoacidi danno luogo alla formazione di gruppi carbonili, di carbossimetillisina e di prodotti di glicazione avanzata su una piccola porzione delle molecole di albumina presenti in circolo (76, 84, 85). Sono stati anche dimostrati "cross-links" di ditirosina (77). Nel plasma, da 1% a 10% delle molecole di albumina sono glicate per reazione con il glucosio, con concentrazioni più elevate nei soggetti diabetici (57, 86). La maggior quantità di albumina glicata presente nelle urine rispetto al plasma è stata attribuita ad una minore efficienza nel riassorbimento tubulare della forma glicata (86). Il riassorbimento tubulare di albumina è un processo mediato da recettori dotati di elevata specificità (87, 88).

Frammentazione dell'albumina

Diversi frammenti di albumina con PM >5 kDa sono stati identificati nell'urina (47, 78-81, 89-94). E' stato dimostrato che la quantità di questi frammenti aumenta in corso di malattia renale (78-81) e probabilmente anche con la conservazione dell'urina a -20 °C (47). Le sequenze di alcuni frammenti di elevate dimensioni nelle urine sono state identificate anche nel plasma, suggerendo una loro derivazione plasmatica (81).

Frammenti di albumina di 500-5000 Da sono stati dimostrati nel plasma e nell'urina (95-103). Alcuni si accumulano nel plasma di pazienti con insufficienza renale. La filtrazione glomerulare è un processo dipendente dalla carica e dalle dimensioni e frammenti piccoli con carica positiva dovrebbero essere rapidamente rimossi dal rene in condizioni fisiologiche (104, 105).

Diverse forme troncate di albumina sono state dimostrate nel plasma, con delezione di 1-2 amminoacidi N-terminali (106) o di 1-6-13 amminoacidi C-terminali (107, 108). L'albumina priva del residuo C-terminale di leucina costituisce il 4-15% dell'albumina di soggetti normali (107) e può diventare la forma prevalente in soggetti con malattie gravi (107, 108). Le proteasi lungo il tratto urinario e nelle urine possono generare frammenti di albumina o modificare ulteriormente tali frammenti (109-111); tali proteasi sono coinvolte anche nelle modifiche indotte dalla conservazione del campione. Una parte di albumina captata dalle cellule tubulari può essere in parte degradata e i frammenti risultanti possono ritornare nelle urine (112).

Influenza sulla misura delle forme molecolari di albumina nelle urine

I metodi immunologici sono i più utilizzati per la misura dell'albumina urinaria. L'albumina umana è altamente antigenica in molte specie animali (57). La risposta policlonale nel coniglio è diretta contro almeno 5 diversi siti antigenici (113), indicando che gli "immunoassay" con impiego di anticorpi policlonali dovrebbero poter reagire con la maggior parte delle forme di albumina modificata. L'esistenza di numerosi siti antigenici è anche suggerita dall'osservazione che un metodo immunoturbidimetrico riconosceva l'albumina tagliata in 3 frammenti dal trattamento con cianogeno bromuro, l'albumina modificata chimicamente e albumine di specie animali che differivano per più del 20% nella composizione di amminoacidi rispetto alla forma umana (47).

METODI IN USO PER MISURARE L'ALBUMINA URINARIA

Concentrazioni di albumina nella urina <150 mg/L sono inferiori al limite di rilevazione delle strisce reattive colorimetriche in uso per l'esame completo delle urine. Gli "immunoassay" di tipo turbidimetrico, nefelometrico e in formato "sandwich" hanno limiti di rivelazione di 2-10 mg/L (114, 115). I metodi di routine impiegano sia anticorpi policlonali che monoclonali, che possono avere diversa affinità per forme di albumina alterate o suoi frammenti.

La cromatografia liquida per gel-filtrazione è stata impiegata come metodo alternativo e dà valori più elevati rispetto agli "immunoassay" nella maggior parte dei campioni. Questa osservazione ha portato alla controversa ipotesi che la cromatografia per gel-filtrazione sia in grado di rivelare una forma di albumina non evidenziata dagli "immunoassay" (114, 116-118). Questa ipotesi è stata messa in dubbio dalla documentata reattività degli antisieri policlonali per siti antigenici multipli dell'albumina (82, 113). Inoltre, il picco cromatografico della gel-filtrazione corrispondente all'albumina includeva altre molecole urinarie di PM simile a quello dell'albumina, incluse numerose proteine (82).

Prestazioni dei metodi di misura dell'albumina urinaria

Non esistono dati sulla comparabilità dei risultati tra metodi e tra laboratori su campioni di urina fresca. Di conseguenza, abbiamo esaminato la variazione tra metodi e tra laboratori nei dati dei programmi di VEQ. In linea di principio, i campioni utilizzati in tali schemi dovrebbero riflettere il contenuto e la composizione di albumina dei campioni nativi ed essere commutabili. In pratica, i campioni di urina usati nei programmi di VEQ sono frequentemente preparati per aggiunta di albumina e creatinina e possono includere altri analiti, stabilizzatori e additivi per il controllo del pH. Tali campioni possono avere una matrice meno complessa e contenere molecole di albumina più omogenee di quelle che si trovano nelle urine native, rendendo i risultati delle VEQ più uniformi di quanto si osserverebbe con urina nativa.

La Tabella 3 dimostra che gli organizzatori di VEQ usano materiali diversi, trattandoli in maniera differente. Campioni costituiti da urina nativa in forma liquida in assenza o con limitate aggiunte di albumina e creatinina purificate sono probabilmente più commutabili. L'esperienza del "Norwegian Center for Quality Assurance in Primary Healthcare" (NOKLUS) indica che

Tabella 3
Sommario dei programmi di VEQ disponibili in vari paesi, con descrizione dei materiali usati per la misura dell'albumina urinaria

Programma	Tipo di campione	Condizioni di preparazione	Trattamento prima della distribuzione ai partecipanti	Modalità di distribuzione ai partecipanti	Commutabilità[a]
EQUALIS (Svezia)	Urina normale	Aggiunta di benzamidinio cloruro all'urina normale. Campione dapprima congelato, poi scongelato e filtrato. Aggiunta di albumina e ricongelamento a -80 °C	Il campione è scongelato, diluito con NaCl e aggiunta la creatinina	Liquido a temperatura ambiente	Dubbia
Labquality (Finlandia, Norvegia)	Urina normale	Urina fresca	Supplementazione con albumina e creatinina	Liquido a temperatura ambiente	Dubbia
NOKLUS (Norvegia)	Urina da pazienti con albuminuria	Urina congelata a -80 °C	Scongelata e filtrata in condizioni di sterilità	Liquido a temperatura ambiente	Sì
QMP-LS (Ontario, Canada)	Da singolo paziente con albuminuria	Urina da un secondo paziente con albuminuria puo' essere aggiunta per ottenere la concentrazione desiderata	Conservata a 4 °C	Liquido, spedito refrigerato	Sì
Digital PT (British Columbia, Canada)	Urina sintetica stabilizzata	Urina liquida a 4 °C	Liquida a 4 °C	Liquido, spedito refrigerato	Sconosciuta
CAP (Stati Uniti)	Urina normale	Sono aggiunti albumina, creatinina, altri analiti e conservanti	Conservata a 4 °C	Liquido, spedito refrigerato	Sconosciuta
RCPA-QAP (Australia)	Urina normale	Sono aggiunti albumina, creatinina e altre sostanze. Segue liofilizzazione	Dopo liofilizzazione, conservazione a 4 °C	Liofilo	No

[a]La stima della commutabilità rispetto ad urina fresca da pazienti con aumentata escrezione di albumina è basata su considerazioni teoriche relative alla preparazione del campione della VEQ; la commutabilità non è stata sperimentalmente dimostrata per alcun materiale. Per maggiori informazioni, vedi testo.
EQUALIS, "External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden"; NOKLUS, "Norwegian Quality Improvement of Primary Care Laboratories"; QMP-LS, "Quality Management Programme-Laboratory Services"; PT, "Proficiency Testing"; CAP, "College of American Pathologists"; RCPA-QAP, "Royal College of Pathologists of Australasia-Quality Assurance Programs".

urine di pazienti con albuminuria si comportano in modo diverso, se determinate con lo stesso metodo, rispetto ad urine normali con aggiunte di albumina purificata. La commutabilità diventa più critica col crescere di processazione e manipolazione del campione. E' probabile che campioni che sono stati liofilizzati non siano più commutabili con i campioni nativi. I campioni non commutabili sono utili limitatamente alla sola valutazione della concordanza dei risultati all'interno di un gruppo omogeneo per metodo/strumento e non possono essere utilizzati per confronti tra metodi diversi.

La Tabella 4 riporta degli esempi di risultati osservati in diversi programmi di VEQ eseguiti in vari paesi. Quando si suppone che il materiale di controllo sia, con ragionevole probabilità, commutabile, i dati dei partecipanti sono combinati per rappresentare una prestazione analitica aggregata tra metodi e laboratori. Quando è meno probabile che il materiale di controllo sia commutabile, i dati sono distinti per metodo per dare una stima della prestazione analitica tra laboratori utilizzanti lo stesso metodo. Tutte le VEQ escludono gli "outliers" (con procedure statistiche diverse) prima dell'analisi statistica. L'intervallo corrispondente a ±2 DS era calcolato per fornire una stima dell'intervallo contenente il 95% dei risultati riportati.

Tutte le VEQ hanno dimostrato una variabilità tra laboratori e tra metodi (Tabella 4). La variabilità tra laboratori utilizzanti lo stesso metodo era più bassa della variabilità interlaboratorio tra metodi, suggerendo differenze tra le calibrazioni dei vari metodi. E' difficile stabilire se le prestazioni analitiche correnti rispettino le necessità cliniche, poiché queste ultime non sono state definite rispetto all'"outcome" clinico. Se la specifica di qualità per l'imprecisione della misura dell'albumina urinaria è posta a ½ della CVi e il valore di quest'ultima è considerato pari al 40%, i risultati delle VEQ sembrano ottemperare questo requisito. Il "bias" non può essere valutato perché non è disponibile un sistema di riferimento.

UN SISTEMA DI RIFERIMENTO PER LA MISURA DELL'ALBUMINA URINARIA

Un sistema di riferimento per l'albumina urinaria richiede materiali di riferimento (RM) primario e secondario (in matrice) e una procedura di riferimento (RMP), con la quale l'esattezza dei valori assegnati ad un RM può essere trasferita al campione dei pazienti attraverso la gerarchia di misurazioni propria della catena della riferibilità (119). Al momento, il "Joint Committee for

Tabella 4
Variazione dei risultati di albumina urinaria osservata in programmi VEQ di diversi paesi[a]

Programma	n	Mediana o media, mg/L	CV, %	Intervallo ±2 DS
EQUALIS	200	20	10,8	16-25
EQUALIS	200	31	8,2	26-37
Labquality	136	19	15,4	14-25
Labquality	136	76	8,9	63-89
QMP-LS	28	20	16,5	14-26
QMP-LS	29	22	10,9	17-26
QMP-LS	28	58	6,9	50-66
NOKLUS (studi medici)	1012	35	12,1	27-44
NOKLUS (turbidimetria)	430	20	6,6	17-44
NOKLUS (turbidimetria)	424	68	5,2	61-74
Digital PT	38	36	11,3	28-44
Digital PT	37	74	8,4	61-86
CAP metodo A, turbidimetria	262	25	10,4	20-27
CAP metodo A, turbidimetria	207	87	5,1	79-92
CAP metodo B, turbidimetria	203	27	6,9	23-29
CAP metodo B, turbidimetria	194	83	3,1	78-85
CAP metodo C, turbidimetria	162	30	7,1	26-32
CAP metodo C, turbidimetria	123	88	4,5	80-92
CAP metodo D, turbidimetria	118	26	5,0	24-28
CAP metodo D, turbidimetria	86	84	3,8	78-87
CAP metodo E, turbidimetria	76	24	6,2	21-25
CAP metodo E, turbidimetria	112	87	4,9	78-91
CAP metodo F, turbidimetria	96	26	10,1	21-29
CAP metodo F, turbidimetria	82	89	4,9	81-94
CAP metodo G, nefelometria	95	27	6,2	23-28
CAP metodo G, nefelometria	79	86	5,3	76-90
CAP metodo H, nefelometria	97	26	7,0	23-28
CAP metodo H, nefelometria	69	93	4,5	84-97
RCPA metodo A, turbidimetria	30	36	8,5	30-42
RCPA metodo A, turbidimetria	30	83	5,8	73-93
RCPA metodo B, nefelometria	20	35	10,5	28-42
RCPA metodo B, nefelometria	20	85	6,2	74-95

[a]Quando è indicato il metodo, il dato riflette la variabilità intra-metodo tra laboratori; diversamente, è mostrata la variabilità tra metodi e tra laboratori.
EQUALIS, "External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden"; QMP-LS, "Quality Management Programme-Laboratory Services"; NOKLUS, "Norwegian Quality Improvement of Primary Care Laboratories"; PT, "Proficiency Testing"; CAP, "College of American Pathologists"; RCPA, "Royal College of Pathologists of Australasia".

Traceability in Laboratory Medicine" (JCTLM) non riporta la disponibilità di RM e/o RMP per l'albumina urinaria (120).

Un RM da utilizzarsi per la calibrazione dei metodi di routine dovrebbe essere commutabile con l'urina nativa per tutte le metodiche. Questo significa che i metodi di routine devono mostrare una reattività immunochimica equivalente per l'albumina contenuta nel RM e nei campioni di urina nativa. La commutabilità è più difficile da definire per i campioni urinari perché la matrice è molto variabile nelle diverse condizioni patologiche e il misurando non è ben definito. Un RM che contenga albumina altamente purificata potrebbe non riflettere le varie forme molecolari di albumina presenti nell'urina in condizioni native. Tuttavia, l'uso di albumina purificata in un RM potrebbe risultare l'approccio più pratico per ottenere una calibrazione standardizzata dei metodi di routine.

Materiali e metodi in uso come riferimento per la calibrazione dei metodi di misura dell'albumina urinaria

Poiché non è disponibile un RM per l'albumina urinaria, la maggior parte dei metodi di routine sono calibrati per essere riferibili al CRM470 (Institute of Reference Materials and Methods) opportunatamente diluito. Questo è un RM per le proteine del siero con una concentrazione di albumina di 39,7 g/L (121). Non sono stati pubblicati protocolli di diluizione condivisi per la preparazione di concentrazioni di albumina adatte alla calibrazione dei metodi per l'albumina urinaria. La concentrazione di albumina nel CRM470 è stata assegnata basandosi su un precedente RM, chiamato USNRP 12-0575C (122). Tuttavia, la struttura della proteina, le sue proprietà chimico-fisiche e la procedura per l'assegnazione della concentrazione del materiale USNRP 12-0575C non sono state del tutto chiarite (121). Un gruppo di lavoro dell'IFCC ha tentato di produrre un RM per le proteine urinarie, inclusa l'albumina, ma tale progetto non è stato concluso (123).

Investigatori giapponesi hanno riportato che il 5-10% dei calibratori usati negli "immunoassay" contiene albumina polimerizzata (51). Lo stesso studio rivelava che alcuni metodi utilizzavano CRM470 diluito come base per la assegnazione del valore del calibratore, mentre altri usavano il coefficiente di estinzione molare dell'albumina umana nel siero.

Proposta per un materiale di riferimento per l'albumina urinaria

La società giapponese di Biochimica Clinica (JSCC) e il "Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards" hanno coordinato la preparazione di un nuovo RM per l'albumina urinaria, con struttura e proprietà chimico-fisiche dell'albumina ben definite (124). Il RM è stato preparato con albumina umana monomerica pura al 97% in una matrice di NaCl 0,5 mol/L, saccarosio 20 g/L, NaN_3 0,5 g/L in tampone fosfato 20 mmol/L, pH 7,3. Il materiale mostrava una differenza tra una ampolla e l'altra <3% ed era stabile per più di 1 anno a 5-10 °C e 20 ore dopo la ricostituzione con acqua sia a 10 °C che a 25 °C. Poiché non è disponibile alcuna RMP per l'albumina urinaria, il valore di concentrazione al RM è stato assegnato utilizzando CRM470 diluito, mediante metodi analitici di routine di tipo immunometrico (124). In particolare, 13 sistemi analitici partecipanti allo studio mostravano un'identica reattività con il RM candidato e con il CRM470 diluito. La concentrazione assegnata al materiale candidato ricostituito con 3 mL di acqua [media, 226,1 (incertezza 8,4) mg/L] era derivata dalla media delle concentrazioni determinate con ciascun metodo di routine secondo una procedura di "value transfer" dal CRM470. Gli investigatori giapponesi progettano di validare la commutabilità del nuovo RM e di sottoporlo al JCTLM per l'approvazione. Essi stanno anche valutando l'uso di albumina umana ricombinante per sviluppare un RM primario, basato sulla stessa tecnologia utilizzata per sviluppare il RM sopradescritto.

Proposta per una procedura di riferimento per la misura dell'albumina urinaria

Una RMP dovrebbe misurare specificamente l'albumina presente nell'urina nativa. A causa della eterogeneità delle forme molecolari di albumina nella urina, il misurando deve essere accuratamente definito. Le procedure immunologiche non sono adatte come RMP, poiché gli anticorpi di diversi metodi possono reagire in modo diverso con gli epitopi dell'albumina o i suoi frammenti e, inoltre, differenti principi di misura possono dare risultati diversi.

Ricercatori della "Mayo Clinic" di Rochester (Stati Uniti) hanno recentemente sviluppato un metodo in cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) che misura il frammento N-terminale di albumina della lunghezza di 24 amminoacidi. Il metodo utilizza una frammentazione indotta all'origine, messa a punto per ovviare alla necessità della digestione con tripsina e a potenziali problemi relativi a incompleta digestione. Risultati comparabili sono stati ottenuti sia usando come standard interno albumina marcata con ^{15}N preparata in cellule di lievito (125) che la meno costosa albumina bovina (126). La calibrazione era basata su urina supplementata con albumina umana commerciale, la cui concentrazione era determinata attraverso il suo coefficiente di estinzione molare a 280 nm [38553 L/(mol-cm)] (127). Poiché la procedura quantifica uno specifico frammento di albumina, sarà necessario studiare in che quantità l'urina normale o in condizione patologiche contenga frammenti di albumina con questi 24 amminoacidi o molecole di albumina troncate sul lato N-terminale. L'uso della LC-MS per rilevare altri frammenti di albumina potrebbe facilitare lo studio della natura, della quantità e la rilevanza clinica delle forme di albumina urinaria nelle malattie renali e cardiovascolari. La tecnologia LC-MS, non essendo basata su anticorpi, può essere sviluppata per diventare una RMP per la misura dell'albumina urinaria.

Un sistema di riferimento per la misura della creatinina urinaria

La determinazione del ACR si basa sulla misura dell'albumina e della creatinina nella urina. La variabilità dei valori di ACR calcolati rifletterà l'inesattezza e l'imprecisione combinate della misura di entrambi gli analiti. La standardizzazione di entrambe le misure di albumina e di creatinina nell'urina è necessaria per ottenere valori comparabili di ACR con differenti metodi e in diversi luoghi.

Il programma di standardizzazione per la misura della creatinina sierica iniziato dal NKDEP è basato sull'esistenza di una RMP validata e di RM secondari commutabili. Un simile percorso è necessario per promuovere misure di qualità elevata della creatinina nelle urine. Il JCTLM elenca una RMP per la misura della creatinina urinaria basata sulla gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) con diluizione isotopica (128) e un RM primario (sostanza pura) certificato per la creatinina (SRM 914a, National Institute for Standards and Technology). Non sono, tuttavia, disponibili RM secondari in matrice per la creatinina urinaria. A causa della man-

canza di RM secondari certificati per la creatinina urinaria, la calibrazione dei metodi di routine è spesso realizzata con RM basati su siero. Questa pratica non è, tuttavia, ideale, poiché esistono importanti differenze tra la matrice del siero e quella dell'urina.

CONCLUSIONI

Numerosi aspetti richiedono chiarificazione per migliorare l'uso della misura dell'albumina urinaria per la valutazione della malattia renale. Le informazioni esistenti in questo momento non consentono di trarre conclusioni definitive o raccomandazioni operative. Ulteriori studi sono necessari per ottenere informazioni ed evidenze obiettive che consentano la standardizzazione della misura dell'albumina urinaria e la stesura di linee guida di pratica clinica che siano basate sulla sua misura. Il gruppo di lavoro NKDEP/IFCC intende sviluppare specifici programmi sperimentali in proposito.

Aspetti sui quali i partecipanti alla conferenza hanno espresso consenso

1 L'uso del termine ''albumina urinaria'' è raccomandato; è sconsigliato l'uso del termine "microalbumina''.
2. I campioni della prima urina del mattino hanno una variabilità più bassa dei campioni "spot".
3. La seconda urina del mattino può anche essere accettabile, ma non vi è evidenza che questa prassi sia superiore alla raccolta della prima urina del mattino.
4. L'albumina urinaria dovrebbe essere misurata in campioni che non sono stati congelati. L'albumina nella urina è sufficientemente stabile per 7 giorni a 2-8 °C prima della misura. Ogni torbidità dovuta a precipitati o a componenti cellulari dovrebbe essere rimossa per centrifugazione prima della conservazione refrigerata del campione.
5. L'urina refrigerata dovrebbe essere portata a temperatura ambiente prima della misura per dissolvere i precipitati, che possono essersi formati, e distaccare l'albumina adsorbita alle pareti del contenitore. L'urina dovrebbe essere ispezionata visivamente per l'eventuale presenza di precipitati e centrifugata, se necessario, per rimuovere precipitati residui.
6. Se l'urina deve essere congelata prima della misura, essa deve essere conservata a -70 °C. Ogni torbidità dovuta a precipitati o a componenti cellulari dovrebbe essere rimossa per centrifugazione prima del congelamento del campione. Lo scongelamento dei campioni deve avvenire a temperatura ambiente, previo accurato mescolamento. L'effetto dello scongelamento/ricongelamento sulle forme molecolari di albumina nelle urine non è conosciuto.
7. ACR deve essere refertato in tutte le misure di albumina nelle urine.
8. Le diverse possibili unità di misura (mg albumina/mmol creatinina, g albumina/mol creatinina, mg albumina/g creatinina, μg albumina/mg creatinina) generano confusione. Questa situazione riflette differenti preferenze e abitudini regionali o nazionali ed è probabile che non possa essere facilmente risolta. Idealmente, dovrebbero essere utilizzate le unità di misura in accordo al Sistema Internazionale (SI). Nel frattempo, dovrebbero essere almeno adottate unifomi linee guida regionali o nazionali.
9. Le concentrazioni di albuminuria espresse in mg/L sono difficili da interpretare e non dovrebbero essere le sole unità di misura refertate.

Aspetti che richiedono ulteriori studi

1. Definizione dei requisiti preanalitici:
   a) influenza del tipo di contenitore,
   b) effetto del momento della raccolta del campione in relazione alla variabilità biologica (prima urina del mattino, seconda urina del mattino, urina "spot", urina delle 24 ore),
   c) interferenza da ematuria, liquido seminale e altri contaminanti fisiologici dell'urina.
2. Definizione delle forme molecolari dell'albumina presenti nell'urina appena emessa e definizione del misurando.
3. Definizione dell'entità della degradazione dell'albumina urinaria in varie condizioni di conservazione.
4. Definizione della variazione nella composizione della matrice urinaria su cui la misura dell'albumina deve essere effettuata.
5. Definizione dei traguardi analitici per l'errore totale della misura dell'albumina urinaria.
6. Sviluppo di una RMP.
7. Sviluppo di un RM secondario per l'albumina urinaria, inclusa la valutazione della sua commutabilità e la sua approvazione da parte del JCTLM.
8. Sviluppo di un RM secondario per la creatinina urinaria, inclusa la valutazione della sua commutabilità e la sua approvazione da parte del JCTLM.
9. Identificazioni di materiali appropriati per la VEQ, che permetteranno di confrontare le prestazioni analitiche dei metodi di routine.
10. Risultati standardizzati sono necessari per consentire agli studi clinici di determinare livelli decisionali ottimali per AER e ACR.
11. Differenti livelli decisionali possono essere necessari per i campioni raccolti con la prima urina del mattino, urine "spot" o altre raccolte temporizzate, a causa dell'aumentata variabilità nei campioni "random".
12. ACR varia con l'età, il sesso e l'origine etnica. Un livello decisionale adatto a questi sottogruppi deve essere individuato. Un singolo cut-off può non essere adeguatamente sensibile in tutti i sottogruppi.
13. Il rischio di malattia renale e cardiovascolare è in relazione continua con la concentrazione di albumina urinaria. Il cut-off appropriato di rischio per una data popolazione deve essere individuato (popolazione generale, popolazioni ad alto rischio come diabetici, ipertesi e cardiopatici).
14. Implementazioni di studi sull'utilità di equazioni età e sesso specifiche per trasformare ACR in una stima di AER, per le quali un unico valore di riferimento può essere appropriato.

BIBLIOGRAFIA

1. Linksde Jong PE, Curhan GC. Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: public health perspectives. J Am Soc Nephrol 2006;17:2120-6.
2. American Diabetes Association Position Statement. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care 2007;30:S19-21.
3. International Diabetes Federation Clinical Guidelines Task Force. Global guidelines for type 2 diabetes; chapter 14: kidney damage. http://www.idf.org/webdata/docs/GGT2D%2014%20Kidney%20damade.pdf
4. Levey AS, Eckardt K, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from kidney disease: improving global outcomes (KDIGO). Kidney Int 2005;67:2089-100.
5. National Kidney Foundation. Kidney disease outcomes quality improvement (K/DOQI™) clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Am J Kidney Dis 2002;39:S1-266.
6. National Kidney Foundation. Kidney disease outcomes quality improvement (K/DOQI™) clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. Am J Kidney Dis 2007;49:S1-180.
7. Caring for Australians with Renal Injury (CARI) Guidelines. Urine protein as a diagnostic test. 2004. www.cari.org.au/ckd_urineprot_list_pub2004.php
8. Joint Specialty Committee on Renal Medicine of the Royal College of Physicians and the Renal Association, and the Royal College of General Practitioners. Chronic kidney disease in adults: UK guidelines for identification, management and referral. London: Royal College of Physicians, 2006.
9. Taal M, Tomson C. Clinical practice guidelines: module 1: chronic kidney disease. 2nd ed., final version. Petersfield (UK): The Renal Association; 2007. http://www.renal.org/guidelines/module1.html
10. National Institute for Clinical Excellence. Management of type 2 diabetes: renal disease, prevention and early management (Guideline F); 2002. http://www.nice.org.uk/Guidance/F
11. National Kidney Foundation. K/DOQI™ clinical practice guidelines on hypertension and antihypertensive agents in chronic kidney disease. Am J Kidney Dis 2004;43:S1-290.
12. Estivi P, Urbino R, Tetta C, et al. Urinary protein excretion induced by exercise: effect of a mountain agonistic footrace in healthy subjects: renal function and mountain footrace. J Sports Med Phys Fitness 1992;32:196-200.
13. Poortmans J, Dorchy H, Toussaint D. Urinary excretion of total proteins, albumin, and beta 2-microglobulin during rest and exercise in diabetic adolescents with and without retinopathy. Diabetes Care 1982;5:617-23.
14. Senturk UK, Kuru O, Kocer G, et al. Biphasic pattern of exercise-induced proteinuria in sedentary and trained men. Nephron Physiol 2007;105:22-32.
15. Poortmans JR, Ouchinsky M. Glomerular filtration rate and albumin excretion after maximal exercise in aging sedentary and active men. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2006;61:1181-5.
16. Bertoluci MC, Friedman G, Schaan BD, et al. Intensity-related exercise albuminuria in insulin dependent diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 1993;19:217-25.
17. Huttunen NP, Kaar ML, Pietilainen M, et al. Exercise-induced proteinuria in children and adolescents. Scand J Clin Lab Invest 1981;4:583-7.
18. Vittinghus E, Mogensen CE. Graded exercise and protein excretion in diabetic man and the effect of insulin treatment. Kidney Int 1982;21:725-9.
19. Robertshaw M, Cheung CK, Fairly I, et al. Protein excretion after prolonged exercise. Ann Clin Biochem 1993;30:34-7.
20. Clerico A, Giammattei C, Cecchini L, et al. Exercise-induced proteinuria in well-trained athletes. Clin Chem 1990;36:562-4.
21. Garg SK, Chase HP, Shapiro H, et al. Exercise versus overnight albumin excretion rates in subjects with type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 1995;28:51-5.
22. O'Brien SF, Watts GF, Powrie JK, et al. Exercise testing as a long-term predictor of the development of microalbuminuria in normoalbuminuric IDDM patients. Diabetes Care 1995;18:1602-5.
23. Hemmingsen, L, Skaarup P. Urinary excretion of ten plasma proteins in patients with febrile diseases. Acta Med Scand 1977;201:359-64.
24. Solling J, Solling K, Mogensen CE. Patterns of proteinuria and circulating immune complexes in febrile patients. Acta Med Scand 1982;212:167-9.
25. Richmond JM, Sibbald WJ, Linton AM, et al. Patterns of urinary protein excretion in patients with sepsis. Nephron 1982;31:219-23.
26. Hernandez C, Simo R. Albumin excretion rate is not affected by asymptomatic urinary tract infection: a prospective study. Diabetes Care 2004;27:1565-9.
27. Carter JL, Tomson CR, Stevens PE, et al. Does urinary tract infection cause proteinuria or microalbuminuria? A systematic review. Nephrol Dial Transplant 2006;21:3031-7.
28. Watts GF, O'Brien SF, Shaw KM. Urinary infection and albumin excretion in insulin-dependent diabetes mellitus: implications for the measurement of microalbuminuria. Diabet Med 1996;13:520-4.
29. Dodge WF, West EF, Smith EH, et al. Proteinuria and hematuria in schoolchildren: epidemiology and early natural history. J Pediatr 1976;88:327-47.
30. Vehaskari VM, Rapola J. Isolated proteinuria: analysis of a school-age population. J Pediatr 1982;101:661-8.
31. Wagner MG, Smith FG Jr, Tinglof BO Jr, et al. Epidemiology of proteinuria: a study of 4,807 schoolchildren. J Pediatr 1968;73:825-32.
32. Rytand DA, Spreiter S. Prognosis in postural (orthostatic) proteinuria: forty to fifty-year follow-up of six patients after diagnosis by Thomas Addis. N Engl J Med 1981;305:618-21.
33. Springberg PD, Garrett LE Jr, Thompson AL Jr, et al. Fixed and reproducible orthostatic proteinuria: results of a 20-year follow-up study. Ann Intern Med 1982;97:516-9.
34. Watts GF, Shaw KM, Polak A. The use of random urine samples to screen for microalbuminuria in the diabetic clinic. Practical Diabetes 1986;3:86-8.
35. Witte EC, Lambers Heerspink HJ, Bakker SJL et al. Timed urine collections or spot urine samples to monitor albuminuria over time? J Am Soc Nephrol 2007;18:337A.
36. Hofmann W, Guder WG. A diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria. J Clin Chem Clin Biochem 1989;27:589-600.
37. Mura-Galelli MJ, Voegel JC, Behr S, et al. Adsorption/desorption of human serum albumin on hydroxyapatite: a critical analysis of the Langmuir model. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:5557-61.
38. Hara F, Shiba K. Nonspecific binding of urinary albumin on preservation tube. Jpn J Clin Chem 2003;32(suppl 1):28-9.
39. Nicholov R, Lum N, Veregin RPN, et al. Human serum albumin adsorption at solid-liquid interface monitored by electron spin resonance spectroscopy. In: Horbett TA,

Brash JL, eds. Proteins at interfaces II: fundamentals and applications. Washington (DC): American Chemical Society, 1995:280-95. (ACS symposium series, 0097-6165; 602).
40. Clark DC, Smith LJ, Wilson DR. A spectroscopic study of the conformational properties of foamed bovine serum albumin. J Colloid Interface Sci 1988;121:136-7.
41. Lad MD, Birembaut F, Matthew JM, et al. The adsorbed conformation of globular proteins at the air/water interface. Phys Chem Chem Phys 2006;8:2179-86.
42. Osberg I, Chase HP, Garg SK, et al. Effects of storage time and temperature on measurement of small concentrations of albumin in urine. Clin Chem 1990;36:1428-30.
43. MacNeil MLW, Mueller PW, Caudill SP, et al. Considerations when measuring urinary albumin: precision, substances that may interfere, and conditions for sample storage. Clin Chem 1991;37:2120-3.
44. Giampietro O, Penno G, Clerico A, et al. How and how long to store urine samples before albumin radioimmunoassay: a practical response. Clin Chem 1993;39:533-6.
45. Tencer J, Thysell H, Andersson K, et al. Long-term stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-chain-immunoreactivity, orosomucoid, and alpha 1-antitrypsin in urine stored at -20 degrees C. Scand J Urol Nephrol 1997;31:67-71.
46. Brinkman JW, de Zeeuw D, Duker JJ, et al. Falsely low urinary albumin concentrations after prolonged frozen storage of urine samples. Clin Chem 2005;51:2181-3.
47. Sviridov D, Drake SK, Hortin GL. Reactivity of urinary albumin (microalbumin) assays with fragmented or modified albumin. Clin Chem 2008;54:61-8.
48. Brinkman JW, de Zeeuw D, Lambers Heerspink HJ, et al. Apparent loss of urinary albumin during long-term frozen storage: HPLC vs immunonephelometry. Clin Chem 2007;53:1520-6.
49. Hara F, Nakazato K, Shiba K. Studies of diabetic nephropathy; I, effects of storage time and temperature on microalbuminuria. Biol Pharma Bull 1994;17:1241-5.
50. Elving LD, Bakkeren JAJM, Jansen MJH, et al. Screening for microalbuminuria in patients with diabetes mellitus: frozen storage of urine decreases their albumin content. Clin Chem 1989;35:308-10.
51. Uemura Y. Preparation of reference material for albumin without lot difference. Laboratory Med 2004;5:557-61.
52. Harwell TS, McDowall JM, Eyler N, et al. Laboratory testing for microalbuminuria in the general community. Diabetes Care 2000;23:1028-30.
53. Fagnani F, Souchet T, Labed D, et al. Management of hypertension and screening of renal complications by GPs in diabetic type 2 patients (France-2001). Diabetes Metab 2003;29:58-64.
54. Edge JA, Swift PG, Anderson W, et al. Youth and Family Advisory Committee of Diabetes UK. Diabetes services in the UK: fourth national survey; are we meeting NSF standards and NICE guidelines? Arch Dis Child 2005;90:1005-9.
55. Aakre KM, Thue G, Subramaniam-Haavik S, et al. Postanalytical external quality assessment of urine albumin in primary health care: an international survey. Clin Chem 2008;54:1630-6.
56. Jones G. Urine albumin sampling and reporting: current practice in Australasia. Clin Biochem Newsl 2006:31-3.
57. Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego, CA: Academic Press; 1996.
58. Carter DC, He XM, Munson SH, et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. Science 1989;244:1195-8.
59. Curry S, Mandelkow H, Brick P, et al. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. Nature Struct Biol 1998;5:827-35.
60. Iwao Y, Hiraike M, Kragh-Hansen U, et al. Changes in net charge and alpha-helical content affect the pharmacokinetic properties of human serum albumin. Biochim Biophys Acta 2007;1774:1582-90.
61. Merler E, Remington JS, Finland M, et al. Differences between urinary albumin and serum albumin. Nature 1962;196:1207-8.
62. Ghiggeri GM, Ginevri F, Candiano G, et al. Characterization of cationic albumin in minimal change nephropathy. Kidney Int 1987;32:547-53.
63. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. Mol Pharmacol 1976;12:1052-61.
64. Honore´ B. Conformational changes in human serum albumin induced by ligand binding. Pharmacol Toxicol 1990;66(suppl 2):7-26.
65. Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. Biol Pharm Bull 2002;25:695-704.
66. Ahmed-Ouameur A, Dianmantoglou S, Dedaghat-Herati MR, et al. The effects of drug complexation on the stability and conformation of human serum albumin: protein unfolding. Cell Biochem Biophys 2006;45:203-13.
67. Fogh-Andersen N. Albumin/calcium association at different pH, as determined by potentiometry. Clin Chem 1977;23:2122-6.
68. Fogh-Andersen N, Bjerrum PJ, Siggaard-Andersen O. Ionic binding, net charge, and Donnan effect of human serum albumin as a function of pH. Clin Chem 1993;39:48-52.
69. Fujiwara S, Amisaki T. Molecular dynamics study of conformational changes in human serum albumin by finding of fatty acids. Proteins 2006;64:730-9.
70. Hortin GL, Meilinger B. Cross-reactivity of amino acids and other compounds in the biuret reaction: interference with urinary peptide measurements. Clin Chem 2005;51:1411-9.
71. Norden AGW, Sharratt P, Cutillas PR, et al. Quantitative amino acid and proteomic analysis: very low excretion of polypeptides >750 Da in normal urine. Kidney Int 2004;66:1994-2003.
72. Lowenthal MS, Mehta AL, Frogale K, et al. Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. Clin Chem 2005;51:1933-45.
73. Lopez MF, Mikulski A, Kuzdzal S, et al. A novel, high-throughput workflow for discovery and identification of serum carrier protein-bound peptide biomarker candidates in ovarian cancer samples. Clin Chem 2007;53:1067-74.
74. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, et al. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. Clin Chem 1993;39:263-71.
75. Hortin GL, Seam N, Hoehn GT. Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins. Clin Chem 2006;52:2258-64.
76. Musante L, Candiano G, Petretto A, et al. Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. J Am Soc Nephrol 2007;18:799-810.
77. Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of albumin critically influence its binding properties. Br J Pharmacol 2007;151:580-90.
78. Wiggins RC, Kshrisagar B, Kelsch RC, et al. Fragmentation and polymeric complexes of albumin in human urine. Clin Chim Acta 1985;149:155-63.
79. Ghiggeri GM, Candiano G, Delfino G, et al. Electrical char-

ge of serum and urinary albumin in normal and diabetic humans. Kidney Int 1985;28:168-77.
80. Yagame M, Suzuki D, Jinde K, et al. Urinary albumin fragments as a new clinical parameter for the early detection of diabetic nephropathy. Intern Med 1995;34:463-8.
81. Candiano G, Musante L, Bruschi M, et al. Repetitive fragmentation products of albumin and α1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephritic syndrome. J Am Soc Nephrol 2006;17:3139-48.
82. Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, et al. Co-elution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: implications for urine albumin analysis. Clin Chem 2006;52:389-97.
83. Chaudhury C, Mahnaz S, Robinson JM, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. J Exp Med 2003;197:315-22.
84. Westwood ME, Thornalley PJ. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins: comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. J Protein Chem 1995;14:359-72.
85. Wagner Z, Molnar M, Molnar GA, et al. Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 2006;47:294-300.
86. Cha T, Tahara Y, Yamato E, et al. Renal handling of glycated albumin in non-insulin-dependent diabetes mellitus with nephropathy. Diabet Res Clin Pract 1991;12:149-56.
87. Cutillas PR, Chalkley RJ, Hansen KC, et al. The urinary proteome in Fanconi syndrome implies specificity in the reabsorption of proteins by renal proximal tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol 2004;287:F353-64.
88. Gekle M. Renal tubule albumin transport. Ann Rev Physiol 2005;67:573-94.
89. Hortin GL, Sviridov D. Analysis of molecular forms of albumin in urine. Proteomics Clin Appl 2008;2:950-5.
90. Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, et al. Proteomic analysis of normal urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. Kidney Int 2002;62:1461-9.
91. Lafitte D, Dussol B, Andersen S, et al. Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. Clin Biochem 2002;35:581-9.
92. Khan A, Packer NH. Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. J Proteome Res 2006;5:2824-38.
93. Zerefos PG, Vougas K, Dimitraki P, et al. Characterization of the human urine proteome by preparative electrophoresis in combination with 2-DE. Proteomics 2006;6:4346-55.
94. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. J Am Soc Nephrol 2007;18:913-22.
95. Kausler E, Spiteller G. Fragments from albumin and β2-microglobulin: constituents of the middle molecule fraction in hemofiltrate. Biol Chem Hoppe-Seyler 1991;372:849-55.
96. Heine G, Raida M, Forssmann WG. Mapping of peptides and protein fragments in human urine using liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 1997;776:117-24.
97. Raida M, Schulz-Knappe P, Heine G, et al. Liquid chromatography and electrospray mass spectrometric mapping of peptides from human plasma filtrate. J Am Soc Mass Spectrom 1999;10:45-54.
98. Richter R, Schulz-Knappe P, Schrader M, et al. Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides. J. Chromatogr B 1999;726:25-35.
99. Wittke S, Mischak H, Walden M, et al. Discovery of biomarkers in human urine and cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry: towards new diagnostic and therapeutic approaches. Electrophoresis 2005;26:1476-87.
100. Jurgens M, Appel A, Heine G, et al. Towards characterization of the human urinary peptidome. Comb Chem High Throughput Screen 2005;8:757-65.
101. Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM et al. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. Kidney Int 2005;67:2313-20.
102. Chalmers MJ, Mackay CL, Hendrickson CL, et al. Combined top-down and bottom-up mass spectrometric approach to characterization of biomarkers for renal disease. Anal Chem 2005;77:7163-71.
103. Kemperman RF, Horvatovich PL, Hoekman B, et al. Comparative urine analysis by liquid chromatography-mass spectrometry and multivariate statistics: method development, evaluation, and application to proteinuria. J Proteome Res 2007;6:194-206.
104. Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. N Engl J Med 1978;298:826-33.
105. Norden AG, Lapsley M, Lee PJ, et al. Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome. Kidney Int 2001;60:1885-92.
106. Brennan SO, George PM, Peach RJ. Characterisation of a slow component of normal human serum albumin. Clin Chim Acta 1988;176:179-84.
107. Brennan SO, George PM. Three truncated forms of serum albumin associated with pancreatic pseudocyst. Biochim Biophys Acta 2000;1481:337-43.
108. Bar-Or D, Rael LT, Bar-Or R, et al. The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient. Clin Chim Acta 2006;365:346-9.
109. Vlaskou D, Hofmann W, Guder WG, et al. Human neutral brush border endopeptidase EC 3.4.24.11 in urine, its isolation, characterization and activity in renal disease. Clin Chim Acta 2000;297:103-21.
110. Bond JS, Matters GL, Banerjee S, et al. Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. FEBS Lett 2005;579:3317-22.
111. Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, et al. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. Shock 2006;26:245-53.
112. Russo LM, Bakris GL, Comper WD. Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective. Am J Kidney Dis 2002;39:899-919.
113. 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.
114. Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT, et al. Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. Kidney Int 2004;66:S69-75.
115. Giampietro O, Lucchetti A, Cruschelli L, et al. Measurement of urinary albumin excretion (UAE) in diabetic patients: immunonephelometry versus radioimmunoassay. J Nucl Med Allied Sci 1989;33:252-7.
116. Osicka TM, Comper WD. Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. Clin Chem 2004;50:2286-91.
117. Clavant SP, Sastra SA, Osicka TM, et al. The analysis and characterization of immunounreactive urinary albumin in healthy volunteers. Clin Biochem 2006;39:143-51.
118. Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of an

HPLC assay for urinary albumin. Am J Clin Pathol 2005;124:219-25.
119. ISO 17511. In Vitro Diagnostic Medical Devices-Measurement of quantities in biological samples-Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. Geneva: International Organization for Standardization, 2003.
120. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM). Database of higher-order reference materials, measurement methods/procedures and services. http://www.bipm.org/jctlm/
121. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins. CRM470. BCR Publication 92/92. Brussels: BCR, 1992.
122. Reimer CB, Smith SJ, Wells TW, et al. Collaborative calibration of the US National and the College of American Pathologists reference preparations for specific serum proteins. Am J Clin Pathol 1982;77:12-9.
123. Price CP, Newman DJ, Blirup-Jensen S, et al. First international reference preparation for individual proteins in urine. Clin Biochem 1998;31:467-74.
124. Itoh Y, Hosogaya S, Kishi K, et al. Standardization of immunoassays for urine albumin. Jpn J Clin Chem 2008;37:5-14.
125. Singh R, Crow FW, Babic N, et al. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of urinary albumin using a novel ^{15}N-isotopically labeled albumin internal standard. Clin Chem 2007;53:540-2.
126. Babic N, Larson TS, Grebe SK, et al. Application of liquid chromatography-mass spectrometry technology for early detection of microalbuminuria in patients with kidney disease. Clin Chem 2006;52:2155-7.
127. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem 1989;182:319-26.
128. Siekmann L. Determination of creatinine in human serum by isotope dilution-mass spectrometry: definitive methods in clinical chemistry, IV. J Clin Chem Clin Biochem 1985;23:137-44.