

Accuratezza diagnostica di un metodo in chimica secca per la misura della albumina nelle urine nella popolazione generale

Maria Stella Graziani¹, Giovanni Gambaro², Lucilla Mantovani¹, Alessandro Sorio¹, Thewoldemedhn Yabarek², Cataldo Abaterusso², Antonio Lupo², Paolo Rizzotti¹

¹Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona

²Divisione di Nefrologia, Università degli Studi di Verona

ABSTRACT

Diagnostic accuracy of a reagent strip device for assessing urinary albumin excretion in the general population. Albuminuria is a sensitive marker of renal impairment and has been included in a number of studies investigating chronic kidney diseases. This paper is aimed to evaluate the diagnostic performance of a strip test for albumin to creatinine ratio in urine in an epidemiological setting and to compare it with that found in a diabetic population. Urine samples were obtained from 201 consecutive subjects enrolled in an epidemiological study and from 259 type 2 diabetic patients. Urines were examined by the strip test (Clinitek Microalbumin, Siemens Diagnostics) and laboratory methods. Samples were stored under various conditions to assess the analyte stability. When used in the general population, the strip test showed 90% sensitivity and 91% specificity, considering the laboratory method as "gold standard", saving >80% of subjects from the laboratory measurement, at the expense of 1% rate of false negative and 8% of false positive results. The strip test performed similarly in the general population and in the diabetics. The stability study demonstrated that storage at -20 °C causes a significant decrease in the urinary albumin concentrations. Clinitek Microalbumin strips can be used as screening test in epidemiological settings, since they correctly classify the majority of subjects. Screening with the strip and by confirming positive results with a wet chemistry method can be an efficient strategy for detecting albuminuria in the general population. The recommended temperature for storing urine samples is -80 °C.

INTRODUZIONE

Sebbene la malattia renale cronica (CKD) sia ritenuta uno dei maggiori problemi sanitari, sia nel mondo occidentale, sia in quello in via di sviluppo, molto spesso i soggetti che si trovano negli stadi precoci della malattia non sono riconosciuti e di conseguenza non vengono trattati (1-3). Le soluzioni per questo problema richiedono strategie dirette non solo a prevenire le conseguenze della malattia renale già instaurata, ma anche (e forse soprattutto) ad identificare il danno renale il più precocemente possibile.

La concentrazione urinaria di albumina è considerata un buon marcatore di disfunzione renale ed è inclusa nella definizione degli stadi 1 e 2 della malattia renale cronica dalla "National Kidney Foundation" (4). Inoltre, una aumentata concentrazione urinaria di albumina si trova in diversi stati patologici, quali l'ipertensione, il diabete, l'obesità, ed è anche considerata un marcatore di disfunzione endoteliale e di rischio cardiovascolare (5-7). Questa misura è stata così inclusa in un numero importante di studi epidemiologici dedicati (8,9).

Per verificare la prevalenza di CKD nella popolazione italiana, nel 2006 è stato iniziato uno studio prospettico e multicentrico denominato INCIPE ("Initiatives on nephropathy, of relevance to public health, which is chronic, possibly in its initial stages, and carries a potential risk of major clinical end-points"). Lo studio è stato condotto in

un campione "random" della popolazione con più di 40 anni del Nord Est italiano (10). Il rapporto albumina urinaria su creatinina (ACR) è il parametro raccomandato per la misura della escrezione urinaria di albumina ed è stato uno degli esami di laboratorio eseguiti sui soggetti reclutati per lo studio (5). Lo studio ha ottenuto l'approvazione del Comitato Etico Aziendale. Dato che la prevalenza di albuminuria nella popolazione generale è bassa (2,9), effettuare un pre-screening con striscia reattiva potrebbe essere un metodo efficace per evitare la misura in laboratorio di un importante numero di campioni.

"Clinitek Microalbumin" (Siemens Medical Solutions Diagnostics) è una striscia reattiva per la misura simultanea di albumina e creatinina nelle urine che è stata studiata a fondo nei pazienti diabetici (11-13). Al contrario, le caratteristiche diagnostiche dell'esame, quando impiegato nella popolazione generale, non sono state approfonditamente studiate. Scopo di questo lavoro è di valutare le prestazioni di questa striscia reattiva per la misura contemporanea di albumina e creatinina nelle urine in confronto con quelle dei metodi in chimica liquida che si eseguono in laboratorio, al fine di verificare se il metodo in chimica secca possa essere vantaggiosamente utilizzato come screening in ambito epidemiologico. Il metodo è stato valutato anche in un gruppo di pazienti diabetici, popolazione nella quale la striscia è stata precedentemente valutata (11-13).

MATERIALI E METODI

Campioni

I campioni di urine della prima minzione del mattino sono stati raccolti da 201 partecipanti allo studio INCIPE presentatisi consecutivamente e da 259 pazienti diabetici di tipo 2, pure presentatisi consecutivamente al Centro Antidiabetico dell'Azienda Ospedaliera di Verona. Le urine sono state analizzate, sia con la striscia reattiva sia con il metodo di confronto, entro 5 ore dalla raccolta.

Metodi

Le strisce utilizzate (Clinitek Microalbumin) comprendono due zone reattive distinte per albumina e creatinina. La zona per albumina è impregnata con un colorante ad alta specificità per albumina, la tetrabromosulfonftaleina (14); il metodo per la creatinina è basato sulla attività simil-perossidasi del complesso rame-creatinina (15). Le due reazioni colorimetriche vengono misurate utilizzando un piccolo riflettometro da banco (Clinitek Status, Siemens Medical Solutions Diagnostics). Lo strumento fornisce una stima semiquantitativa della concentrazione dei due analiti, classificando il campione in quattro classi (10; 30; 80; 150 mg/L) per l'albumina e in cinque classi (0,9; 4,4; 8,8; 17,7; 26,5 mmol/L) per la creatinina. Il rapporto albumina/creatinina è pure fornito in classi (<3,4; 3,4-33,9; >33,9 mg/mmol); quando la creatinina è espressa in mg/dL, i valori sono 10, 50, 100, 200, 300 ed il rapporto albumina/creatinina 30; 30-300; >300 mg/g. Tuttavia, la classificazione del campione nella classe ACR avviene utilizzando la concentrazione di albumina e creatinina (in mg/L e mmol/L o mg/dL) letta dallo strumento e non il valore della classe in cui i campioni vengono classificati.

Per confronto, l'albumina è stata misurata nefelometricamente (Image 800, Beckman Coulter) e la creatinina è stata misurata su Dimension RxL (Siemens Medical Solutions Diagnostics) con metodo al picrato alcalino. Per alcuni campioni è stata eseguita una elettroforesi proteica in gel di agarosio.

È stata verificata l'eventuale interferenza sulla misura dell'albumina con le strisce reattive da parte della proteina di Bence Jones, impiegando la striscia reattiva in tre campioni con elevata proteinuria di Bence Jones (catene κ o λ >1000 mg/L) e confrontando la misura dell'albumina con il metodo nefelometrico.

Alcuni campioni con valori di ACR nelle diverse categorie sono stati usati per verificare l'imprecisione della

striscia reattiva. Le misure sono state ripetute 10 volte per ogni campione in due diverse occasioni per un totale di 20 misure in ogni categoria.

Per verificare la stabilità della albumina e della creatinina nelle urine in diverse condizioni di conservazione, 100 campioni sono stati divisi in aliquote. Le condizioni di conservazione sono state 24 ore (4 °C) e 12 mesi (-20 °C e -80 °C). Le aliquote sono state di volta in volta scongelate a temperatura ambiente, mescolate, centrifugate e quindi analizzate con la striscia reattiva e in chimica liquida.

RISULTATI

La Tabella 1 riporta i risultati del confronto, nella popolazione generale e nei pazienti diabetici, fra i due metodi impiegati, utilizzando il valore soglia di ACR suggerito dall'American Diabetes Association per la definizione della nefropatia diabetica (3,4 mg/mmol) (5,16). Quando usato nella popolazione generale, la sensibilità e la specificità del metodo in chimica secca erano 90% e 91%, rispettivamente; il valore predittivo positivo (PPV) era 53% ed il valore predittivo negativo (NPV) 99%. Quando usato nella popolazione diabetica, la sensibilità e la specificità del metodo in chimica secca erano 91% e 92%, rispettivamente; il PPV era 71% ed il NPV 98%. I campioni falsi negativi non presentavano un valore di pH urinario particolarmente elevato (tutti erano <8,0) o un particolare quadro elettroforetico delle proteine urinarie (proteinuria glomerulare o tubulare o di Bence Jones).

Nello studio di ripetibilità abbiamo ottenuto il 100% di concordanza nelle classi ACR <3,4 e >33,9 mg/mmol, e il 95% nella classe 3,4-33,9 mg/mmol, nella quale un campione è stato classificato una volta come <3,4 mg/mmol.

La Figura 1 presenta i risultati dello studio di stabilità. Quando i campioni erano conservati a +4 °C per 24 ore o a -80 °C per dodici mesi, non si è osservata nessuna modifica nella classificazione dei risultati. La conservazione a -20 °C per dodici mesi causava invece uno spostamento del 5% dei campioni dalla classe 3,4-33,9 mg/mmol alla classe <3,4 mg/mmol. Uno spostamento simile verso le classi a concentrazione più bassa si osservava quando si consideri la misura della sola albumina, mentre la misura della creatinina rimaneva stabile. Anche la concentrazione di albumina misurata con il metodo nefelometrico presentava una differenza significativa (57,4±28,6 vs. 46,7±24,3 mg/L; P <0,01) tra i cam-

Tabella 1

Classificazione dei campioni in base ai valori del rapporto albumina/creatinina misurati con due differenti metodi nella popolazione generale (n = 201) e nei pazienti diabetici (n = 259)

"Chimica liquida" automatizzata	Striscia reattiva ("chimica secca")			
	Popolazione generale		Pazienti diabetici	
	<3,4 mg/mmol	>3,4 mg/mmol	<3,4 mg/mmol	>3,4 mg/mmol
<3,4 mg/mmol	165	16	194	18
>3,4 mg/mmol	2	18	4	43

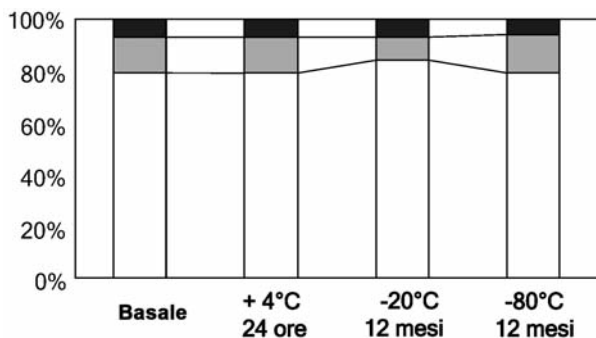


Figura 1

Percentuale della distribuzione dei campioni secondo la classe di rapporto albuminuria creatinina (ACR) nelle varie condizioni di conservazione: ACR <3,4 mg/mmol, area bianca; ACR 3,4-39,9 mg/mmol, area grigia; ACR >39,9 mg/mmol, area nera.

pioni freschi e quelli conservati a -20 °C per dodici mesi. Al contrario, i campioni conservati a +4 °C per 24 ore e a -80 °C per dodici mesi non presentavano differenze significative rispetto ai campioni freschi.

La presenza di proteina di Bence Jones non interferisce con la misura dell'albumina mediante striscia reattiva, non essendo state rilevate differenze significative in campioni con proteinuria di Bence Jones nei quali l'albumina era misurata con i due metodi.

DISCUSSIONE

La CKD è un problema di notevole importanza a livello mondiale; la situazione è complicata dal fatto che gli stadi precoci della malattia sono clinicamente silenti e possono venire riconosciuti solo mediante indagini di laboratorio e/o strumentali (1-3). L'escrezione urinaria di albumina è considerata un marcatore affidabile di danno renale e la sua misura è inclusa nella valutazione della funzionalità renale (4). Esiste un generale consenso sull'utilità di sottoporre a screening per albuminuria i soggetti a rischio di CKD (diabetici, ipertesi), ma è tuttora dibattuto se questa misura sia efficace anche nella popolazione generale. Al momento infatti questa attività di screening è effettuata solo all'interno di studi epidemiologici tesi a verificare la prevalenza di CKD in popolazioni diverse. Lo studio INCIPE è uno di questi studi che ha esaminato più di 6000 soggetti di età maggiore di 40 anni residenti nella Regione Veneto. L'arruolamento e l'esame clinico dei soggetti sono stati eseguiti localmente, mentre gli esami di laboratorio sono stati centralizzati presso il Laboratorio di Chimica Clinica dell'Ospedale Civile Maggiore di Verona su campioni raccolti al momento dell'arruolamento e conservati a -80 °C, al fine di ridurre la variabilità analitica. Considerando la bassa prevalenza della albuminuria nella popolazione generale (2,9), abbiamo scelto di effettuare un pre-screening dei soggetti e di sottoporre alla misura in laboratorio solo i campioni positivi. Questa strategia doveva consentire di evitare la misura in laboratorio (più complessa dal punto di vista organizzativo e più onerosa dal punto di vista economico) per un numero importante di soggetti ed

anche di eliminare la variabilità tra i Centri di arruolamento. Infatti, sebbene la striscia reattiva sia generalmente usata come "point of care", è stata segnalata una considerevole variabilità tra i diversi siti di utilizzo. Questa strategia aveva peraltro necessità di essere validata mediante valutazione sia delle caratteristiche diagnostiche della striscia reattiva che dell'influenza delle condizioni di conservazione del campione.

Considerando come riferimento le misurazioni effettuate con metodi in chimica liquida su analizzatori automatizzati e il valore soglia per ACR di 3,4 mg/mmol, la striscia reattiva ha classificato nella popolazione generale come negativi 165 su 201 campioni (82%) con 2 campioni falsi negativi e 194 su 259 campioni della popolazione diabetica (75%) con 4 campioni falsi negativi. Il comportamento nella popolazione diabetica è simile, se non migliore di quanto riportato in precedenza: sensibilità e specificità oscillavano nei diversi studi da 79% a 89% e da 73% a 81%, rispettivamente (13, 17, 18); le diversità riscontrate possono probabilmente essere spiegate con la diversa composizione della popolazione esaminata in termini di soggetti con vari livelli di albuminuria. Il nostro studio conferma l'utilità dell'impiego di "Clinitek Microalbumin" nella popolazione diabetica, particolarmente quando si tratta di escludere la presenza di albuminuria (NPV 98%). Anche i risultati ottenuti nella popolazione generale vanno in questa direzione: la sensibilità della striscia reattiva nel rilevare un ACR >3,4 mg/mmol (90%) accoppiata con elevato NPV (99%) rende questo metodo particolarmente utile nello screening della CKD nella popolazione generale, dove un risultato negativo che esclude CKD è più importante di una corretta diagnosi di CKD.

Non siamo stati in grado di trovare una spiegazione per i campioni falsi positivi dovuti a valori elevati di albumina, in quanto questi campioni non presentavano caratteristiche fisico-chimiche diverse dagli altri. Studi recenti hanno dimostrato che la natura della albumina nelle urine è più complessa di quanto si sia ritenuto fino ad ora (19). L'albumina può essere escreta come molecola intatta o degradata in frammenti di PM diverso; inoltre la molecola può essere immunoreattiva oppure no a causa di modificazioni chimiche, come ad es. la glicazione. Metodi basati su principi diversi possono misurare forme diverse di albumina e fornire così risultati diversi (19,20). Si può ipotizzare che il metodo colorimetrico della striscia possa essere in grado di misurare una quota di albumina non-immunoreattiva e dare così risultati più alti di quelli forniti dal metodo nefelometrico. Ovviamente, questa ipotesi deve essere verificata attraverso studi specifici.

Per quanto riguarda la precisione del metodo, i dati da noi rilevati confermano quelli già presenti in letteratura (12). I risultati dello studio di stabilità dimostrano che la migliore temperatura per la conservazione dei campioni di urina è -80 °C; a temperature più elevate, la concentrazione di albumina diminuisce sensibilmente (21-23). Gli studi disponibili tuttavia hanno tutti utilizzato metodi in chimica liquida; il nostro studio, a nostra conoscenza, è il primo a verificare che il fenomeno si presenta anche

con i metodi in chimica secca, come il "Clinitek Microalbumin", e conferma che le misure di albumina nei campioni conservati sono inaccurate, a meno che essi non vengano conservati a -80 °C.

In conclusione, possiamo confermare le buone prestazioni del metodo in chimica secca valutato: buone specificità e sensibilità, assenza di interferenze, accettabile imprecisione. In ragione del valore di NPV ottenuto, è possibile usare vantaggiosamente "Clinitek Microalbumin" come screening nella popolazione generale, nella quale la prevalenza della condizione di albuminuria è bassa.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Siemens Medical Solutions Diagnostics per aver messo a disposizione le strisce e lo strumento utilizzati nello studio.

BIBLIOGRAFIA

1. El Nahas AM, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 2005;365:331-40.
2. Kausz AT, Khan SS, Abichandani R, et al. Management of patients with chronic renal insufficiency in the Northeastern United States. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1501-7.
3. Coresh J, Astor BC, Green T, et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population. Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1-12.
4. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-266.
5. American Diabetes Association. Clinical practice recommendation 2007. Nephropathy screening and treatment. *Diabetes Care* 2007;30(Suppl1):S19-21.
6. Sarafidis PA, Bakris GL. Microalbuminuria and chronic kidney disease as risk factors for cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2366-74.
7. Forman JP, Brenner BM. Hypertension and microalbuminuria: the bell tolls for thee. *Kidney Int* 2006;69:22-8.
8. Romundstad S, Holmen J, Kvenild K, et al. Microalbuminuria and all-cause mortality in 2,089 apparently healthy individuals: a 4.4-year follow-up study. The Nord-Trøndelag Health Study (HUNT), Norway. *Am J Kidney Dis* 2003;42:466-73.
9. Verhave JC, Gansevoort RT, Hillege HL, et al. for the PREVEND Study Group. An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int* 2004;66:18-21.
10. Gambaro G, D'Angelo A, Conte M, et al. Silent chronic kidney disease epidemic seen from Europe: designing strategies for clinical management of the early stages. *J Nephrol* 2005;18:123-35.
11. Sarafidis PA, Riechie J, Bogojevic Z, et al. A comparative evaluation of various methods for microalbuminuria screening. *Am J Nephrol* 2008;28:324-9.
12. Parson M, Newman DJ, Pugia M, et al. Performance of a reagent strip device for quantitation of the urine albumin:creatinine ratio in a point of care. *Clin Nephrol* 1999;51:220-7.
13. Le Floch JP, Marre M, Rodier M, et al. Interest of Clinitek Microalbumin in screening for microalbuminuria: results of a multicenter study in 302 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2001;27:36-9.
14. Pugia MJ, Lott JA, Profitt JA, et al. High-sensitivity dye binding assay for albumin in urine. *J Clin Lab Anal* 1999;13:180-7.
15. Pugia MJ, Lott JA, Wallace JF, et al. Assay of creatinine using the peroxidase activity of copper-creatinine complexes. *Clin Biochem* 2000;33:63-70.
16. American Diabetes Association. Position Statement. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:79-83.
17. Croal BL, Mutch WJ, Clark BM, et al. The clinical application of a urine albumin:creatinine ratio point-of-care device. *Clin Chim Acta* 2001;307:15-21.
18. Meinhardt U, Ammann RA, Flück C, et al. Microalbumin in diabetes mellitus: efficacy of a new screening method in comparison with timed overnight collection. *J Diabetes Complications* 2003;17:254-7.
19. Comper WD. Characterisation of immunochemically non-reactive urinary albumin. *Clin Chem* 2004;50:2286-91.
20. Peters T. How should we measure the albumin in urine? *Clin Chem* 2006;52:555-6.
21. Mosca A, Paleari R, Ceriotti F, et al. for the Lercanidipine Study Group. Biological variability of albumin excretion rate and albumin-to-creatinine ratio in hypertensive type 2 diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1229-33.
22. Brinkman JW, de Zeeuw D, Duker JJ, et al. Falsely low urinary albumin concentration after prolonged frozen storage of urine samples. *Clin Chem* 2005;51:2181-3.
23. Parekh RS, Kao WH, Meoni LA, et al. Reliability of urinary albumin, total protein, and creatinine assays after prolonged storage: the family investigation of nephropathy and diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:1156-62.