

Diagnostica di laboratorio: esami su urine. Gli esami per il diabete

G. Penno, L. Pucci, D. Lucchesi, G. Pellegrini*, R. Miccoli, S. Del Prato

*Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo – Università di Pisa
Unità Operativa Malattie Metaboliche e Diabetologia – Azienda Ospedaliera Pisana;*

**Laboratorio di Chimica Clinica – Azienda Ospedaliera Pisana*

Introduzione

Numerosi parametri dosabili sul campione urinario rivestono particolare importanza nella cura del soggetto con diabete mellito. Alcuni di questi parametri hanno attualmente un modesto significato clinico (glucosio, chetoni), mentre altri (proteine, albumina) hanno assunto maggior rilevanza in quanto su di essi sono basati lo screening e la diagnosi della nefropatia diabetica, una delle più temibili complicanze del diabete. Saranno brevemente discussi il significato ed il ruolo del dosaggio del glucosio e dei chetoni urinari, mentre più ampio spazio verrà dedicato al dosaggio dell'albumina nelle urine.

Il glucosio urinario

Impiego clinico

Il dosaggio semiquantitativo del glucosio urinario è stato per lungo tempo il primo indicatore per la diagnosi del diabete e l'unico mezzo a disposizione del paziente diabetico per monitorare, a domicilio, l'efficacia della cura del diabete. Attualmente, in questo ruolo, la glicosuria è rimpiazzata dal monitoraggio domiciliare della glicemia (SMBG, self-monitoring blood glucose)¹. Il monitoraggio attraverso il dosaggio semiquantitativo del glucosio urinario può essere attualmente proposto solo a quei pazienti che rifiutano o non sono in grado di eseguire il monitoraggio su sangue capillare. Il test semiquantitativo viene eseguito dal paziente su campioni urinari estemporanei (single voiding) e più raramente su campioni di raccolte urinarie frazionate in funzione degli intervalli tra i pasti o su campioni delle urine delle 24 ore. Su questi ultimi campioni (frazioni della giornata o raccolta delle 24 ore) è anche possibile un dosaggio quantitativo del glucosio urinario che consente una stima, sia pur grossolana, del comportamento dei valori glicemici nell'intervallo della raccolta urinaria.

Razionale

La glicosuria è un indicatore inadeguato per la diagnosi di diabete. La concentrazione del glucosio urinario non riflette accuratamente la concentrazione del glucosio plasmatico. Una massiccia glicosuria può comparire in presenza di una normale glicemia in presenza di una glicosuria renale, condizione in cui il glucosio filtrato a livello glomerulare eccede una ridotta capacità di riassorbimento tubulare. Glucosio è rilevato nelle urine di soggetti con notevole aumento dei valori glicemici, ma glicosuria può risultare anche da una transitoria elevazione della concentrazione glicemica oltre la soglia renale; infine è evidente come la glicosuria non possa fornire informazioni sui livelli di concentrazioni glicemiche inferiori alla soglia renale del glucosio (circa 180 mg/dL o 10 mmol/L), una soglia tra l'altro variabile con l'età, diversa da individuo ad individuo, eterogenea in differenti "popolazioni" di glomeruli. La soglia renale del glucosio, abbastanza bassa in età giovanile da permettere una occasionale glicosuria, aumenta con l'età. Gradi di intolleranza al glucosio fino a valori inequivocabilmente diagnostici per diabete sono rilevabili in soggetti anziani non glicosurici. Inoltre, i soggetti con ridotta tolleranza al glucosio risultano spesso non glicosurici. Quindi, benché la positività al test per il glucosio nelle urine sia un indicatore frequente di un sottostante diabete, essa non permette la diagnosi di diabete, così come la sua assenza non la può escludere. Anche molto limitata è la sua utilità nel monitorare il controllo glicemico in funzione delle attuali raccomandazioni: obiettivo della glicemia pre-prandiale 90-130 mg/dL, post-prandiale 110-150 mg/dL². La concentrazione del glucosio urinario è funzione della concentrazione delle urine e, in tutti i casi, riflette soltanto i valori glicemici medi dell'intervallo di raccolta del campione.

Considerazioni analitiche

L'impiego di strisce reattive per il dosaggio semiquantitativo della glicosuria che impiegano metodiche glucosio-specifiche evita risposte positive dovute alla presenza di altri zuccheri o sostanze riducenti

o numerosi farmaci. La maggior parte delle strisce reattive disponibili impiegano la reazione della glucosio-ossidasi³. Gli spot test semiquantitativi come il Diastix o il KetoDiastix (Ames), come il Diabur-Test-5000 (Boehringer Mannheim) e come il Test-tape (Lilly) sono i più diffusi ed i più convenienti. Tra le sostanze che possono dare falsi negativi, le più importanti sono i chetoni, che comportano una riduzione quantitativa del glucosio alla lettura con il metodo della glucosio-ossidasi. Anche dosi elevate di vitamina C e di salicilati determinano la comparsa di falsi negativi⁴.

Raccomandazione:

Il dosaggio semiquantitativo del glucosio urinario non è raccomandato per la cura del paziente con diabete mellito.

Evidenza di livello: C

I chetoni urinari

Impiego clinico

I corpi chetonici aceto-acetato (AcAc), acetone e β -idrossibutirrato (β HBA) sono prodotti del catabolismo degli acidi grassi liberi. L'aumentata produzione dai trigliceridi e la ridotta utilizzazione epatica sono entrambe il risultato della carenza assoluta o relativa di insulina e dell'aumento degli ormoni contro-regolatori (cortisolo, epinefrina, glucagone ed ormone della crescita). La determinazione dei chetoni nelle urine (e nel sangue) è ampiamente utilizzata nel cura del paziente diabetico sia per la diagnosi che per monitorare l'andamento nel tempo della chetoacidosi diabetica (DKA), un'importante emergenza medica, che può intervenire sia nel soggetto con diabete noto che nel diabetico di prima diagnosi. Così, la valutazione iniziale del paziente diabetico comprende la determinazione dei chetoni urinari². Il test per i chetoni urinari è importante anche per il monitoraggio del paziente diabetico, soprattutto nei soggetti con diabete tipo 1, nella diabetica durante la gravidanza e nel diabete gestazionale. Tutti i diabetici dovrebbero eseguire il test per la chetonuria durante qualunque tipo di malattia intercorrente, quando sono presenti intensa glicosuria o persistente notevole iperglicemia (>300 mg/dL), durante la gravidanza, o in presenza di sintomi compatibili con la diagnosi di chetoacidosi (nausea, vomito, dolore addominale).

Razionale

I chetoni sono normalmente presenti nelle urine, ma in concentrazioni inferiori alla sensibilità dei comuni metodi di dosaggio. Chetonuria è rilevabile negli individui normali durante il digiuno e fino al 30% dei campioni urinari del primo mattino della donna in gravidanza (con o senza diabete), o anche dopo episodi ipoglicemici. β HBA e AcAc sono di solito

presenti in quantità equimolari, l'acetone è usualmente presente in modeste quantità quale spontanea decarbossilazione dell'AcAc. L'equilibrio tra β HBA e AcAc tende a spostarsi verso il β HBA in condizioni di ipossia, digiuno, disordini metabolici quali la DKA e la chetoacidosi alcolica⁵. Così, i metodi di dosaggio dei chetoni incapaci di rilevare il β HBA possono fornire informazioni cliniche inattendibili sottostimando la concentrazione totale dei chetoni.

Considerazioni analitiche

In condizioni normali, le concentrazioni dei chetoni nelle urine sono inferiori ai limiti di detezione delle metodiche disponibili. Risultati falsamente positivi sono possibili con i test che utilizzano reagenti contenenti nitroprussiato in presenza di farmaci con gruppi sulfidrilici quali l'ACE-inibitore Captopril. Risultati falsamente negativi sono stati descritti con l'impiego di materiali inappropriatamente conservati, in presenza di urine fortemente acidificate (come dopo assunzione di elevate dosi di acido ascorbico) o in campioni ad elevata attività microbica capace di indurre consumo dei chetoni. Poiché l'acetone è altamente volatile, i campioni dovrebbero essere conservati in contenitori a chiusura ermetica. Sono stati sviluppati numerosi metodi di dosaggio. Il più usato è la reazione colorimetrica che si innesca tra chetoni e nitroprussiato con produzione di colorazione porpora³. Questa metodica è ampiamente disponibile sotto forma di strisce o tavolette reattive largamente utilizzate per misurare i chetoni nelle urine o nel sangue (siero o plasma). La metodica al nitroprussiato misura però solo AcAc, a meno della presenza di glicina nel reagente; in questo caso viene rilevato anche l'acetone. Il nitroprussiato non è capace di misurare il β HBA. E' quindi evidente che i test attualmente disponibili per il dosaggio dei chetoni urinari non sono adeguati per la diagnosi ed il monitoraggio del trattamento della chetoacidosi diabetica situazione in cui, grazie allo shift da AcAc a β HBA, il chetone più rappresentato è proprio il β HBA. I test per il rilevamento dei chetoni ematici capaci di misurare il β HBA sono attualmente disponibili e preferibili rispetto ai metodi di rilevamento su urine per la diagnosi ed il monitoraggio della chetoacidosi.

Raccomandazione:

La determinazione dei chetoni urinari non dovrebbe essere utilizzata per diagnosticare o monitorare il decorso della chetoacidosi (DKA).

Evidenza di livello: A

La microalbuminuria

Impiego clinico

Il diabete è ormai divenuto la più comune causa di insufficienza renale (End-Stage Renal Disease, ESRD) negli Stati Uniti ed in Europa. Negli Stati

Uniti, infatti, la nefropatia diabetica è la causa del 40% dei nuovi casi di ESRD. Ciò è dovuto a tre motivi principali: la prevalenza del diabete, in particolare del diabete tipo 2, è aumentata; i pazienti diabetici hanno una più lunga aspettativa di vita; i pazienti diabetici con insufficienza renale sono oggi liberamente accettati nei programmi terapeutici per l'ESRD.

Circa il 20-30% dei soggetti con diabete tipo 1 o con diabete tipo 2 sviluppa la nefropatia, ma nel diabete tipo 2 la progressione ad ESRD è sensibilmente più bassa. Tuttavia, a causa della maggiore prevalenza del diabete tipo 2, tali pazienti rappresentano più della metà dei soggetti con diabete mellito che iniziano la terapia dialitica. Numerosi studi hanno dimostrato che l'insorgenza e la progressione della nefropatia diabetica possono essere significativamente migliorate da misure di intervento, la cui efficacia risulta più elevata se attuate ad uno stadio molto precoce dello sviluppo della complicanza⁶.

La storia naturale della nefropatia diabetica è efficacemente descritta da una concatenazione di stadi di durata ampiamente variabile che, dalla normoalbuminuria, attraverso la microalbuminuria e la proteinuria, conducono alla insufficienza renale (ESRD). Il processo può arrestarsi ad ogni stadio, può essere interrotto prematuramente dalla morte, principalmente per patologia coronarica, può essere modificato, fino alla regressione, da interventi, purché precoci, di prevenzione e di terapia. Infatti, il miglioramento del controllo glicemico riduce il rischio di microalbuminuria^{7,8}, il trattamento con antiipertensivi ed in particolare ACE-inibitori o antagonisti del recettore dell'angiotensina II ritarda la progressione della nefropatia incipiente verso la proteinuria, può indurre la regressione e rallenta l'evoluzione della nefropatia conclamata verso l'insufficienza renale terminale⁹⁻¹².

La microalbuminuria è a tutt'oggi il più semplice e sensibile parametro per rilevare il rischio di nefropatia nel diabete mellito¹³; sia nel diabete tipo 1 che nel tipo 2, ne sono stati riconosciuti e confermati il valore predittivo di nefropatia, di ESRD e di morbilità e mortalità precoci, soprattutto per cause cardiovascolari. Retinopatia diabetica, aumento della pressione arteriosa, sfavorevole profilo lipidico, alterazioni nei processi emocoagulativi e fibrinolitici, disfunzioni dell'endotelio e del microcircolo, insulino-resistenza si associano alla comparsa della microalbuminuria in entrambe le forme di diabete.

La più precoce evidenza clinica di nefropatia diabetica è quindi rappresentata dalla comparsa di microalbuminuria, cioè di bassi ma anormali livelli di albumina nelle urine (≥ 30 mg/die o $20 \mu\text{g}/\text{min}$). Per i pazienti con microalbuminuria persistente viene posta diagnosi di nefropatia diabetica incipiente. In assenza di interventi terapeutici specifici, circa l'80% dei soggetti con diabete di tipo 1 che sviluppano microalbuminuria presenta un incremento dell'escrezione urinaria di albumina pari al 10-20% per

anno con progressione allo stadio di nefropatia conclamata o albuminuria clinica (≥ 300 mg/die o $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$) in un periodo di 10-15 anni. La comparsa di nefropatia conclamata, in assenza di specifici interventi, si accompagna ad una riduzione graduale del filtrato glomerulare (GFR). L'ESRD si sviluppa nel 50% dei soggetti con diabete tipo 1 e nefropatia conclamata entro 10 anni dalla diagnosi di nefropatia; nel 75% dei pazienti si assiste all'insorgenza di ESRD entro 20 anni.

Una elevata percentuale di soggetti con diabete tipo 2 presenta microalbuminuria o nefropatia conclamata a breve distanza dalla diagnosi di diabete. Questo perché spesso il diabete tipo 2 è presente già da molti anni al momento della diagnosi. Senza interventi terapeutici specifici, il 20-40% dei pazienti con diabete tipo 2 e microalbuminuria sviluppa nefropatia conclamata, ma dopo 20 anni dalla comparsa della nefropatia solo circa il 20% sarà progredito verso l'ESRD. Quando il GFR comincia a ridursi, la velocità del declinare della funzione renale risulta ancora una volta ampiamente variabile tra individuo ed individuo, senza sensibili differenze fra pazienti con diabete tipo 1 e pazienti con diabete tipo 2. Tuttavia, nel diabete tipo 2, l'elevato rischio di morte per patologie coronariche, dovuto almeno in parte alla maggiore età, fa sì che molti pazienti con nefropatia in stadio precoce non possano progredire a ESRD. D'altra parte, l'aumentata aspettativa di vita dei pazienti con diabete tipo 2 legata al continuo migliorare degli interventi e delle terapie per la patologia coronarica permette ad un numero sempre maggiore di individui di evolvere verso l'insufficienza renale. Oltre a rappresentare la manifestazione più precoce di nefropatia, l'albuminuria è un marker di aumentata morbilità e mortalità cardiovascolare sia nel diabete tipo 1 che nel diabete tipo 2. Così, la comparsa della microalbuminuria rappresenta una forte indicazione allo screening di possibili patologie vascolari e suggerisce la necessità di interventi terapeutici mirati a ridurre tutti i fattori di rischio cardiovascolare (per esempio, riduzione del colesterolo LDL, terapia antiipertensiva, interruzione del fumo, aumento di attività fisica, etc).

Razionale

L'esame delle urine dovrebbe essere eseguito già alla diagnosi in tutti i pazienti con diabete tipo 2. Se l'esame delle urine è positivo per la presenza di proteine (dipstick positivo), una misura quantitativa della proteinuria, dopo trattamento e risoluzione di eventuali condizioni che possono modificare o invalidare il risultato, è utile per valutare la severità della proteinuria e l'entità della sua progressione, pianificare la terapia e verificare l'impatto delle misure adottate. L'assenza di proteine all'esame delle urine di routine (dipstick negativo) rende necessario il test per lo screening della microalbuminuria: i convenzionali test semiquantitativi per l'albuminuria non sono infatti in grado di rilevare i modesti aumenti della

Tabella I. Definizione delle alterazioni dell'escrezione urinaria dell'albumina

	Raccolta delle urine delle 24 ore (mg/24h)	Raccolta temporizzata delle urine (μ g/min)	Raccolta random delle urine (mg/mmol creatinina)*
Normoalbuminuria	<30	<20	<2,5 (M) <3,5 (F)
Microalbuminuria	30-299	20-199	2.5-25 (M) 3.5-25 (F)
Albuminuria clinica	•300	•200	•25

A causa della variabilità dell'escrezione urinaria dell'albumina, due di tre raccolte eseguite in un periodo di 3-6 mesi devono aver fornito risultati alterati prima di poter affermare che il singolo paziente ha attraversato e superato una delle soglie diagnostiche proposte. Esercizio fisico eseguito nelle 24 precedenti l'esame, infezioni delle vie urinarie, scompenso cardiaco, iperglicemia marcata, elevati valori della pressione arteriosa, piuria ed ematuria possono determinare livelli di escrezione urinaria dell'albumina al di sopra dei valori basali.

* Il rapporto albumina/creatinina, può essere espresso non solo in mg/mmol (fattore di conversione da mg/dL a mmol/L = 0.089), come ampiamente fatto in Europa, ma anche in μ g/mg (o mg/g); questa modalità di espressione, più utilizzata in USA, descrive come microalbuminuria il range di valori compreso tra 30 e 300 μ g/mg nei soggetti di sesso maschile così come nei soggetti di sesso femminile.

escrezione urinaria dell'albumina che caratterizzano gli stadi precoci della nefropatia diabetica. La microalbuminuria raramente compare nel paziente con diabete tipo 1 di breve durata o in età prepubere; così, lo screening della micro-albuminuria nei soggetti con diabete tipo 1 dovrebbe iniziare dopo 5 anni di durata della malattia. Alcuni studi suggeriscono che la durata del diabete in fase prepubere ha un ruolo importante nello sviluppo delle complicanze microvascolari; perciò criteri clinici devono essere applicati quando queste raccomandazioni vengono trasferite al singolo individuo. A causa della difficoltà di datare con precisione l'insorgenza del diabete tipo 2, in questi pazienti lo screening dell'albuminuria dovrebbe iniziare già al momento della diagnosi¹⁴. Dopo l'indagine iniziale ed in assenza di microalbuminuria precedentemente rilevata, lo screening della microalbuminuria dovrebbe essere ripetuto con frequenza annuale. I pazienti più anziani (>75 anni di età) o con breve aspettativa di vita sono verosimilmente a basso rischio di sviluppare nefropatia clinicamente rilevante; in tali pazienti, il significato del trattamento della microalbuminuria non è chiaro, e la necessità di eseguire lo screening per la microalbuminuria è quanto meno incerta. Lo screening della microalbuminuria può essere effettuato con tre metodiche: 1) misurazione del rapporto albumina-creatinina in una raccolta di urine random; 2) raccolta delle urine delle 24-h con misurazione contemporanea della creatinina plasmatica per la simultanea determinazione della clearance della creatinina; 3) raccolta urinaria temporizzata (per esempio, una raccolta di 4 ore o overnight). Il primo metodo è spesso ritenuto il più semplice da eseguirsi nel corso di comuni attività ambulatoriali e generalmente permette di ottenere informazioni accurate; le prime urine del mattino (early-morning sample) od altre raccolte nel corso della mattina sono da preferirsi a causa della nota variabilità circadiana dell'escrezione urinaria dell'albumina; tuttavia se questo procedura non può essere adottata, può essere

sufficiente, nel singolo individuo, uniformare le modalità di esecuzione di raccolte successive. Per misurare concentrazioni urinarie di albumina nel range della micro-albuminuria sono necessari test specifici poiché i metodi di dosaggio standard delle proteine urinarie non sono sufficientemente sensibili. Si definisce microalbuminuria l'escrezione urinaria di albumina pari a 30-299 mg/24h (equivalente a 20-199 μ g/min su un campione di urine temporizzato o a 30-299 mg/g di creatinina su un campione di urine random) (Tabella 1)^a. L'escrezione urinaria di albumina può subire aumenti transitori in presenza di evidente iperglicemia, attività fisica, infezioni delle vie urinarie, ipertensione marcata, scompenso cardiaco ed episodi febbrili intercorrenti.

Se i metodi per il dosaggio in laboratorio della microalbuminuria non sono disponibili si possono condurre screening che potrebbero però essere tutt'altro che accurati utilizzando sistemi in chimica secca (tavole reagenti o sticks); questi sistemi hanno infatti dimostrato una accettabile sensibilità e specificità solo quando impiegati da operatori addestrati ed esperti. Poiché i sistemi in chimica secca misurano soltanto la concentrazione dell'albumina senza correzione per la concentrazione della creatinina, correzione che invece viene effettuata calcolando il rapporto albumina/creatinina, le determinazioni ottenute con questi sistemi sono soggette a possibili errori dovuti all'eventuale concentrazione del campione di urina. Quindi, tutti i risultati positivi ai dosaggi in chimica secca dovrebbero essere confermati con metodiche più accurate. Vi è inoltre ampia variabilità inter-giornaliera nell'escrezione urinaria di albumina; così, almeno due di tre raccolte effettuate in un periodo di 3-6 mesi devono dare risultati positivi per poter classificare il singolo individuo come micro-albuminurico. In Figura 1 è illustrato un algoritmo per lo screening della microalbuminuria¹⁴.

Il significato del monitoraggio annuale della proteiuria e della microalbuminuria è meno chiaro dopo

^a Il rapporto albumina/creatinina, può essere espresso non solo in mg/g (o μ g/mg), come ampiamente fatto in USA, ma anche in mg/mmol; questa modalità di espressione, più utilizzata in Europa, classifica come microalbuminuria il range di valori compreso tra 2.5 e 25 mg/mmol nei soggetti di sesso maschile e tra 3.5 e 25 mg/mmol nei soggetti di sesso femminile.

che la diagnosi di microalbuminuria è stata posta ed è stato intrapreso il trattamento con inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) o con antagonisti del recettore dell'angiotensina (ARB) insieme al controllo della pressione arteriosa. Molti clinici raccomandano una sorveglianza continua per monitorare sia la risposta alla terapia che la progressione della patologia. Oltre alla misurazione dell'escrezione urinaria di albumina, nei pazienti diabetici con alterazioni della funzione renale, è importante la determinazione del filtrato glomerulare.

Raccomandazione:

Nei soggetti senza proteinuria clinica eseguire annualmente il test di screening della microalbuminuria: nei diabetici di tipo 1 in età pubere o post-pubere con durata del diabete superiore a 5 anni in tutti i pazienti con diabete di tipo 2 fin dalla diagnosi.

Evidenza di livello: E

Considerazioni analitiche

Il range di normalità (popolazione non-diabetica) dell'escrezione urinaria di albumina (Albumin Excretion Rate, AER) è compreso tra 1.5 e 20 µg/min (30 mg/24h), ma raramente eccede 15 µg/min, mentre la media geometrica è di 6.5 µg/min. La proteinuria clinica è rilevata quando l'AER supe-

ra i 200 µg/min (300 mg/24h). Per convenzione, la microalbuminuria è quindi definita come l'AER compresa tra 20 e 200 µg/min (30-300 mg/24h). Il limite superiore del range della microalbuminuria (300 mg/24h) corrisponde approssimativamente ad una concentrazione di proteine urinarie pari a 0.5 g/L (positività al dipstick).

Numerosi fattori possono influenzare l'escrezione urinaria dell'albumina (Tabella 2) per cui la raccolta del campione urinario deve essere eseguita in condizioni standardizzate.

L'escrezione urinaria di albumina tende ad essere almeno del 25% più alta durante il giorno rispetto alla notte e, soprattutto, presenta una variabilità biologica intra-individuale del 30-50%. Per la valutazione dell'albuminuria sono state impiegate raccolte urinarie temporizzate (24 ore, overnight, short-term) e non temporizzate (early morning, random). In funzione delle modalità della raccolta, diversa è anche la espressione dei risultati (concentrazione, escrezione a minuto, rapporto albumina/creatinina). Inoltre, data la variabilità dell'escrezione urinaria di albumina, per una misurazione sufficientemente precisa sono raccomandate almeno tre determinazioni in condizioni standardizzate. La variabilità intra-individuale dell'escrezione urinaria dell'albumina è ampia nella popolazione non diabetica e ancora di più nei soggetti con diabete mellito. Howey e coll.¹⁵ hanno studiato, su urine delle 24 ore ed in un intervallo di

Figura 1. Screening della microalbuminuria.

* Nel diabete tipo 1, lo screening della microalbuminuria dovrebbe iniziare dopo 5 anni di durata del diabete.

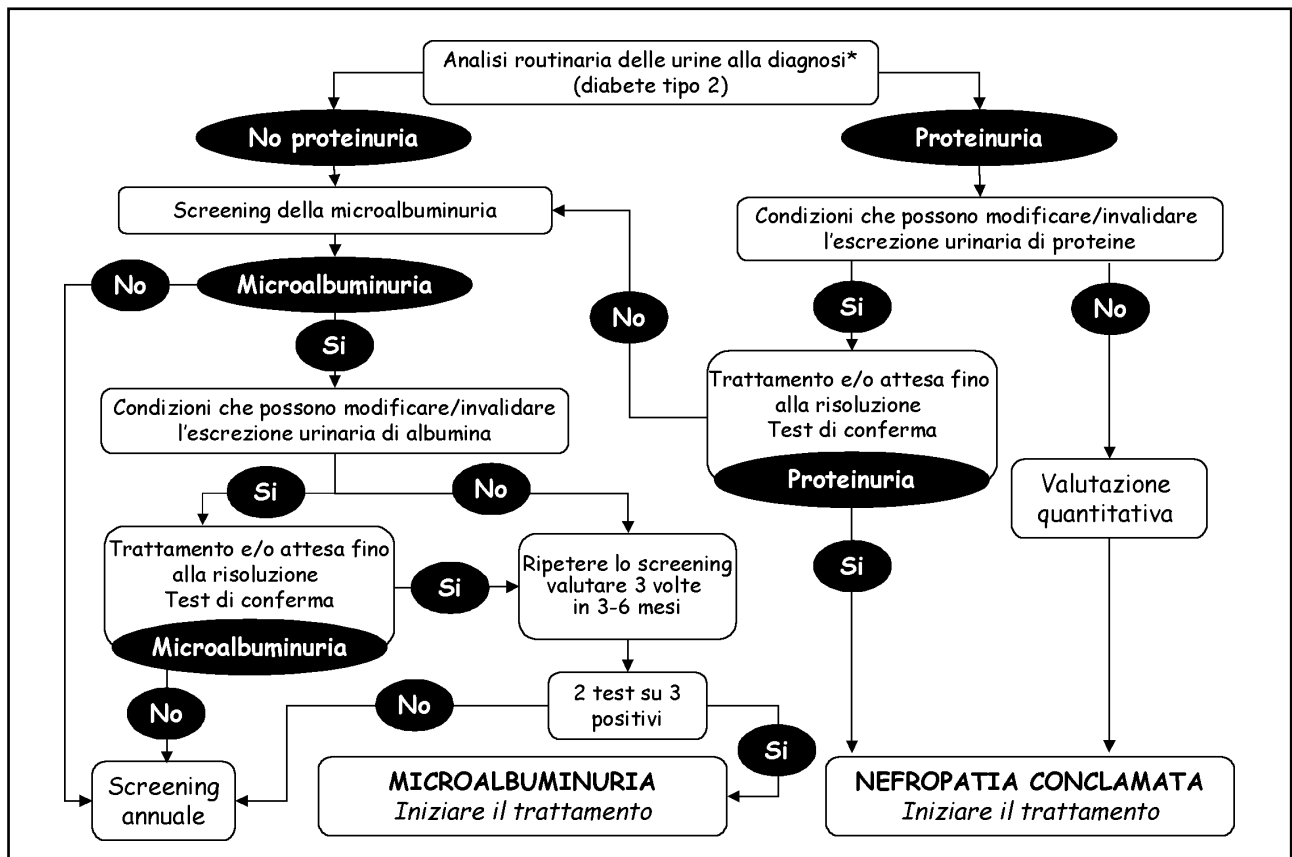


Tabella II. Variabilità dell'escrezione urinaria dell'albumina.

	Rilevanza nella pratica clinica
1. Variabilità intra-individuale biologica dell'AER e del rapporto albuminuria/creatininuria (CV ~30-50%)	Si
2. Diabete in cattivo controllo glicemico o diabete di nuova diagnosi	Si
3. Esercizio fisico/postura	Si *
4. Infezione delle vie urinarie	No
5. Insufficienza cardiaca	verosimile
6. Malattie intercorrenti	No
7. Carico idrico (effetto transitorio)	No
8. Ematuria, flusso mestruale, infezioni genitali	Si
9. Carico orale di proteine (effetto transitorio)	No

*raccolte urinarie overnight o early morning escludono questo problema.

3-4 settimane, la variabilità intergiornaliera dell'escrezione urinaria dell'albumina, della concentrazione dell'albumina, e del rapporto albuminuria/creatininuria. Queste due ultime misure sono state valutate non soltanto nelle urine delle 24 ore, ma anche nelle prime urine del mattino (first voiding sample) ed in urine random non temporizzate. In volontari sani, il coefficiente di variazione (CV) intra-soggetto più basso è stato registrato per la concentrazione dell'albumina (36%) e per il rapporto albuminuria/creatininuria (31%) misurati sulle prime urine del mattino. Gli autori raccomandano quindi l'impiego della concentrazione dell'albumina urinaria o del rapporto albuminuria/creatininuria nelle prime urine del mattino piuttosto che la raccolta delle 24 ore che presentava un CV intra-individuale più alto. Nei diabetici, il CV intra-individuale è risultato del 61% per la concentrazione dell'albumina nelle urine del primo mattino e del 39% per il rapporto albuminuria/creatininuria¹⁵. Uno studio analogo eseguito presso il nostro laboratorio ha dato, in accordo ad altri dati della letteratura¹⁶, risultati almeno in parte diversi. In 12 diabetici di tipo 1 e in 10 soggetti di controllo una raccolta "frazionata" di urine è stata ripetuta tre volte in un intervallo di 15-20 giorni. Il primo campione di urine è stato quello della mattina al risveglio (first morning sample), seguito da raccolte successive e temporizzate eseguite: 1. tra il risveglio ed il pranzo, 2. tra il pranzo e la cena, 3. tra la cena ed il momento di coricarsi, 4. tra il momento di coricarsi ed il risveglio. Le varie frazioni erano infine "sommate" per ottenere il campione delle 24 ore. La raccolta delle "24 ore" ha presentato il più basso CV intra-individuale, inferiore anche a

quello della raccolta "overnight" sia nei diabetici (AER: $17.5 \pm 10.2\%$ vs $27.2 \pm 16.4\%$, $p < 0.05$; ALB/CR: $26.2 \pm 18\%$ vs $36.4 \pm 18\%$, $p < 0.05$) che nei controlli (AER: $20.5 \pm 10.4\%$ vs $31 \pm 37\%$; ALB/CR: $23.5 \pm 13\%$ vs $32.9 \pm 37.8\%$). Esprimendo l'albuminuria come AER ($\mu\text{g}/\text{min}$) piuttosto che come UAE ($\mu\text{g}/\text{ml}$), il CV intraindividuale si riduceva in ogni frazione della giornata; in particolare, nella raccolta delle "24 ore" la riduzione era del 35% nei diabetici (da $26.4 \pm 17\%$ a $17.5 \pm 10.2\%$, $p < 0.05$) e del 45% nei controlli (da 37.8% vs 20.5% , $p < 0.01$); la espressione come rapporto albuminuria/creatininuria (il dosaggio della creatinina urinaria funge da tampone ai possibili effetti della diluizione o concentrazione del campione) permetteva una analoga riduzione del CV intra-individuale.

I campioni di urine temporizzate, "overnight" ($\mu\text{g}/\text{min}$) o 24 ore (mg/24h) - quest'ultima rende possibile la contemporanea determinazione della clearance della creatinina - consentono la più accurata stadiazione di nefropatia, ma sono spesso poco pratiche e poco convenienti. Inoltre, sono facilmente soggette ad incompletezze della raccolta ed errori nella indicazione dei tempi della raccolta stessa. Le urine "early morning" sono di semplice raccolta, non sono influenzate dall'attività fisica, presentano una accettabile variabilità intra-individuale e costituiscono pertanto il campione ideale per lo screening della microalbuminuria (Tabella 3). La concentrazione dell'albumina urinaria (mg/L) misurata su campioni "early morning" soprattutto quando corretta per la concentrazione della creatinina (rapporto albumina/creatinina, mg/mmol) presenta ottime correlazioni con l'AER¹⁵. Il rapporto albuminuria/crea-

Tabella III. Pro e contro di quattro diversi tipi di raccolta urinaria per il dosaggio dell'albuminuria.

	24-hour	Overnight	First-morning	Random
Unità di misura	Gold standard mg/24h	Gold standard $\mu\text{g}/\text{min}$	mg/L	mg/L
Soglia per la microalbuminuria	30 mg/24h	20 $\mu\text{g}/\text{min}$	mg/mmol* 20 mg/L 2.5-3.5 (M/F) mg/mmol	mg/mmol* 20 mg/L 2.5-3.5 (M/F) mg/mmol
Semplicità	no	talvolta	Si	si
Influenza dell'esercizio fisico	si	no	No	si
Variabilità intra-individuale	ampia	moderata	moderata	ampia
Note	Sconveniente per il paziente Bassa compliance	Ideale per monitorare la microalbuminuria	Ideale per lo screening	Possibile uso per lo screening

tininuria è quindi del tutto accettabile per lo screening, ma soltanto informazioni limitate sono disponibili per quanto ne riguarda l'uso per monitorare la risposta alla terapia; a questo fine, le raccolte delle 24 ore o overnight sono forse preferibili.

Raccomandazione:

Campioni accettabili per la stima dell'albuminuria sono le raccolte temporizzate delle urine (24 ore o overnight) che consentono la determinazione dell'albumin excretion rate (AER), ma anche campioni non temporizzati (first voiding sample) sui quali misurare il rapporto albuminuria/creatininuria.

Evidenza di livello: E

La concentrazione dell'albumina urinaria è stabile in campioni "non-trattati" conservati a 4 o 20°C per almeno una settimana¹⁷.

Né filtrazione, né centrifugazione sono necessarie prima della conservazione del campione a -20 o -80°C¹⁸. Campioni centrifugati, filtrati o non-trattati, presentano tutti una riduzione dello 0.27% per giorno quando conservati a -20°C, mentre nessuna riduzione è stata osservata in campioni conservati fino a 160 giorni a -80°C¹⁸. Nel nostro laboratorio sono stati ottenuti i seguenti risultati: 1. la conservazione a 4°C per 72 ore non altera la concentrazione urinaria dell'albumina misurata con metodica radioimmunologica; 2. analogamente, nessuna riduzione dell'albumina è stata rilevata in campioni conservati a -20°C per due mesi; 3. una modesta riduzione della concentrazione dell'albumina (-5% per anno) è stata osservata in campioni conservati per due o più anni a -20°C; 4. pool di urine

(almeno 3 su 21, 14%) conservati per 4-21 mesi a -20°C, hanno presentato significative riduzione di concentrazione dell'albumina.

L'immagazzinamento a -80°C potrebbe essere quindi preferibile per campioni destinati ad essere conservati per periodi superiori a 12 mesi¹⁹.

La performance analitica di una variabile può essere correlata al grado di variabilità biologica, con precisioni minori richieste per analiti che presentano una ampia variabilità nei soggetti che devono essere esaminati. In funzione della variabilità intra-individuale della concentrazione dell'albumina urinaria in campioni "early-morning" (36%) e al fine di mantenere il CV analitico inferiore alla metà della variabilità biologica, Howey e coll.¹⁵ hanno proposto come obiettivo del metodo di dosaggio un CV analitico non superiore al 18%. In alternativa, l'impiego del rapporto albumina/creatinina, può richiedere una qualche minor imprecisione del metodo di dosaggio in funzione della minore variabilità biologica del rapporto albumina/creatinina (31%)¹⁵ e del contributo alla imprecisione complessiva introdotto dal dosaggio della creatinina. Assumendo un CV per la misura della creatinina del 5%, è possibile calcolare un obiettivo del 14.7% per il CV analitico del dosaggio dell'albuminuria quando il metodo è utilizzato per la stima del rapporto albuminuria/creatininuria.

Raccomandazione:

Il coefficiente di variazione (CV) analitico dei metodi impiegati per misurare la microalbuminuria dovrebbe essere inferiore al 15%

Evidenza di livello: E

Tabella IV. Microalbuminuria: metodiche di dosaggio in laboratorio.

	Sensibilità (mg/l)	Range di lavoro (mg/L)	Variabilità (CV%) # (inter-assay)	Strumenti necessari	Principali caratteristiche
Radioimmunoassay (RIA)	0.5	0.8-80	<10	gamma-counter	radioattivo deterioramento dei reagenti elevato costo*
Immunodiffusione radiale (RID)	2	6-90	<8	lettore di piastre RID	laboriosità basso costo*
Metodo immuno-enzimatico (ELISA)	0.02	2-200	<10	lettore di piastre ELISA	laboriosità basso costo*
Immunonefelometria	1	2-500	<8	nefelometro	rapidità elevato costo* automatizzato
Immunoturbidimetria	5	5-400	<8	spettrofotometro	rapidità elevato costo* automatizzato

massima precisione è richiesta per concentrazioni comprese tra 10 e 40 mg/L (range che include la soglia per la microalbuminuria)

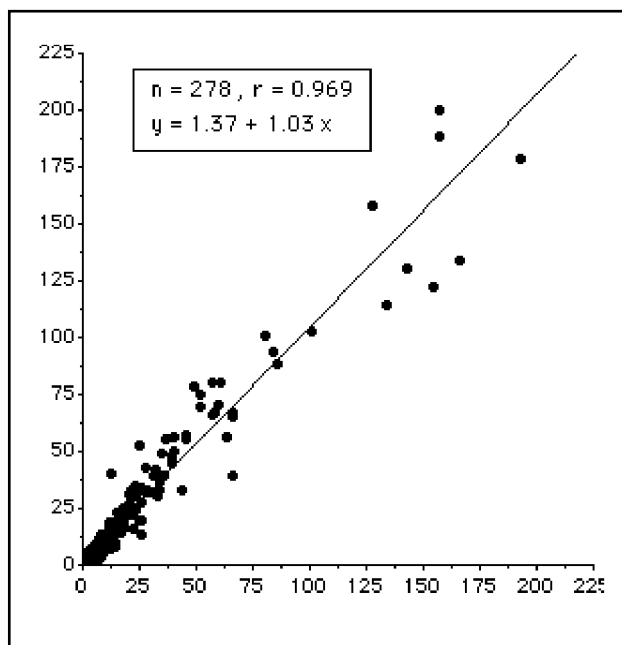
* costo della strumentazione

Un obiettivo del 15% per il CV analitico del dosaggio della concentrazione dell'albumina urinaria appare quindi ragionevole per utilizzare la misura della concentrazione dell'albumina sia per il calcolo dell'"albumin excretion rate" che per quello del rapporto albuminuria/creatininuria.

I metodi disponibili per la misurazione quantitativa della microalbuminuria hanno limiti di rilevazione (sensibilità) pari a 20 µg/L o anche più bassi. Le variabilità intra- e inter-assay risultano ampiamente compatibili con l'obiettivo analitico del 15%, e spesso sono molto più basse. Uno studio recente dimostra che la maggior parte dei metodi, ma non tutti, sono in accordo tra loro almeno entro un intervallo di riferimento di 2-20 µg di albumina/mg di creatinina²⁰.

I metodi attualmente più utilizzati sono l'immunoturbidimetria e l'immunonefelometria, mentre poco diffuse sono sia le tecniche radioimmunologiche che le immunoenzimatiche. Il dosaggio radioimmunologico infatti, introdotto nel 1963, estremamente sensibile e preferenzialmente utilizzato nella maggior parte dei principali trials clinici, è stato ampiamente sostituito nei laboratori di chimica-clinica da metodiche immunologiche non radioisotopiche quali la immunonefelometria e la immunoturbidimetria.

Figura 2. Regressione tra i risultati ottenuti con il metodo radioimmunologico (ascisse) e con il metodo immunonefelometrico (ordinate).



Entrambe le procedure (Tabella 4) sono sufficientemente sensibili (in realtà, il metodo immunoturbidimetrico, non ha la sensibilità per misurare in maniera precisa la normale concentrazione di albumina nelle urine che spesso è inferiore a 5 mg/L), presentano variabilità analitiche accettabili (<10%) e, in quanto facilmente automatizzabili, consentono un elevato numero di determinazioni in tempi brevi ed a bassi costi.

L'immunoturbidimetria, inoltre, offre il vantaggio di un ampio range analitico (5-400 mg/L) senza necessità di diluizione del campione. Entrambi i metodi presentano eccellenti correlazioni con il radioimmunoassay. Nel nostro laboratorio, l'immunonefelometria, metodo che misura la luce deviata dalla presenza di complessi antigene-anticorpo precipitati in fase liquida, è risultata altrettanto accurata e precisa del radioimmunoassay; valori sovrapponibili sono stati ottenuti con i due metodi per tutto il range di concentrazioni esplorato (INA=1.37+1.03RIA; n=278, r=0.969) (Figura 2), e simili sono stati i risultati in termini di sensibilità (1 µg/mL vs 0.3-0.4 µg/mL), e di variabilità tra i saggi (CV = 5-7% vs 8-12%)^{21,22}.

In Figura 3 sono riportati i risultati ottenuti dal nostro laboratorio nel confrontare radioimmunoassay e metodi immunoturbidimetrici (due kit diversi sono stati valutati); anche in questo caso l'agreement tra metodiche, verificato in 136 campioni, è risultato soddisfacente. Test qualitativi (o semiquantitativi) per la stima della concentrazione dell'albuminuria urinaria sono stati proposti come metodi di screening per la microalbuminuria. Per essere utili, i test di screening devono avere alta sensibilità cioè devono avere una elevata efficienza nel rilevare i campioni con concentrazione di albumina superiore alla soglia diagnostica della microalbuminuria.

Raccomandazione:

I test semiquantitativi o qualitativi per lo screening della microalbuminuria dovrebbero essere positivi in più del 95% dei pazienti con microalbuminuria per poter essere utilizzati in maniera efficiente per lo screening. I risultati positivi devono essere confermati da analisi quantitative effettuate in un laboratorio accreditato.

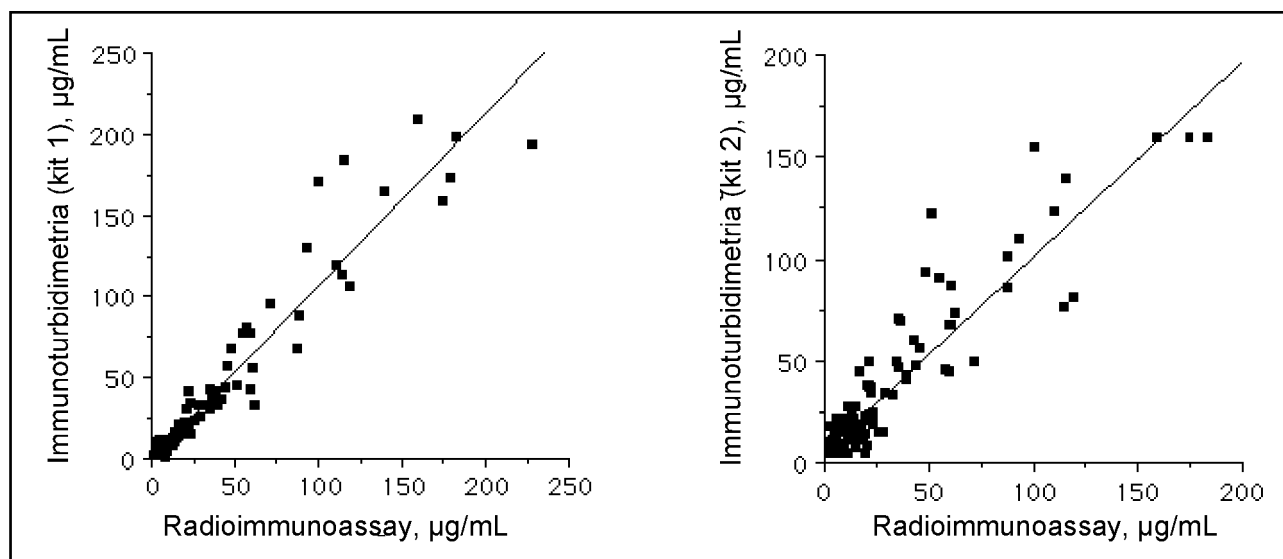
Evidenza di livello: E

Sebbene molti studi abbiano dimostrato la capacità delle strisce in chimica secca di rilevare elevate concentrazioni di albumina nelle urine, rimane da determinare con quale efficienza tali metodi sono in grado di individuare la microalbuminuria, cioè l'aumento sopra determinati livelli soglia dell'AER o del rapporto albumina/creatinina.

Tra gli studi pubblicati nessuno riporta sensibilità nella rilevazione di aumentati valori di AER pari o superiori al 95%.

In un ampio studio²³ la sensibilità di rilevazione di una AER >30mg/24h risultava pari al 91% quando il test semiquantitativo era eseguito da un singolo tecnico di laboratorio, all'86% se il test era eseguito da infermieri e al 66% quando era effettuato dal medico di Medicina Generale. In due studi più recenti^{24,25} la sensibilità variava dal 67% all'86%. Anche il riscontro di falsi positivi sembra essere comune, con per-

Figura 3. Regressione tra i risultati ottenuti con il metodo radioimmunologico (ascisse) e con i metodi immunoturbidimetrici (ordinate).



centuali di falsi positivi fino al 15%²³. Quindi i test disponibili, soprattutto se utilizzati nella pratica clinica, non mostrano attualmente le caratteristiche necessarie per l'applicazione allo screening della microalbuminuria a causa della loro bassa sensibilità (alti livelli di falsi negativi); inoltre, vi è la necessità di confermare con un metodo di laboratorio i risultati positivi. Quando un test di screening mostra una bassa sensibilità diagnostica, anche i risultati negativi devono essere confermati, un approccio che diventa quindi completamente improponibile. I test semiquantitativi devono necessariamente utilizzare un cut-off <20 mg/L allo scopo di assicurare la rilevazione sistematica di concentrazioni di albumina >20 mg/L misurata dai metodi di laboratorio. D'altra parte, la valutazione di un test in chimica secca deve essere limitata al confronto con campioni urinari in cui la concentrazione dell'albumina è compresa tra 20 e 50 µg/mL, mentre è del tutto inadeguato dimostrare che il metodo è capace di rilevare concentrazioni di albumina più elevate. Ulteriori studi sono necessari prima di poter raccomandare l'impiego dei test in chimica secca per il dosaggio della microalbuminuria in alternativa ai metodi di dosaggio quantitativi. L'utilizzo di test qualitativi sarà infatti ragionevole solo quando si potrà dimostrare che questo consente di evitare il dosaggio quantitativo in un'ampia percentuale di soggetti e di assicurare l'identificazione dei pazienti con precoce patologia renale.

Altre proteine urinarie

Numerosi enzimi e proteine urinarie a basso peso molecolare presentano un'aumentata escrezione nel diabete mellito. In molti casi tale fenomeno è indipendente dall'escrezione dell'albumina. Il concetto che l'escrezione di β 2-microglobulina, un marker di alterata funzione tubulare, non è aumentata in soggetti con nefropatia o con microalbumi-

nuria è stato messo in discussione a causa dell'instabilità di tale proteina in urine "normalmente" acide. Aumentate escrezioni di β 2-microglobulina, correlate alla eliminazione della proteina legante il retinolo (RBP), un altro marker di disfunzione tubulare, sono state rilevate dopo alcalinizzazione in vivo delle urine. L'escrezione di enzimi quali l'N-acetil-glucosaminidasi (NAG), la gamma-glutamyl transferasi e la fosfatasi alcalina e di altre proteine quali la alfa1-microglobulina, l'RBP, le catene leggere delle immunoglobuline e la transferrina può aumentare precocemente nella malattia diabetica ed indipendentemente dall'escrezione dell'albumina, talora in correlazione con la qualità del controllo glicemico. Nessuno studio ha tuttavia ancora dimostrato l'eventuale valore predittivo dei marker di funzione tubulare nei confronti dell'insorgenza o della progressione della nefropatia.

Appendice. Sistema di gradazione delle raccomandazioni.

Livello di evidenza	Descrizione
A	Chiara evidenza derivata da trials ben condotti, randomizzati, controllati, multicentrici, generalizzabili e/o meta-analisi.
B	Evidenza derivata da studi di coorte ben condotti, prospettici, e/o studi caso-controllo, e/o meta-analisi di studi di coorte.
C	Evidenza derivata da studi non adeguatamente controllati o non-controllati o evidenze contrastanti ma con peso sbilanciato a supporto della raccomandazione.
E	Consenso tra esperti o esperienza clinica.

Bibliografia

1. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2002;25 (suppl. 1): S97-S99,.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2002;25 (suppl. 1):S33-S49.
3. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis C, Ashwood E, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999:750-808.
4. Rotblatt MD, Koda-Kimble MA. Review of drug interference with urine glucose tests. *Diabetes Care* 1987;10: 103-10.
5. Porter WH, Yao HH, Karounos DG. Laboratory and clinical evaluation of assays for beta-hydroxybutyrate. *Am J Clin Pathol* 1997;107:353-8.
6. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002;346: 1145-51.
7. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
8. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
9. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, and Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993;329:1456-62.
10. Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:870-8.
11. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, et Al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2001;345:851-60.
12. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861-9.
13. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 2000;49:1399-408.
14. American Diabetes Association. Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* 2002;25 (suppl. 1): S85-S89.
15. Howey JE, Browning MC, Fraser CG. Biologic variation of urinary albumin: consequences for analysis, specimen collection, interpretation of results, and screening programs. *Am J Kidney Dis* 1989;13:35-7.
16. Hutchison AS, Paterson KR. Collecting urine for microalbumin assay. *Diabetic Medicine* 1988;5:527-32.
17. Collins AC, Sethi M, MacDonald FA, Brown D, Viberti GC. Storage temperature and differing methods of sample preparation in the measurement of urinary albumin. *Diabetologia* 1993;36:993-7.
18. MacNeil ML, Mueller PW, Caudill SP, Steinberg KK. Consideration when measuring urinary albumin: precision, substances that may interfere, and conditions for sample storage. *Clin Chem* 1991;37:2120-3.
19. Giampietro O, Cruschelli L, Penno G, Navalesi R, Clerico A. More on effects of storage time and temperature on measurement of small concentrations of albumin in urine. *Clin Chem* 1991;37:591-5.
20. Roberts WL, Calcote CB, Cook CB, et al. Comparison of four commercial urinary albumin (microalbumin) methods: implications for detecting diabetic nephropathy using random urine specimens. *Clin Chim Acta* 1998;273:21-33.
21. Giampietro O, Lucchetti A, Cruschelli L. Measurement of Urinary Albumin Excretion (UAE) in Diabetic Patients: Immunonephelometry versus Radioimmunoassay. *J Nucl Med Allied Sci* 1989;33:252-7.
22. Giampietro O, Penno G, Clerico A, Cruschelli L, Lucchetti A, Nannipieri M, Cecere M, Rizzo L, Navalesi R. Which method for quantifying "microalbuminuria" in diabetics? Comparison of several immunological methods (immunoturbidimetric assay, immunonephelometric assay, radioimmunoassay and two semiquantitative tests) for measurement of albumin in urine. *Acta Diabetol* 1992;28:239-45.
23. Poulsen PL, Hansen B, Amby T, Terkelsen T, Mogensen CE. Evaluation of a dipstick test for microalbuminuria in three different clinical settings, including the correlation with urinary albumin excretion rate. *Diabete Metab* 1992;18:395-400.
24. Fernandez Fernandez I, Paez Pinto JM, Hermosin Bono T, Vazquez Garijo P, Ortiz Camunez MA, Tarilonte Delgado MA. Rapid screening test evaluation for microalbuminuria in diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1998;35: 199-202.
25. Leong SO, Lui KF, Ng WY, Thai AC. The use of semi-quantitative urine test-strip (Micral Test) for microalbuminuria screening in patients with diabetes mellitus. *Singapore Med J* 1998;39:101-3.