

Le malattie da deficit dell'apporto iodico e le metodiche di determinazione della ioduria

P. Trimboli^a, E. Marchioni^b

^aServizio di Endocrinologia, Ospedale Israelitico, Roma

^bDipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università Tor Vergata, Roma

Riassunto

Lo iodio è un oligoelemento indispensabile per la sintesi degli ormoni tiroidei che regolano il metabolismo, lo sviluppo e la maturazione di molti apparati. Il suo fabbisogno giornaliero varia con l'età, durante la gravidanza e nel corso dell'allattamento. Poiché la principale (98%) via di escrezione dello iodio è renale, l'apporto iodico si valuta tramite il dosaggio della concentrazione di iodio nelle urine (ioduria).

La maggior parte delle metodiche per la determinazione della ioduria prevedono una misurazione spettrofotometrica in merito alla reazione di Sandell-Kolthoff. Sono state inoltre proposte apparecchiature automatizzate che prevedono l'utilizzo della tecnica dell'HPLC e dell'ICP/MS, molto affidabili ma più costose.

Summary

Iodine deficiency disorders and methods for determination of urinary iodine concentration

Iodine is an essential oligoelement in the synthesis of thyroid hormones. The main source of iodine is dietary and its requirement changes with age, as well as during pregnancy and feeding. Because the main (98%) pathway of excretion of iodine is renal, the daily intake of a subject is assessed by measurement of urinary iodine concentration (UIC).

Several methods for measurement of UIC are based on spectrophotometric evaluation of iodine according to Sandell-Kolthoff reaction. Automatic methods using HPLC and ICP/MS technique, with high effectiveness but high cost, have been also proposed. This review examines the characteristics of analytical methods for iodine measurement, and diagnostic strategies for the prevention of iodine-deficient disorders.

Key-words: iodine deficiency disorders, urinary iodine concentration.

Lo iodio

Lo iodio è un oligoelemento poco presente in natura e presente in piccole quantità nell'organismo umano. In molti paesi del mondo tra cui anche l'Italia, lo iodio è presente in quantità così esigue nello strato più superficiale del suolo, nelle acque e negli alimenti che il fabbisogno minimo giornaliero non può essere soddisfatto. Nel corso delle diverse ere geologiche lo iodio, presente nel suolo in quantità minime, è stato progressivamente dilavato dallo scioglimento dei ghiacci e dalle piogge ed immesso nelle acque marine. Da queste, per effetto delle radiazioni solari, evapora nell'atmosfera e successivamente ricade al suolo per azione delle piogge e dei venti: da qui viene nuovamente ricondotto nei mari attraverso un ciclo mare-aria-suolo (ciclo dello iodio). Lo iodio ingerito viene assorbito dall'intestino e trasportato nei tessuti che hanno la possibilità di cap-

tarlo. Lo iodio è indispensabile per la sintesi degli ormoni tiroidei (iodotironine) i quali regolano il metabolismo, lo sviluppo, la maturazione del sistema nervoso e di molti organi e apparati, la dinamica circolatoria e il normale accrescimento corporeo.

La principale (98%) via di escrezione dello iodio è renale e per questo motivo l'apporto iodico si valuta tramite il dosaggio della concentrazione di iodio nelle urine (ioduria). La fonte principale di iodio è costituita dagli alimenti e il suo fabbisogno giornaliero è di 150-200 µg ma varia con l'età, durante la gravidanza e nel corso dell'allattamento (Tab. I).

Le malattie da deficit dell'apporto iodico (IDD, Iodine Deficiency Disorders)

L'insufficiente apporto iodico alimentare determina una serie di manifestazioni cliniche, denominate malat-

Tabella I. Apporto quotidiano di iodio raccomandato e valori normali di ioduria in base ai diversi momenti della vita (IOM, WHO, UNICEF, UICCDD).

Momenti della vita	Apporto iodico($\mu\text{g}/\text{die}$)	Ioduria($\mu\text{g}/\text{L}$)
0-6 mesi	110	150
7-12 mesi	130	180-220
1-8 anni	90	100-200
9-13 anni	120	100-200
14 fino età adulta	150	100-200
Gravidanza	200-220	200-300
Allattamento	200-290	200-300

tie da deficit dell'apporto iodico (IDD, Iodine Deficiency Disorders), che si manifestano, a seconda della gravità, della durata e del periodo di esposizione alla carenza iodica con vari quadri clinici:

- nel feto: aborti, natimortalità, anomalie congenite
- nel neonato: aumento della mortalità perinatale, gozzo, ipotiroidismo, cretinismo (neurologico e mixedematoso), ritardato sviluppo psicomotorio e mentale
- nell'adolescente: gozzo, ipotiroidismo giovanile, variabile ritardo mentale, ritardo dell'accrescimento, aumentata suscettibilità alle radiazioni.

Nel mondo oltre 1 miliardo di individui sono a rischio di sviluppare IDD. Tra questi, più di 500 milioni sono portatori di gozzo e quasi 11 milioni sono affetti da cretinismo. Tale gruppo di patologie non costituisce un problema di salute pubblica nei Paesi (Stati Uniti, Canada, Svezia, Svizzera, Austria, ecc) dove i programmi nazionali basati sull'uso di sale addizionato con iodio già da molti anni ne hanno normalizzato l'apporto alimentare. In molte altre aree geografiche la carenza iodica è invece ancora presente e in alcuni casi severa, specie nelle aree socio-economicamente meno sviluppate, come alcune zone dell'Africa, dell'Asia e dell'America del Sud. In altri paesi, tra cui l'Italia, la carenza iodica è lieve o moderata, e le IDD hanno tuttora una prevalenza elevata. Infatti, alle aree di endemia gozzigena già note (zone della Val d'Aosta, Piemonte e Trentino Alto-Adige), vanno aggiunte aree più o meno estese, specie rurali, lungo il decorso della dorsale appenninica e nelle isole. Solo recentemente, nel 2005, un provvedimento legislativo ha reso obbligatoria anche in Italia la presenza del sale addizionato con iodio (sale iodato) in tutti i punti vendita.

Per la diagnosi delle IDD, è fondamentale la raccolta dei dati anamnestici, con particolare attenzione all'età, alla familiarità, alla zona di provenienza e di residenza del paziente e alle abitudini alimentari. Segue l'esame obiettivo della regione anteriore del collo, e la diagnosi strumentale che si avvale principalmente dell'ecografia tiroidea. Gli esami di laboratorio utili sono ioduria, TSH, FT_3 , FT_4 , ma solo i primi due sono strettamente necessari. Il dosaggio della ioduria è utilizzato specialmente nelle indagini epidemiologiche ed in con-

dizioni particolari quali la gravidanza e l'allattamento, in cui è necessario accertare che venga soddisfatta l'aumentata richiesta di apporto iodico.

La gravidanza rappresenta, infatti, una condizione fisiologica in cui la tiroide va incontro ad un adattamento funzionale. Durante la gestazione, infatti, si verificano quattro eventi che determinano un aumentato fabbisogno giornaliero di iodio:

1. l'aumentata clearance renale;
2. il passaggio iodico transplacentare;
3. l'incremento dell'uptake iodico da parte della tiroide;
4. l'aumentata richiesta periferica di ormone tiroideo.

In particolare, l'incremento del flusso ematico renale e della velocità di filtrazione glomerulare provocano un aumento della clearance renale dello iodio. Alla perdita renale si aggiunge la quota di iodio che viene messa a disposizione del feto attraverso la placenta e che aumenta di pari passo con la maturazione della funzione tiroidea fetale e con il crescere del pool di ormoni tiroidei fetali. Il trasferimento transplacentare di iodio è necessario dalla 12^a-14^a settimana di gestazione per assicurare l'adeguata attività ormonogenetica della tiroide fetale, in quanto le cellule follicolari fetali iniziano a sintetizzare ormoni tiroidei dopo il primo trimestre di gestazione e prima di tale periodo il feto è totalmente dipendente dalla T4 materna. La richiesta di ormone tiroideo durante la gravidanza, pertanto, aumenta fino al 50% e un normale apporto iodico giornaliero di questo oligoelemento deve ricadere negli intervalli raccomandati in corso di gravidanza dalla WHO (World Health Organization), dall'UNICEF (United Nations Children's Fund) e dall'ICCIDD (International Council for the Control Iodine Deficiency Disorders) pari a 200-300 $\mu\text{g}/\text{d}^{1,2}$. In considerazione di queste modificazioni a carico del metabolismo dello iodio che si verificano nel corso della gravidanza, risulta dunque importante monitorare l'apporto iodico ed eventualmente correggerne una condizione di carenza².

Il sintomo predominante della carenza iodica in età adolescenziale può essere la ridotta velocità di crescita staturale: questo perché il deficit di ormoni tiroidei provoca sia la diminuita secrezione di GH, sia il suo minore effetto sulla cartilagine di accrescimento.

La manifestazione clinica più frequente della carenza iodica è il gozzo, più frequente nel sesso femminile (F/M = 9/1) e durante la pubertà e la gravidanza. Il gozzo si distingue in diffuso e nodulare, mentre dal punto di vista etiopatogenetico ed epidemiologico, si classifica in sporadico, familiare ed endemico. Il gozzo sporadico è di occasionale riscontro e le cause principali sono la relativa carenza iodica che si accentua in determinate condizioni (gravidanza, allattamento, ecc.), i lievi difetti enzimatici della biosintesi degli ormoni tiroidei di difficile rilevazione o, infine, le cause iatrogeniche (assunzione di sostanze gozzigene o di farmaci ad azione antitiroidea). Il gozzo si definisce endemico, se presente in più del 10% della popolazione adulta o in più del 20% della popolazione in età scolare di una determinata area geografica; la causa principale (98%) è la carenza nutrizionale di iodio nella dieta.

Strategie preventive applicabili per le IDD

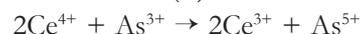
Le IDD possono essere eradicabili con la profilassi iodica generalizzata. Fra gli alimenti più comuni i prodotti ittici sono i più ricchi di iodio. Il sistema migliore, però, per assicurare l'adeguato apporto giornaliero è aggiungere lo iodio ad un alimento usato ogni giorno in quantità anche minima, cioè il sale (sale iodato): provvedimento dal costo irrisorio e dai sicuri benefici. In Italia, di tutto il sale consumato, solo il 40% circa è iodato e solo recentemente è stata approvata la legge (n 55 del 21.03.2005 pubblicata sulla GU n 91 del 20.04.2005) che prevede l'obbligatorietà della presenza di sale iodato in tutti i punti vendita e "assicura la contemporanea disponibilità di sale arricchito con iodio e di sale alimentare comune, nei supermercati e punti di vendita; quest'ultimo è fornito solo su specifica richiesta del consumatore". Questo provvedimento, unitamente a campagne di sensibilizzazione dell'opinione pubblica dovrebbe condurre ad una drastica riduzione delle IDD così come si è verificato nei paesi che hanno adottato questo provvedimento da oltre cinquanta anni, accompagnata da un notevole risparmio della spesa sanitaria per la terapia di tutte le IDD.

Malgrado questi provvedimenti legislativi, è ancora frequente in Italia, anche in aree metropolitane, il riscontro di dati allarmanti. In particolare, è stato recentemente dimostrato come, in un gruppo di donne in gravidanza residenti a Roma, l'apporto iodico fosse molto più basso rispetto alle indicazioni fornite dai maggiori organismi mondiali, nonostante il gruppo di controllo non in gravidanza presentasse una normale ioduria³.

Metodiche di determinazione della ioduria

La maggior parte delle metodiche per la determinazione della concentrazione urinaria dello iodio prevedono una misurazione spettrofotometrica dello iodio in merito alla reazione di Sandell-Kolthoff⁴. Infatti, lo iodio risulta essere un catalizzatore di una reazione di

ossidazione-riduzione in cui uno ione cerico (IV) di colore giallo viene ridotto a ione ceroso (III) praticamente incolore, parallelamente all'ossidazione dello ione arsenioso (III) a ione arsenico (V).



Pur essendo una metodica molto sensibile, la determinazione dello iodio in campioni di urine mediante la reazione di Sandell-Kolthoff presenta alcune problematiche non trascurabili: le urine, infatti, contengono grosse quantità di sostanze interferenti con la reazione di ossido-riduzione sopra descritta (nitrati, tiocianati e ioni ferrosi) ed è per questo che i campioni non possono essere utilizzati così come sono, ma devono essere pre-trattati. Una delle metodiche di pre-trattamento prevede l'incenerimento umido ad alte temperature in presenza di un acido forte quale l'acido clorico. A 400 µl di campione di urina si aggiungono 3 ml di acido clorico in un tubo di vetro Pyrex lungo 13cm e con un diametro pari a 13mm e si carbonizza il tutto a temperature pari a 110-115°C in un bagnetto ad olio o a sabbia per circa 1-1,5 ore, fino a quando si forma un precipitato umido di colore rosso dovuto al dicromato di sodio utilizzato durante la preparazione dell'acido clorico. A questo punto si aggiungono 2,5 ml di acqua deionizzata e la soluzione assume una colorazione giallognola. Si aggiungono quindi 2 ml di arsenito di sodio e si attende che la soluzione diventi incolore. Si lascia il tutto a 30°C per circa 30 minuti e poi si aggiungono 2 ml di solfato di cerio (la soluzione ridiventa gialla). L'aggiunta del secondo reagente deve avvenire a tempi discreti in quanto il tempo di reazione deve essere lo stesso in ogni tubo. L'assorbimento a 420 nm permette di determinare la concentrazione urinaria dello iodio presente nel tubo e il suo valore risulta essere inversamente proporzionale alla quantità assoluta di iodio riscontrata; in pratica più velocemente la soluzione passa da giallo ad incolore, più la quantità di iodio presente nel tubo (che risulta essere un catalizzatore della reazione di Sandell-Kolthoff) risulta elevata. Il valore di iodio presente nel tubo viene calcolato interpolando il valore di assorbimento rilevato, con la curva standard ottenuta a partire da campioni di riferimento con quantità crescenti di iodio. Come standard si utilizza generalmente lo ioduro di potassio (KI).

I fumi derivanti dal processo di carbonizzazione pre-dosaggio sono molto tossici; è pertanto fondamentale che l'operatore lavori in presenza di una potente cappa chimica aspirante in grado di catturare i vapori rilasciati. Inoltre, lavorando in tubi di vetro, la metodica risulta essere poco adatta in studi sistematici che prevedono grosse quantità di campioni da analizzare; il tutto aggravato dalla condizione non trascurabile dell'utilizzo di un bagnetto ad olio o a sabbia in grado di raggiungere temperature elevate (110-115°C) e che per definizione non presentano grande capacità. Non può essere utilizzato il bagnetto ad acqua a causa delle temperature necessarie per il processo d'incenerimento

previsto dalla reazione. Non è possibile inoltre utilizzare contenitori di materiale polimerico perché in presenza di acido clorico ad alte temperature potrebbero usurarsi con conseguente rilascio dei prodotti della reazione. I reagenti utilizzati nella reazione di Sandell-Kolthoff sono fortemente tossici e non possono essere dispersi nell'ambiente ma vanno smaltiti in maniera adeguata.

Pino et al. hanno proposto l'utilizzo dell'ammonio persolfato al posto dell'acido clorico nel processo di pre-trattamento antecedente la reazione di Sandell-Kolthoff⁵. Tuttavia, pur rappresentando una metodica senza dubbio più sicura (viste le proprietà potenzialmente esplosive e corrosive dei residui secchi dell'acido clorico) e risultando oltretutto più economica, si presentano gli stessi inconvenienti descritti nella precedente reazione, con il vantaggio però di poter utilizzare volumi più moderati (1 ml). Per velocizzare la procedura e minimizzare la quantità di rifiuti tossici, Ohashi et al. proposero il metodo APDM (Ammonium Persulfate Digestion on Microplate)⁵. Questa metodica prevede l'uso di micropiastre da 96 pozzetti in polipropilene (PP) a cui si aggiungono 50 µl di campione e 100 µl di persolfato d'ammonio. Per evitare la dispersione e la contaminazione incrociata dei vari pozzetti della micropiastre con i vapori della reazione è stata disegnata una speciale cassetta dal costo commerciale di circa 1000 \$. Questa cassetta viene chiusa ermeticamente e lasciata a 110 °C per 60 minuti. A fine trattamento, al fine di evitare la condensazione dei vapori sulla parte alta dei pozzetti, dovuta ad un raffreddamento lento della cassetta e al fine ulteriore di bloccare la reazione, questa viene portata a temperatura ambiente mettendola sotto l'acqua corrente. A tal punto, 50 µl della miscela vengono trasferiti in una nuova micropiastre e a questi si aggiungono 100 µl di acido arsenioso e 50 µl di solfato di cerio e il tutto viene lasciato a 25 °C per 30 minuti. Si misura quindi l'assorbanza a 405 nm attraverso un lettore di micropiastre. Pur risultando senza dubbio una metodica più rapida e meno pericolosa per l'operatore, occorre considerare un preventivo di spesa inevitabilmente più elevato come l'acquisto di micropiastre, della speciale cassetta per la digestione dei campioni e del lettore per micropiastre; inoltre è da considerare come sussista una forte correlazione tra la metodica sopra riportata e il metodo tradizionale che prevede l'utilizzo dell'acido clorico nella reazione di digestione pre-dosaggio⁶.

In alternativa alle metodiche di pre-trattamento sopra descritte è stata proposta la reazione di ossidazione in presenza di persolfato di potassio ed irradiazione ai raggi UV.

Sono state inoltre proposte apparecchiature automatizzate per il dosaggio dello iodio che prevedono l'utilizzo della tecnica dell'HPLC e dell'ICP/MS. Nonostante l'affidabilità mostrata da queste attrezzature, è improbabile che piccoli laboratori con un numero limitato di campioni di urina da analizzare, possano so-

stenere l'onere economico^{7,8}.

Nonostante tutto, la reazione di Sandell-Kolthoff risulta essere una metodica altamente sensibile e fortemente riproducibile. La più bassa concentrazione di iodio riscontrabile in un campione e che rappresenta la sensibilità limite della metodica risulta essere pari a circa 10 µg/L. La riproducibilità e la precisione della metodica sono valutabili attraverso il calcolo dei coefficienti di variazione (CV) intra e inter-dosaggio; entrambi risultano essere inferiori al 10% e valutano rispettivamente lo scarto riscontrato dosando replicati di urine di controllo a differenti concentrazioni nello stesso dosaggio (intra-dosaggio) e in dosaggi differenti (inter-dosaggio). Il recupero invece oscilla intorno al 98% e si determina aggiungendo quantità prestabilite di iodio a campioni di urine di concentrazione nota e andando a calcolare la quantità di iodio recuperata nel campione, determinando così quella che è l'affidabilità della metodica. E' senz'altro utile inserire nel dosaggio un campione a bassa concentrazione di iodio ed uno ad alta concentrazione che rappresentano dei controlli interni che attestano l'affidabilità e la riproducibilità della metodica in differenti dosaggi.

Nonostante molti studi riguardanti la determinazione urinaria dello iodio adottino un campionamento mattutino, è stato evidenziato un ritmo circadiano di escrezione urinaria dello iodio, con picchi riscontrati nelle fasi tardive della giornata^{9,10}; è dunque utile considerare tale discordanza in merito alla scelta del metodo di collezione dei campioni da dosare. Il dosaggio dello iodio a partire dalle urine delle 24 ore risulta essere quindi più accurato di quello ottenuto da uno spot mattutino. Per evitare che spot di campioni di urina risultino più o meno diluiti in relazione alla quantità di liquidi assunti dall'individuo, si può normalizzare il valore di UI rispetto alla concentrazione di creatinina presente nelle urine delle 24 ore. Questo perché le fluttuazioni del valore di UI in un individuo possono essere sia il risultato di una differente assunzione alimentare dello iodio, sia la conseguenza di un più alto o più basso consumo di acqua da parte dell'individuo¹⁰.

Conclusioni

In conclusione, la prevenzione è la misura più idonea per l'eradicazione delle IDD. Il dosaggio della ioduria, oltre alla valutazione del TSH, è pertanto indicato in tutta la popolazione, ma soprattutto nei soggetti che presentano un aumentato rischio di sviluppare una delle manifestazioni da carenza iodica, come i soggetti in età scolare e adolescenziale, e le donne in età fertile e durante la gravidanza e l'allattamento. In queste categorie di soggetti, infatti, il dosaggio degli ormoni tiroidei può non essere sufficiente per la valutazione della funzione tiroidea.

Purtroppo, il dosaggio della ioduria non è però sempre praticato nei laboratori clinici. Una maggiore diffusione territoriale del dosaggio della ioduria potreb-

be favorire una maggiore consapevolezza dell'entità del problema, e renderebbe più accurata la valutazione dell'apporto iodico nei soggetti a rischio.

Bibliografia

1. Glinoe D. The regulation of thyroid function during normal pregnancy: importance of the iodine nutrition status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18:133-52.
2. The Public Health Committee of the American Thyroid Association. Iodine supplementation for Pregnancy and Lactation - United States and Canada: Recommendations of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2006; 16:949-51.
3. Marchioni E, Fumarola A, Calvanese A, Piccirilli F, Tommasi V, Cugini P, et al. Iodine deficiency in pregnant women residing in an area with adequate iodine intake. *Nutrition* 2008; 24:458-61.
4. Sandell EB, Kolthoff IM. Micro determination of iodine by a catalytic method. *Mikrochim Acta* 1936; 1:9-25.
5. Pino S, Fang SL, Braverman LE. Ammonium persulfate: a safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine. *Clin Chem* 1996; 42:239-43.
6. Ohashi T, Yamaki M, Pandav CS, Karmarkar MG, Irie M. Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clin Chem* 2000; 46:529-36.
7. Schramel P, Hasse S. Iodine determination in biological materials by ICP-MS. *Microchimica Acta* 2005; 116:205-9.
8. Rendl J, Seybold S, Borner W. Urinary iodide determinate by paired-ion reversed-phase HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* 1994; 40:908-13.
9. Als C, Keller A, Minder C, Haldimann M, Gerber H. Age- and gender-dependent urinary iodine concentrations in an area-covering population sample from the Bernese region in Switzerland. *Eur J Endocrinol* 2000; 143:629-37.
10. Soldin OP. Controversies in urinary iodine determinations. *Clin Biochem* 2002; 35:575-9.