

Tecnologia ed automazione dell'esame urine qualitativo

V. Miconi

*Laboratorio di analisi chimico-cliniche e microbiologiche
Ospedale di Arzignano (Vicenza)*

In questa relazione sarà esposto lo stato dell'arte dei supporti tecnologici oggi a disposizione per l'esame urine di tipo qualitativo, sia in rapporto ai materiali, che alla strumentazione automatica utilizzabile.

L'esame qualitativo delle urine

L'esame qualitativo delle urine affonda le sue radici nella storia. Fin dall'antichità l'esame dei fluidi corporei ha rappresentato una parte dell'arte della medicina.

L'antica medicina praticava l'analisi "de visu", mentre nel XVII secolo sono iniziati i primi tentativi di analisi chimica dell'urina^{1,2}.

La ricerca sistematica di parametri chimico-fisici e il dosaggio di analiti urinari mediante metodi chimici standardizzati è un'acquisizione relativamente recente, risalente al decennio tra il 1940 e 1950.

I test su striscia reattiva (dipstick) inizialmente immessi sul mercato, hanno costituito la base del moderno esame chimico-fisico dell'urina³. Ben presto le strisce monoreattive sono state sostituite da strisce con più aree reattive, che permettono di ricavare una cospicua serie di parametri in pochi secondi utilizzando un'esigua quantità di campione.

E' uno dei test più semplici, più economici e più eseguiti in diagnostica di laboratorio. La semplicità è tale da aver prodotto l'inclusione dell'esame urine su striscia reattiva con metodo manuale tra i test "waiwed" dalla legislazione CLIA 88. Questo significa che tale test può essere eseguito anche al di fuori del laboratorio da operatori non addestrati.

Ma la semplicità operativa, il poter essere eseguito al di fuori del laboratorio, nasconde un'insidia: quella di recepire in modo acritico i risultati del test senza conoscere i fattori che possono influenzarne sensibilità e specificità⁴.

La tecnologia della striscia reattiva nel corso degli anni è cambiata; sono aumentati i parametri forniti, la tecnologia costruttiva delle aree reattive delle strisce è molto migliorata, la standardizzazione ha fatto grandi passi.

Quindi semplicità sì, ma unita a conoscenza delle

prestazioni dei materiali e dei problemi interpretativi. Non si deve dimenticare che l'urina è un fluido biologico a composizione chimica estremamente variabile che riflette lo stato metabolico del soggetto ed è influenzato da fattori dietetici, stato di idratazione e presenza di farmaci e loro metaboliti. Questo significa che le condizioni analitiche sono variabili in funzione dell'effetto matrice del campione. L'urina inoltre è un fluido biologico instabile nel quale, a temperatura ambiente, diversi costituenti vanno incontro a significativi cambiamenti nel tempo. Il pH ad esempio, può variare in modo significativo, glucosio e bilirubina possono diminuire o scomparire, leucociti ed eritrociti possono deteriorarsi e non essere più riconoscibili.

Oggi il mercato offre all'utilizzatore strisce reattive a 10 aree, di cui 9 utilizzate per fornire risultati ed una per la compensazione del colore intrinseco dell'urina.

I parametri determinati in chimica secca sono:

- pH
- leucociti
- sangue
- glucosio
- chetoni
- bilirubina
- urobilinogeno
- proteine
- nitriti

A completare il classico esame chimico-fisico mancano colore e aspetto, determinati dalla strumentazione analitica automatica e peso specifico, misurabile dalla strumentazione automatica con metodo rifrattometrico o manualmente o con strumentazione semiautomatica mediante una delle aree reattive della striscia.

Le modalità di raccolta del campione di urine per l'esame chimico-fisico sono state da tempo standardizzate⁵. I risultati sono espressi in scala qualitativa ordinale⁶.

Tabella I. Esempi di strisce reattive per misurazione del Ph.

Produttore o Distributore	Indicatore di pH	Intervallo di misura (unità pH e risoluzione)
Bayer	rosso di metile e blu di bromotimolo	5,0-8,5 (risol. 0,5)
Arkray	verde di bromocresolo e blu di bromoxilenolo	4,5-9,0 (risol. 0,5)
Roche	rosso di metile, fenoltaleina e blu di bromotimolo	5,0-9,0 (risol. 0,5)

La chimica dei metodi utilizzati dalle strisce reattive

pH

Il pH è misurato mediante il viraggio di colore di cromogeni.

Le strisce reattive più utilizzate in commercio contengono miscele di indicatori, in grado di coprire un'ampiezza di pH da 4,5 a 9 con una risoluzione dichiarata pari a 0,5 unità pH.

Leucociti

La reazione chimica per la ricerca dei leucociti utilizza l'esterasi contenuta nelle granulazioni citoplasmatiche dei granulociti. Tale enzima catalizza la scissione di un estere indossilico in indossile che, reagendo con un sale di diazonio, forma un complesso colorato.

La sensibilità della reazione dichiarata dai produttori è di circa 5-25 leucociti/fL.

Falsi negativi si possono riscontrare in urine con concentrazioni di glucosio superiori a 0,5-1 g/dL e di proteine superiori a 3-4 g/L. In tali condizioni il colore della reazione può attenuarsi fino a non essere più rilevabile. Anche la presenza nell'urina di inibitori delle proteasi, sia di derivazione endogena che iatrogena, può essere causa di falsi negativi dovuti ad inibizione dell'enzima.

La sensibilità della reazione esterasica, della ricerca dei nitriti e della presenza di batteri nel sedimento come indicatori di infezioni alle vie urinarie, sono stati messi in dubbio⁷.

La presenza nelle urine di formaldeide, aggiunta come conservante o disinfettante dei recipienti usati per la raccolta, e terapie con imipenem, meropenem e acido clavulanico possono essere causa di falsi positivi. Urine fortemente colorate per la presenza di bilirubina o nitrofurantoina possono causare un effetto additivo intensificando il colore della reazione.

Glucosio

Le strisce reattive utilizzano la reazione chimica catalizzata dalla glucosio-ossidasi, che ossida il glucosio ad acido gluconico con formazione di acqua ossigenata. La perossidasi catalizza poi l'ossidazione di un substrato cromogeno a spese dell'acqua ossigenata. Il cromogeno in forma ossidata sviluppa un

colore di intensità approssimativamente proporzionale alla concentrazione di glucosio nell'urina. I limiti di sensibilità della reazione sono variabili da 10 a 70 mg/dL.

Il test è specifico per il glucosio e non influenzato dalla presenza di sostanze riducenti e da altri carboidrati come saccarosio, lattosio e fruttosio.

Il test può risultare falsamente negativo se sono presenti nell'urina sostanze riducenti come l'acido ascorbico che compete con il cromogeno. Ad una concentrazione di 15-20 mg/dL, l'acido ascorbico provoca la riduzione di intensità della reazione o la negativizzazione se la concentrazione di glucosio è molto bassa. I produttori di strisce reattive hanno cercato di minimizzare tale interferenza. Uno dei metodi utilizzati consiste nel rendere l'area reattiva lievemente ossidante. In tal modo si provoca la neutralizzazione dell'effetto dell'acido ascorbico fino a concentrazioni di 100 mg/dL.

Falsi positivi si possono verificare in presenza di ossidanti come ipoclorito e cloro o in urine con pH inferiore a 4.

Corpi chetonici

I corpi chetonici sono costituiti da acetone, acido acetoacetico e acido β -idrossibutirrico. Sono molecole tra loro convertibili poiché dall'acido acetoacetico si forma acetone per decarbossilazione spontanea e acido β -idrossibutirrico per ossidoriduzione reversibile.

Normalmente nelle urine si trovano piccole quantità di chetoni prodotti dal metabolismo incompleto dei grassi e non rivelabili con le comuni reazioni di laboratorio. Compaiono in quantità variabile in condizioni di squilibrio metabolico, tipico della malattia diabetica, ma anche negli stati febbrili dei bambini e, in assenza di patologia specifica, dopo prolungato digiuno o eccesso di attività fisica.

Il metodo di ricerca che le strisce reattive utilizzano si basa ancor oggi sulla reazione descritta nel 1833 da Legal. In ambiente alcalino e in presenza di nitroprussiato di sodio, si forma un complesso di colore violetto.

La sensibilità della reazione è pari a 5-10 mg/dL di acido acetoacetico ed è maggiore per quest'ultimo rispetto all'acetone, mentre è quasi nulla per l'acido beta idrossibutirrico.

Non sono descritti falsi negativi, mentre falsi positivi sono descritti per L-DOPA, fenilchetone, cefalosporina e ftaleine.

Nitriti

Molte specie di batteri gram negativi convertono i nitrati, assunti con la dieta ed eliminati dal rene, in nitriti.

Il metodo di ricerca dei nitriti si basa sulla reazione di Griess. I nitriti reagiscono in ambiente acido con la sulfanilammide per formare un diazocomposto, il

quale, con una reazione di accoppiamento con naftiletildiammina, forma un azocolorante.

La reazione è specifica per i nitriti, mentre falsi negativi si possono verificare in urine con significativa carica batterica ma povere di nitrati e quindi prive di substrato di reazione.

Sangue

La rivelazione del sangue è basata sulla misurazione dell'attività pseudoperossidasi dell'emoglobina. In presenza di un cromogeno, di emoglobina e di un idroperossido, il cromogeno si ossida e assume una colorazione proporzionale alla quantità di emoglobina presente.

La sensibilità del metodo è elevata: circa 30 mg/dL di emoglobina, pari a quella contenuta in 5-10 eritrociti. La mancata lisi degli eritrociti produce falsi negativi.

Falsi negativi possono essere causati da urine con elevato peso specifico o con alta concentrazione di proteine o di acido ascorbico. Anche in questo caso i produttori adottano le stesse contromisure utilizzate per la ricerca del glucosio (ambiente dell'area reattiva lievemente ossidante) per limitare l'effetto dell'acido ascorbico.

Falsi positivi sono prodotti da sostanze ossidanti come ipoclorito o cloro.

Bilirubina

La reazione chimica utilizzata produce un sale di diazonio mediante un azo-accoppiamento in ambiente acido a partire da una nitroanilina. Il complesso colorato finale è formato dal sale di diazonio e da azobilirubina.

La sensibilità del metodo è di 0,2-0,4 mg/dL.

Falsi negativi sono causati da acido ascorbico, acido urico e nitriti, mentre falsi positivi sono causati da urobilinogeno. Va inoltre ricordato che la bilirubina è instabile alla luce.

Urobilinogeno

La bilirubina eliminata con la bile nell'ambiente intestinale è ridotta ad opera della flora batterica intestinale a stercobilinogeno ed urobilinogeno. Questi composti intermedi sono poi ossidati a stercobilina e urobilina. Attraverso il circolo enteroepatico viene riportata al fegato una quota dei composti ridotti: parte di questi viene nuovamente escreta e parte costituisce la quota urinaria.

Viene utilizzata la reazione di Ehrlich, un azo-accoppiamento in ambiente acido a partire dall'urobilinogeno e da un sale di diazonio che forma un azo-composto colorato

Piccole quantità di urobilinogeno sono rinvenibili nell'urina di pazienti sani e in seguito a forte esercizio fisico o stress.

La sensibilità del metodo è di circa 0,2 mg/dL

Mentre non sono descritti falsi negativi, falsi positivi si possono verificare in urine di pazienti in terapia con carbapenem.

Proteine

La presenza di proteine nell'urina è certamente uno dei sintomi principali di patologia renale e uno dei parametri che più attirano l'attenzione assieme al glucosio⁸.

Il metodo su cui ancora oggi si basano tutti i tipi di striscia reattiva è quello dell'errore proteico degli indicatori di pH. Il principio chimico è stato descritto da Sørensen nel 1909 e adattato alla quantificazione delle proteine urinarie da Feigl⁹.

Il primo prodotto commerciale è stato commercializzato da Ames, marchio storico della chimica clinica, nel lontano 1957.

Il principio chimico si basa sull'impiego di aree reattive imbevute di indicatori di pH come il blu di tetrabromofenolo che, mantenuti in forma cationica in ambiente acido per effetto di un tampone a pH 3, assumono un colore giallo. I gruppi aminici, liberati dalle proteine presenti nell'urina, fanno assumere all'indicatore la sua forma anionica caratterizzata dal viraggio dal colore giallo al verde ed infine al blu.

Nell'urina normale, priva di un apprezzabile contenuto proteico, il tampone mantiene l'indicatore al suo stato acido (giallo). In urine con contenuti proteici apprezzabili, l'indicatore vira dal giallo al verde ed infine al blu. L'entità del viraggio è proporzionale alla concentrazione di proteine.

La soglia di sensibilità delle strisce si aggira a 200 mg/L per l'albumina, a 600 mg/L per la transferrina, a 1200 mg/L per la microglobulina e a concentrazioni molto più alte per la proteina di Bence-Jones.

E' evidente che tali dispositivi sono limitati al solo screening dell'albuminuria franca, in altri termini della proteinuria glomerulare a partire dai 200 mg/L, mentre non sono utilizzabili per lo screening della albuminuria a bassa concentrazione (la cosiddetta microalbuminuria), della proteinuria tubulare e della proteinuria di Bence-Jones¹⁰.

Possibili falsi positivi si possono riscontrare in presenza di mucoproteine che possono essere escrete fino ad un livello di concentrazione di circa 500 mg/L. Deboli falsi positivi si possono talvolta riscontrare in campioni molto concentrati e pigmentati. La causa può essere attribuita a cromogeni chimicamente non caratterizzati presenti nell'urina ed ossidati a pigmenti nell'ambiente acido della striscia reattiva. L'osservazione visiva del campione fa riconoscere facilmente tale evenienza.

Altra fonte di falsi positivi può essere la presenza nelle urine di polivinilpirrolidone, somministrato come plasma expander, di disinfettanti a base di ammonio quaternario usati per la disinfezione dei recipienti e di emoglobinuria massiva.

Questi sono i parametri ottenibili mediante la striscia chimica.

Altri parametri propri dell'esame urine qualitativo sono colore, aspetto e densità relativa.

Colore

Il colore dell'urina può essere valutato visivamente

o fornito come parametro aggiuntivo dalla strumentazione analitica automatica. La determinazione automatica del colore si avvale di un tassello aggiuntivo presente sulle strisce costituito da una superficie assorbente inerte. La luce riflessa da tale area è monitorata a tutte le lunghezze d'onda prodotte dalla strumentazione e processata in modo da ottenere un'interpretazione del colore rapportata alla riflettanza alle singole lunghezze d'onda.

I valori delle letture sono utilizzati come bianco campione per la compensazione delle letture sulle singole aree reattive. Le definizioni dei colori riportate nel referto sono definibili dall'utente.

Aspetto

L'aspetto del campione o, in altri termini, la torbidità, è determinato nella cella di misura del peso specifico sfruttando sia la luce trasmessa che quella dispersa ad angolo retto. La presenza di particelle in sospensione, che conferiscono torbidità al campione, producono un aumento della luce diffusa ad angolo retto e una diminuzione della luce trasmessa.

Densità relativa

La densità di una sostanza è data dal rapporto tra massa e volume. Tanto maggiore è la massa a parità di volume, tanto maggiore è la densità.

La densità dell'urina si definisce relativa in rapporto a quella dell'acqua, pari a 1.

Le tecniche correntemente utilizzate per la misura della densità relativa sono state la rifrattometria e la striscia reattiva¹¹.

La rifrattometria è semplice accurata, precisa e facilmente automatizzabile.

L'urina passa attraverso una cella di lettura dove è misurata la dispersione di luce che è proporzionale all'indice di rifrazione del campione.

L'area reattiva per la misurazione della densità relativa è di solito incorporata nella striscia reattiva multiparametrica. Si basa sul principio della dissociazione dei gruppi acidi prodotta dagli ioni presenti nell'urina. Gli ioni H⁺ abbassano il pH e fanno virare l'indicatore presente sull'area reattiva della striscia. La misura della densità relativa è quindi una misura indiretta derivata quantificando una variazione di pH.

È stato dimostrato che le due tecniche di misurazione della densità relativa sono poco correlabili tra loro, anche senza prendere in considerazione campioni con pH urinario elevato e con glicosuria e proteinuria significative¹².

Tecnologia della strumentazione automatica

Le miglorie tecnologiche avvenute negli ultimi anni sono avvenute prevalentemente sul versante degli strumenti automatici di lettura, piuttosto che su quello della tecnologia delle strisce, già arrivata ad un grado di sviluppo elevato.

Sono disponibili sul mercato numerosi strumenti a diverso grado di automazione per la lettura delle strisce reattive.

Gli strumenti si possono dividere in tre categorie in base al grado di automazione:

- *per singole determinazioni*. In questi strumenti, di solito di piccole dimensioni, la striscia è inserita manualmente, la misura è automatica e la rimozione della striscia è manuale
- *semiautomatici*. Le strisce devono essere inserite manualmente ad intervalli. Il loro trasporto alla zona di lettura, la lettura e la rimozione sono eseguite automaticamente dallo strumento che stampa i risultati e li salva in memoria
- *completamente automatici*. L'immersione manuale e l'inserzione nello strumento non sono più necessarie. Tutto il processo, dalla dispensazione delle strisce fino alla stampa e memorizzazione dei risultati avvengono senza interventi dell'operatore.

Le caratteristiche di tali strumenti saranno brevemente passate in rassegna, con particolare attenzione per quelli a più elevato grado di automazione, che meglio illustrano lo stato dell'arte della tecnologia.

I campionatori permettono il carico di un gran numero di provette. L'uso dei caricatori lineari a 5 o 10 posti è oggi generalizzato e presenta il vantaggio di consentire il caricamento dei campioni in continuo.

Dopo la lettura dei codici a barre, un campionatore preleva una piccola quantità di urina e ne dispensa un volume accurato ed appropriato su ciascuna area reattiva e in celle per la misura della densità relativa e dell'aspetto.

La lettura delle reazioni avviene in rifrattometria. La luce, proveniente da una lampada alogena o da LED che emettono a specifiche lunghezze d'onda, viene riflessa dall'area reattiva della striscia, raccolta, passata attraverso un sistema di filtri e inviata ad un sensore.

La lettura avviene in bicromatismo per compensare il colore proprio del campione. La compensazione del colore si avvale del tassello inerte presente sulle strisce che viene letto a tutte le lunghezze d'onda.

Ogni tipo di strumento utilizza un diverso numero di lunghezze d'onda.

I reagenti a bordo sono protetti dal deterioramento prodotto dall'umidità ambiente e dalla luce. Diverse sono le modalità adottate.

I software di gestione utilizzano specifici algoritmi per compensare l'effetto della temperatura sull'intensità di reazione o per correggere la reazione esterasica per valori elevati di peso specifico.

Il miglioramento delle prestazioni dei computer gestionali, di cui gli strumenti sono dotati, ha permesso di aggiungere una serie di funzioni di supporto all'utilizzatore quali:

- elevato numero di campioni memorizzabili
- gestione del controllo di qualità
- atlanti on-line del sedimento urinario

Tabella II. Caratteristiche principali di tre autoanalizzatori per esame urine standard

	Bayer ClinitekAtlas	Arkray Aution Max	Roche Urisys 2400
Campioni/ora	225	225	240
Fonte di luce	Lampada alogena	Lampada alogena	LED
Lunghezze d'onda	10	5	3+2
Numero di strisce a bordo	Rotoli da 490	Caricamento in continuo	Cassetta da 400
Protezione reagenti	Chiusura ermetica	Chiusura ermetica	Chiusura ermetica

Il futuro

L'evoluzione futura della tecnologia dell'esame qualitativo delle urine è difficile da ipotizzare.

Lo specifico settore di mercato è giunto ad un elevato livello evolutivo, con un apprezzabile livellamento in alto delle prestazioni dei materiali e degli strumenti. Al momento attuale sono poche le prospettive prevedibili di apprezzabili novità tecnologiche.

Ulteriori margini di evoluzione sono prevedibili sul versante dell'automazione, con il miglioramento delle prestazioni degli strumenti, piuttosto che su quello della striscia. Questo settore diagnostico è considerato come mercato marginale dalla gran parte delle Ditte, che riservano investimenti in settori più promettenti ad alta evoluzione.

La striscia tradizionale potrà ancora essere migliorata per dotarla di un maggiore potere diagnostico e prognostico, anche se non sono prevedibili al momento più di 10 aree reattive¹³ con attenzione ai limiti legati al prezzo.

Deve essere ulteriormente migliorata la standardizzazione di strisce in chimica secca e le urine sintetiche di calibrazione e controllo¹⁴.

Bibliografia

- Free A H, Free H M. Urinalysis, critical discipline of clinical science. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1972; 3:481-531.
- Vosswinkel P. *Der schwarze urin*. Berlin: Blackwell Wissenschaft; 1993.
- Kutter D. Routine urinalysis yesterday, today, tomorrow. *Sysmex J Int* 1996; 1:1-3.
- Halloran , Bennitt W. Urine reagent strips: an MDA evaluation. *Prof Nurse* 1999; 14:791-6.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Routine Urinalysis and Collection, Transportation and Preservation of Urine Specimens: Approved Guideline. NCCLS document GP-16A. Willanova, PA: NCCLS,1995; Vol. 15, n.15.
- Kouri T, Laippala P, Kutter D, Gant V, Hallander H, Guder W G. Quality specification for ordinal scale measurements with multiproperty (multiple) urine test strips. *Scand J Clin lab Invest* 1999; 59:523-6.
- Van Nostrand J D, Junkins A D, Bartholdi R K. Poor predictive ability of urinalysis and microscopic examination to detect urinary tract infection. *Am J Clin Pathol*. 2000; 113:709-13.
- Kutter D. Dry chemistry urinalysis of pathological proteinuria. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:929-33
- Feigl F. *Spot tests in organic analysis*. Amsterdam: Elsevier; 1948.
- Ahmed Z, Lee J. Asymptomatic urinary abnormalities. *Med Clin North Am* 1981; 3:641-52.
- Pradella M, Dorizzi RM, Rigolin F. Relative density of urine: methods and clinical significance. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1988; 26:195-242.
- Dorizzi R M, Caputo M. Measurements of urine relative density using refractometer and reagent strips. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:925-8.
- Kutter D. The urine test strip of the future. *Clin Chim Acta* 2000; 297:297-304.
- Takubo T, Tatsumi N. Quality control in urinalysis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30 (Suppl. 3):136-48.