

Tecnologia ed automazione dell'esame urine quantitativo

C. Ottomano

Laboratorio Analisi A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo

Gli analiti generalmente ricercati mediante l'esame urine completo (EUC) sono quelli riportati nella tabella 1, mentre, la maggior parte dei segnali clinici che dal loro movimento si ricava, sono sintetizzati nelle tabelle 2-5.

Nella seconda edizione del documento GP16-A2 "Urinalysis and collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guidelines" NCCLS non accenna neanche alla possibilità che questo esame possa essere effettuato con reagenti liquidi su un qualunque analizzatore di Chimica Clinica.

Chiunque tentasse di affrontare questo problema attraverso una accurata rassegna bibliografica rimarrebbe molto deluso per la pressoché assenza di dati, proteinuria a parte.

Quelli riportati nella sezione dei metodi analitici sono stati, in parte, concessi da una azienda del settore con la quale è in corso una collaborazione scientifica.

Ma chi potrebbe stupirsi di questa latitanza della letteratura se i laboratori che non effettuano più l'EUC, a favore di altri modelli diagnostici, sono ben pochi sia in Italia che nel resto del mondo?

Le motivazioni che possono indurre a modificare il radicato atteggiamento mentale di effettuare l'EUC in chimica secca sono diverse.

Senza pretese tassonomiche tali motivazioni si possono così riportare:

- La disponibilità di effettuare un esame del sedimento urinario tramite citofluorimetria a flusso
- L'esigenza di unificare linee analitiche finora rigidamente separate tra loro, tramite una organizzazione del lavoro completamente automatica
- La propensione delle Direzioni Generali delle Aziende Ospedaliere a non sostituire più il personale che a vario titolo smette di lavorare
- Il flusso continuo, anche nell'arco delle 24 h, dell'arrivo del materiale da analizzare, che supera la vecchia organizzazione del nostro lavoro: apertura > accettazione del materiale in una fascia concentrata e ristretta del mattino > fase analitica > refertazione > chiusura
- L'inaccuratezza del dosaggio delle proteine totali, in realtà solo l'albumina, che comporta la sottostima delle proteine tubulari e delle componenti monoclonali, ma soprattutto la mancata dia-

gnosi della proteinuria di Bence Jones. Non va peraltro sottovalutata l'evenienza dei falsi positivi, in caso di pH molto alcalino della matrice, proprio perché, in chimica secca, si adoperava il metodo "all'errore dell'indicatore proteico"

- L'impossibilità di aggirare alcuni effetti della matrice urinaria, soprattutto quando il dosaggio avviene sfruttando una reazione di ossido-riduzione: eloquente è il caso dell'emoglobina
- La concreta improbabilità di effettuare la ricerca mirata di un analita, incrementando l'accuratezza degli attuali metodi in chimica secca
- L'espressione spesso discontinua dei risultati della chimica secca, con significativa ripercussione sulla loro riproducibilità sia intra che, soprattutto, tra Laboratori. Problema peraltro risolvibile senza dover ricorrere necessariamente alla chimica liquida.
- L'impossibilità di testare un singolo analita quando non occorra saggiare tutti quelli presenti su un dipstick
- L'esecuzione in fase liquida di determinazioni, non altrimenti eseguibili in fase secca (urea,

Tabella I: Esame delle Urine

Test	Intervallo di riferimento
Peso specifico	1.003-1.029
PH	4.5-7.8
Proteine	Assenti
Glucosio	Assente
Chetoni	Assenti
Bilirubina	Assente
Sangue occulto	Assente
Esterasi leucocitaria	Assente
Nitriti	Assente
Urobilinogeno	0.1-1.0 EU/dl
Leucociti	0-5/hpf
Eritrociti	Maschi 0-3/hpf Femmine 0-5/hpf
Cilindri	0-4/lpf ialini
Batteri	Assenti

hpf = high power field
lpf = low power field
EU = Ehrlich units

Tabella II: pH delle urine

Condizioni associate ad urine acide	Condizioni associate ad urine alcaline
Acidosi Metabolica	Alcalosi respiratoria
Diabete Mellito	Alcalosi metabolica
Diarrea	Batteriuria (<i>Proteus spp</i>)
Inedia	Dieta vegetariana
Acidosi respiratoria	Vomito
Enfisema	Terapia diuretica
Sonno	Sindrome di Fanconi
Insufficienza renale con perdita di tampone NH ₃	Milk Alkali sindrom (incrementata perdita di bicarbonati) Terapia alcalinizzante (citrati, bicarbonati) Poliuria alcalina postprandiale (1 h dopo la fine pasto)

Tabella III: Peso specifico delle urine

Aumentato > 1.029	Diminuito < 1.003	Fisso 1.010
Restrizione idrica	Eccessiva assunzione idrica	Danno renale grave, peso specifico fisso a 1.010, il valore del filtrato glomerulare
Disidratazione	Iperidratazione infusioneale	
Febbre	Diuresi	
Sudorazione	Ipotermia	
Vomito	Ridotta capacità di concentrazione del rene	
Diabete mellito (glicosuria)	Pielonefrite	
Proteinuria	Glomerulonefrite	
Insufficienza cardiaca congestizia	Diabete insipido	
Mezzi di contrasto		
Insufficienza surrenalica		
Secrezione inappropriata di ormone antidiuretico		
Tumore secernente ormone antidiuretico		

creatinina, sodio, potassio, microalbuminuria, etc.), che offre la possibilità di costituire un “pannello di diagnosi renale” coerente ed integrato; una “console” che costituisce un ausilio diagnostico fondamentale per il clinico.

- Un più ampio range di misura, rispetto a quello ottenibile con i dipsticks.
- La fornitura di controlli e calibratori inseriti nei kit commerciali che consente un monitoraggio delle performance analitiche dei reagenti, ponendo i presupposti per un possibile programma di Controllo di Qualità Interlab; si può così finalmente dare una risposta alla domanda di verifica della precisione, accuratezza, standardizzazione dei dati analitici relativi alle analisi urinarie.

Questo lavoro nasce dalla esigenza di affermare che abbandonare la chimica secca per quella liquida per l'EUC oggi è possibile.

Il vantaggio organizzativo è intuitivo; quello economico esorbita dallo scopo di questa trattazione, ma una sua valutazione si impone nel prossimo futuro.

Da subito si può affermare che il “D.M.’96” non paga a sufficienza questo esame, soprattutto in quei Laboratori, come il nostro, in cui si è ritenuto improcrastinabile l’impiego della citofluorimetria a flusso per il suo completamento.

La trattazione si snoderà in quattro distinte parti:

1. Considerazioni economiche e metodologiche attuali
2. Considerazioni generali sul significato dell'EUC
3. L'esame delle urine in chimica liquida
4. Conclusioni

1. Considerazioni economiche e metodologiche attuali

Sharp, Warshaw e McLaughlin hanno proposto quattro strumenti per analizzare il rapporto costo/efficacia di un test:

- insuccesso interno

- valutazione
- prevenzione degli errori e degli sbagli
- insuccesso esterno

I costi di insuccesso interno sono quelli che inducono la ripetizione del test a causa di:

- malfunzionamento degli strumenti
- errori degli operatori
- imprecisione analitica

Per assicurare la qualità di un esame delle urine occorre precisione e accuratezza. I conseguenti costi includono:

- prezzo del materiale di controllo
- iscrizione ad una Valutazione Esterna di Qualità
- costo dei test di conferma (microscopica)
- costi di valutazione degli insuccessi interni

I costi per la prevenzione degli errori nell'analisi delle urine includono:

- costi di sviluppo
- stesura di protocolli
- addestramento del personale
- formazione permanente

Gli ultimi due punti riguardano soprattutto la lettura del sedimento.

I costi di insuccesso esterno si verificano quando si rilascino risultati errati. In generale possono derivare falsi negativi con mancato approfondimento di situazioni di varia gravità ovvero ricorso non necessario ai nefrologi.

Almeno gli sbagli di trascrizione dei numerosi dati in gioco sono ormai superati dal diffuso impiego degli on-line tra strumenti di misura ed il LIS.

Linee guida per i medici curanti

Recentemente negli Stati Uniti in molti Ospedali è stato incoraggiato l'uso di richiedere l'esame urine durante il giorno quando vi è la maggiore disponibilità di personale esperto. Questa situazione peraltro coincide con la maggiore significatività clinica del campione (mitto del mattino).

In alcune realtà è concesso un solo esame delle urine al giorno per pazienti ricoverati. Il Laboratorio può derogare da questa regola.

Questa politica ottimizza l'impiego di personale dei turni serali e notturni, consentendo loro di concentrarsi su casi veramente urgenti.

Alcuni limiti dei metodi in chimica secca

Proteine. L'obiettivo di confermare un test positivo (o negativo) di proteinuria è quello di rilevare un errore. In chimica secca la principale causa di falsi positivi è rappresentato dal pH alcalino delle urine: in questi casi si impone la ripetizione della misura con un metodo differente.

Va ricordato però che un pH intensamente alcalino

inibisce anche un metodo di conferma quale l'acido solfo salicilico: in questi casi è opportuno acidificare le urine, o meglio ricorrere ai metodi con coloranti e detergenti più sotto descritti.

Si verificano purtroppo, anche falsi negativi! Il reagente degli stick è più sensibile all'albumina che a qualsiasi altra proteina. Ne deriva che significative quantità di proteine urinarie, quali componenti monoclonali (segnatamente la proteina di Bence Jones) possono essere presenti nelle urine ma non rilevate! Essendo queste in numero esiguo, la King non ritiene opportuno ripetere tutte le proteinurie negative con un metodo sensibile a quella di Bence Jones, così che l'unico vero marcatore tumorale in nostro possesso viene ignorato!

Bilirubina. I metodi di dosaggio della bilirubinuria si fondano sull'impiego di una sale di diazonio in ambiente acido per formare un complesso azocolorante-azobilirubina. I falsi positivi sono rari, per lo più dovuti a farmaci che colorano di rosso le urine in ambiente acido. La conferma con altri test non ha molto senso. La sensibilità del test è compresa tra 0.05 e 0.4 mg/dl di bilirubina.

Peso specifico. La reazione sugli stick generalmente si basa su un polielettrolita che reagisce con gli ioni presenti nelle urine. Urine alcaline fortemente tamponate possono essere causa di peso specifico falsamente diminuito. Invece non vi è interferenza da parte di mezzi di contrasto radiologici e glucosio in elevata concentrazione.

Il rifrattometro misura l'indice rifrattivo dei liquidi, che è correlato alla quantità di solidi dissolti ed al peso specifico.

Produce risultati falsamente elevati (in confronto all'osmometria) in presenza di glicosuria rilevante o di mezzi di contrasto radiologici.

2. Considerazioni generali sul significato dell'esame urine

L'esame delle urine è il test di laboratorio più vecchio che si conosca. Già nel 400 a.C. si soleva buttare a terra le urine per osservare se esse attraessero o meno gli insetti.

Nel medioevo la loro osservazione aiutava gli indovini a predire il futuro.

Fu solo nel 1673 che Dekkers osservò che se un'urina conteneva proteine, formava un precipitato quando era messa a bollire con acido acetico.

Ma abbiamo dovuto aspettare l'inizio di questo secolo prima che Benedict descrivesse il primo metodo capace di rilevare zuccheri nelle urine e gli inizi degli anni '40 perché l'esame delle urine assumesse ad una maggiore dignità scientifica con la produzione delle prime tavolette per il loro esame (Walter Ames Compton, MD).

Negli ultimi 50 anni il numero di prodotti commer-

ciali in chimica secca ha continuato a crescere e recentemente sono in fase di commercializzazione reagenti liquidi applicabili su analizzatori di Chimica Clinica.

Interpretazione dei risultati di un'analisi delle urine

Milioni di esami delle urine sono eseguiti giornalmente in tutto il mondo. Tuttavia, non sempre con piena consapevolezza delle difficoltà più comuni associate all'interpretazione dei risultati.

Alcuni laboratoristi e clinici si interrogano sull'utilità di ricercare in modo sistematico l'urobilinogeno e la bilirubina poiché raramente sono presenti. Comunque, la presenza di uno o entrambi questi analiti, può essere la spia di una patologia del fegato o del catabolismo dell'emoglobina. In molti casi, elevati livelli di urobilinogeno e/o bilirubina nelle urine, possono precedere qualsiasi altro sintomo di patologie epatiche e molti clinici traggono dalla loro concentrazioni spunti di diagnosi differenziale.

Similmente, i nitriti e gli enzimi leucocitari sono impiegati per sospettare una infezione delle vie urinarie. Una obiezione importante è che vi sono situazioni diverse in cui la presenza di una infezione delle vie urinarie non si accompagna alla positività del test per la ricerca dei nitriti.

Le cause principali di questo comportamento possono essere riassunte come:

- molti batteri Gram negativi sono in grado di convertire i nitrati della dieta, eliminati attraverso l'emuntorio renale, in nitriti; ma se i nitrati della dieta sono scarsamente presenti, anche i nitriti saranno poco o per nulla presenti
- un contatto troppo breve, tra batteri ed urine, può non consentire alle reductasi batteriche di convertire i nitrati in nitriti, anche in presenza di una alta carica batterica in vescica. Il test per i leucociti rileva la presenza di un'esterasi conosciuta come esterasi leucocitaria, elastasi dei neutrofili o elastasi granulocitaria. L'esterasi leucocitaria è la principale proteinasi endogena capace di degradare le proteine della matrice del connettivo, motivo per cui molti inibitori di questi enzimi sono presenti in circolo per modularne l'attività. Uno di questi inibitori è l'alfa-1-antitripsina, anche conosciuta come alfa-1-inibitore delle proteinasi. La reazione di legame tra alfa-1-antitripsina ed esterasi leucocitaria è una delle più veloci interazioni proteina-proteina presenti in natura. Poiché nelle urine sono presenti una grande quantità di inibitori delle proteasi, il loro repentino legame all'esterasi leucocitaria può determinarne l'inattivazione, con un conseguente falso negativo nella sua ricerca. Va ricordato inoltre che alcuni farmaci, di recente entrati nella farmacopea, svolgono un'azione inibitrice delle proteinasi, anch'esse escrete attraverso l'emuntorio renale e quindi capaci di

inibire gli enzimi leucocitari con esito falsamente negativo della loro ricerca.

Il valore dell'esame delle urine

Vale la pena continuare ad eseguire l'esame delle urine di screening?

Un certo numero di lavori della letteratura negli ultimi 10-15 anni documentano la prevalenza (10-30%) di situazioni non fisiologiche riscontrate attraverso l'analisi di screening delle urine in popolazioni diverse.

Ci sono studi che dimostrano che l'esame chimico macroscopico è vantaggioso sotto il profilo sia diagnostico che economico.

Per esempio uno studio riporta un valore predittivo negativo del 98% utilizzando la combinazione nitriti ed enzimi leucocitari nel rilevare le infezioni delle vie urinarie nei pazienti di un dipartimento di malattie renali e dei trapianti.

In un campione di 400 urine, i ricercatori poterono escludere il 75% dei soggetti studiati da ulteriori indagini grazie all'esame completo delle urine.

Considerando il costo relativamente basso e la semplicità della parte macroscopica dell'analisi delle urine, il continuare ad eseguire screening delle urine appare giustificato. Non tutti i risultati fuori dagli intervalli di riferimento necessitano di un intervento clinico, ma anche in questo caso sembra possano essere utili nel monitoraggio a lungo termine di un paziente.

3. L'esame urine in chimica liquida

Prenderemo in considerazione i seguenti analiti:

- Esterasi leucocitaria
- Nitriti
- pH urinario
- Corpi chetonici
- Proteine totali
- Peso specifico
- Emoglobina

Esterasi Leucocitaria

L'esterasi leucocitaria è un enzima stabile per parecchie ore a temperatura ambiente e per molti mesi quando il campione sia conservato a < 20°C.

Principio di un metodo proposto da una Azienda a marchio registrato

L'enzima catalizza la reazione che trasforma il substrato (estere indolico dell'N-toluene sulfonyl alanina) in due prodotti indolo e N-toluene sulfonyl alanina. (1)

Il substrato è fotosensibile soprattutto a temperatura

elevata. Per questo la reazione deve avvenire a temperatura ambiente. Il tampone fosfato impiegato nella reazione funge da bianco; l'attività esterasica è espressa in unità di milliassorbanza (1 unità si definisce come il cambiamento in milliassorbanze a 385 nm / min a condizioni standardizzate di temperatura e pH). L'incubazione deve avvenire a pH 6.8 appunto in tampone fosfato, anche se è noto che l'attività esterasica possa avvenire ad una vasta gamma di pH del mezzo ambiente.

Il complesso colorato blu presenta il picco massimo di assorbanza a 385 nm ed un secondo picco meno elevato a 610 nm. Quando la reazione si monitorizza a 610 nm si osserva una caduta di assorbanza transitoria dopo un periodo di incubazione di 4 minuti.

Questo è un evento comune quando col procedere della reazione uno dei prodotti precipita. Se si separa il precipitato dalla miscela di reazione e si trasferisce il sovrantante in una nuova cuvetta, la reazione progredisce in modo lineare rispetto al suo inizio fino a quando non si forma altro precipitato.

Comunque, questo fenomeno non interferisce con le misure di assorbanza a 385 nm, indicando che lo spettro di assorbanza del precipitato è diverso da quello dell'indoxyl. E' pertanto possibile monitorare l'attività esterasica a 385 nm di lunghezza d'onda e non oltre.

Sviluppo della reazione dell'esterasi

A 385 nm la reazione ha un andamento regolare con un incremento costante di assorbanza a differenza delle lunghezze d'onda superiori. A 385 nm si realizza quindi la situazione ideale per il monitoraggio della reazione e la concentrazione iniziale del substrato (2.5 mmoli/100-500 ul di urine) appare sufficiente.

Fabbisogno di ossigeno

Il fabbisogno di ossigeno per la formazione del cromoformo blu nella reazione catalizzata dall'esterasi, è stato indagato sostituendo l'ossigeno con elio. La miscela in incubazione è stata deareata facendo gorgogliare elio continuamente per 10 minuti prima di consentire l'inizio della reazione che portava alla misura dell'esterasi leucocitaria in una cuvetta sigillata.

Non si è osservata differenza di formazione di cromoformo blu in presenza o assenza di ossigeno disciolto nel mezzo.

Caratteristiche della reazione catalitica dell'esterasi

Le proprietà cinetiche della reazione catalitica dell'esterasi è stata studiata da Murthy e Karmen usando esterasi di fegato di maiale. La reazione è stabile per almeno 10 minuti e proporzionale alla quantità di enzima presente nella miscela di reazione

fino ad una unità di enzima puro. Il valore della K_m per il substrato, per l'enzima di fegato di maiale, è stata 0.9 mM al 15% (v/v) ed 1.5 mM in una soluzione al 20% di acetonitrile, usando 0.1 Unità di enzima. Questi risultati concordano pienamente con quelli di studi che hanno impiegato preparati altamente purificati di esterasi leucocitaria.

La reazione lineare si è osservata quando il volume di urine nella miscela in incubazione è variato da 0.1 a 0.5 ml. Eventuali interferenze da cromogeni del campione sono state eliminate col bianco campione in tampone. Anche i campioni di urine con evidenti flocculati in sospensione sono state processate tal quali. Un eventuale aumento della lag phase di reazione, osservata in saggi in cui si sono impiegati maggiori volumi di campione, è probabilmente dovuto alla decantazione del sedimento presente nella miscela posta ad incubare. Dopo la decantazione la reazione è proseguita a velocità costante.

La reazione dell'esterasi dei leucociti urinari procede più velocemente in tampone fosfato rispetto al triclorico. Il substrato dissolto in tampone Tris appare molto instabile e la soluzione vira al blu verde con valori molto elevati del bianco campione.

La misura spettrofotometrica dell'enzima in tampone fosfato riflette più accuratamente il numero di leucociti presenti nelle urine, confrontati con quelli contati in camera, rispetto al tampone Tris e in accordo al risultato ottenuto con reattivo anidro.

Effetto delle sostanze interferenti

Murthy e Karmen, che non hanno purtroppo effettuato una ricerca sistematica di effetti matrice del loro metodo per il dosaggio dell'esterasi leucocitaria, hanno tuttavia trovato un solo caso di falso negativo di un campione appartenente ad un soggetto in terapia antibiotica; concludendo per una interferenza farmacologica che interferiva sul dosaggio dell'attività esterasica in un'urina invece ricca di leucociti.

Navia e coll. ha potuto dimostrare che alcuni derivati dell'acido clavulanico, antagonisti delle beta lattamasi prodotte da sempre più numerosi ceppi batterici anche Gram negativi, posseggono una potente attività inibitoria sull'esterasi leucocitaria. Questo evento è particolarmente sfavorevole se si considera che proprio nel corso di infezioni delle vie urinarie, l'impiego di terapia antibiotica con acido clavulanico può comportare falsi negativi nella ricerca dell'esterasi leucocitaria.

Murthy e Karmen potevano anche dimostrare che un caso di falso positivo su striscia reattiva, mostrava invece solo una lag phase più lunga in fase liquida, ma un esito negativo con una cinetica di reazione piatta, in accordo col risultato microscopico caratterizzato da assenza di leucociti. La causa di questa diversità di comportamento tra i due tipi di dosaggi fu ascritta al particolare colore delle urine che aveva interferito nella lettura del tassello per l'esterasi della striscia reattiva.

Il metodo di questi Autori ha dimostrato una sensibilità del 96% ed una specificità del 99%, così dimostrandosi un buon metodo di screening nei soggetti con sospetta infezione delle vie urinarie.

Altri metodi di analisi prevedono l'utilizzo di diversi substrati cromogenici, che per azione delle esterasi dei granulociti liberano la parte cromofora, (in genere para nitro aniline), che è legata con legame di tipo estereo alla parte peptidica; l'assorbanza, misurata in rate, è direttamente proporzionale al cromogeno liberato, quindi all'attività esterasica.

I substrati utilizzati sono diversi, e differiscono tra loro per affinità e specificità verso l'esterasi leucocitaria; tra questi, sono oggetto di studio i seguenti oligopeptidi:

- . Butyloxycarbonyl -alanine- p-nitrophenylester
- . Succinyl-L-(Alanine)3-pNitroAnilide
- . Methoxysuccinyl-(alanyl)2,prolyl-valine-p NitroAnilide

Il primo è tuttavia sensibile all'azione di altri enzimi come tripsina e chimotripsina, mentre il secondo è preferibile per una maggiore specificità e sensibilità verso l'esterasi leucocitaria; il terzo dimostra in assoluto la maggiore sensibilità tra i tre substrati ($K_{cat}/K_m = 120\,000 \text{ sec}^{-1}$)

Nitriti

Applicazione di un metodo proposto da una Azienda a marchio registrato

La concentrazione di nitriti si può misurare attraverso una reazione colorimetrica in cui, a pH acido e in presenza di detergenti, essi reagiscono con una ammina aromatica (sulfanilamide) formando un composto diazotato che reagisce con la naftiletilendiammina producendo un colore rosa.

La sensibilità del test (0.025 mg/dl), nettamente maggiore di quella dei dipsticks, può consentire una diagnosi più precoce delle infezioni del tratto urinario, per le quali l'urinocoltura rappresenta l'indagine di riferimento.

Precauzioni nell'uso dei reagenti

- 1) sono pericolosi se ingeriti
- 2) la naftiletilendiammina è tossica
- 3) temono la luce solare

Precauzioni pre analitiche

- 1) la riduzione dei nitrati a nitriti avviene solo se le urine permangono sufficientemente a lungo in vescica (meglio se un'intera notte)
- 2) i campioni spot non sono affidabili se non è ac-

certabile il tempo di permanenza delle urine in vescica

- 3) le urine raccolte da alcune ore possono mostrare falsi positivi, mentre quelle fresche sono più affidabili perfino se non sono raccolte in un recipiente non sterile

Performance analitica e valori attesi

La linearità attesa del test in chimica liquida è fino a 0.5 mg/dl. Quando la concentrazione dei nitriti supera i 0.10 mg/dl è probabile la presenza nelle urine di batteri Gram negativi.

Diverse specie batteriche non riducono i nitrati a nitriti. I primi possono mancare nelle urine di soggetti compromessi sul piano nutrizionale, nelle cui urine sono presenti in bassa concentrazione.

Anche la massiccia presenza di acido ascorbico nelle urine e la presenza di cariche batteriche enormi, capaci di ulteriore riduzione dei nitriti ad urea, possono esitare in falsa assenza dei nitriti con l'errata conclusione diagnostica di assenza di flora microbica urinaria.

pH

Applicazione di un metodo proposto da una Azienda a marchio registrato

Si usano comunemente cromogeni per determinare la titolazione degli idrogenioni di una soluzione, su un'ampia gamma di valori di pH. Il fenomeno è visibile ad occhio nudo. I cromogeni Blu di Bromotimolo e Verde di Bromocresolo, coprono un range di pH da 4.0 a 8.0 con lettura a 600 nm.

Precauzioni nell'uso dei reagenti

Non vi sono particolari precauzioni nell'impiego dei reagenti tranne quelle legate al loro potenziale infettivo.

Precauzioni pre analitiche

Il campione è stabile per tre giorni a 4-8° C mentre non ci sono limiti di tempo se il campione è congelato. Prima della misura il campione deve essere scongelato completamente e portato a 20-27° C.

I campioni molto torbidi dovrebbero essere centrifugati prima della misura.

Performance analitica e valori attesi

La reazione deve avvenire a temperatura costante. L'esecuzione del bianco reagente deve avvenire con il

solo reagente in quanto l'aggiunta di un qualunque liquido comporterebbe una reazione tipica del suo pH. Il metodo considerato ha una imprecisione nella serie (CV%) compreso tra 0.9 e 1.6 e tra le serie tra 2.6 e 3.5. I campioni dovrebbe avere un pH tra 5.0 e 8.0. Un invecchiamento del campione può essere causa di un risultato inattendibile, in questo caso è opportuno richiedere un altro campione.

Una proteinuria inferiore a 500 mg/l non da interferenze sulle misure.

Corpi Chetonici

Col termine corpi chetonici si indicano tre prodotti intermedi del metabolismo lipidico: acetone, acido acetoacetico ed acido beta - idrossibutirrico.

Generalmente i corpi chetonici non sono presenti nelle urine, ma compaiono quando il metabolismo energetico passa a "bruciare" lipidi invece che zuccheri.

Il dosaggio dei corpi chetonici è importante nel monitoraggio del diabete mellito, poiché la chetonuria è la spia di una deficienza di insulina.

L'accumulo di corpi chetonici nel sangue porta a squilibrio elettrolitico, disidratazione, ed eventualmente acidosi e coma diabetico.

Il dosaggio dei corpi chetonici è utile nella valutazione dell'efficienza dell'utilizzo degli zuccheri nel metabolismo energetico, come accade nel diabete mellito, nella perdita di zuccheri come nel vomito, nella loro ridotta assunzione, o nel digiuno prolungato e nella perdita di peso.

Applicazione di un metodo proposto da una Azienda a marchio registrato

I tre corpi chetonici non sono presenti in eguale misura in natura: le proporzioni 78% a favore dell'acido beta-idrossibutirrico, 20% dell'acido acetoacetico e 2% dell'acetone sono relativamente costanti in tutti i campioni.

Il metodo di dosaggio è basato su una reazione mono step. Poiché l'acetone e l'acido idrossibutirrico derivano dall'acido acetacetico, si assume che il dosaggio di quest'ultimo possa esprimere correttamente anche la presenza e la concentrazione dei primi due.

Il sodio nitroprussiato reagisce in ambiente alcalino opportunamente tamponato con l'acido acetacetico sviluppando un colore bruno, la cui assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione dei 3 corpi chetonici eventualmente presenti nelle urine. Un opportuno stabilizzante del colore consente una lettura entro il terzo minuto di reazione.

Precauzioni nell'uso dei reagenti

Il Nitroprussiato, sensibile alla luce, è tossico, dannoso per ingestione.

Performance analitica e valori attesi

Una concentrazione superiore a 10 mg/dl di acido acetoacetico può essere considerata positiva per la presenza di corpi chetonici.

Il test è lineare fino a 250 mg/dl ed evidenzia una sensibilità di dosaggio pari a 3 mg/dl di acido acetacetico, pertanto nettamente superiore a quella raggiungibile comunemente con i dipsticks (10 mg/dl di acetoacetato).

La presenza di bilirubina (> 3 mg/dl) o emoglobina (> 250 ug/dl) può incrementare i valori dei corpi chetonici.

La Dopamina può essere causa di reazione falsamente positiva, ed i campioni raccolti dopo procedure diagnostiche che impiegano coloranti a base di Ftaleina possono presentare una colorazione rossa in ambiente alcalino. Anche la presenza di Fenilchetoni può interferire sulla reazione dell'acetoacetato col Nitroprussiato.

Lo stress può portare ad un aumento dei corpi chetonici, così pure il digiuno, la gravidanza e gli sforzi fisici intensi.

Durante la chetoacidosi, nel digiuno prolungato o in altre situazioni patologiche del metabolismo dei carboidrati, i corpi chetonici possono essere rilevati in concentrazione più elevata nelle urine rispetto al sangue.

Proteine totali

La proteinuria totale, e non la sola albuminuria, è un potente indicatore di danno renale, ma anche di numerose situazioni patologiche extra renali.

L'autorevole studio di Framingham (2) ha sancito in modo definitivo un rischio significativamente maggiore di insufficienza renale e mortalità cardiovascolare negli individui con proteinuria patologica. Le osservazioni dello studio si concludono infatti con la raccomandazione di indagare accuratamente il significato di una proteinuria persistente anche in adulto sintomatico.

Come già riportato altrove le proteinurie si possono classificare in pre renali, renali e post renali.

Ancora oggi nessun singolo metodo automatizzabile è universalmente accettato come metodo di riferimento a causa della grossolana eterogeneità di tali proteine.

Nel 1976 Bradford (3) propose un metodo colorimetrico diretto per il dosaggio della proteinuria totale che aveva come limite la stima diversa delle proteine in funzione della loro struttura terziaria e quaternaria. Problema risolto qualche anno dopo da Lott grazie all'impiego di un detergente: il sodio dodecil solfato (SDS). Tale sostanza distrugge la struttura terziaria e quaternaria delle proteine rendendole omogenee al colorante.

I metodi commerciali che sono stati proposti da molte Aziende seguono sostanzialmente le indicazioni di Lott e di altri Autori che hanno formulato varianti al suo metodo originale: quella che segue è la sintesi di questi passaggi.

Principio del metodo

Le proteine urinarie in presenza di Pirogallolo/Rosso Molibdato e SDS (4) reagiscono per formare un complesso colorato stabile, a termine, dopo 300 secondi di reazione; la reazione segue la legge di Lambert e Beer, le letture devono essere effettuate a 600 nm.

Invece del Pirogallolo si può impiegare il Blu di Comassie (5) la lunghezza d'onda a cui leggere le miscele di reazione non cambia.

Può cambiare il colorante ma permane il ruolo fondamentale dell' SDS, che è indispensabile anche quando si passi ad impiegare il Blu di Comassie.

Per quanto attiene invece la concentrazione del detergente, lo studio dello spettro di Assorbanza dimostra che quella ideale è fissata a 30 mg/l, in questa situazione infatti, si osserva un'iso-Assorbanza di una uguale concentrazione di albumina, gamma globuline e proteine di Bence Jones, mentre è minima l'incidenza dell' SDS.

Si può inoltre osservare che mentre l' SDS deprime la assorbività dell' albumina e delle globuline, lascia intatta quella delle proteine di Bence Jones, riconducendo appunto al comportamento di queste ultime quello di albumina e globuline.

Precauzioni nell'uso dei reagenti

I reagenti sono pericolosi se ingeriti.

E' opportuno non esporli alla luce solare.

Non possono essere usati oltre la data di scadenza.

Performance analitica e valori attesi

L'imprecisione nella serie e tra le serie delle formulazioni proposte da Aziende diverse è variabile. In un lavoro di Ottomano e Fenili il CV% dell'imprecisione nella serie varia tra 2.3 e 4.3, mentre tra le serie tra 2.6 e 5.1.

Quando si confrontano i due coloranti (Rosso di Pirogallolo vs Blu di Comassie) o formulazioni dello stesso metodo di Aziende diverse, si osserva una loro maggiore correlazione per le proteinuria glomerulare ($r=0,970$) e minore in quella tubulare ($r=0,870$), le proteinurie di Bence Jones sono intermedie ($r=0,910$).

La sensibilità dei metodi Rosso di Pirogallolo e Blu di Comassie è intorno a 200 mg/l, ma può sensibilmente aumentare aumentando la quantità di campione a parità di reagente. La linearità si aggira intorno a 3500 mg/l e può essere aumentata con l'espedito inverso a quello con cui aumenta la sensibilità.

Recentemente Marshall e Williams sono ritornati sull'impiego alternativo dei due coloranti dimostrando che esso è problematico ed indipendente dalla conservazione o meno del campione (congelamento/scongelo). Questi Autori hanno potuto dimostrare che l'impiego di un liofilizzato di proteine

urinarie come standard supera la non commutabilità di risultato con reattivi di Fornitori diversi. Peraltra altri Autori hanno rinvenuto in precedenza analoghi problemi, mai risolti prima perché non si era fatto ricorso ad urina liofila, ma ad albumina umana o ad una miscela albumina/globuline. Così Marshall e Williams raccomandano l'impiego di uno standard a matrice urinaria commercializzato in uno stato altamente stabilizzato, il cui valore deve essere assegnato impiegando un metodo di riferimento quale il Biureto. In alternativa, per i costi di produzione di un simile standard, questi Autori raccomandano il ricorso ad un fattore di correzione tra i risultati ottenuti con i vari prodotti commerciali.

In realtà il timore di una misura inaccurata della proteinuria di un calibratore urinario può essere superata dal ricorso al metodo di Doetsch e Gadsden (6) che nel lontano 1973 descrissero un metodo per il dosaggio della proteinuria totale, in doppia cromatografia su colonna, che affianca la sensibilità del Lowry alla specificità del biureto.

Un'ultima considerazione deve essere fatta sulla reale indifferenza di impiego del Rosso di Pirogallolo e del Blu di Comassie. A questo riguardo Pena e Cortes hanno dimostrato che l'impiego di plasma expanders interferisce nella misura della proteinuria, solo quando si impiega come colorante il Rosso di Pirogallolo e non quando si impieghi il blu di Comassie.

Non si può escludere che in altre circostanze si potrebbe osservare il comportamento contrario delle due sostanze.

L'intervallo di riferimento della proteinuria fisiologica è sempre stato considerato con una certa leggerezza a causa della molto scarsa confrontabilità non solo tra metodi diversi, ma anche con prodotti commerciali dello stesso metodo.

Scolasticamente si ripeterà tuttavia anche qui che il limite della proteinuria fisiologica è di 150 mg/24 h. La trattazione tuttavia della significatività di questa affermazione, come della reale necessità di riferirsi alla proteinuria delle 24 h esula da questa trattazione. Non si può non rimarcare tuttavia che, in analogia alla microalbuminuria, anche per la proteinuria il rapporto con la creatinina urinaria consente il ricorso ad un campione spot di urine per la sua determinazione. Ancora va rimarcato che la proteinuria da sola non dovrebbe essere impiegata per la diagnosi ed il monitoraggio delle nefropatie con proteinuria. A tale proposito si rimanda ad un recente lavoro di Guder "Development and evaluation of a urine export system" (7) nel quale ancora si raccomanda l'impiego di proteine specifiche per la valutazione del danno glomerulo tubulare.

Effetto matrice

Il pH urinario non ha nessuna influenza sull'accuratezza del metodo ai coloranti. Ugualmente nessuna

interferenza si ha da parte di cilindri, eritrociti, batteri, leucociti, sali di ammonio quaternario: tutti interferenti a vario titolo dei dipsticks.

Tra i numerosi farmaci testati solo la Tolbutamide ha mostrato un effetto matrice positivo.

Peso Specifico

Varie sostanze presenti nelle urine (urea, creatinina, ioni) concorrono alla determinazione del loro peso specifico.

La determinazione del peso specifico consente un orientamento diagnostico in diverse condizioni fisiopatologiche, come pure di sospettare una volontaria contraffazione del campione da impiegare a fini medico legali, ad esempio la determinazione di droghe d'abuso.

I metodi fin qui impiegati per la sua determinazione sono quello gravimetrico, refrattometrico (influenzato dal numero, massa e struttura chimica delle particelle dissolte) e da molto tempo anche con i dipsticks. Questi ultimi sono attualmente molto impiegati in Laboratorio, tuttavia possono risultare occasionalmente inaccurati.

Metodi

La determinazione del peso specifico proposto sul mercato ha fatto finora riferimento alla determinazione del Cl^- .

Nelle nostre mani un metodo per il dosaggio del Cl^- nei liquidi biologici correlava bene con quello dosato con un sistema ad elettrodi ionoselettivi, ma entrambi male col peso specifico determinato per pesata e successivamente anche con dipsticks.

Decisamente migliore si è dimostrata la correlazione tra peso specifico e creatininuria.

Stiamo attualmente studiando la correlazione tra peso specifico e la "urocreatininuria", che si prospetta molto interessante.

Vero è che esiste una correlazione evidente tra peso specifico e creatinina, nonché tra peso specifico ed urea urinaria; si assume pertanto che il dosaggio simultaneo e addizionale di due parametri che costituiscono due variabili tra loro indipendenti, possa conferire ancora maggiore significatività al valore creatininuria + azoturia quale indice correlabile al peso specifico.

Performance analitica e valori attesi

Carrieri et Al. (8) hanno descritto una relazione tra creatinina e peso specifico secondo la seguente relazione:

valori corretti di peso specifico = $1.48 * \text{valori corretti di creatinina}$

Inoltre questo Autore ha dimostrato che la correla-

zione tra creatinina e peso specifico è età dipendente in quanto con l'invecchiamento diminuisce l'escrezione di creatinina ma non del peso specifico, probabilmente perché cataboliti diversi aumentano nell'urina a determinarne un'omeostasi di quest'ultimo.

Va infine considerato che il peso specifico ha una modestissima variabilità biologica, in accordo a quanto accade alla creatininuria.

Emoglobina

Il dosaggio dell'emoglobina nelle urine può essere effettuato sfruttando da una parte la capacità cosiddetta "perossidasi simile" dell'emoglobina, cioè la sua capacità di catalizzare l'ossidazione dell'acqua ossigenata da parte di alcune sostanze, ovvero la sua capacità di essere rilevata come antigene da parte di anticorpi anti emoglobina.

Mentre la prima possibilità è ampiamente sfruttata in chimica secca e potenzialmente in chimica liquida, la seconda è oggetto di studio anche nelle nostre mani e sarà frutto di divulgazione scientifica prossimamente.

Il dosaggio dell'emoglobina quale enzima perossidante non è esente da problemi che sono stati studiati molti anni fa attraverso alcuni semplici ma brillanti esperimenti di Mattenheimer e Adams (9) (10).

Questi Autori hanno potuto dimostrare che impiegando l'o-Toluidina come cromogeno e non la benidina, più largamente usata ma instabile, la possibilità di rilevare l'emoglobina cade sotto l'influenza di potenti inibitori presenti nella matrice urinaria.

Questi inibitori sono di due classi:

- 1) alto peso molecolare (non dializzabili)
- 2) basso peso molecolare

Questi ultimi sono rappresentati da sostanze quali l'acido urico e l'acido ascorbico e tioli.

E' stato studiato l'effetto della gel filtrazione mediante Sephadex G 50 sull'eliminazione degli inibitori della perossidazione, inefficace nell'eliminazione di tutti gli inibitori, a meno dell'aggiunta di aptoglobina nell'urina in esame.

L'aptoglobina possiede però un effetto inibitorio sulla capacità "perossidasi simile" dell'emoglobina, che invece viene esaltata in un sistema che utilizza il guaiacolo.

Tarukoshi, al contrario, dimostrò invece che l'aptoglobina incrementa detta capacità quando si usi l'odanisidina invece dell'o-Toluidina e l'etilidroperossido invece dell'acqua ossigenata.

In un ulteriore lavoro, sempre Mattenheimer e Adams, partendo dall'apparente contraddizione dell'effetto dell'aptoglobina sulla capacità "perossidasi simile" dell'emoglobina, lo riconsiderarono alla luce di due considerazioni:

- 1) l'effetto della concentrazione dell' H_2O_2
- 2) l'uso di parametri differenti per esprimere tale attività

Riguardo al primo punto i due Autori hanno dimo-

strato che, impiegando una bassa concentrazione di H_2O_2 , la capacità "perossidasi simile" dell'emoglobina viene esaltata, mentre ad elevate concentrazioni di H_2O_2 viene inibita.

In riferimento alla espressione dell'attività invece, Mattenheimer e Adams hanno dimostrato che la capacità "perossidasi simile" dell'emoglobina viene inibita quando si adoperi il punto finale della reazione (massima espressione del colore), mentre è esaltata quando si impieghi l'initial rate per la misura della reazione, a prescindere dalla concentrazione di H_2O_2 .

In conclusione si può affermare che l'impiego dell'aptoglobina preserva la capacità "perossidasi simile" dell'emoglobina dall'azione degli inibitori purché in presenza di aptoglobina, e la misura dell'attività sia eseguita utilizzando l'initial rate e non il punto finale per la misura della reazione, in quanto l'effetto dei riducenti diventa talmente marcato da inibire totalmente lo sviluppo del colore.

In definitiva va evidenziato l'effetto matrice estremamente marcato che viene esercitato dai numerosi riducenti, presenti nelle urine in concentrazioni imprevedibili, sulla reazione di perossidazione tra emoglobina e ammine cromogeniche (TMB-ABTS-Toluidina-Guaiacolo-Benzidina- ecc.). L'utilizzo in chimica liquida di antiriducenti descritti in letteratura per reagenti secchi ed oggetto anche di numerosi brevetti (sali di Ferro trivalenti, ascorbato ossidasi, trietanolammina borato, iodati, sali rameici) non ha dato risultati apprezzabili. Una società del settore ha pertanto sviluppato un reattivo al lattice con lettura turbidimetrica quantitativa per il dosaggio dell'emoglobina nelle urine. In una prima valutazione preliminare, il metodo evidenzia una sensibilità di dosaggio pari a 5 microgrammi di Hb/dl di urina, ed un effetto prozona attorno ai 350 microgrammi/dl. L'elevata sensibilità di dosaggio lo rende pertanto particolarmente idoneo al rilevamento di tracce molto basse di sangue nelle urine (sangue occulto urinario). E' in via di valutazione anche l'incidenza di eventuali effetti matrice sulla reazione turbidimetrica.

Al momento non risultano metodi, descritti in letteratura, di dosaggio dell'emoglobina urinaria in chimica liquida automatizzabili.

L'unica premessa teorica già descritta riguarda il pH della reazione, che per favorire l'agglutinazione di un sistema antigene anticorpo (montato ad esempio su lattice) deve essere differente in funzione del tipo di emoglobina in esame.

In particolare, per quanto riguarda l'emoglobina nativa A_0 deve essere di 8.0 o inferiore, a differenza di quanto accade per l'Hb A1c per la quale l'agglutinazione avviene ad un pH di 8.5 o superiore.

Conclusioni

In questa trattazione non si fa cenno al dosaggio in chimica liquida dell'urobilinogeno e della bilirubina urinarie.

Se sono condivisibili le considerazioni della letteratura a tale proposito su riportate, e cioè che tali cataboliti possono precedere altri segni clinici, non v'è dubbio che strumenti diagnostici più risolutivi, non necessariamente più sofisticati, sono da tempo nelle nostre mani per rispondere ai dubbi diagnostici che un'urina, iper pigmentata in modo persistente, pone. Patologie troppo importanti si potrebbero nascondere dietro quel segnale anche solo ispettivo.

Al quesito se sia opportuno continuare col test di screening delle urine molta letteratura ha in passato risposto positivamente. Ciò che appare singolare è tanta rassegnazione davanti all'incapacità del metodo all'"errore dell'indicatore proteico" di non rilevare tutte le proteinurie glomerulari, le tubulari e, ciò che è più grave, la proteinuria di Bence Jones, marcatore indelebile dei mielomi micromolecolari e non solo.

Alla glicosuria non si è fatto cenno per doveroso rispetto verso il lettore.

L'abbandono della chimica secca nell'esame urine completo non è dietro l'angolo. E' prevedibile una notevole inerzia al cambiamento, ma la storia della medicina ci ha insegnato che questa analisi, vecchia di oltre venticinque secoli, ha fatto reali progressi solo negli ultimi decenni.

Forse questo procedere poco lineare merita un riscatto.

Ringraziamenti

A Clonital srl, subsidiary di Amplimedical Spa, con cui stiamo lavorando per validare una intera linea di prodotti per l'esame urine in chimica liquida, che ci ha concesso di riportare alcuni dei metodi riportati in questa review.

Ai Dr.i Paolo Amboni e Pio Zilio per la collaborazione nella valutazione continua dei risultati ed ai tecnici del settore di "Biochimica" del Laboratorio Analisi degli Ospedali Riuniti di Bergamo e in particolare ai tecnici Carlo Gavazzeni, Elisabetta Gotti (detta Betty) e Maurizio Parimbelli che alla fine di giornate di lavoro prive di pause, trovano ancora l'entusiasmo per il nuovo.

Bibliografia

1. Murthy VV e Karmen A. A simple spectrophotometric assay for urinary leucocyte esterase activity. *Biochem Med Metab Biol* 1988; 40: 260-268.
2. Kamnel WB, Stampfer MJ, Castelli WP, Verter J. The prognostic significance of proteinuria: the Framingham study. *Am Heart J* 1984; 108: 1347-52.
3. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye-binding. *Annal Biochem* 1976; 72: 248-54.
4. Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C, Lustenberger P e Bernard S: An improved pyrogallol red-molybdate method for determinig total urinary protein, *Clin Chem* 1989; 35: 2233-36.

5. Lott JA, Stephan VA, Pritchard KA. Evaluation of the Comassie Brilliant Blu G250 method for urinary protein. *Clin Chem* 1983; 29: 1946-50.
6. Doetsch K, Gadsden RH. Determination of total urinary protein combining Lowry sensitivity and biuret specificity. *Clin Chem* 1973; 19: 1170-78.
7. Ivandic M, Hofmann W, Guder WG. Development and evaluation of a urine protein expert system. *Clin Chem* 1996; 42: 1214-22.
8. Carrieri M, Trevisan A, Bartolucci GB. Adjustment to concentration-dilution of spot urine samples: correlation between specific gravity and creatinine. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74: 63- 67.
9. Mattenheimer H, Adams C.jr. Quantitative determination of hemoglobin in urine. *Zeitschrift fur Kinische Chemie*; 5: 48-54 1967.
10. Mattenheimer H. e Adams C. jr.: The peroxidare-like activity of the hemoglobin-haptoglobin complex. *Zeitschrift fur Kinische Chemie* 1968; 6: 69-77.