

## Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: proposta di linee guida per la fase analitica del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU)<sup>a</sup>

Fabio Manoni<sup>1</sup>, Gianluca Gessori<sup>2</sup>, Giovanni Battista Fogazzi<sup>3</sup>, Maria Grazia Alessio<sup>4</sup>, Alberta Caleffi<sup>5</sup>, Giovanni Gambaro<sup>6</sup>, Maria Grazia Epifani<sup>7</sup>, Barbara Pieretti<sup>8</sup>, Angelo Perego<sup>9</sup>, Cosimo Ottomano<sup>10</sup>, Graziella Saccani<sup>11</sup>, Sara Valverde<sup>2</sup>, Sandra Secchiero<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura, Ospedali Riuniti Padova Sud "Madre Teresa di Calcutta", Monselice (PD)

<sup>2</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Madonna della Navicella, Chioggia (VE)

<sup>3</sup>Laboratorio Clinico e di Ricerca sul Sedimento Urinario, UO Nefrologia e Dialisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>4</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>5</sup>UO Diagnostica Ematochimica, Dipartimento Diagnostico, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Parma

<sup>6</sup>Divisione di Nefrologia e Dialisi, Fondazione Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>7</sup>Centro di Ricerca Biomedica, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

<sup>8</sup>Laboratorio Analisi, Ospedale S. Croce, Fano (PU)

<sup>9</sup>Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedali Riuniti Padova Sud "Madre Teresa di Calcutta", Monselice (PD)

<sup>10</sup>Centro Analisi, Monza

<sup>11</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Orlandi, Bussoleto (VR)

### ABSTRACT

**Physical, chemical and morphological urine examination: proposed guidelines for the analytical phase by the Intersociety Urinalysis Group.** With these guidelines, the Intersociety Urinalysis Group (GIAU) aims to stimulate the following aspects: a) improvement and standardization of the analytical approach to physical, chemical and morphological urine examination (ECMU); b) to emphasize the value added to ECMU by automated analyzers for the study of the morphology of the corpuscular fraction urine; c) improvement of the chemical analysis of urine with particular regard to the reconsideration of the diagnostic significance of parameters that are traditionally evaluated in dipstick analysis, together with an increasing awareness of the limits of sensitivity and specificity of this analytical method; d) to increase the awareness of the importance of professional skills in the field of urinary morphology and of the relationships with clinicians; e) implementation of a policy for the evaluation of the analytical quality by using, in addition to traditional IQC and EQA, a program for the evaluation of morphological competence; f) to stimulate the diagnostic industry to focus research efforts and development methodology and instrumental catering to the needs of clinical diagnosis. The hope is to revalue the enormous diagnostic potential of ECMU, by implementing an urinalysis based on personalized diagnostic needs.

### DEFINIZIONE DI LINEA GUIDA

Le linee guida (LG) possono essere definite come "raccomandazioni di comportamento clinico, elaborate mediante un processo di revisione sistematica della letteratura e delle opinioni di esperti, con lo scopo di

aiutare i medici a decidere le modalità assistenziali più appropriate in specifiche situazioni cliniche" (1). Questa definizione di LG segna la differenza tra linee guida e altri strumenti. I cosiddetti "protocolli", per esempio, sono schemi di comportamento predefiniti e vincolanti, utilizzati nel corso di sperimentazioni. Si dicono invece "profili di

<sup>a</sup>Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica*, *Giornale Italiano di Nefrologia* e *La Rivista Italiana di Medicina di Laboratorio*.

Corrispondenza a: Fabio Manoni, Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura, Ospedale Madre Teresa di Calcutta, via Albere 30, 35043 Monselice (PD). Tel. 0429788256, Fax 0429788560, E-mail fabio.manoni@ulss17.it

Ricevuto: 23.06.2016

Accettato: 27.06.2016

Pubblicato on-line: 17.11.2016

DOI: 10.19186/BC\_2016.037

cura” o “percorsi diagnostico-terapeutici”, i risultati degli adattamenti delle linee guida alle situazioni locali, con le loro specifiche caratteristiche organizzative e gestionali (2).

Le LG nascono quindi per rispondere a un obiettivo fondamentale: assicurare il massimo grado di appropriatezza degli interventi, riducendo al minimo quella parte di variabilità nelle decisioni cliniche che è legata alla carenza di conoscenze e alla soggettività nella definizione delle strategie assistenziali (3).

## METODOLOGIA

Queste LG sono state sviluppate da un gruppo di professionisti di Medicina di Laboratorio e di Nefrologia componenti il GIAU. Si tratta di un gruppo impegnato a rivalutare l'esame delle urine per l'importanza che questo riveste nella diagnosi precoce delle alterazioni dell'apparato urinario. In particolare, in queste LG si sono affrontate le problematiche relative alla fase analitica dell'esame fisico, chimico e morfologico delle urine (ECMU). Sono stati identificati gli aspetti relativi alla fase analitica e, sulla base di una revisione sistematica della letteratura, sono state sviluppate le relative raccomandazioni.

## STRATEGIA DI RICERCA DELLE PROVE DI EFFICACIA

La LG si basa su una revisione sistematica della letteratura, volta alla ricerca di prove di efficacia per fornire risposte ai quesiti individuati dal gruppo di lavoro. Il processo di ricerca delle prove di efficacia ha seguito una strategia di selezione gerarchica, secondo il principio di saturazione teorica (4, 5): è iniziata cioè con la ricerca di LG (studi terziari) pubblicate su questo argomento, selezionate sulla base di criteri di qualità, come indicato dalla metodologia AGREE (6). La ricerca ha condotto all'identificazione delle seguenti LG, che sono state utilizzate come riferimento nella stesura di questo documento:

- European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM) - European urinalysis guidelines (7),
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI GP-16 A3. Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine specimens; Approved guideline - 3<sup>rd</sup> ed. (8),
- Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). Management of suspected bacterial urinary tract infection in adults (9),
- International Society of Laboratory Hematology (ISLH) recommended reference procedure for the enumeration of particles in urine (10),
- Linea Guida Regione Emilia Romagna. Infezioni delle vie urinarie nell'adulto (11),
- British Columbia Health Service Guidelines for macroscopic and microscopic urinalysis and investigation of urinary tract infections (12).

La ricerca è poi proseguita con l'identificazione di studi primari e secondari. Questa ulteriore fase si è resa necessaria sia perché le LG facevano riferimento a una bibliografia non aggiornata, sia perché alcune delle problematiche identificate dal gruppo di lavoro, ad esempio quelle relative all'automazione della valutazione della frazione corpuscolata, non erano state debitamente affrontate e dibattute nelle LG in esame.

Gli studi primari e secondari sono stati selezionati e inclusi partendo da quelli di livello superiore (revisioni sistematiche) e interrompendo la selezione al livello gerarchico più elevato al quale è stata identificata una prova di efficacia rilevante. In altri termini, sono stati inizialmente consultati la “Cochrane library” e la “Clinical evidence”. Per gli argomenti ai quali questi strumenti non hanno fornito risposta o nel caso in cui il dato fornito non fosse recente, la ricerca è proseguita in “PubMed-Medline”, dando priorità agli studi randomizzati controllati (RCT). In assenza di RCT si è proseguito con l'inclusione di studi di livello progressivamente più basso (studi controllati non randomizzati, studi osservazionali controllati, studi osservazionali non controllati, opinione di esperti). In questo modo si è riusciti a fornire le risposte ai quesiti utilizzando il più elevato livello di prova di efficacia disponibile.

## LIVELLO DELLE PROVE DI EFFICACIA

Nell'attribuzione del livello delle prove di efficacia e del grado delle raccomandazioni, si è fatto riferimento ai principi adottati dal gruppo di lavoro del GRADE (13): le raccomandazioni vengono distinte in forti o deboli sulla base di criteri espliciti e condivisi. Rispetto agli altri sistemi, l'aspetto caratterizzante del GRADE è che non si tratta di un metodo di valutazione automatica. In particolare, in questa LG, si è utilizzata una versione semplificata del GRADE, adottata a partire dal 2006 dall'“American College of Chest Physicians” (14). Le prove di efficacia possono ricevere i seguenti livelli di qualità: elevata, moderata, scarsa.

## GRADO DELLE RACCOMANDAZIONI

Il grado della raccomandazione (forte o debole) è un giudizio finale basato sulla valutazione di diverse componenti il cui valore deve essere esplicitato contestualmente alla raccomandazione (13, 14). In questa LG si è deciso di presentare le raccomandazioni con il grado (forte o debole) in evidenza. Ogni singola raccomandazione è correlata da un inciso che descrive le componenti che hanno portato al giudizio finale. Tutte le raccomandazioni sono state discusse, condivise e accettate dai componenti del GIAU.

## NECESSITÀ DI UNA LG

La malattia renale cronica (MRC) è ormai emersa come un problema di salute pubblica di prima grandezza su scala mondiale (15). I “Centers for Disease Control

and Prevention” identificano la MRC come una delle grandi priorità dell'era della transizione epidemiologica (16) e una revisione sistematica della prevalenza della malattia in Europa ha messo in luce che nei paesi europei il problema è dello stesso ordine di grandezza riscontrato negli Stati Uniti (17). Si stima che, in Italia, nella popolazione adulta con più di 40 anni di età, ~1 individuo ogni 7 (13%) abbia un grado qualsiasi di MRC (18). Oltre quella che viene ormai comunemente definita emergenza nefrologica, non bisogna trascurare la rilevante numerosità di patologie urologiche che pongono un ampio ventaglio di casi clinici, che devono essere tempestivamente diagnosticati e trattati. A tutto questo il laboratorio è chiamato a dare una risposta che sia all'altezza della sfida, sia in termini di diagnosi precoce che di definizione accurata del processo patologico in atto (19-21).

L'esame delle urine, nella sua accezione comune (“dipstick” + analisi microscopica del sedimento) non può più essere considerato uno strumento idoneo a rispondere alle nuove esigenze che nascono da quella che viene ormai considerata una vera e propria epidemia. Le maggiori conoscenze sui limiti dei “dipstick”, la disponibilità di nuove tecnologie per l'analisi automatizzata della frazione corpuscolata, la possibilità di effettuare misurazioni biochimiche altamente sensibili e accurate su strumenti automatici a elevata cadenza analitica, la selezione, l'integrazione, l'elaborazione (sulla base di griglie preimpostate personalizzabili) dei dati ottenuti con metodiche e strumentazioni diverse attraverso “software” dedicati, la disponibilità di sistemi per la raccolta e archiviazione delle immagini rende il moderno esame delle urine uno strumento complesso e totalmente modulabile sulle esigenze del clinico e del laboratorio, dall'esame condotto al letto del malato per prendere decisioni non differibili in condizioni di emergenza, fino alla realizzazione di un profilo integrato di esami biochimici/immunochimici e di valutazioni morfologiche, capaci di rispondere a quesiti clinici complessi e realizzabile solo in laboratori a elevata specializzazione (22-24).

In tutto questo, lo specialista di laboratorio è chiamato a svolgere un ruolo fondamentale: a lui sono richieste competenze cliniche e morfologiche comprovate e adeguate al livello diagnostico richiesto al laboratorio, una conoscenza approfondita delle tecnologie e, per i livelli analitici più alti, la capacità di lavorare in equipe, rapportandosi con i colleghi di altre specialità per elaborare percorsi diagnostici condivisi (25, 26).

Riteniamo quindi non differibile dotarsi di una LG aggiornata che, attraverso un “update” di metodi e tecnologie, ridefinisca i requisiti necessari per l'esecuzione di un ECMU che sia all'altezza delle rinnovate esigenze cliniche.

Queste LG della fase analitica non si riferiscono a tutte le determinazioni che possono essere eseguite sulle

urine, ma soltanto all'ECMU. Non trattano quindi, se non incidentalmente, aspetti microbiologici, dosaggi su raccolte temporizzate e aspetti farmaco-tossicologici; definiscono inoltre la modalità per il laboratorio di eseguire al meglio l'ECMU sulle decine o più spesso centinaia di campioni urinari da analizzare con informazioni cliniche spesso carenti o assenti. Seguono a distanza di 5 anni, le LG della fase preanalitica dell'esame urine, redatte dallo stesso GIAU, alle quali si rimanda per tutti gli aspetti relativi all'appropriatezza della richiesta, alle modalità di raccolta, alla tipologia del campione da esaminare, al tempo e alla temperatura accettabili per la (breve) conservazione del campione fino al momento dell'analisi<sup>1</sup>. In estrema sintesi, possono così essere riassunte: l'ECMU va richiesto per la diagnosi, il monitoraggio, l'esclusione di patologie del rene e delle vie urinarie di varia natura, primitive o secondarie; il campione va raccolto alla prima minzione del mattino, da mitto intermedio e dopo accurata pulizia dei genitali, deve essere analizzato nel più breve tempo possibile, mai oltre le 4 ore se conservato a 20 °C o le 6 ore a 4 °C. L'utilizzo di conservanti deve essere riservato a casi particolari e dopo aver verificato che non influenzi i risultati dei diversi parametri fisici, chimici, morfologici.

Le modalità di refertazione e l'armonizzazione dei risultati saranno oggetto di una prossima LG.

## DEFINIZIONE E RILIEVO DELL'ECMU

L'ECMU è un esame ampiamente diffuso per le numerose informazioni che è in grado di fornire, per la facilità con cui si raccoglie il campione, per la possibilità di eseguirlo in qualunque laboratorio in modo pratico, accurato, sicuro e per il vantaggioso rapporto costo-efficacia. Essendo, insieme alla creatininemia e alla stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR), il primo approccio alla diagnostica di lesioni e/o di disfunzioni del rene e dell'apparato urinario, è particolarmente importante che venga eseguito correttamente nelle caratteristiche 3 fasi, preanalitica, analitica e post-analitica. Infatti, se mal condotto potrebbe innescare con esiti falsamente positivi un eccesso di accertamenti non necessari o, peggio, con esiti falsamente negativi, delle mancate diagnosi. In entrambi i casi le conseguenze sarebbero di particolare gravità sia sotto il profilo medico che sotto quello economico e possiamo quindi parlare di appropriatezza analitica come chiave di volta del processo diagnostico rapportato alle esigenze cliniche (27-30).

L'ECMU include di norma alcuni o tutti i seguenti tipi di indagine e relativi parametri:

- ispezione visiva: colore e aspetto (24, 31-35);
- analisi fisiche: volume (nelle raccolte temporizzate), concentrazione (densità relativa/conduktività/osmolalità) (24, 31-35);
- analisi chimiche: proteine, albumina, glucosio,

<sup>1</sup>Manoni F, Caleffi A, Gessoni G, et al. L'esame chimico, morfologico e colturale delle urine: proposta di linea guida per una procedura standardizzata della fase preanalitica. *Biochim Clin* 2011;35:31-9.

chetoni, bilirubina, urobilinogeno, emoglobina, esterasi, nitriti, pH, creatinina e acido ascorbico (24, 31-35);

- conteggio e morfologia della componente corpuscolata su analizzatori automatici e/o in microscopia: emazie, leucociti, cellule epiteliali, cilindri, batteri, cristalli, miceti, lipidi, parassiti, contaminanti, protozoi e cellule atipiche (24, 31-35).

Ciascun laboratorio definisce quali procedure utilizzare e, in accordo con i clinici, come approfondire le indagini sulla base di studi noti e pubblicati, quali esami eseguire in accordo con la prevalenza di malattie nella popolazione aperta e con la tipologia di pazienti studiati. Infatti, la probabilità pre-test in relazione alla prevalenza di malattie renali o urologiche dovrà condizionare l'uso di procedure altamente specifiche o al contrario di esami altamente sensibili: se si valutano prevalentemente pazienti nefrologici/urologici dovranno privilegiarsi metodi a elevata specificità, mentre in soggetti privi di particolari patologie, come ad esempio in medicina sportiva, dovranno privilegiarsi metodi molto sensibili (7-12).

La richiesta di ECMU dovrebbe essere effettuata sulla base di un quesito clinico, anche quando tali accertamenti sono richiesti per escludere la presenza di una patologia o come parte di un approccio generale per inquadrare clinicamente un paziente (7, 8). La richiesta di ECMU trova un suo razionale nelle seguenti condizioni: sospetto o "follow-up" di infezione o di patologia non infettiva del tratto urinario, sospetto o "follow-up" di malattia renale primitiva o secondaria a patologie sistemiche, effetti collaterali di farmaci (7-12).

## ASPETTI TECNICO-DIAGNOSTICI

### Riconoscimento di un liquido da caratterizzare come urina

Talvolta può essere necessario stabilire la natura di un liquido inviato in laboratorio come urina. Ciò potrebbe ad esempio essere opportuno qualora si sospetti un'adulterazione fraudolenta (in corso di un accertamento con finalità legali o cliniche) o per valutare la natura di un liquido di drenaggio addominale (dopo un intervento interessante la vescica).

Le urine appena emesse presentano abitualmente le seguenti caratteristiche (24, 31-35):

- densità relativa tra 1007 e 1035 (individui che abbiano recentemente ricevuto mezzi di contrasto iodato possono presentare una densità relativa urinaria >1035);
- pH tra 4,5 e 7,5;
- temperatura tra 32,5 e 37,5 °C;
- creatinina con una concentrazione 50-100 volte più alta che negli altri liquidi corporei.

La concentrazione di urea, sodio, potassio e cloruri nelle urine è significativamente più elevata di quanto riscontrato negli altri liquidi corporei. Nelle urine di soggetti sani abitualmente si riscontrano quantità trascurabili di glucosio e proteine, che invece sono presenti in alta concentrazione nel plasma, nel liquido

amniotico, negli essudati (ma non necessariamente nei trasudati).

### Raccomandazione

***L'esame di di scelta per caratterizzare come urina un liquido biologico è la determinazione della creatinina.***

### Esame fisico

#### *Volume*

Il volume di urina fisiologicamente prodotto nelle 24 ore è compreso tra 600 e 1500 mL. Il dato non riveste importanza nell'ambito dell'ECMU (verifica solo l'idoneità della quantità del campione da analizzare), ma assume rilievo nel caso delle raccolte temporizzate e nel calcolo delle "clearance". La misura della diuresi con i dispositivi medicali disponibili è affidabile in ambito ospedaliero, molto meno quando la raccolta è effettuata dal paziente presso il proprio domicilio; in quest'ultimo caso, è compito del medico prescrittore insegnare al paziente la corretta modalità di raccolta (24, 31-35).

#### *Colore*

Le urine abitualmente presentano una colorazione propria, gialla più o meno marcata, ma possono assumere colorazioni diverse in corso di patologie sistemiche, renali o urologiche: rosso scuro o color cola in corso di emoglobinuria, mioglobinuria, porfiria; marrone in corso di ittero e alcaptonuria; blu nella sindrome del pannolino blu per la presenza nelle urine di indolo, un catabolita del triptofano; color lavatura di carne in corso di ematuria macroscopica. Colori diversi legati all'assunzione di alimenti contenenti particolari pigmenti e di farmaci non hanno nessun rilievo patologico (Tabella 1) (24, 31-35). Nell'ECMU il colore viene sempre valutato, ma viene riportato nel referto solo nel caso di colorazioni anomale con obbligo di commento.

#### *Torbidità*

Le urine fisiologiche appaiono limpide; vari gradi di torbidità sono correlati a un aumento dei corpuscoli in sospensione (24, 31-35).

#### *Schiuma*

La formazione di schiuma nelle urine è legata a sostanze tensioattive in essa presenti.

La presenza di schiuma abbondante biancastra è spesso legata alla presenza di proteine.

In un soggetto itterico la schiuma può essere colorata in giallo-verdastro o arancio scuro.

### Raccomandazioni

***Non è raccomandata la determinazione del volume nell'ECMU, se non nell'ambito della valutazione dell'idoneità del campione (campione***

**Tabella 1***Principali alterazioni del colore delle urine e loro possibili cause*

Colore	Patologia	Farmaci	Alimenti
Rosso	Ematuria Porfirinuria Mononucleosi Emoglobinuria Mioglobinuria	Cascara Desferroamina Doxorubicina Levodopa Fenotiazine Fenitoina Rifampicina Senna (urine alcaline) Epirubicina Sulfametossazolo Ibuprofene	Barbabietole More Rabarbaro
Arancio	Disidratazione	Warfarin Rifampicina Sulfasalanzina (urine alcaline) Fluorescina	Peperoncino Rabarbaro
Verde-blu	Ittero (verdi) Tifo Infezioni urinarie da <i>Pseudomonas</i> (verdi) "Blue diaper syndrome" Amitriptilina	Indometacina Blu di metilene Triamterene	
Marrone	Alkaptonuria Tirosinosi Porfirinuria Ittero	Cascara Ferro Levodopa Metronidazolo Metildopa Nitrofurantoina Fenotiazine Fenitoina Chinino Senna (urine alcaline)	
Nero	"Black water fever" (febbre emoglobinurica in corso di alcune malattie infettive quali malaria, dengue, coinfezione acuta da HBV + HDV) Melanoma maligno	Cascara Ferro Metildopa Chinino	
Viola	Porfirinuria Sindrome da catetere vescicale ("Purple urine bag syndrome")	Senna	

**insufficiente); in tal senso ogni laboratorio dovrà dare indicazioni sul volume necessario all'esecuzione analitica.**

**È raccomandata la valutazione del colore delle urine solo qualora esso sia alterato; in questo caso è raccomandato refertarlo, indicando gli eventuali ulteriori approfondimenti da effettuare.**

**Non è raccomandata la valutazione dell'aspetto delle urine nell'ECMU, in quanto tutti gli elementi che lo determinano vengono valutati quale frazione corpuscolata nell'esame morfologico.**

**Non è raccomandata la valutazione della presenza di schiuma in quanto la presenza di proteine viene rilevata con analisi chimica.**

### Esame chimico

Alla luce delle conoscenze accumulate negli ultimi decenni, oggi possiamo affermare che molti dei parametri

abituamente rilevati nelle urine con l'ECMU sono privi di effettiva utilità clinica o lo sono solo in alcune condizioni cliniche particolari, esulano pertanto da quello che dovrebbe essere un esame mirato principalmente alla valutazione della presenza o meno di patologie dell'apparato urinario (30, 36-39). I "dipstick" sono attualmente il metodo più utilizzato nella prassi di laboratorio, le cui caratteristiche di sensibilità e specificità sono state valutate da numerosi autori. La Tabella 2 compendia le caratteristiche dei principali prodotti in commercio.

Sebbene ad oggi non siano disponibili metodi commerciali in kit applicabili sugli analizzatori di chimica clinica per la valutazione dell'intero profilo dell'ECMU, è possibile procedere a un aggiornamento prevedendo:

- 1) la refertazione dei soli parametri clinicamente utili;
- 2) la misurazione in chimica liquida delle proteine urinarie con metodi più sensibili e specifici (nei laboratori di medie-grandi dimensioni e/o di

**Tabella 2**

Valutazione comparativa della sensibilità analitica di alcune strisce reattive del commercio per albumina, glucosio, emazie/emoglobina, esterasi, nitriti e chetoni. Modificata da rif. 34

Prodotto	Albumina	Glucosio	Emazie/ emoglobina	Esterasi <sup>a</sup>	Nitriti	Chetoni <sup>b</sup>
Germaines Lab. AimStick	150 mg/L	500 mg/L	5/μL-3 mg/L	5/μL	0,9 mg/L	Ad 5 mg/dL Ac 48 mg/dL
Arkray AutionSticks	150 mg/L	500 mg/L	20/μL-0,6 mg/L	5/μL	0,9 mg/L	Ad 5 mg/dL
Roche Diagnostics Chemistrip	60 mg/L	400 mg/L	5/μL-ND	20/μL	0,5 mg/L	Ad 9 mg/dL Ac 70 mg/dL
Analyticon Biotech CombiScreen plus	150 mg/L	400 mg/L	5/μL-ND	10/μL	0,5 mg/L	Ad 5 mg/dL Ac 50 mg/dL
Hypoguard DiaScreen	50 mg/L	500 mg/L	5/μL-0,2 mg/L	20/μL	0,5 mg/L	Ad 5 mg/dL
Dirui Ind. Dirui Serie H	150 mg/L	500 mg/L	5/μL-ND	5/μL		Ad 0,5 mmol/LL
Medisave MediTest C9	300 mg/L	500 mg/L	10/μL-ND	ND	0,5 mg/L	ND
Acon Lab Mission	180 mg/L	250 mg/L	ND-0,18 mg/L	9/μL	0,5 mg/L	Ad 2,5 mg/dL
Siemens Healthcare Diagnostics Multistix	150 mg/L	750 mg/L	5/μL-0,15 mg/L	5/μL	0,6 mg/L	Ad 5 mg/dL
ChungDo Phrarm Self Stick	50 mg/L	500 mg/L	5/μL-ND	ND	0,5 mg/L	Ad 5 mg/dL Ac 100 mg/dL
Arkray Uriflet S2	50 mg/L	100 mg/L	10/μL-0,3 mg/L	20/μL	0,8 mg/L	Ad 5 mg/dL
YD Diagnostics Uriscan	100 mg/L	500 mg/L	5/μL-0,15 mg/L	2/μL	0,5 mg/L	Ad 5 mg/dL Ac 70 mg/dL
Uritest Medical Uritest 13G	100 mg/L	400 mg/L	ND-3 mg/L	15/μL	0,6 mg/L	Ad 0,5 mmol/L
Erba Diagnostics Uro-Dip 10C	ND	1000 mg/L	ND-0,5 mg/L	ND	0,5 mg/L	Ad 5 mg/dL Ac 100 mg/dL
Eiken Uropaper alfa 3-9L	150 mg/L	500 mg/L	10/μL-3 mg/L	25/μL	1 mg/dL	Ad 10 mg/dL
Teco Diagnostics URS	150 mg/L	1000 mg/L	5/μL-3 mg/L	10/μL	0,75 mg/L	Ad 5 mg/dL
Bio Pacific vChem	150 mg/L	450 mg/L	5/μL-2 mg/L	20/μL	0,5 mg/L	Ad 5 mg/dL Ac 48 mg/dL

Ad, acido aceto-acetico o acido diacetico; Ac, acetone; ND, non disponibile.

<sup>a</sup>Espressa come numero di leucociti.

<sup>b</sup>Usualmente i "pad" reattivi non sono in grado di evidenziare l'acido β-idrossibutirrico.

riferimento territoriale);

- 3) l'analisi su richiesta e con metodi in chimica tradizionale dei parametri utili solo in particolari condizioni cliniche (ad es., glucosio, chetoni).

Possiamo suddividere i parametri dell'ECMU in 4 categorie:

- parametri irrinunciabili o di indubbia utilità clinica: proteine/albumina, creatinina, concentrazione urinaria (densità relativa, conduttività, osmolalità), emoglobina, pH;
- parametri utili e di verifica analitica per il laboratorio: esterasi, nitriti, e ascorbato;
- parametri utili solo in particolari condizioni cliniche: glucosio, chetoni;
- parametri non utili: bilirubina, urobilinogeno.

#### Parametri irrinunciabili e/o di indubbia utilità clinica

##### Albumina/proteine

Quando la proteinuria supera i limiti fisiologici indica quasi sempre la presenza di una compromissione della funzionalità e integrità del rene o di una patologia sistemica (7, 8, 24, 31-35). Le recenti LG della "Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) initiative" sulla scorta di molteplici studi ed evidenze, indicano come la presenza di proteine nelle urine rappresenti un fattore prognostico negativo sia per lo sviluppo di insufficienza renale cronica che per il rischio cardiovascolare già a concentrazioni considerate "fisiologiche" (comprese tra 100 e 300 mg/L di albumina oppure, utilizzando il rapporto albumina/creatinina, tra 10

e 30 mg/mmol), quando ancora l'eGFR risulti nei limiti fisiologici (40, 41). Ne consegue che una precoce rilevazione dell'albuminuria (e/o proteinuria) con metodi sensibili e accurati può costituire l'arma più efficace per una diagnosi precoce di malattia renale e per la prevenzione cardiovascolare (42-46).

Classicamente possiamo distinguere 4 tipi di proteinurie: ortostatica, da sovraccarico, glomerulare, tubulare. Nella forma funzionale la proteinuria, di solito modesta (sempre <1,5 g/die) compare dopo che il soggetto ha mantenuto per un certo tempo la postura eretta (proteinuria ortostatica) o in corso di stati febbrili, dopo attività fisica, scompenso cardiaco acuto, mentre è assente nelle prime urine del mattino (24, 31-35). La forma da sovraccarico è riconducibile a un aumento della proteine plasmatiche ultrafiltrate. Questo aumentato carico di proteine a basso PM si può avere ad esempio nelle patologie renali da gammopatie monoclonali associate a eliminazione di catene leggere, nella setticemia severa (in questo caso si tratterà di proteine della fase acuta), nell'emolisi acuta (emoglobina) o cronica (emosiderina), nei traumi muscolari massivi (mioglobina) (24, 31-35). La proteinuria glomerulare è la forma di proteinuria più grave e più comune, spesso marcata (>3,5 g/die, cosiddetta proteinuria in "range" nefrosico); si può associare a ematuria nella glomerulonefrite oppure a lipiduria con ipoalbuminemia e iperlipemia nella sindrome nefrosica. Abitualmente la proteina più rappresentata nelle urine è l'albumina, ma mano a mano che la malattia evolve possono comparire altre specie proteiche di PM più elevato. La presenza di modeste quantità di albumina nelle urine (cosiddetta erroneamente "microalbuminuria") ha assunto un valore prognostico importante in alcune comuni patologie quali diabete e ipertensione e sulla base di ciò viene considerata sufficiente come marcatore di MRC dalle LG KDIGO, se riconfermata a distanza di almeno 3 mesi (24, 31-35, 41). La proteinuria tubulare si ha quando la fisiologica funzione tubulare di riassorbimento delle proteine viene a mancare; si tratta caratteristicamente di una proteinuria relativamente modesta (<1,5 g/die), caratterizzata da proteine a basso PM (<35 kDa) quali il lisozima, la globulina legante il retinolo e l' $\alpha_1$ -microglobulina (24, 31-35). La proteinuria mista glomerulare/tubulare si ha quando sono associati un danno glomerulare e un danno tubulare; si tratta di una proteinuria non selettiva caratterizzata da proteine a diverso PM. E' opportuno che il risultato delle proteine urinarie sia espresso come rapporto con la creatinuria quale indicatore di concentrazione urinaria (PCR o ACR).

Per la rilevazione della proteinuria, le LG KDIGO danno indicazioni precise (40, 41): la determinazione delle proteine urinarie deve essere eseguita sul mitto intermedio del primo campione del mattino, con metodi sensibili, in chimica liquida, e il risultato espresso in rapporto alla concentrazione della creatinuria (40-46). In ordine di preferenza vengono suggeriti: ACR (esame di prima scelta nell'adulto), PCR (esame di prima scelta nel bambino), "dipstick" (40-46). La minor sensibilità di ACR nei soggetti in età pediatrica è determinata dalla

maggiore frequenza, in questa fascia di età, di patologie tubulari rispetto a quelle glomerulari.

Molto rilevante è il metodo analitico utilizzato nell'ECMU: l'immunoturbidimetria su analizzatori automatici è quello più attendibile, ma anche il meno utilizzato attualmente; a seguire sono utilizzati metodi in "dry chemistry" con coloranti specifici per l'albumina ed espressione in rapporto alla creatinuria; infine, non consigliati, metodi in "dry chemistry" che valutano la concentrazione delle proteine (quasi esclusivamente albumina) sulla base della variazione di un indicatore sensibile alle variazioni di pH, con marcate interferenze in caso di pH alcalino. Altri metodi, tra i quali la nefelometria, non sono applicabili nella pratica clinica.

L'accuratezza (e l'armonizzazione) della misurazione dell'albumina e della creatinina urinarie è ancora un problema aperto, al punto che l'IFCC è attualmente impegnata per superare al meglio tale criticità. In ogni caso, la scelta della metodica deve garantire la rilevazione, con adeguata sensibilità, sia dell'albumina che delle globuline. Il termine "microalbuminuria", coniato per individuare la misurazione dell'albumina in basse concentrazioni, deve essere evitato per non indurre errori sulla natura della proteina ed eventualmente sostituito da termini in grado di evidenziare la sensibilità del metodo di determinazione (40-46). Nel test eseguito con striscia reattiva non si dovrebbe parlare di proteine, ma di albumina. Il metodo utilizzato infatti è sensibile quasi esclusivamente alla presenza di albumina e transferrina, pochissimo alla presenza di globuline, mentre la sensibilità per le catene leggere è praticamente nulla. Alcune strisce multireattive utilizzano, a fianco del "pad" basato sul principio sopra esposto, un'area reattiva per la determinazione dell'albumina a bassa concentrazione (~100 mg/L). Oltre ai limiti di sensibilità, bisogna ricordare che i "dipstick" dosano l'albumina in valore assoluto, senza alcuna correlazione con la concentrazione del campione; pertanto, urine molto diluite possono dare albuminurie falsamente negative e, al contrario, urine fortemente concentrate possono rilevare un'albuminuria significativa, senza che questa in realtà superi i limiti fisiologici. Per ovviare a questo problema, sono state recentemente immesse nel commercio strisce reattive in grado di rilevare l'ACR (24, 31-35, 40-46). Trattandosi di un metodo semplice, poco costoso e rapido, la chimica secca su "dipstick" si è diffusa in tutti i laboratori e attualmente può essere considerata il metodo maggiormente utilizzato per la determinazione delle proteine (albumina) nelle urine. Tuttavia, in considerazione dei numerosi limiti che questo metodo presenta (metodo non quantitativo, numerosi interferenti, scarsa o nulla sensibilità per le globuline, mancata rilevazione della proteinuria di Bence Jones) la determinazione della proteinuria con i "dipstick" andrebbe limitata a situazioni in cui non sia possibile effettuare una determinazione più accurata in chimica liquida (vedi capitolo sui livelli diagnostici) (44-46). In un paziente con proteinuria, può risultare rilevante valutare la selettività della proteinuria attraverso esami specifici di approfondimento quali la migrazione elettroforetica in

base al PM (elettroforesi in sodio dodecilsolfato), ma questo esula dallo specifico dell'ECMU.

Concentrazione urinaria (densità relativa, conduttività, osmolalità)

Le urine sono composte per il 97-99% di acqua e per il restante 1-3% da una miscela di soluti. La concentrazione dei soluti nelle urine è un importante indice della capacità di concentrare le urine da parte del rene, oltre che dello stato di idratazione del soggetto. Risulta quindi essere un indicatore di notevole valenza clinica (7, 8, 24, 31-35). Ha inoltre rilevanza nell'analisi del sedimento urinario, in quanto la concentrazione delle urine condiziona la conservazione degli elementi figurati, che possono andare incontro a lisi in urine poco concentrate e ad alterazioni morfologiche in urine fortemente ipertoniche (7, 8, 24, 31-35).

L'espressione dei soluti nelle urine può essere valutata utilizzando diversi parametri che appaiono differenti per significato e per tipologia dei soluti che si andranno a rilevare: densità relativa, osmolalità, conduttività, creatinuria (7, 8, 24, 31-35). Ciascuno di questi parametri può essere determinato utilizzando metodiche differenti.

*Densità relativa.* Misura la densità delle urine in g/L (massa/volume) ed è la determinazione usualmente utilizzata nella pratica clinica. Viene troppo spesso erroneamente indicata come peso specifico che è il rapporto tra il peso e il volume e si esprime in Newton/L (47-50).

I metodi per la determinazione della densità relativa possono essere diretti o indiretti. I metodi diretti determinano la densità relativa delle urine a prescindere dalla tipologia di soluto presente, in quanto tutti i soluti vengono rilevati e misurati, sia quelli fisiologicamente presenti nelle urine, come urea ed elettroliti, sia quelli indicativi di patologia, come glucosio e proteine, sia quelli di origine iatrogena, come i mezzi di contrasto radiologici. La presenza di proteine o glucosio nelle urine può falsare il significato dell'esame; infatti, la glicosuria può ricondurre nei limiti fisiologici un valore di densità relativa pur in presenza di urine patologicamente non concentrate nella poliuria diabetica (7, 8, 24, 31-35). La densità relativa può essere valutata direttamente utilizzando i seguenti metodi: gravimetrico (non utilizzato in diagnostica clinica, ma comunque considerato il metodo di riferimento), urinometro e oscillazione armonica (obsoleti), rifrattometrico (poco adatto a usi clinici, ma ancora utilizzabile in casi particolari, ad es., urine ipercromiche), strumentazioni automatiche per "dry chemistry" (24, 31-35).

Il metodo utilizzato nei "pad" reattivi dei "dipstick" si basa sulla determinazione degli ioni (principalmente, sodio, potassio, cloruri e ammonio), mentre non viene invece rilevata la presenza di altre sostanze non ioniche (glucosio, proteine, mezzi di contrasto radiologici). Si tratta quindi di una metodica in grado di valutare la capacità del rene di gestire l'equilibrio idro-elettrolitico attraverso il riassorbimento e l'eliminazione selettiva

dell'acqua e degli ioni. La variazione del pH nel "pad" provoca il cambiamento di colore del blu di bromotimolo dal blu al giallo. Il metodo però appare influenzato dal pH (sovrastima a pH acido e sottostima a pH alcalino) e dalla colorazione delle urine. Nel caso di "strip multipads" con contemporanea rilevazione del pH sarà possibile effettuare la correzione per tale fattore interferente. Si tratta di un metodo facilmente automatizzabile e adatto alle applicazioni cliniche (24, 31-35).

*Osmolalità.* Viene determinata sfruttando metodi in grado di valutare le proprietà colligative dei soluti, che vanno a interferire con i cambiamenti di stato della soluzione. Tali capacità colligative dipendono solo dal numero delle particelle presenti in soluzione e non dalle loro caratteristiche. Si utilizzano metodi che valutano la temperatura di congelamento o la tensione di vapore; in entrambi i casi si tratta di metodi scarsamente automatizzabili e poco adatti ad applicazioni cliniche. Anche in questo caso il valore è influenzato dalla glicosuria e quindi risulta non attendibile nei diabetici scompensati (24, 31-35).

*Conduttività.* La conduttività o conducibilità è un parametro noto da molto tempo il cui utilizzo è stato riproposto per la disponibilità su strumentazione automatica che lo rende idoneo per un uso routinario. La conduttività dipende dalla concentrazione di elettroliti nelle urine (principalmente, sodio, potassio, cloruri e ammonio), ma non dalla concentrazione di glucosio e proteine, e non è influenzata dal pH e dal colore delle urine; è quindi in grado di misurare il risultato dell'azione del riassorbimento e dell'eliminazione selettiva di acqua e di ioni del rene anche in soggetti diabetici (47-50).

#### Creatinina

La misurazione della creatinina urinaria ha rilevanza in diverse applicazioni: identificazione di un liquido come urina, evidenziazione di adulterazioni, nell'ambito di dosaggi complessi, quali la determinazione della "clearance" della creatinina, o la determinazione della proteinuria o della ionuria in rapporto alla creatinina intesa come indicatore di concentrazione delle urine (24, 31-35).

Sono disponibili sui comuni analizzatori automatici di biochimica clinica due metodi di misurazione della creatinina urinaria: il metodo enzimatico e il metodo di Jaffè; quest'ultimo, superato dal metodo enzimatico per la misurazione sierica, si fa preferire per la determinazione della creatinina urinaria, perché ha prestazioni simili sulla matrice urinaria e minor costo (24, 31-35).

#### Emoglobina

La presenza di emoglobina e/o di eritrociti nelle urine è, insieme alla presenza di proteine, uno dei "marker" più significativi di possibile patologia dell'apparato urinario; l'ematuria può costituire l'unica spia della presenza di una patologia glomerulare o urologica, comprese quelle di natura neoplastica (7, 8, 24, 31-35, 51-56).

Con il termine "emoglobinuria" si intende la presenza di emoglobina libera, mentre con il termine "ematuria" si definisce la presenza di eritrociti nelle urine. In urine poco concentrate (densità relativa <1010 g/L) o molto alcaline (pH >8,0) le emazie possono andare incontro a lisi liberando l'emoglobina in esse contenuta; solitamente in questi casi residuano i cosiddetti eritrociti fantasma ("ghost") oltre a un numero variabile di eritrociti con maggiore resistenza osmotica (7, 8, 24, 31-35, 51-56). Oltre a situazioni legate alla fase preanalitica, l'emoglobinuria è espressione di patologie emolitiche intra- ed extra-eritrocitarie di diversa origine: metabolica, infettiva, immune, meccanica. In queste patologie la crisi emolitica dà luogo a una marcata pigmentazione delle urine di color bruno per effetto della trasformazione in metaemoglobina operata dal pH acido delle urine.

Per il rilievo clinico del parametro la sua misurazione nelle urine è fortemente raccomandata. Tutti i metodi in "dipstick" si basano sulla attività pseudo-perossidasi dell'anello tetrapirrolico completo dell'atomo di ferro centrale (protoporfirina IX); la sensibilità è ~0,3 mg/L, corrispondente a ~10 emazie/ $\mu$ L. Il test risulta reattivo sia per emoglobina che per mioglobina, in quanto entrambe contengono l'anello tetrapirrolico. False negatività possono essere ricondotte all'interferenza dell'acido ascorbico, che essendo dotato di un forte potere riducente tende a legare il perossido sottraendolo alla reazione, mentre false positività possono essere ricondotte all'attività di perossidasi batteriche e/o leucocitarie o alla contaminazione del campione con sostanze dotate di attività ossidoriducibile (detergenti, ipoclorito) (7, 8, 24, 31-35). La sensibilità non supera 80-90%; pertanto, non è possibile escludere la presenza di ematuria con l'utilizzo del solo "dipstick", ma è indispensabile che a esso venga sempre associata la valutazione microscopica e/o strumentale della frazione corpuscolata (51-56). L'attuale maggior sensibilità degli analizzatori della frazione corpuscolata sta facendo emergere una frequenza maggiore di discordanze tra esito chimico per l'emoglobina del "dipstick" e l'esito per le emazie degli analizzatori di quanto avvenisse in passato con la lettura microscopica. Al momento non sono presenti in commercio metodi alternativi alla determinazione dell'emoglobina in chimica secca con il metodo della perossidasi; è auspicabile l'introduzione di metodi di maggior sensibilità e specificità applicabili su strumentazione automatica (51-56).

#### pH

È un parametro irrinunciabile sotto il profilo clinico e laboratoristico con evidenti limiti di misurazione con la metodica "dry chemistry". Il rene gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'equilibrio acido-base. Il pH urinario può variare da 4,5 a 7,5. Fisiologicamente, le urine presentano un pH leggermente acido (tra 5,0 e 6,0) poiché in condizioni basali la produzione endogena di acidi è prevalente e vi è quindi la necessità di procedere alla loro eliminazione. La determinazione del pH ha una notevole importanza per il laboratorio perché permette di

interpretare meglio le altre reazioni chimiche (albumina/proteine) e di valutare correttamente le cristallurie e l'eventuale batteriuria. Per il clinico ha importanza nelle infezioni urinarie e nella valutazione della funzionalità tubulare. Il pH urinario può influenzare la conservazione degli elementi figurati; ad es., a pH alcalino si può avere lisi delle cellule e mancata formazione dei cilindri per interazione con la loro matrice proteica (7-9, 24, 31-35).

Tutti i "dipstick" del commercio dispongono di un "pad" per la rilevazione del pH, con un intervallo variabile da 4,5-5,0 fino a 8,0-9,0. Il pH così misurato (su scala ordinale con step di 0,5 unità) ha una scarsa accuratezza e quindi un modesto rilievo se non per orientare l'interpretazione analitica di cristalli o altro. Nei casi in cui la rilevazione del pH rivesta importanza clinica (calcolosi, nefropatie, monitoraggio terapie acidificanti/alcalinizzanti, ecc.) è consigliabile che sia effettuata una specifica richiesta di pH urinario (diversa dall'ECMU), con una misurazione mediante pHmetro da parte del laboratorio o dello stesso reparto in "point-of-care" (POC) (nefrologia, terapia intensiva) (7-9, 24, 31-35).

#### Parametri utili e di verifica analitica per il laboratorio

##### Esterasi leucocitaria

È un enzima presente nei granuli azzurrofilii dei granulociti, ma non nei linfociti (7, 8, 24, 31-35). La presenza di leucocituria significativa può indicare la presenza di un'infezione o di una flogosi delle vie urinarie (57-64). La positività dei "dipstick" si verifica in presenza di esterasi rilasciate dai leucociti in corso di degenerazione. In presenza di leucociti giovani, resistenti alla lisi, con nullo o minimo rilascio di esterasi, si può avere leucocituria nel sedimento con negatività all'esterasi; al contrario, una lisi dei leucociti (dovuta alla bassa concentrazione del campione, all'esposizione a pH molto alcalino o alla cattiva conservazione del campione) può determinare positività per l'esterasi in assenza di leucociti rilevabili al microscopio o con strumentazione automatica. Pertanto, come per l'emoglobina, la determinazione dell'esterasi leucocitaria deve essere associata alla ricerca dei leucociti con la microscopia e/o con strumentazione automatica (57-64). Tutti i "dipstick" del commercio rilevano l'esterasi leucocitaria, con una sensibilità equivalente a ~20-25 leucociti/ $\mu$ L. Tale sensibilità è minore di quella rilevata dagli analizzatori automatici (2-3 elementi/ $\mu$ L) e al limite superiore di riferimento per i leucociti (10-15/ $\mu$ L) (7, 8, 24, 31-35).

##### Nitriti

Alcuni batteri (prevalentemente *Enterobacteriaceae*), ma non altri importanti patogeni urinari come gli enterococchi, sono in grado di convertire in nitriti i nitrati fisiologicamente presenti nelle urine. I nitrati sono introdotti nell'organismo con una dieta ricca in vegetali freschi e la loro riduzione a nitriti da parte del metabolismo batterico richiede un lasso di tempo variabile in funzione della quantità e del tipo di batteri in

causa. Pertanto, la mancata assunzione di nitrati con la dieta o la ridotta permanenza delle urine in vescica sono le ragioni per cui, anche in caso di infezioni sostenute da batteri in grado di ridurre i nitrati a nitriti, il test dei nitriti nelle urine può risultare negativo (7, 9-11, 65-67). A fronte di una bassa sensibilità, il test è utile in quanto dotato di elevato valore predittivo positivo; il valore predittivo negativo non appare altrettanto elevato per la possibilità che l'infezione sia sostenuta da enterococchi (7, 9-11, 65-67).

Tutti i "dipstick" del commercio rilevano i nitriti urinari, mentre non sono disponibili kit per chimica liquida automatizzata (24, 31-35).

#### Ascorbato

La presenza di ascorbato nelle urine è piuttosto frequente potendo originare sia dalla dieta (agrumi, conservanti) sia dall'assunzione di farmaci contenenti vitamina C. Nelle urine la presenza di acido ascorbico a una concentrazione di 100 mg/L è in grado di interferire con la determinazione dell'emoglobina; a una concentrazione di 250 mg/L dà interferenza con la determinazione dei nitriti e della bilirubina; a una concentrazione di 500 mg/L si ha interferenza anche con la determinazione del glucosio. Rappresenta pertanto per il laboratorio un utile indicatore di possibili interferenze; pertanto, alcune aziende hanno dotato le loro strisce reattive di un "pad" dedicato alla rilevazione della presenza di questa sostanza nelle urine (7-9, 24, 31-35).

#### *Parametri utili in particolari condizioni cliniche*

##### Glucosio

La presenza di glucosio nelle urine si ha quando la quantità di glucosio ultrafiltrata eccede le capacità di riassorbimento tubulare. Questo può avvenire per diminuzione della capacità del tubulo prossimale di riassorbire il glucosio oppure per la maggior ultrafiltrazione conseguente all'iperglicemia. Nel soggetto a rene integro compare glicosuria quando la glicemia supera i 180 mg/dL; glicosuria si può avere anche con concentrazioni fisiologiche di glucosio nel sangue nella patologia tubulare congenita nota come "glicosuria normoglicemica" e nella sindrome nefrosica, a causa della ridotta capacità di riassorbimento del glucosio da parte delle cellule del tubulo prossimale per competizione con il riassorbimento di proteine ultrafiltrate a livello glomerulare (7, 8).

Tutte le strisce reattive sono dotate di "pad" per la rilevazione della glicosuria; falsi negativi si possono avere in presenza di ascorbato e nel caso di infezione del tratto urinario, mentre falsi positivi si osservano in presenza di sostanze ossidanti e nelle urine particolarmente acide. Il glucosio può essere determinato in chimica liquida utilizzando un metodo enzimatico specifico (ad es., esochinasi o glucosio ossidasi) (24, 31-35).

Negli ultimi anni l'utilità clinica della determinazione

del glucosio nelle urine è stata fortemente ridimensionata; nelle LG internazionali, i diabetologi non fanno più alcun riferimento a questo esame per la diagnosi e il monitoraggio del diabete, ormai totalmente basati su esami eseguiti su sangue (glicemia ed emoglobina glicata) (68, 69). L'analisi del glucosio urinario può tuttavia essere utile in patologie nefrologiche, quali le tubulopatie congenite o acquisite (sindrome di Fanconi) e in corso di tubulo-interstiziopatie a varia eziologia, dove può essere specificamente richiesta e determinata in chimica liquida (68-70). Inoltre, la ricerca del glucosio urinario può essere inserita, insieme ai chetoni e accanto ai parametri irrinunciabili, in un profilo dedicato in modo specifico ai soggetti pediatrici nella prima infanzia, quando le oggettive difficoltà a ricorrere ai prelievi ematici rendono più frequente il ricorso alla glicosuria come primo esame nel sospetto clinico di diabete (70, 71).

##### Chetoni

I chetoni sono una famiglia di 3 composti: acetone, aceto-acetato e acido  $\beta$ -idrossibutirrico, che derivano dal metabolismo (in carenza di glucosio) degli acidi grassi. La presenza di chetoni nelle urine è per lo più legata al digiuno ed è utile solo in riferimento a specifiche popolazioni di pazienti e in specifiche condizioni cliniche (diabete, ipotermia, febbre, vomito prolungato, complicanze fetali nel post-termine). Raramente hanno reale utilità clinica, a eccezione di alcune situazioni in medicina d'urgenza (chetoacidosi diabetica, abuso alcolico) (24, 31-35).

Con il "dipstick", falsi negativi sono determinati dal fatto che non viene rilevato l'acido  $\beta$ -idrossibutirrico, mentre risultati falsi positivi si osservano in presenza di gruppi sulfidrilici liberi (ad es., farmaci come captopril, L-DOPA, cefalosporina) (24, 31-33). Per reali necessità cliniche è quindi auspicabile misurare le specifiche chetonurie in chimica liquida su precisa richiesta del curante.

#### *Parametri non utili*

##### Pigmenti biliari (bilirubina, urobilinogeno)

La bilirubina e l'urobilinogeno rilevati nelle urine hanno perduto il loro significato e la letteratura scientifica concorda sull'insufficiente capacità di previsione del danno epatico sulla base delle positività urinarie dei pigmenti biliari. Sono rilevati dai comuni "dipstick". Falsi negativi per la bilirubina si evidenziano in presenza di vitamina C e di nitriti, mentre falsi positivi si riscontrano in presenza dei metaboliti della clorpromazina e, per quanto riguarda l'urobilinogeno, di altri farmaci (carbapenem e sulfanilammide). Falsi positivi sono frequenti anche in condizioni di cattiva conservazione delle strisce reattive (umidità) (24,31-35).

Per un quadro riassuntivo dei principali interferenti dell'esame chimico con "dipstick", si veda la Tabella 3.

**Tabella 3***Principali interferenti nell'impiego delle strisce reattive per l'esecuzione dell'esame chimico delle urine*

Parametro	Metodo/sensibilità	Specificità/interferenze
Densità relativa	Reattivo polielettrolitico e indicatore di pH/ Da 1010 a 1030	Solo soluti ionici Interferenza in riduzione: pH alcalino, glucosio e urea >1 g/L Interferenza in aumento: proteine >5 g/L, chetoacidosi
pH	Due indicatori di pH/ Da 5,0 a 9,0 (incrementi di 0,5 unità)	Interferenza in riduzione: formaldeide
Sangue/emoglobina	Attività pseudoperossidasi/ Da 0,2 a 0,6 mg/L (da 5 a 10 RBC/ $\mu$ L)	Falsi positivi: perossidasi batteriche, agenti ossidanti, acido cloridrico Falsi negativi: ascorbato, alta densità relativa, agenti riducenti, formalina, nitriti, farmaci
Esterasi leucocitaria	Attività indoxil esterasica/ 5-25 WBC/ $\mu$ L	Presente solo nei granulociti Falsi positivi: urine ipercromiche, formalina, farmaci, sodio azide, detergenti Falsi negativi: ascorbato, borato, glucosio >30 g/L, proteine >5 g/L, elevata densità relativa, agenti ossidanti, saponi e detergenti, farmaci
Nitriti	Reazione di Greiss/0,5 mg/L	Falsi positivi: urine ipercromiche, farmaci, malconservazione campione Falsi negativi: batteri non formanti nitriti, dieta povera in nitrati, urine che non hanno soggiornato in vescica, ascorbato
Proteine	Legame non specifico a un indicatore/ Sensibili alla albumina, 60-150 mg/L	Falsi negativi: presenza di globuline, urine ipercromiche Falsi positivi: urine fortemente alcaline, urine ipercromiche, farmaci, ammonio quaternario, "plasma expander"
Glucosio	Glucosio ossidasi-perossidasi/400 mg/L	Metodo specifico per il glucosio, ma interferenze da bassa temperatura e/o elevata densità relativa Falsi positivi: agenti ossidanti, perossidi, acido cloridrico Falsi negativi: ascorbato, malconservazione
Chetoni	Reazione al nitroprussiato/ 50-100 mg/L per aceto acetato, 500-700 mg/L per acetone	Non evidenzia l'acido $\beta$ -idrossibutirrico Falsi positivi: gruppi sulfidrilici liberi (N-acetilcisteina), Urine ipercromiche, metaboliti del levodopa, fenofltaieina Falsi negativi: malconservazione campione
Bilirubina	Azoreazione con sali di diazonio/ 0,4-0,8 mg/dL bilirubina coniugata	Falsi positivi: urine ipercromiche, clorpromazina Falsi negativi: ascorbato, nitriti, malconservazione, luce solare diretta
Urobilinogeno	Azoreazione con aldeide di Erlich/ 2-10 mg/L	Falsi positivi: urine ipercromiche, sulfonamidi, acido para-aminosalilico Falsi negativi: formalina, agenti ossidanti, malconservazione
Ascorbato	Riduzione dell'indolo/200 mg/L	Falsi positivi: gruppi sulfidrilici liberi (N-acetilcisteina), agenti riducenti
Creatinina	Reazione ossidativa con complessi di rame	Falsi negativi: EDTA Falsi positivi: emoglobina, mioglobina

*RBC, eritrociti; WBC, leucociti.***Raccomandazioni**

***E' fortemente raccomandata la determinazione dell'albumina nelle urine. Nei bambini, è fortemente raccomandata la determinazione delle proteine totali. In entrambi i casi, è raccomandato l'utilizzo di metodi quantitativi, a elevata sensibilità e specificità, che non risentano dell'influenza del pH e il cui risultato venga normalizzato in funzione della concentrazione delle urine (ACR o PCR). La rilevazione della proteinuria con i "dipstick" dovrebbe essere limitata alle sole situazioni di***

***indisponibilità di strumentazione idonea all'analisi in chimica liquida.***

***E' fortemente raccomandata la determinazione della concentrazione urinaria (densità relativa, conduttività o osmolalità) quale indice dello stato di idratazione o della capacità del rene di gestire l'equilibrio idro-elettrolitico, utilizzando un metodo che non risenta della presenza di altri soluti (ad es., glucosio e proteine).***

***E' fortemente raccomandata la determinazione della creatinina urinaria sia come indicatore di concentrazione del campione e per l'espressione in***

**termini di rapporto dei parametri urinari, ove previsto, sia come garante della natura urinaria del campione.**

**E' fortemente raccomandata la ricerca dell'emoglobina nelle urine; la rilevazione con "dipstick" deve sempre essere associata alla valutazione microscopica e/o strumentale della frazione corpuscolata.**

**E' fortemente raccomandata la determinazione del pH urinario, in quanto può dare indicazioni al laboratorio nell'identificazione delle cristallurie e, con un pH fortemente alcalino, può suggerire una falsa positività di proteinuria al "dipstick". In casi di reale utilità clinica, è raccomandata la rilevazione con pH-metro.**

**E' raccomandata la ricerca dell'esterasi leucocitaria nelle urine; la rilevazione con "dipstick" dovrebbe sempre essere associata alla valutazione microscopica e/o strumentale della frazione corpuscolata.**

**E' raccomandata la ricerca dei nitriti nelle urine per il loro elevato valore predittivo positivo per le infezioni delle vie urinarie.**

**E' raccomandata la determinazione dell'ascorbato per le informazioni utili al laboratorio circa possibili interferenze sui risultati analitici ottenuti con "dipstick".**

**Non è raccomandata la misurazione della glicosuria. Per finalità specifiche in ambito nefrologico e nella prima infanzia se ne raccomanda l'analisi in chimica liquida.**

**Non è raccomandata la determinazione dei chetoni urinari, tranne che in situazioni di medicina di emergenza/urgenza (chetoacidosi diabetica, intossicazione alcolica).**

**Non è raccomandata la determinazione di urea, acido urico, ioni; la loro determinazione deve essere effettuata su richiesta, in specifiche condizioni cliniche.**

**Non è raccomandata la determinazione della bilirubina urinaria.**

**Non è raccomandata la determinazione dell'urobilinogeno nelle urine.**

### **Analisi della frazione corpuscolata**

La gerarchia dei processi analitici riconosce 4 livelli (Tabella 4).

Livello I - Test rapidi. Si tratta di esami che idealmente dovrebbero dare una risposta rapida e affidabile per il singolo paziente; possono essere eseguibili al letto del malato. Nell'ambito della microscopia urinaria possiamo considerare come esame di primo livello l'osservazione di un preparato a fresco di urina nativa in campo chiaro con vetrini portaoggetto e coprioggetto tradizionali eseguita, ad esempio, nell'ambulatorio di un medico (7, 8).

Livello II - Metodi di routine. Si tratta delle metodiche che vengono abitualmente adottate per la diagnostica nei laboratori clinici. In riferimento alla microscopia urinaria possiamo ricomprendere in questo livello la valutazione microscopica di preparati allestiti dopo centrifugazione del campione, aspirazione del sovrantante, risospensione del fondello. I preparati sono allestiti in vetrini multicellette a volume predefinito, dotati di reticolo per il conteggio. La lettura potrà avvenire in campo chiaro o a contrasto di fase (7, 8).

Livello III - Metodi di comparazione. Si tratta di metodiche diagnostiche che, pur non essendo ancora di riferimento, sono comunque più accurate di quelle considerate nel livello II. Si tratta di metodi automatizzati e adatti alla applicazione su ampie serie di campioni che richiedono per la loro esecuzione personale adeguatamente formato e attrezzature analitiche complesse. Come metodica di livello III per l'esame microscopico si intende la valutazione a fresco a 400 ingrandimenti delle urine native (non centrifugate), effettuata da due diversi osservatori utilizzando una camera citometrica (ad es., Kovacs o Fuchs Rosenthal) in contrasto di fase (7, 8). In alcune situazioni in cui è importante ricercare elementi di particolare rilievo clinico (ad es., cilindri eritrocitari) risulta vantaggioso centrifugare il campione anche se questo inficia la corretta quantificazione degli elementi.

Livello IV - Metodi di riferimento. Le metodologie diagnostiche dotate di maggiore accuratezza sono dette "metodi di riferimento" e vengono così definite dopo essere state sottoposte a un'accurata valutazione di tutte le fonti di inaccuratezza, compresa la specificità. Allo stato attuale non esistono metodiche di livello IV applicabili alla diagnostica microscopica delle urine (7, 8).

Nella diagnostica microscopica delle urine, non esistendo metodi di riferimento (livello IV), le metodiche di livello III costituiscono il massimo livello di approfondimento diagnostico e possono essere utilizzate per valutare la prestazione analitica delle metodiche di livello II.

**Tabella 4**

*Tecniche di visione microscopica per identificare e quantificare gli elementi particolati delle urine. Modificata da rif. 10*

1. Metodi rapidi: microscopia estemporanea del campione nativo (livello I)
2. Metodi di routine: esame microscopico standardizzato del sedimento (livello II)
3. Metodi di comparazione: conta degli elementi corpuscolati delle urine in camera citometrica effettuata su campione non centrifugato. Valutazione della flora batterica dopo centrifugazione fissazione e colorazione secondo Gram (livello III)
4. Metodo di riferimento: conta di leucociti, eritrociti, cellule epiteliali e cilindri in camera citologia secondo raccomandazione dell'"International Society of Laboratory Hematology" (livello IV)

## Principi di microscopia manuale del sedimento urinario

La valutazione della componente corpuscolata delle urine viene effettuata utilizzando l'esame a fresco del sedimento urinario in microscopia manuale in campo chiaro. Tale metodologia, sino al 2000, era considerata adeguata alle applicazioni di routine. L'utilizzo di colorazioni sopravitali veniva raccomandato solamente in casi patologici, per migliorare la differenziazione degli elementi cellulari o dei cilindri. L'uso della microscopia in contrasto di fase veniva riconosciuto in grado di migliorare il riconoscimento e la differenziazione degli elementi corpuscolati, ma senza specifiche raccomandazioni di utilizzo. L'utilizzo di tecniche alternative di microscopia, come la microscopia in polarizzazione, veniva fortemente raccomandato per l'evidenziazione e la differenziazione di cristalli e lipidi. E' raccomandata la standardizzazione di una serie di aspetti e passaggi preanalitici, quali caratteristiche del contenitore, modalità di centrifugazione dei campioni e allestimento dei preparati microscopici (7). Infine, viene data indicazione che sia garantito il riconoscimento e la differenziazione dei seguenti elementi (72-78):

- cellule ematiche: eritrociti e leucociti,
- cellule epiteliali: squamose, transizionali (uroteliali) tubulari,
- cilindri: ialini, granulari, cerei, lipidici, eritrocitari, leucocitari, epiteliali (contenenti cellule tubulari renali), pigmentati (da emoglobina, mioglobina, bilirubina), con inclusi cristalli o microorganismi, misti,
- lipidi,
- cristalli: ossalato di calcio, acido urico, urati amorfi, fosfati amorfi, calcio fosfato, fosfato triplo, colesterolo, cistina, 2,8 di-idrossiadenina, da farmaci (i risultati sono espressi in termini qualitativi),
- microorganismi: batteri, miceti, parassiti, protozoi,
- altro: muco, spermatozoi, contaminanti (i risultati sono espressi in termini qualitativi).

L'importanza di una corretta lettura della frazione corpuscolata delle urine e delle notevoli implicazioni cliniche a essa correlate sono esemplificate nella Tabella 5 (79, 80).

Le modalità di osservazione del sedimento urinario in microscopia ottica, enunciate nelle linee guida europee del 2000 (7), restano ancora oggi valide nei principi generali, anche se l'avvento dei sistemi automatizzati di conteggio differenziale della frazione corpuscolata delle urine ne ha molto ridotto il campo d'impiego.

### *Valutazione morfologica della frazione corpuscolata mediante microscopia ottica*

#### Identificazione e quantificazione delle emazie

Si definisce "ematuria" la presenza di emazie nelle urine. Si parla di "macroematuria" se la quantità di sangue è tale da alterare il colorito delle urine. Sono sufficienti 2 mL di sangue in un litro di urina per causare un cambiamento visibile del colore (24, 31-33). In caso di ematuria macroscopica le urine possono avere vari colori

in base alla gravità del sanguinamento e anche alla tempistica con cui è avvenuto. Per esempio, un'ematuria franca (color rosso) indica un considerevole sanguinamento in atto, l'ematuria "a lavatura di carne" indica un lieve sanguinamento, l'ematuria color "marsala" o "cola" può indicare emoglobinuria o un sanguinamento pregresso. In presenza di urine colorate di rosso è sempre necessaria la conferma microscopica della presenza di emazie nel campione, in quanto alcune sostanze di origine alimentare e alcuni farmaci possono conferire alle urine un colore simile a quello determinato dalla presenza di sangue (Tabella 1) (24, 31-35). Si parla di "microematuria" quando la quantità di sangue è modesta e non in grado di alterare l'aspetto delle urine. Non esiste un valore soglia condiviso per definire la microematuria. E' raccomandato che ogni laboratorio definisca i propri valori di riferimento in relazione alla popolazione e alla casistica esaminata. Una delle soglie più condivise è quella dell'"American Urological Association", che indica come microematuria la presenza di 3 o più emazie per campo microscopico a 400X, equivalenti a 10-12 eritrociti/ $\mu$ L con gli analizzatori automatici (24, 31-35). Le principali cause di ematuria sono riportate nella Tabella 6.

#### Identificazione e quantificazione dei leucociti

Non esiste un valore soglia condiviso per definire la leucocituria. E' raccomandato che ogni laboratorio definisca i propri valori di riferimento in relazione alla popolazione e alla casistica esaminata. Si definisce comunemente come leucocituria la presenza di oltre 3-5 cellule/campo microscopico in "high performance field" (HPF) (400x), equivalenti a 10-20 globuli bianchi per  $\mu$ L di urine.

Nelle urine possiamo trovare granulociti neutrofili ed eosinofili, linfociti e macrofagi. I granulociti neutrofili costituiscono un riscontro comune in molte patologie infettive e flogistiche, dall'infezione delle vie urinarie alla glomerulonefrite (24, 31-35). I granulociti eosinofili sono presenti in diverse patologie e hanno quindi perso il significato patognomonico di marcatore di nefrite acuta interstiziale. I linfociti appaiono associati a condizioni di infiammazione cronica e malattie virali; sono presenti nelle urine in corso di rigetto del trapianto renale (sensibilità 80-90%) o in corso di patologie ematologiche (leucemie o linfomi con infiltrazione del rene) (24, 31-35). I macrofagi (istiociti) possono essere presenti in varie patologie infiammatorie croniche, quasi sempre associati ai neutrofili e in corso di marcata proteinuria. Possono assumere vari aspetti: dendritico con pseudopodi, poligonale, simile ai granulociti in via di degenerazione, circolare con inclusioni e nucleo evidente (81, 82).

#### Identificazione e quantificazione dei cilindri

Elementi di forma cilindrica con estremità talvolta arrotondate e talvolta tronche sono costituiti da proteina di Tamm-Horsfall (THP), che può essere l'unico costituente (cilindri ialini) o nel quale possono essere presenti elementi cellulari o di derivazione cellulare. La

**Tabella 5***Elementi corpuscolati nelle urine e principali associazioni cliniche. Modificata da rif. 34 e 79.*

Elementi	Principali associazioni cliniche
Eritrociti dismorfici e acantociti	Ematuria glomerulare
Eritrociti isomorfi	Ematuria non glomerulare
Leucociti polimorfonucleati	Infezioni urinarie Glomerulonefriti proliferative Nefriti interstiziali acute Contaminazione da secrezioni genitali
Cellule epiteliali renali tubulari	Patologie renali associate a danno tubulare organico (necrosi tubulare acuta), quali si possono osservare nelle nefropatie tubulotossiche, ischemiche, glomerulonefriti, nefriti interstiziali, ecc.
Cellule transizionali superficiali	Patologie associate a danno dell'epitelio di transizione (strati cellulari superficiali)
Cellule transizionali profonde	Patologie associate a danno dell'epitelio di transizione (strati cellulari profondi)
Cellule squamose	Contaminazione da secrezioni genitali
Lipidi	Patologie glomerulari associate a proteinuria di grado variabile, ma soprattutto di entità nefrosica Malattia di Fabry (da accumulo lisosomiale di glicosfingolipidi)
Cilindri ialini	Possono essere presenti in piccolo numero negli individui sani Possono essere presenti in svariate tipologie di patologie renali
Cilindri ialino-granulosi	Possono essere presenti in piccolo numero negli individui sani Possono essere presenti in svariate tipologie di patologie renali
Cilindri granulosi	Possono essere presenti in svariate tipologie di patologie renali Necrosi tubulare acuta
Cilindri cereei	Patologia renale con significativa perdita di funzione
Cilindri lipidici	Sindrome nefrosica
Cilindri eritrocitari	Ematuria glomerulare Glomerulonefrite proliferativa o necrotizzante
Cilindri leucocitari	Nefrite interstiziale acuta Pielonefrite acuta Glomerulonefrite proliferativa
Cilindri cellulari/epiteliali (cellule epiteliali tubulari)	Necrosi tubulare acuta Nefrite interstiziale acuta Sindrome nefrosica
Cilindri emoglobinici	Ematuria glomerulare Glomerulonefrite proliferativa o necrotizzante Emolisi acuta intravascolare
Cilindri mioglobinici	Rabdomiolisi
Cilindri bilirubinici	Icttero marcato
Cilindri con inclusi batterici o micotici	Infezioni batteriche o micotiche del rene
Cilindri con inclusioni cristalline	Insufficienza renale acuta da cristalluria massiva
Cilindri a composizione mista	

**Tabella 6***Classificazione delle principali cause di ematuria*

Cause urologiche	Cause non urologiche	Falsa ematuria
Cistite emorragica	Nefrite interstiziale acuta	Colorazione da farmaci
Calcolosi	Da anticoagulanti	Colorazione da alimenti
Neoplasie delle vie urinarie	Glomerulopatie	Mioglobinuria
Neoplasie della prostata		Porfirie
Traumatismi		Emoglobinuria
Ematuria da sforzo fisico intenso		
Fistole artero-venose renali		
Rottura cisti renali		
Manovre diagnostiche invasive		
Endometriosi delle vie urinarie		

THP costituisce la componente quantitativamente più importante della proteinuria fisiologica ed è prodotta a livello del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle. La formazione dei cilindri deriva dall'aggregazione delle fibrille della THP, che è favorita da diversi fattori, quali pH acido, alta osmolalità, presenza di proteine ultrafiltrate. Nelle urine a pH alcalino il riscontro dei cilindri è abbastanza raro per la mancata aggregazione delle fibrille di THP. Nei soggetti sani il riscontro di cilindri ialini non è infrequente e non esiste un valore soglia in quanto dipendente da diversi fattori fisiologici.

I cilindri assumono il significato suggerito dai loro costituenti; si formano soprattutto nell'ansa di Henle e nel tubulo contorto distale, dei quali riproducono la forma (7, 8, 10, 24, 31-35, 70-76). In base alla loro costituzione è possibile distinguere i seguenti tipi di cilindri:

- cilindri ialini,
- cilindri granulosi (a piccoli e grandi granuli),
- cilindri leucocitari,
- cilindri eritrocitari,
- cilindri epiteliali (cellule renali tubulari),
- cilindri lipidici,
- cilindri cerei,
- cilindri pigmentati (da emoglobina, mioglobina, bilirubina),
- cilindri con inclusi batterici o micotici,
- cilindri con inclusi cristallini,
- cilindri misti.

*Cilindri ialini.* Sono costituiti solo dalla THP; possono presentarsi scarsamente visibili con luce intensa (e sono ritenuti di recente formazione) oppure più visibili e dalla struttura più compatta. Una cilindruria ialina si può osservare anche in soggetti sani, più facilmente dopo sforzo, disidratazione o esposizione al freddo, nello scompenso cardiaco acuto e nell'iperpiressia. Una cilindruria ialina può essere presente in tutte le nefropatie nelle quali è abitualmente associata a cilindri di altro tipo (7, 8, 10, 24, 31-33).

*Cilindri granulosi.* A piccoli e grandi granuli: i piccoli granuli sono formati da conglutinati di proteine ultrafiltrate a livello del glomerulo, i grandi granuli sono formati dalla degenerazione di elementi cellulari. Solitamente non si riscontrano nelle urine dei soggetti sani sebbene, anche in assenza di patologia renale, cilindri a piccoli granuli si possano ritrovare dopo iperpiressia. I cilindri a grandi granuli si ritrovano spesso in molti tipi di nefropatia, ad es., nelle glomerulonefriti e nella nefropatia diabetica. Nei pazienti con insufficienza renale acuta, i cilindri granulosi sono considerati un marcatore di danno tubulare organico (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri leucocitari.* La loro presenza nell'urina può essere determinata da tutte le patologie flogistiche del rene, ad es., lupus eritematoso, nefrite interstiziali, pielonefriti acute (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri eritrocitari.* Possono osservarsi in tutte le nefropatie che causano ematuria per le quali rappresentano un "marker" di specificità assoluta (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri epiteliali.* Sono considerati come espressione di una sofferenza tubulare acuta organica quale si può

osservare ad esempio nelle nefropatie glomerulari, necrosi tubulare acuta, nefriti interstiziali acute e tubulopatie (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri lipidici.* Sono presenti in situazioni caratterizzate da proteinuria marcata, specialmente nella sindrome nefrosica (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri cerei.* Sono gli unici cilindri in cui la matrice proteica prevalente non è THP. Sono compatti e friabili e, solo eccezionalmente, presentano elementi inclusi perché la lunga permanenza nei tubuli li porta a completa degenerazione. I cilindri cerei sono quindi espressione di una compromissione renale. Una loro presenza può essere associata principalmente a glomerulonefriti, nefropatia diabetica, amiloidosi renale (8, 10, 24, 31-35, 83, 84).

*Cilindri pigmentati.* Devono la loro colorazione alla presenza di sostanze cromogene. Cilindri emoglobinici e mioglobinici: di colore rossastro, hanno aspetto simile a un cilindro granuloso. Quelli di emoglobina possono derivare da emazie degenerate o da emoglobinuria; quelli di mioglobina si riscontrano nell'insufficienza renale acuta associata a rhabdmiolisi di diverse origini. Cilindri bilirubinici: la bilirubina conferisce al cilindro un colore aranciato scuro; si osservano in pazienti itterici con alta percentuale di bilirubina coniugata (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri con inclusi batterici o micotici.* La presenza di cilindri con inclusioni batteriche depone per un'infezione renale; il reperto ha una notevole importanza, perché indicativo della presenza di un'infezione particolarmente grave (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri con inclusi cristallini.* La presenza di inclusi cristallini indica che i cristalli sono presenti a livello tubulare. Molto importante clinicamente nelle forme cristalluriche di insufficienza renale acuta, quale ad esempio la nefropatia uratica acuta (7, 8, 10, 24, 31-35).

*Cilindri misti.* Sono forme pleiomorfe nelle quali possono trovarsi elementi corpuscolati diversi (emazie, leucociti, cellule, lipidi, cristalli, ecc.) inclusi nella matrice THP. Il loro significato clinico riconduce a quanto espresso per i cilindri con le singole inclusioni (7, 8, 10, 24, 31-35).

#### Identificazione e quantificazione delle cellule

Le mucose del tratto genito-urinario sono rivestite da differenti tipologie di epitelii (7, 8, 10, 24, 31-35).

L'uretra nel suo primo tratto appare rivestita da un epitelio di transizione in continuità con quello della vescica; nella sua porzione anteriore, invece, è rivestita da un epitelio pavimentoso squamoso disposto in più strati, sino all'orifizio uretrale esterno. Le cellule epiteliali squamose provenienti dall'uretra e dal trigono vescicale (nelle donne in età fertile) sono di grandi dimensioni, fogliacee, con piccolo nucleo picnotico (7, 8, 10, 24, 31-35).

La vescica, ad eccezione del trigono, e gli ureteri sono rivestiti da un epitelio di transizione pluristratificato, detto urotelio. Si riconoscono almeno 3 morfologie cellulari distinte: le cellule dello strato superficiale, di forma rotonda o ovalare, a ombrello e di grosse

dimensioni, con nucleo piccolo e centrale; le cellule dello strato intermedio, generalmente di dimensioni inferiori e forma più eterogenea (ovalari o a clava spesso binucleate) e le cellule dello strato profondo, cuboidali (7, 8, 10, 24, 31-35).

I tubuli renali sono rivestiti dall'epitelio tubulare. Su base morfologica possiamo distinguere tra l'epitelio dei tubuli distale e prossimale, monostratificato con cellule cubiche o cilindriche, con nucleo centrale tondeggiante e corti microvilli sul lato luminale, e l'epitelio del dotto collettore, generalmente cubico con nucleo centrale ovoidale e corti microvilli (7, 8, 10, 24, 31-35).

Le cellule epiteliali possono provenire da ogni porzione del tratto genito-urinario e quindi sono per definizione estremamente pleiomorfe.

La presenza di cellule squamose è un evento frequente nella valutazione microscopica delle urine e solitamente non riveste significato patologico, essendo in genere espressione di contaminazione genitale; pertanto, rappresenta il più delle volte un indicatore di non corretta raccolta del campione.

La presenza di elementi dell'urotelio (cellule transizionali) appare frequentemente correlata a patologia vescicale infiammatoria, calcolosi, manovre invasive (ad es., cateterizzazione) o patologia neoplastica.

La presenza di cellule tubulari ha sempre un significato patologico e appare correlata con un danno acuto del tubulo renale, quale si osserva in diverse patologie acute del parenchima renale (7, 8, 10, 24, 31-35).

#### Identificazione dei lipidi

Dal punto di vista morfologico esistono 4 categorie di lipidi: goccioline (isolate o in aggregati), corpi ovali grassi, cilindri lipidici e cristalli di colesterolo. L'identificazione delle prime 3 categorie è facilitata dall'impiego della luce polarizzata che mostra le tipiche "croci di Malta". Questi elementi sono associati a proteinuria marcata (7, 8, 10, 24, 31-35).

#### Identificazione dei cristalli

La presenza di cristalli nelle urine è significativa solo per quantità consistenti e per alcuni tipi di cristalli (85-90). In urine acide possono ritrovarsi cristalli di acido urico e di ossalato di calcio, ma anche precipitati di urati amorfi. Nelle urine alcaline si possono ritrovare cristalli di fosfato di calcio e precipitati di fosfati amorfi (85-92).

Alcune cristallurie vengono considerate sempre patologiche; rientrano in questo campo la presenza di cristalli di triplo fosfato (infezioni del tratto genitourinario), cistina (cistinuria), idrossiadenina, tirosina e leucina (patologie ereditarie, epatite, leucemie), colesterolo (patologie renali, sindrome nefrosica), bilirubina (ittero clinicamente rilevabile), emosiderina (emolisi severa, anemie emolitiche, reazioni trasfusionali). Va tenuto presente che anche alcuni farmaci possono dare luogo alla presenza di particolari precipitati nelle urine (85-90).

La maggior parte dei cristalli non strettamente

patologici precipita nelle urine a seguito di determinate condizioni preanalitiche (campione vecchio, conservato in frigorifero o sottoposto a sbalzi termici o a concentrazione per evaporazione), ma anche per elevata concentrazione, transitoria, di sali da fattori fisiologici o para-fisiologici, quali alimenti, disidratazione estiva, ecc.; in questo caso il loro riscontro è privo di significato clinico.

Nella valutazione di un soggetto con sospetta diatesi calcolotica, l'esame del sedimento urinario andrebbe effettuato esclusivamente su un campione di urina appena emessa, esaminato "a fresco": il riscontro di cristalli non necessariamente patologici (acido urico, ossalato di calcio, ecc.), ma presenti in grande quantità, con forme di medie e/o grosse dimensioni e/o formazione di aggregati e/o persistenti in campioni ripetuti, costituisce in questo caso indicazione a uno studio metabolico più approfondito (88-96).

#### Microorganismi

Le linee guida dell'ECLM propongono una classificazione degli agenti eziologici di infezione delle vie urinarie (IVU) in base: a) alla loro potenziale uropatogenicità; b) all'integrità dell'apparato genito-urinario; c) alle condizioni fisiologiche (ad es., gravidanza); d) alla presenza di malattie sistemiche (7). Inoltre, tale classificazione prende in considerazione la frequenza con cui i diversi microrganismi vengono isolati da campioni urinari. Si definiscono "patogeni primari" quei batteri in grado di dare frequentemente infezione in soggetti sani e senza anomalie anatomiche o funzionali dell'apparato urinario (ad es., *Escherichia coli* e *Staphylococcus saprophyticus*) e "patogeni secondari" quei batteri che pure si riscontrano in soggetti sani ma con minore frequenza. Si tratta spesso di infezioni in soggetti istituzionalizzati o con anomalie funzionali/anatomiche dell'apparato urinario o con patologia sistemica concomitante (ad es., *Enterococcus spp.*, *Proteuss spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*). Vengono poi definiti "patogeni condizionali" quei batteri che non sono in grado di dare infezione in soggetti sani, ma che rivestono significato patologico in pazienti con anomalie funzionali o anatomiche dell'apparato urinario o presentano patologia sistemica concomitante (ad es., miceti lieviformi, *Streptococcus agalactiae* o di gruppo B, stafilococchi coagulasi negativi, *Pseudomonas spp.*). Il quarto e ultimo gruppo è quello dei "batteri contaminanti" e quindi privi di significato patologico (ad es., difteroidi e lattobacilli).

Pertanto, la sola valutazione quantitativa e qualitativa della flora batterica nelle urine non è sufficiente a porre diagnosi di IVU (che è una diagnosi clinica), ma deve essere integrata con una valutazione della componente corpuscolata: leucociti, eritrociti, cellule epiteliali. La presenza di un elevato numero di cellule epiteliali squamose suggerisce una contaminazione, mentre la presenza di batteriuria senza piuria depone per una colonizzazione invece che per un' infezione (7, 9, 11, 12, 24, 31, 34, 35).

### Raccomandazione

***E' fortemente raccomandato che all'esame batteriologico per IVU sia associata la valutazione della componente corpuscolata delle urine al fine di definire, oltre al microrganismo, la reazione infiammatoria dell'ospite e le lesioni che l'infezione ha causato.***

### Contaminanti

Sono considerati contaminanti tutti quegli elementi presenti nel campione in esame che non originano dall'apparato urinario. In tal senso possiamo distinguere contaminanti provenienti:

- dal soggetto che ha prodotto il campione: di provenienza genitale (eritrociti, leucociti, cellule squamose batteri, protozoi, miceti, spermatozoi); di provenienza cutanea (peli, parassiti, talco, creme, olii, polveri aspersorie); di provenienza fecale (fibre, cellule, batteri, parassiti e loro uova); fibre tessili dagli indumenti, fibre di cellulosa da assorbenti, pannolini, carta igienica;
- dall'ambiente esterno durante la raccolta e conservazione: pollini, cellule vegetali, spore fungine, fibre;
- dal laboratorio durante la preparazione/esecuzione dell'esame: frammenti di vetro dai vetrini per l'osservazione microscopica, polvere aspersoria dai guanti, bollicine d'aria prodotte dal pipettamento del campione.

Per ridurre il rischio di contaminazione del campione dal soggetto e dall'ambiente è fondamentale attuare quanto raccomandato dalle LG: preliminarmente accurata igiene dei genitali (7, 8), raccolta da mitto intermedio con contenitore monouso e dispositivo per provetta sottovuoto (27, 29). Il raro reperto di protozoi di origine genitale o elminti (o loro uova) di origine fecale nelle urine non appare indicativo di un'infestazione urinaria, ma suggerisce una contaminazione; tuttavia, trattandosi di elementi indicativi di un'infestazione parassitaria genitale o intestinale il dato deve essere opportunamente segnalato nel referto per i relativi approfondimenti e/o trattamenti (7, 9, 11, 12, 24, 31, 34, 35). Per quanto attiene la contaminazione dal laboratorio, l'utilizzo di lettori automatizzati della frazione corpuscolata ha notevolmente ridotto la manipolazione dei campioni e quindi il rischio di contaminazioni da esposizione all'ambiente, così come l'utilizzo di dispositivi in plastica multicellette per microscopia (senza vetro) e l'uso di guanti in vinile o nitrile (senza polveri aspersorie) hanno eliminato le relative contaminazioni.

Per ridurre il rischio che eventuali contaminanti possano generare errate informazioni è necessario che il personale addetto all'analisi riconosca i quadri morfologici relativi ai contaminanti e alle loro possibili origini, segnalando con opportuni commenti l'idoneità del campione o la necessità di procedere a una nuova e più accurata raccolta in conformità alle LG (7, 8).

### Raccomandazioni

***E' fortemente raccomandato dare informazione agli utenti circa le modalità di raccolta dei campioni urinari: preliminarmente accurata igiene dei genitali, raccolta da mitto intermedio, utilizzo di contenitori dedicati e provette sottovuoto.***

***E' fortemente raccomandato che gli operatori acquisiscano le competenze per il riconoscimento dei contaminanti, il giudizio di idoneità del campione e commentino opportunamente i casi in cui ripetere l'esame con raccolta conforme alle LG.***

***E' fortemente raccomandato il giudizio di non idoneità del campione urinario con protozoi di origine genitale o elminti (o loro uova) di origine fecale. Rivestendo importanza clinica il dato deve essere opportunamente segnalato nel referto per i relativi approfondimenti e/o trattamenti.***

### Sistemi per acquisizione e archiviazione d'immagini in formato digitale

Collegati alla microscopia ottica sono disponibili sistemi di acquisizione di immagini, oggi facilmente reperibili sul mercato a costi contenuti e con possibilità di adattamento a sistemi di microscopia preesistenti. Essi permettono:

- la creazione di atlanti "in linea", in cui riversare le immagini della propria casistica;
- lo svolgimento di funzioni educative durante il tutoraggio del personale in formazione (laureandi, specializzandi, ecc.);
- la fruizione di teleconsulenze di colleghi più esperti mediante l'invio delle immagini di elementi urinari di difficile classificazione.

### Valutazione della frazione corpuscolata delle urine mediante strumentazione automatizzata

Gli analizzatori per la valutazione e quantificazione automatizzata della frazione corpuscolata delle urine sono classificabili in 3 categorie in base al principio di funzionamento: a) microscopia automatizzata; b) cattura di immagini; c) citofluorimetria.

#### *Microscopia automatizzata*

Il più diffuso analizzatore per l'analisi della frazione corpuscolata delle urine mediante automazione della microscopia ("cuvette-based microscopy", CBM) è l'analizzatore SediMAX (Menarini), a cui di recente si è aggiunto un sistema denominato Cobas 6500 (Roche Diagnostics). L'analisi richiede un volume minimo di campione di 2 mL. Un'aliquota di 200 µL viene iniettata all'interno di una particolare cuvetta che, una volta centrifugata, permette la formazione di un sottile film liquido su cui avviene la lettura con videocamera microscopica mediante illuminazione del campione tramite "led" verde a elevata potenza. Per ogni campione possono essere analizzati più campi microscopici a 400x,

visualizzati attraverso 15 fotografie. Una speciale rete neurale, supportata da un "database" contenente migliaia di immagini del sedimento, individua gli elementi in base alle loro caratteristiche morfologiche. E' possibile evidenziare gli elementi identificati tramite un acronimo che compare sull'elemento stesso; gli elementi anomali, contigui e sovrapposti modificano l'aspetto morfologico perimetrale, non vengono quindi riconosciuti e vengono esclusi dal conteggio (97-103). Recentemente è stata rilasciata una nuova versione dell'analizzatore SediMAX, che utilizza la microscopia in contrasto di fase in aggiunta al campo chiaro.

### *Cattura di immagini*

Il primo analizzatore con tecnologia a cattura di immagini è stato l'analizzatore Iris iQ200 (Beckman Coulter). A questo sistema si sono ora aggiunti altri due sistemi, FUS 100 e 200 (Dirui), che ricalcano lo stesso principio di funzionamento. Tali sistemi incorporano un microscopio automatizzato con ottica focalizzata su cella planare a flusso laminare, nella quale le particelle contenute nel campione vengono focalizzate idrodinamicamente. Il flusso laminare consente di presentare il campione all'interno del piano focale dell'obiettivo del microscopio, orientando inoltre le particelle asimmetriche in modo che si presentino in posizione ortodromica per una migliore lettura e classificazione. Una lampada stroboscopica illumina con una frequenza di 24 flash al secondo il campione che transita attraverso la cella a flusso, consentendo a una camera digitale miniaturizzata di riprendere, isolare e memorizzare un elevatissimo numero di fotogrammi per campione. A ogni singola immagine viene sottratto il valore di fondo ("background"), ripreso e digitalizzato precedentemente, esaltando in questo modo la morfologia della particella ripresa e il suo confronto con il medium liquido. Le singole immagini di una particella sono isolate all'interno di ogni fotogramma. Il "software" di riconoscimento delle particelle analizza con una rete neurale ogni elemento e lo confronta con oltre 26.000 immagini univoche; quindi, considerando le caratteristiche di dimensione, forma, contrasto e contenuto interno, lo classifica (104-109).

### *Citofluorimetria*

L'unico analizzatore automatizzato della frazione corpuscolata delle urine mediante citofluorimetria è l'analizzatore Sysmex UF, di cui il modello 1000i è l'ultima evoluzione. Sysmex UF-1000i combina la tecnologia impedenziometrica con la citofluorimetria e utilizza come fonte luminosa un laser a diodi. Il campione urinario (0,8-1,2 mL) viene aspirato nel sistema, diluito con un tampone e sottoposto a un processo di colorazione con due fluorocromi polimetinici di recente concezione, in grado di legarsi agli acidi nucleici. Dopo un processo di focalizzazione idrodinamica, il campione viene fatto passare attraverso due celle a flusso, una dedicata all'analisi dei microorganismi e l'altra dedicata all'analisi di tutti gli altri elementi corpuscolati. Il passaggio delle

single particelle viene riconosciuto con metodica impedenziometrica, che ne permette l'accurata quantificazione e fornisce indicazioni circa le loro dimensioni. Inoltre, il passaggio delle particelle sospese nel flusso laminare devia il fascio di luce laser e genera un segnale di diffrazione che viene letto sia da rilevatori per lo "scatter" frontali ("forward", 45°) e laterali ("side", 90°) che da un rilevatore di fluorescenza. I parametri misurati vengono convertiti in segnali elettrici che, analizzati attraverso algoritmi matematici, permettono l'identificazione dei diversi elementi presenti nell'urina. Per caratterizzare il campione, viene inoltre misurata la conduttività della soluzione, che è indice della concentrazione di elettroliti nelle urine. Il canale dei batteri funziona analogamente a quello degli altri elementi su specifiche orientate al conteggio e differenziazione dei microorganismi presenti nelle urine (110-115).

Tutti gli analizzatori automatici per la valutazione qualitativa e quantitativa della frazione corpuscolata delle urine hanno in comune alcuni vantaggi e presentano alcune problematiche. Esaminano urina nativa, eliminando così la centrifugazione, l'aspirazione del sovrantante, la risospensione del fondello e l'allestimento del preparato microscopico. Tali passaggi, presenti nella microscopia tradizionale, non solo introducono una notevole variabilità analitica, per la sostanziale assenza di standardizzazione, ma costituiscono dei colli di bottiglia organizzativi, con un ritardo nell'analisi della frazione corpuscolata che può modificare gli esiti analitici a scapito dell'accuratezza. Questo è tanto più rilevante nei laboratori con elevati carichi di lavoro. La quantificazione degli elementi corpuscolati effettuata con analizzatori automatici è assai più ripetibile di quella effettuata da un osservatore umano al microscopio. Inoltre, vengono forniti risultati quantitativi espressi in numero di particelle per unità di volume, evitando espressioni descrittive e soggettive quali "rari", "alcuni", "numerosi", ecc. La possibilità di quantificare gli elementi per unità di volume esaminato permette di standardizzare l'analisi e costituisce un indicatore oggettivo per la valutazione clinica.

La capacità degli analizzatori di identificare correttamente gli elementi corpuscolati delle urine appare soddisfacente per quanto attiene gli eritrociti, i leucociti, le cellule epiteliali squamose, i batteri e i miceti. Per contro l'identificazione dei cilindri appare meno soddisfacente, con possibilità di falsi positivi dovuti alla presenza di muco, aggregati cellulari, ammassi di cristalli; in questo caso sarà dirimente la valutazione morfologica. Al riguardo va ricordato che la presenza di muco testimonia nella gran parte dei casi una raccolta del campione scorretta, eseguita da mito iniziale e non intermedio (106-113).

La necessità di definire soglie di allarme, griglie per la revisione dei risultati, allarmi per l'anomalia del dato e/o del campione ha permesso di orientare le risorse e le competenze professionali su quei casi che beneficiano di opportuni approfondimenti. Paradossalmente proprio

l'introduzione degli analizzatori automatizzati per il conteggio differenziale della frazione corpuscolata sta sempre più valorizzando la competenza morfologica degli operatori, dando un notevole valore aggiunto all'ECMU. Inoltre, questi analizzatori permettono un agevole CQI, consentendo di valutare i principali parametri corpuscolati e di operare sulla scorta di elementi oggettivi. Tali analizzatori, al momento, non sono in grado di riconoscere lipidi, protozoi e numerosi cristalli, segnalando generici allarmi, che devono essere colti in fase di revisione, così come non distinguono le cellule tubulari e le transizionali, limitandosi genericamente a segnalare piccole cellule rotonde ("small round cells") e cellule di grandi dimensioni ("large cells").

In conclusione, gli analizzatori automatici per lo studio della frazione corpuscolata delle urine sono uno strumento indispensabile per garantire elevati standard analitici nei laboratori analisi, rimpiazzando l'esame morfologico tradizionale nei casi di semplice definizione, quantificando gli elementi corpuscolati con accuratezza paragonabile a quella di un microscopista esperto, mediante adeguata tecnologia, metodologia e con carichi di lavoro ridotti e permettendo una selezione efficace dei casi per i quali si rende necessario un approfondimento con la microscopia tradizionale o con altri metodi d'indagine. Sono quindi in grado di focalizzare le risorse da dedicare alla microscopia sui casi clinici meritevoli di approfondimento, contribuendo quindi a migliorare le prestazioni sia dei casi semplici che complessi sotto il profilo diagnostico-clinico (97-115).

## Raccomandazioni

### **Sono fortemente raccomandati:**

- ***l'impiego del microscopio a contrasto di fase per la valutazione del sedimento urinario; l'osservazione microscopica delle urine in campo chiaro può essere un utile complemento visivo, ad es., con elementi pigmentati;***
- ***l'impiego del polarizzatore sia per la valutazione dei cristalli sia per il riconoscimento dei lipidi urinari. Tale dotazione fa parte del corredo necessario al laboratorio e deve essere acquisita al pari dei reagenti analitici;***
- ***l'implementazione dei sistemi di acquisizione delle immagini microscopiche, sia per l'archiviazione di immagini significative a scopo didattico e documentale sia per applicazioni di teleconsulenza;***
- ***l'utilizzo degli analizzatori automatizzati della frazione corpuscolata nei laboratori con un carico di lavoro >40 ECMU giornalieri, per l'impatto positivo sulla standardizzazione dei processi analitici. E' comunque raccomandato il loro impiego anche in realtà con carichi di lavoro inferiori;***
- ***la verifica microscopica in tutti quei casi in cui gli analizzatori automatizzati della frazione***

***corpuscolata diano luogo ad allarmi riferiti a elementi anomali, interpretazioni dubbie, necessità di approfondimento;***

- ***la valutazione della tipologia e delle caratteristiche degli analizzatori da utilizzare da parte del laboratorio in merito alla compatibilità con le necessità operative, alla casistica esaminata e alle competenze degli operatori in modo da valorizzare i punti di forza e minimizzare i limiti strumentali.***

## CQI E VEQ

Negli ultimi anni l'evoluzione del ruolo della Medicina di Laboratorio nella gestione del paziente e l'attenzione al contenimento dei costi hanno imposto al laboratorio una valutazione del servizio fornito basata su criteri di efficacia. Tecnologie e metodi sempre più innovativi e accurati, assieme alla formazione del personale, a un adeguato ambiente di lavoro, a processi ben pianificati, all'erogazione di informazioni comprensibili per il giusto paziente al momento giusto, sono elementi fondamentali per garantire la qualità. In questo contesto è diventato cogente il superamento delle tecniche di controllo della qualità dalla fase puramente analitica e la promozione e sviluppo di sistemi di assicurazione della qualità del "total testing process" (TTP). La verifica di qualità è diventata pertanto uno degli elementi connotanti la pratica di laboratorio. Infatti, contrariamente ad altre branche della medicina, la messa in discussione del modo di operare, dei risultati ottenuti e perfino delle competenze e capacità diagnostiche degli operatori è costante e rituale.

In alcune Regioni, la VEQ assume valore mandatorio per il mantenimento dell'autorizzazione all'esercizio professionale; la certificazione ISO (9001/2015 e 15189/2012) e i principali standard per l'accreditamento prescrivono l'adesione a programmi per CQI e VEQ. Nella fase analitica, consideriamo il CQI, l'allineamento, i traguardi analitici; nella fase post-analitica la VEQ sia chimica che morfologica (116-125).

Il CQI risponde all'esigenza di verificare le prestazioni analitiche di un metodo/sistema analitico in modo tale da fornire allarmi nel caso in cui quest'ultimo non stia più lavorando entro limiti di errore predefiniti. Il CQI va eseguito a ogni seduta di lavoro per validare la serie analitica secondo regole ben definite da Westgard (116-120). Può e deve essere ripetuto più volte laddove le sedute analitiche siano protratte a lungo. E' opportuno che la matrice dei campioni di controllo sia la stessa dei campioni analizzati, ma laddove questo non sia possibile, dovrà avere caratteristiche analoghe. E' raccomandato che il campione di controllo sia di parte terza, prodotto cioè da un fabbricante estraneo alla ragione sociale del produttore della strumentazione e dei reagenti (121).

## Allineamento

Quando in un laboratorio sono presenti più strumenti

per l'ECMU è necessario che questi siano allineati ovvero che i risultati ottenuti dai diversi strumenti sullo stesso campione non varino oltre quanto accade sul singolo strumento. Per valutare quanto le variazioni siano casuali e indipendenti dallo strumento utilizzato si può utilizzare il metodo statistico di Bland-Altman (122). E' importante che il campione utilizzato per la verifica dell'allineamento sia un campione urinario con una concentrazione intermedia di soluti e di elementi corpuscolati.

### Traguardi analitici

Per traguardo analitico (o specifica di qualità) di un esame si intende la massima variazione accettabile nelle prestazioni di un metodo che non comprometta l'interpretazione clinica del dato. Per definire i traguardi analitici di imprecisione (CV), inesattezza ("bias") ed errore totale generalmente si fa riferimento ai concetti di variabilità biologica utilizzando le formule consigliate da Fraser con le quali la prestazione analitica viene schematicamente distinta in ottimale, desiderabile, soddisfacente, non soddisfacente (126). Nel caso dell'ECMU, tali traguardi non risultano in modo univoco.

La VEQ risponde all'esigenza di confrontare le prestazioni del laboratorio e del metodo utilizzato con quelle di tutti gli altri partecipanti. Il fine ultimo è quello di verificare l'esattezza della misura analitica rispetto a un valore vero (ottenuto con metodi di riferimento) o di consenso (risultante cioè da quello determinato da tutti gli utilizzatori con lo stesso metodo o con metodi diversi). Sono disponibili programmi di VEQ per la quasi totalità degli analiti del profilo biochimico, sia in fase liquida che su "dipstick".

La scarsa diffusione dei programmi di VEQ per l'esame chimico-fisico delle urine mediante striscia reattiva è dovuta al fatto che, mentre la riferibilità e la descrizione dell'incertezza di misura sono ben stabilite in chimica liquida, questi concetti sono ancora poco applicabili per le determinazioni di tipo semi-quantitativo o su scala ordinale utilizzate per l'esame delle urine. Molti schemi per l'analisi mediante "dipstick" prendono in considerazione risultati solo di tipo qualitativo, raggruppandoli in una scala lineare (ad es., assente, tracce, positivo) ed esistono veramente pochi programmi di VEQ che utilizzano i risultati numerici corrispondenti (127). Tra quest'ultimi citiamo il programma di VEQ gestito dal Centro di Ricerca Biomedica sin dal 2000, che vede una partecipazione di ~300 laboratori, nel quale l'elaborazione viene effettuata per sistema diagnostico (striscia reattiva) confrontando il risultato del laboratorio con quello più frequente (moda) fornito dai partecipanti che utilizzano la stessa striscia. Questo tipo di VEQ, pur con i limiti intrinseci derivanti dal dover necessariamente raggruppare in categorie arbitrarie i risultati delle diverse strisce presenti sul mercato, può essere un valido aiuto per tenere sotto controllo l'esame chimico-fisico delle urine. Consente infatti di valutare come un laboratorio si colloca nel contesto generale e favorisce la riduzione dell'errore analitico allertando il

referente quando un valore fornito dal suo laboratorio risulta appartenere a una classe di valori lontana da quella in cui cadono tutti gli altri risultati. Inoltre, il programma di VEQ può contribuire alla standardizzazione della refertazione di alcuni parametri, come nel caso dell'emoglobina (mg/L invece di Ery/ $\mu$ L) e a diffondere l'utilità della determinazione di importanti parametri, quali la creatinina e il PCR/ACR, che in Italia, al contrario di altri Paesi, sono ancora scarsamente utilizzati.

I programmi di VEQ per l'analisi della frazione corpuscolata delle urine sono ancora meno sviluppati rispetto ai programmi di VEQ per l'analisi chimica, quantitativa o semiquantitativa, delle urine poiché i risultati di tipo qualitativo per l'analisi morfologica in generale non possono essere suddivisi in "rank" e il giudizio su ogni singola risposta richiede la consulenza di un professionista esperto nella disciplina (128-133). In Italia è attiva una VEQ per il sedimento urinario, basata sull'interpretazione di immagini degli elementi corpuscolati, per alcuni dei quali è richiesta una correlazione clinica; nel programma annuale è prevista anche la valutazione di casi clinici. Gli esercizi che propongono casi clinici hanno lo scopo di approfondire una specifica patologia, mediante il confronto tra i risultati dell'esame chimico-fisico e quelli ottenuti dall'esame morfologico e la ricerca delle motivazioni di eventuali discrepanze tra i due tipi di informazione (ad es., il ritrovamento di un basso numero di eritrociti e leucociti in contrasto con il risultato di 10 mg/L di emoglobina e 250 leucociti/ $\mu$ L di esterasi leucocitaria, dovuto alla lisi delle cellule causata da una bassa densità) e l'individuazione del commento più appropriato da inserire nel referto. L'aspetto saliente è che l'ente organizzatore si deve avvalere di uno o più consulenti molto esperti della patologia inerente i casi clinici che vengono trattati e disponibili a fornire assistenza al riguardo. Nel report del programma di VEQ oltre alla valutazione delle risposte del laboratorio con il relativo punteggio, vengono forniti commenti esaustivi sul significato clinico di ogni elemento proposto. L'analisi delle risposte, raccolte in più di 15 anni di esperienza su questo tipo di VEQ, ne ha mostrato la grande utilità anche in termini educazionali (130-133). In questo tipo di schemi di VEQ, infatti, per la refertazione dei risultati è richiesta una valutazione soggettiva da parte del professionista di laboratorio; questi esercizi sono pertanto utili al laboratorio per evidenziare eventuali necessità di formazione/aggiornamento e rappresentano uno stimolo per il personale preposto ad approfondire le conoscenze su una determinata patologia. Insieme ai corsi teorico-pratici sull'argomento, questo programma di VEQ costituisce quindi un supporto indispensabile alla formazione dei partecipanti e ha quindi un suo spazio e un suo ruolo nell'educazione continua nella Medicina di Laboratorio italiana (130-133).

A tutt'oggi non è ancora disponibile una VEQ per l'analisi automatizzata della frazione corpuscolata: vi sono infatti difficoltà ad approntare un materiale tale da garantire la stabilità e l'integrità morfologica degli

elementi in esame e che risulti idoneo all'analisi con tutti i sistemi disponibili sul mercato che utilizzano tecnologie molto diverse tra loro.

#### Raccomandazioni

***E' fortemente raccomandato che:***

- ***il laboratorio esegua il CQI, l'allineamento delle strumentazioni e la VEQ secondo programmi annuali che tengano conto delle strumentazioni, delle procedure e del personale addetto alla ECMU sia per la componente chimica che morfologica;***
- ***venga eseguito un "proficiency test" a cadenza periodica (3/4 volte l'anno) per valutare la competenza del personale in ambito morfologico e interpretativo.***

#### LIVELLI DIAGNOSTICI DELL'ECMU

Per le sue caratteristiche e soprattutto per la facilità di acquisire il campione l'ECMU è uno degli esami più eseguiti anche al di fuori dell'ambito specialistico del laboratorio (7, 8, 12). Naturalmente, in relazione alle competenze e alle attrezzature utilizzate ne deriveranno accertamenti che differiscono anche sostanzialmente per accuratezza, sensibilità e specificità, con conseguenti marcate differenze circa la percentuale di veri positivi, veri negativi, falsi positivi e falsi negativi, che si traducono in una diversa affidabilità e penetranza diagnostica dell'esame (7, 8, 12). Occorre quindi differenziare in diversi livelli l'ECMU per non correre il rischio di attuare un'inappropriatezza analitica in relazione alla tipologia di accertamento, di paziente e di condizioni operative (7, 8, 12).

#### Raccomandazione

***E' fortemente raccomandato che il livello diagnostico sia in stretta relazione con la tipologia di pazienti valutata, permettendo una diagnosi efficace delle patologie riscontrabili con maggiore frequenza e un corretto indirizzo di quelle più rare o complesse a un opportuno approfondimento da effettuarsi presso strutture di livello più elevato per disponibilità di attrezzature, di competenze specialistiche e di procedure adottate.***

#### Livello I

E' l'approccio base, di tipo generalista e non specialistico; utilizza una striscia reattiva per il solo esame chimico ed è solitamente usato per confermare o smentire un sospetto diagnostico che per motivi di opportunità/necessità si ritiene di non poter differire. Un classico esempio si ha nell'assistenza domiciliare, nell'ambulatorio medico/pediatrico territoriale e in tutte quelle situazioni dove il laboratorio non risulti accessibile sulla scorta di una decisione clinica non rinviabile.

E' utilizzabile in un ambito non specialistico, dove si

accetta una minore affidabilità dell'esame sulla base dell'impossibilità ad accedere a prestazioni diverse o della necessità di assumere decisioni cliniche non differibili.

Questa minor affidabilità deriva, oltre che dal processo non sufficientemente standardizzato, anche dai minori requisiti di competenza dell'operatore. Infatti, l'esame può essere eseguito dallo stesso paziente (autodiagnosi) o da un sanitario (infermiere, medico, farmacista) senza specifiche competenze e/o pratica di laboratorio.

Non risultano evidenze circa l'opportunità di questa pratica in ospedali ove siano attivi laboratori h24; per questo, essa è sconsigliata in quanto non standardizzata, quasi sempre senza la necessaria verifica di qualità, quasi mai documentata. Può trovare applicazione nei POC di cui il laboratorio garantisca la gestione secondo regole condivise e documentate con apposite procedure e programmi di controllo di qualità.

#### Raccomandazioni

***E' fortemente raccomandata la lettura strumentale della striscia reattiva per eliminare la soggettività nella valutazione della reazione cromatica e la stampa o memorizzazione automatica dei risultati.***

***Non è raccomandabile questo livello al letto del paziente nei reparti degli Ospedali dove risulti attivo un servizio di Medicina di Laboratorio h24.***

***E' raccomandato che la valenza analitica di questo livello sia solo di supporto al sospetto clinico. Laddove l'esito risulti discordante è opportuno che non abbia valore definitivo, ma che indirizzi a ulteriori indagini.***

***E' raccomandata la presenza delle tabelle degli interferenti con i test utilizzati nella striscia reattiva per facilitare la comprensione dei risultati, soprattutto quelli inattesi, ed eliminare incertezze nella valutazione del dato.***

***E' raccomandata l'archiviazione dei risultati degli esami eseguiti; per poterli rivalutare alla luce di modificate condizioni cliniche, per consentire il confronto di esiti successivi, per poter documentare l'attività svolta.***

#### Livello II

E' l'approccio più semplice all'attività specialistica di laboratorio: per le tecnologie utilizzate, per la standardizzazione del processo, per le competenze e la pratica degli operatori (7, 8, 12). E' raccomandato che venga espresso il giudizio di idoneità del campione circa la corretta esecuzione della fase preanalitica relativamente a preparazione del paziente, raccolta, volume, identificazione, tempo e temperatura di conservazione e sicurezza biologica per gli operatori (7-12, 27, 29, 134-140).

Durante la fase analitica è raccomandata la verifica dell'assenza di contaminanti fecali (fibre vegetali o

carnee) e genitali (cellule vaginali, spermatozoi); questi elementi sono legati a una contaminazione non evidente a occhio nudo ma rilevata da reperti nella componente corpuscolata (7-12, 27, 29, 134-140). A questo proposito è opportuno raccomandare che nella refertazione si evitino sia le omissioni circa la contaminazione, che potrebbero dar luogo a inopportuni allarmi per una patologia urinaria in realtà inesistente (come nel caso di positività per proteine, leucociti, emazie e batteri presenti nel materiale contaminante), sia le espressioni legate alla natura del contaminante stesso (ad es., spermatozoi), limitandosi a inserire un commento del tipo "campione non idoneo per evidente contaminazione, si consiglia di ripetere la raccolta attenendosi alle modalità prescritte dal laboratorio". Nel caso di parassiti intestinali patogeni, questi vanno segnalati insieme alla contaminazione perché legati a un'evidente parassitosi di cui il curante deve essere messo a conoscenza (7-12, 27, 29).

Il criterio di idoneità analitica del campione vale anche per tutti i livelli superiori mentre non risulta praticabile per il livello I con sola striscia reattiva (7-12, 27, 29, 112-114, 127-134).

All'esame chimico deve essere sempre associata la valutazione della morfologia della frazione corpuscolata (o su analizzatori automatizzati o in microscopia standardizzata). Il laboratorio deve risolvere le possibili discordanze tra parametri chimici e corrispettivi morfologici (7-12, 27, 29). Questo livello deve essere praticato anche nella diagnostica d'urgenza in modo da poter rispondere in modo adeguato alle esigenze del paziente, assicurando nelle 24 ore i necessari requisiti di standardizzazione in accordo con il sistema di gestione della qualità adottato e con i clinici richiedenti. Naturalmente, questa raccomandazione deve tenere in debito conto il contesto e le necessità cliniche oltre che la disponibilità strumentale e di personale competente.

Deve essere attuato un adeguato programma per il controllo e la verifica della qualità analitica (7-12).

In conformità con i documenti dei maggiori organismi per la promozione della qualità e della standardizzazione devono essere valutati i seguenti parametri (7-12, 27, 29):

- parametri irrinunciabili e di indubbia utilità: proteine/albumina, creatinina, densità relativa/conducibilità, emoglobina, pH;
- parametri utili e di verifica per il laboratorio: nitriti, esterasi, ascorbato.

Tutti i parametri chimici, con l'eccezione di pH e nitriti, devono essere espressi in concentrazione.

Gli altri parametri, ad eccezione dei chetoni in ambito pediatrico, sono da considerare poco utili se non in casi selezionati e pertanto, in caso di necessità di valutazioni metaboliche, i relativi parametri dovrebbero essere vantaggiosamente sostituiti da dosaggi diversi e più efficaci oppure, in caso di specifiche e motivate richieste, dosati con metodi più accurati.

Relativamente alla componente corpuscolata è obbligatorio esprimere in termini di concentrazione: n°/μL o n°/campo microscopico HPF, i seguenti

parametri irrinunciabili e di indubbia utilità: emazie, leucociti, cellule epiteliali, cilindri. L'espressione dei parametri morfologici in termini di concentrazione impone la definizione di valori di riferimento. Trattandosi di indicatori di lesione, devono esprimere il solo limite superiore di riferimento (URL) riferito al 95° percentile ed è opportuno che ciascun laboratorio calcoli i propri sulla base della metodologia utilizzata e della popolazione esaminata (135, 136).

Parametri morfologici utili clinicamente sono batteri, miceti e identificazione dei cristalli (acido urico, urato e fosfati amorfi, ossalato di calcio, triplo fosfato, cistina, farmaci, ecc.).

Rispetto all'esame eseguito al livello I è possibile acquisire una quota significativa (tra 12% e 30%) di informazioni aggiuntive relative alla frazione corpuscolata, che il solo esame su striscia reattiva non è in grado di fornire (ad es., cilindri, miceti, cellule tubulari, contaminanti, ecc.) (7-9, 24, 31).

Le competenze professionali sono quelle specialistiche: medico specialista (discipline di laboratorio o nefrologia nel caso di aree diagnostiche nella unità di nefrologia), biologo specialista, tecnico sanitario di laboratorio biomedico. Le abilità devono prevedere il riconoscimento morfologico degli elementi di più frequente riscontro in termini tali da non risultare equivoci e la segnalazione dell'opportunità di un approfondimento morfologico, microbiologico, biochimico (Tabella 7).

Per garantire la necessaria standardizzazione del processo è fortemente raccomandato l'uso degli analizzatori automatizzati sia per l'analisi chimica che per l'esame della frazione corpuscolata, interfacciati al sistema informatico del laboratorio (LIS). Solo per carichi di lavoro di ridotta entità (<40 campioni/die) è accettabile eseguire l'esame chimico con sistemi semiautomatizzati, ma è raccomandabile che siano interfacciati con il LIS. Per carichi di media-alta entità (>100 campioni/die) è fortemente raccomandata l'analisi degli elementi corpuscolati con sistemi automatizzati in grado di eseguire il conteggio differenziale, con approfondimenti

#### Tabella 7

##### *Competenze morfologiche indispensabili per il II livello diagnostico*

Corretta identificazione di leucociti

Corretta identificazione degli eritrociti

Corretta identificazione delle cellule di sfaldamento con differenziazione tra cellule squamose e non squamose

Corretta identificazione dei cilindri e differenziazione tra cilindri jalinici e non jalinici

Identificazione di batteri, lieviti, protozoi, uova di parassiti

Identificazione dei cristalli più comuni e/o caratteristici: urati, ossalati, fosfato, fosfato triplo, cistina

Identificazione dei principali contaminanti: nemaspermi, peli, artefatti, fibre, amido, materiale fecale

morfologici in microscopia a contrasto di fase e luce polarizzata.

L'utilizzo esclusivo dell'esame microscopico della frazione corpuscolata è raccomandato solo per numeri di ridotta entità, nei casi in cui il tempo impiegato per l'allestimento dei preparati non pregiudichi la conservazione e l'integrità del campione (110, 140).

Per carichi di lavoro medio-alti sono raccomandati "software" esperti in grado di rendere agevole il rilascio veloce dei risultati non patologici e/o congruenti, la gestione delle possibili discordanze tra l'esame chimico e morfologico, l'inserimento di commenti preordinati per le situazioni di frequente riscontro, la selezione dei casi per i quali sia richiesto un più elevato livello per l'approfondimento specialistico laddove possibile e/o necessario (110, 140).

La valenza analitica di questo livello si estrinseca nella possibilità di diagnosticare con un buon grado di efficacia patologie ben espresse a livello urinario. Per patologie a elevata complessità, con un'espressione modesta e/o incostante di indicatori di lesione e/o di funzione e in presenza di specifici quesiti/sospetti clinici, è raccomandato attuare un livello diagnostico superiore.

#### **Raccomandazioni**

##### ***E' fortemente raccomandato:***

- ***il giudizio di idoneità del campione;***
- ***l'associazione tra l'esame chimico e la valutazione della morfologia della frazione corpuscolata;***
- ***la risoluzione da parte del laboratorio delle possibili discordanze tra parametri chimici e corrispettivi morfologici;***
- ***l'esecuzione di quei parametri fisico-chimici di utilità sia diagnostica che per la pratica di laboratorio;***
- ***che emazie, leucociti, cellule epiteliali, cilindri siano espressi in concentrazione;***
- ***l'utilizzo di analizzatori automatici sia per la componente chimica che corpuscolata con carichi di lavoro di media/alta entità;***
- ***l'utilizzo di "software" esperti per il trattamento dei dati e il collegamento delle strumentazioni al LIS;***
- ***che laddove la complessità del caso superi le possibilità diagnostiche di questo livello siano prescritti approfondimenti di livello superiore;***
- ***che il laboratorio esegua il CQI, l'allineamento delle strumentazioni e la VEQ, secondo programmi annuali che tengano conto delle strumentazioni, delle procedure e del personale addetto all'ECMU, sia per la componente chimica che morfologica;***
- ***che venga eseguito un "proficiency test" a cadenza periodica (3/4 volte l'anno) per valutare la competenza del personale in ambito morfologico e interpretativo.***

#### **Livello III**

E' l'approccio specialistico avanzato di laboratorio: per le tecnologie utilizzate, per la standardizzazione del processo, per le competenze e la pratica degli operatori esprime il più alto livello riferibile all'ECMU. Esso prevede (7-9, 24, 31-35):

- un impegno tecnologico e professionale rilevante;
- la standardizzazione dell'intero processo, l'approfondimento microscopico su casi selezionati con griglie e/o criteri definiti sulla base della casistica esaminata in ogni laboratorio;
- l'espressione di commenti riferiti alla valutazione analitica e alla possibile interpretazione in chiave clinica.

Si raccomanda che l'esame chimico venga eseguito su analizzatori automatizzati con elevato controllo del processo e della qualità analitica e che l'esame della frazione corpuscolata venga eseguito su urina nativa da un analizzatore automatizzato, con produzione di allarmi e segnalazioni che permettano la selezione di casi per gli approfondimenti necessari su base analitica e su base clinica, a cui far seguire la produzione di un commento interpretativo. Sotto il profilo analitico è raccomandato che la misura dell'albuminuria sia accurata e rapportata alla creatinina urinaria, per la crescente importanza di questo parametro nella valutazione del danno e della funzione renale (7-9, 24, 31-35).

Per quanto attiene l'idoneità del campione e i parametri chimici e morfologici da valutare, vale quanto previsto per il livello II, con l'integrazione per quanto riguarda le dotazioni in relazione agli approfondimenti da effettuare nelle seguenti situazioni patologiche:

- proteinurie: determinazione quantitativa di albumina e proteine specifiche;
- cristallurie: microscopio a contrasto di fase e con filtro polarizzato, pH-metro;
- ematurie: camere di conta specifiche (Fuchs Rosenthal);
- emoglobinuria: riconoscimento dell'emoglobina con metodo immunologico; la sola reattività alla pseudoperossidasi non è probatoria di emoglobinuria in assenza di ematuria in quanto la reattività pseudoperossidasi non risulta dirimente tra emoglobinuria e mioglobinuria;
- citologia: colorazioni appropriate per migliorare la definizione di immagini riferite a elementi o cellule di dubbia o complessa interpretazione;
- sistemi di registrazione e archiviazione delle immagini.

Agli operatori già previsti nel livello II vengono richieste competenze professionali che devono prevedere, oltre al riconoscimento morfologico degli elementi comunemente riscontrabili nella pratica clinica, la segnalazione della presenza di elementi patologici di non frequente riscontro e la possibilità di effettuare o proporre nella stessa sede l'approfondimento morfologico/biochimico necessario. In particolare, per il livello III morfologico è richiesta la capacità di effettuare una valutazione del quadro microscopico relazionandolo

a un quadro sindromico laddove richiesto dal clinico o dalla gravità del caso (Tabella 8) (7-9, 24, 31-35).

La valenza analitica di questo livello si esprime nella possibilità di valutare con un elevato grado di efficacia patologie renali e urologiche, anche a elevata complessità e con una bassa concentrazione di indicatori di lesione e/o di funzione a livello urinario. E' l'accertamento indicato per pazienti nefrologici, urologici o internistici con un coinvolgimento renale. Per la definizione di particolari quesiti/sospetti clinici possono essere necessari specifici accertamenti ed è quindi raccomandato attuare un livello diagnostico superiore.

#### Raccomandazioni

##### **Sono fortemente raccomandati:**

- **una dotazione strumentale che permetta la determinazione quantitativa di albumina urinaria con sensibilità analitica rapportata alle crescenti esigenze cliniche;**
- **una dotazione microscopica con contrasto di fase, luce polarizzata, luce trasmessa, archiviazione di immagini;**
- **l'utilizzo di camere di conta microscopica per le necessarie verifiche e/o approfondimenti;**
- **che le competenze professionali siano attestate da un percorso formativo-esperienziale, da adeguato aggiornamento e da programmi di verifica della competenza gestiti da enti terzi;**
- **che il laboratorio esegua il CQI, l'allineamento delle strumentazioni, la VEQ dell'ECMU secondo programmi annuali definiti;**
- **che venga eseguito un "proficiency test" a cadenza periodica (3/4 volte l'anno) per valutare la competenza del personale in ambito morfologico e interpretativo.**

##### **Sono raccomandati:**

- **l'uso di un pHmetro per le tutte le misurazioni rilevanti analiticamente o clinicamente;**

#### Tabella 8

*Competenze morfologiche indispensabili per il III livello diagnostico*

Identificazione dei leucociti: differenziazione tra granulociti, linfociti, macrofagi

Identificazione degli eritrociti, connotando l'eventuale dismorfismo

Identificazione delle cellule di sfaldamento con differenziazione, oltre che tra cellule squamose e non squamose, di cellule transizionali (superficiali e profonde) e cellule tubulari

Identificazione delle varie tipologie di cilindri: jalini, granulosi, leucocitari, eritrocitari, epiteliali, cerei, lipidici, pigmentati (bilirubinici, mioglobinici, emoglobinici)

Morfologia dei batteri presenti: cocchi, bastoncelli, ecc.; morfologia dei miceti: lieviti, ife, ecc.; identificazione di protozoi, parassiti e loro uova

Identificazione dei cristalli seguenti: ossalati, urati, fosfato, triplo fosfato, colesterolo, farmaci, cistina, leucina

Identificazione dei principali contaminanti endogeni (nemaspermi, materiale fecale) ed esogeni (peli, fibre vegetali, tessili, pollini, amido, polveri aspersorie, materiale plastico, vetroso, cartaceo)

Corretta identificazione dei lipidi: gocce, corpi ovali grassi

Identificazione presuntiva di cellule patologiche, ad es., cellule di origine vaginale, cellule neoplastiche, enterociti, ecc.

- ***l'uso di reattivi per rilevare immunologicamente l'emoglobinuria in assenza di ematuria.***

#### Livello IV

Il livello IV esprime in modo efficace l'interazione tra medicina clinica e di laboratorio finalizzata a uno specifico quesito diagnostico. In questo caso non siamo più di fronte a un esame schematicamente preordinato, ma a un accertamento modulato sulle esigenze diagnostiche del paziente e in base a una forte interazione con il clinico ed, eventualmente, anche con il paziente. E' infatti un'indagine diagnostica che procede con l'anamnesi, la raccolta del campione con le modalità, l'esame del campione teso a valorizzare i caratteri patognomonici e gli elementi di diagnostica differenziale su base microscopica e/o strumentale, per concludersi con un referto interpretativo e un'indicazione clinica (7-9, 24, 31-35).

Le competenze morfologiche indispensabili per il livello IV sono le stesse indicate per il livello III, ma integrate dall'utilizzo di specifici strumenti atti al riconoscimento non solo presuntivo degli elementi del sedimento e alla definizione/esclusione di una patologia in atto. In particolare, si richiedono:

- utilizzo dell'osmometro per la più compiuta valutazione della capacità di concentrazione renale;
- valutazione del pH urinario con pHmetro e utilizzo del polarizzatore per la valutazione dei cristalli e dei lipidi;
- differenziazione morfologica degli eritrociti, con espressione in percentuale delle popolazioni isomorfa e disomorfa e degli acantociti;
- allestimento di colorazioni specifiche, per la differenziazione di leucociti e macrofagi, per la definizione della componente citologica o microbiologica o parassitaria;
- documentazione e archiviazione di immagini;
- dosaggi biochimici e/o immunochimici specifici;
- coinvolgimento di altri specialisti per la gestione "in

team” di casi particolarmente complessi.

#### *Esempi di quesiti per il livello IV*

*Origine dell'ematuria.* ECMU; valutazione immagini/grafici/scatter/parametri strumentali; espressione in percentuale delle due popolazioni eritrocitarie isomorfiche e dismorfiche e, nell'ambito di queste ultime, il riconoscimento degli acantociti, che correlano con la presenza di ematuria di origine glomerulare; ricerca di altri elementi caratterizzanti (cilindri ematici, altre tipologie di cilindri, cellule tubulari, cellule dell'epitelio transizionale, cristalli, ecc.); eventuale determinazione di ACR e/o PCR in caso di ematuria glomerulare, eventuale determinazione dell' $\alpha_2$ -macroglobulina per confermare un'ematuria post-glomerulare, eventuale classificazione dell'ematuria (glomerulare/non glomerulare/mista); emissione di un referto commentato.

*Origine della proteinuria [prerenale, renale (glomerulare/tubulare/mista), post-renale].* ECMU con "dipstick", diagnostico solo per albuminuria, in minima parte per alcune proteine tubulari, mai per la proteinuria di Bence Jones. ECMU con misurazione della PCR: se <200 mg/g si conclude per proteinuria nei limiti fisiologici; se PCR >200 mg/g caratterizzare la proteinuria mediante elettroforesi delle urine e determinazione di proteine specifiche a cascata: albumina,  $\alpha_1$ -microglobulina, transferrina, IgG, catene leggere  $\kappa$  e  $\lambda$ . I risultati sono metodo dipendenti ed è opportuno che ciascun laboratorio rapporti i valori di riferimento al metodo utilizzato.

*Sindrome nefritica e/o nefrosica.* ECMU; valutazione immagini/grafici/scatter/parametri strumentali; esame microscopico del sedimento con ricerca di tutti gli elementi caratterizzanti (emazie, leucociti, cilindri, cellule tubulari, lipidi, ecc.); determinazione PCR, ACR; emissione di un referto commentato.

*IVU di difficile inquadramento e/o trattamento.* ECMU; valutazione immagini/grafici/scatter/parametri strumentali, con particolare riguardo ai valori di leucociti e batteri; esame microscopico con ricerca degli elementi significativi utili a confermare e connotare la presenza di IVU e a escludere una contaminazione (emazie, cilindri leucocitari e batterici, macrofagi, cellule epiteliali squamose, muco, ecc.); emissione di un referto commentato.

*Sospetta nefrotossicità da farmaci.* ECMU; valutazione immagini/grafici/scatter/parametri strumentali; esame microscopico del sedimento con ricerca di tutti gli elementi caratterizzanti (emazie, leucociti, cilindri, cellule tubulari, cristalli, ecc.); determinazione ACR e PCR; determinazione proteine di origine tubulare; elettroforesi delle proteine urinarie; emissione di un referto commentato.

*Insufficienza renale acuta.* ECMU; valutazione immagini/grafici/scatter/parametri strumentali; esame microscopico del sedimento con ricerca di tutti gli elementi caratterizzanti (emazie, leucociti, cilindri, cellule tubulari, ecc.); osmolarità urinaria; concentrazione sodica urinaria; frazione di escrezione del sodio;

determinazione di "neutrophil gelatinase-associated lipocalin" (NGAL), "kidney injury molecule-1" (KIM-1) e/o altri biomarcatori urinari.

*Valutazione della diatesi calcolotica.* ECMU; pHmetria; valutazione immagini/grafici/scatter/parametri strumentali; analisi del sedimento a fresco ed eventuale valutazione dei cristalli (tipologia, dimensioni, presenza di aggregati, ecc.); esecuzione profilo biochimico su urine (creatinina, urea, calcio, magnesio, fosforo, sodio, potassio, cloruri, cistina, citrati, ossalati); analisi in spettrometria infrarossa della composizione del calcolo.

*Ricerca e identificazione di parassiti.* ECMU; valutazione immagini/grafici/scatter/parametri strumentali; raccolta temporizzata e con fase preanalitica controllata (schistosoma); esame microscopico del sedimento a fresco; eventuali colorazioni specifiche; emissione di un referto commentato.

#### **Raccomandazioni**

##### **Sono fortemente raccomandati:**

- ***l'emissione di un referto adeguatamente commentato e mirato a rispondere al quesito inizialmente posto;***
- ***la formulazione di un'indicazione diagnostica, utilizzando a esempio, come gradazione (in senso crescente) della forza dell'associazione i termini compatibile, suggestivo, indicativo;***
- ***l'espressione di un criterio di idoneità analitica avvalorato dall'interazione con il medico curante e con il paziente;***
- ***la pratica di questo impegnativo livello solo se presenti le necessarie competenze di fisiopatologia renale e di microscopia clinica, attestate da un percorso formativo-esperto, da un adeguato aggiornamento e dai programmi di verifica della competenza gestiti da enti terzi.***

#### **STRATEGIA PER UN APPROCCIO GRADUATO ALL'ECMU**

Ciascun laboratorio in base alla casistica di afferenza, alla tipologia della richiesta, al grado di competenza professionale degli operatori e alle dotazioni tecnologiche deve individuare il livello diagnostico erogabile e di conseguenza definire le procedure da adottare e il grado di approfondimento diagnostico disponibile.

L'esame morfologico deve essere sempre effettuato a partire dal livello II. Non è ammissibile la pratica di decidere se eseguire o meno l'esame morfologico sulla base dei risultati dell'esame chimico-fisico e della casistica esaminata in quanto esporrebbe il laboratorio a un numero eccessivo di falsi negativi e ridurrebbe notevolmente l'efficacia diagnostica dell'esame.

La decisione di effettuare una revisione microscopica dei campioni dopo l'esame morfologico automatizzato deve invece essere valutata sulla base di criteri di selezione espliciti e formalizzati che, in presenza di un

“software” gestionale dedicato, potranno essere selezionati automaticamente; l'operatore potrà comunque individuare ulteriori campioni da inviare all'approfondimento microscopico sulla base di segnalazioni o allarmi strumentali, incongruenze tra esame chimico e morfologia automatizzata, pazienti critici per esiti analitici o decorso clinico.

### RACCOMANDAZIONI CONCLUSIVE

Con queste linee guida il GIAU si propone di stimolare i seguenti aspetti:

- migliorare e standardizzare l'approccio analitico all'ECMU con il presupposto di una raccolta e di un processo preanalitico ben condotto;
- sottolineare il valore aggiunto, in termini di informazioni e standardizzazione metodologica, delle nuove tecnologie (citofluorimetria urinaria, cattura digitale di immagini, microscopia automatizzata) adottate dagli analizzatori per lo studio della morfologia della frazione corpuscolata delle urine;
- ricondurre ai soli elementi clinicamente utili o necessari alla pratica analitica i parametri misurati e proposti alla refertazione;
- migliorare l'analisi chimica delle urine; in particolare, la determinazione dell'albumina dovrebbe essere effettuata con metodo immunoturbidimetrico e il risultato dovrebbe essere espresso in rapporto a indicatori di concentrazione urinaria quali la creatinina, permettendo, attraverso la normalizzazione, una valutazione più attendibile del risultato e in linea con le esigenze cliniche;
- aumentare la consapevolezza dell'importanza delle competenze professionali nel campo della morfologia urinaria e delle loro relazioni con la clinica;
- disporre delle basilari dotazioni tecnologiche per la microscopia a contrasto di fase e a luce polarizzata per valutare adeguatamente elementi di indubbio rilievo clinico: cellule, cilindri, lipidi, cristalli, ecc;
- attuare una politica di verifica della qualità analitica che oltre ai tradizionali controlli interni e esterni preveda un programma per la valutazione della competenza morfologica;
- misurare ed esprimere in termini quantitativi sia i parametri fisico-chimici sia principali elementi corpuscolati;
- approfondire l'analisi compiuta, ove necessario, con ulteriori indagini fisiche, chimiche e morfologiche che permettano di risolvere eventuali incongruenze analitiche o di orientare in maniera più sicura il percorso diagnostico-terapeutico del paziente;
- stimolare l'industria diagnostica a concentrare gli sforzi di ricerca e messa a punto metodologica e strumentale per aderire alle esigenze clinico-diagnostiche.

L'auspicio è quello di rivalutare l'enorme potenziale diagnostico dell'ECMU, attuando un esame personalizzato sulle esigenze diagnostiche che ogni paziente porta con sé.

### RINGRAZIAMENTI

Il GIAU è formato da: M. Alessio (Bergamo), R. Anderlini (Modena), I. Bountis (Monselice), G. Brunori (Trento), A. Caleffi (Parma), D. Coseddu (Torino), B. Creanza, N. Di Pace e G. Di Rienzo (Gravina di Puglia), M. Epifani (Padova), G. Fogazzi (Milano), G. Gambaro (Roma), G. Gessoni (Chioggia), L. Gesualdo (Bari), M. Guida (Gravina di Puglia), A. Liverani, F. Manoni (Monselice), C. Ottomano (Monza), M. Parimbelli (Bergamo), A. Perego (Monselice), B. Pieretti (Fano), D. Poz (S. Daniele), G. Saccani (Bussolengo), M. Schinella (Rovereto), S. Secchiero (Padova), F. Sirianni (Palmanova), B. Talento (Nocera Inferiore), S. Valverde (Chioggia), D. Vannoni (Siena), M. Vizzini (Rovereto), T. Zorzan (Monselice).

### CONFLITTO DI INTERESSI

G.B. Fogazzi è consulente per la ditta A. Menarini Diagnostics.

### BIBLIOGRAFIA

1. Grilli R, Penna A, Zola P, et al. Physician's view of practice guidelines. *SocSci Med* 1996;43:1283-7.
2. Formoso G, Liberati A, Magrini N. Practice guidelines: useful and «participative» method? Survey of Italian physicians by professional setting. *Arch Int Med* 2001;161:2037-42.
3. Burnand B. Clinical practice guidelines. A public health perspective. *Eur J Public Health* 1999;9:83-5.
4. Coomarasamy A. Searching for evidence to inform clinical practice. *Current Obstetrics & Gynaecology* 2004;14:142-6.
5. Lilford R, Richardson A, Stevens A, et al. Issues in methodological research: perspectives from researchers and commissioners. *Health Technol Assess* 2001;15:1-57.
6. Grilli R. AGREE uno strumento per la valutazione della qualità delle linee guida. Dossier 60 Bologna. Agenzia Sanitaria Regionale dell'Emilia-Romagna, 2002. <http://www.snlg-iss.it/cms/files/agree.pdf>
7. ECLM - European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:1-96.
8. CLSI GP-16 A3. Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine specimens; Approved guideline - 3<sup>rd</sup> ed., Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
9. Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). Management of suspected bacterial urinary tract infection in adults. A National Clinical Guideline. Edinburgh (Scotland): SIGN, 2006 (SIGN publication n. 88).
10. Kuori T, Gyory A, Rowan M. ISLH recommended reference procedure for the enumeration of particles in urine. *Lab Hematol* 2003;9:58-63.
11. Linea Guida Regione Emilia Romagna. Infezioni delle vie urinarie nell'adulto. Dossier 190, 2010. [http://assr.regione.emilia-romagna.it/it/servizi/pubblicazioni/dossier/doss190/at\\_download/file](http://assr.regione.emilia-romagna.it/it/servizi/pubblicazioni/dossier/doss190/at_download/file)
12. British Columbia Health Service. Guidelines for macroscopic and microscopic urinalysis and investigation of urinary tract infections. 2005. [www.healthservices.gov.bc.ca/msp/protoguides](http://www.healthservices.gov.bc.ca/msp/protoguides).
13. Atkins D, Best D, Briss P, et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *Br Med J*

- 2004;328:1490-5.
14. Guyatt G, Gutterman D, Baumann MH, et al. Grading strength of recommendations and quality of evidence in clinical guidelines: report from American College of Chest Physicians task force. *Chest* 2006;129:174-81.
  15. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011;80:17-28.
  16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors - United States, 1999-2004. *MMWR Morb Mortal Weekly Rep* 2007;56:161-165. [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5608a2](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5608a2).
  17. Zoccali C, Kramer A, Jager KJ. Chronic kidney disease and end-stage renal disease – a review produced to contribute to the report “the status of health in the European union: towards a healthier Europe”. *NDT Plus* 2010;3:213-24.
  18. Gambaro G, Yabarek T, Graziani MS, et al. Prevalence of CKD in Northeastern Italy: results of the INCIPE study and comparison with NHANES. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1946-53.
  19. Chacko KM, Feinberg LE. Laboratory screening at preventive health exams: trend of testing, 1978-2004. *Am J Prev Med* 2007;32:59-62.
  20. Woolhandler S, Pels RJ, Bor DH, et al. Dipstick urinalysis screening of asymptomatic adults for urinary tract disorders. I. Hematuria and proteinuria. *JAMA* 1989;262:1214-9.
  21. Pels RJ, Bor DH, Woolhandler S, et al. Dipstick urinalysis screening of asymptomatic adults for urinary tract disorders. II. Bacteriuria. *JAMA* 1989;262:1221-4.
  22. Yuno T, Hisada Y, Nishimura Y. A review of urinary examination - what medical practice expects now and what urinary examinations have to provide in the future. *Rinsho Byori* 2013;61:622-8.
  23. Cho BS, Hahn WH, Cheong HI, et al. A nationwide study of mass urine screening tests on Korean school children and implications for chronic kidney disease management. *Clin Exp Nephrol* 2013;17:205-10.
  24. Brunzel N.I. *Fundamentals of urine & body fluid analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Elsevier, 2013.
  25. Prochazka AV, Lundahl K, Pearson W, et al. Support of evidence-based guidelines for the annual physical examination: a survey of primary care providers. *Arch Intern Med* 2005;165:1347-52.
  26. Simerville J, Maxted W, Pahira J. Urinalysis: a comprehensive review. *Am Fam Physician* 2005;71:1153-62.
  27. Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D, et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:229-41.
  28. McNulty CA, Thomas M, Bowen J, et al. Improving the appropriateness of laboratory submissions for urinalysis from general practice. *Fam Pract* 2008;25:272-8.
  29. Manoni F, Gessoni G, Alessio MG, et al. Mid-stream vs first-voided urine collection by using automated analyzers for particle examination in healthy subjects: an Italian multi center study. *Clin Chem Lab Med* 2011;50:679-84.
  30. Rao PK, Gao T, Pohl M, et al. Dipstick pseudo hematuria: unnecessary consultation and evaluation. *J Urol* 2010;183:560-4.
  31. Mc Bride L. *Textbook of urinalysis and body fluids: a clinical approach*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.
  32. Kanbay M, Kasapoglu B, Perazella MA. Acute tubular necrosis and pre-renal acute kidney injury: utility of urine microscopy in their evaluation - a systematic review. *Int Urol Nephrol* 2010;42:425-33.
  33. Perazella MA, Coca SG, Hall IE, et al. Urine microscopy is associated with severity and worsening of acute kidney injury in hospitalized patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:402-8.
  34. Mundt L, Shanahan K. *Graff's textbook of urinalysis and body fluids*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
  35. Ross D, Neely A. *Textbook of urinalysis and body fluids*. Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1982.
  36. Braeckman L, Haak E, Peremans L. Routine dipstick urinalysis in daily practice of Belgian occupational physicians. *Arch Public Health* 2012;70:1-15.
  37. Rigby D, Gray K. Understanding urine testing. *Nurs Times* 2005;101:60-2.
  38. Berry J. Microalbuminuria testing in diabetes: is a dipstick as effective as laboratory tests? *Br J Community Nurs* 2003;8:267-73.
  39. Patel HD, Livsey SA, Swann RA, et al. Can urine dipstick testing for urinary tract infection at point of care reduce laboratory workload? *J Clin Pathol* 2005;58:951-4.
  40. KDIGO Clinical Practice Guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Supp* 2012;2:1-138.
  41. KDIGO Clinical Practice Guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Supp* 2013;3:1-150.
  42. Ruggenenti P, Porrini E, Motterlini N, et al. Measurable urinary albumin predicts cardiovascular risk among normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1717-24.
  43. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2013;31:1281-357.
  44. Graziani MS, Secchiero S, Terreni A, et al. La diagnostica di laboratorio della malattia renale cronica in Italia: armonizzare è d'obbligo. *Biochim Clin* 2015;39:6:617-26.
  45. Graziani M, Lo Cascio C, Caldini A, et al. Indagine conoscitiva sulla determinazione quantitativa della albumina nelle urine nei laboratori italiani. *Biochim Clin* 2007;31:290-6.
  46. Graziani M, Caldini A per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL Diabete Mellito. Indicazioni per la misura dell'albumina nelle urine per l'accertamento e il monitoraggio della nefropatia diabetica. *Biochim Clin* 2011;35:127-30.
  47. Turchetti E, Fasi R. *Elementi di fisica*, 1<sup>a</sup> ed. Bologna: Zanichelli, 1998.
  48. Manoni F, Fornasiero L, Ercolin M, et al. Laboratory diagnosis of renal failure: urine conductivity and tubular function. *Minerva Urol Nefrol* 2009;61:17-20.
  49. Wang JM, Wen CY, Lin CY, et al. Evaluating the performance of urine conductivity as screening for early stage chronic kidney disease. *Clin Lab* 2014;60:635-43.
  50. Fazil Marickar YM. Electrical conductivity and total dissolved solids in urine. *Urol Res* 2010;38:233-5.
  51. Sing RI, Singal RK. What is significant hematuria for the primary care physician? *Can J Urol* 2012;19(suppl 1):36-41.
  52. Higashihara E, Nishiyama T, Horie S, et al. Hematuria: definition and screening test methods. *Int J Urol* 2008;15:281-4.
  53. McDonald MM, Swagerty D, Wetzel L. Assessment of microscopic hematuria in adults. *Am Fam Physician* 2006;15:1748-54.

54. Cohen RA, Brown RS. Clinical practice. Microscopic hematuria. *N Engl J Med* 2003;348:2330-8.
55. Ma J, Wang C, Yue J et al. Clinical laboratory urine analysis: comparison of the UriSed automated microscopic analyzer and the manual microscopy. *Clin Lab* 2013;59:1297-303.
56. Boven LA, Kemperman H, Demir A. A comparative analysis of the Iris iQ200 with manual microscopy as a diagnostic tool for dysmorphic erythrocytes in urine. *Clin Chem Lab Med* 2012;250:751-3.
57. Khasriya R, Khan S, Lunawat R, et al. The inadequacy of urinary dipstick and microscopy as surrogate markers of urinary tract infection in urological outpatients with lower urinary tract symptoms without acute frequency and dysuria. *J Urol* 2010;183:1843-7.
58. Aspevall O, Hallander H, Gant V, et al. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:173-8.
59. Marschal M, Wienke M, Hoering S, et al. Evaluation of 3 different rapid automated systems for diagnosis of urinary tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;72:125-30.
60. Kouri T, Malminiemi O, Penders J, et al. Limits of preservation of samples for urine strip tests and particle counting. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:703-13.
61. Fabbro C, Darolles J, Rault JP. Preservation of urine samples for UF 1000i analysis. *Ann Biol Clin* 2011;69:588-92.
62. Komarova O, van derMeer W, Levtchenko E, et al. Effective chemical preservation of morphology of urinary erythrocytes. *Pediatr Nephrol* 2003;18:665-6.
63. Kouri T, Vuotari L, Pohjavaara S, et al. Preservation of urine for flowcytometric and visual microscopic testing. *Clin Chem* 2002;48:900-5.
64. del Rosario-Rodríguez M, Rodríguez-Moreno I, León MT, et al. A new chemical preservative that permits analysis of urine sediment for light microscopic examination 12 h after emission. *Nephron* 1999;82:65-71.
65. Mody L, Juthani-Mehta M. Urinary tract infections in older women: a clinical review. *JAMA* 2014;311:844-54.
66. Sundvall PD, Gunnarsson RK. Evaluation of dipstick analysis among elderly residents to detect bacteriuria: a cross-sectional study in 32 nursing homes. *BMC Geriatr* 2009;9:32-8.
67. Kodikara H, Seneviratne H, Kaluarachchi A, et al. Diagnostic accuracy of nitrite dipstick testing for the detection of bacteriuria of pregnancy. *Public Health* 2009;123:393-4.
68. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2015. *Diabetes Care* 2015;38(suppl1):S1-94.
69. Shivaraj G, Prakash B, Shruthi S, et al. Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci* 2010;2:170-3.
70. Lamb EJ, Price CP. Kidney function tests. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4<sup>th</sup> ed. New Delhi: Elsevier Inc, 2006:797-808.
71. Arvind B, Anurag B, Shina M. Approach to renal tubular disorders. *Indian Journal of Pediatrics* 2005;72:771-6.
72. Fogazzi GB, Saglimbeni L, Banfi G, et al. Urinary sediment features in proliferative and non-proliferative glomerular diseases. *J Nephrol* 2005;18:703-10.
73. Emerson JF, Emerson SS. Evaluation of a standardized procedure for microscopic cell counts in body fluids. *J Clin Lab Anal* 2005;19:267-75.
74. Fogazzi GB, Grignani S. Urine microscopic analysis an art abandoned by nephrologists? *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2485-7.
75. Fogazzi GB, Cameron JS. Urinary microscopy from the seventeenth century to the present day. *Kidney Int* 1996;50:1058-68.
76. Fogazzi GB, Cameron JS. The introduction of urine microscopy into clinical practice. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:410-3.
77. Tsai JJ, Yeun JY, Kumar VA, et al. Comparison and interpretation of urinalysis performed by a nephrologist versus a hospital-based clinical laboratory. *Am J Kidney Dis* 2005;46:820-9.
78. Fogazzi GB, Grignani S, Colucci P. Urinary microscopy as seen by nephrologists. *Clin Chem Lab Med* 1999;36:919-24.
79. Fogazzi GB, Garigali G. Urinalysis. In: Johnson RJ, Feehally J, Floegeet J. *Comprehensive clinical nephrology*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014.
80. Fogazzi GB. *The urinary sediment. An integrated view* - 3<sup>rd</sup> ed. Milano: Elsevier-Masson, 2010.
81. Hisano S, Sasatomi Y, Kiyoshi Y, et al. Macrophage subclasses and proliferation in childhood IgA glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2001;37:712-19.
82. Shiozawa S. Participation of macrophages in glomerular sclerosis through the expression and activation of matrix metalloproteinases. *Pathol Int* 2000;50:441-57.
83. Fogazzi GB, Ferrari B, Garigali G, et al. Urinary sediment findings in acute interstitial nephritis. *Am J Kidney Dis* 2012;60:330-2.
84. Spinelli D, Consonni D, Garigali G, et al. Waxy casts in the urinary sediment of patients with different types of glomerular diseases: results of a prospective study. *Clin Chim Acta* 2013;424:47-52.
85. Henschkowski J, Vogt B. Crystalluria. *Ther Umsch* 2006;63:591-4.
86. Baggio B, Giannossi ML, Medici L, et al. X-ray microdiffraction and urine: a new analysis method of crystalluria. *J Xray Sci Technol* 2012;20:489-98.
87. van Noord C, Wulkan RW, van den Dorpel MA. Crystalluria. *Neth J Med* 2012;70:84-7.
88. Verdesca S, Fogazzi GB, Garigali G, et al. Crystalluria: prevalence, different types of crystals and the role of infrared spectroscopy. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:515-20.
89. Baumann JM, Affolter B, Meyer R. Crystal sedimentation and stone formation *Urol Res* 2010;38:21-7.
90. Marickar YM, Salim A. Photomicrography of urinary deposits in stone clinic. *Urol Res* 2009;37:359-68.
91. Fazil-Marickar YM, Lekshmi PR, VarnaL, et al. Elemental distribution analysis of urinary crystals. *Urol Res* 2009;37:277-82.
92. Daudon M, Jungers P, Lacour B. Clinical value of crystalluria study. *Ann Biol Clin* 2004;62:379-93.
93. Gruppo di Studio Multidisciplinare per la Calcolosi Renale. Percorso diagnostico-terapeutico per il paziente con calcolosi urinaria. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2010;27:282-9.
94. Scoffone C, Zattoni F. *Linee Guida 2009 Comitato SIU (Società Italiana di Urologia)*. [http://www.casettagiovanni.it/contents/pubblicazioni/linee\\_guida/Linee%20Guida%20SIU%202009.pdf](http://www.casettagiovanni.it/contents/pubblicazioni/linee_guida/Linee%20Guida%20SIU%202009.pdf)
95. AURO.it (Associazione Urologi Ospedalieri Italiani). *Linee guida per la calcolosi delle vie urinarie*, 2007. <http://auro.it/wp-content/uploads/2013/11/ig09.pdf>
96. Goldfarb DS, Arowojolu O. Metabolic evaluation of first-time and recurrent stone formers. *Urol Clin North Am* 2013;40:13-20.

97. Bottini PV, Martinez MH, Garlipp CR. Urinalysis: comparison between microscopic analysis and a new automated microscopy image-based urine sediment instrument. *Clin Lab* 2014;60:693-7.
98. Manda-Handzlik A, Sztéfko K, Zajac A, et al. UriSed - Preliminary reference intervals and optimal method for urine sediment analysis in newborns and infants. *Clin Biochem* 2016;49:909-14.
99. Yüksel H, Kiliç E, Ekinci A, et al. Comparison of fully automated urine sediment analyzers H800-FUS100 and LabUMat-UriSed with manual microscopy. *J Clin Lab Anal* 2013;27:312-6.
100. Martinez MH, Bottini PV, Levy CE, et al. UriSed as a screening tool for presumptive diagnosis of urinary tract infection. *Clin Chim Acta* 2013;411:77-9.
101. Anderlini R, Manieri G, Lucchi C, et al. Automated urinalysis with expert review for incidental identification of atypical urothelial cells: an anticipated bladder carcinoma diagnosis. *Clin Chim Acta* 2015;451:252-6.
102. Zaman Z, Fogazzi GB, Garigali G, et al. Urine sediment analysis: analytical and diagnostic performance of sediMAX - a new automated microscopy image-based urine sediment analyser. *Clin Chim Acta* 2010;411:147-54.
103. Budak YU, Huysal K. Comparison of three automated systems for urine chemistry and sediment analysis in routine laboratory practice. *Clin Lab* 2001;57:47-52.
104. Akin OK, Serdar MA, Cizmeci Z, et al. Comparison of LabUMat-with-UriSed and iQ200 fully automatic urine sediment analysers with manual urine analysis. *Biotechnol Appl Biochem* 2009;53:139-44.
105. Park J, Kim J. Evaluation of iQ200 automated urine microscopy analyzer. *Korean J Lab Med* 2008;28:267-73.
106. Mayo S, Acevedo D, Quiñones-Torrel C, et al. Clinical laboratory automated urinalysis: comparison among automated microscopy, flow cytometry, two test strips analyzers, and manual microscopic examination of the urine sediments. *J Clin Lab Anal* 2008;22:262-70.
107. Chien TI, Kao JT, Liu HL, et al. Urine sediment examination: a comparison of automated urinalysis systems and manual microscopy. *Clin Chim Acta* 2007;384:28-34.
108. Linko S, Kouri TT, Toivonen E, et al. Analytical performance of the Iris iQ200 automated urine microscopy analyzer. *Clin Chim Acta* 2006;372:54-64.
109. Du J, Xu J, Wang F, et al. Establishment and development of the personalized criteria for microscopic review following multiple automated routine urinalysis systems. *Clin Chim Acta* 2015;444:221-8.
110. Xiang D, Cong Y, Wang C, et al. Development of microscopic review criteria by comparison urine flow cytometer, strip and manual microscopic examination. *Clin Lab* 2012;58:979-85.
111. Fabbro C, Darolles J, Rault JP. Evaluation of the performances of the UF-1000i automated urine analyzer. *Ann Biol Clin* 2011;69:431-9.
112. Kadkhoda K, Manickam K, Degagne P, et al. UF-1000i flow cytometry is an effective screening method for urine specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;69:130-6.
113. Jiang T, Chen P, Ouyang J, et al. Urine particles analysis: performance evaluation of Sysmex UF-1000i and comparison among urine flow cytometer, dipstick, and visual microscopic examination. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71:30-7.
114. Manoni F, Tinello A, Fornasiero L, et al. Urine particle evaluation: a comparison between the UF-1000i and quantitative microscopy. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1107-11.
115. National Health Service. Evidence Review. Automated urine screening systems. CAO 10030 March, 2010. [http://www.akeah.gov.tr/dosyalar/201208103741\\_CEP10030-Automated-Urine-Screening-Evidence-Review.pdf](http://www.akeah.gov.tr/dosyalar/201208103741_CEP10030-Automated-Urine-Screening-Evidence-Review.pdf)
116. Westgard JO, Westgard SA. Quality control review: implementing a scientifically based quality control system. *Ann Clin Biochem* 2016;53:32-50.
117. Harel O, Schisterman EF, Vexler A, et al. Monitoring quality control: can we get better data? *Epidemiology* 2008;19:621-7.
118. Westgard JO. Design of internal quality control for reference value studies. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:863-7.
119. Westgard JO. Internal quality control: planning and implementation strategies. *Ann Clin Biochem* 2003;40:593-611.
120. Westgard JO. The need for a system of quality standards for modern quality management. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:483-6.
121. Ottomano C, Ceriotti F, Galeazzi M, et al. Linee guida per la gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno. *Biochim Clin* 2008;32:102-21.
122. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;327:307-10.
123. Ceriotti F, Secchiero S, Sciacovelli L, et al. Linee guida per la gestione dei programmi di Valutazione Esterna di Qualità. *Biochim Clin* 2011;35:107-26.
124. Sciacovelli L, Secchiero S, Zardo L, et al. The role of External Quality Assessment. *Biochimica Medica* 2010;2:160-4.
125. Secchiero S, Sciacovelli L, Faggian A, et al. Gli strumenti di assicurazione della qualità in Medicina di Laboratorio: i programmi di VEQ e gli indicatori di qualità del Centro di Ricerca Biomedica. *Ligand Assay* 2013;18:41-53.
126. Fraser CG, Petersen HP, Libeer JC, et al. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* 1997;34:8-12.
127. Kouri T, Laippala P, Kutter D, et al. Quality specifications for ordinal scale measurements with multiproperty (multiple) urine test strips. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:523-6.
128. Schürer-Maly C, Wood WG, Falbo R, et al. An educational web-based external quality assessment outcome and evaluation: first experiences with urinary sediment and hemostaseology. *Clin Lab* 2013;59:1061-9.
129. Wood WG, Schwarz P, Illigen D, et al. Experience with an alternative form of samples for external quality assessment of urinary sediment (visual sample EQA). *Clin Lab* 2013;59:875-83.
130. Fogazzi GB, Secchiero S, Consonni D, et al. An Italian external quality assessment (EQA) program on urinary sediment. *Clin Chim Acta* 2010;411:859-67.
131. Secchiero S, Fogazzi GB. Quality control programs for urinary sediment. In: Fogazzi GB, ed. *The urinary sediment. An integrated view*. 3<sup>rd</sup> ed. Milano: Elsevier Masson, 2009:233-45.
132. Fogazzi GB, Secchiero S, Garigali G, et al. Evaluation of clinical cases in an Italian External Quality Assessment Scheme (EQAS) for the urinary sediment. *Clin Clem Lab Med* 2014;52:845-2.
133. Secchiero S, Fogazzi GB, Manoni F, et al. The Italian External Quality Assessment (EQA) program: results of the period 2012-2015. *Clin Clem Lab Med* 2015;53: S1495-502.
134. Manoni F, Caleffi A, Gessoni G, et al. L'esame chimico, morfologico e colturale delle urine: proposta di linee guida per una procedura standardizzata della fase pre analitica. *Riv Ital Med Lab* 2011;7:25-35.

135. Manoni F, Gessoni G, Alessio MG, et al. Gender's equality in evaluation of urine particles: Results of a multicenter study of the Italian Urinalysis Group. *Clin Chim Acta* 2014;427:1-5.
136. Manoni F, Gessoni G, Caleffi A, et al. Pediatric reference values for urine particles quantification by using automated flow cytometer: results of a multicenter study of Italian urinalysis group. *Clin Biochem* 2013;46:1820-4.
137. Shayanfar N, Tobler U, von Eckardstein A, et al. Automated urinalysis: first experiences and a comparison between the Iris iQ200 urine microscopysystem, the Sysmex UF-100 flow cytometer and manual microscopic particle counting. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1251-6.
138. Graziani MS, Gambaro G, Mantovani L, et al. Diagnostic accuracy of a reagent strip for assessing urinary albumin excretion in the general population. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1490-4.
139. Camporese A. L'evoluzione della citofluorimetria urinaria in microbiologia, da metodo di screening a insostituibile strumento per la validazione clinica dell'esame delle urine. *Riv Ital Med Lab* 2014;10:242-6.
140. Caleffi A, Manoni F, Alessio MG, et al. Quality in extra analytical phases of urinalysis. *Biochimica Medica* 2010;20:179-83.