

## Determinazione fotometrica della cistinuria

Giovanni Cangiano<sup>1</sup>, Annachiara Latte<sup>1</sup>, Maria Russo<sup>1</sup>, Francesco Forte<sup>1</sup>, Elvira Di Maina<sup>1</sup>, Maurizio D'Amora<sup>2</sup>, Maurizio Terribile<sup>3</sup>, Domenico Scognamiglio<sup>4</sup>, Rosaria Di Napoli<sup>4</sup>, Andrea Risitano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Patologia Clinica e <sup>3</sup>U.O. Nefrologia, P.O. "Pellegrini", ASL NA 1, Napoli

<sup>2</sup>Laboratorio Patologia Clinica, P.O. "Incurabili", ASL NA 1, Napoli

<sup>4</sup>Centro Screening Ipotiroidismo e Fenilchetonuria, P.O. "Annunziata", ASL NA 1, Napoli

### ABSTRACT

**Photometric measurement of cystinuria.** The monitoring of cystine excretion in the 24 h urine collection is of primary importance for the medical treatment of cystinuria. This paper describes the characteristics and the performance of a new photometric method for the urinary cystine determination. The method is fully automatized and replaces the old sodium nitroprusside Brand test. The reference interval, obtained on 230 healthy adults, was 21-148 mg/24h.

### INTRODUZIONE

La cistinuria è una malattia caratterizzata dalla formazione di calcoli nelle vie urinarie che hanno la tendenza a recidivare con elevata frequenza e sono molto resistenti alla terapia medica e chirurgica (1, 2). È una malattia a trasmissione ereditaria di tipo autosomico recessivo ed è dovuta all'incapacità da parte del tubulo prossimale di riassorbire l'aminoacido cistina (3).

Sia nei soggetti omozigoti che eterozigoti, l'escrezione di cistina risulta essere 10 – 20 volte maggiore rispetto ai soggetti normali (4). Poiché tra i componenti fisiologici urinari non esistono inibitori della cristallizzazione dell'aminoacido, alla supersaturazione urinaria di cistina segue la precipitazione dei cristalli esagonali e la formazione di calcoli che comportano una ricorrente e progressiva patologia calcolotica renale (5-7).

In questa malattia, insieme alla cistina, anche altri tre aminoacidi, definiti dibasici, quali ornitina, arginina e lisina vengono persi con le urine, senza che ne derivino però, ulteriori specifiche conseguenze clinicamente evidenti (8).

Con un rigoroso controllo medico e laboratoristico, sempre più raro diviene il ricorso alle terapie chirurgiche, perché i calcoli possono ridursi e anche scomparire con la terapia medica (idroterapia, alcalinizzazione, solubilizzazione e dieta) (9-11).

Le numerose richieste di misura pervenute dall'Ambulatorio della Calcolosi del reparto di Nefrologia del Presidio Ospedaliero (P.O.) "Pellegrini" (ASL NA 1) e l'impossibilità di utilizzo del vecchio test qualitativo di Brand al cianuro (sostanza non più presente nei laboratori di analisi) hanno indirizzato il nostro interesse verso lo studio di una semplice e rapida procedura di screening, completamente automatizzata e capace di quantificare la cistinuria nelle urine delle 24 ore mediante metodica colorimetrica al fosfotungstato.

### MATERIALI E METODI

In questo lavoro sono stati esaminati 230 campioni di urine delle 24 ore, pervenute al Laboratorio di Patologia Clinica del P.O. "Pellegrini" dell'ASL Napoli 1 ed appartenenti a pazienti afferenti all'Ambulatorio della Calcolosi dell'U.O. di Nefrologia del sopraccitato P.O.

Le conferme cromatografiche (tecnica a scambio ionico) (12-14) ed alcuni test al nitroprussiato (15) sono stati effettuati presso il Centro Screening per la fenilchetonuria e l'ipotiroidismo congenito del P.O. "Annunziata" dell'ASL NA 1.

Il principio del metodo al fosfotungstato (16), illustrato nella Figura 1, si basa sulla riduzione del gruppo disolfuro della cistina e degli altri disolfuri, grazie alla presenza di solfito di sodio. I gruppi sulfidrici formati, assieme ad acido urico ed acido ascorbico, reagiscono con l'acido fosfotungstico per dare luogo al blu di tungsteno, evidenziabile a 600 nm. Un bianco campione bloccherà i gruppi sulfidrici derivanti dalla cistina grazie alla presenza di cloruro mercurico. La differenza di assorbanza tra campione e bianco è proporzionale alla concentrazione della cistina urinaria.

La misura fotometrica effettuata sull'analizzatore AU 600 Olympus prevede l'utilizzo degli stessi reattivi utilizzati in manuale da Shinohara e Padis (16) ma opportunamente modificati ed adattati per l'automazione così come precedentemente riportato (17). In particolare, la nostra esperienza in automazione prevede che l'acido fosfotungstico sia diluito al 25% con acqua distillata e che i reagenti siano tra loro opportunamente miscelati per dare luogo a due metodiche bireattive per misurare la cistina totale ed il suo bianco.

1. Metodica cistina totale (CYS): a 150  $\mu$ L di soluzione 1 (R1: 5,0 mL tampone acetato, 1,5 mL solfito, 3,5 mL acqua) si aggiungono 50  $\mu$ L di campione urinario. Dopo un'attesa di 10 cicli macchina (circa 220 s) l'analizzatore dispensa 100  $\mu$ L di soluzione 2 (R2: acido

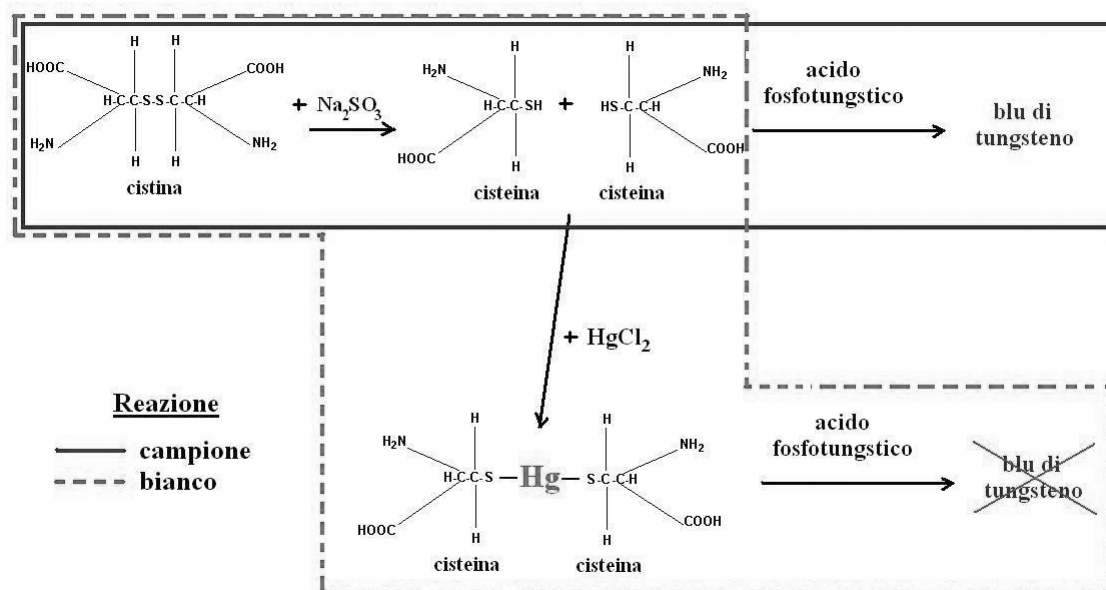


Figura 1

Principio del metodo al fosfotungstato per la determinazione della cistinuria.

fosfotungstico 25%). La reazione a termine (END) è determinata rilevando l'assorbanza a 600 nm al 27° ciclo ( $\Delta E_{27-0}$ ) sottratta del suo bianco ( $\Delta E_{10-0}$ ).

2. Metodica bianco cistina (CYS B): valgono gli stessi parametri riportati prima per la determinazione di CYS. L'unica differenza è data dal reagente R1 in cui è presente anche il cloruro mercurico (R1: 5,0 mL tampone acetato, 1,5 mL solfito, 2,5 mL acqua, 1,0 mL cloruro mercurico).

Lo standard chimico di cistina (5 mg/dL) si utilizza per calibrare inizialmente sia CYS che CYS B: la nuova assorbanza, ottenuta per differenza tra quelle di CYS e CYS B, verrà in seguito associata alle calibrazioni delle suddette metodiche.

Il reagente R2 è simile per le due metodiche CYS e CYS B ed è stabile indefinitamente in frigorifero, mentre, il reagente R1 (tampone, solfito ed acqua per CYS; tampone, solfito, acqua e mercurio per CYS B) deve essere preparato al momento ed è possibile utilizzarlo entro 5 ore dalla preparazione.

## RISULTATI

L'acido fosfotungstico, quando preparato come nella metodica tradizionale di Shinohara e Padis ed utilizzato in quella completamente automatizzata, produce delle densità ottiche elevate già con pochi  $\mu\text{L}$  di urina. Questo dà però lo svantaggio di dare elevate imprecisioni specie per campioni a bassa concentrazione di cistina. La Figura 2 mostra invece che l'utilizzo di acido fosfotungstico diluito 1:4 con acqua distillata riduce i CV dei campioni (6 replicati) a valori accettabili. E' possibile che l'elevata densità del reattivo poco o non diluito possa portare ad una insufficiente aspirazione del reagente da

parte delle siringhe dello strumento o a problemi di mescolamento.

Nella Figura 3 sono rappresentate le concentrazioni di cistina misurate rispetto a quelle attese, pressoché allineate tra loro fino a 25 mg/dL. I singoli punti sperimentali sono stati ottenuti diluendo opportunamente con soluzione fisiologica un campione urinario ad elevato contenuto di cistina. Per ogni punto sono stati effettuati 6 replicati.

Nella Figura 4 è rappresentato il profilo di imprecisione ottenuto misurando in triplicato campioni di urina a diversa concentrazione di cistina: nell'intervallo analitico compreso tra 1 e 30 mg/dL si evidenzia un CV inferiore al 5%. Concentrazioni inferiori vengono misurate con una discreta imprecisione (8% a concentrazioni di 0,7 mg/dL).

Le prove di precisione nella serie ( $n=20$ ) e tra le serie (10 sedute lavorative in cui si effettuano le determinazioni dei campioni in duplicato), effettuate su 4 campioni urinari a diversa concentrazione di cistina, mostravano CV inferiori al 4% (Tabella 1).

Per il calcolo degli intervalli di riferimento, l'analisi statistica, effettuata col metodo non parametrico (18), si riferisce a 230 campioni urinari delle 24 ore appartenenti a soggetti adulti di età compresa tra i 18 ed i 57 anni, di ambo i sessi (122 femmine e 108 maschi), ed apparentemente sani. Non si evidenziano differenze tra i sessi. L'intervallo di riferimento (Figura 5) risulta compreso tra 21 e 148 mg/24h di cistinuria. I relativi intervalli di confidenza al 90% sono rispettivamente 12-28 mg/24h e 144-163 mg/24h. I valori di cistinuria espressi in concentrazione non risultavano essere superiori a 10 mg/dL ed il 96% dei dati era contenuto nell'intervallo tra 1 e 7 mg/dL.

In 7 campioni urinari su 230 si riscontravano valori compresi tra 148 mg/24h e 176 mg/24h. Le determina-

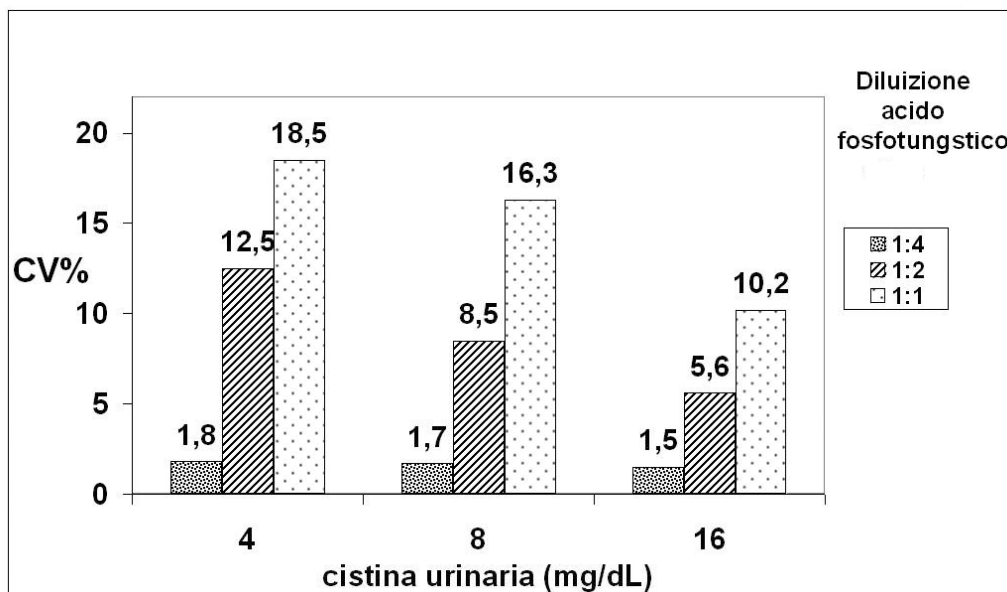


Figura 2

Effetto della concentrazione di acido fosfotungstico sulla riproducibilità delle misure.

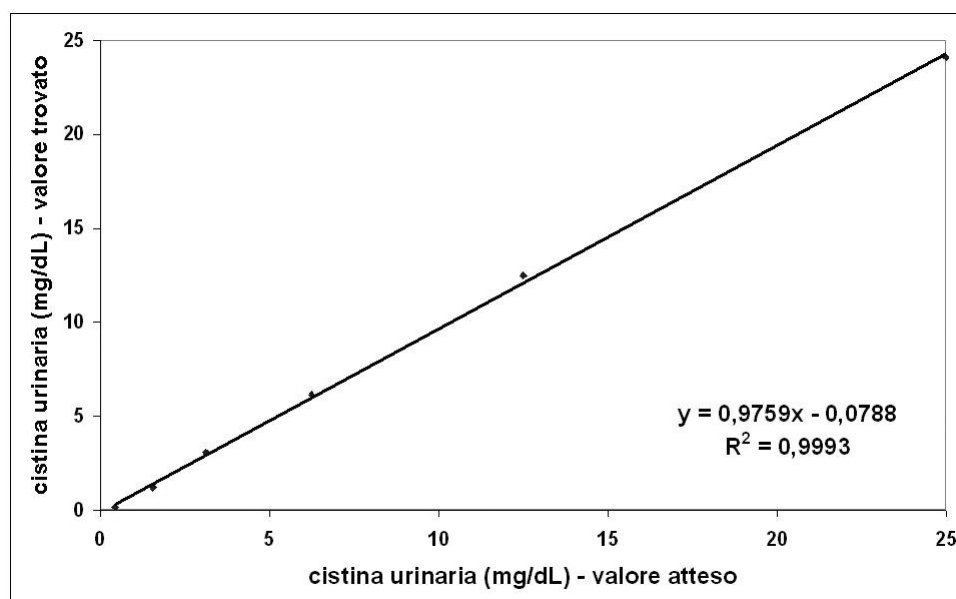


Figura 3

Linearità della misura.

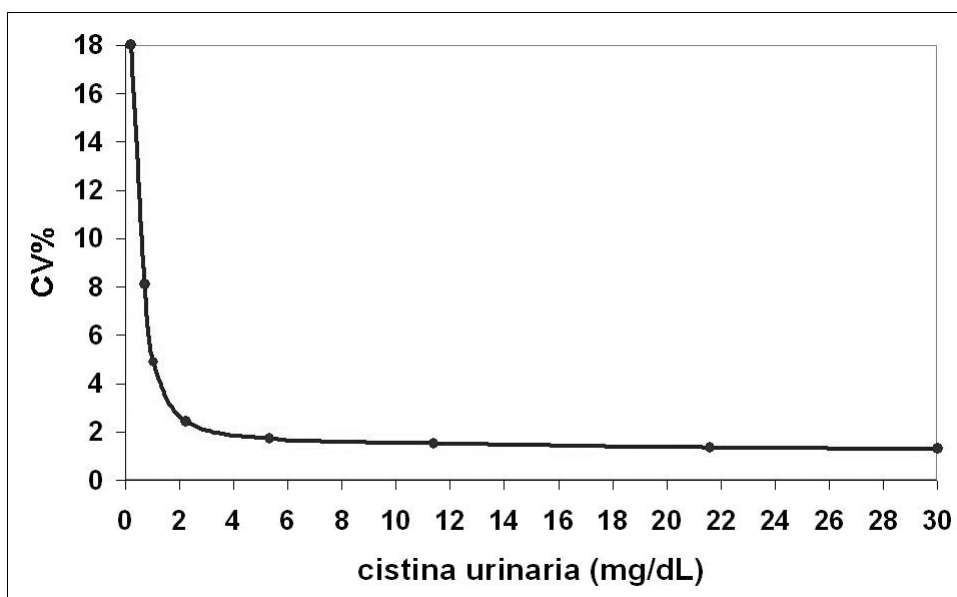
zioni di questi campioni in cromatografia a scambio cationico non hanno messo in evidenza alcun aumento di aminoacidi quali lisina, arginina ed ornitina.

## DISCUSSIONE

L'esigenza di ricercare un nuovo metodo di screening è scaturita dall'impossibilità di poter utilizzare il vecchio test di Brand, sicuramente rapido, ma oggi non più in uso a causa della tossicità del cianuro impiegato nella reazione al nitroprussiato. Lo studio di un metodo di laboratorio rapido, completamente automatizzato ed avente la capacità di quantificare la cistinuria nelle urine

delle 24 ore, si rende necessario nello screening delle calcolosi, ma anche per il monitoraggio dei pazienti sottoposti ad idroterapia ed a solubilizzazione dei calcoli.

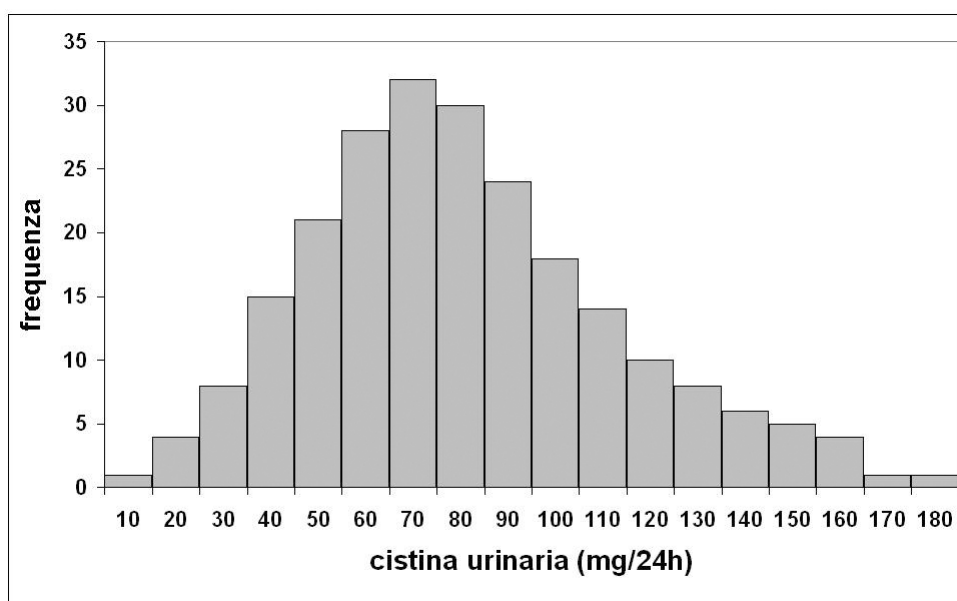
Questa nuova metodica, eseguita sull'analizzatore biochimico AU600 Olympus, risolve i problemi creati dalla metodica manuale di Shinohara e Padis dovuti a: utilizzo di una serie di reagenti miscelati al momento, necessità di effettuare un bianco campione urine e standard, utilizzo di un fotometro da banco, realizzazione di una curva di calibrazione a 6 punti e relativa estrapolazione del dato analitico. Improprio risulta effettuare la determinazione di screening dell'aminoacido con tecniche più sofisticate molto sensibili e costose quali la cro-



**Figura 4**  
*Profilo di imprecisione. CV ottenuti su tre replicati per ciascuna concentrazione.*

**Tabella 1**  
*Risultati delle prove di precisione nella serie e tra serie*

Media mg/dL	Nella serie		Tra le serie		
	DS mg/dL	CV %	Media mg/dL	DS mg/dL	CV %
1,95	0,057	2,92	2,04	0,072	3,54
3,94	0,072	1,83	3,88	0,104	2,67
8,06	0,135	1,67	8,13	0,204	2,51
16,3	0,246	1,51	15,9	0,343	2,16



**Figura 5**  
*Distribuzione dei valori di cistinuria (mg/24h) nella popolazione di riferimento esaminata (230 soggetti).*

matografia a scambio cationico, da noi usata solo per le conferme di positività.

Il metodo al fosfotungstato proposto su Olympus AU600 risulta essere una possibile alternativa anche alle recenti procedure HPLC che prevedono l'uso di più pratiche colonne a fase inversa e derivatizzanti sempre più specifici per i gruppi tiolici (19-22).

## BIBLIOGRAFIA

1. Assimos DG, Lesile SW, Ng C, et al. The impact of cystinuria on renal function. *J Urol* 2002;168:27-30.
2. Milliner DS: Cystinuria. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19:889-907.
3. Lindell A, Denneberg T, Granerus G. Studies on renal function in patient with cystinuria. *Nephron* 1997;77:76-85.
4. Pras E. Cystinuria at the turn of the millennium: clinical aspects and new molecular developments. *Mol Urol* 2000;4:409-14.
5. Rudnick DM, Bennett PM, Dretler SP. Retrograde reno-scopic fragmentation of moderate-size (1.5-3.0-cm) renal cystine stones. *J Endourol* 1999;13:483-5.
6. Rutchik SD, Resnick MI. Cystine calculi. Diagnosis and management of cystinuria. In: Coe FL, Favus MJ, Pak C, eds. *Kidney stones: Medical and surgical managements*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven 1996:1007-17.
7. Martins MC, Meyers AA, Whalley NA, et al. Cystine: a promoter of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in normal undiluted human urine. *J Urol* 2002;167:317-21.
8. Bertran J, Werner A, Chillaron J, et al: Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1993;268:14842-9.
9. Chow GK, Strem SB. Medical treatment of cystinuria: results of contemporary clinical practice. *J Urol* 1996;156:1576-8.
10. Heimbach D, Jacobs D, Muller SC, et al. Improving cystine stone therapy: an in vitro study of dissolution. *Urology* 2000;55:17-21.
11. McDonald MW, Stoller ML. Cystinuria: advances in medical therapy. *Contemp Urol* 1996;8:20-36.
12. Garret R, Grisham C. *Principi di biochimica con messa a fuoco su quella umana*. Padova: Piccin 2004:670-2.
13. Spandrio L. *Principi e tecniche di chimica clinica. Cromatografia*. Padova: Piccin 2001:138-9.
14. Wilson K, Goulding KH. *Biochimica applicata. Le metodologie biochimiche in laboratorio. Tecniche cromatografiche*. Milano: Cortina Editore 1986:235-40.
15. Ibbott FA, Aminoacidi e sostanze affini. In: Henry K, ed. *Clinical Chemistry, Principles and technics*. 2nd ed. New York: Harper and Row 1974:590-5.
16. Shinohara K, Padis LE. The determination of thiol and disulfide compound, with special reference to cysteine and cystine. *J Biol Chem* 1935;112:709-21.
17. Latte A, Cangiano G, D'Amora M, et al. Screening della cistinuria (metodo al fosfotungstato) su AU600 Olympus e proposta di intervalli di riferimento. *Biochim Clin* 2005;29:268.
18. Solberg HE. Approved recommendations (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:645-56.
19. Livesey JF, Donnelly JG, Ooi DS. HPLC screening method for cystinuria. *Clin Chem* 1996;42:1714-6.
20. Kaniowska E, Chwatko G, Glowacki R, et al. Urinary excretion measurement of cysteine and homocysteine in the form of S-pyridinium derivatives by HPLC with UV detection. *J Chromatogr A* 1998;798:27-35.
21. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter E. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem* 1999;45:290-2.
22. Fermo I, Arcelloni C, Paroni R. HPLC screening method for cystine in urine. *Anal Biochem* 2002;307:181-3.