



## **Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.**

N.002/24

### **Principi, tecniche e metodologia dell'esame morfologico delle urine**

Rossini I. (Varese), Casati G. (ASST Brianza), Colucci C. (Andria), Di Meo I. (Chieti)

**Rev. 1.0**

**SITLaB news**

**Pubblicato: 20 Aprile 2024**

**Copyright: © SITLaB**

## **Abstract**

L'esame delle urine si intreccia strettamente con la storia della Medicina. Spesso viene sottovalutato e considerato erroneamente un esame di laboratorio minore quando in realtà la sua rilevanza clinica rimane intatta nonostante il trascorrere del tempo.

Il sedimento urinario è rappresentato dall'insieme di microscopici elementi, cellulari e non, che possono essere identificati e quantificati nell'urina, in concentrazioni variabili a seconda dello stato di salute del paziente.

L'analisi del sedimento, attraverso il microscopio e/o tecniche automatizzate, rappresenta parte integrante del "variegato mondo" degli esami tradizionali, eseguiti sulle urine, ed è fondamentale per l'identificazione di patologie a carico dell'apparato urinario.

In questo articolo verranno esposti una serie di aspetti fondamentali per una corretta esecuzione dell'esame morfologico delle urine con particolare attenzione alle tecniche utilizzate e agli analiti che è possibile ricercare e quantificare con questo prezioso test.

## **Introduzione**

L'esame microscopico del sedimento urinario costituisce il caposaldo della diagnostica delle malattie renali e dei disordini delle vie urinarie; è una tipologia di esame che richiede grande attenzione, adeguata formazione ed esperienza, e che necessita della massima corrispondenza tra dato laboratoristico e clinica. Esso non deve essere mai separato dall'esame chimico-fisico del campione di urina. L'esame del sedimento urinario consente di chiarire e confermare i dati chimici e fornisce una serie di informazioni preziose circa la natura, lo stato di attività e la sede di una patologia renale e/o dell'apparato urinario. Le tecniche diagnostiche ad oggi disponibili per le patologie renali sono variegata, tuttavia l'esame delle urine con un'attenta lettura del sedimento conserva la sua validità diagnostica decisiva o propedeutica ad ulteriori indagini.

## **Obiettivo**

Scopo di questo articolo è descrivere, in generale, gli aspetti più importanti della fase preanalitica dell'esame morfologico delle urine, l'aspetto dell'automazione con le metodiche e le strumentazioni proposte che sono sempre più performanti, gli elementi distinguibili e quantificabili nel sedimento urinario con le relative patologie ad essi correlate e le specifiche modalità operative per l'esecuzione del test.

## **La corretta preparazione all'esame**

È fortemente raccomandato fornire adeguate informazioni ai pazienti circa le corrette modalità di raccolta dei campioni per l'analisi del sedimento. Dovrebbero essere, infatti, istruiti ad evitare:

- sforzi fisici intensi;
- sovraccarichi alimentari;
- rapporti sessuali nelle dodici ore precedenti;
- la raccolta durante il periodo mestruale, nella donna.

## **Campione utilizzato per l'analisi**

Dal momento che le urine costituiscono un campione biologico molto delicato, possono essere molteplici i criteri di non idoneità che rientrano nella fase preanalitica del flusso di lavoro (tipo di contenitore, adeguata igiene, corretta identificazione, adeguato volume ecc.).

Per assicurare un campione che sia maggiormente rappresentativo in termini di concentrazione di elementi figurati e al fine di ridurre al minimo le fonti di contaminazione, è importante che il

*campione* di urine sia quello raccolto con la prima minzione *del mattino, che la raccolta avvenga da mitto intermedio*, a seguito di lavaggio dei genitali esterni, e che il contenitore utilizzato sia ermetico; successivamente alla raccolta, per l'esecuzione dell'esame, il campione deve essere travasato in una provetta conica da 12 ml.

*Per garantire la correttezza del risultato, il campione deve essere esaminato entro due ore dalla raccolta*; tale periodo può, tuttavia, essere prolungato fino a quattro ore, previa conservazione in frigorifero a 5°C o, come alternativa, si potrà ricorrere all'utilizzo di sostanze preservanti.

In caso di refrigerazione il campione dovrà essere portato a temperatura ambiente ed agitato prima di effettuare l'analisi. È bene ricordare, però, che la realizzazione della catena del freddo fino al momento dell'analisi non è esente da criticità, in quanto la conservazione del campione a basse temperature può presentare risvolti sulla valutazione di alcuni elementi del sedimento urinario quali, per esempio, la formazione di precipitati (fosfati e/o urati amorfi).

L'analisi effettuata in tempi di conservazione che superano le quattro ore e su campioni di urina rimasti a temperatura ambiente, può comportare la formazione di artefatti, a seguito di modifiche dei caratteri fisici e chimici; sui campioni si possono, infatti, osservare modifica del pH e crescita batterica.

Inoltre, dal momento che in caso di urine ipotoniche gli elementi cellulari ed organizzati possono andare incontro ad una veloce degradazione, una tempistica allungata aumenta il rischio di andare incontro a risultati falsamente negativi.

Un altro punto fondamentale per garantire un risultato corretto è che gli operatori siano in grado di individuare gli eventuali contaminanti ed il grado di idoneità dei campioni consegnati in Laboratorio.

I contaminanti possono provenire da:

- utente che ha prodotto il campione (genitale, fecale, fibre tessili, fibre di cellulosa degli assorbenti, pannolini, carta igienica);
- ambiente esterno (pollini, cellule vegetali, spore fungine, fibre);
- Laboratorio, nella fase di preparazione ed esecuzione del campione (impurità presenti sul vetrino per l'osservazione microscopica, bolle d'aria prodotte presenti nel campione ecc.).

Il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, prima di processare il campione, deve valutare attentamente la sua idoneità per quanto concerne identificazione, volume, contenitore di raccolta, tempi e modalità di trasporto, tempi e modalità di conservazione. In relazione alle eventuali irregolarità riscontrate, si procederà definendo il campione non idoneo, comunicandolo nel referto, e si richiederà l'invio di un nuovo campione.

## **Tecniche di visione microscopica**

Tecniche di visione microscopica, classificabili in livelli, per identificare e quantificare gli elementi particolari nelle urine, sono:

1. *metodi rapidi*: microscopia estemporanea del campione nativo; sono test che dovrebbero fornire risposte in tempi brevi e possono essere eseguiti direttamente al letto del paziente. In tale ambito metodi rapidi possono consistere nell'osservazione di un preparato a fresco di urina nativa in campo chiaro con vetrini porta-oggetto e copri-oggetto tradizionali.
2. *Metodi di routine*: esame microscopico standardizzato del sedimento; si tratta di metodiche che vengono generalmente utilizzate per la diagnostica di routine nei Laboratori Analisi, ovvero la valutazione microscopica di preparati allestiti dopo centrifugazione del campione urinario, l'eliminazione del sovrantante, la risospensione delicata del sedimento e l'allestimento del vetrino da sottoporre a lettura.
3. *Metodi di comparazione*: conta degli elementi corpuscolati delle urine in camera citometrica effettuata su campione urinario non centrifugato; valutazione della flora batterica a seguito di centrifugazione, fissazione e colorazione secondo Gram. Tali metodiche sono più meticolose rispetto alle precedenti ed automatizzate, che richiedono Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico adeguatamente formati ed attrezzature analitiche complesse.
4. *Metodi di riferimento*: conta di leucociti, eritrociti, cellule epiteliali e cilindri in camera citologica.

## **Preparazione del campione e microscopia ottica manuale**

Raccomandazioni del NCCLS per l'esecuzione dell'esame sono:

- volume di partenza di 12 ml;
- centrifugazione per 5 minuti a 400 RCF;
- volume del sedimento consigliato di 0,5 ml;
- volume del sedimento esaminato costante, in base alla camera di conteggio utilizzata;
- osservazione al microscopio ottico a campo chiaro, passando da basso (10X) ad alto ingrandimento (40X);
- referto con terminologia, ordine della risposta e valori di riferimento standardizzati.

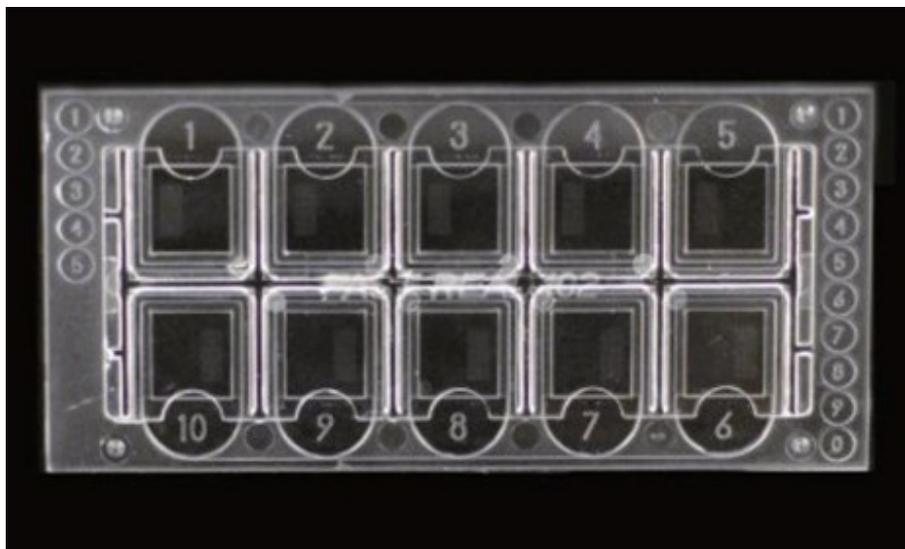
Come già anticipato i campioni di urine, per l'esecuzione dell'esame morfologico, dovranno essere contenuti in apposite provette da 12 ml e successivamente occorrerà sottoporre il campione a centrifugazione secondo tempi e velocità stabilite. Successivamente verrà eliminato accuratamente il

surnatante e risospeso il sedimento, agitandolo delicatamente, in modo da non danneggiare gli elementi presenti. A questo punto, per mezzo di una pipetta pasteur, deve essere disposta una goccia di urina in un'apposita griglia di lettura alloggiata su un vetrino Kova™ Glasstic™ Slide 10 (figura 1). Si tratta di un vetrino a 10 camere con una griglia di tipo emocitometro, che consente la conta microscopica di cellule e/o elementi corpuscolati presenti in un liquido biologico. Il prodotto è realizzato con un particolare tipo di plastica otticamente trasparente che presenta lo stesso indice di rifrazione del vetro.

Ogni vetrino è dotato di dieci pozzetti in cui, attraverso un'azione capillare, viene immessa una certa quantità di fluidi; le pareti di ciascun pozzetto impediscono la fuoriuscita dei campioni, escludendo così la possibilità di contaminazione reciproca.

L'utilizzo di questo dispositivo consente una distribuzione omogenea dei liquidi all'interno delle camere di conteggio, favorendo conte precise e riproducibili di cellule e/o di elementi presenti in ciascun campione.

Ciascuno dei 10 pozzetti presenta una griglia di lettura formata da 9 quadrati grandi che a loro volta sono suddivisi in 9 quadrati più piccoli, per un totale di 81 quadrati; il volume dell'intero pozzetto risulta essere di 10  $\mu$ L, mentre il volume della griglia di lettura è di 1  $\mu$ L. La conta degli elementi presenti quindi nell'intera griglia (81 quadrati) fornisce il risultato in termini di *n° di elementi/ $\mu$ L*.



*Figura 1 - Kova™ Glasstic™ Slide 10*

Sebbene l'analisi del sedimento urinario mediante microscopia ottica abbia rappresentato per molti anni e continui a rappresentare il gold standard, oggi, con l'avvento delle nuove tecnologie, anche questo ambito diagnostico è stato "surclassato" dal processo di modernizzazione anche se in determinati contesti lavorativi e in particolari situazioni conserva comunque la sua validità.

L'automazione ha permesso, infatti, di superare alcuni limiti intrinseci al sistema di lettura manuale, quali l'impegno non trascurabile richiesto in termini di tempi di lavoro e soprattutto la scarsa standardizzazione del metodo essendo inevitabilmente influenzato dalla soggettività dell'operatore. D'altro canto, il primo analizzatore automatico del sedimento urinario fu descritto in letteratura medica già nel 1985 e, dagli studi effettuati, emerse che aveva buone prestazioni e fu proposto come un'alternativa al microscopio manuale.

Attualmente le strumentazioni disponibili sul mercato hanno raggiunto un buon grado di affidabilità analitica; le metodologie analitiche a disposizione si basano su tre differenti principi di funzionamento:

1. **Microscopia automatizzata:** il campione viene miscelato ed omogeneizzato tramite aria soffiata attraverso un ago campionario; successivamente un'aliquota di urina viene dispensata in una cuvetta di lettura monouso. La cuvetta viene, quindi, posizionata all'interno di una centrifuga integrata nello strumento per essere centrifugata a 2000 giri per 10 secondi, al fine di favorire la sedimentazione degli elementi sospesi nell'aliquota urinaria e la formazione di un film liquido. Al termine di questi passaggi il film viene letto automaticamente a 400X con un microscopio ottico in campo chiaro, la cui fonte luminosa è costituita da un led verde ad alta potenza, che consente di riconoscere gli elementi grazie alle loro caratteristiche morfologiche. Al termine della lettura vengono automaticamente selezionate le 15 immagini migliori scattate dalla fotocamera incorporata e, attraverso il confronto con le migliaia di immagini contenute nel database interno al software, lo strumento è in grado di fornire una prima interpretazione degli elementi visualizzati.
2. **Cattura di immagini:** gli elementi dispersi nel campione di urina vengono incanalati in un flusso laminare in modo tale da poter essere esposti singolarmente al piano focale del microscopio; la sorgente luminosa è rappresentata da una lampada stroboscopica. Successivamente, attraverso una camera digitale miniaturizzata integrata all'interno dello strumento, i singoli elementi vengono fotografati; i fotogrammi vengono, a loro volta, confrontati con migliaia di immagini memorizzate in uno specifico software e, a conclusione di questo processo, si ottiene una classificazione delle diverse particelle i cui criteri sono rappresentati da dimensione, forma, contrasto e contenuto di ciascun corpuscolo.
3. **Citometria a flusso:** il campione di urina viene dapprima colorato con due fluorocromi, uno per i batteri e l'altro per i leucociti e le cellule simili ai lieviti. Successivamente, lo stesso viene sottoposto ad un processo di focalizzazione idrodinamica, al fine di incanalare singolarmente ciascun elemento e/o cellula. A questo punto il campione viene fatto passare

attraverso due distinte celle a flusso, e sottoposto al fascio luminoso di un laser a diodi; la deviazione della luce (*scatter*) generata al passaggio delle particelle e/o microorganismi è di due differenti tipologie, ovvero frontale e laterale; inoltre, i due fluorocromi, con cui il campione è stata colorato, sono in grado di emettere luce fluorescente a seguito dell'eccitazione fornita dal raggio laser. La deviazione del raggio luminoso è rappresentativa della forma e delle dimensioni della particella colpita, mentre la fluorescenza descrive il contenuto cellulare. I parametri rilevati vengono trasformati in segnali elettrici ed analizzati tramite algoritmi matematici che consentono l'identificazione degli elementi presenti.

## Esempi di strumentazione

- **Cobas u 601 (Roche)**

L'analizzatore per urine *Cobas u 601* (figura 2) è un sistema completamente automatizzato per l'analisi delle strisce reattive delle urine. Sfruttando strisce di qualità e la tecnologia fotometrica è in grado di fornire risultati estremamente affidabili. È in grado di processare 240 campioni/ora e possiede una capacità di caricamento di 75 campioni (15 rack con 5 campioni/rack).



*Figura 2 - Analizzatore cobas u 601.*

- **CLINITEK AUWi System (Siemens)**

Il sistema *CLINITEK AUWi System* (figura 3) combina due analizzatori per urine con un'interfaccia software semplice da utilizzare:

- *CLINITEK Atlas Automated Urine Chemistry Analyzer*: analizzatore affidabile, in grado di caricare 490 test per volta e che standardizza l'interpretazione dei risultati;

- *Sysmex UF-1000i Urine Cell Analyzer*: analizzatore che standardizza e fornisce risultati quantitativi dei sedimenti urinari, ovviando alla variabilità dovuta ad operatori diversi.



*Figura 3 - CLINITEK AUWi System.*

- **UF 5000/4000 (Dasit)**

L'analizzatore UF 5000/4000 (figura 4) è utilizzato per l'analisi della frazione corpuscolata delle urine. Si tratta di un sistema analitico da banco che, tramite tecnologia citofluorimetrica, permette la determinazione quantitativa dei principali elementi presenti nelle urine. L'analisi è eseguita in maniera completamente automatizzata, con tutte le fasi completamente standardizzate.



Figura 4 Analizzatore UF 5000/4000.

## Elementi del sedimento urinario

Di seguito sono riportati gli elementi che si possono identificare e contare tramite l'analisi del sedimento urinario.

- **Cellule**

Nelle normali urine è consuetudine il riscontro di un numero variabile di cellule, provenienti in particolare dagli strati superficiali dell'epitelio transizionale e, specie nelle donne, dall'epitelio squamoso. L'evidenza di abbondanti cellule, soprattutto degli strati medi e profondi, è segno di fenomeni infiammatori; quella invece di grandi quantità di cellule renali libere e/o incluse in cilindri, di patologia renale infettiva o degenerativa; di corpi renali grassi, di nefrosi. Nelle urine sono riscontrabili essenzialmente: cellule epiteliali tubulari renali, dell'epitelio transizionale e squamose.

Gli *eritrociti* sono generalmente scarsi nel sedimento. Possono essere riscontrati per: infiammazione, danneggiamento, patologie renali e del tratto urinario, raccolta errata del campione (in presenza di emorroidi e ciclo mestruale). La loro quantità consistente (*ematuria franca*) può avere significato patologico.

I *leucociti*, come nel caso degli eritrociti, normalmente sono scarsi. Il loro aumento può dipendere da infezioni o infiammazioni delle vie urinarie o da contaminanti (originati, ad esempio, dalle secrezioni vaginali). La loro quantità consistente dà alle urine aspetto lattescente (*piuria*).

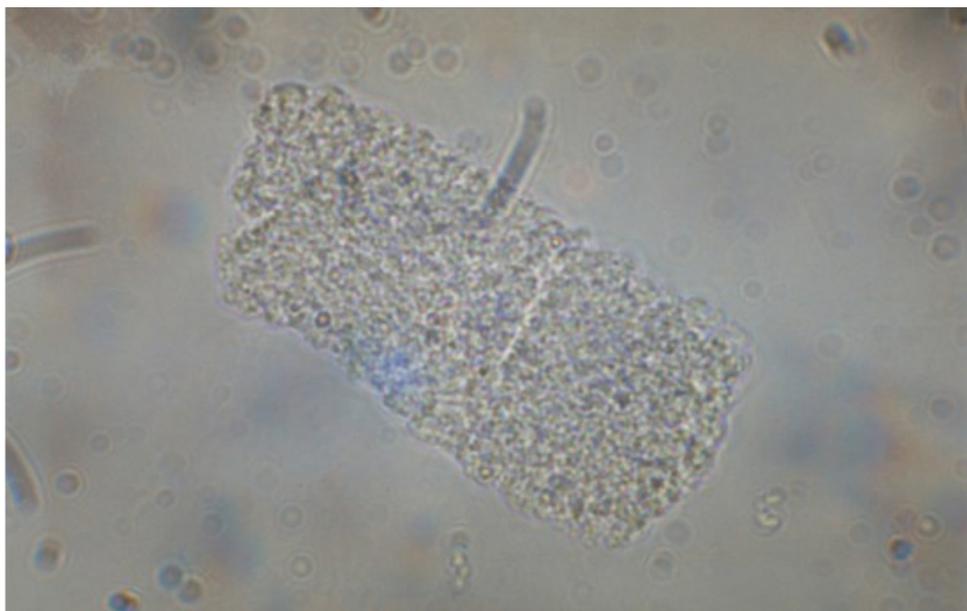
Le *cellule epiteliali* (figura 5) sono anch'esse generalmente poche, provenienti dalla vescica (cellule epiteliali transizionali) o dall'uretra esterna (cellule epiteliali squamose). Il riscontro in numero elevato si ha in caso di infezioni, infiammazioni e neoplasie a carico delle vie urinarie.



*Figura 5 - Cellule epiteliali basse vie nel sedimento urinario.*

- **Cilindri**

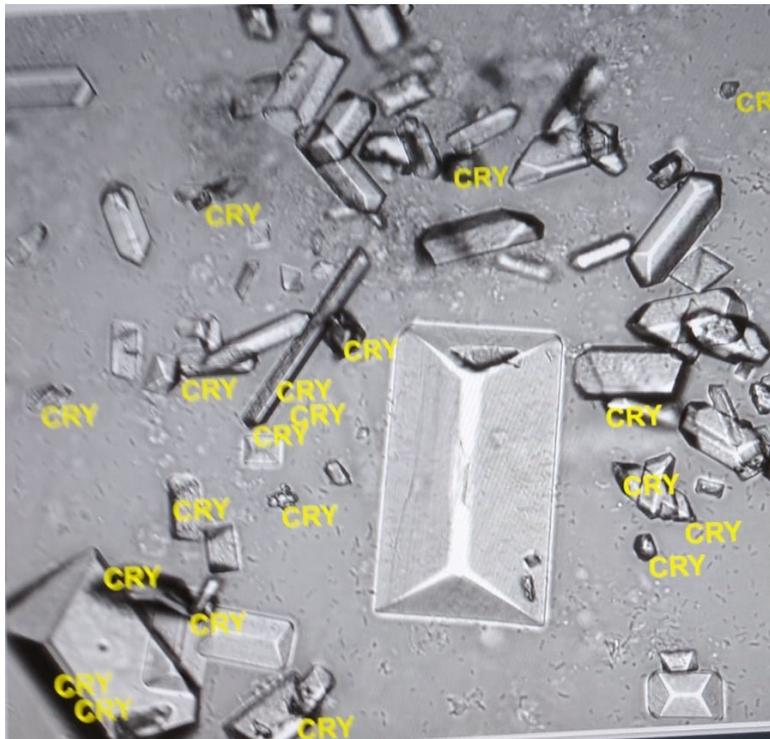
I cilindri sono elementi del sedimento urinario, che si formano dalla precipitazione di proteine di origine globulare e/o tubulare, in presenza di un'elevata concentrazione ed un pH basso delle urine. Il loro riscontro può essere segno di patologia renale diffusa o localizzata, di sforzi fisici o stati febbrili occasionali. Possono essere: *ialini*, *granulosi* (figura 6), *ialino-granulosi*, *cellulari* (leucocitari, eritrocitari, epiteliali, misti), *cerei*, *con inclusioni lipidiche o ematici*.



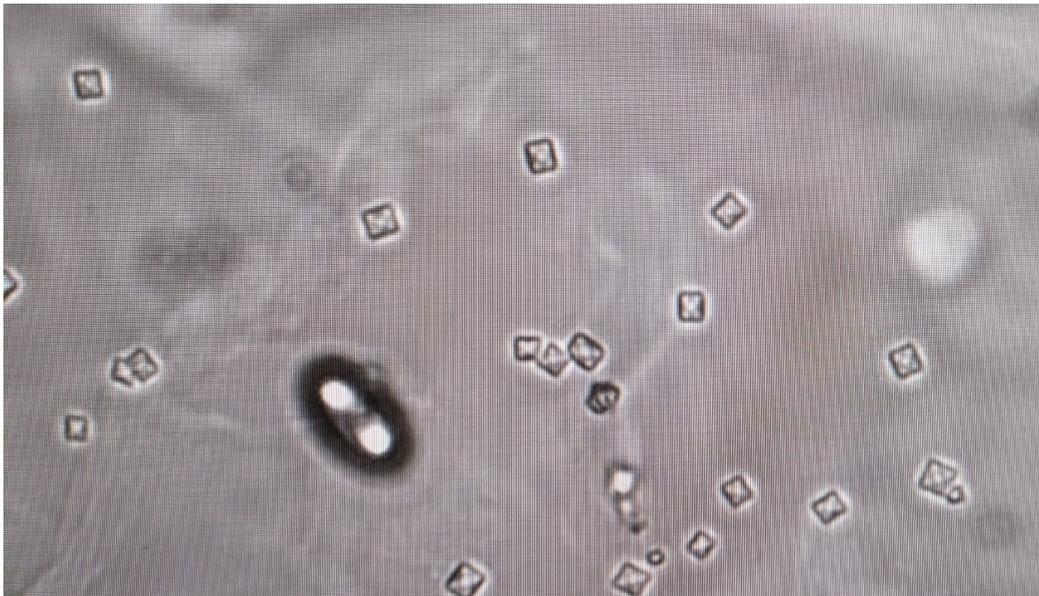
*Figura 6 - Cilindro granuloso nel sedimento urinario.*

- **Cristalli**

A seguito di variazioni di temperatura e pH, la maggior parte dei cristalli presenti precipita nelle urine a seguito della minzione. Va riservata attenzione alla grandezza più che al numero dei cristalli presenti nelle urine. Cristalli come cistina, tirosina, leucina ecc. assumono significato patologico. Cristalli che possono essere determinati nelle urine sono dunque: *urati amorfi, di ammonio, acido urico* (figura 9), *fosfato di calcio, fosfato triplo* (figura 7), *solfato di calcio, carbonato di calcio, ossalato di calcio* (figura 8), *colesterolo, bilirubina, acido ippurico, cistina, xantina, tirosina e leucina*.



*Figura 7 - Cristalli di triplo fosfato*



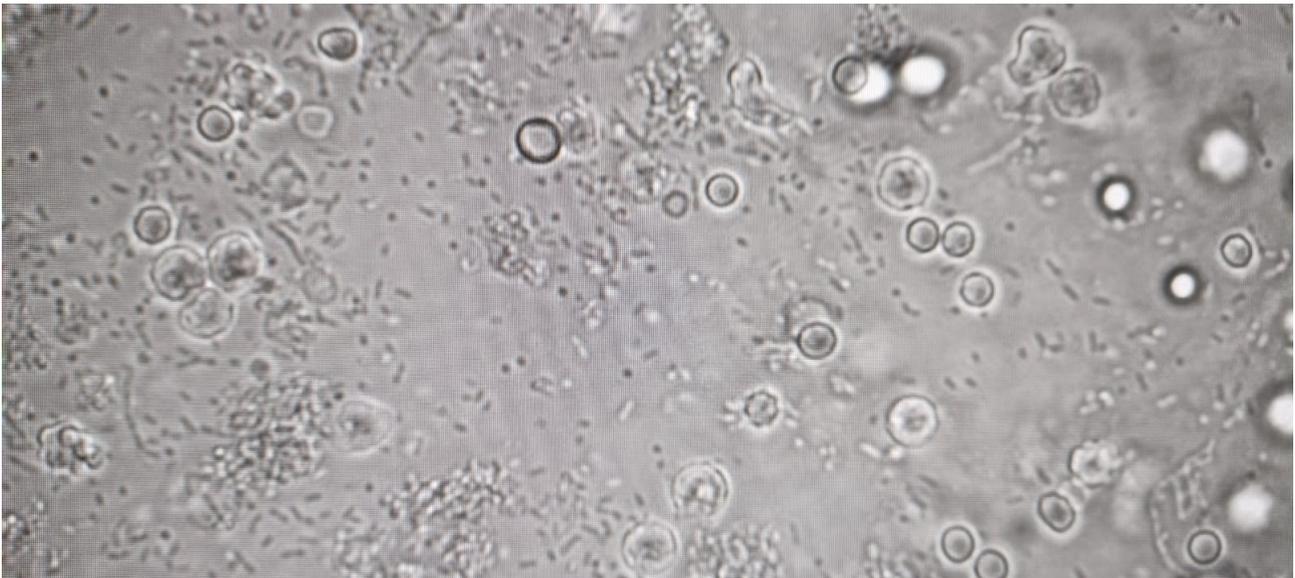
*Figura 8 - Cristalli di ossalato diidrato e monoidrato nel sedimento urinario.*



*Figura 9 - Cristalli di acido urico nel sedimento urinario.*

- **Batteri**

La presenza di batteri nelle urine (figura 10) deve far sospettare un'infezione dell'apparato urinario; spesso si uniscono leucocituria ed urine torbide con odore ammoniacale. La batteriuria, tuttavia, può essere conseguenza di una cattiva raccolta del campione (no mitto intermedio) o di inquinamento di quest'ultimo. Nelle urine non esaminate entro tempi brevi o che rimangono per ore a temperatura ambiente quei pochi batteri presenti, eliminati dal soggetto normale, si riproducono attivamente. Talvolta possono essere presenti in numero tale da comporre aggregati di dimensioni varie, che possono essere confusi con cristalli amorfi ammassati.



*Figura 10 - Eritrociti, leucociti e batteri nel sedimento urinario.*

- **Miceti**

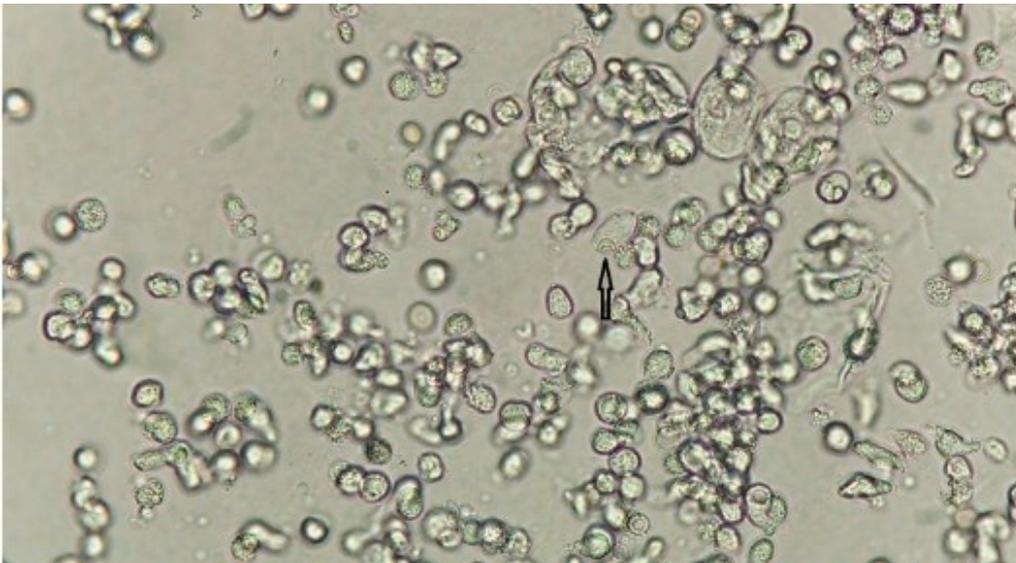
Spesso i miceti (figura 11) non assumono significato patologico, se non nei soggetti diabetici o immunodepressi; in quest'ultimi spesso si ha infezione da Candida.



*Figura 11 - Miceti nel sedimento urinario.*

- **Protozoi**

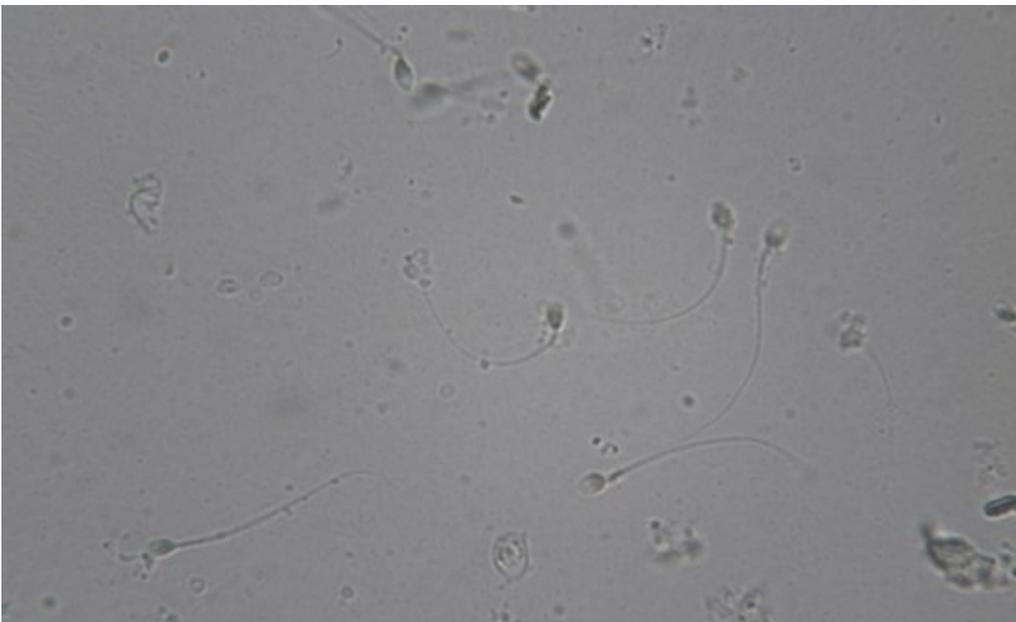
Il protozoo più frequente nelle urine è il *Trichomonas* (figura 12), di forma rotondeggiante o piriforme e con dimensioni variabili e consistenti, presente in genere per contaminazione con secreto vaginale. Il *Trichomonas* può essere causa di infezione vescicale ed uretrale.



*Figura 12 - Trichomonas nel sedimento urinario.*

- **Spermatozoi**

La presenza di spermatozoi (figura 13) nelle urine maschili è legata a crisi epilettica, malattia dell'organo genitale e spermatorrea. Essa può essere conseguenza anche di un rapporto sessuale in entrambi i sessi.



*Figura 13 - Spermatozoi nel sedimento urinario.*

- **Muco**

La sua presenza non è di significato patologico; indica perlopiù uno stato irritativo delle mucose urinarie.

## Conclusioni

L'argomento dell'esame morfologico dell'urina è realmente vasto e questo articolo sicuramente non lo esaurisce.

Si può affermare, senza ombra di dubbio, che è di fondamentale importanza ricevere il campione in laboratorio in perfette condizioni di integrità e conservazione per una corretta esecuzione del test.

Il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico svolge un ruolo chiave a cominciare dai primi istanti in cui il campione giunge in laboratorio. A tutti gli effetti si occupa di fare una prima valutazione che riguarda l'idoneità del campione e successivamente procede con la processazione dello stesso attraverso le varie fasi che riguardano l'esecuzione del test fino all'allestimento del vetrino che viene sottoposto all'osservazione del clinico nell'analisi manuale.

Nonostante l'avvento delle nuove tecnologie rappresenti una svolta cruciale per l'esame morfologico delle urine, ovvero nella lettura dei sedimenti urinari, poiché in un'ottica di riduzione dei tempi e di processazione di un'elevata numerosità di campioni è oramai indispensabile l'ausilio di tecniche automatizzate, l'osservazione effettuata dall'occhio umano al microscopio risulta essere sempre e comunque un baluardo da preservare perché l'esperienza del clinico offre un valore aggiunto notevole all'esecuzione del test.

Risulta oltretutto importante non sottovalutare clinicamente l'esame delle urine poiché fornisce un insieme di informazioni specifiche che riguardano la natura, l'evoluzione dell'attività e la sede delle patologie che possono insorgere a carico dei reni e/o dell'apparato urinario.

Nello specifico l'esame morfologico, grazie ad una meticolosa analisi delle cellule contenute nel sedimento, si rivela decisamente prezioso a livello diagnostico fornendo indicazioni chiare o aprendo la strada ad ulteriori accertamenti che confermano la sua importanza a livello clinico.

## Bibliografia

1. <https://labtestsonline.it/lto-tests/esame-chimico-fisico-e-microscopico-delle-urine.html#:~:text=L'esame%20chimico%20fisico%20e%20microscopico%20dell'urina%20viene%20utilizzato,urina%2C%20quali%20proteine%20o%20glucosio>
2. F. Manoni, G. Gessoni et al., *Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: proposte di linee guida per la fase analitica del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU)*, *Biochimica Clinica*, 2016, vol. 40, n. 4, pp. 352-382.
3. <https://digilander.libero.it/sorgia/page002.html>
4. <https://www.med4.care/esame-chimico-fisico-microscopico-delle-urine/>
5. <https://www.michelerotunno.com/index.html>
6. T. Ramos, *L'esame morfologico dell'urina*, *Riv Med Lab*, 2002, vol. 3, n.1.
7. E. Gulletta, I. Antonozzi, *Medicina di laboratorio, logica e patologia clinica*, 2019.
8. F. Manoni, A. Caleffi et. al., *L'esame delle urine chimico morfologico e colturale: proposta di linea guida per una procedura standardizzata della fase preanalitica*. SIPMeL, 2011.
9. V. Miconi, B. Brando et al., *Raccomandazioni della Federazione Italiana della Società di Medicina di Laboratorio (FISMeLab) per il trasporto del materiale biologico*. *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio*, 2019.
10. <https://www.diagnolab.com/product/urine-microscopic-sediment-test-slides-kova-slides>
11. O. Aspevall, H. Hallander, V. Gant, T. Kouri, *European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID*. 2002.
12. G.B. Fogazzi, G. Garigali, *The Urinary Sediment by sediMax conTRUST PRO. A whole new way of examining urinary sediment*. 2020.
13. <https://diagnostics.roche.com/it/it/products/instruments/cobas-u-601-ins-2790.html#productInfo>
14. <https://www.siemens-healthineers.com/it/urinalysis/systems/clinitek-auwi-system>
15. <https://dasit.it/it/prodotti/analisi-urine>