

De la nécessité d'un traitement pré-analytique des urines pour les dosages de calcium, phosphate et acide urique ?

Is a pre-analytical process for urinalysis required?

Morgane Petit

Jean-Louis Beaudeau

Sandrine Majoux

Carole Hennequin

Service de biochimie générale,
Hôpital universitaire Necker-Enfants
malades, AP-HP, Paris, France
<carole.hennequin@aphp.fr>

Résumé. Pour des dosages urinaires fiables de calcium, phosphate et acide urique, il est recommandé de requérir à un traitement pré-analytique des urines au laboratoire par un acide ou par une base afin de dissoudre les solutés précipités après le recueil urinaire. Plusieurs études menées sur différents types d'échantillons et automates ont préalablement démontré que ce traitement n'était pas nécessaire. L'objectif de notre travail a été d'étudier la nécessité du traitement pré-analytique des échantillons urinaires prélevés sur système V-Monovette® (Sarstedt) et dosés sur analyseur Architect C16000, Abbott Diagnostics. Soixante échantillons urinaires de patients hospitalisés ont été sélectionnés (n = 30 pour le dosage de calcium et phosphate, et n = 30 pour le dosage d'acide urique). Après respectivement acidification des échantillons urinaires pour les dosages de calcium et phosphate et alcalinisation pour le dosage d'acide urique, les différences de concentration de ces analytes avant et après traitement ont été confrontées aux limites d'acceptabilité proposées par la Société française de biologie clinique (SFBC). Pour le calcium et l'acide urique, aucune différence de concentration après respectivement acidification et alcalinisation ne s'écarte des normes d'acceptabilité de la SFBC. Pour le dosage du phosphate, un seul échantillon sort de ces limites d'acceptabilité, donnant paradoxalement un résultat inférieur après acidification. En conclusion, et en accord avec de précédentes études, les résultats présentés montrent que l'acidification/alcalinisation d'échantillons urinaires de 24 h ou de miction n'est pas une nécessité pré-analytique pour les dosages de calcium, phosphate et acide urique par la méthodologie analytique utilisant les réactifs Abbott Diagnostics.

Mots clés : acidification, alcalinisation, traitement pré-analytique, urines

Abstract. For the reliable urinary measurement of calcium, phosphate and uric acid, a pre-analytical process by adding acid or base to urine samples at laboratory is recommended in order to dissolve precipitated solutes. Several studies on different kind of samples and analysers have previously shown that a such pre-analytical treatment is useless. The objective was to study the necessity of pre-analytical treatment of urine samples collected using the V-Monovette® (Sarstedt) system and measured on the analyser Architect C16000 (Abbott Diagnostics). Sixty urinary samples of hospitalized patients were selected (n=30 for calcium and phosphate, and n=30 for uric acid). After acidification of urine samples for measurement of calcium and phosphate, and alkalinisation for measurement of uric acid respectively, differences between results before and after the pre-analytical treatment were compared to acceptable limits recommended by the French society of clinical biology (SFBC). No difference in concentration between before and after pre-analytical treatment of urine samples exceeded acceptable limits from SFBC for measurement of calcium and uric acid.

Article reçu le 04 décembre 2016,
accepté le 15 février 2017

Tirés à part : C. Hennequin

Pour citer cet article : Petit M, Beaudeau JL, Majoux S, Hennequin C. De la nécessité d'un traitement pré-analytique des urines pour les dosages de calcium, phosphate et acide urique ? *Ann Biol Clin* 2017 ; 75(5) : 519-24 doi:10.1684/abc.2017.1271

For phosphate, only one sample exceeded these acceptable limits, showing a result paradoxically lower after acidification. In conclusion, in agreement with previous study, our results show that acidification or alkalinisation of urine samples from 24 h urines or from urination is not a pre-analytical necessity for measurement of calcium, phosphate and uric acid.

Key words: acidification, alkalinisation, pre-analytical treatment, urinalysis, urine

Les dosages de calcium, phosphate et acide urique dans les urines permettent d'évaluer l'excrétion urinaire et de mettre en évidence des anomalies du métabolisme phosphocalcique. En outre, associés et déterminés de façon répétée, ils fournissent une estimation du risque cristallurique et de suivre le patient lithiasique, ces solutés étant les trois promoteurs principaux de la lithogénèse [1].

Pour des dosages fiables de la calciurie et de la phosphaturie, il est préconisé de réaliser une acidification de l'échantillon urinaire préalablement à l'étape analytique, soit par un recueil dans un récipient contenant de l'acide, soit par ajout au laboratoire d'une solution acide en faible volume. Pour le dosage de l'uricurie, l'addition d'une base permet de dissoudre les solutés précipités [2, 3].

Suite à un audit interne technique effectué au laboratoire en juin 2016 dans le cadre de l'accréditation par le Comité français d'accréditation (Cofrac), l'absence d'acidification/alkalinisation des urines préconisée par notre fournisseur de réactifs Abbott Diagnostics (sur analyseur C16000) pour certains paramètres urinaires a été relevée et considérée écart non critique. Des études menées sur des automates Roche Diagnostics (sur analyseurs Modular P800 et Cobas c701) [4, 5], Olympus (analyseur AU 640) [6] ou Siemens (analyseur Advia 2400) [7] ont préalablement démontré que l'acidification/alkalinisation des urines pour le dosage de calcium et phosphate ou acide urique n'est pas nécessaire : en revanche, à notre connaissance, aucune étude similaire sur des analyseurs Abbott Diagnostics n'a encore été menée.

L'utilisation de système type V-Monovette® (Sarstedt), qui comporte un dispositif intégré sous vide pour l'échantillonnage de l'urine par transfert clos depuis le flacon de collecte vers un tube, est largement répandue aujourd'hui en milieu hospitalier de par sa facilité d'utilisation et ses conditions optimales d'hygiène. De plus, au niveau du laboratoire, les échantillons sont ainsi directement transférables sur les automates. L'objectif de notre travail a été d'étudier la nécessité du traitement pré-analytique sur des échantillons urinaires prélevés sur ce type de récipient, pour le dosage de calcium, phosphate et acide urique urinaire sur analyseur Architect C16000 Abbott Diagnostics, utilisant les réactifs du même fournisseur.

Matériels et méthodes

Pour le dosage du calcium et du phosphate urinaires, 30 échantillons ont été sélectionnés en fonction de leur niveau de concentration en calcium : 15 échantillons présentant une concentration inférieure à 3,8 mmol/L, et 15 échantillons présentant une concentration supérieure ou égale à 3,8 mmol/L, seuil défini pour l'hypercalciurie de concentration. En effet, un accroissement significatif du risque cristallurique pour les espèces calcium-dépendantes est observé au-delà de ce seuil en raison de la sursaturation en calcium urinaire [8].

Pour l'acide urique urinaire, 30 échantillons ont été sélectionnés en fonction de leur niveau de concentration en acide urique : 15 échantillons présentant une concentration inférieure à 2,5 mmol/L et 15 échantillons présentant une concentration supérieure ou égale à 2,5 mmol/L (seuil d'hyperuricurie de concentration) [1].

Les échantillons urinaires ont été préalablement centrifugés, puis dosés selon le circuit habituel du laboratoire sur Architect C16000 (Abbott Diagnostics). Les méthodes de dosage des analytes étudiés sont les suivantes : méthode colorimétrique en point final utilisant la complexation avec l'arsenazo III pour le calcium urinaire, méthode photométrique à 340 nm utilisant la complexation avec le molybdate d'ammonium pour le phosphate urinaire et une méthode photométrique à 604 nm en point final après réaction de Trinder avec le couple uricase-peroxydase pour l'acide urique urinaire.

Sur les mêmes échantillons urinaires, l'acidification pour le dosage du calcium et du phosphate a été réalisée par ajout de 70 µL d'HCl 6 N pour 5 mL d'urine, pour cibler un pH inférieur à 2 comme recommandé par le fournisseur et par les études précédentes, notamment pour assurer la dissolution des cristaux d'oxalate de calcium [2]. Après homogénéisation, le pH a été vérifié par bandelettes réactives, et si nécessaire ajusté pour obtenir le pH ciblé. L'alkalinisation des échantillons urinaires pour le dosage de l'acide urique a été réalisée par ajout de 50 µL de NaOH 5 % pour 5 mL d'urine, pour cibler un pH supérieur à 8. De même, après homogénéisation, le pH a été vérifié par bandelettes réactives, et si nécessaire ajusté pour obtenir le pH ciblé. Tous les échantillons urinaires prétraités ont ensuite été centrifugés et dosés à nouveau sur le même automate, dans un délai de 3 h maximum après le premier dosage.

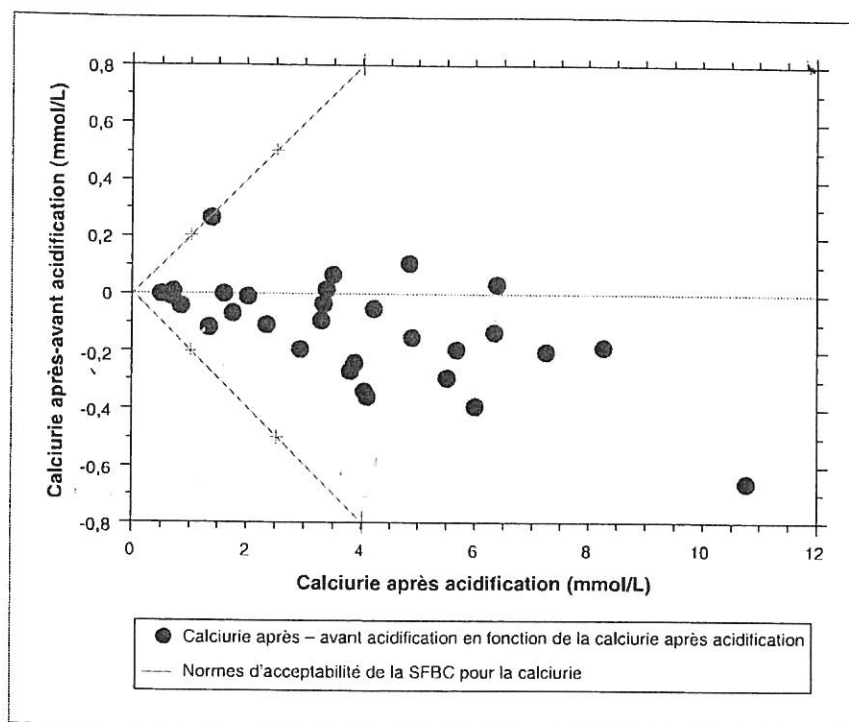


Figure 1. Diagramme des différences pour la calciurie après – avant acidification.

Les résultats obtenus ont été traités selon le protocole de validation de technique de la Société française de biologie clinique (SFBC) [9] : droite de corrélation et mesure de l'inexactitude par le graphique des différences pour l'ensemble des spécimens, et confrontés aux limites d'acceptabilité proposées par la SFBC [10]. Un échantillon donnant un résultat en dehors de ces limites d'acceptabilité est qualifié de déviant.

Résultats

Calcium

Les concentrations urinaires en calcium des échantillons étudiés non acidifiés s'étendent de 0,5 mmol/L à 11,42 mmol/L. La régression linéaire de la concentration en calcium avant et après acidification montre une très bonne corrélation sur toute la gamme de concentration étudiées ($r = 0,998$). Aucun déviant n'a été observé : après traitement pré-analytique, aucun échantillon n'a donné de résultat au-delà des normes d'acceptabilité définies dans la littérature par la SFBC (figure 1). Aucune différence significative entre la mesure du calcium avant et après acidification n'est mise en évidence pour les calciuries inférieures au seuil de 3,8 mmol/L ($p = 0,18$). En revanche, pour les calciuries supé-

rieures ou égales à 3,8 mmol/L, une différence significative est observée ($p < 0,01$), avec des résultats inférieurs obtenus après acidification.

Phosphate

Sans acidification, les concentrations urinaires de phosphate des échantillons étudiés s'étendent de 1,55 mmol/L à 55 mmol/L. La régression linéaire de la concentration en phosphate avant et après acidification montre une très bonne corrélation ($r = 0,998$). Le diagramme des différences montre un seul déviant, mais dont la valeur après acidification est inférieure à la valeur observée avant acidification (figure 2).

Acide urique

Sans alcalinisation, les concentrations urinaires de l'acide urique des échantillons étudiés s'étendent de 0,5 mmol/L à 7,3 mmol/L. Il existe une très bonne corrélation entre la concentration d'acide urique avant et après alcalinisation ($r = 0,999$), et aucun déviant n'est observé (figure 3). Aucune différence significative n'est mise en évidence après alcalinisation lorsque l'uricurie est inférieure au seuil de 2,5 mmol/L ($p = 0,12$). En revanche, une différence significative est observée lorsque l'uricurie est supérieure à 2,5 mmol/L ($p < 0,01$).

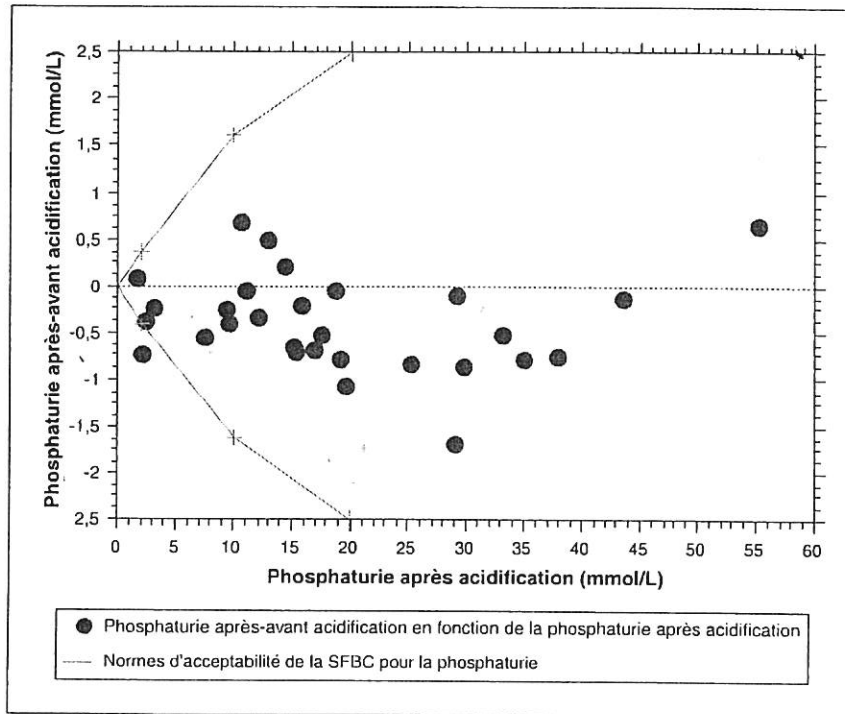


Figure 2. Diagramme des différences pour la phosphaturie après – avant acidification.

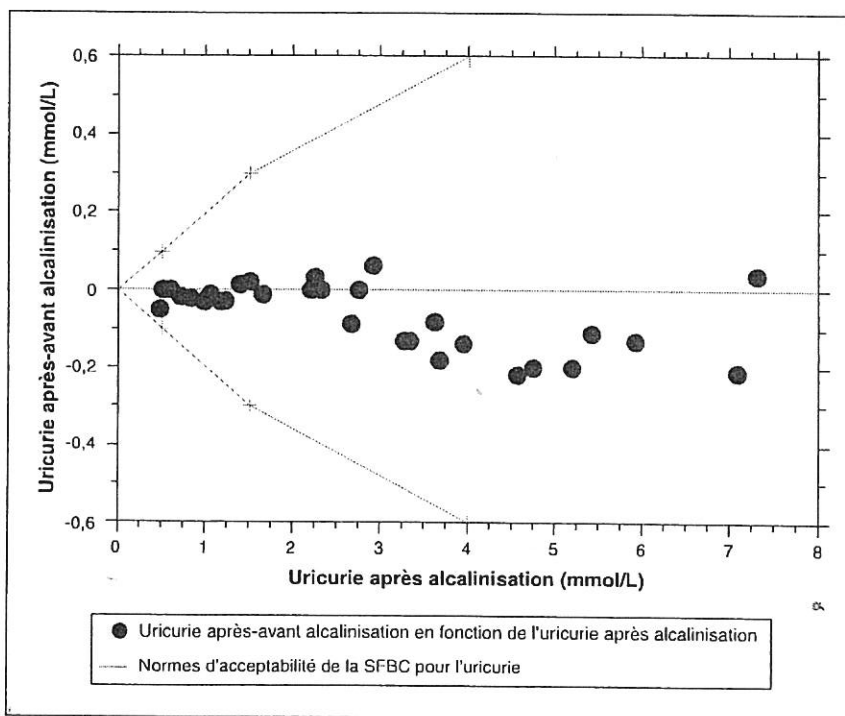


Figure 3. Diagramme des différences pour l'uricurie après – avant alcalinisation.

Discussion

La solubilité de nombreux composants des cristaux urinaires dépend du pH. Lorsque l'urine est alcaline, phosphate et urate ont tendance à précipiter facilement. En revanche lorsque l'urine est acide (pH < 5,5), c'est l'acide urique qui cristallise [1]. L'oxalate de calcium lui précipite facilement lorsque les urines sont conservées plusieurs heures *ex vivo*, et peut être dissous par acidification forte des urines. De ce fait, prenant en compte ce phénomène de cristallisation pour le dosage urinaire du calcium, du phosphate et de l'acide urique, il est recommandé de se placer dans des conditions auxquelles ces solutés sont le plus solubles afin de limiter toute sous-estimation dans le résultat du dosage. Si le recueil des urines dans un flacon contenant de l'acide est encore recommandé dans les fiches techniques des fournisseurs, cette méthode de recueil n'est pas appliquée en pratique courante, d'une part à cause du risque pour le patient et, d'autre part, parce qu'il ne peut être utilisé pour le dosage de l'acide urique ou d'autres analytes tels que le sodium et le potassium, ceci multipliant les collections urinaires. Le traitement pré-analytique des urines au laboratoire reste préconisé, bien que sujet à controverse. En outre, l'addition d'un acide ou d'une base aux échantillons urinaires au niveau du laboratoire représente de nombreux inconvénients : risque pour le technicien, dilution des échantillons, consommation de temps et nécessité d'un espace de prétraitement des échantillons. Par ailleurs, en milieu hospitalier, aujourd'hui les systèmes type V-Monovette® (Sarstedt), sont largement répandus de par leur facilité d'utilisation et leurs conditions optimales d'hygiène. En effet, ils disposent d'un dispositif intégré sous vide pour l'échantillonnage de l'urine par transfert clos depuis le flacon de collecte vers un tube, ce tube étant directement utilisable sur les automates, sans manipulation supplémentaire. Le fait de prétraiter les échantillons urinaires s'appuie sur des études anciennes telles que celles de Ng *et al.* [3]. Si ces auteurs recommandent d'acidifier ou d'alcaliniser les urines, les résultats ne mettent pas en évidence de différence significative sur urine fraîche (dosage dans les 6 h) ou conservée 24 h pour le calcium entre échantillon acidifié et non acidifié. Les différences observées pour les dosages de calcium et d'acide urique avec ou sans prétraitement des échantillons ne sont significatives qu'après 24 h pour l'acide urique et 48 h pour le calcium. De même, des études récentes ont démontré que l'acidification/alcalinisation pré-analytique des urines n'était pas nécessaire pour les dosages de calcium, phosphate et acide urique, à condition que les échantillons soient analysés rapidement après réception [4, 6, 7, 11, 12], ce qui est le cas dans les laboratoires de biologie aujourd'hui. Cependant, il faut noter que les échantillons urinaires analysés dans le cadre de ces études provenaient de sujets

sains [7, 11, 12] ou de patients dont les concentrations urinaires en calcium n'excédaient pas 4 mmol/L. De même, les concentrations urinaires en acide urique de ces patients étudiés étaient faibles. Or il faut garder à l'esprit que le risque de sous-estimer un résultat est plus important chez les patients lithiasiques, car ils présentent des concentrations urinaires élevées en calcium, phosphate et acide urique. D'ailleurs, l'étude de Pratumvinit *et al.* [5], a montré que les concentrations urinaires de calcium et phosphate sont significativement différentes après acidification uniquement pour les échantillons présentant des cristaux. Dans cette étude, les dosages ont été réalisés avec la méthodologie et sur l'analyseur Modular P800 (Roche Diagnostics). Pour confronter notre travail à ces données de la littérature, nous avons donc sélectionné des échantillons urinaires (n = 15) dont les concentrations en calcium et acide urique étaient supérieures au seuil de risque cristallogène, respectivement 3,8 mmol/L pour le calcium (valeur maximale : 11,4 mmol/L) et 2,5 mmol/L pour l'acide urique (valeur maximale : 7,3 mmol/L).

Concernant les valeurs de calcium et d'acide urique urinaires, aucun déviant n'a été mis en évidence. Autrement dit, après traitement pré-analytique, aucun échantillon n'a donné de résultat au-delà des normes d'acceptabilité définies dans la littérature par la SFBC [10], ces dernières prenant en considération la variabilité analytique et biologique (intra et/ou interindividuelles). Un déviant a été observé pour le phosphate urinaire, donnant contre toute attente un résultat de phosphaturie inférieur après acidification. Ce résultat paradoxal ponctuel a déjà été rapporté dans l'étude de Pratumvinit *et al.* [5].

En accord avec nos résultats, l'étude de Pratumvinit *et al.* [5] montre également que le biais observé entre les dosages de calcium et de phosphate urinaire après acidification pour les urines présentant des cristaux reste inférieur à la différence critique obtenue à partir des résultats du contrôle de qualité et de la variation biologique individuelle, suggérant donc l'absence d'impact sur l'interprétation clinique du résultat. Cependant, dans le cadre d'une étude de cristallurie sur la première miction de la journée recueillie dans sa totalité, l'acidification peut être recommandée pour le dosage du calcium afin de confirmer l'abondance de cristaux d'oxalate de calcium et d'aider au diagnostic étiologique. En effet, il a été montré que les concentrations urinaires en calcium sont diminuées en l'absence d'acidification lorsque l'urine comporte une surcharge en oxalate (hyperoxalurie) [13]. Mais il s'agit d'un contexte spécifique de dosage de la calciurie dans le cadre d'une cristallurie d'oxalate de calcium.

Conclusion

La détermination isolée de la calciurie, de la phosphaturie ou de l'uricurie sur les urines de 24 h ou sur une

Article original

miction est d'intérêt clinique limité, ne constituant en aucun cas un élément diagnostique. En revanche, l'association de leur dosage permet une évaluation du risque lithiasique. Différentes procédures de traitements pré-analytiques pour le dosage de ces analytes sont préconisées, mais difficilement applicables en routine courante au laboratoire. Les résultats présentés dans ce travail en utilisant la méthodologie de dosage Abbott Diagnostics, en accord avec des travaux précédents ayant utilisé des méthodologies d'autres fournisseurs (Roche Diagnostics, Olympus, Siemens), démontrent que l'acidification ou l'alcalinisation d'échantillons urinaires de 24 h ou de mictions recueillis à partir des systèmes V-Monovette n'est pas une nécessité pré-analytique, y compris pour des concentrations élevées en calcium, phosphate et acide urique, sauf à conserver les urines pour un dosage différé. En effet, les biais observés entre les concentrations obtenues avant après acidification/alcalinisation des échantillons urinaires, sont pour tous les échantillons étudiés, inférieures aux normes d'acceptabilité de la SFBC. La mesure de ces solutés peut donc être réalisée sur le même échantillon, sans prétraitement, la variation analytique n'atteignant pas le seuil de variation biologiquement significatif et permettant ainsi un gain de temps et une réduction du coût pour le laboratoire.

Remerciements. Les auteurs tiennent à remercier l'équipe technique du laboratoire de biochimie générale pour leur participation.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Daudon M, Traxer O, Jungers P. *Lithiase urinaire*. Paris: Lavoisier. Médecine Sciences Publications, 2012.
2. Hodgkinson A. Sampling errors in the determination of urine calcium and oxalate : solubility of calcium oxalate in HCl-urine mixtures. *Clin Chim Acta* 1981 ; 109 : 239-44.
3. Ng RH, Menon M, Ladenson JH. Collection and handling of 24-hour urine specimens for measurement of analytes related to renal calculi. *Clin Chem* 1984 ; 30 : 467-71.
4. Sodi R, Bailey LB, Glaysher J, Allars L, Roberts NB, Marks EM, *et al*. Acidification and urine calcium : is it a preanalytical necessity ? *Ann Clin Biochem* 2009 ; 46 : 484-7.
5. Pratumvinit B, Reesukumal K, Wongkrajang P, Khejonnit V, Klinbua C, Dangneawnoi W. Should acidification of urine be performed before the analysis of calcium, phosphate and magnesium in the presence of crystals ? *Clin Chim Acta* 2013 ; 426 : 46-50.
6. Yilmaz G, Yilmaz FM, Hakligör A, Yücel D. Are preservatives necessary in 24-hour urine measurements ? *Clin Biochem* 2008 ; 41 : 899-901.
7. Feres MC, Bini R, De Martino MC, Biagini SP, Lino de Souza A, Campana PG, *et al*. Implications for the use of acid preservatives in 24-hour urine for measurements of high demand biochemical analytes in clinical laboratories. *Clin Chim Acta* 2011 ; 412 : 2322-5.
8. Daudon M, Hennequin C, Boujelben G, Lacour B, Jungers P. Serial crystalluria determination and the risk of recurrence in calcium stone formers. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 1934-43.
9. Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, Dumont G, Bailly M, Henny J, *et al*. Protocole de validation de techniques. *Ann Biol Clin* 1986 ; 44 : 686-745.
10. Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin* 1999 ; 57 : 685-95.
11. Sodi R, Godber IM. Effect of refrigeration, centrifugation, acidification, heat treatment and storage on urine calcium, magnesium and phosphate. *Clin Chem Lab Med* 2016 ; 54 : e379-e381.
12. Wu W, Yang D, Tiselius HG, Ou L, Mal Z, Chen K, *et al*. Collection and storage of urine specimens for measurement of urolithiasis risk factors. *Urology* 2015 ; 85 : 299-303.
13. Van Gammeren AJ, Van Haperen C, Kuypers AWHM. The effect of acidification and oxalate concentration on urine calcium measurements in EQAS materials and patient samples. *Clin Chem Lab Med* 2012 ; 50 : 375-7.