GIULIANO DALL'OLIO *

La ricerca dello zucchero nell'urina: nascita e sviluppo della "Dry Chemistry" in chimica clinica

Glucose analysis in urine: beginning and development of "dry chemistry" in clinical chemistry

Summary – In the second half of XIX century the use of chemical analysis in physiological and pathological research made the physician's diagnosis of diabetes mellitus more precise by means of a "chemical sign": the glucose presence in urine.

This chemical opportunity was important for the diagnosis of diabetes but also for the possibility of patients monitoring.

Easy and fast tests were necessary, with simple reagents, usable also from practitioners for bedside urine testing.

This necessity led to the birth and development of the so called "dry chemistry" where reagents are in a dry form impregnated in a pice of paper or tissue. After placing a drop of urine on it, the water of the specimen solubilizes reagents and the glucose reacts developing a colour.

The first qualitative analysis of glucose in urine using solid phase chemistry was described by the French chemist Jules Maumené in 1850.

Later on, many others reagents in solid phase were used by the Italian chemist Cesare Pratesi (1873) and the British physicians William Pavy (1880) and George Oliver (1889).

The spread of "dry chemistry" became important in the XX century when enzimatic dry-tests were employed.

Further expansion of "dry chemistry" occurred when, on the basis of a theoretical model developed by the physicists Paul Kubelka and Franz Munk in 1931, it was made possible the realization, around 1970, of the first reflection spectrophotometers.

* Laboratorio di Chimica clinica, Ospedale "S. Bortolo". Viale Rodolfi 37, 36100 Vicenza.

INTRODUZIONE

Nella seconda metà dell'Ottocento, con le nuove possibilità offerte dalla chimica applicata alla fisiologia ed alla patologia, la diagnosi del diabete mellito diviene più sicura poiché ai classici sintomi descritti fin dai tempi più antichi si può aggiungere un "segno chimico" importante e inequivocabile: la presenza di glucosio nelle urine (*glicosuria, melituria*).

Che le urine dei diabetici contenessero una sostanza dolce era stato stabilito anche dagli antichi medici ma alla misura di un particolare zucchero, il glucosio, si arriva solo nella metà del XIX secolo. Per i clinici ed i medici pratici dell'Ottocento la possibilità di rilevare la concentrazione di glucosio nelle urine appare subito non solo un potente mezzo per la diagnosi ma anche un significativo supporto nel monitoraggio del paziente diabetico, una informazione importante per la verifica degli effetti delle cure, che in quell'epoca tutti gli studiosi di diabete vanno proponendo e sperimentando, e per la vigilanza della "compliance" a regimi dietetici sempre difficili da seguire.

Servono quindi metodi analitici il più possibile semplici, sia "*perché nessuno può pretendere che un buon medico sia anche un buon chimico*" [11], sia per utilizzare pochi reattivi che possano trovar posto anche nella borsa del medico "di campagna" per eseguire indagini al letto del malato. Frequenti sono infatti i "consulti" che il medico pratico, in casi particolarmente complicati o su invito dei parenti di un paziente facoltoso, chiede ai clinici ospedalieri o semplicemente a colleghi particolarmente stimati. In quella sede vengono spesso effettuate indagini sull'urina del malato, una semplice uroscopia dapprima e quindi, con l'affinarsi delle tecniche, delle analisi chimiche vere e proprie. Da ricordare anche che i medici dell'epoca iniziano ad istruire i pazienti più colti all'autocontrollo della glicosuria e quindi a maggior ragione le determinazioni del glucosio devono essere di estrema semplicità [4].

Per la misura del glucosio intorno alla metà dell'Ottocento sono disponibili metodiche analitiche certamente non alla portata di tutti, che necessitano di reagenti caustici non facilmente trasportabili e spesso la reazione deve avvenire a caldo. I più noti sono basati sulla proprietà degli zuccheri (in particolare del glucosio, *zucchero d'uva*) di ridurre una soluzione alcalina di solfato di rame ottenendo un precipitato rosso di ossido rameoso. Le reazioni prendono il nome dei loro autori: reazione di Trommer realizzata da Carl August Trommer (1806-1879) nel 1841, modificata da Louis-Charles Barreswill (1817-1870) nel 1844 ed ancora nel 1848 da Hermann von Fehling e nel 1862 da William Pavy (1829-1911) [13].

Il glucosio si determinava anche con la prova della fermentazione (tubo di Einhorn, 1887) o con il polarimetro, sviluppato nel 1840 dal fisico francese Jean Baptiste Biot (1774-1862), impiegato largamente in chimica clinica (diabetometro), metodi certamente non utilizzabili al letto del malato.

DRY CHEMISTRY

La necessità di "semplicità analitica", di rapidità dell'esame (se eccessivamente lungo si rivelerebbe inutile poiché "*potrebbe l'ammalato essersi già guarito o morto, o per lo meno la sua malattia aver cambiato d'indole o di stadio*" [11]) e nello stesso tempo di attendibilità del risultato, porta alla nascita ed al successivo sviluppo della cosiddetta "dry chemistry" (chimica allo stato secco).

Nella "dry chemistry" i reagenti chimici sono allo stato anidro, applicati su un supporto di carta o di stoffa o addirittura metallico o ancora predisposti in palline o tavolette. Messi a contatto con il liquido biologico da esaminare, l'acqua in esso contenuta scioglie i reagenti che, a contatto con l'analita interessato sviluppano sullo strato applicato al supporto un colore utilizzabile per l'analisi qualitativa o quantitativa oppure fanno assumere al liquido una caratteristica colorazione. Si può facilmente intuire come questa soluzione analitica sia un espediente ottimale per le indagini effettuate dal medico pratico anche se Gaetano Primavera (1832-1899) sconsiglia le analisi al letto del malato a meno che non si tratti "*di un grande e difficile consulto, in cui interessi al medico curante di ripetere l'analisi chimica in casa stessa dell'infermo alla presenza di tutti i medici consulenti*" [11]. Suggerisce ai medici di fare le analisi a casa propria "*con comodo e tranquillità di spirito e con un reagentario molto più ricco di quelli portatili, che sono sempre una meschinità (…). È sempre meglio fare una buon'analisi e quindi una giusta diagnosi anzi che mettersi nel rischio di fare un'analisi cattiva e quindi una diagnosi orribilmente sbagliata*" [11]. Ma pochissimi medici pratici hanno le capacità, le conoscenze di chimica analitica e l'attrezzatura del Primavera che si è da sempre dedicato al laboratorio e lavora all'ospedale di Napoli, per cui la semplicità e affidabilità delle indagini offerte dalla "dry chemistry" divengono un'esigenza improrogabile.

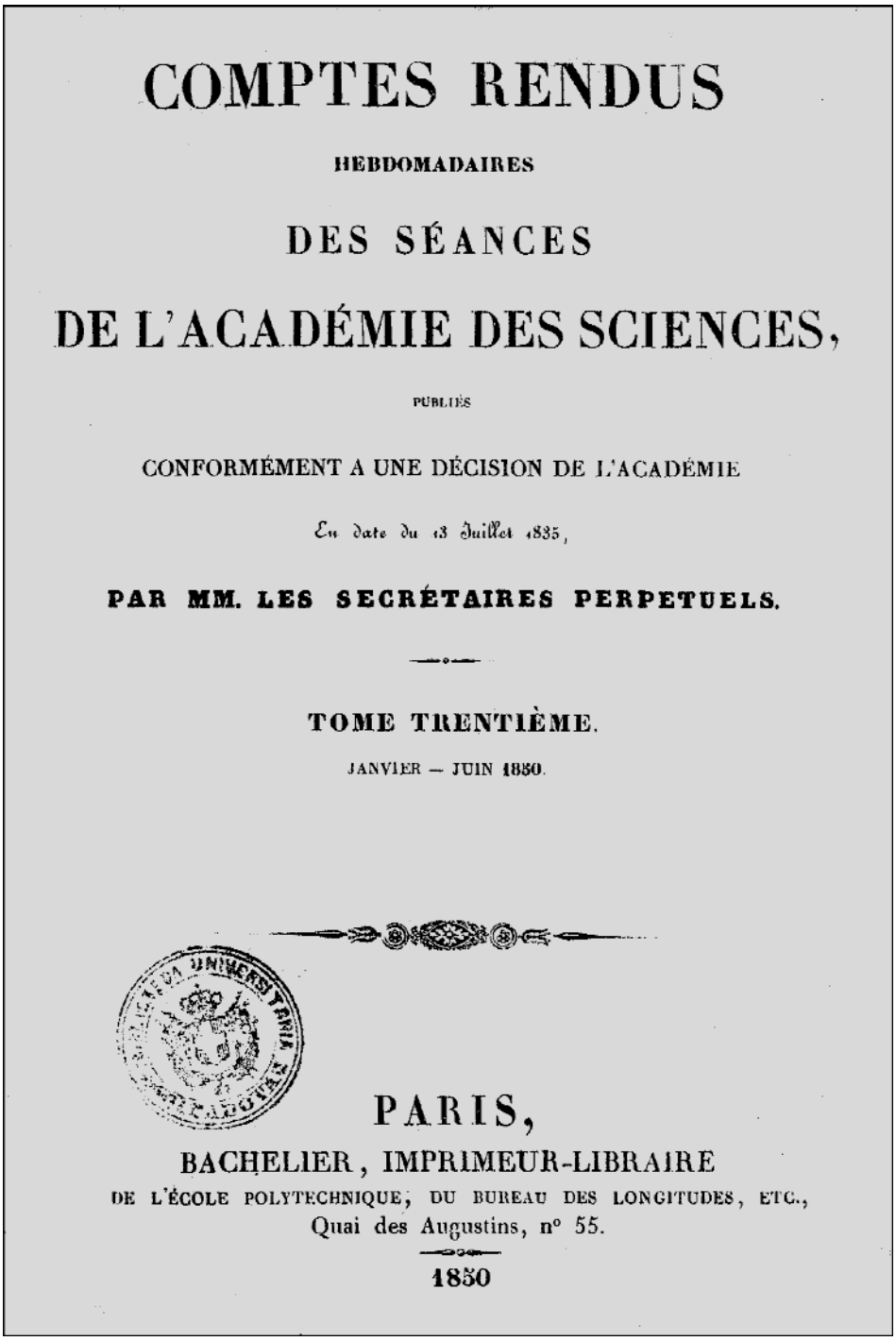
L'Ottocento

Jules Maumené

La realizzazione del primo reagente allo stato secco per la ricerca del glucosio viene attribuita al chimico francese Jules Maumené, (1818-1898) che ne pubblica la composizione e l'uso sui "Comptes Rendus de l'Acadèmie des Sciences" di Parigi nel 1850 (Figure 1, 2).

Nella sua nota richiama la indaginosità dei numerosi metodi per la ricerca dello zucchero nelle urine dei diabetici e propone un procedimento semplice capace di rilevarne in pochissimo tempo minime quantità, soprattutto nella pratica medica: "*io offro ai chimici ed ai medici una carta o piuttosto un tessuto reattivo per mezzo del quale è possibile, in un istante, discernere la presenza di minime quantità di zucchero (…)*"[1] [6].

[1] "*Les chimistes sont parvenus à indiquer plusieurs procédés pour la recherche du sucre, même dans les circonstances singulières de l'affection diabétique. Malheureusement aucun de ces procédés*



COMPTES RENDUS

HEBDOMADAIRES

DES SÉANCES

DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES,

PUBLIÉS

CONFORMÉMENT A UNE DÉCISION DE L'ACADÉMIE

En date du 13 Juillet 1835,

PAR MM. LES SECRÉTAIRES PERPETUELS.

TOME TRENTIÈME.

JANVIER — JUIN 1850.

PARIS,

BACHELIER, IMPRIMEUR-LIBRAIRE

DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE, DU BUREAU DES LONGITUDES, ETC.,

Quai des Augustins, n° 55.

1850

Fig. 1. Resoconti dell'Accademia delle Scienze di Parigi (1850).

MÉMOIRES PRÉSENTÉS.

CHIMIE APPLIQUÉE. — *Sur un nouveau réactif pour distinguer la présence du sucre dans certains liquides.* (Extrait d'une Note de M. MAUMENÉ.)

(Commissaires, MM. Pelouze, Balard.)

« Les chimistes sont parvenus à indiquer plusieurs procédés pour la recherche du sucre, même dans les circonstances singulières de l'affection diabétique. Malheureusement aucun de ces procédés n'est encore d'une exécution assez simple pour être aisément adopté dans la pratique médicale. Je viens offrir aux chimistes et aux médecins un papier ou plutôt un tissu réactif au moyen duquel on peut, en un instant, discerner la présence des plus minimes quantités de sucre.

Fig. 2. Memoria di Maumenè presentata all'Accademia delle Scienze di Parigi (1850).

Ricorda ancora come l'azione del cloro sullo zucchero non sia perfettamente conosciuta e verifica che esso agisce sullo zucchero anche a secco, velocemente a caldo, più lentamente a freddo. In ogni caso si forma una sostanza bruna che diventa un caramello nero brillante una volta seccata.

Sperimenta che tutti gli zuccheri si comportano con i cloruri come lo zucchero di canna: subiscono una disidratazione il cui termine finale è un prodotto bruno-nero. Inoltre, le sostanze la cui composizione è analoga a quella dello zucchero (materiali legnosi, canapa, lino, cotone, carta, amido, fecola) sono soggette allo stesso genere di alterazione. Questa osservazione dell'autore è di estremo interesse pratico poiché egli ha promesso una cartina o meglio un tessuto reattivo per rilevare la presenza di piccole quantità di zucchero nelle urine. Deve quindi disporre di un supporto solido, dove porre un reattivo per il glucosio, che non dia la stessa reazione degli zuccheri portando a risultati falsi positivi.

Come reagente individua il cloruro di stagno che dovrà essere imbevuto ed essiccato su una striscia di materiale solido. Questa, parzialmente immersa per breve tempo in una soluzione di zucchero, e quindi asciugata riscaldando, darà le reazioni caratteristiche che egli ha sperimentato: cambierà di colore, e diventerà di un bruno nero più o meno scuro.

Ma, riferisce ancora Maumené, resta da trovare la lamina solida, il supporto al reattivo: dalle sue esperienze risulta chiaro come non si possa ricorrere alla carta, a tele di canapa, di lino o di cotone, la cui decomposizione avrà luogo simultanea-

n'est encore d'un exécution assez simple pour être aisément adopté dans la pratique médicale. Je viens offrir aux chimistes et aux médecins un papier ou plutôt un tissu réactif au moyen duquel on peut, en un instant, discerner la présence des plus minimes quantités du sucre (…)" [6].

mente a quella dello zucchero. Individua un materiale adatto in un tessuto di lana merinos bianca.

La preparazione delle strisce reattive, come egli la descrive, non è particolarmente difficoltosa: "*dopo aver inzuppato la lana per 3 o 4 minuti in una soluzione acquosa di bicloruro di stagno del commercio ($SnCl_2.5H_2O$) fatta con 100 grammi di bicloruro, 200 grammi di acqua comune, faccio sgocciolare il liquido, secco la merinos su una striscia della stessa stoffa a bagno-maria, e il tessuto reattivo è pronto. Lo taglio in strisce di 7-10 centimetri di lunghezza e 2-3 di larghezza, come le carte reattive ordinarie*".

Effettua delle prove di sensibilità, non così ortodosse come ci si aspetterebbe da un chimico, riferisce infatti: "*la sensibilità del reattivo è elevata: 10 gocce di una urina diabetica versate in 100 centimetri cubi di acqua, formano un liquido con il quale si rendono le merinos clorurate completamente bruno-nere*". Riferisce anche sulla specificità del reattivo "*l'urina ordinaria, l'urea, l'acido urico, non danno alcuna colorazione con il cloruro di stagno*".

"*Avvalendosi di queste "merinos clorurate", il medico potrà, senza alcuna fatica, determinare se l'urina di un malato contiene una traccia apprezzabile di zucchero. Basterà versare una goccia di urina sulla striscia, ed esporla sopra un carbone rovente, o la fiamma di una lampada o di una bugia, per produrre in un minuto una macchia nera molto evidente*" [6].

Nonostante la sua semplicità il metodo non trova larga diffusione, come riferisce Johann Joseph Scherer (1814-1869), chimico clinico a Würzburg, che lo sperimenta estesamente [15].

Cesare Pratesi

Nel 1873 Cesare Pratesi, medico di laboratorio all'Arcispedale di Santa Maria Nuova di Firenze dove lavora dal 1863 come assistente del professor Serafino Capezzuoli (1813-1888), riprende il problema delle indagini chimico cliniche decentrate (Figure 3, 4): "*i saggi chimici fatti con processo che chiamerò di laboratorio possono essere eseguiti nelle grandi città, negli spedali, perché ivi non mancano né laboratorii speciali, né farmacisti provvisti di opportuni reagentarii, e pronti ad eseguire siffatte ricerche. Ma quelli che in regola generale non faranno mai o quasi mai questi saggi, quelli che sentono il bisogno di avere qualche reattivo clinico, sono il maggior numero, cioè i medici delle piccole città, delle campagne ec. ec., i quali non possono ricorrere ai laboratorii speciali perché ivi non esistono, né sempre trovare nei farmacisti quello che può abbisognare per effettuarli…*" [9].

Ribadisce l'importanza dell'esame chimico dell'urina specialmente nella diagnosi di diabete mellito: "*Fra tutti i prodotti dell'animale organismo, niuno ve ne ha che tanto abbia affaticata la mente degli sperimentatori, quanto l'orina. (…) Così i moderni chimici con savio intendimento, l'hanno fatta soggetto delle loro più accurate indagini, per la qual cosa sono state fatte importantissime scoperte, delle quali la medicina ha fatto mirabile tesoro. E fra queste la non meno interessante si è quella che*

LO

SPERIMENTALE

GIORNALE CRITICO

DI

MEDICINA E CHIRURGIA

DIRETTO E COMPILATO

DA

CARLO GHINOZZI
Professore di clinica medica nelle Scuole di Firenze

PIETRO BURRESI
Prof. di clinica medica a Siena

PASQUALE LANDI
Prof. di clinica chirurgica a Pisa

GIUSEPPE CORRADI
Professore di clinica chirurgica nelle Scuole di Firenze

ANNO XXV — TOMO XXXII.

FIRENZE
DALLA TIPOGRAFIA CENNINIANA
nelle Murate, via Ghibellina 8
1873.

Fig. 3. Il periodico scientifico "Lo Sperimentale" (1873).

RICERCA CLINICA DEL GLUCOSIO NELLE ORINE DEI DIABETICI.

Memoria letta alla Società Medico-Fisica nella pubblica adunanza del dì 15 giugno 1873, dal Socio Conservatore CESARE PRATESI.

Fra tutti i prodotti dell'animale organismo, niuno ve ne ha che tanto abbia affaticata la mente degli sperimentatori, quanto l'orina. Come gli antichi alchimisti, spinti da cupidigia di guadagno non cessarono di cimentarla in mille diversi modi, sognando fantastiche trasformazioni, così i moderni chimici con savio intendimento, l'hanno fatta soggetto delle loro più accurate indagini, per la qual cosa sono state fatte importantissime scoperte, delle quali la medicina ha fatto mirabile tesoro. E fra queste la non meno interessante si è quella che affacciasi alla mente del medico, ogni volta che trovisi nel caso di diagnosticare una glucosuria.

Fig. 4. Memoria di Cesare Pratesi presentata alla Società Medico-Fisica di Firenze (1873).

affacciasi alla mente del medico, ogni volta che trovisi nel caso di diagnosticare una glicosuria. Qualunque sintomo potrebbe essere fallace, ove per mezzo della chimica non fosse resa manifesta nelle orine la presenza del glucosio" [9]. Rammenta che i metodi in uso sono di facile esecuzione ed egli ha sempre preferito il metodo indicato dal Capezzuoli al Congresso degli Scienziati Italiani di Lucca nel 1843.[2] Come ogni medico anch'egli prima di passare al saggio chimico esamina la densità dell'urina: se questa è molto bassa si può ritenere con una certa sicurezza trattarsi di poliuria semplice, deduzione che dispensa dall'analisi chimica, mentre nella poliuria con densità elevata non è ancora certo che questa sia dovuta alla presenza di glucosio. "*In questi casi il saggio della densità non puole andare mai disgiunto dal saggio chimico, al quale soltanto è riserbato tutto il valore diagnostico*" [9]. Purtroppo da osservazioni effettuate da medici illustri, riferisce l'autore, pur essendoci a disposizione numerosi metodi chimici per la ricerca del glucosio, molti casi di diabete non vengono diagnosticati. "*Se è così, a me pare che non debba attribuirsi ad altro che alla mancanza del saggio chimico. E questa mancanza trova qualche scusa, se vogliamo, nell'incomodo che risente il medico nel dover portare presso di sé quello che occorre per fare questi saggi. D'altronde reattivi del glucosio, clinici, vale a dire non incomodi, e tanto semplici da poter essere sperimentati al letto del malato nella guisa istessa che*

[2] Si tratta di un metodo che sfrutta la riduzione da parte degli zuccheri di sali di rame in ambiente alcalino, reazione già proposta da Carl August Trommer nel 1841 ma che viene conosciuta in Italia solo nel 1843 attraverso i "*Jahresberichte*" di Berzelius. La reazione viene da alcuni denominata di Trommer-Capezzuoli. (Dall'Olio G., 2004. Personaggi della Chimica Clinica Italiana dell'Ottocento. Medical Systems, Genova).

si praticherebbe un salasso, a me pare che non vi sieno" [9]. Tutti i metodi conosciuti, ribadisce Pratesi, prevedono l'uso di potassa caustica o di acido solforico che non sono certo reattivi da portarsi facilmente appresso nelle visite domiciliari. Solo Maumené, riconosce l'autore, ha presentato un metodo che egli definirebbe "clinico", cioè di facile uso, ma il percloruro di ferro utilizzato[3] è molto deliquescente e non dà risultati soddisfacenti come egli stesso ha potuto sperimentare.

Convinto quindi della mancanza di un metodo semplice e sicuro per la ricerca del glucosio intraprende degli esperimenti "*con l'intendimento di togliere a questo saggio l'uso delle boccette o dei reattivi liquidi*" [9] e dai risultati ottenuti ritiene di essere riuscito nell'intento tanto da poterli presentare alla Società Medico-Fisica di Firenze, della quale è "Socio Conservatore", nella pubblica adunanza del 15 giugno 1873. Da ricordare che Pratesi non è nuovo a simili ricerche, nel 1863 aveva prodotto delle cartine reattive per la ricerca dello iodio nell'urina [8].

Premette che il suo reattivo è adatto a rilevare la glicosuria in urine di diabetici le quali, in tanti anni di pratica, ha sempre notato contenere, anche al primo manifestarsi dei sintomi, quantità "*abbastanza elevate*" di glucosio. Non sarà quindi un metodo di "*un'immensa sensibilità*" ma sicuramente di "*una rilevante semplicità*".

Passa a descrivere la preparazione: scioglie a freddo in 60 g di silicato di potassa "*alla maggior concentrazione*" 2,5 g di potassa caustica e 2 g di bicromato di potassio. Questa soluzione in bottiglia chiusa si mantiene stabile "*per un tempo assai lungo*".

Prepara delle listelle di latta lunghe 7 cm e larghe 1 cm, con la punta di una bacchetta di vetro pone una goccia della soluzione ad una estremità ed asciuga al calore di un lume a petrolio o di una candela. Ripete l'operazione altre due volte, dopo aver asciugato bene le laminette sono pronte all'uso. Conservate anche per più di due mesi non perdono sensibilità se non quando "*dominano quei che volgarmente si dicono venti asciutti*". Data però la semplicità di preparazione possono essere approntate poco prima dell'analisi.

L'utilizzo al letto del malato è semplice. Riscaldata al calore di una piccola fiamma l'estremità reattiva della laminetta, che diventa gonfia e di colore giallo canarino, si versano sopra due gocce di urina in esame e si scalda fino a secco. Se l'urina contiene glucosio nella zona reattiva apparirà una colorazione verde, se il glucosio è assente la colorazione verde non si manifesta mai come egli ha potuto assicurarsi con numerosi esperimenti con urine normali e patologiche.

Pratesi riferisce anche di essersi fatto costruire un "urinometro" (areometro) di piccolissime dimensioni non più lungo di otto centimetri. Modificato in tal modo lo tiene in tasca in un piccolo astuccio insieme ad alcune laminette reattive. "*Ecco in qual modo mi è sembrato che il medico, senza veruno incomodo, possa fare al letto del malato la ricerca del glucosio, quando sospetta che si tratta di una glicosuria*" [9] (Figura 5).

[3] Maumené nella sua memoria parla di bicloruro di stagno.

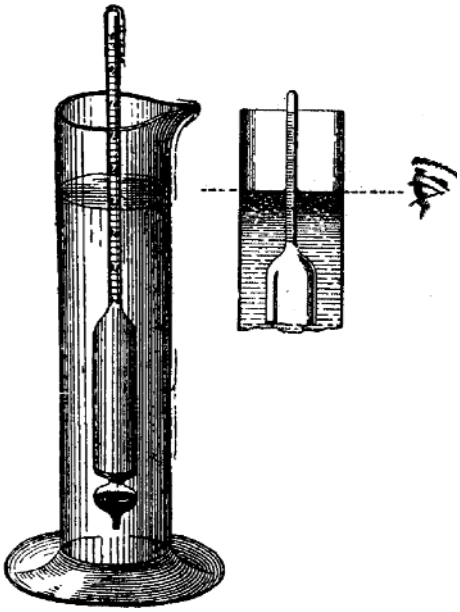


Fig. 5. Misura della densità dell'urina con l'aerometro (urinometro).

Il nuovo reattivo viene discusso nel corso dell'adunanza dove Pratesi lo raccomanda ai medici pratici e si rimette quindi al giudizio dell'Accademia. Giorgio Roster (1843-1927), collega di Pratesi, caldeggia il nuovo reattivo non solo per quanto esposto dal suo inventore ma soprattutto per dare ai medici un metodo che possa far scoprire con sicurezza e facilità il glucosio essendogli accaduto "*più di una volta di trovare zuccherine alcune orine, che erano già state saggiate da qualche medico, cui non era riuscito scoprirvi glucosio*" [14].

William Pavy

Sempre in relazione alle difficoltà legate alla preparazione e alla conservazione dei reagenti liquidi l'illustre medico londinese Frederick William Pavy (1829-1911), allievo di Richard Bright (1789-1858), che dedica 60 anni della sua vita allo studio del diabete, nel 1880 raccomanda per la ricerca del glucosio nell'urina un reattivo di sali di rame allo stato solido le cui singole dosi sono preparate sotto forma di palline.

Saranno conosciute come le *Pavy's pellets*[4] [15] (Figura 6).

[4] "*Sir, may I ask you to insert a few words with reference to the copper test-pellets, which, at my suggestion, have been prepared by Mr. Cooper, of 26, Oxford-street. The object of these pellets was to supply a copper test for the examination of urine of a more convenient and stable nature than the copper solution. When kept under suitable conditions they fulfil all that can be desired. (…)*" [10].

THE LANCET.

A Journal of British and Foreign Medicine, Physiology, Surgery, Chemistry, Public Health, Criticism, and News.

COPPER TEST-PELLETS FOR SUGAR.

To the Editor of THE LANCET.

SIR,—May I ask you to insert a few words with reference to the copper test-pellets for sugar, which, at my suggestion, have been prepared by Mr. Cooper, of 26, Oxford-street. The object of these pellets was to supply a copper test for the examination of urine of a more convenient and staple nature than the copper solution. When kept under suitable conditions they fulfil all that can be desired. I have received information from some who have procured them that they have become moist, and thereby spoilt on keeping. Hitherto they have been sent out in corked bottles rendered air-tight with sealing wax. As long as the bottle has remained unopened they have been all right, but when the sealing wax has been broken the cork has allowed the penetration of moisture, which, being absorbed by the caustic potash contained in the pellet, has led to its becoming moist. All that is wanted to prevent this occurrence is that they should be kept for use in a good stoppered bottle; and Mr. Cooper, in consequence of the representation I have made to him, has liberally undertaken to supply them in future in stoppered, instead of corked bottles. Those who now have them in corked bottles should transfer them as soon as opened to a bottle provided with a well-fitting glass stopper. By this simple measure all objection is at once removed.

I am, Sir, your obedient servant,

Grosvenor-street, July 5th, 1880. F. W. PAVY.

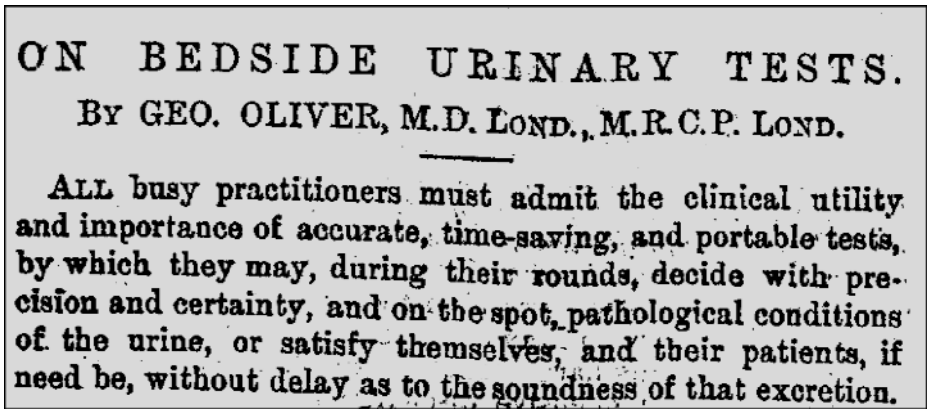
Fig. 6. Comunicazione di William Pavy a Lancet (1880).

Con tali reattivi preconfezionati il medico pratico è in grado di preparare le soluzioni necessarie alla reazione, rapidamente e con semplicità al momento dell'analisi al letto del malato, risolvendo così il delicato problema del trasporto dei liquidi.

George Oliver

La ricerca di reattivi di facile uso per l'analisi chimica del glucosio non si arresta.

Il medico pratico inglese George Oliver (1841-1915) propone delle cartine reattive per la ricerca del glucosio e dell'albumina in un suo lavoro apparso su *Lancet* nel 1883 (Figura 7). "*Tutti gli indaffarati medici pratici devono ammettere l'utilità clinica e l'importanza di test accurati, rapidi e portatili, per mezzo dei quali possono, durante i loro giri di visite domiciliari, individuare con precisione e sicurezza, e sul posto, condizioni patologiche dell'urina, o convincere loro stessi ed i loro pazienti, senza ritardo, circa lo stato fisiologico di questa escrezione*" [7]. Questi medici, che da tempo conoscono il serio inconveniente di portarsi appresso liquidi caustici per effettuare analisi al letto del paziente, sono molto interessati a reagenti più maneggevoli, comodi ed egualmente attendibili. Espone i risultati ottenuti con i test qualitativi e quantitativi per albumina, glucosio e acidità totale che egli ha messo a punto. "*Vorrei fare la preliminare dichiarazione che sono riuscito in tutti i miei reagenti ad abolire lo stato liquido ed anche le forme solide come polveri, cristalli e palline*" [7]. Ha sperimentato cartine e tela di lino imbevute di reattivo poi seccato che, al momento dell'indagine chimica, viene riportato in soluzione una volta intinto nell'urina producendo una rapida e sensibile azione sugli analiti cercati. Osserva che le sue cartine reattive immerse in una piccola quantità di urina sono un test molto raffinato e pulito, sono le più facilmente trasportabili e compatte ed inoltre producono migliori risultati di quelli che aveva ottenuto con le vecchie soluzioni corrosive. Inoltre, dal momento che è facile graduare le cartine con soluzioni stan-



ON BEDSIDE URINARY TESTS.

BY GEO. OLIVER, M.D. LOND., M.R.C.P. LOND.

ALL busy practitioners must admit the clinical utility and importance of accurate, time-saving, and portable tests, by which they may, during their rounds, decide with precision and certainty, and on the spot, pathological conditions of the urine, or satisfy themselves, and their patients, if need be, without delay as to the soundness of that excretion.

Fig. 7. Lavoro di George Oliver su "The Lancet" (1883).

dardizzate dei reagenti, indaga fino a che punto questo semplice processo può rilevare l'albumina ed il glucosio; "*in altre parole ho tentato di applicare al letto del malato i metodi volumetrici di analisi sotto forma di pezzi di carta da filtro impregnati con precise quantità dei reagenti (…)*" [7].

Nel 1889 pubblica l'opuscolo "*On bedside urine-testing*", che avrà quattro edizioni in pochi anni, dove spiega l'uso delle sue "*urinary test papers*" per la ricerca dell'albumina e del glucosio al letto del malato. Le cartine di Oliver vengono prodotte e diffuse in Germania dal farmacista di Dresda Ewald Geissler (1848-1898).

Il Novecento

Nella prima metà del nuovo secolo l'uso e la ricerca di reattivi allo stato solido registra un rallentamento.

Una nuova striscia per determinazioni semiquantitative del glucosio nell'urina viene presentata sulla rivista *Analytical Chemistry* nel 1956 [2]. "*Una cartina reattiva per il glucosio nell'urina, con una semplicità e accuratezza simile alle cartine per le misure di pH era attesa da molti anni. Comunque, la misura delle proprietà riducenti non specifiche del glucosio con gli usuali reagenti chimici fissati su carta non si sono rivelati funzionali a causa della instabilità di tali reagenti su carta alle normali condizioni di conservazione*" [2]. La reazione proposta nel lavoro prevede l'ossidazione del glucosio, presente nel campione in esame, da parte dell'enzima specifico *glucosio ossidasi* con formazione di acido gluconico e acqua ossigenata. Quest'ultima in presenza di o-toluidina e dell'enzima perossidasi dà origine ad un colore blu. La reazione enzimatico-colorimetrica è specifica per il glucosio. La parte reattiva della cartina è impregnata di glucosio ossidasi, porossidasi ed o-toluidina allo stato anidro che vengono portati in soluzione e resi pronti alla reazione quando sono immersi per qualche secondo nell'urina.

A questo punto, il termine "dry chemistry" identifica le procedure analitiche che fanno uso di reagenti (indicatori, enzimi, reagenti ausiliari) in quantità esattamente predeterminata, essiccati ed immobilizzati su adatti supporti (carta o film di plastica). I reagenti rimangono assolutamente stabili fino al momento del loro utilizzo. Essi vengono solubilizzati ed inizia la reazione (*corpora nisi soluta non agunt*) in seguito all'aggiunta di una quantità stabilita di campione (urina, siero o plasma) che funziona quindi anche da solvente del sistema. La reazione viene evidenziata da una variazione di colore, valutata rispetto ad una scala cromatica riportata sul contenitore delle strisce reattive.

I reagenti in questa forma sono convenienti anche per l'esecuzione di una singola analisi, particolarmente adatti quindi al letto del paziente o nello studio del medico e trovano subito larghissima diffusione commerciale.

Negli anni '50 del Novecento vengono messe sul mercato le strisce multielemento che permettono la completa analisi chimica dell'urina con un'unica striscio-lina di cellulosa dove sono fissate porzioni reattive per: pH, proteine, glucosio, che-

toni, urobilinogeno, bilirubina, emoglobina. L'analisi qualitativa o semiquantitativa avviene immergendo la striscia nella provetta di urina, si attende 1 minuto e quindi si confrontano i colori sviluppati nei diversi quadratini reattivi con strisce colorate standard (Figura 8).

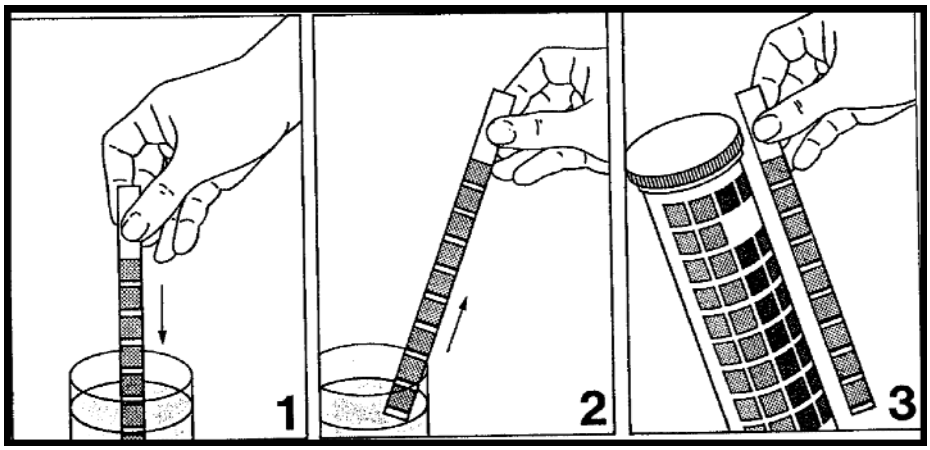
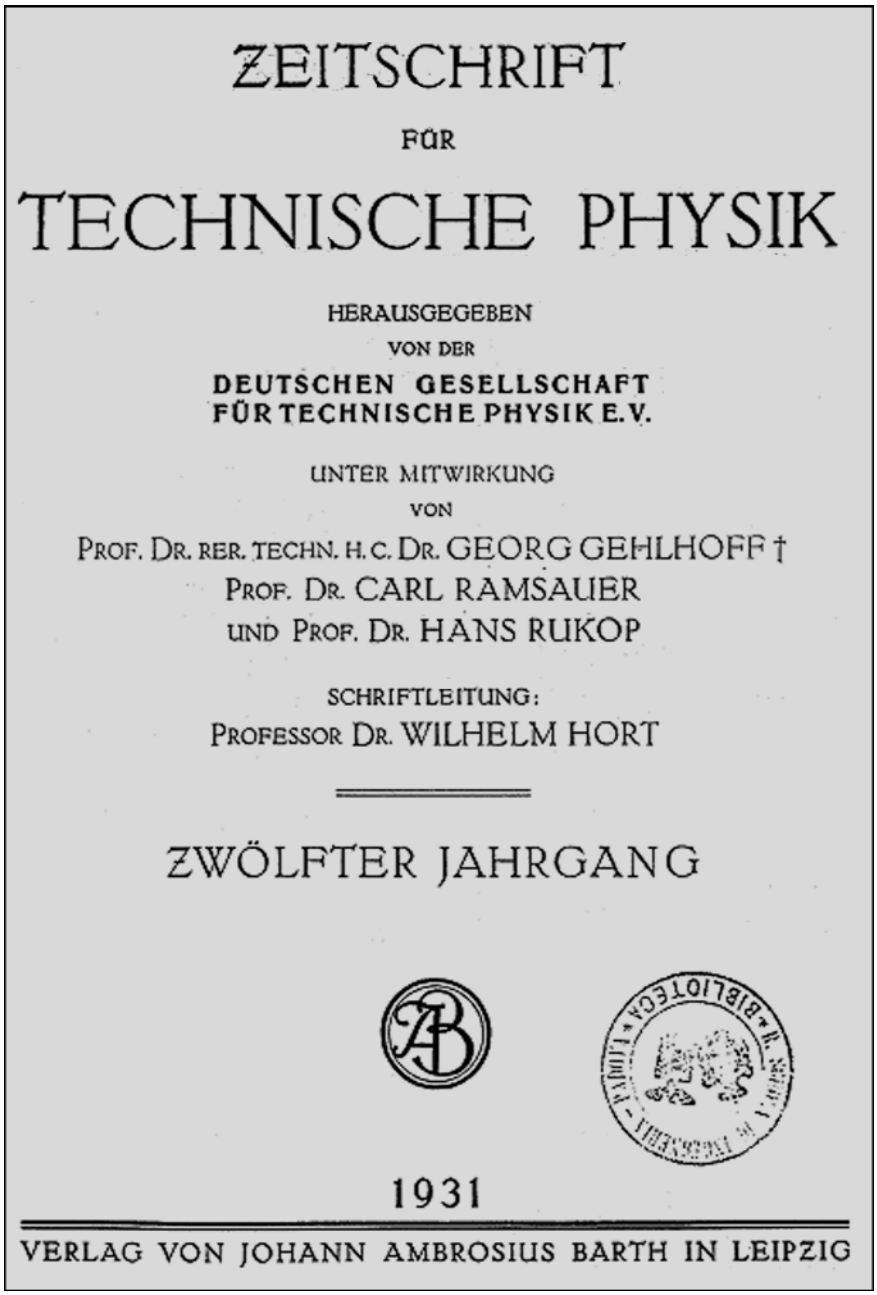


Fig. 8. Analisi qualitativa dell'urina con strisce reattive.

La ulteriore evoluzione delle strisce permette ora anche l'esame quantitativo del glucosio e altri analiti nel siero, nel plasma ed anche nel sangue intero, eliminando così il passaggio della centrifugazione del campione. I reattivi in quantità esattamente standardizzata allo stato secco sono posti su piccole aree reattive multistrato su un supporto di plastica.

La spettroscopia di riflettanza diffusa

Ulteriore grandissima espansione della "dry chemistry" si ha quando, in seguito ad un modello teorico sviluppato dai fisici Paul Kubelka e Franz Munk fin dal 1931 [5] (Figure 9, 10), viene trovata la relazione tra la riflettanza diffusa da una superficie solida colorata, colpita da una opportuna radiazione luminosa, e la intensità del colore della superficie stessa (reflometria). La reflometria, a differenza della fotometria di assorbimento in cui dalla intensità della radiazione trasmessa da una soluzione si risale alla concentrazione di un componente (legge di Lambert-Beer), impiega la riflettanza, ovvero l'intensità di luce di appropriata lunghezza d'onda diffusa da una superficie solida colorata o in cui si è generato un colore in seguito a reazione chimica (equazione di Kubelka-Munk) [3]. È intuitivo come questa tecnica si presti molto bene a misurare le concentrazioni dei componenti che provocano una variazione dell'intensità di colore dei reagenti in chimica secca. "*Nel 1968 quando Boehringer Mannheim iniziò lo studio per l'impiego della reflometria,*



ZEITSCHRIFT

FÜR

TECHNISCHE PHYSIK

HERAUSGEGEBEN

VON DER

DEUTSCHEN GESELLSCHAFT
FÜR TECHNISCHE PHYSIK E.V.

UNTER MITWIRKUNG

VON

PROF. DR. RER. TECHN. H. C. DR. GEORG GEHLHOFF †
PROF. DR. CARL RAMSAUER
UND PROF. DR. HANS RUKOP

SCHRIFTLEITUNG:
PROFESSOR DR. WILHELM HORT

ZWÖLFTER JAHRGANG

1931

VERLAG VON JOHANN AMBROSIUS BARTH IN LEIPZIG

Fig. 9. Rivista di Fisica Tecnica (1931).

Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche

Von Paul Kubelka und Franz Munk, Aussig

Inhalt: Einleitung. 1. Die grundlegenden Differentialgleichungen. 2. Die Helligkeit eines unendlich dicken Anstriches. 3. Die Helligkeit eines endlich dicken Anstriches. 4. Der Sonderfall $s = 0$ (ideal weißer Deckanstrich). 5. Der Sonderfall $r = 0$ (Lasuranstrich). 6. Deckkraft: Definitionen. 7. „Kryptometer"-Deckkraft. 8. „Kontrastuntergrund"-Deckkraft. 9. Bunte Anstriche. Zusammenfassung.

Fig. 10. Il lavoro di Paul Kubelka e Franz Munk pubblicato su "Zeitschrift für Technische Physik" (1931).

come nuovo sistema di analisi quantitativa, la notizia sollevò un notevole scetticismo". La determinazione quantitativa a quei tempi era esclusivo appannaggio della spettrofotometria tradizionale in cuvetta, mentre le strisce reattive erano considerate un metodo analitico esclusivamente qualitativo o semiquantitativo [12]. Tuttavia, dalla presentazione del primo strumento per la misura del glucosio con speciali strisce reattive nel 1974 (Reflomat) alla immissione sul mercato del più sofisticato sistema Reflotron (1985), la ditta Boehringer Mannheim aveva costruito oltre 50.000 fotometri a riflettanza diffusa dimostrando che tale tecnica era ormai alla pari con i metodi convenzionali [30].

Con la diffusione della tecnologia dei microprocessori sono in seguito progettati e costruiti strumenti ad alta produttività e per un numero elevato di analiti che operavano in riflettanza diffusa con strisce "dry chemistry" (Figura 11), soprattutto quando la ditta Kodak mette a disposizione della chimica allo stato secco la grande esperienza acquisita nel campo del materiale per fotografia. All'inizio degli anni '80 del Novecento ha già immesso sul mercato un analizzatore di chimica clinica con reattivi "dry chemistry" completamente automatizzato con una produttività di 500 determinazioni/ora e con un pannello *on board* di 16 analiti [1].

Negli anni '80 sembrava che il futuro della chimica clinica fosse la "dry chemistry" però inspiegabilmente, in Italia ed in Europa, ha poco e breve utilizzo rispetto alla fotometria tradizionale che è tuttora applicata su tutti gli autoanalizzatori.

La vera vittoria della strisce "dry chemistry" saranno invece gli apparecchi a riflettanza diffusa per la misura del glucosio, resi, dal progredire della tecnologia, sempre più piccoli, di semplice uso ed economici tanto da essere alla portata di tutti i diabetici per il controllo domiciliare della glicemia, resa necessaria soprat-

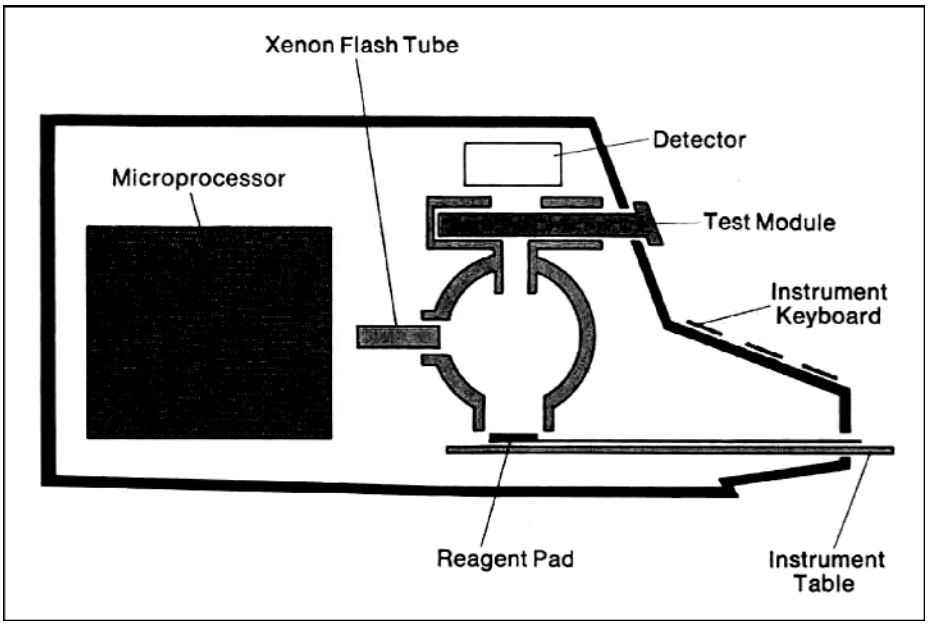


Fig. 11. Fotometro a riflettanza (1983) (Rif. 1).

tutto dopo la scoperta e l'utilizzo terapeutico dell'insulina (1923) [16]. Altro impiego importantissimo sono le misure rapide nell'ambulatorio del medico, nelle farmacie e nei reparti di degenza e di urgenza (analisi decentrate).

Si è finalmente realizzato il sogno dei medici e chimici dell'Ottocento.

Riassunto – Nella seconda metà dell'Ottocento, con l'applicazione della chimica agli studi di fisiologia e patologia, si aggiunge, nella diagnosi di diabete mellito, un "segno chimico" importante e inequivocabile: la presenza di glucosio nelle urine.

Questa possibilità si rivela subito un potente mezzo non solo per la diagnosi ma anche per il monitoraggio del paziente diabetico. Servono però metodi analitici il più possibile semplici e reattivi che possano trovar posto anche nella borsa del medico "di campagna" per eseguire indagini al letto del malato. Ciò porta alla nascita ed al successivo eccezionale sviluppo della cosiddetta "dry chemistry".

Nella "dry chemistry" i reagenti chimici per la ricerca di una sostanza sono allo stato anidro, applicati su supporto di carta o di stoffa. A contatto con il liquido biologico da esaminare, i reagenti vengono solubilizzati dall'acqua contenuta nel campione e la presenza dell'analita da ricercare sviluppa un colore, utilizzabile per l'analisi qualitativa o quantitativa.

La realizzazione del primo reagente allo stato secco per la ricerca del glucosio nelle urine viene attribuita al chimico francese Jules Maumené nel 1850.

Successivamente si trovano altri esempi di reattivi allo stato secco pronti all'uso: le

laminette metalliche di Cesare Pratesi (1872), le "*copper test pellets*" di William Pavy (1880), le cartine reattive ("*urinary test papers*") di George Oliver (1889).

Il grande sviluppo della "dry chemistry" si avrà però negli anni '50 del Novecento con i primi reattivi enzimatici allo stato secco.

Ulteriore espansione di questa tecnologia avviene quando, sulla base di un modello teorico sviluppato da Paul Kubelka e Franz Munk fin dal 1931, vengono costruiti intorno al 1970 gli strumenti per la spettroscopia di riflettanza diffusa.

BIBLIOGRAFIA

[1] Bert W., 1983. Dry reagent chemistries in clinical analysis. Analytical Chemistry; 55, 498A-514A.

[2] Comer J.P., 1956. Semiquantitative specific test paper for glucose in urine. Analytical Chemistry, 28, 1748-1750.

[3] Dall'Olio G., F. Tasinazzo, A. Bolzon, 1991. Spettroscopia di Riflettanza Diffusa e Dry Chemistry. Biotecnica, 8, 109-114.

[4] Dall'Olio G., 2004. Il controllo e l'autocontrollo della glicosuria nell'Ottocento. Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo, 24, 199-206.

[5] Kubelka P., F. Munk, 1931. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. Zeitschrift für Technische Physik, 11, 593-601.

[6] Maumenè J., 1850. Sur un noveau réactif pour distinguer la presence du sucre dans certain liquides. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 30, 314-316.

[7] Oliver G., 1883. On bedside urinary tests. The Lancet, I, 139-140, 190-192.

[8] Pratesi C., 1863. Di un nuovo reattivo dell'iodio proposto ai medici come reattivo clinico. Lo Sperimentale, 12, 469-473.

[9] Pratesi C., 1873. Ricerca clinica del glucosio nelle orine dei diabetici. Lo Sperimentale, 25, 37-42.

[10] Pavy F.W., 1880. Copper test pellets for sugar. The Lancet, II, 57.

[11] Primavera G., 1868. Manuale di Chimica Clinica. Vitaler, Napoli.

[12] Redazione, 1986. Reflotron system. Analisi in una nuova dimensione. Attualità diagnostiche, 11, 14-17.

[13] Rosenfeld L., 1999. Four centuries of Clinical Chemistry. Taylor & Francis, New York.

[14] Società medico-Fisica Fiorentina, 1874. Nona adunanza pubblica del 15 giugno 1873. Lo Sperimentale, 34, 233-236.

[15] Voswinckel P., 1994. A marvel of colors and ingredients. The story of urine test strips. Kidney International, 46, S3-S7.

[16] Winter W,E., 2004. A Rosetta Stone for insulin treatment: self-monitoring of blood glucose. Clinical Chemistry, 50, 985-987.