

Ruolo della spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier nella valutazione della calcolosi urinaria

Aniello Primiano¹, Pietro Manuel Ferraro², Silvia Persichilli¹, Giovanni Gambaro², Cecilia Zuppi¹, Jacopo Gervasoni¹

¹Dipartimento di Diagnostica e Medicina di Laboratorio, Policlinico A. Gemelli, Roma

²Unità Operativa di Nefrologia, Complesso Integrato Columbus, Roma

ABSTRACT

Role of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in the evaluation of urinary stone disease.

Nephrolithiasis is a common disease occurring in both industrialized and developing countries and mainly affecting adults aged 20-60 years. The determination of crystalline and molecular composition and the quantification of all stone components are helpful to establish the etiology of urinary stone disease. Different methodologies exist for the analysis of renal stones. In our laboratory, we used the chemical spot test, which is the most popular method for routine stone analysis. However, this method is relatively inaccurate and does not allow distinguishing between the crystalline phases. In this paper, we evaluated the quantitative FT-IR spectroscopy technique for a possible introduction in our laboratory. We analyzed 100 urinary stones, divided into 3 groups: pure stones, mixed stones, and pure stones with substances in trace. Results of each group were compared with those obtained with chemical spot test. A total or partial disagreement between the two methods was observed in 59% of pure stones, in 86.6% of mixed stones and in 100% of pure stones with substances in trace, respectively, suggesting the replacement of the chemical test with FT-IR spectroscopy.

INTRODUZIONE

La nefrolitiasi è una malattia la cui incidenza in entrambi i sessi è andata aumentando progressivamente negli ultimi vent'anni, interessando la fascia d'età compresa tra 20 e 60 anni (1, 2). Nei Paesi con un elevato standard di vita, come gli Stati Uniti, la prevalenza della calcolosi renale è notevolmente elevata (>10%) (3), mentre una recente indagine condotta in Italia ha mostrato una prevalenza del 7,5% in una popolazione urbana (4).

La formazione del calcolo è il risultato finale di un processo a più stadi in cui l'equilibrio tra i fattori che promuovono la cristallizzazione di determinati sali urinari e fattori che la inibiscono è perturbato. I calcoli urinari possono essere composti da diverse sostanze; le più comuni sono l'ossalato di calcio monoidrato (COM, whewellite), l'ossalato di calcio diidrato (COD, weddellite), il carbonato apatite (CA, dahllite), l'urato di ammonio, il fosfato idrato di ammonio e magnesio (PAM, struvite), il calcio diidrato idrogeno fosfato (brushite), l'acido urico (forma anidra AU0 e forma diidrato AU2, uricite) e suoi sali e la cistina. Sostanze meno frequenti sono xantina, 2,8-diidrossiadenina e diversi farmaci (3).

E' riconosciuto che la determinazione della composizione e la quantificazione di tutti i componenti del calcolo in esame sono molto utili per stabilire l'impostazione diagnostica, terapeutica e per la valutazione prognostica della nefrolitiasi (5). I metodi chimici, utilizzati nella maggior parte dei laboratori italiani, presentano molti limiti (3, 6). Metodi più accurati sono la diffrazione a raggi X e la spettroscopia infrarossa. Tra i due, la spettroscopia infrarossa sta diventando quello più utilizzato (3, 7). Gli spettri di assorbimento in infrarosso si dicono di vibrazione e rotazione, perché le radiazioni infrarosse convogliano quantità di energia capaci di provocare nelle molecole dei moti di vibrazione degli atomi o dei moti rotatori di un atomo o di un gruppo di atomi intorno all'asse che lo lega a un altro atomo. Le vibrazioni possono prodursi nel senso di variare temporaneamente sia le distanze tra due atomi tra loro legati, sia l'angolo che due atomi formano con un terzo atomo al quale sono ambedue legati. Nello specifico, quando una molecola viene investita da una radiazione infrarossa a una certa frequenza ν (espressa come numero d'onda, $1/\nu$, in cm^{-1}), l'energia ceduta dalla radiazione viene convertita in energia rotazionale e vibrazionale. I vari gruppi funzionali

Corrispondenza a: Silvia Persichilli, Dipartimento di Diagnostica e Medicina di Laboratorio, Largo A. Gemelli 8, 00168 Roma. Tel. 0630154222, Fax 0630154222, E-mail spersichilli@rm.unicatt.it

Ricevuto: 11.08.2015

Revisionato: 16.09.2015

Accettato: 06.10.2015

della molecola in esame assorbono a frequenze ben precise e la rilevazione di un segnale all'interno dello spettro di un composto indicherà la presenza di un particolare gruppo funzionale. Quindi, le frequenze vibrazionali sono una sorta di impronta digitale dei composti. Questa proprietà viene utilizzata per la caratterizzazione di composti organici e inorganici presenti, nella fattispecie, nei calcoli urinari e l'intensità di una banda è proporzionale alla concentrazione del composto. La spettroscopia infrarossa permette quindi di ottenere informazioni inequivocabili sulla composizione del calcolo, identificando sia le sostanze principali che quelle presenti in tracce, ottenendo così tutte le informazioni essenziali per una terapia mirata (8).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare un metodo colorimetrico con il metodo in spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) per l'analisi dei calcoli urinari al fine di valutare la possibile introduzione della seconda nel nostro laboratorio.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 100 calcoli urinari da pazienti (58 uomini e 42 donne, di età compresa tra 21-75 anni) provenienti dalla Divisione di Nefrologia e Urologia del nostro ospedale. Al momento della consegna in laboratorio sono stati registrati forma, colore, dimensioni e peso di ogni campione. I calcoli sottoposti ad analisi sono stati lavati con acqua deionizzata e lasciati ad asciugare a temperatura ambiente per 24 ore; successivamente, sono stati polverizzati in un mortaio di agata e aliquotati in 2 provette prima di essere sottoposti alle analisi con entrambi i metodi.

Metodo chimico colorimetrico

L'analisi colorimetrica dei calcoli urinari è stata eseguita seguendo le indicazioni riportate dal kit (Urinary Calculi Analysis kit, DiaSys). Questo metodo permette di rilevare la presenza degli ioni più comuni presenti nei calcoli urinari. In breve, una delle due aliquote del calcolo urinario in esame veniva risospesa in acqua ultrapura. Il saggio consisteva nell'aggiunta di diversi reagenti chimici. Il viraggio della soluzione verso determinati colori, la formazione di precipitati o la comparsa di bolle di gas, dopo l'aggiunta di specifici reagenti per ogni analita, indica la presenza di un determinato ione o della cistina. Dopo incubazione, il colore della soluzione viene confrontato con quelli riportati sulla scala colorimetrica del kit specifica per lo ione di interesse, fornendo un risultato qualitativo.

Metodo in spettroscopia FT-IR

La seconda aliquota del campione polverizzato è stata mescolata in un mortaio di agata con un sale inerte (bromuro di potassio essiccato) in una proporzione da 0,5% a 2%. Questa miscela è stata trasferita in uno

stampo appropriato e pressata (200 atm) per formare una pastiglia ("pellet") trasparente (13 mm di diametro). Il "pellet" ottenuto è stato inserito nella fenditura dedicata ("slitta") per essere analizzato. Per ogni spettro sono state effettuate 32 scansioni, nell'intervallo spettrale 4000-400 cm^{-1} con risoluzione di 4 cm^{-1} . Al fine di eliminare il rumore di fondo, prima di ogni analisi lo spettro è stato azzerato contro un "pellet" di potassio bromuro o contro aria (9). Tutti gli spettri sono stati acquisiti tramite lo strumento Perkin Elmer Spectrum One e poi confrontati con gli spettri contenuti nella libreria dedicata per i calcoli renali (Spectra Nicodoms IR Library, ottenuta da Nicodoms Ltd.). Da questo confronto viene generato un rapporto per i relativi componenti del calcolo urinario. L'intervallo dei punteggi può variare da 0,000 a 1,000, dove un punteggio 1,000 indica una perfetta congruenza tra lo spettro del campione e quello di riferimento. In ogni caso, è stato eseguito un controllo visivo degli spettri, per la scelta della composizione più appropriata e per fornire un risultato semi-quantitativo.

Confronto tra i metodi

Sulla base delle analisi effettuate in FT-IR, i 100 campioni analizzati sono stati divisi in 3 gruppi: calcoli puri (n=44), calcoli misti (n=45) e calcoli puri con sostanze in tracce (n=11). I risultati di ciascun gruppo sono stati confrontati con quelli del kit DiaSys. Dal confronto delle due metodiche, abbiamo definito i seguenti criteri di classificazione:

- in accordo: quando FT-IR e kit DiaSys identificavano gli stessi componenti;
- parzialmente in accordo: quando il kit DiaSys identificava la componente principale rilevata con la FT-IR in aggiunta ad altri ioni non riconducibili a una particolare specie cristallina;
- in disaccordo: quando il kit DiaSys non identificava la componente principale oppure quando identificava la sostanza principale, ma anche altri ioni riconducibili a particolari specie cristalline, che non sono state rilevate dalla FT-IR.

RISULTATI

La Tabella 1 mostra i costituenti rilevati da entrambe le tecniche sui campioni analizzati.

Al fine di poter confrontare i risultati di entrambe le metodiche, i componenti sono stati scomposti nei singoli ioni per ottenere i valori in percentuale dei singoli costituenti dei calcoli urinari analizzati (puri, misti e con sostanze in tracce) (Tabella 2). Si può notare come la metodica colorimetrica tenda a sovrastimare gli ioni ossalato, magnesio, ammonio, mentre sottostima la presenza del carbonato e dello ione urato rispetto alla spettroscopia FT-IR.

Come mostrato nella Tabella 3, per il gruppo dei calcoli puri le metodiche erano in accordo nel 40,9% dei casi, in accordo parziale nel 31,8% e in totale disaccordo nel 27,2%. Un maggiore disaccordo tra le due metodiche era presente nel gruppo dei calcoli misti (Tabella 4) e in

quello dei calcoli puri con sostanze in tracce (Tabella 5).

Per valutare l'importanza della quantità di campione da analizzare, due frammenti di 1 mg dello stesso calcolo sono stati analizzati con entrambe le metodiche: mentre la metodica chimica non era in grado di rilevare nessuna sostanza, la spettroscopia FT-IR ha individuato la presenza di ossalato di calcio con tracce di carbonato-apatite.

DISCUSSIONE

Conoscere l'esatta composizione del calcolo urinario è importante sia per una corretta diagnosi che per un "follow-up" efficace della malattia. Tra i metodi disponibili per quest'analisi, il metodo chimico colorimetrico è

Tabella 1

Costituenti dei calcoli urinari analizzati rilevati con le metodiche valutate

Sostanze rilevate	Numero (%)
<i>Metodo colorimetrico</i>	
Ossalato	83 (83%)
Calcio	79 (79%)
Magnesio	28 (28%)
Fosfato	31 (31%)
Urati	21 (21%)
Ammonio	22 (22%)
Cistina	7 (7%)
Carbonati	6 (6%)
<i>Analisi in spettroscopia infrarossa</i>	
Sostanze rilevate	Numero
Ossalato di calcio monoidrato	67 (67%)
Carbonato-apatite	39 (39%)
Acido urico anidro	30 (30%)
Ossalato di calcio diidrato	23 (23%)
Acido urico diidrato	3 (3%)
Fosfato ammonio magnesio	3 (3%)
Cistina	4 (4%)
Proteine	5 (5%)
Atazanivir	1 (1%)

Tabella 2

Frequenze in percentuale dei singoli costituenti nei calcoli urinari analizzati rilevati con la metodica colorimetrica e quella spettroscopica FT-IR

Sostanza rilevata	Metodo colorimetrico	Spettroscopia FT-IR
Ossalato	83%	70%
Calcio	79%	78%
Magnesio	28%	3%
Fosfato	31%	40%
Urati	21%	30%
Ammonio	22%	3%
Cistina	7%	4%
Carbonati	6%	40%

quello più diffuso nei laboratori italiani perché poco costoso e di facile esecuzione, sebbene richieda tempo e grandi quantità di campione. Nelle "Guidelines on urolithiasis" dell'"European Association of Urology" ne viene tuttavia sconsigliato l'utilizzo (3). Nelle stesse viene sottolineata l'importanza di analizzare la composizione dei calcoli con la spettroscopia a infrarosso oppure con la diffrazione a raggi X. La principale difficoltà nella diffusione nei laboratori per entrambe queste metodiche è legata alla necessità di uno strumento dedicato e alla complessità dell'interpretazione dei risultati, per la quale è richiesta la presenza di personale qualificato. La diffrazione a raggi X è la metodica di elezione per l'analisi delle fasi cristalline, anche se la spettroscopia FT-IR è stata adottata da molti laboratori europei per l'analisi dei calcoli urinari, essendo la fase preanalitica più semplice e veloce (9). Inoltre, a differenza della diffrazione a raggi X consente la determinazione non solo delle componenti cristalline ma anche delle componenti amorfe (10).

Per i motivi sopraindicati abbiamo ritenuto la metodica spettroscopica più adeguata ai nostri scopi. L'impegno principale ha riguardato la formazione del personale (due corsi al Tenon University Hospital di Parigi), che ha svolto un periodo di pratica di ~1 anno prima dell'introduzione in routine della metodica.

Il nostro studio, in linea con la letteratura internazionale, dimostra la potenzialità dell'analisi mediante FT-IR nell'identificare la composizione di calcoli rari: ad es., un calcolo che analizzato con la metodica chimica sembrava composto da ossalato di calcio, all'analisi in spettroscopia FT-IR mostrava solamente la presenza di atazanivir (farmaco antivirale). Inoltre, durante il nostro studio siamo riusciti ad analizzare due calcoli identificando come componente principale le proteine, che sarebbero sfuggite utilizzando la metodica chimica. Va sottolineato infine che il più elevato numero di risultati per gli ioni ammonio e magnesio osservati con la metodica chimica potrebbe indurre il clinico a un'errata diagnosi di calcolosi da struvite, indirizzando erroneamente verso una patogenesi infettiva.

I metodi chimici hanno dimostrato di essere poco affidabili in numerosi programmi di controllo di qualità, con tassi di errore >90% nell'identificazione di alcuni componenti (11); la tecnica FT-IR mostra al contrario una sensibilità molto elevata e permette un'identificazione

Tabella 3*Comparazione dei risultati ottenuti con le metodiche utilizzate nel gruppo dei calcoli puri (n=44)*

Sostanza rilevata	Accordo	Accordo parziale	Disaccordo
Ossalato di calcio monoidrato	15	6	3
Acido urico anidro	2	6	6
Carbonato-apatite	-	-	1
Cistina	1	2	-
Proteine	-	-	1
Atazanivir	-	-	1
Totale	18 (40,9%)	14 (31,8%)	12 (27,2%)

Tabella 4*Comparazione dei risultati ottenuti con le metodiche utilizzate nel gruppo dei calcoli misti (n=45)*

Sostanza rilevata	Accordo	Accordo parziale	Disaccordo
Acido urico anidro + ossalato di calcio monoidrato	3	4	3
Ossalato di calcio monoidrato + ossalato di calcio diidrato + carbonato-apatite	-	4	3
Fosfato ammonio magnesiaco + carbonato-apatite + ossalato di calcio monoidrato	-	-	1
Fosfato ammonio magnesiaco + carbonato-apatite	-	-	1
Carbapatite + fosfato ammonio magnesiaco + proteine	-	-	1
Acido urico anidro + ossalato di calcio monoidrato + carbonato-apatite	-	-	1
Acido urico anidro + acido urico diidrato	1	-	1
Acido urico anidro + acido urico diidrato + ossalato di calcio monoidrato	-	1	-
Acido urico anidro + ossalato di calcio diidrato + ossalato di calcio monoidrato	-	1	-
Carbonato-apatite + ossalato di calcio monoidrato + ossalato di calcio diidrato	-	1	3
Ossalato di calcio monoidrato + carbonato-apatite	-	2	2
Ossalato di calcio monoidrato + ossalato di calcio diidrato	-	1	-
Ossalato di calcio diidrato + carbonato-apatite + proteine	-	-	1
Carbonato-apatite + ossalato di calcio monoidrato	-	1	-
Carbonato-apatite + ossalato di calcio diidrato	-	1	-
Ossalato di calcio diidrato + ossalato di calcio monoidrato + carbonato-apatite	1	1	1
Ossalato di calcio diidrato + ossalato di calcio monoidrato	-	1	-
Carbonato-apatite + ossalato di calcio diidrato + proteine	-	-	1
Carbonato-apatite + ossalato di calcio monoidrato + proteine	1	-	-
Acido urico anidro + ossalato di calcio diidrato	-	-	1
Cistina + carbonato-apatite	-	1	-
Totale	6 (13,3%)	19 (42,2%)	20 (44,4%)

Tabella 5*Comparazione dei risultati ottenuti con le metodiche utilizzate nel gruppo dei calcoli puri con sostanze in tracce*

Sostanza rilevata	Accordo	Accordo parziale	Disaccordo
Ossalato di calcio monoidrato + carbonato-apatite tracce	-	5	2
Ossalato di calcio diidrato + carbonato-apatite tracce	-	1	-
Ossalato di calcio monoidrato + ossalato di calcio diidrato tracce	-	1	-
Brushite + carbonato-apatite tracce	-	-	1
Proteine + carbonato-apatite tracce	-	-	1
Totale	0 (0,0%)	7 (63,6%)	4 (36,4%)

accurata della composizione del calcolo, anche se riteniamo che l'interpretazione effettuata da un operatore esperto sia indispensabile per ottenere un risultato affidabile.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro condotto con un contributo ottenuto dal bando SIBioC 2013 per giovani professionisti della Medicina di Laboratorio per facilitare l'acquisizione di nuove tecnologie.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet* 2006;367:333-44.
2. Daudon M, Doré JC, Jungers P, et al. Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach. *Urol Res* 2004;32:241-7.
3. Türk C, Knoll T, Petrik A, et al. Guidelines on urolithiasis. European Association of Urology, 2015. http://uroweb.org/wp-content/uploads/22-Urolithiasis_LR_full.pdf
4. Croppi E, Ferraro PM, Taddei L, et al. Prevalence of renal stones in an Italian urban population: a general practice-based study. *Urol Res* 2012;40:517-22.
5. Baggio B, Borghi L, Caudarella R, et al. Linee guida per la nefrolitiasi. *G Ital Nefrol* 2000;17:59-64.
6. Hesse A, Kruse R, Geilenkeuser WJ, et al. Quality control in urinary stone analysis: results of 44 ring trials (1980-2001). *Clin Chem Lab Med* 2005;43:298-303.
7. Benramdane L, Bouatia M, Idrissi MOB, et al. Infrared analysis of urinary stones, using a single reflection accessory and a KBr pellet transmission. *Spectroscopy Letters* 2008;41:72-80.
8. Singh I. Renal geology (quantitative renal stone analysis) by "Fourier transform infrared spectroscopy. *Int Urol Nephrol* 2008;40:595-602.
9. Estepa LM, Levillain P, Lacour B, et al. Infrared analysis of urinary stones: a trial of automated identification. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1043-52.
10. Basiri A, Taheri M, Taheri F. What is the state of the stone analysis techniques in urolithiasis? *Urol J Spring* 2012;9:445-54.
11. Gràcia-García S, Millán-Rodríguez F, Rousaud-Barón F, et al. Why and how we must analyze urinary calculi. *Actas Urol Esp* 2011;35:354-62.