

Il ruolo del laboratorio clinico nella diagnostica della calcolosi renale

Michele Petrarulo, Marta Leporati, Federica Pullara, Paolo Valesella, Simone Busso, Alessandra Canevaro, Michael Prestigiovanni, Domenico Cosseddu

Laboratorio di Chimica Analitica e Calcolosi Renale - Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano di Torino

ABSTRACT

The role of clinical laboratory for the diagnosis of urolithiasis

The pathogenesis of urolithiasis is related to the presence of physico-chemical abnormalities in the urine environment. These anomalies can be highlighted and evaluated through specific biochemical investigations, often not included in the usual activities of a hospital laboratory. The laboratory activities include the adoption of the most appropriate procedures for the evaluation of urine saturation with respect to lithogenic salts (propensity to stone formation), the identification and analysis of precursors and inhibitors of crystallization, the biochemical investigation for the identification of pre-existing diseases, including the genetic ones, and the analysis of kidney stones. Over the years, in the medical approach to nephrolithiasis, the need for specialized analytical techniques has increasingly raised, requiring the use of versatile technology (HPLC, GC-LC/MS, FTIR), adaptable to the investigation of substances belonging to the most varied classes and present in different biological matrices. In this paper we describe the main analytical activities carried out by a specialized laboratory for the study of renal stone disease.

Parole chiave: diagnostica urinaria, calcolosi renale, spettroscopia all'infrarosso

GENERALITÀ

La patogenesi della calcolosi renale è correlata alla presenza di anomalie chimico-fisiche nell'ambiente urinario. Tali anomalie possono essere evidenziate e studiate attraverso indagini biochimiche specifiche, spesso non ricomprese tra le usuali attività di un laboratorio analisi ospedaliero.

Le attività del laboratorio per lo studio della calcolosi comprendono la valutazione dello stato di saturazione delle urine rispetto ai sali litogeni (propensione alla calcolosi), l'individuazione e l'analisi dei precursori e degli inibitori della cristallizzazione, l'indagine biochimica per l'individuazione di patologie, anche genetiche, correlate alla calcolosi, il monitoraggio del turnover osseo, l'analisi del calcolo renale.

Nel corso degli anni, nell'approccio medico alla calcolosi renale, è aumentata sempre più l'esigenza di analisi approfondite e specialistiche che necessitano l'utilizzo di tecniche versatili, quali la cromatografia liquida (HPLC), la gas cromatografia o la cromatografia liquida

accoppiate alla spettrometria di massa (GC-LC/MS) o la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR), adattabili all'analisi di sostanze appartenenti alle classi più svariate e presenti in varie matrici biologiche.

La nefrolitiasi è una delle malattie non trasmissibili con maggiore impatto epidemiologico nei paesi occidentali (1). Ha una prevalenza superiore al 10% con un tasso di recidiva del 50%. La forma calcica è quella predominante (2). I calcoli renali si formano a seguito della precipitazione di sostanze poco solubili nell'ambiente urinario. La cristallizzazione e l'accrescimento dei cristalli possono avvenire solo in condizioni di soprassaturazione rispetto al sale litogeno, cioè in quella condizione in cui il prodotto ionico dei componenti del sale supera il prodotto di solubilità, limite stabilito dalla termodinamica.

Scopo di questa rassegna è quello di descrivere il ruolo di un laboratorio specializzato nello studio della calcolosi renale. Vengono esposte le principali problematiche da affrontare, le caratteristiche della dotazione strumentale nonché il modo in cui opera il nostro laboratorio.

Corrispondenza a: Marta Leporati, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano di Torino - Laboratorio Analisi Chimiche e Microbiologiche Torino, Email: mleporati@mauriziano.it

Ricevuto: 16.05.2023

Revisionato: 14.06.2023

Accettato: 01.10.2023

Pubblicato on-line: 17.10.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.079

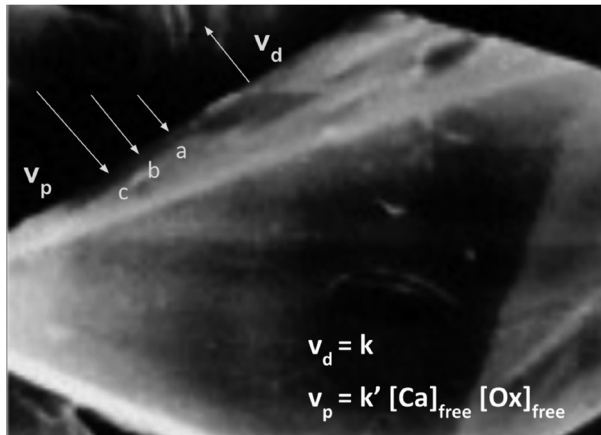


Figura 1
 Schema delle cinetiche di dissoluzione e precipitazione dell'ossalato di calcio monoidrato (COM) in presenza di corpo di fondo.

V_d = velocità di dissoluzione, k =costante cinetica di dissoluzione, V_p = velocità di precipitazione di COM in soluzione
 a) sottosatura, b) satura, c) sopratura. In soluzione satura $V_p=V_d=k'[Ca]_{free,ss} \times [Ox]_{free,ss}$.
 k' = costante cinetica di precipitazione.

Dinamica della formazione e della dissoluzione dei cristalli di ossalato di calcio nell'ambiente urinario

Formazione, accrescimento e dissoluzione del cristallo di ossalato di calcio

Allo scopo di razionalizzare la dinamica di formazione e di accrescimento dei calcoli renali è possibile usare come modello i meccanismi chimico-fisici che coinvolgono la calcolosi ossalo-calcica.

Per comprendere i meccanismi di formazione, accrescimento e dissoluzione del cristallo di ossalato di calcio, occorre premettere che qualsiasi sale presente come corpo di fondo in una soluzione acquosa satura mantiene una sua velocità di dissoluzione pressoché indipendente da fattori diversi dalla temperatura e dal grado di agitazione della soluzione. La diffusione delle particelle è un fenomeno centrale nella dinamica di accrescimento del cristallo (3) ed è significativamente influenzata da temperatura e agitazione del mezzo.

Se una certa quantità di ossalato di calcio monoidrato (COM) viene posta in acqua, con il solido presente come corpo di fondo, COM tenderà a dissolversi con una cinetica di ordine zero rispetto ai suoi componenti e dipendente solo dalla temperatura, dal tipo e dall'estensione della superficie cristallina esposta all'ambiente acquoso ($V_d=k$, dove V_d è la velocità di dissoluzione e k è una costante). La dissoluzione comporta un graduale aumento delle concentrazioni di calcio e ossalato in soluzione. All'aumentare delle concentrazioni di ossalato e calcio in soluzione inizia a formarsi il complesso di ossalato di calcio ($CaOx$) solubile. L'aggregazione tra questi addotti conduce alla formazione di microcristalli.

Quando il prodotto ionico delle concentrazioni di calcio e ossalato supererà il prodotto di solubilità del COM ($K_{sp_{CaOx}}$) inizierà la precipitazione intesa come accrescimento dei microcristalli con abbandono della fase acquosa. La velocità di precipitazione (V_p), dipendente da temperatura e forza ionica, sarà di ordine uno rispetto sia al calcio libero ($[Ca]_{free}$) che all'ossalato libero ($[Ox]_{free}$), ($V_p=k'[Ca]_{free} \times [Ox]_{free}$) (4-9).

La soluzione risulterà satura rispetto al COM quando la velocità di precipitazione eguaglierà quella di dissoluzione dei cristalli ($V_{p,ss}=V_d$; dove $V_{p,ss}$ è la velocità di precipitazione in soluzione satura). In tale situazione la soluzione apparirà stabile dal punto di vista macroscopico sebbene i fenomeni di dissoluzione e precipitazione continuano ad avere luogo (Figura 1).

Il prodotto di solubilità del COM a 37°C ha un valore di circa $2,7 \times 10^{-9}$ (mol/L)² (5), pertanto in una soluzione acquosa satura a 37°C, le concentrazioni sia di calcio che di ossalato liberi saranno nell'ordine di 50 µmol/L. Ciò implicherebbe che, se nell'ambiente urinario non intervenissero altri fattori, per eliminare 300 µmol di ossalato, che è la quantità media di ossalato escreto in 24 ore da un individuo adulto, sarebbe necessaria una diuresi di alcuni litri. Tale valore teorico è decisamente elevato se si considera che la calciuria è molto più elevata di 50 µmol/L (nell'ordine delle mmol/L).

Calcolo della saturazione urinaria rispetto all'ossalato di calcio monoidrato e ad altre specie litogene

Sono state sviluppate diverse procedure in grado di stimare le concentrazioni libere di Ox e Ca urinari (ad esempio Lithorisk®, Mayoly Italia S.p.A., Rivoli, Italia) al fine di poter rapportare il loro prodotto ionico al prodotto di solubilità del COM ($K_{sp_{CaOx}}$) misurandone così il grado di saturazione (7,10-14).

Tutti gli elettroliti urinari in grado di diminuire le concentrazioni di Ca e Ox liberi ($[Ca]_{free}$ e $[Ox]_{free}$) contribuiscono ad abbassare la saturazione rispetto a COM. I complessanti del calcio quali citrato, tartrato, il fosfato o altri polianioni ne diminuiscono la frazione libera. Allo stesso modo, ad esempio, l'ossalato libero diminuisce al diminuire del pH e all'aumentare del Mg, con cui forma un complesso solubile.

La seguente espressione semplificata (viene omessa la dipendenza dalla forza ionica), definisce la saturazione rispetto a COM (β_{CaOx}):

$$\beta_{CaOx} = [Ca]_{free} \times [Ox]_{free} / K_{sp_{CaOx}}$$

dove:

- $K_{sp_{CaOx}}$ = prodotto di solubilità condizionale di COM

- $[Ca]_{free}$, $[Ox]_{free}$ = concentrazioni ioni liberi

e

$$\beta_{CaOx} = 1 = [Ca]_{free,ss} \times [Ox]_{free,ss} / K_{sp_{CaOx}}$$

dove:

- $[Ca]_{free,ss}$, $[Ox]_{free,ss}$ = concentrazioni ioni liberi in soluzione satura

I vari sistemi di calcolo utilizzati indicano che normalmente l'urina è soprassaturata rispetto al COM ($\beta_{CaOx} = 1-15$). Ciò equivale a dire che le urine riescono a mantenere in soluzione più calcio e più ossalato di quanto consentito termodinamicamente. Inoltre, a livello sperimentale si osserva che, maggiore è il valore della soprassaturazione, maggiore è la propensione alla cristallizzazione e alla formazione di calcoli di ossalato di calcio (7).

Il sistema di calcolo da noi messo a punto (Lithorisk®), finalizzato alla stima di $[Ca]_{free}$ e $[Ox]_{free}$ necessarie per il calcolo della β_{CaOx} , prevede l'analisi di 11 parametri biochimici (calcio, magnesio, sodio, potassio, ammonio, pH, cloruro, citrato, ossalato, fosfato, solfato). Il valore di saturazione calcolato rappresenta una grandezza indicativa, malgrado ciò trova una sua utilità clinica. L'imprecisione della stima di β_{CaOx} è determinata dalla combinazione dell'imprecisione tipicamente accettabile per i metodi analitici utilizzati.

Il calcolo delle concentrazioni delle varie specie teoricamente presenti nella miscela, compresi i vari complessi che vengono originati, viene effettuato risolvendo in modo iterativo un sistema di equazioni di bilanciamento di massa costruite mediante l'utilizzo di 31 costanti di stabilità (7,15).

Analogamente, è possibile stimare le saturazioni urinarie rispetto ad altre specie litogene quali acido urico, cistina, brushite, utilizzando algoritmi comprendenti le costanti di formazione di ciascuna specie e i parametri rilevanti (ad esempio il pH, la forza ionica).

Sebbene la stima venga normalmente calcolata su raccolte urinarie delle 24 ore, un recente approccio semplificato e meno costoso, effettuato su urine del mattino a digiuno, ha mostrato una certa utilità (16).

Fattori di inibizione della cinetica di precipitazione dell'ossalato di calcio monoidrato

Normalmente le urine sono soprassature rispetto a COM e ciò non appare compatibile con la solubilità del COM. Il grado di saturazione è calcolato sulla base di una trattazione termodinamica per sistemi all'equilibrio, ma in realtà l'ambiente urinario non è un sistema all'equilibrio. Perturbando infatti un campione urinario soprassaturato mediante aggiunta di cristalli di COM si osserva la graduale diminuzione della soprassaturazione nel corso del tempo fino al raggiungimento di valori di β_{CaOx} prossimi a 1 (condizione di equilibrio) (13).

Il fenomeno della soprassaturazione urinaria è pertanto da interpretare in termini cinetici: l'ambiente urinario è generalmente in grado di rallentare la precipitazione dei sali litogeni sfavorendo la formazione e l'accrescimento dei cristalli, quantomeno nel corso del tempo di permanenza delle urine nelle vie urinarie.

Nell'ambiente urinario il microcristallo in formazione è affine (superficie e spigoli carichi) ad una serie di sostanze (inibitori) che, adsorbite sulla sua superficie, lo "isolano" dall'ambiente circostante, lo "avvelenano" e ne rallentano l'aggregazione e l'accrescimento per un tempo sufficiente a consentirne l'eliminazione.

È risaputo che soggetti sani possono esibire una significativa cristalluria senza formazione di calcoli renali, infatti piccole particelle si possono formare ed essere escrete nelle urine senza causare alcun problema (17).

Il cristallo, oltre ad essere soggetto ad "avvelenamento" da parte di sostanze adsorbite, tende a dissolversi spontaneamente con velocità costante, fattore favorente l'ulteriore rallentamento dell'aggregazione dei microcristalli. Molte sostanze presenti nelle urine, sia endogene che esogene, sono considerate inibitori cinetici della cristallizzazione, tra queste: gli acidi policarbossilici e derivati fosforilati, alcune glicoproteine (18), flavonoidi e polifenoli (19). *In vivo*, l'importanza degli inibitori della cristallizzazione si osserva, ad esempio, nell'ipocitraturia che è causa di un'aumentato rischio di calcolosi ossalocalcica e fosfocalcica (20). Non è errato, pertanto, affermare che la formazione di calcoli di ossalato di calcio è causata da anomalie chimico-fisiche dell'ambiente urinario.

In definitiva, in condizioni normali, il "sistema urinario" dei mammiferi è in grado di eliminare molto più ossalato e calcio di quanto sarebbe possibile in semplice acqua. Le concentrazioni di calcio e ossalato appaiono "compresse", oltre i limiti termodinamici, all'interno dell'ambiente urinario.

GESTIONE DEL CAMPIONE URINARIO NEL LABORATORIO DELLA CALCOLOSI RENALE

In sede di prima valutazione nefrologica viene richiesta una serie di esami di screening sull'urina delle 24 ore ed eventualmente su quella delle 2h (secondo urine del mattino) (Tabella 1). Viene inoltre richiesta l'analisi del calcolo renale se questo è già stato espulso o estratto.

L'analisi del calcolo è fondamentale nell'indirizzo di ulteriori indagini. Se la richiesta comprende gli esami necessari il referto includerà il calcolo della saturazione rispetto alle principali specie litogene. Il nefrologo valuta l'esito dello screening e procede ad eventuali ulteriori approfondimenti all'indicazione terapeutica. Per esempio in caso di calcolo di cistina e positività al test di Brand, si procederà con la determinazione quantitativa della cistina.

Tabella 1
Esempio di esami richiesti per lo screening della calcolosi (prima visita)

Raccolta 24 ore acidificata	Raccolta 24 ore con inibitane	Urina delle 2 ore
U-pH	U-creatinina	U-calcio
U-acido citrico	U-urato	U-creatinina
U-fosfato inorganico	U-urea	Cistina (test Brand)
U-solfato	U-sodio	
U-ossalati	U-potassio	
U-calcio		
U-magnesio		
U-ammonio		

Se invece dallo screening emerge una condizione di iperossaluria sarà necessario valutare se si tratta di una iperossaluria primitiva (PH) o secondaria, eseguendo lo screening per i marcatori biochimici dell'iperossaluria primitiva (acidi glicolico per la PH1, L-glicerico per la PH2, 4-idrossi-2-ossoglutarico e 4-idrossiglutamico per la PH3). Potrebbe inoltre notarsi un pH urinario eccessivamente basso e/o una uricuria elevata. Le fasi diagnostiche successive possono quindi implicare opportuni approfondimenti.

Viene di seguito descritto l'iter del campione presso il nostro centro: il paziente si reca al centro prelievi per prenotare e ritirare le provette dei conservanti da aggiungere al contenitore di raccolta delle urine. Quando T la raccolta urinaria viene consegnata, il campione viene accettato sul sistema informatico, aliquotato nelle provette per le relative analisi ed inviato ai settori di competenza (Biochimica Clinica e Calcolosi renale). Una volta completate le analisi gli esiti convogliano su un unico referto, diviso in opportune sezioni.

Raccolta del campione

La corretta raccolta del campione è una fase fondamentale per l'esecuzione di analisi accurate. Il nostro centro adotta un protocollo d'indagine consolidato in grado di determinare i parametri necessari a stimare la saturazione urinaria. La raccolta delle 24 ore è sempre preferibile. Nei casi in cui non sia possibile effettuare la raccolta o per i pazienti pediatrici si possono utilizzare le seconde urine del mattino. Il paziente, al momento della prenotazione, riceve istruzioni dettagliate sulla raccolta dell'urina e sull'uso dei conservanti (Cloridina Gluconato 20% o Hibitane, 2 mL; HCl 37%, 10 mL).

I conservanti sono necessari al fine di inibire la proliferazione batterica e di evitare la degradazione degli analiti.

Quando l'analisi viene effettuata sulle urine delle 24 ore la raccolta deve essere doppia:

- in acido per la misurazione di ossalato, citrato, solfato, fosfato, calcio, magnesio e ammonio;
- in hibitane per creatinina, pH, acido urico ed elettroliti;

In base agli analiti richiesti il paziente riceverà le istruzioni per effettuare una raccolta adeguata. Per esempio, se sono richiesti ossalato, citrato e calcio effettuerà solo la raccolta acida, se invece è richiesto anche l'urato e il pH dovrà effettuare la raccolta doppia (acida e hibitane, Tabella 1).

L'acidificazione dell'urina consente:

- l'inibizione della precipitazione dell'ossalato e del fosfato di calcio in urine a pH>7;
- la stabilizzazione dell'acido ascorbico che, a pH>7, si converte spontaneamente in ossalato, causandone una sovrastima (21).

Stabilità

La conoscenza della stabilità degli analiti è un fattore particolarmente importante, specie quando sia necessario

posticipare l'esecuzione dell'analisi. Il campione è stabile se mantenuto in condizioni ambientali predeterminate e in presenza dei conservanti più appropriati.

Il nostro centro ha periodicamente valutato la stabilità degli analiti. Utilizzando lo schema qui riportato è stato considerato l'effetto di conservanti diversi su un pool di urine mantenuto a temperature diverse.

Conservanti valutati :

- Hibitane (cloridina gluconato 20%, Hib) - 2 mL/L urina;
- HCl 37% - 10 mL/L urina;
- acido acetico (AA) - 10 mL/L urina;
- acido tricloroacetico (TCA) - 10 g/L urina;
- urina tal quale (senza l'aggiunta di conservante)

Condizioni di temperatura:

- +25°C (temperatura ambiente);
- +4°C (frigorifero);
- -20°C (freezer);
- +35-40°C (temperatura elevata).

Ciascuna condizione di conservazione è stata verificata nel tempo, processando un'aliquota del relativo campione ai giorni 0, 1, 2, 5, 10, 30, per un totale di 105 aliquote.

I risultati ottenuti hanno mostrato che:

- l'ossalato è stabile con qualsiasi conservante a +4°C e diminuisce sensibilmente se conservato a -20°C indipendentemente dalla presenza di conservanti (Figura 2). Tale diminuzione è imputabile alla formazione di microcristalli di COM, evidentemente favorita dalle basse temperature;
- il citrato è stabile con qualsiasi conservante a +4°C, mentre diminuisce se conservato in acido a -20°C o in assenza di conservanti a qualunque temperatura;
- il calcio e la creatinina sono stabili con qualsiasi conservante acido a tutte le temperature ma, in hibitane o in assenza di conservanti, sono stabili se il campione viene mantenuto a basse temperature (+4°C, -20°C).

In caso di mancata acidificazione nel corso della fase di raccolta del campione, sempre che l'urina non sia infetta, può essere accettabile acidificarne una aliquota al momento dell'arrivo in laboratorio in ragione di 100 µL di HCl 37%/10 mL.

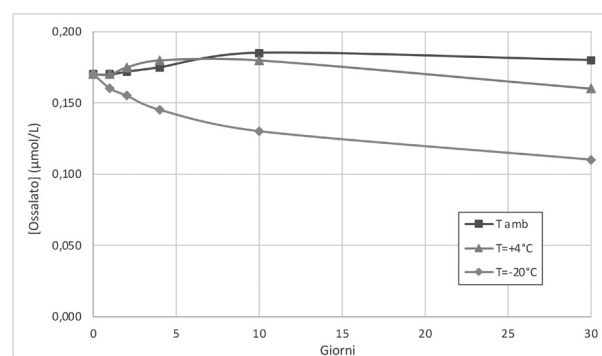


Figura 2

Stabilità dell'ossalato in pool di urine acidificato (HCl 37%) e conservato a diverse temperature.

Metodi di analisi

Gli usuali parametri biochimici (quali elettroliti, creatinina, acido urico) vengono analizzati presso il laboratorio centrale. Invece gli analiti particolari, per i quali non sono disponibili metodi in automazione, sono analizzati in un centro specializzato che dispone di metodi versatili e adattabili quali quelli cromatografici.

Nei paragrafi successivi vengono descritte le metodiche più idonee all'analisi di parametri utili nell'ambito della diagnostica della calcolosi renale.

Analisi del calcolo renale

L'analisi del calcolo renale rappresenta spesso il primo contatto con il paziente e il suo esito indirizza le ulteriori indagini metaboliche. Per questo motivo è importante che l'analisi venga eseguita con metodi affidabili e non fuorvianti. Ad esempio sul mercato sono ancora disponibili kit colorimetrici "per via umida", ormai obsoleti, che potrebbero produrre risultati poco accurati (22).

La diffrazione di Raggi X consente la valutazione quali-quantitativa della composizione e della struttura cristallina. L'apparecchiatura è piuttosto costosa e utilizzata nell'ambito della ricerca.

La spettroscopia infrarossa (FT-IR) rappresenta l'approccio analitico ottimale in quanto offre informazioni idonee sia per l'indagine quali-quantitativa che per la caratterizzazione della struttura cristallina.

L'adozione di dispositivi che consentono di operare in Riflettanza Totale Attenuata (ATR) sono estremamente utili nel caso di carico routinario rilevante, in quanto non richiedono una particolare preparazione del campione. In alternativa si utilizza la tecnica classica di misurazione della trasmittanza su campione solido disperso in pastiglia di KBr, che presenta il vantaggio di poter esaminare campioni molto scarsi (peso <2 mg), ma richiede una preparazione del campione più lunga e complessa.

Il peso e la descrizione morfologica del calcolo, oltre alla sua composizione, sono informazioni clinicamente di rilievo. Se il calcolo è costituito da porzioni macroscopicamente diverse si effettua la campionatura e l'analisi di ciascuna porzione.

Ossalato

Come già accennato in precedenza, per evitare errori grossolani nell'analisi dell'ossalato urinario è necessario mantenere il campione a pH <7.

Una tecnica sufficientemente accurata per la determinazione dell'ossalato è la cromatografia a scambio anionico con rivelazione conduttimetrica (IC) (23). Questa tecnica, grazie all'ampia gamma di combinazioni fase stazionaria/fase mobile, consente di ottimizzare la separazione di ciascuna delle varie classi di sostanze anioniche (anioni inorganici, acidi mono-, bi- e tri-carbossilici).

La cromatografia anionica si addice particolarmente

all'analisi dell'ossalato in quanto in grado di:

- separarlo cromatograficamente,
- rivelarlo in modo specifico e sensibile,
- prevenire la conversione di precursori dell'ossalato in colonna (es. acido ascorbico, acido ossalurico) attraverso l'uso di un'opportuna fase mobile,
- non risente della presenza di riducenti nel campione urinario in grado di interferire con il sistema cromogenico, normalmente utilizzato dai metodi colorimetrici/enzimatici.

Ulteriori vantaggi sono: la semplicità del pretrattamento del campione (semplice diluizione con acqua), la possibilità di utilizzare uno standard interno (ad esempio lo ione bromuro), a garanzia di una maggiore precisione dei risultati.

Citrato

Il campione urinario per la determinazione del citrato deve essere raccolto in presenza di un batteriostatico (ad esempio HCl o Hibitane). I metodi analitici più comuni sono del tipo enzimatico/colorimetrico. Vengono utilizzate anche altre metodiche quali: l'elettroforesi capillare (CE) e la IC. In ambito nefrologico, visto il ruolo rilevante del citrato nella prevenzione della calcolosi ossalocalcica, l'individuazione dell'ipocitraturia è di grande interesse. A questo fine è necessario disporre di tecniche analitiche di particolare sensibilità ed accuratezza: la IC possiede queste caratteristiche ed è attualmente utilizzata presso il nostro centro, per l'analisi di circa 1 000 campioni/anno. (24)

Cistina

La cistinuria è una malattia rara che può indurre formazione di calcoli di cistina nelle vie urinarie. Al primo accesso ambulatoriale è necessario effettuare lo screening urinario della cistinuria. Un metodo colorimetrico qualitativo immediato è il cosiddetto test di Brand (25).

La conferma può essere effettuata mediante metodi cromatografici. Il nostro laboratorio utilizza una procedura in cromatografia liquida con rivelazione fluorimetrica, specifica per il gruppo tiolico (26). Poiché la terapia può comprendere la somministrazione di tioli, questo approccio analitico consente, inoltre, il monitoraggio dell'aderenza alle indicazioni terapeutiche e dell'efficacia farmacologica.

Ulteriori attività analitiche

Il laboratorio deve essere attrezzato anche per l'individuazione e lo studio metabolico delle forme più rare di calcolosi. Sebbene quelle più diffuse siano la calcica e l'urica/uratica (2), ne esistono altre forme, non meno importanti, indotte da patologie genetiche o dall'assunzione di farmaci (27).

Tra le patologie genetiche vanno menzionate: l'iperossaluria primitiva, la cistinuria, la

2,8-diidrossiadeninuria, la xantiniuria.

Relativamente ai farmaci, ricordiamo: gli antibiotici (sulfametossazolo, amoxicillina, ceftriaxone, ciprofloxacina), gli antivirali (indinavir, atazanavir), l'allopurinolo, e tra gli eccipienti, i silicati.

La disponibilità di tecniche cromatografiche e della spettrometria di massa consente l'identificazione dei vari metaboliti che possono cristallizzare nelle vie urinarie. Non essendo generalmente disponibili metodi commerciali idonei, il laboratorio deve occuparsi del loro sviluppo e della loro validazione.

CONCLUSIONI

Lo studio metabolico della calcolosi renale è di notevole importanza per il clinico e richiede un certo grado di specializzazione all'interno del laboratorio clinico. La patogenesi della calcolosi renale, che comprende le dinamiche di formazione e accrescimento dei cristalli, è correlata alla presenza di anomalie chimico-fisiche nell'ambiente urinario. L'individuazione di tali anomalie è la principale attività di un centro dedicato allo studio della nefrolitiasi.

Tutto ciò necessita sia della disponibilità di tecnologie analitiche versatili, idonee alla messa a punto di metodi da sviluppare internamente, che di personale esperto e dedicato. È opportuno sottolineare inoltre che l'approccio multidisciplinare tra diverse figure professionali, in particolare tra chimici e nefrologi, può consentire l'ottenimento di risultati altrimenti difficilmente raggiungibili.

Presso il nostro Centro vengono effettuate le analisi di tipo specialistico. Annualmente si analizzano circa 2 000 calcoli renali, 2 500 ossalati e 1 000 citrati urinari. Le analisi vengono effettuate con cadenza settimanale. I metodi cromatografici da noi utilizzati sono stati validati internamente (precisione: CV% <10%; accuratezza: bias ±10%).

Lo studio del metabolismo di malattie rare che inducono nefrolitiasi è una sfida avvincente. Ne è un chiaro esempio la quantificazione dei precursori dell'ossalato nel monitoraggio del trattamento farmacologico dell'iperossaluria primitiva (28).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

- Marangella M. Medical management of urinary calculi: up to date 2016. *Urologia* 2016;83:110-23.
- Tiselius HG. Epidemiology and medical management of stone disease. *BJU Int* 2003;91:758-67.
- White DJ, Nancollas GH. The kinetics of dissolution of calcium oxalate monohydrate: a constant composition study. *J Cryst Growth* 1982;57:267-72.
- Desmars JF, Tawashi R. Dissolution and growth of calcium oxalate monohydrate. I. Effect of magnesium and pH. *Biochim Biophys Acta* 1973;313:256-67.
- Nancollas GH, Gardner GL. Kinetics of crystal growth of calcium oxalate monohydrate. *J Cryst Growth* 1974;21:267-76.
- Garside J, Brečević Lj, Mullin JW. The effect of temperature on the precipitation of calcium oxalate. *J Cryst Growth* 1982;57:233-40.
- Marangella M, Daniele PG, Ronzani M, Sonogo S, Linari F. Urine saturation with calcium salts in normal subjects and idiopathic calcium stone-formers estimated by an improved computer model system. *Urol Res* 1985;13:189-93.
- White DJ, Coyle-Rees M, Nancollas GH. Kinetic factors influencing the dissolution behavior of calcium oxalate renal stones: a constant composition study. *Calcif Tissue Int* 1988;43:319-27.
- Gvozdev NV, Petrova EV, Cherevich TG, Shustin OA, Rashkovichet LN. Atomic force microscopy of growth and dissolution of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals. *J Cryst Growth* 2004;261:539-48.
- Gill WB, Silvert MA, Roma MS. Supersaturation levels and crystallization rates of calcium oxalate from urines of normal humans and stone formers determined by a ¹⁴C-Oxalate technique. *Invest Urol* 1974; 12:203-9.
- Pak CY, Hayashi Y, Finlayson B, Chu S. Estimation of the state of saturation of brushite and calcium oxalate in urine: a comparison of three methods. *J Lab Clin Med* 1977;89:891-901.
- Erwin DT, Roberts JA, Sledge G, et al. Estimating urine saturation, a comparison of results of two methods evaluating changes induced by drinking milk. In: Fleisch H, Robertson WG, Smith LH, Vahlensieck W (eds) *Urolithiasis research*. New York:Plenum Press 1977;437-40.
- Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Marshall DH, Clark PB. Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *Br J Urol* 1978;50:449-54.
- Pak CY, Maalouf NM, Rodgers K, Poindexter JR. Comparison of semi-empirical and computer derived methods for estimating urinary saturation of calcium oxalate. *J Urol* 2009;182:2951-6.
- Marangella M, Petrarulo M, Vitale C, Daniele P, Sammartano S. LITHORISK.COM: the novel version of a software for calculating and visualizing the risk of renal stone. *Urolithiasis* 2021;49:211-7.
- Ferraro PM, Lopez F, Petrarulo M, Barbarini S, Curhan GC, Marangella M, et al. Estimating 24-hour urinary excretion using spot urine measurements in kidney stone formers. *Nephrol Dial Transplant* 2022;37:2171-9.
- Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OL. Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney Int* 1990;37:51-6.
- Grover PK, Moritz RL, Simpson RJ, Ryall RL. Inhibition of growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro--a comparison of four human proteins. *Eur J Biochem* 1998;253:637-44.
- Zeng X, Xi Y, Jiang W. Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019;59:2125-35.
- Zuckerman JM, Assimos DG. Hypocitraturia: pathophysiology and medical management. *Rev Urol* 2009;11:134-44.
- Baker EM, Saari JC, Tolbert BM. Ascorbic acid metabolism in man. *Am J Clin Nutr* 1966;19:371-8.
- European Association of Urology Guidelines on Urolithiasis. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2023. ISBN 978-94-92671-19-6.
- Petrarulo M, Marangella M, Bianco O, Marchesini A, Linari F. Preventing ascorbate interference in ion-chromatographic determinations of urinary oxalate: four

- methods compared. *Clin Chem* 1990;36:1642-5.
24. Petrarulo M, Leporati M, Pullara F, Frattini M, Nannavecchia V, Marangella M, et al. Sensitive Ion-chromatographic determination of citric acid in urine. *Separations* 2022;9:143.
 25. Brand E, Harris M, Biloon S. Cystinuria: the excretion of cystine which decomposes in the urine with the liberation of free cystine. *J Biol Chem* 1930;86:315-31.
 26. Imai K, Toyo'oka T. Fluorometric assay of thiols with fluorobenzoxadiazoles. *Methods Enzymol* 1987;143:67-75.
 27. Daudon M, Frochot V, Bazin D, Jungers P. Drug-Induced Kidney Stones and Crystalline Nephropathy: Pathophysiology, Prevention and Treatment. *Drugs* 2018;78:163-201.
 28. Garrelfs SF, Frishberg Y, Hulton SA, Koren MJ, O'Riordan WD, Cochat P, et al. Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1. *N Engl J Med* 2021;384:1216-26.