Marco Besozzi

Le basi della Medicina di Laboratorio per la pratica medica

Questo testo è reso disponibile come memoria storica, ed è escluso ogni suo possibile utilizzo medico.

PMS Pubblicazioni Medico Scientifiche

NOTA: L'Editore non si assume alcuna responsabilità per le affermazioni o le opinioni espresse in questo libro. L'Autore e l'Editore hanno compiuto ogni ragionevole sforzo per assicurare che le terapie descritte siano accurate ed in accordo con gli standard accettati al momento della pubblicazione. Si consiglia tuttavia ai lettori di controllare che non siano intervenute variazioni riguardo i dosaggi o le controindicazioni relative alla somministrazione di farmaci, nelle denominazioni commerciali dei farmaci e nei nomi delle ditte che li producono. Questa raccomandazione riveste particolare importanza nell'uso di farmaci nuovi o di impiego poco frequente. L'Editore non si assume alcuna responsabilità, espressa od implicita, riguardo l'accuratezza delle informazioni contenute in questo libro e declina qualsiasi tipo di responsabilità legale rispetto ad eventuali errori od omissioni.

Copyright © 1999 - 2002 **PMS PUBBLICAZIONI MEDICO SCIENTIFICHE**
Casella Postale 207- 33100 Udine UD
Tel. 0432.48.16.32 Fax 0432.48.70.00
e-mail: pms.libri@tin.it info@pmsudine.it
sito internet: www.pmsudine.it

Prima Edizione: settembre 2002

Tutti i diritti sono riservati. Nessuna parte del presente volume può essere riprodotta, memorizzata, trasmessa, diffusa od adattata in alcun modo, comprese le copie fotostatiche, anche ad uso interno o didattico, senza il precedente consenso scritto dell'Editore.

Indice

PRESENTAZIONE **7**

CAPITOLO 1
LE BASI BIOCHIMICHE DELLA MEDICINA DI LABORATORIO **9**
(M. Besozzi)
I sistemi biologici **10**
Struttura e funzione dei sistemi biologici **13**
Il linguaggio biochimico del progetto **53**
Il linguaggio biochimico dei processi di comunicazione **65**

CAPITOLO 2
SETTORI SPECIALISTICI DEL LABORATORIO CLINICO **73**
Biochimica clinica *(M. Di Lernia)* **76**
Biologia molecolare *(A. Di Blasio, S. Russo)* **85**
Citogenetica e citogenetica molecolare *(D. Giardino)* **88**
Ematologia *(D. Lambertenghi)* **99**
Endocrinologia *(A. Dubini)* **117**
Immunologia *(M. Gerosa, P. Riboldi)* **124**
Microbiologia *(E. Cesana)* **136**
Sierologia infettiva *(G. Lissoni)* **141**

CAPITOLO 3
DAL DATO ANALITICO ALL'INFORMAZIONE DI LABORATORIO **143**
(M. Besozzi)
Le basi metodologiche del processo decisionale medico **145**
Le basi probabilistiche e statistiche del processo decisionale medico **156**

CAPITOLO 4
EFFETTI PRE-ANALITICI SUI RISULTATI DELLE ANALISI **187**
(M. Besozzi)
Effetti legati alle condizioni fisiche del paziente **189**
Effetti legati all'ora del prelievo **189**
Effetti legati all'assunzione di farmaci **190**
Effetti legati alla raccolta e alla conservazione dei campioni **195**

CAPITOLO 5
VALORI DECISIONALI **199**
(M. Besozzi)
Intervalli di riferimento **200**
Valori desiderabili **281**
Intervalli terapeutici dei farmaci **281**
Valori di allerta **282**
Differenze critiche **285**

CAPITOLO 6
CENNI INTERPRETATIVI SUI RISULTATI DELLE ANALISI **291**
Cenni interpretativi sulle analisi di biochimica clinica *(M. Di Lernia)* **293**
Cenni interpretativi sulle analisi di biologia molecolare *(A. Di Blasio, S. Russo)* **331**
Cenni interpretativi sulle analisi di citogenetica e citogenetica molecolare *(D. Giardino)* **338**
Cenni interpretativi sulle analisi di ematologia *(D. Lambertenghi)* **350**
Cenni interpretativi sulle analisi di immunologia *(M. Gerosa, P. Riboldi)* **378**
Cenni interpretativi sulle analisi di microbiologia *(E. Cesana)* **400**
Cenni interpretativi sulle analisi di sierologia infettiva *(G. Lissoni)* **424**

CAPITOLO 7
PRELIEVI E RACCOLTA DEI MATERIALI BIOLOGICI **435**
(M. Besozzi)
Prelievo venoso **435**
Raccolta dei materiali biologici **440**
Esecuzione del tempo di emorragia **476**
Esecuzione del test-tine **477**

CAPITOLO 8
GRANDEZZE E UNITÀ DI MISURA NEL LABORATORIO CLINICO **479**
(M. Besozzi)
Il sistema SI **480**

CAPITOLO 9
TECNICHE ANALITICHE **491**
(L. Mascolo)
Metodi spettrofotometrici **491**
Metodi immunochimici **493**
Metodi cromatografici **499**
Elettroforesi **502**
Isoelettrofocalizzazione **505**
Conteggio degli elementi corpuscolati del sangue **505**
Citofluorimetria **507**
Principi di analisi del DNA **509**

CAPITOLO 10
CONTROLLO DEI PROCESSI NEL LABORATORIO CLINICO **513**
(E. Sala)
Certificazione di conformità secondo le norme ISO 9000 **513**

CAPITOLO 11
CONTROLLO DI QUALITÀ NEL LABORATORIO CLINICO **523**
(M. Besozzi)
Premessa **524**
Le basi statistiche del controllo di qualità **525**
Le basi analitiche del controllo di qualità **530**
Gli obiettivi del controllo di qualità **533**
Il disegno del controllo di qualità **538**
Conclusione **544**
Bibliografia **550**
Glossario **556**

CAPITOLO 12
CRONOLOGIA MEDICA **565**
(M. Besozzi)

APPENDICE **586**
Requisiti di sistema **587**
Installazione del software necessario per consultare il CD-ROM **588**
Installazione del software accessorio disponibile sul CD-ROM **591**
Esecuzione del software che non richiede installazione disponibile sul CD-ROM **593**
Avvio e utilizzo del CR-ROM **594**

Presentazione

Il fatto di disporre, per indagare le malattie, solamente dei propri sensi, ha sempre rappresentato per il medico un limite. È vero che anche solo basandosi su di essi il medico è potuto arrivare ad intuizioni geniali (si pensi al diabete "mellitus", dalle urine dolci come il miele). Tuttavia è chiaro che la medicina moderna si è sviluppata solamente quando, sulla base dello studio "*more scientifico*" degli organismi biologici, si è innescato un circolo virtuoso tra questo e i suoi sviluppi tecnologici. E oggi nessun medico saprebbe rinunciare a quelle estensioni dei propri sensi che sono rappresentate dalle analisi di laboratorio, dalla diagnostica per immagini (radiografia, tomografia assiale computerizzata, risonanza magnetica nucleare, ecografia), dalle tecniche elettrofisiologiche (elettrocardiografia, elettroencefalografia, elettromiografia), dalle tecniche endoscopiche: in altre parole, oggi nessun medico saprebbe rinunciare all'*informazione* che da queste gli viene fornita.

Per quanto concerne specificamente le analisi di laboratorio, ecco allora l'obiettivo, duplice, di questo volume. Che è quello da un lato di presentare l'articolazione e *la complessità* di un moderno laboratorio clinico, dall'altro lato di raccogliere strumenti pratici, ma soprattutto integrati tra di loro, per fornire un vero e proprio *sistema di supporto al medico* nell'ambito dei processi che consentono di trasformare i dati forniti dal laboratorio in informazioni. Tenendo sempre peraltro presente il fatto che il valore aggiunto fornito da queste informazioni può esprimersi compiutamente soltanto al momento della loro integrazione da parte del medico stesso all'interno del quadro clinico del paziente.

Infine, poiché oggigiorno è impensabile fare informazione senza utilizzare le formidabili potenzialità delle tecnologie rappresentate dai sistemi ipertestuali e dalle reti, queste sono state strettamente integrate con il più tradizionale testo cartaceo, sotto forma di un CD-ROM che consente di navigare tra testo, tabelle, immagini e siti Internet, in un vero e proprio *ipertesto virtuale* di Medicina di Laboratorio.

Sia nella parte cartacea, sia, e soprattutto, sul CD-ROM, il materiale è stato articolato in modo tale da consentire un facile accesso alle informazioni sia al lettore/navigatore che intende sfogliarne, andando solo per sommi capi, il contenuto, sia a coloro che intendono approfondi-

re in modo specialistico singoli specifici argomenti. L'obiettivo è stato quello di rendere il tutto fruibile e utile a un pubblico che va dal Medico di Medicina Generale, allo Specialista Clinico, allo specializzando in Medicina di Laboratorio: a loro giudicare se l'obiettivo, invero abbastanza ambizioso, è stato raggiunto.

Cordiali ringraziamenti per il contributo prestato nella redazione delle parti relative ai settori specialistici vanno a E. Cesana (microbiologia), A. Di Blasio (biologia molecolare), M. Di Lernia (biochimica clinica), A. Dubini (endocrinologia), P. Finelli (immagini di FISH), M. Gerosa (immunologia), D. Giardino (citogenetica e citogenetica molecolare), G. Gottardi (immagini di cariotipi), D. Lambertenghi (ematologia), G. Lissoni (sierologia infettiva), L. Mascolo (tecniche analitiche), P. Riboldi (immunologia), S. Russo (biologia molecolare), E. Sala (controllo dei processi).

Si ringraziano inoltre B. Cavanna, L. Massaccesi, R. Rosso e O. Turri per avere fornito parte del materiale della sezione riservata ai cenni interpretativi sulle analisi di biochimica clinica.

Infine un ringraziamento supplementare a D. Lambertenghi, che si è sobbarcata l'onere assai gravoso della revisione finale del testo e del CD-ROM.

Da ultimo, ma più importante, il più vivo ringraziamento all'Editore, senza la lungimiranza, e soprattutto la pazienza, del quale questo libro non avrebbe mai avuto l'onore delle stampe.

Milano, settembre 2002

M. B.

Capitolo 1
Le basi biochimiche della medicina di laboratorio

(M. Besozzi)

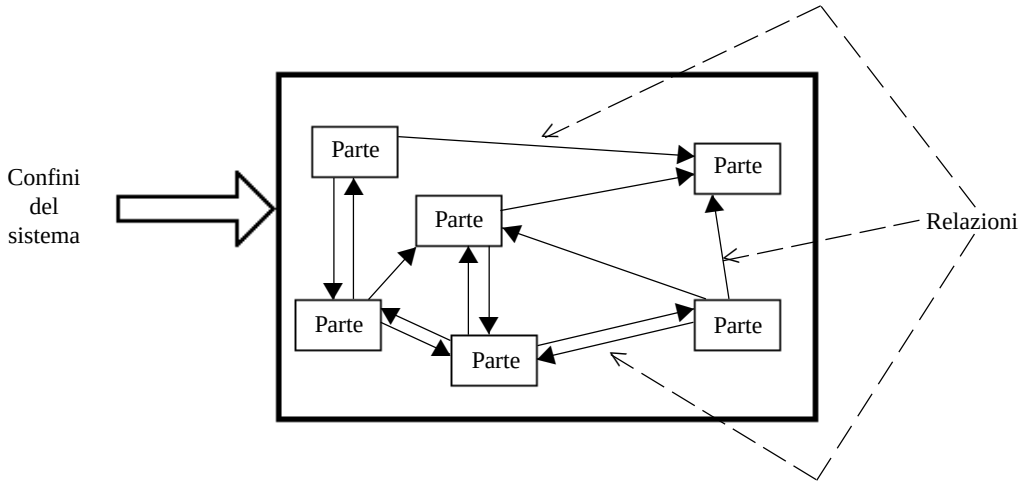
I sistemi biologici 10
Struttura e funzioni dei sistemi biologici 13
Dagli atomi alle molecole della vita 13
Molecole inorganiche 15
Acqua ed elettroliti 15
Ioni idrogeno e pH 17
Molecole gassose 18
Molecole organiche 19
Carboidrati 19
Lipidi 23
Amminoacidi e proteine 28
Basi eterocicliche, nucleosidi, nucleotidi e acidi nucleici 35
Vitamine 40
Enzimi 41
Il motore energetico delle cellule eucariote 44
Compartimenti e principali funzioni delle cellule eucariote 48
La membrana cellulare 49
Il nucleo 51
Il nucleolo 51
Il reticolo endoplasmatico 51
L'apparato di Golgi 51
I mitocondri 52
I lisosomi 52
I perossisomi 53
Microtubuli e microfilamenti 53
Il citosol 53
Il linguaggio biochimico del progetto 53
L'invarianza dell'informazione 57
La variabilità necessaria per l'evoluzione della specie 58
La trascrizione e la traduzione del codice genetico 60
La regolazione genica 63
Il linguaggio biochimico dei processi di comunicazione 65
Le strategie di comunicazione 68
Acqua, stereospecificità e processi di comunicazione 68
Cablaggi e processi di comunicazione 70

Studiare gli organismi utilizzando la chimica. L'intuizione fu di Louis Pasteur, sul finire del secolo scorso. E i progressi fatti nel corso degli ultimi decenni indicano chiaramente come lo studio della chimica dei viventi (biochimica) sia la base per comprendere i fenomeni auto-organizzativi che hanno portato la materia ad animarsi. Oggi è chiaro che senza l'apporto della teoria dei sistemi e della teoria dell'informazione questi fenomeni auto-organizzativi non possono essere spiegati appieno. Ma resta il fatto che la vita è il più grande capolavoro di *miniaturizzazione a livello molecolare* di *sistemi* e di *processi di comunicazione* mai apparso sulla Terra.

I sistemi biologici

Lo scopo della prima parte di questo capitolo è di introdurre il lettore ad una visione sistemica dei processi biologici, e delle loro basi (bio)chimiche.

Il termine *sistema* viene ampiamente utilizzato nel linguaggio quotidiano. Si pensi ad espressioni quali *sistema solare*, *sistema economico*, *sistema di equazioni*, *sistema nervoso*, eccetera. Il concetto di sistema può essere formalizzato in modo rigoroso. La teoria dei sistemi definisce un sistema come un "insieme di *parti* che, connesse da *relazioni*, formano un *tutto* caratterizzato da una specifica *funzione* e *struttura*".



In un sistema "*l'insieme rappresenta qualcosa di più della somma delle singole parti*"[1]. In altre parole viene riconosciuto che le relazioni che interconnettono le parti sono in grado di fornire valore aggiunto al sistema. E, come afferma *von Bertalanaffy*[2] per comprendere le proprietà del tutto non è tanto importante conoscere le parti che lo compongono e le proprietà delle singole parti, quanto piuttosto conoscere le relazioni che connettono le singole parti.

Va notato che il concetto di sistema prescinde dal livello di risoluzione al quale si opera. Per cui quello che a un livello di risoluzione maggiore (e a un livello di integrazione minore) può essere considerato un sistema, e come tale può essere studiato, può a sua volta essere visto, a un livello di risoluzione minore (e a un livello di integrazione maggiore), come una delle diverse parti che compongono un sistema più complesso. In questo caso l'ambiente in cui il sistema è incluso, e del quale il sistema, insieme ad altri sistemi, costituisce le parti, diventa il sistema di ordine superiore (andando dal microscopico al macroscopico).

Questo concetto viene qui illustrato a proposito dei sistemi biologici:

Parti	***Relazioni***	***Sistema***	***Ambiente***
Atomi	Legami atomici	Molecola	Organello cellulare
Molecole	Interazioni molecolari	Organello cellulare	Cellula
Organelli cellulari	Coordinamento tra organelli cellulari	Cellula	Tessuto
Cellule	Coordinamento tra cellule	Tessuto	Organo
Tessuti	Coordinamento tra tessuti	Organo	Organismo
Organi	Coordinamento tra organi	Organismo	Ecosistema
Organismi	Coordinamento tra organismi	Ecosistema	Biosfera
Ecosistemi	Coordinamento tra ecosistemi	Biosfera	

Si fa notare che il concetto soggiacente al termine di "coordinamento" introdotto per descrivere l'esigenza di procedere "in modo armonico" richiesta alle varie parti dei sistemi elencati, e quindi il concetto soggiacente al termine "relazioni", è quello di "scambio di informazioni reciproche". Senza il quale non sarebbe concepibile l'emergere, dall'ineluttabile progresso del disordine previsto dal secondo principio della termodinamica, l'ordine che caratterizza gli esseri viventi[3].

---

[1] *Capezzuto D, Gianni D. Sistemi. Modellistica, comunicazione, misura e controllo. Milano: Hoepli, 1988:367pp.*

[2] *Ludwig von Bertalanaffy (1901-1972).*

[3] *Perché facendo bollire un acquario si ottiene una zuppa di pesce, mentre raffreddando una zuppa di pesce non si ottiene un acquario? Perché un bicchiere va in mille pezzi, mentre mille pezzi non confluiscono un bicchiere? Perché una palla che rimbalza spontaneamente si ferma, mentre una palla ferma non si mette spontaneamente a rimbalzare? Dall'osservazione che i corpi caldi spontaneamente si raffreddano, mentre non accade il contrario, cioè che i corpi freddi spontaneamente si riscaldino. Clau-*

L'osservazione per cui le relazioni che consentono di coordinare tra di loro le varie parti di un sistema biologico[4] implicano uno scambio di informazioni reciproche, rappresenta il più grande contributo della biochimica moderna alla comprensione della vita.

Infatti nonostante l'intuizione di Pasteur, che il fenomeno "vita" possa essere fatto risalire ad una somma di eventi (bio)chimici, fosse e resti fondamentalmente corretta, è mancato a lungo un elemento determinante. Che è apparso chiaro con il fallimento del programma riduzionistico della (bio)chimica, cioè nell'equivalenza *molecole biologiche = vita*, esemplarmente incarnato dall'esperimento di Miller, del 1935. L'interazione di scariche elettriche e molecole inorganiche (acqua, ammoniaca, metano, ossigeno, idrogeno, CO_2), in un ambiente che ricreava l'ambiente primordiale che doveva esserci sulla terra circa 3 miliardi e mezzo di anni fa, ha portato si alla sintesi di molecole organiche, ma non alla comparsa dei tratti caratteristici dei biosistemi.

In altre parole, il fatto di conoscere le parti che compongono un sistema biologico, ed addirittura averle ricostruite in laboratorio, e il fatto di conoscere le proprietà delle singole parti, non ha portato a progressi significativi nella comprensione del fenomeno vita (anche se ne ha ovviamente rappresentato un prerequisito essenziale).

Oggi è finalmente chiaro che il carattere distintivo dei sistemi biologici è quello di essere sistemi costituiti da parti coordinate tramite un flusso enorme, e solo in parte rivelato, di informazioni reciproche a livello molecolare. In altre parole, ogni organismo risulta essere un imponente "ecosistema" di molecole, prodotte sulla base di un progetto descritto in alcuni miliardi di parole, nel quale sono le relazioni tra le parti a fornire al sistema il vero valore aggiunto che lo caratterizza.

---

sius nel 1750 pose le basi per la comprensione scientifica di una asimmetria che caratterizza la natura del mondo in cui viviamo. Mentre tutto il lavoro può essere trasformato in calore, non accade il contrario: non è cioè possibile trasformare completamente il calore in lavoro. Boltzmann nel 1880 definisce in termini matematici la legge nota come secondo principio della termodinamica, e introduce il concetto di entropia: in un sistema fisico termodinamicamente chiuso, come l'universo, l'entropia, cioè il disordine, può solo aumentare. Se finora tutti i tentativi di contraddire il secondo principio della termodinamica sono inesorabilmente caduti sotto il vaglio della verifica sperimentale, è pure evidente che lo sviluppo di un organismo dalla cellula uovo va in senso opposto all'aumento dell'entropia. La spiegazione risiede nel concetto di "contraddizione su base locale" del principio. In altre parole, il secondo principio della termodinamica vale e continua a valere globalmente per un sistema termodinamicamente chiuso come l'universo, anche se sistemi termodinamicamente aperti come gli esseri viventi lo possono contraddire su base locale. Rimane un buffo mistero: quando da una cellula uovo emerge progressivamente l'ordine di un nuovo essere vivente, visto che l'entropia, cioè il disordine globale dell'universo, può solo aumentare, chi ne paga le conseguenze? Forse nessuno, visto che l'ordine che si crea è solo una effimera bolla, che più o meno rapidamente ricade nel brodo del disordine primordiale dal quale era emersa. La recente scoperta che sistemi rigorosamente deterministici possono evolvere rapidamente verso uno stato di caos, e che reciprocamente sistemi apparentemente caotici hanno un determinismo soggiacente, riassunta nella teoria dei sistemi caotici, ha aggiunto nuovi strumenti alla comprensione di questi fenomeni.

[4] *a qualsiasi livello di risoluzione si consideri il sistema biologico, microscopico, macroscopico, o intermedio.*

Struttura e funzione dei sistemi biologici

Lo scopo della seconda parte di questo capitolo è di mostrare le basi biochimiche attraverso cui, a partire dal progetto, e con l'indispensabile supporto delle strutture, sono realizzate le funzioni dei sistemi biologici.

Dagli atomi alle molecole della vita

Esistono ormai prove convincenti che l'universo in cui viviamo si sia originato a partire da una cataclismatica espansione di quella che i fisici definiscono "una singolarità", cioè un punto ideale nel quale non esistevano né spazio, né tempo, né le leggi fisiche di natura che oggi conosciamo. La teoria del Big-Bang è oggi supportata da varie osservazioni. Le due principali sono le abbondanze cosmiche osservate per i vari elementi, che sono in accordo con le previsioni della teoria, e la radiazione di fondo a microonde, corrispondente a quella di un corpo nero alla temperatura di 3 gradi Kelvin, che permea completamente lo spazio dell'universo, e che rappresenta il residuo della radiazione termica dell'esplosione primordiale.

Tralasciamo ora quello che avvenne nei primissimi istanti del Big-Bang. Dopo circa trecento mila anni dall'esplosione primordiale la temperatura dell'universo era scesa ad unvalore che consentì agli elettroni di accoppiarsi con i nuclei atomici, e quindi si formarono i primi atomi, tutti di elementi leggeri (idrogeno, deuterio, elio).

Quali sono stati i processi che hanno portato alla formazione degli elementi più pesanti, che sono presenti sulla Terra, e che sono alla base della vita?

Questi processi sono oggi ben conosciuti, e si sa che hanno avuto origine (e continuano ad originarsi) nelle stelle, e in particolare in una varietà speciale di stelle, di massa molto grande, le supernove, come descritto da *Margherita Hack*[5]: "*una stella di massa molto grande, almeno 10 o più masse solari, ha vita ben più breve di quella del sole…una stella del genere si forma per contrazione di una regione dentro una nube, dove la densità è più alta che nelle parti circostanti, sotto l'azione della gravità. Contraendosi il gas si riscalda e diventa opaco, intrappolando così il calore prodotto. Quando la temperatura nel nocciolo centrale è sufficientemente alta da innescare le reazioni nucleari con trasformazione di idrogeno in elio (è la reazione che avviene alla temperatura più bassa, pochi milioni di gradi) la pressione esercitata dal gas caldo che tenderebbe ad espandere e disperdersi rallenta la contrazione, e quando la temperatu-*

[5] *Hack M. Sette variazioni sul cielo. Milano: Raffaello Cortina, 1999:248pp.*

ra raggiunge valori di una ventina di milioni di gradi si instaura l'equilibrio tra la forza della pressione del gas e la forza di gravità. Nel corso di milioni di anni, tramite una serie di reazioni di fusione nucleare, l'elio prende il posto dell'idrogeno. Là dove c'erano quattro protoni c'è una sola particella, un nucleo di elio, e perciò la pressione del gas è ridotta. Inoltre, alle temperature sufficienti per trasformare l'idrogeno in elio, l'elio è inerte. E poiché la forza di pressione del gas non è più sufficiente a equilibrare la forza di gravità, il nocciolo comincia a raffreddarsi. La stella comincia a comprimersi… la compressione porterà la temperatura del nocciolo a 100 milioni di gradi. Allora l'elio stesso potrà trasformarsi in carbonio e l'equilibrio sarà ristabilito. Tale fase della vita della stella sarà, però, molto più breve della precedente, perché la produzione di energia (e quindi il consumo del combustibile nucleare) cresce rapidamente al crescere della temperatura, che è passata da circa 20 milioni a 100 milioni di gradi. Segue una serie di fasi analoghe: esaurimento del combustibile nucleare, una contrazione, aumento della temperatura centrale, innesco di altro combustibile a temperature via via più elevate. Quando, compressione dopo compressione, la temperatura centrale ha raggiunto i 10 miliardi di gradi, il nocciolo è composto da nuclei di ferro. Ma il ferro a quella temperatura si trasforma in elio…questa reazione, a differenza di quelle che l'hanno preceduta, invece di produrre energia, la richiede, e assorbe così l'energia termica fornita dalla massa di gas caldo che costituisce la stella. Nel giro di qualche decina di minuti la temperatura al centro scende da 10 miliardi di gradi a 100 milioni. La pressione esercitata dal gas non è più sufficiente a equilibrare la gravità, e la massa della stella precipita verso il centro, comprimendolo a densità spaventose: milioni di miliardi di volte la densità dell'acqua. Ne risulta un oggetto di qualche chilometro di diametro [sic!] *di massa eguale o poco superiore a quella del Sole, costituito da un gas di neutroni stabili: la cosiddetta "stella di neutroni". Ma negli strati più esterni, ove restano elementi come idrogeno, elio, carbonio, ossigeno…in grado di dare luogo a reazioni nucleari produttrici di energia, la brusca caduta verso il centro provoca un subitaneo aumento delle temperature: nell'inviluppo si scatenano varie reazioni nucleari, con la produzione di tutti gli elementi che noi conosciamo in natura. Per dissipare tutta l'energia prodotta la stella esplode, scaraventando nello spazio interstellare il suo inviluppo a velocità di parecchie migliaia di chilometri al secondo*".

In altre parole, nelle fasi finali delle stelle di grande massa, durante l'esplosione che dà luogo a una supernova, si formano gli elementi che noi conosciamo, e che vengono scagliati nello spazio interstellare e che andranno ad arricchire le future stelle e i loro pianeti.

Il carbonio e tutti gli elementi presenti nei nostri organismi sono stati sintetizzati durante le esplosioni delle supernove.

E, quando si sono verificate le condizioni opportune sulla Terra, gli elementi, dotati di una naturale reattività chimica, facilitata dalle condizioni iniziali dell'ambiente terrestre, hanno cominciato a reagire tra di loro, formando le molecole inorganiche e organiche alla base della vita.

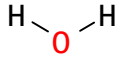
Molecole inorganiche

È certo che, se non nel sistema solare, peraltro nella nostra galassia (che comprende circa cento miliardi di stelle) o in qualcuna degli altri 50 miliardi di galassie che, sulla base di recentissime (primi mesi del 2000) osservazione dello *Hubble Space Telescope*, si è calcolato popolino l'universo, debbano esistere altre forme di vita. Ed è quasi certo che queste differiscano di molto da quelle della Terra qualora siano basate su un mezzo (solvente) diverso dall'acqua.

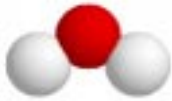
Nel solvente acquoso le molecole possono diffondere, e quindi collidere, realizzando il potenziale di comunicazione necessario a realizzare le funzioni vitali.

Acqua ed elettroliti

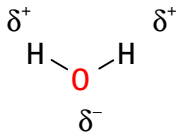
Per sottolineare l'importanza dell'***acqua*** nei sistemi biologici basta ricordare che il 60% della massa totale di un individuo adulto è costituito da acqua



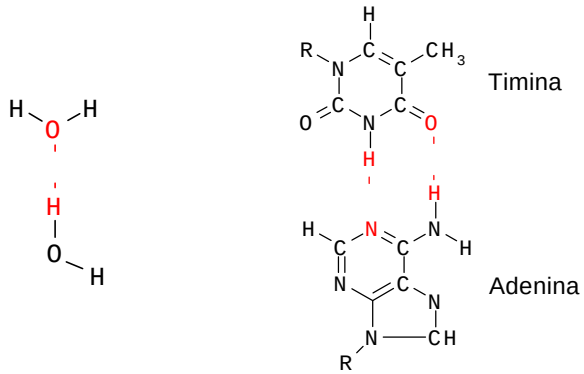
oppure H_2O oppure



Come illustrato, i legami tra idrogeno e ossigeno sono angolati (l'angolo tra i due legami dell'idrogeno è per la precisione di 104,5 gradi). Questo, e il fatto che sugli atomi di idrogeno residua una parziale carica positiva δ^+, mentre sull'atomo di ossigeno residua una parziale carica negativa δ^-, conferiscono alla molecola dell'acqua il carattere di un *dipolo*

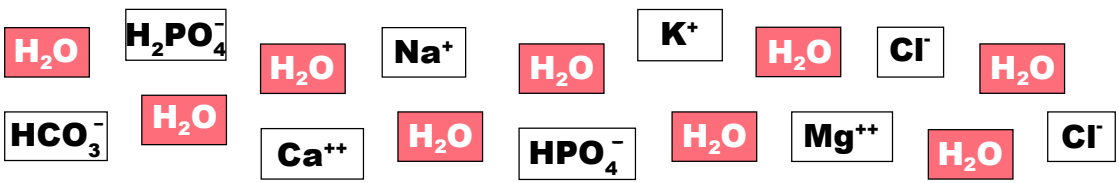


Le molecole interagiscono tra di loro mediante un debole legame, denominato *legame idrogeno*, che viene rappresentato con un tratteggio. Oltre che tra molecole di acqua, il legame idrogeno si stabilisce in generale tutte le volte che un idrogeno, legato covalentemente ad un atomo elettronegativo, e quindi recante una parziale carica positiva, si trova in stretta prossimità di un atomo di ossigeno o di azoto con parziale carica negativa. Questo avviene in moltissime situazioni, di cui viene presentata, come paradigmatica, quella relativa ai legami idrogeno che determinano, nel DNA, l'appaiamento tra basi, come quello tra adenina e timina.



Il *legame idrogeno* svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi di interazione molecolare, e quindi nei meccanismi di *riconoscimento* reciproco tra molecole che sono alla base dell'*ordine* che caratterizza la chimica dei sistemi biologici.

Nel solvente acquoso sono presenti innanzitutto ***molecole inorganiche*** semplici, soprattutto ***elettroliti*** come il cloruro di sodio (NaCl), che in acqua risulta completamente dissociato nello ione cloruro, con carica elettrica negativa (Cl^-) e nello ione sodio, con carica elettrica positiva (Na^+), e altri ioni con carica positiva (ione potassio, K^+, ione calcio, Ca^{++}, ione magnesio, Mg^{++}), e con carica negativa (ioni fosfato, $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{--}).



Gli ioni sodio (Na^+) e potassio (K^+) consentono di mantenere i potenziali transmembrana necessari per la trasmissione degli impulsi nervosi e lo ione calcio (Ca^{++}) svolge un ruolo determinante nella contrazione muscolare.

Ioni idrogeno e pH

L'anidride carbonica (CO_2), si discioglie in acqua producendo acido carbonico H_2CO_3 (secondo la reazione reversibile $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$) che a sua volta si dissocia nello ione positivo idrogeno H^+ e nello ione negativo idrogenocarbonato HCO_3^- (secondo la reazione reversibile $H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$), con una reazione che globalmente può essere descritta come

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Dalla reazione di equilibrio tra acido carbonico da un lato, e ioni idrogeno e idrogenocarbonato dall'altro

$$k = \frac{[H^+]\,[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

può essere facilmente derivata l'*equazione di Henderson-Hasselbalch*

$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Poiché il pK dell'acido carbonico è 6,1 e il pH ematico è uguale in media a 7,4, il logaritmo del rapporto tra bicarbonati e acido carbonico deve essere uguale a 1,3. L'antilogaritmo di 1,3 è 20: questo significa che a pH 7,4 il rapporto tra le concentrazioni del bicarbonato e dell'acido carbonico è uguale a 20.

Un sistema come quello descritto dall'equazione di Henderson-Hasselbalch viene definito un *sistema tampone*, e ha la proprietà di opporsi al cambiamento del pH (cioè della concentrazione di ioni idrogeno H^+) quando alla soluzione sono aggiunti acidi o basi.

Il sistema idrogenocarbonato/acido carbonico svolge un ruolo essenziale come sistema tampone nel mantenimento del pH del sangue nell'intervallo fisiologico 7,35÷7,45.

Molecole gassose

Considerato che la concentrazione dell'acido carbonico è proporzionale alla *pressione parziale*[6] della CO_2 (pCO_2), e che precisamente

$$H_2CO_3 = 0{,}03 \cdot pCO_2$$

l'*equazione di Henderson-Hasselbalch* può essere riscritta come

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{0{,}03 \cdot pCO_2}$$

A livello dei tessuti il metabolismo cellulare produce CO_2, per cui l'equilibrio della reazione è fortemente spostato verso destra

$$H_2O + \mathbf{CO_2} \Rightarrow H_2CO_3 \Rightarrow H^+ + HCO_3^-$$

mentre a livello dei capillari polmonari, dove il sistema acquoso dell'organismo è in contatto, tramite la membrana degli alveoli polmonari, con l'aria atmosferica, povera in CO_2, l'equilibrio è fortemente spostato verso sinistra

$$H_2O + \mathbf{CO_2} \Leftarrow H_2CO_3 \Leftarrow H^+ + HCO_3^-$$

Nei tessuti il *gradiente di pressione* della CO_2 e il *gradiente di concentrazione* dell'acido carbonico H_2CO_3 presenti tra acqua cellulare/liquido interstiziale (alta pCO_2 e alta concentrazione di H_2CO_3) e sangue arterioso in arrivo (bassa pCO_2 e bassa concentrazione di H_2CO_3), determinano lo spostamento della CO_2 dai tessuti al sangue.

---

[6] *La pressione parziale di un gas è uguale alla pressione atmosferica moltiplicata per la percentuale del gas nell'atmosfera. Così, ad esempio, data una pressione atmosferica di 760 mmHg (millimetri di mercurio), in una atmosfera costituita per lo 0,5% da CO_2, la pressione parziale di questo gas (pCO_2) sarà uguale a 760* x *0,05 e quindi pari a 15,2 mmHg.*

Nei capillari degli alveoli polmonari il *gradiente di pressione* della CO_2 e il *gradiente di concentrazione* dell'acido carbonico H_2CO_3 presenti tra sangue venoso in arrivo (alta pCO_2 e alta concentrazione di H_2CO_3) e aria alveolare (bassa pCO_2), determinano lo spostamento della CO_2 dal sangue venoso all'aria alveolare che viene espirata.

Le reazione di idratazione dell'anidride carbonica ad acido carbonico $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$ viene accelerata dall'enzima *anidrasi carbonica* presente negli eritrociti del sangue. Una reazione molto accelerata è di fondamentale importanza per consentire al sangue venoso di scaricare tutta la CO_2 nel tempo brevissimo durante il quale il sangue venoso resta in contatto con l'aria alveolare.

Per quanto riguarda l'ossigeno, il processo si realizza in modo inverso.

Nei capillari degli alveoli polmonari il *gradiente di pressione* dell'O_2 presente tra aria alveolare (alta pO_2) e sangue venoso in arrivo (bassa pO_2), determina lo spostamento dell'O_2 dall'aria alveolare che viene inspirata al sangue venoso (che diventa arterioso).

Nei tessuti il *gradiente di pressione* dell'O_2 presente tra sangue arterioso in arrivo (alta pO_2) e liquido interstiziale/acqua cellulare (bassa pO_2), determina lo spostamento dell'O_2 dal sangue arterioso (che diventa sangue venoso) ai tessuti.

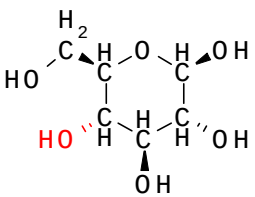
Molecole organiche

I successivi paragrafi trattano le principali classi di molecole organiche, per le quali nella parte riservata ai compartimenti e alle principali funzioni delle cellule eucariote si potranno cogliere meglio gli aspetti metabolici. Si rammenta che la classificazione adottata, pur essendo quella tradizionale, non esclude le presenza di importantissime classi di sostanze che stanno a cavallo tra quelle elencate. Quindi alla voce "carboidrati" si troveranno accenni ai *proteoglicani*, molecole che contengono il 95% o più di carboidrati, ovvero alla voce "proteine" si troveranno accenni alle *glicoproteine*, molecole che contengono in proporzione meno carboidrati che proteine.

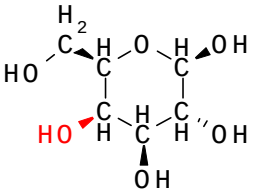
Carboidrati

La formula bruta $(H_2O)_n$ che caratterizza questi composti è all'origine della denominazione di *idrati di carbonio* (o carboidrati) che è stata assegnata a questa classe di composti.

Tra i ***monosaccaridi***, appartengono alla classi degli *esosi* (carboidrati a sei atomi di carbonio) il *glucosio* e il *galattosio*



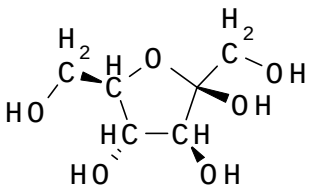
Glucosio



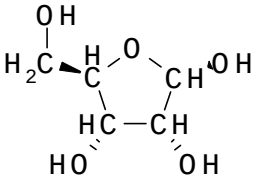
Galattosio

Si fa notare che il galattosio è un isomero del glucosio, dal quale differisce solamente per la posizione del gruppo ossidrilico (OH) legato all'atomo di carbonio 4 (gli atomi di carbonio sono numerati in senso orario, a partire dall'atomo di carbonio immediatamente a destra rispetto all'ossigeno che chiude l'anello).

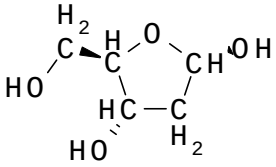
Appartengono alla classe dei *pentosi* (carboidrati a cinque atomi di carbonio) il *fruttosio*, il *ribosio* e il *desossiribosio*



Fruttosio



Ribosio



Desossiribosio

Il ribosio è il carboidrato presente nella catena dell'RNA, il desossiribosio è il carboidrato presente nella catena del DNA.

I monosaccaridi si possono unire a formare dimeri (*disaccaridi*), oligomeri (*oligosaccaridi*) o polimeri (*polisaccardi*).

Il disaccaride formato dall'unione di due molecole di glucosio è il *maltosio* (che si forma durante la degradazione dei polimeri del glucosio che vedremo tra poco).

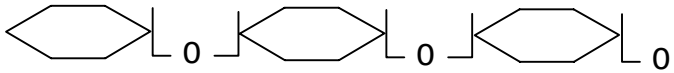
Il disaccaride formato dall'unione di una molecola di glucosio e di una molecola di fruttosio è il *saccarosio* (lo zucchero bianco utilizzato per gli usi alimentari).

Il disaccaride formato dall'unione di una molecola di glucosio e da una di galattosio è il *lattosio* (lo zucchero presente nel latte).

Tra i ***trisaccaridi*** il più importante è il *raffinosio*, formato dall'unione di una molecola di fruttosio, una molecola di glucosio e una molecola di galattosio (il raffinosio è il trisaccaride presente nella barbabietola da zucchero).

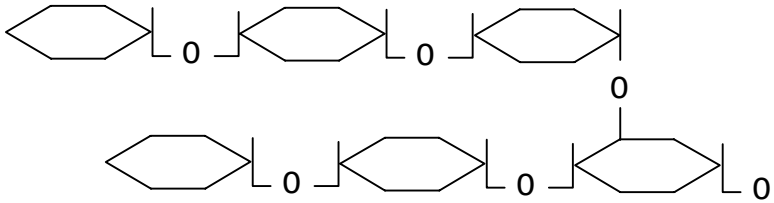
Tra i principali ***polisaccaridi*** si ricordano l'*amido*, il *glicogeno* e la *cellulosa*. Tutti e tre sono ***omoglicani***, termine che viene utilizzato per indicare che sono formati a partire da un unico monosaccaride (per la precisione tutti e tre sono formati esclusivamente da glucosio).

Nella struttura dell'amido si riconoscono *amilosio* e *amilopectina*. Nell'amilosio le molecole di glucosio sono unite tra di loro in una catena lineare, con un legame tra l'atomo di carbonio 1 e l'atomo di carbonio 4 di tipo alfa (legame α 1→4)



Amilosio

mentre nell'amilopectina la catene risultano ramificate per la presenza anche di legami tra l'atomo di carbonio 1 a l'atomo di carbonio 6 (legame α 1→6)



Amilopectina

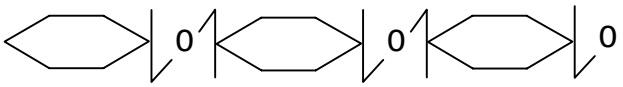
Le α-amilasi (*α-amilasi pancreatica* e *α-amilasi salivare*) provvedono alla degradazione dell'amido contenuto negli alimenti scindendo i legami α 1→4 fino ad ottenere disaccaridi (maltosio) e oligosaccaridi contenenti i legami α 1→6. Il maltosio, il lattosio e il saccarosio, e gli oligosaccaridi residui contenenti i legami α 1→6, vengono quindi scissi ai monosaccaridi che li costituiscono da parte di *oligosaccaridasi* e di *disaccaridasi* presenti nell'orletto a spazzola delle cellule della mucosa dell'intestino tenue.

Il glicogeno è un polisaccaride analogo agli amidi di origine vegetale, contenente sia legami α 1→4 sia legami α 1→6.

L'organismo umano dispone di limitate riserve di glicogeno, che vengono prodotte a partire dal glucosio derivante dall'eccesso calorico alimentare, accumulate nel fegato e nel muscolo, e utilizzate per produrre rapidamente glucosio durante il digiuno.

Per la degradazione completa del glicogeno a glucosio è necessario l'intervento di un apposito enzima, detto *enzima deramificante*, in grado di scindere i legami α 1→6.

Si ricorda infine che la *cellulosa* è anch'essa un polimero lineare del glucosio, simile all'amilosio tranne per il fatto che i legami tra gli atomi di carbonio 1 e 4 sono di tipo β.



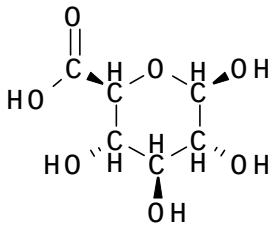
Cellulosa

La cellulosa non viene degradata dagli enzimi intestinali, tanto che essa rappresenta, come ben noto la principale fonte di fibre alimentari. Questo avviene a causa del fatto che l'intestino umano non dispone degli enzimi necessari a idrolizzare il legame di tipo beta tra gli atomi di carbonio 1 e 4 (legame β 1→4).

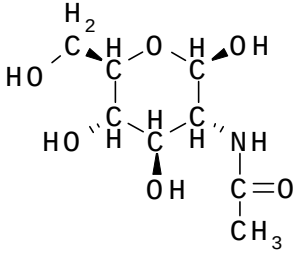
L'impossibilità da parte degli enzimi che scindono i legami α 1→4 di scindere i legami β 1→4 rappresenta un chiaro esempio della *stereospecificità* che caratterizza l'azione degli enzimi.

Tra gli ***eteroglicani*** (termine che viene utilizzato per indicare polisaccaridi contenenti monosaccaridi differenti) vanno ricordati l'*acido ialuronico* e l'*eparina*. Si fa notare che attualmente in genere si parla di ***proteoglicani*** per riferirsi a questa classe di sostanze.

L'acido ialuronico è un polimero formato dall'unione alternata di una molecola di *acido glicuronico* e di una molecola di *N-acetilglucosammina*



Acido glicuronico



N-acetilglucosammina

L'acido ialuronico è un costituente fondamentale del connettivo e di altri tessuti, ed è la sostanza che svolge la funzione lubrificante e anti-urto nelle articolazioni.

L'eparina contiene anch'essa N-acetilglucosammina e acido glicuronico, con in aggiunta acido iduronico, e con gruppi solfato sul carbonio 3 e sul carbonio 6 della glucosammina e sul carbonio 2 dell'acido glicuronico.

L'eparina è nota come anticoagulante e come agente chiarificante dei lipidi, anche se il suo naturale ruolo fisiologico non è ancora perfettamente chiaro.

Il *dermatan-solfato*, l'*eparan-solfato* e il *cheratan-solfato* sono altri tipi di eteroglicani (o *mucopolisaccaridi*) presenti nell'organismo. Il termine di mucopolisaccaridi viene ancora oggi utilizzato specialmente in riferimento a una classe di malattie, le *mucopolisaccaridosi*.

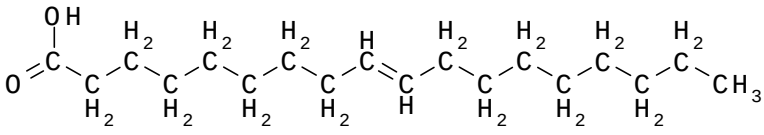
Le mucopolisaccaridosi sono malattie nelle quali si ha l'accumulo nelle cellule di mucopolisaccaridi a causa di specifici difetti enzimatici che ne impediscono la degradazione da parte degli *enzimi lisosomiali*.

Lipidi

Costituiscono una classe eterogenea di sostanze, che hanno in comune la caratteristica di essere *idrofobici*, ovvero scarsamente o per nulla solubili in acqua.

I lipidi sono i principali componenti delle membrane biologiche.

I lipidi più semplici sono gli ***acidi grassi***. Un esempio è rappresentato dall'acido oleico, un acido a 18 atomi di carbonio con un legame insaturo (doppio legame) tra gli atomi di carbonio in posizione 9 e in posizione 10 (negli acidi grassi gli atomi di carbonio sono numerati in ordine crescente a partire dal carbonio del gruppo carbossilico), del quale viene qui riportata la formula di struttura

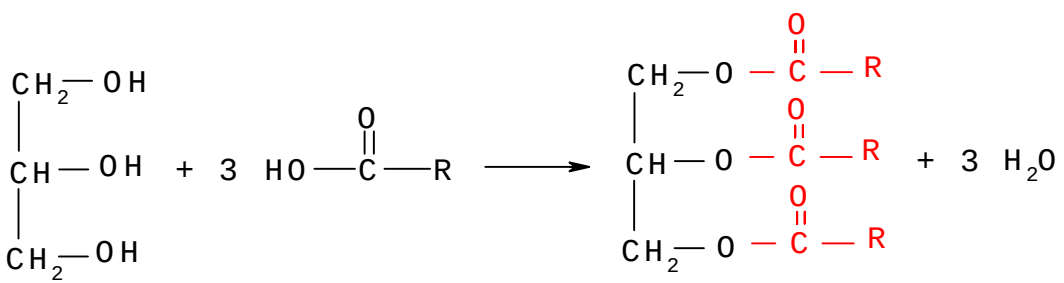


Acido oleico [18:1(9)]

Nella tabella che segue sono riportate le formule brute dei principali acidi grassi. Nella prima colonna il simbolo numerico indica, come nel caso sopra riportato, il numero di atomi di carbonio presenti nella molecola, mentre il secondo, quello che segue i due punti (:), indica il numero di doppi legami presenti nella molecola, e il terzo, tra parentesi, indica il primo della coppia di atomi di carbonio tra i quali esiste il doppio legame

Simbolo	***Struttura***	***Nome comune***
16:0	CH_3-$(CH_2)_{14}$-COOH	Acido palmitico
16:1(9)	CH_3-$(CH_2)_5$-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH	Acido palmitoleico
18:0	CH_3-$(CH_2)_{16}$-COOH	Acido stearico
18:1(9)	CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH	Acido oleico
18:2(9,12)	CH_3-$(CH_2)_3$-$(CH_2$-CH=CH$)_2$-$(CH_2)_7$-COOH	Acido linoleico
18:3(9,12,15)	CH_3-$(CH_2$-CH=CH$)_3$-$(CH_2)_7$-COOH	Acido linolenico
20:4(5,8,11,14)	CH_3-$(CH_2)_3$-$(CH_2$-CH=CH$)_4$-$(CH_2)_3$-COOH	Acido arachidonico

I *triacilgliceroli* (o ***trigliceridi***) sono i prodotti di esterificazione dei tre gruppi alcolici (gruppi OH) del glicerolo con tre acidi grassi secondo la seguente reazione formale

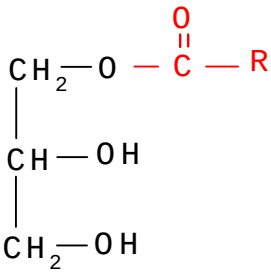


Glicerolo

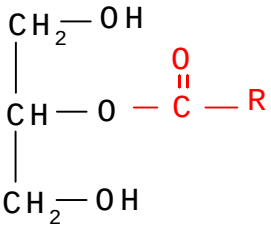
1,2,3-Triacilglicerolo
(trigliceride)

La maggior parte degli acidi grassi è presente nell'organismo sotto forma di *trigliceridi*, che vengono sintetizzati a partire dall'eccesso calorico, trasportati nel sangue e accumulati nelle cellule del tessuto adiposo (*adipociti*).

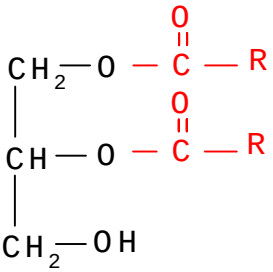
Nell'organismo sono anche presenti minori quantità di *monogliceridi* (1-monoacilglicerolo e 2-monoacilglicerolo) e di *digliceridi* (1,2-diacilglicerolo)



1-Monoacilglicerolo

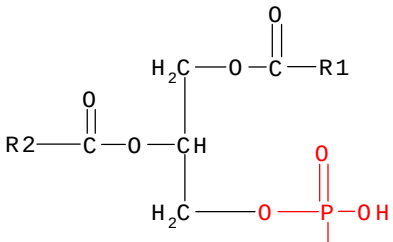


2-Monoacilglicerolo



1,2-Diacilglicerolo

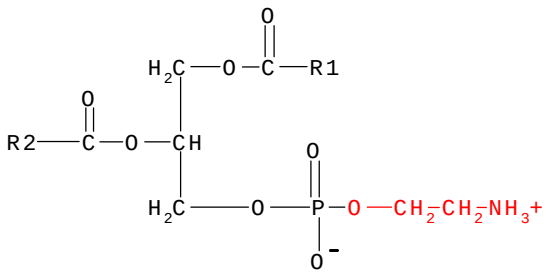
Dalla molecola del glicerolo, in questo caso esterificata mediante una molecola di acido *orto-fosforico*, origina un'altra importante classe di lipidi, i ***fosfolipidi*** (o *fosfogliceridi*) che sono derivati dall'*acido fosfatidico*



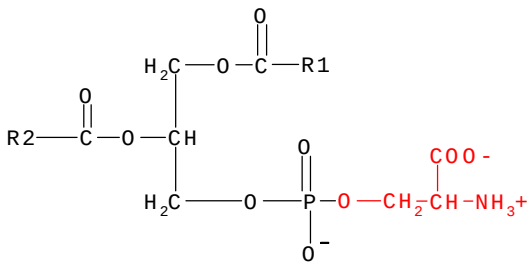
Acido fosfatidico

I fosfolipidi sono i lipidi più abbondanti nelle membrane cellulari.

Tra i fosfolipidi importanti vanno ricordati la *fosfatidiletanolammina* e la *fosfatidilserina*

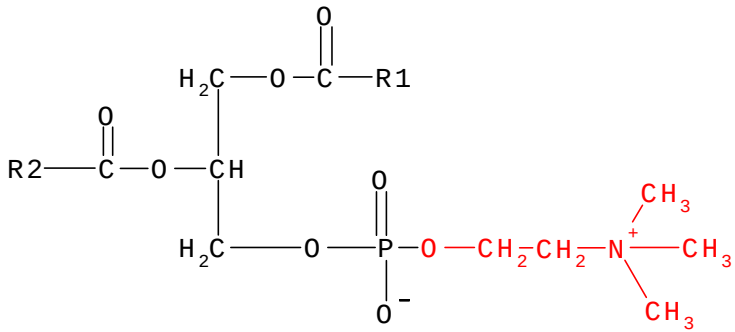


Fosfatidiletanolammina



Fosfatidilserina

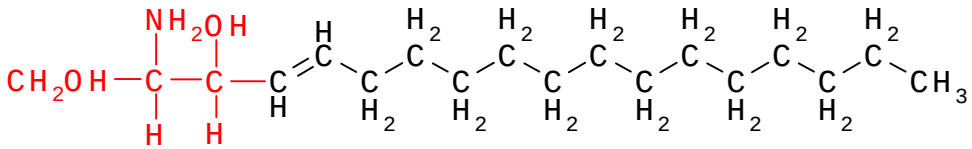
e ancora la *fosfatidilcolina* (o *lecitina*)



Fosfatidilcolina (lecitina)

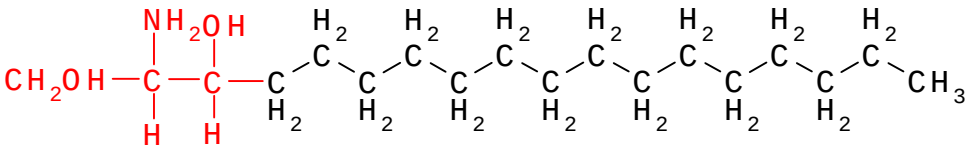
La *cardiolipina*, un fosfolipide composto da due molecole di acido fosfatidico unite covalentemente mediante una molecola di glicerolo, è un importante marcatore delle malattie autoimmuni.

Un'altra importante classe di lipidi è rappresentata dagli ***sfingolipidi***. Alla base di questa classe di sostanze vi sono due amminaolcoli, la *sfingosina*



Sfingosina

e il suo derivato *diidrosfingosina*

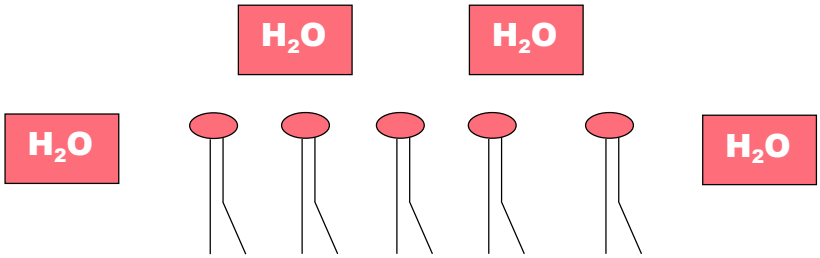


Diidrosfingosina

a partire dai quali sono sintetizzate le strutture definitive, quella dei *ceramidi* e quella della *sfingomielina*.

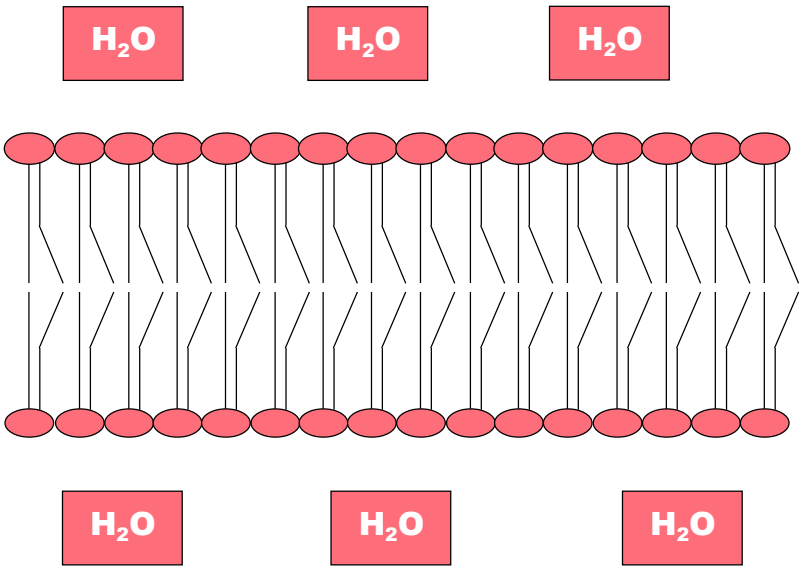
La sfingomielina forma lo strato isolante delle fibre nervose (guaina mielinica).

La proprietà fondamentale degli sfingolipidi, come di quella dei fosfolipidi, è in definitiva quella di contenere una testa polare e una o più catene idrofobiche (struttura detta *anfipatica*).



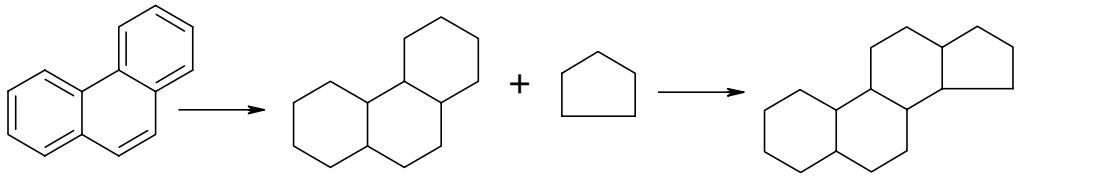
A causa della struttura anfipatica delle molecole, in ambiente acquoso le teste polari tendono a restare in contatto con l'ambiente, mentre le code idrofobiche, insolubili in acqua, tendono a sfuggire. Spontaneamente, le molecole tendono a ruotare ponendo le parti idrofobiche in contatto reciproco tra di loro.

La struttura che ne risulta è la seguente

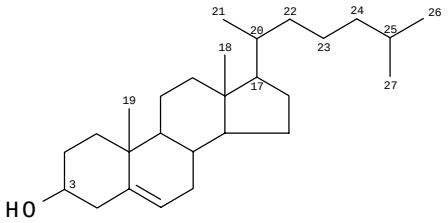


La *struttura anfipatica* dei glicerofosfolipidi e degli sfingolipidi porta spontaneamente alla formazione del doppio strato lipidico che sta alla base delle *membrane biologiche*.

Formalmente dall'unione di una molecola di *fenantrene* completamente saturata (*peridrofenantrene*) e di una molecola di *ciclopentano* origina il *ciclopentanoperidrofenantrene*



che rappresenta il nucleo organico (*nucleo steroideo*) della molecola del *5-colesten-3-beta-olo* più comunemente noto come *colesterolo* (che in realtà viene prodotto attraverso un processo di biosintesi molto complesso)



Colesterolo (5-colesten-3-beta-olo)

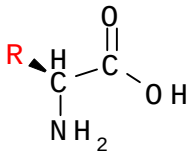
Il colesterolo a causa della sua struttura è una molecola altamente idrofobica (insolubile in acqua) ed è alla base di una classe di lipidi nota con il nome di ***steroidi***.

Il colesterolo è tra l'altro il precursore degli *ormoni steroidei* e, dopo i glicerofosfolipidi e gli sfingolipidi, rappresenta la terza maggiore classe dei lipidi delle membrane cellulari.

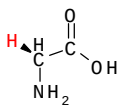
Amminoacidi e proteine

Gli ***amminoacidi***, come suggerisce il nome, sono molecole caratterizzate dalla contemporanea presenza di un gruppo basico (il gruppo amminico NH_2 che in soluzione associa un protone trasformandosi nel gruppo NH_3^+) e di un gruppo acido (il gruppo carbossilico COOH che in soluzione libera un protone H^+ trasformandosi nel gruppo COO^-). A pH 7,0 entrambi i gruppi

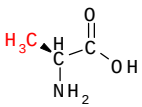
sono ionizzati e gli amminoacidi si comportano come molecole sia acide che basiche, ovvero, secondo la nomenclatura chimica, come molecole *anfotere*.



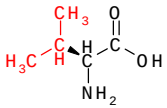
Dal punto di vista formale (la loro biosintesi procede ovviamente in modo assai più complesso) gli amminoacidi possono essere fatti derivare sostituendo il radicale R riportato nella formula a lato con diversi gruppi chimici. Quelli più semplici (*glicina*, *alanina*, *valina*, *leucina*, *isoleucina*) hanno una catena laterale contenente solamente carbonio e idrogeno, e sono denominati *amminoacidi non sostituiti*



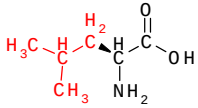
Glicina



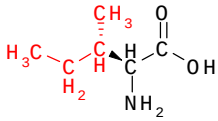
Alanina



Valina

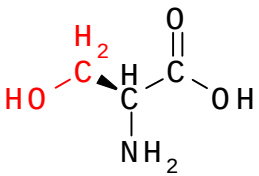


Leucina

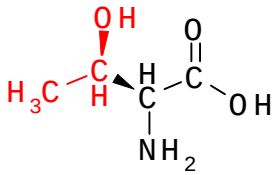


Isoleucina

Serina e *treonina* sono *idrossiamminoacidi*, nei quali un atomo di idrogeno è sostituito da un gruppo idrossilico OH

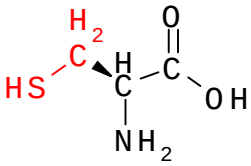


Serina

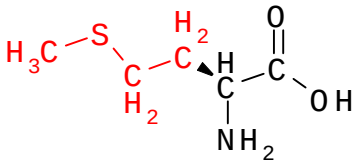


Treonina

Amminoacidi solforati, cioè contenenti un atomo di zolfo, sono la *cisteina* e la *metionina*

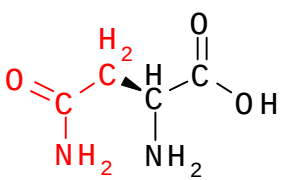


Cisteina

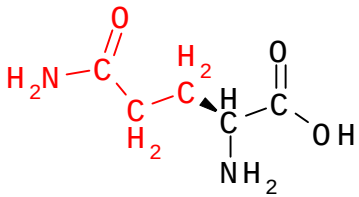


Metionina

Asparagina e *glutammina* sono *aminoacidi carbossiammidici*

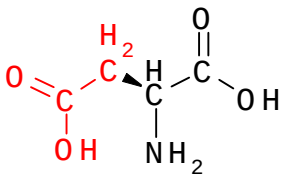


Asparagina

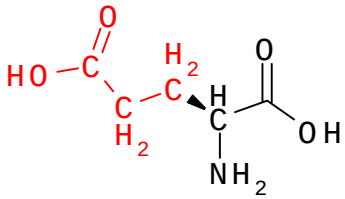


Glutammina

Sono *aminoacidi monoammino-dicarbossilici* (cioè contenenti un gruppo amminico e due gruppi carbossilici) l'*acido aspartico* e il l'*acido glutammico*

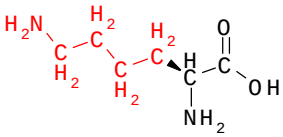


Acido aspartico

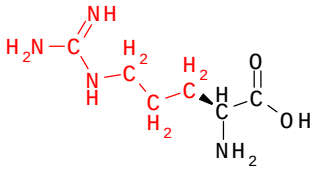


Acido glutammico

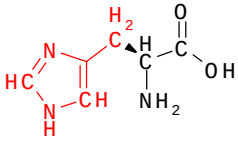
Sono *aminoacidi diammino-monocarbossilici* (cioè contenenti due gruppi amminici e un gruppo carbossilico) la *lisina*, l'*arginina* e l'*istidina*



Lisina



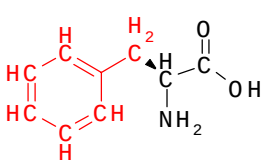
Arginina



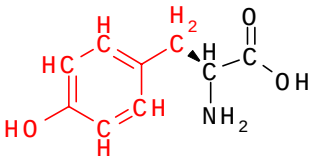
Istidina

La decarbossilazione (perdita del gruppo carbossilico -COOH) dell'istidina porta alla formazione dell'*istamina*, uno dei mediatori dell'infiammazione.

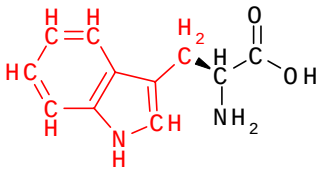
Fenilalanina, *tirosina* e *triptofano* sono *amminoacidi aromatici*. La tirosina differisce dalla fenilalanina solamente per un gruppo ossidrilico in più legato all'anello aromatico.



Fenilalanina



Tirosina

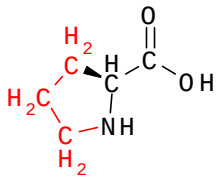


Triptofano

La tirosina è il precursore degli ormoni tiroidei.

Il triptofano ha una struttura complessa, non può essere sintetizzato in vivo, e per questo è un *amminoacido essenziale*, che deve essere introdotto con la dieta.

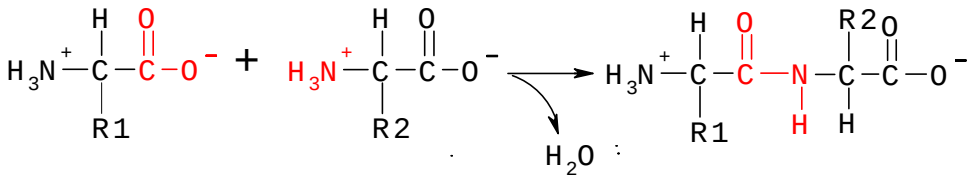
Infine un caso a sé stante è rappresentato dalla *prolina*, un *amminoacido eterociclico* che possiede un anello formato per ciclizzazione interna



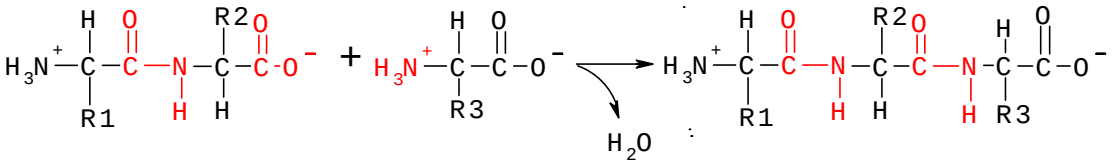
Prolina

Quando la catena di carbonio di alcuni amminoacidi viene utilizzata per sintetizzare il glucosio (mediante il processo noto come *gluconeogenesi*), il gruppo amminico ($-NH_2$) viene eliminato sotto forma di *urea*.

In seguito all'azione di opportuni enzimi e all'intervento dell'RNA, che specifica la successione (o *sequenza*) degli amminoacidi, due o più amminoacidi possono unirsi tra loro mediante un *legame peptidico*, formando dei polimeri. I *dipeptidi* sono formati da due amminoacidi legati mediante un singolo legame peptidico, la cui formazione, come evidenziato, porta all'eliminazione di una molecola di acqua



I *tripeptidi* sono formati da tre amminoacidi legati mediante due legami peptidici



L'unione di più amminoacidi porta ad una *catena polipeptidica*, come ad esempio quella del *glucagone umano*, del quale viene qui riportata la sequenza amminoacidica

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-ASp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr

Le abbreviazioni utilizzate sono riportate nella seguente tabella

Sigla	***Amminoacido***	***Sigla***	***Amminoacido***	***Sigla***	***Amminoacido***	***Sigla***	***Amminoacido***
Ala	Alanina	*Gln*	Glutammina	*Leu*	Leucina	*Ser*	Serina
Arg	Arginina	*Glu*	Acido glutammico	*Lys*	Lisina	*Thr*	Treonina
Asn	Asparagina	*Gly*	Glicina	*Met*	Metionina	*Trp*	Triptofano
Asp	Acido aspartico	*His*	Istidina	*Phe*	Fenilalanina	*Tyr*	Tirosina
Cys	Cisteina	*Ile*	Isoleucina	*Pro*	Prolina	*Val*	Valina

Viene riportata qui di seguito, a titolo di esempio, anche la sequenza di amminoacidi dell'albumina del siero, che è formata da 609 amminoacidi, con una massa della mole di 69.294.

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Gly Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala

Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

Nella tabella che segue per la composizione dell'albumina viene riportato il numero di molecole di ciascun amminoacido e la percentuale che esso rappresenta della massa totale della molecola

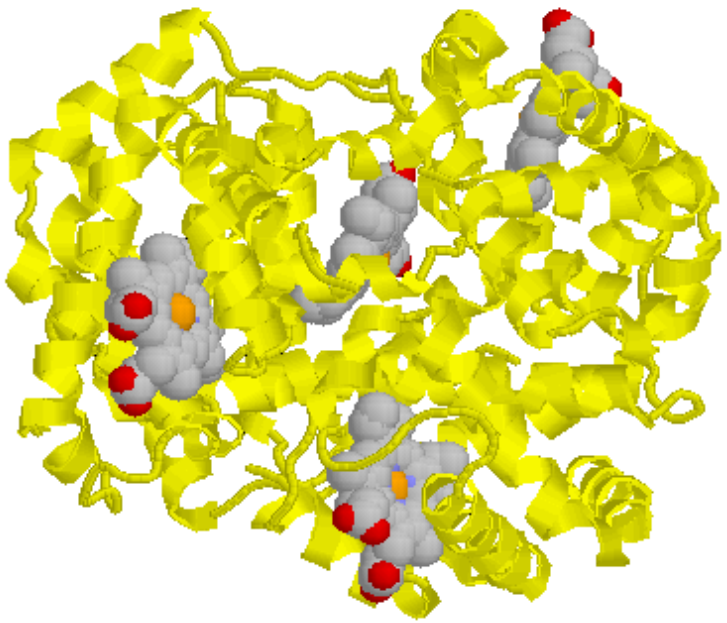
Amminoacido	***Molecole***	***Percentuale***	***Amminoacido***	***Molecole***	***Percentuale***
Ala	63	10.3%	Gln	20	3.3%
Leu	64	10.5%	Ser	28	4.6%
Arg	27	4.4%	Glu	61	10.0%
Lys	60	9.9%	Thr	29	4.8%
Asn	17	2.8%	Gly	14	2.3%
Met	7	1.1%	Trp	2	0.3%
Asp	36	5.9%	His	16	2.6%
Phe	35	5.7%	Tyr	19	3.1%
Cys	35	5.7%	Ile	9	1.5%
Pro	24	3.9%	Val	43	7.1%

Le *proteine* sono costituite da una o più catene polipeptidiche, con l'eventuale aggiunta di gruppi attivi (come ad esempio il gruppo *eme* dell'*emoglobina*).

Nelle proteine la catena polipeptidica (o le catene polipeptidiche qualora una proteina sia formata da più catene) è organizzata in modo da assumere in definitiva una struttura tridimensionale, nel seguente ordine gerarchico

Struttura	***Fattore determinante la struttura***
Primaria	Legami covalenti che determinano la sequenza amminoacidica di ciascuna catena polipeptidica
Secondaria	Interazioni non-covalenti che determinano la formazione di tratti avvolti a elica
Terziaria	Legami covalenti e non-covalenti tra i residui presenti nelle catene laterali degli amminoacidi che formano la catena polipeptidica, che determinano la struttura tridimensionale della proteina
Quaternaria	Legami non-covalenti che determinano l'associazione di più catene polipeptidiche (subunità) nella proteina finale

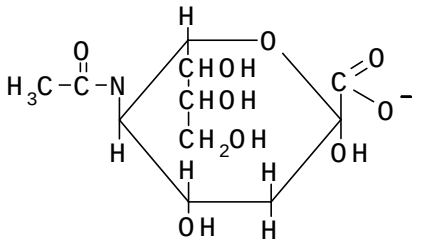
Un esempio di struttura quaternaria di una proteina è quella dell'emoglobina, che come noto è un tetramero, formato dall'unione di quattro catene polipeptidiche (quattro subunità a due a due uguali).



L'*emoglobina* A_1 qui illustrata, che con il 95% circa rappresenta la quota preponderante di emoglobina nell'adulto, è formata da due catene denominate alfa (α) e da due catene denominate beta (β), ciascuna delle quali contiene un gruppo eme, unite a formare il tetramero $\alpha_2\beta_2$.

Infine non vanno dimenticate le *glicoproteine*, proteine coniugate che contengono come *gruppo prostetico* (gruppo non proteico) uno o più saccaridi legati covalentemente.

Il più importante componente delle glicoproteine è l'acido N-acetilneuramminico (o acido sialico).



Acido N-acetilneuramminico
(acido sialico)

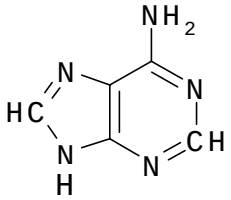
Contrariamente a quanto si può essere indotti a ritenere, le glicoproteine non sono affatto un'eccezione, ma sono molto diffuse, e l'unione di saccaridi alle catene proteiche sembra essere determinante per la funzione biologica di molte proteine. In effetti sono glicoproteine:

- molte proteine delle membrane cellulari, inclusi i *recettori virali* e i *recettori ormonali* siti sulle membrane cellulari:
- gli antigeni del *sistema antigenico gruppo ematico ABO*;
- gli antigeni del *sistema di istocompatibilità*;
- i siti antigenici delle *immunoglobuline*;
- la maggior parte delle plasmaproteine, inclusi i *fattori della coagulazione* e molte delle *proteine del complemento* (l'albumina, che non è una glicoproteina, è la principale eccezione);
- alcuni ormoni proteici, come la *follitropina* (FSH), la *tireotropina* (TSH);
- proteine strutturali come il *collagene*, la *laminina* e la *fibronectina*;
- la proteina antivirale nota come *interferone*;
- le *proteine delle secrezioni*, che svolgono il ruolo di lubrificante e di protezione delle cellule epiteliali.

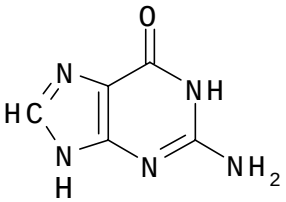
Basi eterocicliche, nucleosidi, nucleotidi e acidi nucleici

Le ***basi eterocicliche*** entrano a far parte delle molecole di DNA e di RNA. Rappresentano le lettere mediante le quali viene scritto il codice genetico (nel DNA) e viene assicurata la trascrizione del codice genetico in forma di proteine (mediante l'RNA).

Adenina e *guanina* sono *basi puriniche* (da *purum uricum*, la molecola che rappresenta l'anello contenente azoto dell'acido urico che le caratterizza).



Adenina

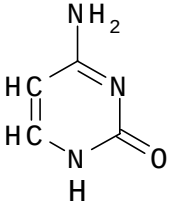


Guanina

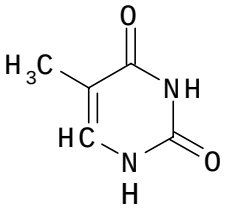
Adenina (A) e guanina (G) sono presenti sia nel DNA sia nell'RNA.

Il catabolismo dell'adenina e della guanina porta alla formazione dell'*acido urico*.

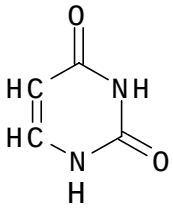
Citosina, *timina* e *uracile* sono *basi pirimidiniche* (da *pirimidina*, la molecola che rappresenta l'anello contenente azoto che le caratterizza)



Citosina



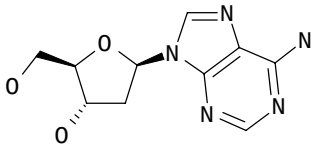
Timina



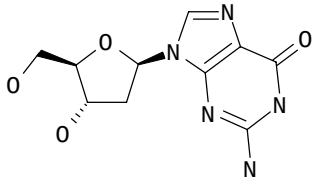
Uracile

Nel DNA sono presenti citosina (C) e timina (T), nell'RNA sono presenti citosina e uracile (U).

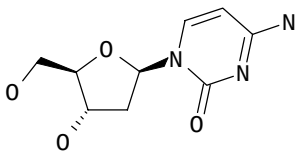
L'unione delle basi eterocicliche con una molecola di desossiribosio porta alla formazione dei corrispondenti *nucleosidi* (***desossiribonucleosidi***) che entrano nella formazione della molecola di DNA (acido desossiribonucleico, dalla presenza del desossiribosio)



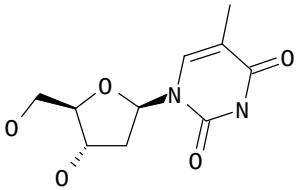
Desossiadenosina



Desossiguanosina

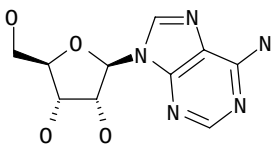


Desossicitidina

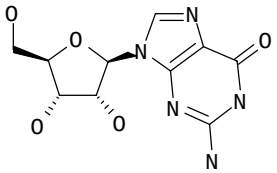


Desossitimidina

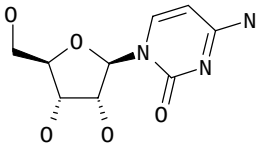
L'unione delle basi eterocicliche con una molecola di ribosio porta alla formazione dei corrispondenti *nucleosidi* (***ribonucleosidi***) che entrano nella formazione della molecola di RNA (acido ribonucleico, dalla presenza del ribosio)



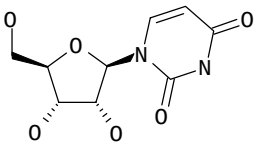
Adenosina



Guanosina

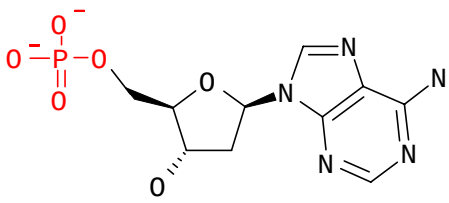


Citidina

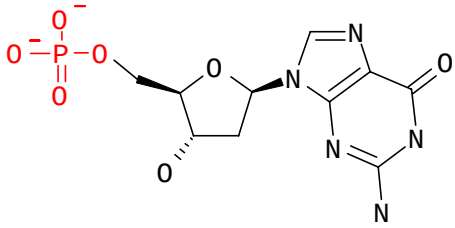


Uridina

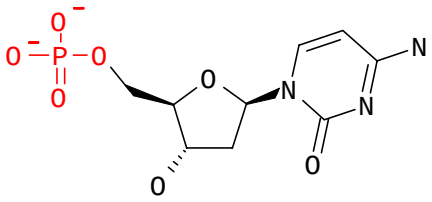
Finalmente l'unione di un nucleoside con una molecola di acido fosforico a livello dell'atomo di carbonio 5 del desossiribosio conduce alla formazione dei corrispondenti *nucleotidi* (***desossinucleotidi***) del DNA



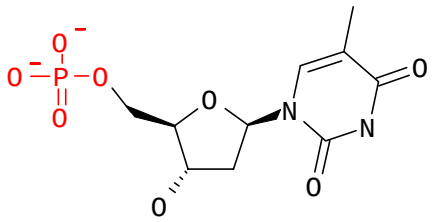
Desossiadenosina 5' monofosfato
(acido desossiadenilico)



Desossiguanosina 5'-monofosfato
(acido desossiguanilico)

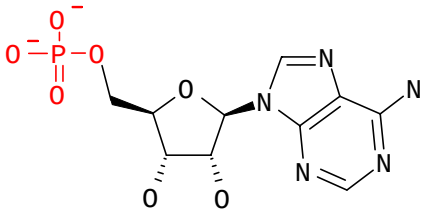


Desossicitidina 5' monofosfato
(acido desossicitidilico)

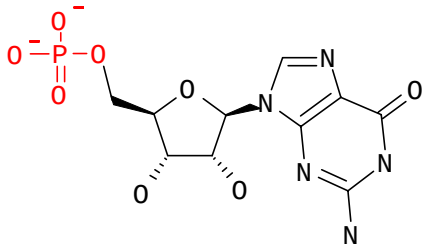


Timina 5' -monofosfato
(acido desossitimidilico)

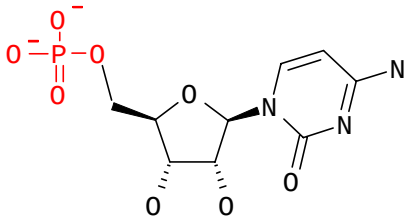
mentre l'unione di un nucleoside con una molecola di acido fosforico a livello dell'atomo di carbonio 5 del ribosio conduce alla formazione dei corrispondenti *nucleotidi* (***ribonucleotidi***) dell'RNA



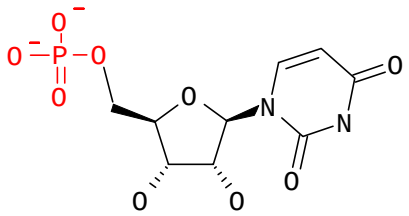
Adenosina 5' monofosfato
(acido adenilico)



Guanosina 5' -monofosfato
(acido guanilico)



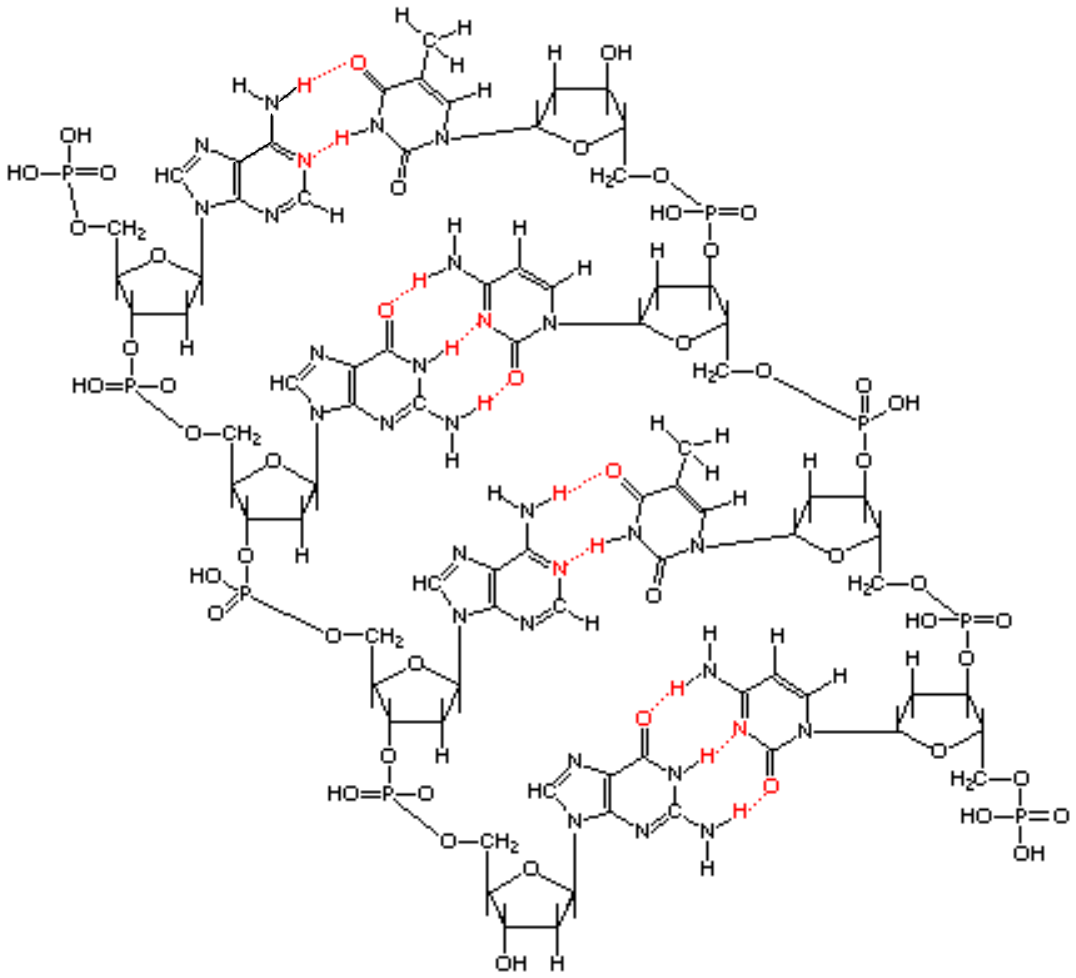
Citidina 5' monofosfato
(acido citidilico)



Uridina 5' -monofosfato
(acido uridilico)

I nucleotidi sono polimerizzati tra di loro a formare le lunghe catene degli ***acidi nucleici***. Nella figura seguente è riportata la formula di struttura di un frammento di *acido desossiribonucleico* (DNA), costituito da una sequenza di quattro basi puriniche e quattro basi pirimidi-

niche accoppiate tra loro. Sull'estrema sinistra e sull'estrema destra compaiono le catene di desossiribosio e fosfato. Dall'alto verso il basso le basi accoppiate tra loro sono rispettivamente (da sinistra a destra) adenina e timina, guanina e citosina, adenina e timina, guanina e citosina. La sequenza del filamento di DNA di sinistra è pertanto AGAG, quella del filamento complementare di destra è TCTC. Si notino i legami idrogeno che consentono l'appaiamento tra le *basi complementari*.



I *legami idrogeno* sono di fondamentale importanza nel determinare la struttura tridimensionale ad *elica* del DNA.

Vitamine

Le vitamine sono sostanze di natura organica, contenute negli alimenti, e richieste solamente in piccola quantità. Si distinguono in ***vitamine liposolubili*** e ***vitamine idrosolubili***.

Le vitamine idrosolubili sono i *coenzimi* di varie reazioni metaboliche. Il meccanismo di azione delle vitamine liposolubili a livello molecolare è invece ancora parzialmente sconosciuto.

Nella seguente tabella sono riportate separatamente le richieste giornaliere delle vitamine liposolubili e delle vitamine idrosolubili, accanto ai sintomi che conseguono ad un loro insufficiente apporto.

Vitamine liposolubili	***Nome chimico***	***Richiesta giornaliera***	***Sintomi da carenza***
A	Retinolo	1,0 mg	Cecità notturna (emeralopia), xeroftalmia
D	Calciferolo	5 μg (sintetizzata nella pelle per esposizione ai raggi UV)	Rachitismo
E	Tocoferolo	10 mg	Debolezza muscolare, emolisi
K	Menachinone	1,4 mg (sintetizzata dai batteri intestinali)	Ritardata coagulazione del sangue

Vitamine idrosolubili	***Nome chimico***	***Richiesta giornaliera***	***Sintomi da carenza***
B_1	Tiamina	1,4 mg	Sindrome di Wernicke-Korsakoff (negli alcolisti), polineurite (beriberi)
B_2	Riboflavina	1,7 mg	Dermatite
	Acido nicotinico (niacina)	18 mg (sintetizzata nell'organismo a partire dal triptofano)	Pellagra
	Acido pantotenico	7 mg	Parestesie a crampi alle estremità
B_6	Piridossina	2,2 mg	Dermatite, disturbi psichici
B_{12}	Cobalammina	3,0 mg	Anemia perniciosa, neuropatie
C	Acido ascorbico	60 mg	Scorbuto
H	Biotina	0,15 mg (sintetizzata dai batteri intestinali)	Dermatite

Dalla niacina derivano i coenzimi NAD (*nicotinammide-adenin-dinucleotide*) e NADP (*nicotinammide-adenin-dinucleotide fosfato*), dalla riboflavina derivano i coenzimi FMN (*flavin-mononucleotide*) e FAD (*flavin-adenin-dinucleotide*), dalla piridossina deriva il coenzima *piridossal-fosfato*, dalla tiamina deriva il coenzima TPP (*tiamina-pirofosfato*).

Enzimi

Gli enzimi sono proteine in grado di catalizzare le reazioni chimiche che avvengono nelle cellule. Gli enzimi aumentano la velocità alla quale le reazioni raggiungono l'equilibrio.

Viene denominata ***apoenzima*** la parte proteica dell'enzima. Sono denominati ***cofattori*** tutte le molecole inorganiche e organiche che l'enzima richiede per realizzare la sua *funzione catalitica*. Viene denominato ***gruppo prostetico*** qualsiasi cofattore legato in modo covalente all'apoenzima. L'aggiunta di cofattori e del gruppo prostetico all'apoproteina porta alla formazione dell'***oloenzima***, cioè dell'enzima funzionante.

Una caratteristica fondamentale degli enzimi è la specificità: così ad esempio la glucosio ossidasi ossida il glucosio ma non ossida il galattosio che, come visto in precedenza, è identico al glucosio tranne che per la posizione del gruppo ossidrilico (OH) legato all'atomo di carbonio 4. La specificità è legata ad un ***sito di legame***, che corrisponde alla particolare disposizione di gruppi chimici che consente di legare specificamente il ***substrato***, cioè la/e molecola/e sulle quali l'enzima esplica la propria azione. Il ***sito attivo*** è infine il sito che contiene "il macchinario", sotto forma di particolari gruppi chimici, necessario per portare ad effettivo compimento l'azione catalitica.

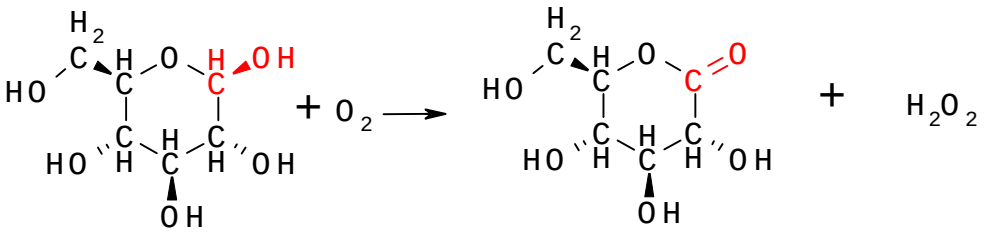
Infine in molte molecole di enzimi esiste un sito denominato ***sito allosterico***. Piccole molecole, legandosi al sito allosterico, possono determinare un cambiamento nella configurazione del sito di legame, aumentando o diminuendo l'affinità per il substrato, o nel sito attivo, rendendolo più o meno attivo.

La presenza del *sito allosterico* consente di regolare la funzione enzimatica.

Le principali classi e sottoclassi nelle quali gli enzimi sono classificati, sono riportate nella tabella che segue, che dà un'idea della complessità e dell'ubiquità dell'intervento degli enzimi nelle reazioni metaboliche degli organismi viventi.

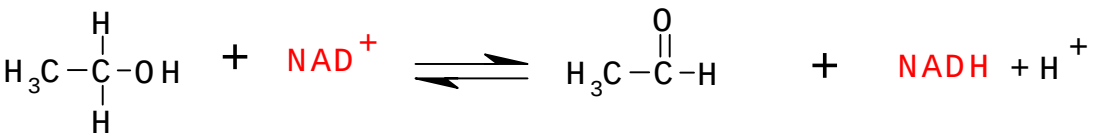
Classe	*Sottoclassi*
Ossidoreduttasi	Deidrogenasi, Ossidasi, Reduttasi, Perossidasi, Catalasi, Ossigenasi, Idrossilasi
Transferasi	Transaldolasi, Transchetolasi, Aciltransferasi, Metiltransferasi, Glucosiltransferasi, Fosforiltransferasi, Chinasi, Posfomutasi
Idrolasi	Esterasi, Glicosidasi, Peptidasi, Fosfatasi, Tiolasi, Fosfolipasi, Amidasi, Deaminasi, Ribonucleasi
Liasi	Decarbossilasi, Aldolasi, Idratasi, Deidrasi, Sintetasi, Liasi
Isomerasi	Racemasi, Epimerasi, Isomerasi, Mutasi
Ligasi	Sintetasi, Carbossilasi

Le ***ossidoreduttasi*** catalizzano le reazioni di ossidoriduzione. Come ad esempio l'ossidazione del *β-D-glucosio* a *δ-gluconolattone* da parte di una *ossidasi* (la *glucosio-ossidasi*)



Glucosio Gluconolattone

o ancora la reazione di ossidazione dell'etanolo da parte di una *deidrogenasi* (*alcool-deidrogenasi*), nella quale interviene come coenzima il NAD che funge da accettore per i due atomi di idrogeno che vengono tolti all'etanolo, e che quindi dalla forma ossidata NAD^+ si trasforma nella forma ridotta $NADH + H^+$



Le *perossidasi* utilizzano H_2O_2 (perossido di idrogeno) come ossidante in luogo dell'ossigeno. Così la *NADH perossidasi* catalizza la reazione

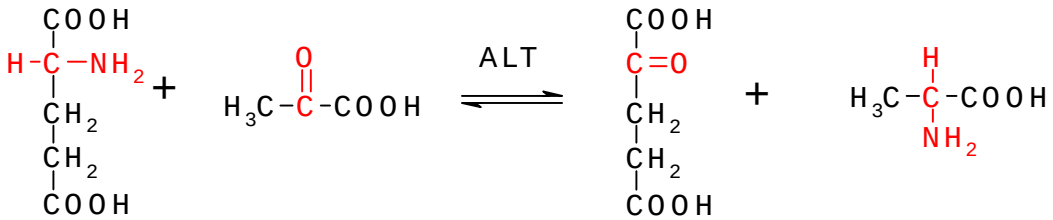
$$NADH + H^+ + H_2O_2 \rightleftharpoons NAD^+ + 2H_2O$$

La *catalasi* è unica nel suo genere, in quanto utilizza l'H_2O_2 sia come donatore che come accettore

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2H_2O$$

Nelle cellule la *catalasi* presiede all'azione di detossificazione eliminando l'H_2O_2.

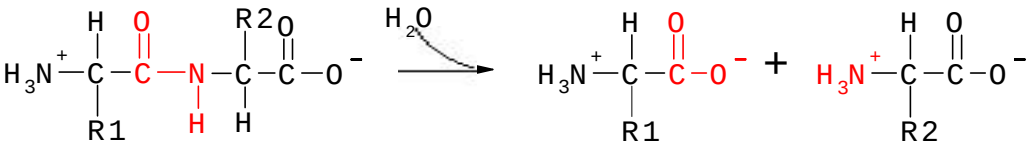
Le ***transferasi*** sono coinvolte nel trasferimento di gruppi funzionali tra donatori e accettori. Così le *amminotransferasi* (o *transaminasi*) trasferiscono un gruppo amminico da un amminoacido a un chetoacido accettore, con la formazione di un nuovo amminoacido e di un nuovo chetoacido



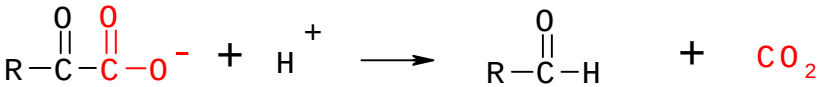
Acido glutammico (amminoacido) — Acido piruvico (chetoacido) — Acido chetoglutarico (chetoacido) — Alanina (amminoacido)

L'*alanina amminotransferasi* (ALT), ancora nota con la vecchia denominazione di transaminasi glutammico-piruvica (GPT), è un enzima particolarmente abbondante negli epatociti, dai quali viene liberato nel sangue in caso di danno cellulare conseguente ad infezione virale o a lesioni tossiche.

Le ***idrolasi*** sono una speciale classe di transferasi, in grado di trasferire il gruppo donatore all'acqua. Tra esse vale la pena di ricordare le *peptidasi*, una speciale classe di idrolasi in grado di scindere il legame peptidico (*enzimi proteolitici*), formando amminoacidi a partire dalle proteine e dai peptidi

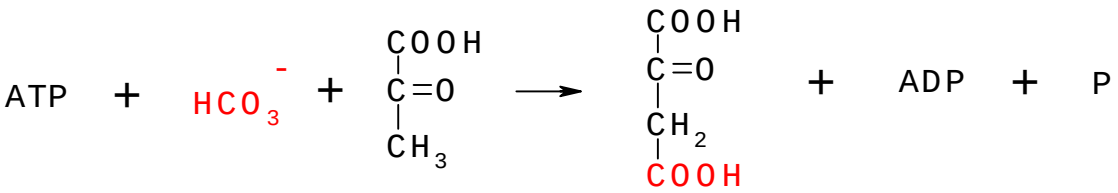


Le ***liasi*** aggiungono o rimuovono, da molecole più grandi, molecole di acqua, di ammonio o di anidride carbonica (CO_2). Le *decarbossilasi* rimuovono quest'ultima, come nella reazione di decarbossilazione di un chetoacido qui riportata



Le ***isomerasi*** catalizzano vari tipi di isomerizzazione.

Le ***ligasi*** catalizzano la formazione di nuovi legami, un fatto per il quale viene consumata energia sotto forma di ATP



Il motore energetico delle cellule eucariote

A partire da Lavoisier, si è compreso che il motore energetico degli esseri viventi è in prima istanza analogo al motore a combustione: dall'***ossidazione*** degli alimenti (che negli esseri viventi sostituiscono il carbone), si ricavano anidride carbonica (***CO_2***), acqua (***H_2O***) ed ***energia***, che può essere trasformata in lavoro (vedere la contrazione muscolare, come pure la sintesi di nuove molecole).

Risulta evidente che i processi di combustione nell'organismo procedono in modo meno brutale dei processi di una caldaia a combustione, o di un motore a scoppio. Le differenze sostanziali che intercorrono tra i due processi sono state chiarite da generazioni di biochimici, e

possono essere riassunte nel concetto dell'utilizzo da parte delle cellule di una *tecnologia di combustione sofisticatissima.*

Innanzitutto bisogna definire che cosa si intende per *reazione di ossidazione*. E la definizione è che una reazione di ossidazione consiste nella *sottrazione a un atomo di uno o più elettroni* da parte di un altro atomo, che acquista quindi uno o più elettroni. L'*acquisto di uno o più elettroni da parte di un atomo* viene denominato *reazione di riduzione*. Dato che la reazione di ossidazione di un atomo è necessariamente accoppiata alla reazione di riduzione di un altro atomo, è più appropriato parlare di *reazione di ossidoriduzione*.

Il termine ossidazione non è stato coniato per caso, ma deriva dall'osservazione che l'ossigeno contenuto nell'atmosfera terrestre in forma di molecola biatomica (O_2) presenta per l'appunto spiccate proprietà di acquistare elettroni, sottraendoli ad altri atomi[7], e che la combustione/ossidazione può avvenire solamente in presenza di ossigeno.

L'atomo che fa più le spese di questa proprietà dell'ossigeno è l'atomo di idrogeno, che presenta per la propria natura (contiene come noto un solo elettrone) una spiccata proprietà a perdere elettroni. Le cellule ricavano l'energia necessaria al loro funzionamento non dall'ossidazione del carbone, come in una caldaia a combustione, bensì dall'ossidazione dell'idrogeno, che non esiste allo stato libero, ma che viene sottratto ad un opportuno substrato (per esempio acidi grassi o glucosio) nel quale è legato al carbonio, con produzione di acqua (H_2O).

Poiché l'idrogeno che viene ossidato risulta legato ad atomi di carbonio, che devono a loro volta essere eliminati, si ha come risultato anche la produzione di CO_2, che deve quindi essere vista semplicemente come un sottoprodotto della reazione di ossidazione che porta alla produzione di energia. Per questo motivo il famoso biochimico Szent-Gyorgyi ha affermato, ovviamente in modo figurato, ma a ragione, che "*la nostra alimentazione è costituita solamente da idrogeno*"[8].

Il risultato dell'ossidazione dell'idrogeno è rappresentato dall'energia liberata durante la reazione di ossidazione. Ed ecco un'altra differenza sostanziale rispetto all'ossidazione del carbone in una caldaia a combustione. In questa l'energia viene liberata sotto forma di calore, che a sua volta viene trasformato in lavoro mediante un opportuno dispositivo. Nell'ossidazione dell'idrogeno l'energia liberata viene immagazzinata sotto forma di legami chimici detti ***legami ricchi di energia***, che hanno da un lato la possibilità di conservarla, dall'altro la capacità di

---

[7] *Le proprietà ossidanti dell'ossigeno sono notevoli, tanto che, se non esistesse la flora a rimpiazzarlo continuamente con la fotosintesi clorofilliana, nel giro di un tempo relativamente breve (dal punto di vista delle ere geologiche) l'atmosfera lo perderebbe progressivamente e completamente a causa del suo spontaneo combinarsi con i costituenti di superficie della crosta terrestre.*

[8] *Boulenger P, Polonowski J, Biestre G, Dautrevaux M. Biochimica. Introduzione allo studio del metabolismo e della sua regolazione. Milano, Masson: 1985:354 pp.*

liberarla in condizioni opportune. Le principali molecole a questo deputate sono dei nucleotidi. Prevalentemente l'ATP, l'estere trifosforico dell'adenina (P rappresenta il fosforo mentre il simbolo ~ rappresenta il legame chimico che immagazzina l'energia liberata dall'ossidazione, cioè il legame ricco di energia)

Adenina - ribosio - P ~ P ~ P

ma anche gli esteri trifosforici denominati CTP, GTP, e UTP, cioè rispettivamente

Citosina - ribosio - P ~ P ~ P
Guanina - ribosio - P ~ P ~ P
Uracile - ribosio - P ~ P ~ P

Sono inoltre in grado di formare legami ricchi di energia il *coenzima A* (*CoA*, che viene sintetizzato a partire dall'acido pantotenico di origine esogena, che abbiamo visto nel capitolo delle vitamine) sotto forma di acil-coenzima A, cioè del coenzima A legato al residuo di un acido organico

R - CO ~ S - CoA

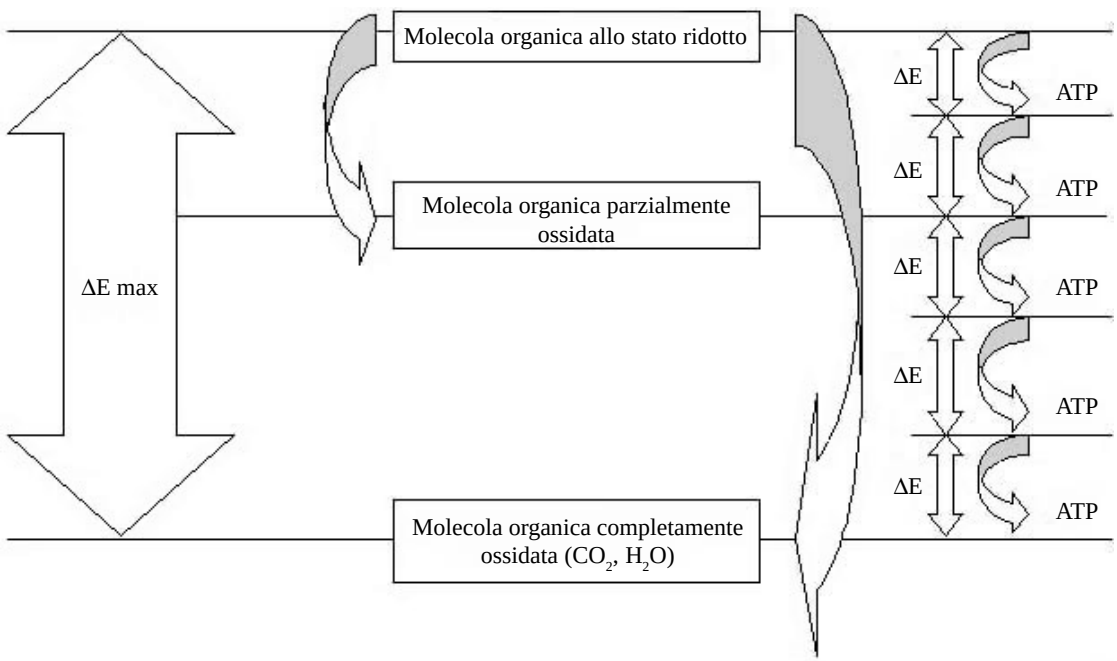
il *fosfoenolpiruvato* e l'acido *1,3-difosfoglicerico*.

L'ultima differenza sostanziale rispetto all'ossidazione del carbone in una caldaia a combustione è rappresentata dal fatto che l'ossidazione dell'idrogeno viene effettuata per gradi, anziché in un solo passaggio brutale. Questo è possibile in quanto l'energia di ossidazione viene liberata per gradini, ciascuno dei quali rappresenta una frazione dell'energia totale liberata, e in corrispondenza di ciascuno dei quali l'energia liberata viene accoppiata alla formazione di un legame ricco di energia. Ciò è reso possibile dal fatto che l'idrogeno (ovvero l'elettrone che gli corrisponde) viene trasportato al suo destino finale (l'atomo di ossigeno, a formare acqua) da una catena di coenzimi, il NAD, il NADP, il FMN, il FAD, il TPP. Si ricorda che, come abbiamo visto sopra, tutti questi coenzimi derivano da vitamine.

In definitiva da tutto questo deriva il fatto che l'energia di ossidazione può essere immagazzinata, quindi utilizzata con parsimonia, in modo mirato, per realizzare le reazioni di biosintesi necessarie al funzionamento delle cellule.

Resta da chiarire la differenza tra *fermentazione* e *respirazione*, denominazioni che in chiave moderna sono state trasformate rispettivamente in *metabolismo anaerobio* e *metabolismo ae-*

robio. Tale differenza è limitata al fatto che nella fermentazione, che avviene in assenza di ossigeno, le molecole organiche sono ossidate solo parzialmente, mentre nella respirazione, che avviene in presenza di ossigeno, l'ossidazione procede fino alla completa trasformazione delle molecole organiche a CO_2 e H_2O. Più progredisce l'ossidazione, più energia viene liberata, e quindi più energia può essere immagazzinata sotto forma di legami ricchi di energia. Quindi il metabolismo aerobio risulta più efficiente del metabolismo anaerobio, avendo una resa energetica maggiore. Questo concetto è illustrato nel seguente schema, nel quale risulta evidente che l'energia massima *ΔE max* derivabile dall'ossidazione del substrato (molecola organica allo stato ridotto) viene ricavata solo parzialmente dalla fermentazione/metabolismo anaerobio (che si ferma quando la molecola è solo parzialmente ossidata) mentre la respirazione/metabolismo aerobio riesce a ricavarla per intero. Durante il processo di ossidazione, ogniqualvolta il salto energetico raggiunge un *valore soglia*, la differenza di energia tra i due stati di ossidazione viene immagazzinata sotto forma di un legame ricco di energia (legame fosfato ~ P), qui rappresentato dalla formazione di molecole di ATP.



Compartimenti e principali funzioni delle cellule eucariote

L'obiettivo di questo paragrafo è di mostrare come le molecole e il motore energetico sopra illustrati portino alla realizzazione delle strutture e delle funzioni delle cellule eucariote.

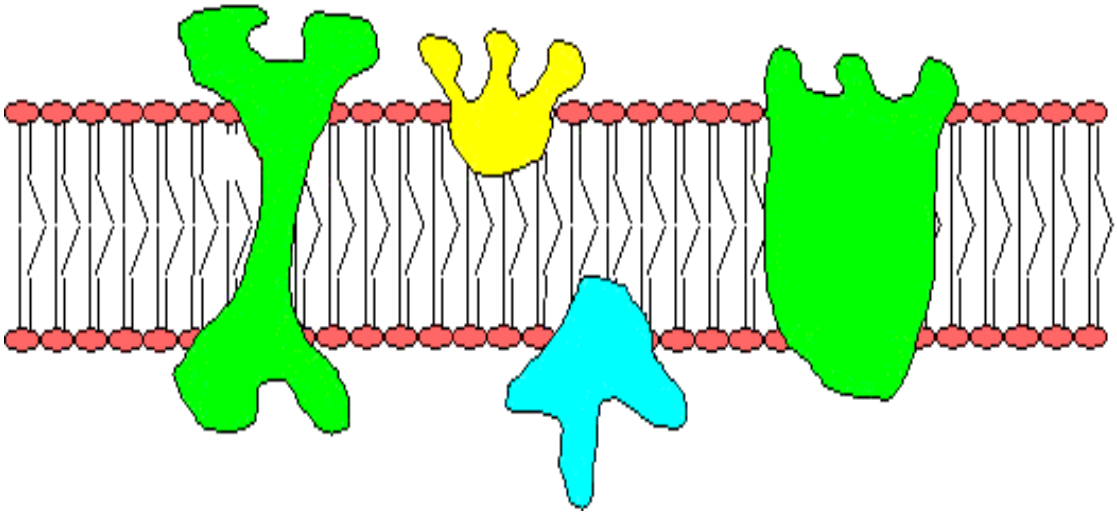
La cellula eucariota può essere vista come composta da una serie di *compartimenti* (le parti del sistema cellula) ciascuno dei quali realizza una specifica struttura nella quale si realizzano una o più funzioni, riassunte in questa tabella

Compartimento	***Principali funzioni***
Membrana citoplasmatica	Trasporto di ioni e molecole
	Recettori per molecole di vario genere
	Definizione della morfologia cellulare
	Partecipazione al movimento cellulare
Nucleo	Sintesi del DNA
	Riparazione del DNA
	Sintesi dell'RNA
Nucleolo	Elaborazione dell'RNA e sintesi dei ribosomi
Reticolo endoplasmatico	Sintesi delle membrane
	Sintesi di proteine e lipidi destinati alla formazione degli organelli cellulari
	Sintesi di proteine e lipidi destinati ad essere emessi all'esterno
Apparato di Golgi	Modifica delle proteine destinate alla formazione degli organelli cellulari
	Modifica delle proteine destinate ad essere emesse all'esterno
Mitocondri	Conservazione dell'energia sotto forma di legami ricchi di energia (legami fosfato ~ P)
	Respirazione cellulare
	Ossidazione di carboidrati e lipidi
	Sintesi dell'urea e dell'eme
Lisosomi	Digestione cellulare (idrolisi di proteine, carboidrati, lipidi e acidi nucleici)
Perossisomi	Eliminazione dell'H_2O_2
Microtubuli e microfilamenti	Formazione del citoscheletro cellulare
	Definizione della morfologia cellulare
	Partecipazione al movimento cellulare
Citosol	Metabolismo di carboidrati, lipidi, amminoacidi e nucleotidi
	Sintesi proteica

Alcune funzioni di queste fondamentali strutture sono qui brevemente illustrate.

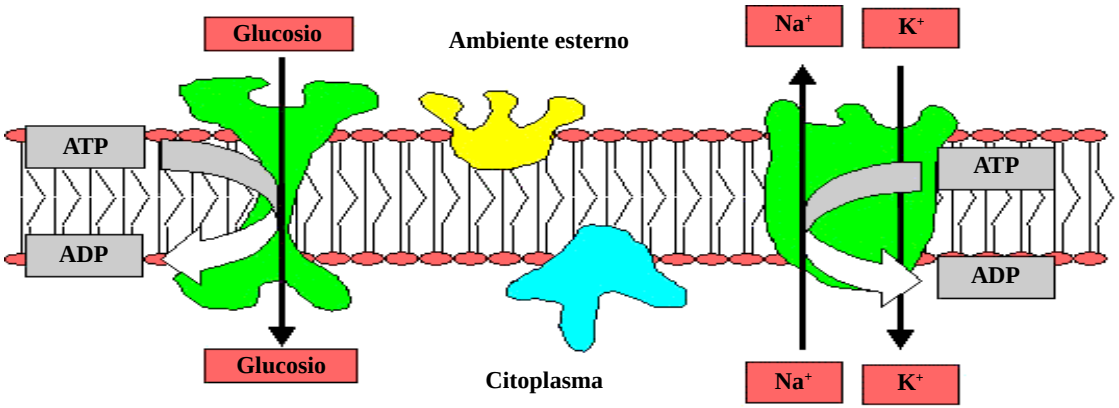
La membrana cellulare

Abbiamo visto in precedenza come la struttura anfipatica dei glicerofosfolipidi e degli sfingolipidi porti spontaneamente alla formazione del doppio strato lipidico che sta alla base delle membrane biologiche. Ad essi va aggiunto il colesterolo, ma soprattutto vanno aggiunte numerose proteine (molte delle quali glicoproteine). Alcune attraversano completamente la membrana, altre risultano ancorate in modo più o meno robusto all'esterno o all'interno della membrana.



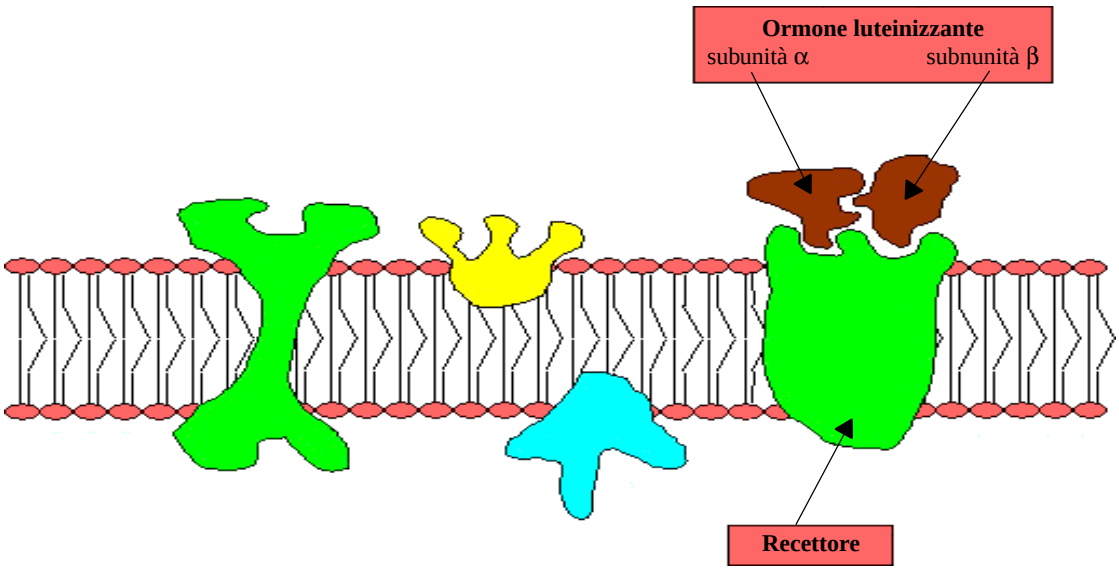
Questa struttura realizza quello che è stato definito come il ***mosaico fluido*** caratteristico della membrana cellulare.

La natura lipidica delle membrane restringe fortemente il tipo di molecole che possono attraversarla con un meccanismo di *trasporto passivo* (semplice ***diffusione***). Mentre le molecole liposolubili diffondono spontaneamente, riescono a diffondere solo molto lentamente attraverso la membrana cellulare tutte le molecole (sia organiche sia inorganiche, come gli ioni Na^+, K^+, eccetera) dotate di carica, e le molecole non liposolubili. Per queste molecole (che oltre agli elettroliti includono i carboidrati e gli amminoacidi) sono invece disponibili dei meccanismi di ***trasporto attivo***. Il trasporto, che comporta consumo di energia, viene realizzato a livello di specifiche ***proteine di trasporto*** che attraversano la membrana, affacciandosi contemporaneamente sull'ambiente esterno e nell'ambiente interno della cellula (citosol).



L'energia necessaria per il trasporto attivo, per esempio del glucosio, o dello ione sodio che viene pompato all'esterno della cellula e scambiato con uno ione potassio, viene ottenuta dalla degradazione di molecole ricche di energia, come l'ATP, che viene trasformato in ADP. Questo a sua volta viene ritrasformato in ATP, e quindi rigenerato, dal motore energetico cellulare.

Altre proteine svolgono il ruolo di ***recettori***. Questo avviene nel caso di molecole proteiche di grandi dimensioni, che non possono attraversare la membrana, come nell'esempio qui illustrato dell'ormone luteinizzante (luteotropina o LH), ma che legandosi al recettore possono attivare, sul versante interno della membrana, le azioni specifiche di regolazione dell'attività cellulare



Il nucleo

Data l'importanza fondamentale che il nucleo riveste, in quanto portatore dell'informazione necessaria a realizzare il progetto di esistenza della cellula, gli aspetti biochimici specifici meritano di essere trattati più compiutamente. Ciò verrà fatto a parte, nel paragrafo riservato ad illustrare *il linguaggio biochimico del progetto*.

Il nucleolo

Il nucleolo è la sede di ***produzione dei ribosomi***, che quindi sono immessi nel citoplasma, ove in piccola parte sono liberi, e in gran parte legati alle membrane del *reticolo endoplasmatico rugoso* (così detto a causa per l'appunto della rugosità delle membrane determinata dalla presenza dei ribosomi).

Il reticolo endoplasmatico

Nel *reticolo endoplasmatico rugoso* i ribosomi provvedono alla ***biosintesi delle proteine*** destinate ad essere emesse all'esterno della cellula (come per esempio gli ormoni proteici) e delle proteine e degli enzimi cellulari. Anche in questo caso, gli aspetti biochimici specifici meritano di essere trattati più compiutamente, ed essendo strettamente correlati al discorso riguardante *il linguaggio biochimico del progetto*, saranno trattati con esso.

Sempre il reticolo endoplasmatico è implicato nella ***sintesi dei lipidi*** e nella ***sintesi delle membrane***, e contiene una importante classe di enzimi, denominati ***citocromi P450***, che catalizzano reazioni di idrossilazione nella ***sintesi degli steroidi***.

Infine il reticolo endoplasmatico, in cooperazione con l'apparato di Golgi, partecipa alla ***formazione di organelli cellulari*** quali i *lisosomi* e i *perossisomi*.

L'apparato di Golgi

L'apparato di Golgi è un insieme di membrane lisce a livello delle quali avviene il legame di glicidi e lipidi con le proteine, con conseguente ***biosintesi delle glicoproteine*** e ***biosintesi delle lipoproteine***. Inoltre è responsabile della ***secrezione delle proteine*** destinate all'ambiente esterno.

I mitocondri

Nei mitocondri avviene la ***produzione di ATP*** (la maggior parte di quello necessario alla cellula). Ciò è reso possibile dalle reazioni di ***ossidazione dei glicidi***, di ***ossidazione dei lipidi*** e di ***ossidazione degli amminoacidi*** che si svolgono al loro interno.

Nei mitocondri sono presenti anche speciali vie metaboliche, e particolarmente quella che porta alla ***biosintesi dell'urea*** e quella che porta alla ***biosintesi dell'eme***, l'anello ferroprotoporfirinico contenuto nell'emoglobina ma anche nei citocromi P450.

I lisosomi

La membrana citoplasmatica è in grado di formare introflessioni che inglobano liquidi e macromolecole in soluzione (*pinocitosi*) o materiali corpuscolati come i batteri (*fagocitosi*). Queste introflessioni vengono quindi interiorizzate sotto forma di vescicole (*vacuoli*). In alcuni casi i vacuoli possono contenere anche *parti usurate della cellula stessa*, come mitocondri danneggiati che devono essere sostituiti. In questo caso si parla di *vacuoli autofagici*.

I lisosomi consistono in una *vescicola* formata da una membrana che contiene enzimi. Quando la membrana dei lisosomi si fonde con quella di un vacuolo si forma un vacuolo digestivo. All'interno del vacuolo digestivo gli enzimi lisosomiali, che hanno la proprietà di manifestare il massimo di attività a pH 5 (cioè a pH acido), provvedono alla ***idrolisi delle proteine***, alla ***idrolisi dei lipidi***, alla ***idrolisi dei carboidrati*** e alla ***idrolisi degli acidi nucleici***, liberando da essi le molecole elementari che possono quindi essere riutilizzate dalla cellula per i propri processi di biosintesi.

Difetti genetici specifici dei geni che controllano la sintesi degli enzimi lisosomiali possono portare alla loro assenza o mancanza di attività. Ne conseguono malattie (le mucopolisaccaridosi) nelle quali si ha l'accumulo nelle cellule dei mucopolisaccaridi che non possono essere idrolizzati, come indicato nella seguente tabella.

Malattia	***Prodotto accumulato***	***Enzima carente***
Hunter	Eparan-solfato/Dermatan-solfato	Iduronato solfatasi
Hurler e Scheie	Eparan-solfato/Dermatan-solfato	α-L-iduronidasi
Moroteaux-Lamy	Dermatan-solfato	N-acetilgalattosammina solfatasi
Mucolipidosi VII	Eparan-solfato/Dermatan-solfato	β-glicuronidasi
Sanfilippo A	Eparan-solfato	Eparan-sulfamidasi
Sanfilippo B	Eparan-solfato	N-acetilglucosamminidasi
Sanfilippo C	Eparan-solfato	N-acetilglucosammina-6-solfatasi

I perossisomi

Contengono enzimi in grado di ossidare amminoacidi, acido urico e vari acidi organici utilizzando ossigeno (O_2) e producendo perossido di idrogeno (H_2O_2). L'enzima catalasi, presente nei perossisomi, catalizza quindi la conversione dell'H_2O_2 ad acqua e ossigeno secondo la seguente reazione

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Microtubuli e microfilamenti

Microtubuli e microfilamenti hanno un ruolo determinante nella ***formazione del citoscheletro***, che dà forma alla cellula, che favorisce il trasporto intracellulare di sostanze, che garantisce la motilità cellulare, ed è coinvolto nella mitosi e nella meiosi.

I microtubuli sono formati dalla proteina ***tubulina***, i microfilamenti dalla proteina ***actina***.

Tre proteine, la ***miosina***, la ***dinesina*** e la ***chinesina***, sono in grado, mediante un meccanismo non ancora completamente chiarito, di convertire l'energia chimica del legame ricco di energia (legame fosfato ~ P) dell'ATP in energia meccanica.

Il citosol

Nella matrice acquosa senza apparente struttura denominata citosol, sono presenti ribosomi liberi, in grado di effettuare la ***biosintesi delle proteine***, ed enzimi solubili, in grado di catalizzare reazioni di vario genere.

Il linguaggio biochimico del progetto

Lo scopo della terza parte di questo capitolo è di illustrare come il progetto che sta alla base dei sistemi viventi sia basato su un linguaggio biochimico miniaturizzato a livello molecolare.

Nel nucleo cellulare risiede come noto ***il progetto*** della cellula, sotto forma di ***codice genetico***. Negli organismi pluricellulari, questo progetto contiene l'***informazione*** necessaria per realizzare la ***struttura*** e le ***funzioni*** di tutte le singole cellule che si dovranno differenziare dalla

cellula uovo, e contiene l'informazione necessaria per realizzare il ***coordinamento*** delle cellule necessario prima alla costruzione e poi al funzionamento dell'organismo.

In termini di teoria dei sistemi, si può dire più sinteticamente che il progetto contiene la descrizione delle parti che compongono il sistema, e delle relazioni che le interconnettono.

Il codice genetico è scritto nel DNA utilizzando un linguaggio biochimico miniaturizzato a livello molecolare, composto di sole ***quattro lettere***: rispettivamente ***A***, ***G***, ***C*** e ***T***. Ciascuna lettera è *realizzata fisicamente* con una molecola: la lettera A corrisponde alla molecola dell'adenina (base purinica), la lettera G corrisponde alla molecola della guanina (base purinica), la lettera C corrisponde alla molecola della citosina (base pirimidinica), la lettera T corrisponde alla molecola della timina (base pirimidinica).

Le lettere sono organizzate in ***parole*** tutte della stessa lunghezza. Ogni parola è formata da tre lettere. Con quattro lettere combinate in parole delle lunghezza di tre lettere si possono scrivere 4^3 quindi ***64 parole diverse***.[9]

Il supporto fisico delle lettere, quello che consente di mantenere la loro sequenza spaziale, è rappresentato dal polimero di desossiribosio (D) della catena laterale del DNA, mentre le lettere sono rappresentate dalle basi puriniche e pirimidiniche legate covalentemente alla catena laterale

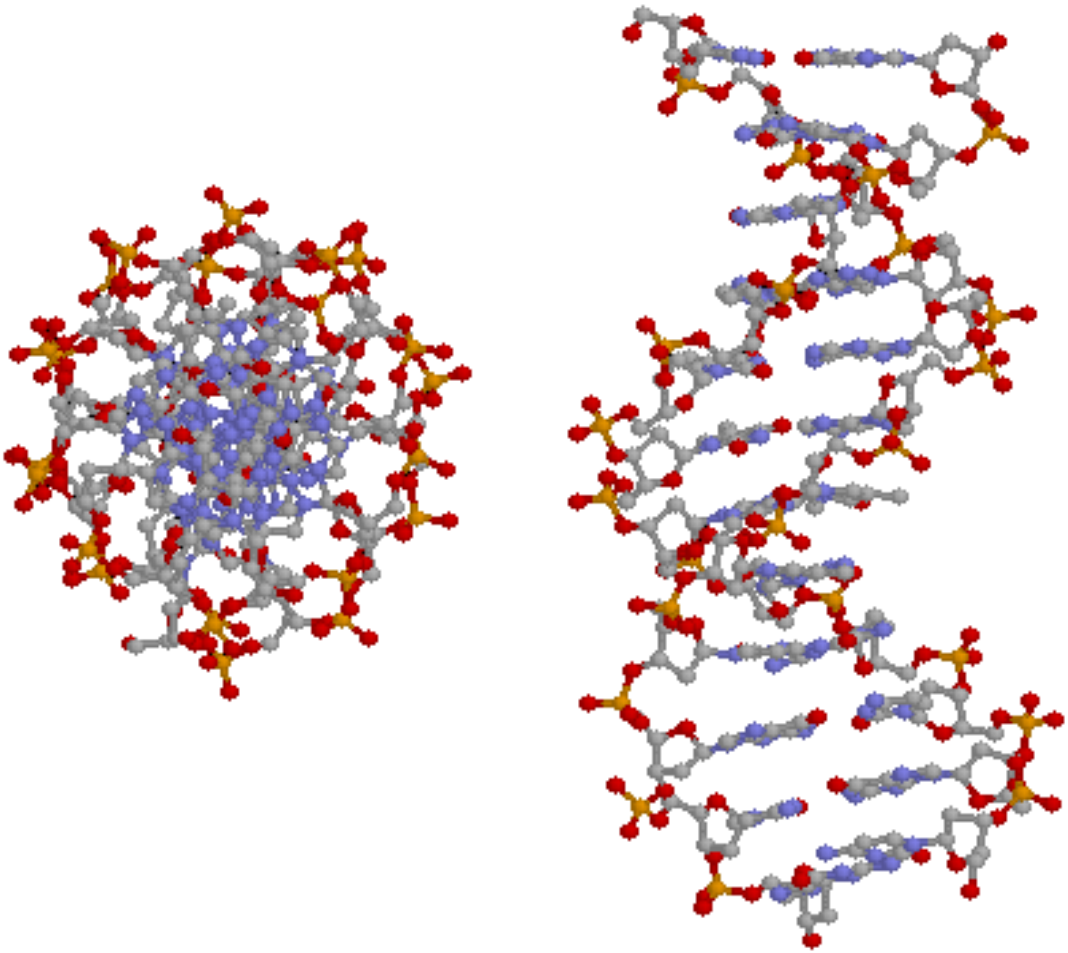
T T T C A A A G C G G A
| | | | | | | | | | | |
-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-

Nel DNA a doppia elica due catene si appaiano secondo le seguenti regole: A si appaia con T, e C si appaia con G. Le basi che si appaiano tra loro sono dette ***basi complementari***. L'appaiamento avviene, come già illustrato, mediante legami idrogeno

[9] *Vale forse la pena di mettere in evidenza le differenze tra il linguaggio comune e il linguaggio del codice genetico. Nel linguaggio comune le lettere sono 26 (includendo le lettere j, k, w, x e y), e la lunghezza della parole varia da una (e) a 26 lettere (precipitevolissimevolmente). Considerando una lunghezza media delle parole di 5 lettere, sono possibili 26^5, ovvero 11.881.376 parole diverse. Il codice genetico è molto simile al codice dai calcolatori, nel quale le lettere impiegate (dette byte) sono solamente 2 (0 e 1, che corrispondono ai due stati possibili di un interruttore: perché è questo in definitiva il substrato fisico che rappresenta le lettere), e le parole sono tutte della stessa lunghezza (8 lettere). In questo modo sono possibili 28 ovvero 256 parole diverse, che rappresentano il vocabolario del linguaggio informatico. In altre parole, a 3 miliardi e mezzo di anni dalla comparsa della vita sulla terra, gli informatici hanno costruito un linguaggio che utilizza gli stessi principi del linguaggio del codice genetico.*

-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-
| | | | | | | | | | | | |
A A A G T T T C G C C T
. . . . . .
. . . . . .
T T T C A A A G C G G A
| | | | | | | | | | | | |
-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-D-

Ne risulta una struttura ad elica, qui rappresentata in sezione trasversale (a sinistra) e in proiezione laterale (a destra)



Il codice genetico umano comprende circa ***tre miliardi di lettere*** e quindi circa ***un miliardo di parole***. Troppe per esser conservate in un'unica macromolecola. In effetti il codice genetico risulta spezzato in segmenti, analogamente a quanto avviene in una ponderosa enciclopedia, che viene spezzata in volumi. Il codice genetico include 46 volumi, che corrispondono ai ***46 cromosomi*** umani. All'interno di ogni volume il testo è suddiviso in *capitoli* di senso compiuto. I capitoli sono circa 100.000, e corrispondono ai circa ***100.000 geni*** del genoma umano. Le analogie e le differenze tra elementi del linguaggio umano, elementi del linguaggio dei calcolatori ed elementi del linguaggio del genoma sono qui illustrate

Elementi	***Linguaggio umano (alfabeto anglosassone)***	***Linguaggio dei calcolatori***	***Linguaggio del genoma***
Lettere	26	2 (0, 1)	4 (A, G, C, T)
Lunghezza parole	Variabile	Fissa (8 lettere)	Fissa (tre lettere)
Numero parole (combinazioni possibili di lettere)	Almeno 11 milioni	2^8 (256)	4^3 (64)
Lunghezza del testo	Illimitata	Illimitata	Un miliardo di parole
Unità di testo	Volume (tomo)	Disco (hard-disk, CD, DVD, nastro magnetico)	Cromosoma
Subunità di testo	Capitolo	File	Gene
Unità di senso compiuto	Parola	Byte	Codone
Unità espressiva	Lettera	Bit	Base

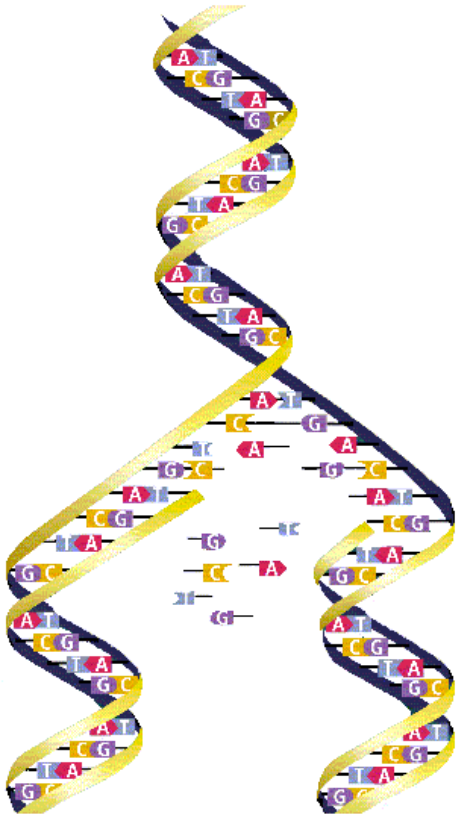
Nella tabella che segue è riportata la sequenza completa di DNA che codifica per l'enzima LDH1 (lattato-deidrogenasi, l'isoenzima 1 presente nel sangue, nota anche come LDH-A)

atggcaactctaaaggatcagctgatttataatcttctaaaggaagaacagacccccag
aataagattacagttgttggggttggtgctgttggcatggcctgtgccatcagtatctta
atgaaggacttggcagatgaacttgctcttgttgatgtcatcgaagacaaattgaaggga
gagatgatggatctccaacatggcagccttttccttagaacaccaaagattgtctctggc
aaagactataatgtaactgcaaactccaagctggtcattatcacggctggggcacgtcag
caagagggagaaagccgtcttaatttggtccagcgtaacgtgaacatatttaaattcatc
attcctaatgttgtaaaatacagcccgaactgcaagttgcttattgtttcaaatccagtg
gatatcttgacctacgtggcttggaagataagtggttttcccaaaaaccgtgttattgga
agtggttgcaatctggattcagcccgattccgttacctgatgggggaaaggctgggagtt

cacccattaagctgtcatgggtgggtccttggggaacatggagattccagtgtgcctgta
tggagtggaatgaatgttgctggtgtctctctgaagactctgcacccagatttagggact
gataaagataaggaacagtggaaagaggttcacaagcaggtggttgagagtgcttatgag
gtgatcaaactcaaaggctacacatcctgggctattggactctctgtagcagatttggca
gagagtataatgaagaatcttaggcgggtgcacccagtttccaccatgattaagggtctt
tacggaataaaggatgatgtcttccttagtgttccttgcattttgggacagaatggaatc
tcagaccttgtgaaggtgactctgacttctgaggaagaggcccgtttgaagaagagtgca
gatacactttgggggatccaaaaggagctgcaattttaa

L'organizzazione del codice genetico risponde a due esigenze, entrambe fondamentali ma antitetiche. Da un lato l'esigenza di garantire l'***invarianza dell'informazione*** contenuta nel progetto, dall'altra l'esigenza di garantire la ***variabilità necessaria per l'evoluzione delle specie***.

L'invarianza dell'informazione



Uno dei meccanismi alla base dei sistemi informativi "fault-tolerant", cioè dei sistemi informativi in grado di assicurare il servizio anche nel caso di crash del sistema (come la rottura improvvisa di un hard-disk) è rappresentato dal mirroring. Questa tecnica provvede ad assicurare in tempo reale una doppia copia dei dati su due diversi supporti (hard-disk). Nel caso di rottura di uno dei due, il sistema è in grado di continuare a funzionare senza interruzioni, utilizzando l'hard-disk rimasto funzionante. Il sistema funziona talmente bene che l'aneddotica dei centri informativi è ormai ricca di casi nei quali ci si è accorti della rottura di uno dei due hard-disk a distanza di giorni o addirittura di settimane.

Il principio del mirroring è utilizzato da tempo immemorabile nei sistemi biologici: il primo meccanismo mediante il quale viene garantita l'invarianza dell'informazione del codice genetico è basato sulla ***ridondanza dell'informazione***

a livello del doppio filamento del DNA, e risulta evidente dal fatto che i due filamenti sono complementari. Ciò significa che conoscendo il codice genetico di uno dei due, il codice genetico dell'altro risulta univocamente determinato. Quindi a tutti gli effetti l'informazione risulta scritta due volte.

Il secondo meccanismo mediante il quale viene garantita l'invarianza dell'informazione è basato sulla fatto che ***il DNA si replica in modo semiconservativo***. In pratica, cioè, un filamento rimane immodificato, e fa da stampo per la biosintesi del filamento complementare, come sopra illustrato

Data perciò una molecola "madre" a doppio filamento di DNA, le due molecole figlie risulteranno costituite ciascuna da un filamento di DNA della molecola madre e da un filamento sintetizzato ex-novo, a questo complementare.

Risulta intuitivo che, se il DNA si replicasse linearmente per intero, si avrebbe una probabilità ben più alta di degrado dell'informazione contenuta nel codice genetico di quella che si ha in effetti.

Il terzo meccanismo mediante il quale viene garantita innanzitutto l'invarianza dell'informazione è fornito dagli ***enzimi di riparazione del DNA***, che intervengono ogniqualvolta la molecola venga danneggiata. Gli enzimi di riparazione del DNA continuano febbrilmente, e ininterrottamente, a riparare una della due catene (danneggiata per esempio dall'attacco dei raggi UV o dei radicali liberi che alterano fisicamente o chimicamente l'informazione codificata) utilizzando come stampo l'altra catena, rimasta integra. Senza questa continua attività di riparazione le cellule accumulerebbero ben presto tali a tante alterazioni degenerative del codice genetico dall'esserne irrimediabilmente distrutte.

Lo *Xeroderma pigmentoso* è un'affezione caratterizzata dalla precoce formazione di tumori cutanei e morte in giovane età. In seguito alla presenza di un difetto genetico che colpisce gli enzimi di riparazione del DNA, i danni provocati al DNA delle cellule della cute da parte dei raggi ultravioletti non possono essere riparati. I soggetti affetti devono vivere al buio.

La variabilità necessaria per l'evoluzione delle specie

Se il DNA fosse trasmesso perfettamente immodificato di generazione in generazione, le specie sarebbero costituite tutte da *cloni* di individui perfettamente identici, fatto che sappiamo non accadere.

La variabilità necessaria per esprimere le differenze tra individui, e che a loro volta consentono l'evoluzione delle specie, è determinata da diversi meccanismi.

Il primo meccanismo è rappresentato dalle ***mutazioni***. Per fenomeni di diverso genere, può accadere che il DNA non venga replicato in modo perfetto, ma che qualche base sia alterata. Se l'alterazione è incompatibile con la vita, la mutazione viene automaticamente eliminata dal genoma, e quindi dal ***pool genico***, cioè dall'insieme di geni della popolazione umana. Altrimenti la mutazione verrà trasmessa, e se l'individuo che la presenta ha un vantaggio di qualche genere nei confronti della ***pressione selettiva dell'ambiente*** tenderà a diffondersi nella popolazione.

Le *emoglobinopatie* sono affezioni genetiche nelle quali si ha la produzione di una emoglobina anomala, che spesso differisce da quella normale per un solo amminoacido, a causa di mutazioni puntiformi del DNA, cioè di mutazioni che coinvolgono una sola base, con cambiamento conseguente di una sola parola (codone). In molti casi l'emoglobina modificata risulta perfettamente funzionante, e l'emoglobina rappresenta quindi semplicemente una ***variante*** presente nella popolazione.

Nell'anemia a cellule falciformi l'emoglobina S anomala presente nei globuli rossi fornisce loro la capacità di resistere molto più di quelli normali all'attacco dei plasmodi della malaria. Il vantaggio selettivo che ne è derivato ha determinato una deriva genica con aumento della frequenza di questo gene nelle popolazioni di razza nera che abitano in luoghi dove la malaria è endemica.

Tra le popolazioni di razza bianca lo stesso identico fenomeno si è verificato per i geni della talassemia, particolarmente diffusi in Sardegna e nel delta del Po, ove a causa della presenza di paludi era endemica la malaria.

Per illustrare gli altri meccanismi, bisogna ricordare che nelle ***cellule somatiche*** dell'individuo adulto sono presenti ***46 cromosomi***: *44 autosomi* (22 di origine materna e 22 di origine paterna) e i *due cromosomi del sesso* (X e X nella donna, X e Y nell'uomo). Il cromosoma X può quindi essere indifferentemente di origine materna o di origine paterna, mentre il cromosoma Y è per definizione di origine paterna.

Il secondo meccanismo che assicura la variabilità necessaria al genoma è basato sul fatto che nelle ***cellule germinali*** (uovo e spermatozoo) sono presenti solamente ***23 cromosomi***, cioè la metà di quelli presenti nelle cellule somatiche. Poiché ciascuno di questi 23 cromosomi può essere indifferentemente, e casualmente, di origina materna o di origine paterna, ecco che due cellule germinali sono difficilmente uguali tra di loro.

Il terzo meccanismo è basato sul particolare tipo di replicazione cellulare, la ***meiosi***, che porta alla formazione delle cellule germinali a 23 cromosomi. Durante la meiosi i cromosomi

omologhi (quello di origine materna e quello di origine paterna di ciascuna coppia di autosomi) si scambiano, mediante un meccanismo noto come crossing-over, parti di DNA. Il risultato è che la variabilità del genoma contenuto nelle cellule germinali aumenta ulteriormente.

Il quarto meccanismo parte dal fatto che nello ***zigote*** (la cellula uovo fecondata dallo spermatozoo), e nelle cellule che ne derivano, di nuovo 23 cromosomi saranno di origine materna e 23 di origine paterna. I 44 autosomi della cellula somatica (a due a due omologhi, ma non uguali), garantiscono a questo punto in ogni nuovo individuo la presenza di due copie dello stesso gene (***alleli***). Gli individui ***omozigoti*** possiedono due copie uguali di alleli, mentre gli individui ***eterozigoti*** possiedono due copie di alleli differenti. Il fatto che uno dei due alleli possa essere ***dominante*** rispetto all'altro (che a sua volta è ***recessivo*** nei suoi confronti), ovvero ***codominante***, aumenta ulteriormente la variabilità individuale, aggiungendo alla variabilità del genotipo la ***variabilità del fenotipo*** (cioè delle modalità con le quali il genotipo si esprime nel singolo individuo).

Ma a questo punto le differenze nel corredo genetico avranno condotto ad un individuo unico nella sua originalità, completamente diverso dai genitori, e completamente nuovo nell'ambito della specie.

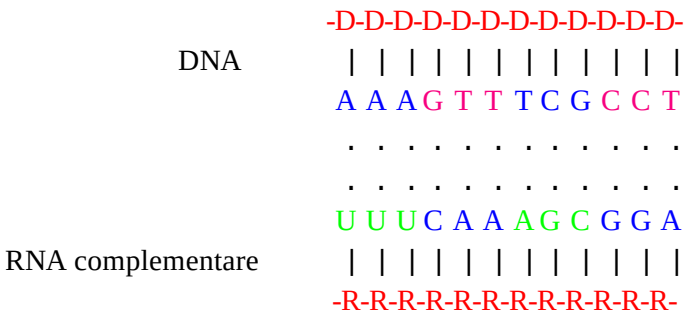
Resta da ultima una considerazione riguardante la ridondanza dell'informazione derivante dal fatto che i 44 autosomi della cellula somatica (a due a due omologhi, ma non uguali), garantiscono in ogni soggetto la presenza di due copie dello stesso gene (***alleli***). Questa ridondanza potrebbe parere eccessiva nei soggetti che hanno due copie perfettamente conservate dello stesso allele (soggetti ***omozigoti***). Ha invece un'estrema importanza come meccanismo conservativo, in quanto in caso di mancanza o danno di una delle due copie di alleli (soggetti ***eterozigoti***), la copia integra è molte volte in grado di svolgere lo stesso la funzione richiesta.

L'abilità del fenomeno vita di muoversi all'interno del dualismo tra conservazione (invarianza) e innovazione (evoluzione) è un evento unico nel suo genere.

La trascrizione e la traduzione del codice genetico

L'esistenza del codice genetico presuppone l'esistenza di meccanismi che consentano di realizzare il progetto in esso contenuto. La prima fase della realizzazione del progetto consiste nella ***trascrizione*** del DNA in RNA.

Innanzitutto viene sintetizzato l'***RNA messaggero*** (o ***mRNA***) a partire dal DNA, come illustrato (ricordando che la timina nell'RNA è sostituita dell'uracile: -R-R-R-R- indica la catena lineare polimerica di ribosio alla quale sono legate le basi)



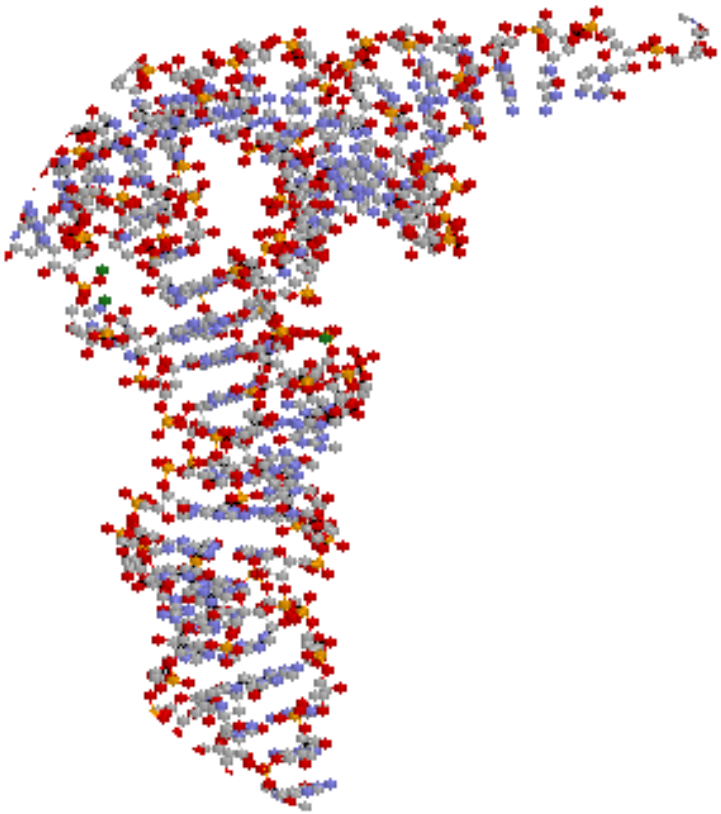
L'RNA messaggero contiene a questo punto la sequenza di lettere che codifica la sequenza di amminoacidi nella proteina che deve essere prodotta. Il codice è qui riassunto

Codone	***Significato***	***Codone***	***Significato***	***Codone***	***Significato***	***Codone***	***Significato***
UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	***STOP***	UGA	***STOP***
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	***STOP***	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met/***START***	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

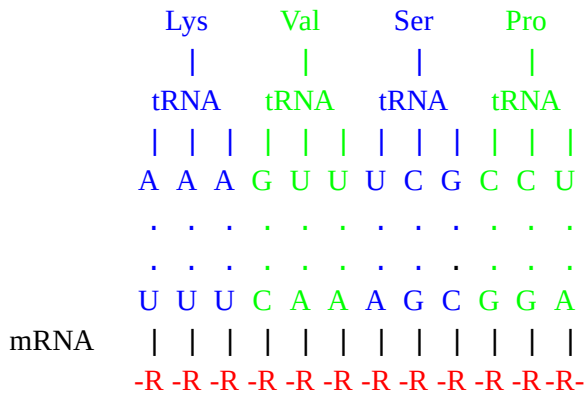
Il codice è ***degenerato***, nel senso che a parte la metionina (AUG) e il triptofano (UGG), ciascun aminoacido è rappresentato da un numero di codoni che va da 2 a 6, ma risulta comunque ***univoco***, nel senso che a un dato codone corrisponde un solo amminoacido.

Il codone AUG, che codifica per la metionina, è anche il codone che codifica l'inizio della catena da sintetizzare (segnale di ***START)***. I codoni UAG, UAA e UGA sono detti ***codoni non-senso***, e danno il segnale di interruzione della sintesi della catena (segnale di ***STOP***).

La successiva fase di ***traduzione*** del codice nella proteina corrispondente prevede l'intervento di un secondo tipo di RNA, l'***RNA di trasporto*** *(o* ***tRNA***) qui rappresentato



Esiste una molecola di tRNA per ciascun amminoacido. Il tRNA possiede due siti importanti: il primo che lega l'amminoacido corrispondente, l'altro provvisto di un anticodone complementare al codone dell'mRNA. A livello dei ribosomi la catena di mRNA viene letta, le molecole di tRNA si allineano all'mRNA riconoscendo i rispettivi anticodoni, e una serie di sistemi enzimatici provvede a generare passo passo la catena proteica



che al termine viene staccata e rimane libera

Lys-Val-Ser-Pro

La regolazione genica

La semplice trascrizione del DNA in RNA e la traduzione di questo in un proteina lascia ovviamente aperto il problema di come le proteine possano a loro volta regolare le complesse funzioni della cellula. Il fenomeno, che non può ovviamente essere spontaneo, è stato compreso quando ci si è resi conto del fatto che, accanto ai geni che producono proteine strutturali (***geni strutturali***), vi sono geni in grado di regolare, sempre mediante la produzione di proteine, l'attività degli altri geni: sono i ***geni regolatori***[10]. I geni regolatori, oltre ad essere i responsabili della differenziazione dei tessuti embrionali e della loro organizzazione spaziale, sono i geni che consentono agli organismi viventi di rispondere ad un mutamento delle condizioni ambientali.

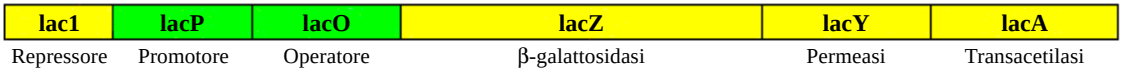
L'insieme del/i gene/i strutturale/i e del gene regolatore che regola una data funzione, e degli ***elementi di controllo***, cioè dei siti del DNA adiacenti al/i gene/i strutturale/i sui quali agisce la proteina regolatrice, viene denominato ***operone***.

Il meccanismo della ***regolazione genica*** viene qui illustrato mediante l'esempio dell'operone del lattosio di *Escherichia coli*. Questo batterio, in assenza di lattosio nel terreno di coltura, non produce l'enzima *β-galattosidasi*, che è necessario per idrolizzare questo disaccari-

[10] *Va da sé che il sequenziamento del genoma umano è solo un primo piccolo passo. La comprensione del genoma umano non sarà completa fino a quando non saranno compresi i meccanismi di azione dei geni regolatori, che appaiono sempre più essere i veri artefici del funzionamento degli organismi biologici.*

de nei due monosaccaridi che lo formano (glucosio e galattosio), che possono quindi essere metabolizzati, con produzione e immagazzinamento sotto forma di ATP dell'energia ricavata dalla ossidazione. Se si aggiunge lattosio al terreno di coltura, E. coli inizia a produrre rapidamente la β-galattosidasi. Si tratta di un evidente fenomeno adattativo "intelligente", che consente di economizzare le risorse, in quanto la sintesi della β-galattosidasi comporta consumo di energia, e sarebbe perfettamente inutile in assenza del lattosio.

L'operone del lattosio include 4 geni, tre *geni strutturali* ***lacZ***, ***lacY***, ***lacA***, e il *gene di controllo* ***lac1***, organizzati nel seguente modo

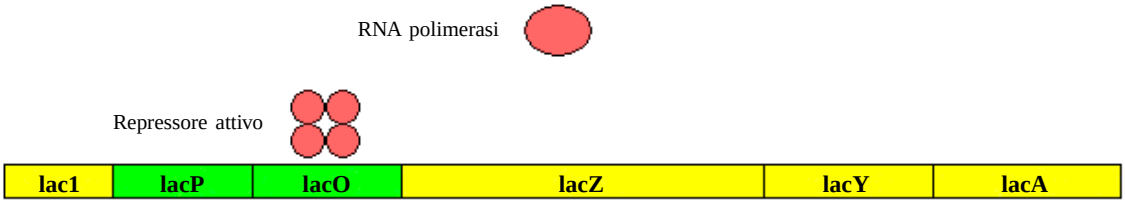


Il *gene lacZ* codifica per la *β-galattosidasi*, un enzima composto di 4 subunità identiche di 1021 amminoacidi ciascuna.

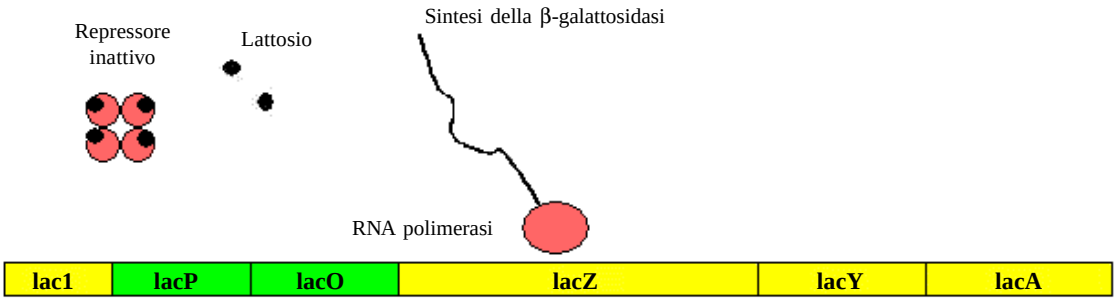
Il *gene lacY* codifica per una *permeasi*, una proteina di 275 amminoacidi che partecipa al trasporto di numerosi zuccheri, incluso il lattosio, attraverso la membrana.

Il *gene lacA* codifica per la *β-galattoside transacetilasi*, un enzima di 275 amminoacidi, che svolge la funzione di eliminazione degli analoghi dei β-galattosidi non metabolizzati.

Il *gene lac1* codifica per una proteina che controlla l'inizio della trascrizione dei tre geni strutturali adiacenti. Viene sintetizzato sotto forma di un monomero di 360 amminoacidi, che polimerizzano a formare un tetramero che rappresenta la forma attiva del *repressore*. Questo ha una spiccata affinità per un specifica sequenza del DNA, denominata ***operatore*** e sopra indicata come ***lacO***. Il legame del repressore con questo segmento di DNA impedisce alla *RNA polimerasi* di legarsi alla sequenza di DNA denominata ***promotore*** (***lacP***) e di iniziare la trascrizione. Operatore e promotore sono quindi gli *elementi di controllo*.



Quando viene aggiunto lattosio (cerchio nero pieno nella figura che segue) al terreno di coltura, le piccole quantità di lattosio che penetrano nella cellula per diffusione e/o pinocitosi, si legano al repressore, e lo inattivano. Il repressore inattivo non è più in grado di rimanere legato all'operatore, l'RNA polimerasi si può legare al promotore, e inizia la produzione di β-galattosidasi.



Il linguaggio biochimico dei processi di comunicazione

Lo scopo della quarta parte di questo capitolo è di illustrare come, oltre al progetto, anche i processi di comunicazione tra i sottosistemi necessari per realizzare le funzioni integrate dell'organismo siano basati su strategie che fanno ricorso a un linguaggio biochimico miniaturizzato a livello molecolare.

Per realizzare un aereo un ingegnere deve operare seguendo una metodologia rigorosa:

- avere a disposizione il ***codice del progetto***, cioè disegni e testi che forniscono le istruzioni operative sul modo in cui si deve procedere, incluse le priorità da dare alla singole fasi della realizzazione. Il codice con cui è scritto il progetto prevede ovviamente l'utilizzo di un linguaggio di cui siano chiare le regole di codifica e di decodifica;
- avere a disposizione i ***materiali di base*** con cui far realizzare le singole parti (duralluminio per le ali, rame per i conduttori elettrici, gomma per lo strato isolante che circonda i conduttori elettrici, eccetera);
- avere a disposizione le ***fonti di energia*** necessarie per realizzare le lavorazioni previste;
- costruire con i materiali di base le singole le ***parti*** necessarie, *sensori* (per esempio un sensore di pressione), *trasduttori* (per esempio un trasduttore che trasformi il segnale proveniente dal sensore di pressione in una corrente elettrica), *effettori* (per esempio i flaps che

consentono di variare la portanza delle ali al variare delle esigenze di volo), *dispositivi meccanici* (per esempio le leve per alzare e abbassare il carrello), *connettori meccanici* (i tiranti che collegano la cloche ai piani di coda dell'aereo), *dispositivi elettrici* (per esempio il radar di bordo), *connettori elettrici* (cavi elettrici), un *calcolatore centrale*, in grado di effettuare delle elaborazioni dei segnali che riceve, e di controllare le funzioni fondamentali dell'aereo;

- definire e realizzare le ***relazioni fisiche tra le parti*** necessarie perché queste possano svolgere le funzioni che risultano dall'integrazione dei singoli eventi ad esse collegati (per esempio la cloche deve essere collegata mediante tiranti ai piani di coda, in modo che spostando la cloche i piani di coda si muovano in modo coerente);
- definire e realizzare le ***relazioni logiche tra le parti***, cioè gli *algoritmi* (*regole*) che definiscono il comportamento reciproco delle singole parti (per esempio l'algoritmo che regola il rapporto di proporzionalità tra la direzione in cui viene mossa la cloche e l'entità dello spostamento, con la direzione e lo spostamento dei piani di coda);
- garantire i ***processi di comunicazione*** tra le singole parti, mediante lo scambio di informazioni reciproche, (per esempio l'altimetro comunica al sistema di pilotaggio automatico l'altezza ogni 3 secondi, il pilota automatico confronta l'altezza con quella prevista, elabora e invia ogni 3 secondi agli alettoni gli impulsi necessari per correggere l'altezza, l'altimetro comunica al sistema di pilotaggio automatico l'altezza, eccetera);
- garantire i ***processi di comunicazione*** del progetto agli assemblatori, in modo che disegni e testi che forniscono le istruzioni operative sul modo in cui si deve procedere, siano tradotti in azioni coerenti;
- garantire i ***processi di comunicazione*** tra gli assemblatori, in modo che questi, mentre lavorano ciascuno sulla propria parte di progetto, risultino anche coordinati tra di loro.

Questa metodologia, dovuta agli ingegneri a partire dalla rivoluzione industriale, cioè due secoli fa, risulta identica a quella che gli esseri viventi hanno "inventato" circa tre miliardi e mezzo di anni fa.

Per realizzare un organismo, una cellula deve operare seguendo una metodologia rigorosa…

Si lascia come esercizio al lettore la possibilità, semplicemente con questo cambiamento nella frase iniziale, e sostituendo opportunamente gli esempi, di utilizzare la stessa identica terminologia per descrivere la realizzazione di un organismo.

Nella cellula il ***codice del progetto*** per la costruzione dell'organismo ha un preciso substrato fisico, ha precise regole di codifica (codoni) e di decodifica (trascrizione e traduzione), e l'informazione relativa risiede nella molecola del DNA.

I ***materiali di base*** sono molecole ormai note: acqua, ioni inorganici, glicidi, lipidi, amminoacidi, basi puriniche e pirimidiniche, vitamine. Mediante essi sono costruite le macromolecole biologiche necessarie (DNA, RNA, enzimi, ormoni, fattori della coagulazione, eccetera).

Le ***fonti di energia*** sono costituite dalle molecole che, in seguito ad ossidazione, liberano energia, che può essere immagazzinata sotto forma di legami ricchi di energia (per esempio nella molecola dell'ATP).

I ***sensori*** sono formati da cellule specializzate, come per esempio i coni e i bastoncelli della retina, nei quali sono presenti molecole fotosensibili, che vengono modificate dall'impatto dei fotoni che costituiscono la radiazione elettromagnetica nello spettro del visibile.

I ***trasduttori*** sono formati anch'essi da cellule specializzate, come le cellule collegate agli otoliti nell'orecchio interno (coclea), che trasformano in un segnale elettrico, poi trasmesso al cervello, gli stiramenti conseguenti all'inerzia meccanica degli otoliti in presenza di movimenti del capo.

Gli ***effettori***, sotto il controllo di opportuni sistemi, sono in grado di ritrasformare l'energia chimica in energia meccanica (vedere la fibra muscolare).

I ***dispositivi meccanici*** (le leve fornite dagli arti) e i ***connettori meccanici*** (tendini) consentono di tradurre in lavoro l'energia meccanica.

I ***dispositivi elettrici*** (per esempio il nodo seno-atriale) consentono di realizzare funzioni come la contrazione del cuore.

I ***connettori elettrici*** (le fibre nervose) consentono di condurre a destinazione i potenziali elettrici (per esempio quelli necessari alla contrazione volontaria della muscolatura striata).

Il ***calcolatore centrale*** (il cervello) integra vari tipi di segnali provenienti dai sensori periferici (occhio, orecchio, naso, sensori del gusto e del tatto), li elabora, e controlla le funzioni fondamentali dell'organismo.

Le ***relazioni fisiche tra le parti*** sono regolate da opportuni geni regolatori, come quelli che, durante l'embriogenesi, dirigono la crescita cellulare in modo che le cellule che evolveranno nei vari organi lo facciano rispettando i rapporti spaziali necessari per dare la forma desiderata all'organismo.

Le ***relazioni logiche tra le parti*** possono essere esemplificate con gli algoritmi che stanno alla base della regolazione della concentrazione del glucosio nel sangue, che mediante una serie di delicati equilibri, legati a continuo scambio di informazioni tra organi ed apparati, consente di mantenerla mediamente compresa tra 60 e 100 milligrammi per decilitro di sangue (mg/dL). Questo ci riconduce all'aspetto dei ***processi di comunicazione***.

Le strategie di comunicazione

Per realizzare i processi di comunicazione, il progetto ha seguito fondamentalmente due strategie. La prima strategia, quella più diffusa e più capillare, prevede di utilizzare la ***mobilità che le molecole manifestano nell'acqua***, sia essa legata al processo fisico di *diffusione passiva* ovvero legata a processi di *trasporto attivo*. L'acqua permea tutti i compartimenti, può essere movimentata (pompa cardiaca e circolazione corporea), ed è in grado di raggiungere qualsiasi punto dell'organismo.

La seconda strategia è quella di seguire una logica di ***cablaggio***, cioè di collegamento mediante fili. In questo caso il limite più evidente è rappresentato dal fatto che non è possibile raggiungere una per una tutte le cellule dell'organismo. Ma data la coesistenza di questa seconda strategia con la prima, la cosa non risulta necessaria. Anche perché certe funzioni in un organismo sono ampiamente delegate (vedere le funzioni del sangue ad esempio), al sistema di governo cablato non si richiede di intervenire nelle funzioni di dettaglio (le cellule emopoietiche del midollo sanno cosa fare). Per questo il sistema di governo cablato si limita ad intervenire sugli aspetti macroscopici dei processi (così, data una riduzione del trasporto dell'ossigeno dovuta per esempio ad una anemia rilevante, come alla permanenza ad alta quota, il sistema cablato si limita ad intervenire sulla frequenza respiratoria, aumentandola).

Acqua, stereospecificità e processi di comunicazione

Nel solvente acquoso le molecole possono muoversi e collidere, realizzando il potenziale di comunicazione necessario a realizzare le funzioni vitali.

> La realizzazione dei processi di comunicazione necessari per mantenere il controllo di un organismo passa attraverso la molecola dell'acqua.

Si pensi solo all'esempio dell'operone del lattosio di E. coli, che richiede la possibilità al lattosio di diffondere nell'ambiente acquoso intracellulare fino a raggiungere i siti specifici presenti sul repressore attivo, trasformandolo nella forma inattiva. In questo modo viene comunicato alla cellula di iniziare a produrre la β-galattosidasi.

In assenza invece di lattosio, il repressore, combinandosi con il sito lacO del DNA, comunica di fatto alla cellula che non è necessario produrre la β-galattosidasi.

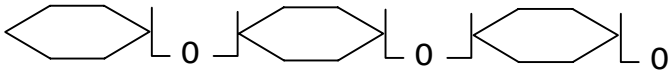
Sia nel caso del repressore attivo che si combina con il sito specifico del DNA, sia nel caso del lattosio che si combina con un sito specifico del repressore attivo, inattivandolo, entra in

gioco il secondo grande interprete dei processi di comunicazione, la ***stereospecificità***. Questo termine viene impiegato per indicare l'esistenza di un *rapporto chiave-serratura* tra due molecole.

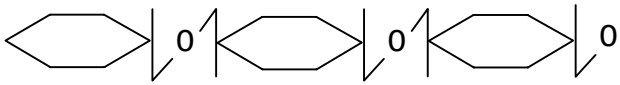
La stereospecificità è il fondamento dei processi di comunicazione, sia intracellulari che tra cellule.

Abbiamo già visto un esempio di stereospecificità a proposito del sito allosterico degli enzimi. Piccole molecole, legandosi al sito allosterico, possono determinare un cambiamento nella configurazione del sito di legame, aumentando o diminuendo l'affinità per il substrato, o nel sito attivo, rendendolo più o meno attivo.

Abbiamo già visto anche che l'impossibilità da parte degli enzimi che scindono i legami α $1\rightarrow4$ tra molecole di glucosio presenti nell'amilosio di scindere i legami β $1\rightarrow4$ tra molecole di glucosio presenti nella cellulosa rappresenta un chiaro esempio della estrema stereospecificità che caratterizza l'azione di certi enzimi.



Amilosio



Cellulosa

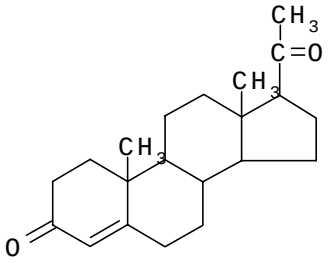
La porzione carboidratica delle glicoproteine delle membrane cellulari, che rappresenta il codice che consente la identificazione delle cellule da parte di altre cellule e l'inibizione da contatto che regola la crescita cellulare, è in grado di interagire stereospecificamente con le molecole che la riconoscono, e quindi comunicare.

Un altro esempio di stereospecificità è quello delle immunoglobuline, che riconoscono l'antigene grazie al fatto di possedere un tratto di molecola che si combina con l'antigene in modo estremamente specifico.

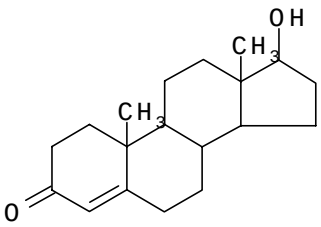
La specificità delle immunoglobuline viene utilizzata in laboratorio nei metodi immunometrici, che consentono di determinare la concentrazione di numerosissime molecole. Gli anticorpi, marcati con opportuni rivelatori, si legano specificamente all'antigene, e il segnale che si ricava è proporzionale alla concentrazione di questo.

Come illustrato in precedenza per l'ormone luteinizzante (luteotropina o LH), gli ormoni proteici si legano in modo specifico a recettori che si trovano sulla superficie delle membrane cellulari, nelle quali non possono penetrare a causa delle loro elevate dimensioni. In seguito al legame dell'ormone con il recettore, quest'ultimo, che attraversa per intero la membrana, attiva sul lato interno di questa una serie di reazioni che comunicano alla cellula il da farsi.

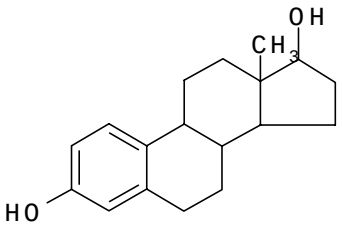
Gli ormoni steroidei, una volta penetrati nella cellula, si legano a recettori specifici. Il legame innesca una serie di reazioni che portano al manifestarsi dell'effetto previsto per lo specifico ormone.



Progesterone



Testosterone



17-beta estradiolo

Le piccole differenze tra le molecole del progesterone, del testosterone e del 17β-estradiolo sono riconosciute in modo molto specifico, tanto che le azioni di questi ormoni risultano essere molto diverse tra loro.

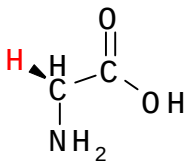
Cablaggi e processi di comunicazione

Il cablaggio è fornito come noto dai collegamenti tra i neuroni nel cervello e negli altri organi del sistema nervoso, e dalle loro diramazioni periferiche (fibre nervose).

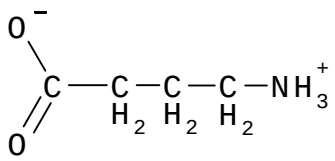
In condizioni normali il glucosio è l'unica fonte energetica per il cervello, che ne utilizza circa 100 grammi al giorno. L'ATP prodotto dall'ossidazione del glucosio viene utilizzato per mantenere una differenza di potenziale di -70 millivolt tra l'interno e l'esterno della cellula

(l'interno è negativo rispetto all'esterno). Questo potenziale viene mantenuto da una pompa che, consumando ATP, pompa il sodio (Na^+) al di fuori della cellula, e pompa il potassio (K^+) all'interno. Quando il potenziale cade al di sotto di un valore soglia (come in seguito ad uno stimolo) i canali del sodio si aprono per circa un millisecondo, e la membrana si depolarizza. La reazione si estende alla zona immediatamente adiacente, che raggiunge il valore soglia per la depolarizzazione, e così via. E l'impulso nervoso può trasmettersi lungo le fibre nervose (assoni). Questo è il principio del cablaggio utilizzato a livello della trasmissione nervosa.

I neurotrasmettitori, sia quelli ad azione inibitoria (glicina e acido gamma-amminobutirrico o GABA),

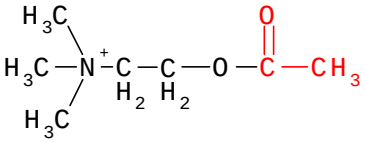


Glicina

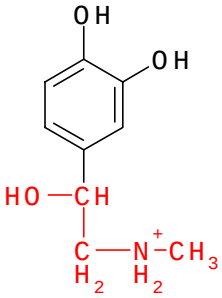


Acido gamma-amminobutirrico (GABA)

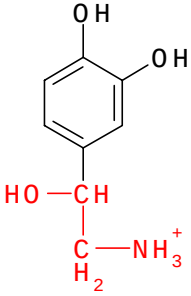
sia quelli ad azione eccitatoria (tra gli altri adrenalina, noradrenalina, acetilcolina, dopammina, 5-idrossitriptammina, istamina, glutammato)



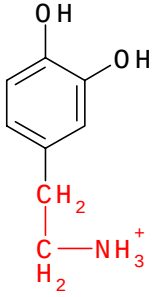
Acetilcolina



Adrenalina



Noradrenalina



Dopamina

sono rilasciati quando il potenziale d'azione raggiunge la membrana presinaptica, e si legano a proteine specifiche situate sulla membrana postsinaptica, consentendo la trasmissione dell'impulso tra un neurone e l'altro.

Nonostante quindi il sistema sia cablato, viene rispettata la premessa di questo paragrafo, e cioè che le funzioni si manifestano per il ricorso a un linguaggio biochimico miniaturizzato a livello molecolare.

Capitolo 2
Settori specialistici del laboratorio clinico

Biochimica clinica *(M. Di Lernia)* 76
Elettroliti, pH e gas del sangue 76
Metaboliti e cataboliti 76
Marcatori del danno cellulare 77
Proteine della fase acuta 77
Marcatori della necrosi cellulare 77
Marcatori tumorali 80
Xenobiotici 81
Monitoraggio terapeutico dei farmaci 81
Droghe d'abuso 83
Indagini tossicologiche 83
Biologia molecolare *(A. Di Blasio, S. Russo)* 85
Diagnostica batteriologica e virologica 85
Genetica molecolare 86
Citogenetica e citogenetica molecolare *(D. Giardino)* 88
Anomalie numeriche dei cromosomi 88
Anomalie strutturali dei cromosomi 89
Citogenetica delle anomalie cromosomiche costituzionali 91
Analisi del cariotipo costituzionale post-natale 92
Analisi del cariotipo costituzionale pre-natale 93
Citogenetica delle anomalie cromosomiche acquisite 94
Mutagenesi 94
Citogenetica oncologica 94
Citogenetica molecolare (FISH) 94
Tecniche di base per l'analisi del cariotipo 96
Ematologia di laboratorio *(D. Lambertenghi)* 99
Struttura e funzioni degli elementi figurati del sangue 99
Eritrociti 99
Leucociti 104
Piastrine 107
Coagulazione 109
La fase vasopiastrinica 109
I fattori della coagulazione 111
Immunoematologia 113
Gruppi sanguigni 114
Test di Coombs 115

Endocrinologia *(A. Dubini)* 117
L'ipotalamo 117
L'ipofisi 117
La tiroide 118
Le paratiroidi 119
I surreni 119
Le ovaie 120
I testicoli 121
Il pancreas endocrino 121
L'apparato iuxtaglomerulare del rene 122
Immunologia di laboratorio *(M. Gerosa, P. Riboldi)* 124
Immunità naturale 124
La fagocitosi 124
Il complemento 125
Immunità acquisita 127
I linfociti 127
Gli anticorpi 129
Autoimmunità 130
Allergologia 132
Microbiologia *(E. Cesana)* 136
Batteriologia 136
Micologia 138
Parassitologia 139
Identificazione di batteri e virus mediante tecniche di biologia molecolare 139
Sierologia infettiva *(G. Lissoni)* 141

I principali settori in cui è articolato un moderno laboratorio clinico sono i seguenti:

- biochimica clinica (inclusi monitoraggio terapeutico dei farmaci e tossicologia);
- biologia molecolare (diagnostica batteriologica e virologica, e genetica molecolare);
- citogenetica e citogenetica molecolare (citogenetica delle anomalie cromosomiche costituzionali, citogenetica delle anomalie cromosomiche acquisite e citogenetica molecolare);
- ematologia;
- endocrinologia;
- immunologia;
- microbiologia (batteriologia, micologia, parassitologia e virologia);
- sierologia infettiva.

La citoistopatologia o anatomia patologica rappresenta un settore a sé stante, date le peculiarità che la contraddistinguono. Per questo motivo non viene specificamente trattata, anche se sia nel testo sia nel CD-ROM sono disponibili le modalità di raccolta e conservazione dei campioni (di estrema utilità nella pratica, data la possibilità che uno specialista prelevi ambulatoriamente materiali per l'esame citologico [come ad esempio un PAP test] o frammenti di tessuto da sottoporre ad analisi istologica, da inviare ad un laboratorio che disponga di questo settore), e l'elenco delle principali analisi eseguite.

Degli altri settori sono qui riportate alcune informazioni essenziali.

Biochimica clinica

(M. Di Lernia)

In questo settore è inclusa la maggior parte delle analisi di più frequente esecuzione, in quanto da un lato legate a patologie che hanno una grande diffusione nella popolazione, dall'altro disponibili, perlomeno le principali, da molto tempo, in quanto potevano essere eseguite anche con le tecniche analitiche semplici di molti decenni fa. Poiché l'affinamento delle tecniche analitiche ha consentito nel tempo, oltre che un enorme miglioramento della qualità delle analisi, anche una notevole estensione dello spettro delle analisi eseguibili, vale la pena di presentarle brevemente.

Elettroliti, pH e gas del sangue

L'equilibrio idro-elettrolitico è uno dei prerequisiti fondamentali per garantire il funzionamento delle cellule e dei tessuti. Fanno parte delle analisi di base di biochimica clinica le determinazioni nel siero degli elettroliti ***sodio***, ***potassio*** e ***cloruro*** (Na^+, K^+, Cl^-) come pure le determinazioni di alcuni ioni che regolano le attività cellulari, come il ***calcio ionizzato*** (Ca^{++}), e lo ione ***fosfato*** ($H_2PO_4^-$ e HPO_4^{--}), che entra in equilibrio con il ***calcio totale*** del siero ad alimentare la costituzione del tessuto osseo, tessuto che, contrariamente a quanto si pensava in passato, è soggetto ad un ricambio (turnover) elevato.

Più specialistiche sono le determinazioni di ***pH*** e dei ***gas*** del sangue ottenute mediante ***emogasanalisi***, legate soprattutto a situazioni di urgenza medica, visto che in condizioni normali l'organismo possiede risorse veramente importanti per regolarne le concentrazioni, che sono come ovvio assolutamente vitali.

Metaboliti e cataboliti

La determinazione di metaboliti e cataboliti riveste un ruolo importante da molto tempo. Si ricordano la determinazione del ***glucosio*** nel siero o nel plasma (la malattia diabetica colpisce nel mondo oltre 300 milioni di persone), e del glucosio nelle urine, delle ***proteine totali*** nel siero e nelle urine (con le quali le proteine possono essere perse in seguito e lesioni renali, principalmente per perdita della frazione principale, l'***albumina***), la determinazione dell'***acido urico*** (legata al disordine del metabolismo delle purine che porta alla gotta), l'***urea*** e la ***creatinina*** nel siero (innalzamento nell'insufficienza renale, essendo peraltro l'urea meno significativa della creatinina, che rappresenta il vero indicatore del grado di insufficienza renale), la ***bilirubina*** nel siero (iperprodotta, e quindi quasi esclusivamente nella forma ***indiretta***, nel caso

di anemie emolitiche, non eliminata, e quindi quasi esclusivamente nella forma ***diretta*** nel caso di ostruzione delle vie biliari, in un rapporto variabile ma più bilanciato nel caso di epatite).

Pensando alle malattie cardiovascolari, che hanno nell'aumento della concentrazione del ***colesterolo*** nel siero un fondamentale fattore di rischio, non vanno dimenticati il ***colesterolo HDL*** e il ***colesterolo LDL***, i ***trigliceridi***, l'***apolipoproteina AI*** e l'***apolipoproteina B***.

Nelle anemie, la patologia ematologica più frequente, la determinazione del ***ferro***, della ***transferrina*** e della ***ferritina*** si complementano tra loro e complementano in modo insostituibile i risultati dell'esame ematologico più importante, l'esame emocromocitometrico (mentre le determinazioni della *capacità totale di legare il ferro* [TIBC] e della *capacità latente di legare il ferro* [LIBC] sono ormai da considerarsi obsolete).

L'***elettroforesi delle proteine del siero*** ha ormai importanza solo come metodo per lo screening delle componenti monoclonali, da confermare mediante ***immunofissazione*** (che ha sostituito l'ormai obsoleta immunoelettroforesi). Per il monitoraggio di una componente monoclonale di rilevante entità (superiore ai 0,3÷0,5 g/dL) viene eseguita l'elettroforesi e quindi la componente viene determinata in base alle proteine totali e alla percentuale che essa rappresenta nel tracciato elettroforetico.

Marcatori del danno cellulare

Sono elencate sotto questa voce molecole proteiche la cui concentrazione nel siero viene alterata dalla presenza di uno stato infiammatorio (***proteine della fase acuta***), molecole (enzimi e altre molecole) liberate in circolo in seguito a necrosi cellulare (***marcatori della necrosi cellulare***) e i ***marcatori tumorali***, che comprendono glicoproteine di superficie delle cellule che, presenti in condizioni normali, aumentano la loro concentrazione nel caso di tumori che le producono in elevata quantità, e altre molecole (enzimi, ormoni, molecole di trasporto, eccetera).

Proteine della fase acuta

Negli stati infiammatori, l'***alfa-1-glicoproteina acida*** e la ***proteina C reattiva*** (PCR) affiancano in modo essenziale la VES consentendo, sulla base delle differenze nelle loro emivite, di differenziare una flogosi acuta da una in via di risoluzione.

Marcatori della necrosi cellulare

Dalle tradizionali ***transaminasi*** (AST o GOT e ALT o GPT), le cui concentrazioni più ele-

vate sono legate a distruzione degli epatociti in seguito ad epatite (virale o tossica), ma che aumentano anche in caso di infarto del miocardio, si va alla ***lattato deidrogenasi*** (LDH) e alla ***creatina chinasi*** (CK), purtroppo poco specifiche, e meglio sostituite nel caso dell'infarto del miocardio dalla CK-MB (isoenzima specifico del muscolo cardiaco), dalla ***mioglobina*** e dalla ***troponina I*** e dalla ***troponina T*** (sostanzialmente equivalenti tra di loro e per questo utilizzabili in alternativa). Tornando all'epatite, agli enzimi va affiancata, come detto in precedenza, la ***bilirubina***; nelle pancreatiti hanno importanza diagnostica l'***alfa-amilasi*** e la ***lipasi***.

Tra le analisi di ***biochimica clinica*** si ricordano:

- ✓ ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ ACIDO VANILMANDELICO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ ALDOLASI, nel siero [S]
- ✓ alfa-1-ANTITRIPSINA, nel siero [S]
- ✓ alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA, nel siero [S]
- ✓ alfa-2-MACROGLOBULINA, nel siero [S]
- ✓ alfa-AMILASI, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ alfa-AMILASI, nel siero [S]
- ✓ ALT (GPT), nel siero [S]
- ✓ AMMONIO, nel plasma [P]
- ✓ AMP-CICLICO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ APOLIPOPROTEINA AI, nel siero [S]
- ✓ APOLIPOPROTEINA B, nel siero [S]
- ✓ AST (GOT), nel siero [S]
- ✓ beta-2-MICROGLOBULINA, nel siero [S]
- ✓ beta-2-MICROGLOBULINA, nelle urine [U]
- ✓ BICARBONATI, nel siero [S]
- ✓ BILIRUBINA TOTALE, nel siero [S]
- ✓ BILIRUBINA FRAZIONATA, nel siero [S]
- ✓ C1-INIBITORE, nel siero [S]
- ✓ CALCIO IONIZZATO, nel siero [S]
- ✓ CALCIO TOTALE, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ CALCIO TOTALE, nel siero [S]
- ✓ CATECOLAMMINE, nel plasma [P]
- ✓ CATECOLAMMINE, nelle urine [U]
- ✓ CERULOPLASMINA, nel siero [S]
- ✓ 17-CHETOSTEROIDI, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ CK-MB, nel siero [S]
- ✓ CLORURO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ CLORURO, nel siero [S]
- ✓ COBALAMMINA (Vitamina B_{12}), nel siero [S]
- ✓ COLESTEROLO HDL, nel siero [S]
- ✓ COLESTEROLO LDL, nel siero [S]
- ✓ COLESTEROLO TOTALE, nel siero [S]
- ✓ COLINESTERASI, nel siero [S]
- ✓ COMPLEMENTO C3, nel siero [S]
- ✓ COMPLEMENTO C4, nel siero [S]
- ✓ CONTA DI ADDIS, nelle urine [U]
- ✓ CREATINA CHINASI, nel siero [S]
- ✓ CREATININA, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ CREATININA, nel siero [S]
- ✓ CREATININA CLEARANCE
- ✓ CRIOGLOBULINE, nel siero [S]
- ✓ ELETTROFORESI PROTEINE, nel siero [S]
- ✓ ELETTROFORESI URINE
- ✓ ELETTROLITI (Na+K+Cl), nelle urine delle 24 ore [dU]

- ✓ EMOGLOBINA GLICATA, nel sangue [Sg]
- ✓ FERRITINA, nel siero [S]
- ✓ FERRO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ FERRO, nel siero [S]
- ✓ alfa-FETOPROTEINA, nel siero [S]
- ✓ alfa-FETOPROTEINA, nel liquido amniotico [LA]
- ✓ FOLATO, nel siero [S]
- ✓ FOSFATASI ACIDA, nel siero [S]
- ✓ FOSFATASI ALCALINA, nel siero [S]
- ✓ FOSFATASI PROSTATICA, nel siero [S]
- ✓ FOSFATO INORGANICO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ FOSFATO INORGANICO, nel siero [S]
- ✓ FRUTTOSAMMINA, nel siero [S]
- ✓ gamma-GT, nel siero [S]
- ✓ GLUCOSIO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ GLUCOSIO, nel plasma [P]
- ✓ GLUCOSIO (curva da carico 6 punti), nel plasma [P]
- ✓ GLUCOSIO (basale e dopo carico), nel plasma [P]
- ✓ HBDH, nel siero [S]
- ✓ 17-IDROSSICORTICOSTEROIDI, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ IDROSSIPROLINA, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ IMMUNOFISSAZIONE, nel siero [S]
- ✓ IMMUNOGLOBULINA A (IgA), nel siero [S]
- ✓ IMMUNOGLOBULINA G (IgG), nel siero [S]
- ✓ IMMUNOGLOBULINA M (IgM), nel siero [S]
- ✓ ISOENZIMI FOSFATASI ALCALINA
- ✓ ISOENZIMI LDH
- ✓ LATTATO DEIDROGENASI, nel siero [S]
- ✓ LEUCINAMMINOPEPTIDASI, nel siero [S]
- ✓ LIPASI, nel siero [S]
- ✓ MAGNESIO TOTALE, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ MAGNESIO TOTALE, nel siero [S]
- ✓ MICROALBUMINURIA, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ OMOCISTEINA, nel siero [S]
- ✓ ORNITINA-CARBAMILTRANSFERASI, nel siero [S]
- ✓ OSSALATI, nelle urine [U]
- ✓ POTASSIO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ POTASSIO, nel siero [S]
- ✓ PROTEINA C REATTIVA, nel siero [S]
- ✓ PROTEINE, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ PROTEINE DI BENCE-JONES, nelle urine [U]
- ✓ PROTEINE TOTALI, nel siero [S]
- ✓ RAME, nel siero [S]
- ✓ SODIO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ SODIO, nel siero [S]
- ✓ TELOPEPTIDE (NTx), nelle urine [U]
- ✓ TEST DI GRAVIDANZA, nelle urine [U]
- ✓ TRANSFERRINA, nel siero [S]
- ✓ TRIGLICERIDI, nel siero [S]
- ✓ URATO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ URATO, nel siero [S]
- ✓ UREA, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ UREA, nel siero [S]
- ✓ UREA CLEARANCE
- ✓ URINE ESAME COMPLETO
- ✓ VITAMINA D (1,25-OH), nel siero [S]
- ✓ VITAMINA D (25-OH), nel siero [S]
- ✓ XILOSIO, nel siero e nelle urine
- ✓ ZINCO, nel plasma [P]

Marcatori tumorali

È noto da tempo che le cellule neoplastiche, a causa dell'alterazione di alcuni processi di crescita e di metabolismo, producono sostanze che si possono ritrovare nel sangue generalmente in concentrazione molto bassa, ma tale da essere rilevabile facilmente con le tecniche immunochimiche attualmente disponibili.

Dal punto di vista delle ***caratteristiche biochimiche-biologiche*** i marcatori tumorali possono essere rappresentati da:

- ***enzimi/isoenzimi*** [fosfatasi acida prostatica (PAP), enolasi neurone-specifica (NSE)], fosfatasi alcalina, antigene prostatico specifico (PSA);
- ***ormoni/subunità ormonali*** [gonadotropina corionica umana (HCG), calcitonina, tireoglobulina (Tg)];
- ***prodotti di differenziazione*** [poliamine, acidi sialici, ferritina, beta-microglobulina];
- ***molecole di adesione*** [antigene carcinoembrionario (CEA)];
- ***molecole di trasporto*** [alfa-fetoproteina (AFP)];
- ***citocheratine*** [antigene polipeptidico tissutale (TPA), TPS, TPAcyk];
- ***mucine*** [marcatori tumorali identificati con anticorpi monoclonali. Sono i marcatori tumorali appartenenti alla serie dei CA (Cancer Antigen CA19.9, CA125, CA15.3, eccetera) caratterizzata da epitopi espressi dalla numerosa famiglia delle mucine ed identificati rispettivamente con l'anticorpo monoclonale NS19, OC125, 115D8 e DF3, eccetera. Le mucine sono particolari glicoproteine che rivestono la superficie degli epiteli costituendo il gel mucoso, responsabile della protezione fisiologica contro microrganismi, sostanze tossiche, agenti fisici e variazioni di pH. Tali sostanze sono state identificate anche sulla superficie di cellule non epiteliali o comunque di cellule non deputate alla secrezione. Tali molecole vengono normalmente secrete dall'epitelio ghiandolare dei tratti gastrointestinale, respiratorio e urogenitale, e costituiscono la componente principale del muco];
- ***marcatori associati a modificazioni genetiche del tumore*** [prodotti di oncogeni e geni oncosoppressori]. Pur rimanendo per ora nell'ambito della ricerca, rappresentano un'importante prospettiva;
- ***cellule tumorali circolanti***. Anche queste, pur rimanendo per ora nell'ambito della ricerca, rappresentano un'importante prospettiva.

Dal punto di vista della ***specificità tessutale*** sono riconoscibili:

- ***marcatori tumorali espressi da un solo tipo tessutale***: tireoglobulina (prodotta dalla tiroide), antigene prostatico specifico (prodotto dalla prostata), gonadotropina corionica umana (prodotta dal sinciziotrofoblasto);

- ➢ ***marcatori tumorali espressione di un dato tipo cellulare, ma non necessariamente dell'organo dove quel tipo cellulare è prevalente***: calcitonina (prodotta dal carcinoma midollare della tiroide e da tumori endocrini del tubo digerente), NSE (prodotta da tumori neuroendocrini, neuroblastoma, tumore di Wilms, melanoma, linfomi, teratomi, timoma);
- ➢ ***marcatori tumorali associati in modo quantitativamente prevalente ad un dato tipo istologico***: SCC, TPA, Cyfra21.1, TPS, TPAcyk associati a carcinomi di tipo squamoso e CEA, CA19.9, CA15.3, MCA, CA50, CA125 associati ad adenocarcinomi.

Alcune analisi di biochimica clinica riguardanti i ***marcatori tumorali*** frequentemente richieste sono:

- ✓ alfa-FETOPROTEINA, nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE CA 125, nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE CA 15.3, nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE CA 19.9 (GICA), nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE PSA, nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE TPA, nel siero [S]
- ✓ CEA, nel siero [S]

Xenobiotici

Sono ***sostanze estranee*** che hanno importanza diagnostica in quanto somministrate a scopo terapeutico (farmaci), soggette ad abuso (droghe) o di importanza tossicologica prevalentemente, se non esclusivamente, nel settore della medicina del lavoro.

Monitoraggio terapeutico dei farmaci

In caso di malattia, la somministrazione dei farmaci viene effettuata applicando sistematicamente regole posologiche specifiche per ciascun farmaco e che il medico curante, sulla base delle conoscenze farmacologiche che gli sono peculiari, è in grado di modulare opportunamente a seconda della gravità della malattie e delle caratteristiche individuali (pazienti in età pediatrica, pazienti con insufficienza renale, pazienti anziani, eccetera).

Tuttavia in alcuni casi, in particolare per alcuni farmaci con un ridotto indice terapeutico, per i quali cioè la dose terapeutica è molto vicina alla dose che incomincia ad esplicare effetti tossici, al fine di raggiungere e mantenere nel sangue del paziente la concentrazione terapeutica appropriata il medico si serve del dosaggio del farmaco nel sangue. Questo è particolarmente vero per i farmaci ***anticonvulsivanti***, utilizzati per il controllo delle crisi epilettiche, per i farmaci ***digitalici*** (che aumentano la forza di contrazione del muscolo cardiaco, e sono quin-

di utilizzati nell'insufficienza cardiaca), per i ***broncodilatatori*** (utilizzati per il controllo delle crisi asmatiche), per alcuni ***antidepressivi*** (tipicamente il litio).

Le principali analisi di biochimica clinica riguardanti il ***monitoraggio terapeutico dei farmaci*** sono:

- ✓ ACIDO VALPROICO, nel siero [S]
- ✓ CARBAMAZEPINA, nel siero [S]
- ✓ DIGOSSINA, nel siero [S]
- ✓ FENITOINA, nel siero [S]
- ✓ FENOBARBITAL, nel siero [S]
- ✓ LITIO, nel siero [S]
- ✓ PRIMIDONE, nel siero [S]
- ✓ TEOFILLINA, nel siero [S]

Nella tabella che segue viene presentata la ***correlazione tra i principali farmaci dosati e i nomi commerciali*** di prodotti che li contengono come principi attivi:

Dal nome commerciale al farmaco		***Dal farmaco al nome commerciale***	
AMINOMAL	TEOFILLINA	CARBAMAZEPINA	TEGRETOL
CARBOLITHIUM IFI	LITIO	DIGOSSINA	CARDIOREG
CARDIOREG	DIGOSSINA	DIGOSSINA	DIGOMAL
COMIZIAL	FENOBARBITAL	DIGOSSINA	EUDIGOX
DEPAKIN	VALPROATO	DIGOSSINA	LANICOR
DIFFUMAL 24	TEOFILLINA	DIGOSSINA	LANOXIN
DIGOMAL	DIGOSSINA	FENITOINA	DINTOINA
DINTOINA	FENITOINA	FENITOINA	METINAL-IDANTOINA
EUDIGOX	DIGOSSINA	FENITOINA	SEDITAL
EUPHYLLINA	TEOFILLINA	FENOBARBITAL	COMIZIAL
EUPHYLONG	TEOFILLINA	FENOBARBITAL	GARDENALE
GARDENALE	FENOBARBITAL	FENOBARBITAL	LUMINALE
LANICOR	DIGOSSINA	FENOBARBITAL	LUMINALETTE
LANOXIN	DIGOSSINA	LITIO	CARBOLITHIUM IFI
LUMINALE	FENOBARBITAL	LITIO	MANIALIT
LUMINALETTE	FENOBARBITAL	LITIO	QUILONUM
MANIALIT	LITIO	PRIMIDONE	MYSOLINE
METINAL IDANTOINA	FENITOINA	TEOFILLINA	AMINOMAL
MYSOLINE	PRIMIDONE	TEOFILLINA	DIFFUMAL 24
QUILONUM	LITIO	TEOFILLINA	EUPHYLLINA
SABIDAL	TEOFILLINA	TEOFILLINA	EUPHYLONG
SEDITAL	FENITOINA	TEOFILLINA	SABIDAL
SLO-PHYLLIN	TEOFILLINA	TEOFILLINA	SLO-PHYLLIN

SOMOFILLINA	TEOFILLINA	TEOFILLINA	SOMOFILLINA
TEFAMIN	TEOFILLINA	TEOFILLINA	TEFAMIN
TEGRETOL	CARBAMAZEPINA	TEOFILLINA	TEONOVA
TEONOVA	TEOFILLINA	TEOFILLINA	THEO-24
THEO-24	TEOFILLINA	TEOFILLINA	THEO-DUR
THEO-DUR	TEOFILLINA	TEOFILLINA	THEOLAIR SR
THEOLAIR SR	TEOFILLINA	VALPROATO	DEPAKIN

Droghe d'abuso

L'importanza del dosaggio delle droghe d'abuso è legata prevalentemente a problemi di tipo medico legale, sia di tipo preventivo, in particolari classi di lavoratori (piloti d'aereo per esempio), sia a posteriori (incidenti stradali, eccetera), ovvero a problemi di pronto soccorso (pazienti in coma).

Oggi è possibile disporre, nei centri avanzati, di metodiche di cromatografia liquida (HPLC) in grado di determinare contemporaneamente su un solo campione di sangue 400÷500 tra droghe e loro metaboliti (***tetraidrocannabinolo***, ***morfina***, ***eroina*** e loro metaboliti, ***benzodiazepine***, ***barbiturici***, allucinogeni come ***LSD*** ed ***ecstasy***, eccetera).

Indagini tossicologiche

Le indagini tossicologiche sono eseguite pressoché esclusivamente in seguito ad esigenze provenienti dalla Medicina del Lavoro. Questa attualmente basa la sua politica di intervento e la sua efficacia piuttosto che sulla misura a posteriori della concentrazione delle sostanze potenzialmente nocive nel sangue e nelle urine dei lavoratori, sulla prevenzione: realizzata sulla base di un'accurata conoscenza dei processi produttivi e sulla messa in atto di tutti i meccanismi di protezione dei lavoratori, inclusa la formazione del lavoratore al rispetto scrupoloso delle procedure messe in atto per la tutela della sua salute. Per questo motivo il numero di analisi che si rendono necessarie risulta enormemente inferiore a quanto ci si aspetterebbe.

Nonostante la valorizzazione dell'aspetto preventivo su quello curativo, in numerosi casi risulta peraltro necessario procedere a valutazioni periodiche della concentrazione di sostanze potenzialmente dannose in soggetti professionalmente esposti, per verificare che le procedure di prevenzione stiano fornendo i risultati attesi in termini di protezione del lavoratore dal rischio.

Le analisi di questo settore sono pertanto specificamente indirizzate alle aziende che devono, per legge, garantire l'efficacia della prevenzione del rischio nei lavoratori professionalmente esposti.

Le principali ***analisi tossicologiche*** del settore di biochimica clinica sono:

- ✓ ACETATO DI ETILENE, nelle urine [U]
- ✓ ACETONE, nel siero [S]
- ✓ ACETONE, nelle urine [U]
- ✓ ACIDO delta-AMMINOLEVULINICO, nel siero [S]
- ✓ ACIDO FENILGLIOSSILICO, nelle urine [U]
- ✓ ACIDO FORMICO, nelle urine [U]
- ✓ ACIDO IPPURICO, nelle urine [U]
- ✓ ACIDO MANDELICO, nelle urine [U]
- ✓ ACIDO METILIPPURICO, nelle urine [U]
- ✓ ACIDO TRICLORACETICO, nelle urine [U]
- ✓ ALA DEIDRASI, nel sangue [Sg]
- ✓ ALCOOL, nelle urine [U]
- ✓ ALCOOL BUTILICO, nel siero [S]
- ✓ ALCOOL ISOBUTILICO, nel siero [S]
- ✓ ALLUMINIO, nel plasma [P]
- ✓ ALLUMINIO, nelle urine [U]
- ✓ AMMINE AROMATICHE, nelle urine [U]
- ✓ ARGENTO, nelle urine [U]
- ✓ CADMIO, nelle urine [U]
- ✓ CARBOSSIEMOGLOBINA, nel sangue [Sg]
- ✓ COBALTO, nelle urine [U]
- ✓ CROMO, nelle urine [U]
- ✓ 2,5 ESANDIONE, nelle urine [U]
- ✓ FENOLI, nelle urine [U]
- ✓ FLUORURO, nelle urine [U]
- ✓ MANGANESE, nel plasma [P]
- ✓ MERCURIO, nelle urine [U]
- ✓ METAEMOGLOBINA, nelle urine [U]
- ✓ METAEMOGLOBINA, nel sangue [Sg]
- ✓ METANOLO, nel siero [S]
- ✓ METILETILCHETONE, nelle urine [U]
- ✓ NICKEL, nel siero [S]
- ✓ NICKEL, nelle urine [U]
- ✓ NITRODERIVATI, nelle urine [U]
- ✓ PIOMBO, nel sangue [Sg]
- ✓ PIOMBO, nelle urine [U]
- ✓ PORFIRINE TOTALI, nelle urine [U]
- ✓ PROTOPORFIRINA IX, nel sangue [Sg]
- ✓ TIOCIANATI, nelle urine [U]
- ✓ TRICLOROETANOLO, nelle urine [U]
- ✓ ZINCOPROTOPORFIRINA, nel sangue [Sg]

Biologia molecolare

(A. Di Blasio, S. Russo)

Negli ultimi anni lo sviluppo delle ricerche nel campo della biologia molecolare ha permesso di introdurre nel laboratorio clinico delle metodologie diagnostiche che si caratterizzano per la loro elevata sensibilità e specificità. Le tecniche molecolari oggi applicabili consentono la rilevazione e lo studio di sequenze specifiche di DNA e di RNA e sono pertanto utilizzabili per evidenziare la presenza di acidi nucleici appartenenti a batteri e virus (***diagnostica batteriologica e virologica***) e per identificare alterazioni geniche (***genetica molecolare***).

Diagnostica batteriologica e virologica

L'identificazione diretta degli ***acidi nucleici di agenti infettanti*** viene eseguita mediante amplificazione (PCR) di una determinata regione del DNA o RNA batterico o virale e successiva ibridazione con una sonda specifica. Utilizzando tali tecniche è possibile:

- discriminare un'infezione in atto da un'infezione pregressa;
- avere una diagnosi più precoce evitando la coltura dell'agente infettante in cellule permissive;
- eliminare l'effetto "finestra" determinato dal tempo necessario alla produzione di anticorpi specifici.

L'elevata sensibilità di queste metodiche consente la determinazione del microrganismo anche in campioni in cui la carica microbica sia molto bassa e, quindi, difficilmente rilevabile con le tecniche tradizionali.

I più comuni esempi di applicazione di queste metodiche nella diagnostica clinica sono nella determinazione di:

- virus dell'epatite C (HCV);
- virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV);
- Chlamydia trachomatis;
- Mycobaterium tubercolosis;
- cytomegalovirus;
- Toxoplasma gondii.

Negli ultimi anni è stata sviluppata una variazione della tecnica di amplificazione che viene indicata come PCR competitiva o PCR real-time che consente di valutare la progressione della malattia e la risposta alla terapia monitorando la carica virale e l'eventuale scomparsa dell'agente infettante.

Per il virus dell'epatite C ed il virus dell'immunodeficienza acquisita è possibile determinare anche la variante allelica.

Il *materiale per l'analisi* è rappresentato da *siero, sangue, urine, espettorato, liquido di lavaggio bronchiale, liquido amniotico, tampone cervicale*.

Genetica molecolare

Le tecniche utilizzate e le strategie di analisi per lo studio delle diverse sindromi genetiche possono essere differenti. In ciascun caso viene comunque applicata la strategia diagnostica più efficace, tenendo conto anche dei risultati di eventuali indagini di citogenetica e/o genetica molecolare eseguite in precedenza.

I più frequenti difetti molecolari che costituiscono i meccanismi patogenetici delle sindromi con maggiore impatto sociale sono:

- mutazioni puntiformi della sequenza genica;
- espansione di triplette nucleotidiche ripetute all'estremità 5' e 3' non tradotta del gene;
- delezioni di varia estensione della sequenza genica;
- alterazione del pattern di metilazione in geni la cui espressione è regolata dal meccanismo dell'imprinting.

Generalmente, tutti questi difetti molecolari danno luogo alla produzione di forme anomale del prodotto proteico o alla sua completa assenza.

Per ciascun difetto genetico sono qui indicate le sindromi più note da esso causate:

- mutazioni puntiformi (*fibrosi cistica, talassemia, emocromatosi*);
- espansione di triplette nucleotidiche (*sindrome di Martin Bell o dell'X fragile, Corea di Huntington, atassia spinocerebellare*);
- delezioni di varia estensione della sequenza genica (*distrofia muscolare di Duchenne, microdelezioni del cromosoma Y*);
- alterazione del pattern di metilazione (*sindrome di Angelman, sindrome di Prader-Willi, sindrome di Beckwith-Wiedemann, sindrome di Silver-Russell*).

È importante sottolineare che l'identificazione del difetto genico ha non solo un significato diagnostico, ma, in alcuni casi, anche preventivo perché consente di confermare o escludere la condizione di portatore nei parenti dei soggetti affetti.

Bisogna tuttavia considerare che le alterazioni sopra riportate non consentono la diagnosi nel 100% dei pazienti perché il difetto molecolare talvolta è diverso da quelli comunemente studiati.

Il *materiale per l'analisi* è rappresentato da DNA estratto da tessuti diversi quali *sangue periferico, liquido amniotico, villi coriali, tessuti abortivi e tessuti solidi*.

Alcune ***analisi di biologia molecolare*** sono qui elencate:

- ✓ ANALISI DI POLIMORFISMI (STR, VNTR)
- ✓ ANALISI DNA CON PCR
- ✓ CHLAMYDIA T. DNA, nelle urine [U]
- ✓ ANALISI DNA E IBRIDIDAZIONE CON SONDA MOLECOLARE
- ✓ ANALISI MOLECOLARE MICROSATELLITI
- ✓ CITOMEGALOVIRUS DNA [S]
- ✓ HCV-GENOTIPO, nel siero [S]
- ✓ HCV-RNA, nel siero [S]
- ✓ HCV-RNA QUANTITATIVO, nel siero [S]
- ✓ HIV DNA, NEL SIERO, [S]
- ✓ MUTAZIONI EMOCROMATOSI, nel sangue [Sg]
- ✓ MUTAZIONI FBROSI CISTICA, nel sangue [Sg]
- ✓ MUTAZIONI GENE UBE3A, nel sangue [Sg]
- ✓ MYCOBACTERIUM T. DNA, nell'escreato

Citogenetica e citogenetica molecolare

(D. Giardino)

Per indagini citogenetiche si intendono le analisi che consentono lo studio dell'assetto cromosomico delle cellule e quindi del ***cariotipo***.

In seguito a mutazioni il cariotipo può modificarsi nel numero o nella morfologia dei cromosomi che lo costituiscono, dando così origine alle ***anomalie numeriche dei cromosomi*** (***aneuploidie***) e alle ***anomalie strutturali dei cromosomi*** rispettivamente. Le anomalie cromosomiche, in base al periodo del ciclo vitale in cui si instaurano, sono distinte in ***anomalie cromosomiche costituzionali***, riscontrabili in tutte le cellule di un individuo (corredo cromosomico omogeneo) o in una percentuale di esse (corredo cromosomico a mosaico) e ***anomalie cromosomiche acquisite*** (limitate ad un tessuto o ad una linea cellulare).

Anomalie numeriche dei cromosomi

Il numero cromosomico presente nei ***gameti*** (cellule germinali), che nella specie umana è di 23 e corrisponde alla metà del numero dei cromosomi presenti nelle cellule somatiche (46), viene definito aploide. Ogni cellula che contiene un numero di cromosomi diverso da un multiplo del corredo aploide viene definita aneuploide. Le aneuploidie più frequentemente osservate nell'uomo sono la monosomia (assenza di un elemento nella coppia di cromosomi omologhi) e la trisomia (presenza di un elemento addizionale in una coppia di cromosomi omologhi). In questi casi si parla di monosomia e trisomia completa, ma si possono verificare anche monosomie/trisomie parziali, per assenza o presenza in triplice copia di singoli segmenti cromosomici.

Le ***monosomie complete*** sono incompatibili con la vita postnatale, l'eccezione è rappresentata dalla monosomia del cromosoma X, associata alla sindrome di Turner. Le trisomie complete di alcuni cromosomi (trisomia 21 o sindrome di Down, trisomia 18 o sindrome di Edwards, trisomia 13 o sindrome di Patau) sono invece compatibili con la vita postnatale, come pure le aneuploidie dei cromosomi sessuali.

L'***aneuploidia*** è causata, nella maggior parte dei casi, da *errori di non-disgiunzione* alla meiosi che causano la formazione di due cellule (gameti) che contengono rispettivamente un cromosoma in più ed uno in meno. La causa della non-disgiunzione non è nota, ma si verifica con maggior frequenza nella meiosi femminile ed aumenta con l'età. Da ciò deriva un aumenta-

to rischio di patologia cromosomica fetale in madri di età superiore a 35 anni. La non-disgiunzione si può verificare anche durante la divisione mitotica, in tal caso si osserverà un cariotipo a mosaico per la presenza nello stesso individuo di cellule a corredo cromosomico diverso.

Le principali ***sindromi da aneuploidia*** sono qui elencate:

Patologia	*Anomalia cromosomica*	*Frequenza alla nascita*
Sindrome di Down	trisomia del cromosoma 21	1 :700
Sindrome di Edwards	trisomia del cromosoma 18	1: 6.000- 8.000
Sindrome di Patau	trisomia del cromosoma 13	1: 10.000
Sindrome di Turner	monosomia del cromosoma X	1: 5.000 femmine
Sindrome di Klinefelter	costituzione dei cromosomi del sesso XXY	1: 1.000 maschi

Anomalie strutturali dei cromosomi

Originano dalla rottura di uno o più cromosomi e, poiché queste rotture possono teoricamente avvenire ovunque nel genoma, il numero di potenziali riarrangiamenti è praticamente infinito. In realtà si è potuto osservare che le rotture non hanno una distribuzione casuale, ma si concentrano in alcune regioni.

I riarrangiamenti strutturali si dividono in due grandi gruppi: *bilanciati* e *sbilanciati*. I primi non danno luogo né a perdita né ad acquisto di materiale genetico e le persone portatrici sono generalmente fenotipicamente normali. Possono essere ereditate per più generazioni senza che siano identificate. Quando ciò avviene è solitamente perché i portatori possono essere infertili, oppure perché nella loro storia riproduttiva si osserva abortività spontanea ripetuta o la nascita di un soggetto clinicamente affetto, che ha ereditato una forma sbilanciata del riarrangiamento.

Le anomalie sbilanciate provocano perdita/acquisto di materiale genetico, perciò vengono identificate in soggetti con fenotipo clinico. I principali tipi di anomalie strutturali sono: delezioni, duplicazioni, inversioni, traslocazioni, cromosomi ad anello, isocromosomi.

Le ***delezioni*** consistono nella perdita di un segmento di un cromosoma, che può essere terminale o interstiziale. Nella tabella sottostante sono elencati alcuni esempi di sindromi causate da delezione.

Sindrome	*Regione deleta*	*Principali caratteristiche cliniche*
Wolf-Hirschhorn	4p	dismorfismi facciali caratteristici, coloboma oculare, labiopalatoschisi, anomalie viscerali, grave ritardo psicomotorio
Cri du Chat	5p	microcefalia, ipertelorismo,micrognazia, grave ritardo mentale
Williams	7q11.23	ritardo mentale, bassa statura, stenosi aortica sopravalvolare, ipercalcemia
Jacobsen	11q24.1-qter	ritardo mentale e di crescita, trigonocefalia, strabismo, difetti cardiaci, trombocitopenia
Angelman	15q11-q13, sul cromosoma di origine materna	ritardo mentale, assenza del linguaggio, microcefalia, convulsioni
Prader-Willi	15q11-q13, sul cromosoma di origine paterna	bassa statura, ritardo mentale, obesità, ipogonadismo, dismorfismi facciali caratteristici, mani e piedi piccoli.
Miller-Dieker	17p13.3	ritardo mentale e di crescita, lissencefalia, microcefalia
Smith-Magenis	17p11.2	ritardo mentale, iperattività, disturbi del sonno, bassa statura, brachicefalia, prognatismo
Di George	22q11.2	ipo-aplasia del timo e delle parotidi, cardiopatie tronco-conali, dismorfismi facciali caratteristici
Kallmann	Xp22.3	ipogonadismo ipogonadotropico, habitus eunucoide, anosmia,

Di solito le sindromi da delezione interessano segmenti relativamente grandi di cromosoma (> 5 Mb = Megabasi). Delezioni di queste dimensioni possono essere identificate con tecniche di citogenetica tradizionale ad alta risoluzione. Delezioni inferiori alle 4 Mb possono essere identificate solo con le più moderne tecniche di citogenetica molecolare (FISH).

Le ***duplicazioni*** consistono nella presenza di due copie di un segmento di cromosoma e pertando costituiscono delle trisomie parziali. Sono più comuni delle delezioni in quanto gli effetti dei loro sbilanciamenti sono meglio tollerati, ma solo in rari casi sono state associate a sindromi cliniche definite (sindrome di Beckwith-Wiedemann, sindrome da duplicazione 3q26.3 che ha fenotipo simile alla Cornelia De Lange). In generale le conseguenze cliniche di una duplicazione sono il ritardo dell'accrescimento, sia pre- che postnatale, ritardo mentale, dismorfismi e malformazioni.

Le ***inversioni*** originano da 2 rotture che avvengono sullo stesso cromosoma e dalla successiva rotazione di 180° del segmento compreso tra i punti di rottura. Le inversioni producono un nuovo allineamento dei geni lungo l'asse di un cromosoma e di solito non si associano ad al-

terazioni cliniche. I portatori di inversione sono però a rischio riproduttivo, in quanto possono produrre gameti sbilanciati.

Le ***traslocazioni reciproche*** originano dalla rottura di due o, raramente, di più cromosomi e dallo scambio reciproco dei segmenti, senza perdita o acquisizione di materiale cromosomico. In questo caso si tratta di traslocazioni bilanciate, che hanno una frequenza di circa 1:1.000 nella popolazione generale. I portatori di traslocazioni bilanciate sono generalmente clinicamente normali, ma a rischio riproduttivo, perché possono produrre gameti sbilanciati.

Le ***traslocazioni Robertsoniane*** hanno una frequenza di 1:1.000 nella popolazione ed originano dalla fusione di due cromosomi acrocentrici, che si sono rotti al centromero od in prossimità di questo. I cromosomi che si originano da questo scambio sono uno dotato di uno o due centromeri ed uno acentrico (cioè senza centromero). Quest'ultimo è instabile e viene perso alla prima divisione cellulare. I portatori di traslocazioni Robertsoniane hanno di conseguenza 45 cromosomi e sono clinicamente normali. Sono anch'essi a rischio riproduttivo potendo produrre gameti sbilanciati.

I ***cromosomi ad anello***, detti anche ***ring***, sono originati dalla rottura di entrambe le braccia di un cromosoma, perdita delle regioni distali alle rotture e riunione delle due estremità in una struttura ad anello, appunto. I ring possono essere sovrannumerari, ed in tal caso il portatore avrà 47 cromosomi e sarà trisomico per le regioni comprese nel ring, oppure possono aver sostituito un cromosoma normale, ed in tal caso il portatore avrà 46 cromosomi ma sarà parzialmente monosomico, per la perdita delle regioni distali alle rotture. Poiché il segmento di cromosoma deleto di solito contiene numerosi geni, le conseguenze cliniche sono generalmente gravi.

Gli ***isocromosomi*** possono avere uno o due centromeri, sono formati da braccia uguali e simmetriche, e implicano la delezione di un braccio del cromosoma da cui originano e la duplicazione dell'altro. Gli isocromosomi più comuni sono quelli dei cromosomi del sesso, in particolare l'isocromosoma per il braccio lungo del cromosoma X, associato alla sindrome di Turner.

Citogenetica delle anomalie cromosomiche costituzionali

Le caratteristiche della patologia cromosomica identificano una serie di situazioni cliniche in cui è raccomandata l'analisi del cariotipo:

- per la conferma diagnostica di sindromi cromosomiche clinicamente accertate [il che consente inoltre di definirne il tipo citogenetico (ad esempio: trisomia libera vs. traslocazione), la sua prognosi (aneuploidia omogenea vs. mosaico) ed il rischio di ricorrenza della patologia nella famiglia];
- per lo screening di portatori di aberrazioni cromosomiche strutturali, correlate al rischio di produrre gameti sbilanciati.

Esempi di sindromi dovute ad anomalie cromosomiche costituzionali, e quindi diagnosticabili con l'analisi citogenetica sia pre-natale che post-natale, sono la *sindrome di Down, la sindrome di Edwards, la sindrome di Patau, la sindrome di Turner, la sindrome di Klinefelter*.

Esistono poi situazioni di "rischio" per anomalie cromosomiche fetali, che rendono giustificata la richiesta di diagnosi cromosomiche prenatali.

Analisi del cariotipo costituzionale post-natale

Le principali indicazioni per l'analisi cromosomica in epoca post-natale sono:

- quadri clinici suggestivi di patologia cromosomica (ad esempio: sindrome di Down);
- presenza di due o più malformazioni congenite non sindromiche;
- ritardo mentale non sindromico;
- bassa statura non sindromica;
- genitali esterni ambigui;
- neonati nati morti con malformazioni o con causa non accertata;
- genitori e familiari di pazienti con patologia cromosomica;
- poliabortività;
- infertilità primaria (ad esempio: maschi con oligospermia o azoospermia, femmine con amenorrea primaria o secondaria);
- controllo del cariotipo in coppie che si sottopongono a fecondazione assistita;
- aborti spontanei (l'analisi del cariotipo su tessuto abortivo consente di inquadrare la natura dell'aborto e di identificare eventuali rischi di ricorrenza).

Le anomalie cromosomiche costituzionali si riscontrano nel:

- 50% degli aborti spontanei;
- 10,40% dei feti malformati e/o con ritardo di crescita;
- 5,10% dei nati morti o delle morti perinatali;
- 0,8% dei neonati;
- 4,8% dei neonati con difetti congeniti gravi;
- 12,33% dei soggetti con ritardo mentale;
- 5% dei maschi infertili (nel 15% degli azoospermici);
- 9% delle amenorree primarie (55% di quelle associate a bassa statura e 73% di quelle con fenotipo turneriano).

Il *materiale per l'analisi* può essere rappresentato da *sangue periferico, biopsie cutanee, villi placentari* e *tessuti fetali*.

Analisi del cariotipo costituzionale pre-natale

L'analisi citogenetica viene effettuata in questo caso durante il primo o il secondo trimestre di gravidanza e permette l'identificazione di eventuali *aberrazioni cromosomiche fetali*. La diagnosi prenatale del corredo cromosomico fetale è indicata quando il rischio di aneuploidie o di sbilanciamenti dei cromosomi è aumentato.

Le principali indicazioni per l'analisi cromosomica in epoca pre-natale sono:

- ➢ età materna superiore a 35 anni;
- ➢ genitori con precedente figlio affetto da aneuploidia;
- ➢ genitori eterozigoti per anomalie cromosomiche bilanciate;
- ➢ evidenza ecografica di malformazioni fetali;
- ➢ alterazioni biochimiche nella madre nel II trimestre (triplo-test positivo).

La *pregressa poliabortività* di coppie con cariotipo normale, l'esposizione di un genitore ad agenti mutageni, nonché considerazioni di natura strettamente psicologica, sono altre indicazioni che indirizzano talvolta la gestante alla diagnosi citogenetica pre-natale. Il *materiale per l'analisi* può essere rappresentato da *liquido amniotico, villi coriali, sangue fetale*.

L'***amniocentesi*** è la tecnica attraverso la quale si esegue, sotto controllo ecografico e per via transaddominale, il prelievo del liquido amniotico (LA). Il rischio di aborto legato all'invasività della tecnica è circa 0.5-1%. Per eseguire lo studio del cariotipo fetale il periodo ottimale per il prelievo è attorno alla 16ª settimana e la quantità di materiale necessaria all'analisi è di circa 15-20 mL. Dopo centrifugazione del campione si separa la parte corpuscolata del LA, che contiene le cellule (amniociti) derivate per desquamazione della membrana amniotica, della cute, delle mucose e dall'apparato renale del feto. Gli amniociti vitali possono essere coltivati in vitro e consentono di ottenere, in circa 8-10 giorni una popolazione di cellule in crescita adeguata per lo studio del cariotipo. La parte non corpuscolata del LA viene utilizzata per il dosaggio dell'α-fetoproteina, che consente il monitoraggio dei difetti del tubo neurale.

Il ***prelievo dei villi coriali*** viene effettuato attorno alla 10ª-11ª settimana di gestazione, sotto controllo ecografico, mediante villocentesi per via transaddominale o transcervicale. Il rischio di aborto associato alla tecnica è di circa 2-3%, di poco superiore al rischio di aborto spontaneo nella stessa epoca gestazionale. Il materiale prelevato con questa tecnica può essere utilizzato direttamente per l'analisi cromosomica, in quanto le cellule del citotrofoblasto si dividono spontaneamente, ottenendo il risultato in circa 48 ore, e/o coltivato in vitro per circa 10-15 giorni. In quest'ultimo caso si analizzano le cellule fetali di origine mesenchimale. Il massimo valore informativo si ottiene integrando il risultato dell'analisi ottenuto dopo analisi diretta e dopo coltura a medio termine. La quantità di materiale necessaria all'allestimento delle colture con entrambe le tecniche è $\geq$10 mg.

Il ***prelievo di sangue fetale*** si ottiene, sempre sotto controllo ecografico, mediante cordocentesi effettuata solitamente tra la 18ª e la 20ª settimana di gestazione, per puntura transaddominale del funicolo a livello dell'inserzione placentare. Il rischio di aborto a seguito del prelievo è circa 2%. La quantità di materiale necessaria per lo studio del cariotipo è di circa 0.5÷1 ml. Le applicazioni di questa tecnica di prelievo sono limitate allo studio del cariotipo fetale in tutti i casi in cui sia necessaria una diagnosi rapida (il risultato si ottiene in circa 48-72 ore) normalmente richiesta per verificare un risultato ambiguo ottenuto su LA.

Citogenetica delle anomalie cromosomiche acquisite

Mutagenesi

L'esposizione ad agenti mutageni può indurre mutazioni geniche e/o cromosomiche. Il danno è spesso dose-dipendente e varia in rapporto all'agente induttore ed alla risposta individuale. L'analisi citogenetica costituisce un parametro indiretto di valutazione delle mutazioni.

Le principali indicazioni per questo tipo di analisi sono costituite da:

- ➢ esposizione ad agenti mutageni chimici (ad esempio agenti alchilanti, idrocarburi policiclici aromatici);
- ➢ esposizione ad agenti mutageni fisici (ad esempio radiazioni ionizzanti).

Il *materiale per l'analisi* è rappresentato dal *sangue periferico*.

Citogenetica oncologica

Le anomalie cromosomiche somatiche sono comunemente identificate nei tessuti tumorali e costituiscono marcatori utili nella diagnosi, nella formulazione di giudizi prognostici, nella scelta di protocolli di terapia e nel follow-up della malattia. L'analisi citogenetica di tumori solidi si delinea come un'indagine di supporto da affiancare sempre all'analisi istopatologica.

Le principali *indicazioni* per questo tipo di analisi sono costituite da:

- ➢ neoplasie ematologiche;
- ➢ tumori solidi.

Il *materiale per l'analisi* è rappresentato da *sangue midollare* e da *biopsie del tessuto tumorale*.

Citogenetica molecolare (FISH)

La tecnica più moderna di analisi dei cromosomi è quella molecolare, definita FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Questa tecnica consente la localizzazione di una qualsiasi se-

quenza di DNA su preparati fissati di cromosomi, di nuclei interfasici e di sezioni di tessuto. Il suo potere di risoluzione è superiore alla citogenetica tradizionale e consente di classificare anomalie di numero o di struttura non definibili attraverso le tecniche di bandeggiamento e di identificare riarrangiamenti criptici, in particolare le microdelezioni (piccole perdite di materiale cromosomico non evidenziabili con tecniche di citogenetica tradizionale). Non si applica di routine per l'analisi del cariotipo, ma solo nei casi in cui un sospetto clinico, oppure emerso dalle indagini tradizionali, suggerisca l'opportunità di un approfondimento.

Le principali *indicazioni* per questo tipo di analisi sono costituite dalla diagnosi citogenetica delle ***sindromi da microdelezione o da microduplicazione*** come la *sindrome di Angelman*, la *sindrome del Cri-du-chat*, la *sindrome di Kallman*, la *sindrome di Di George*, la *sindrome di Miller-Dieker*, la *sindrome di Prader-Willi*, la *sindrome di Smith-Magenis*, la *sindrome di Williams*, la *sindrome di Wolf-Hirschhorn*, ed ancora per:

- la determinazione dell'*origine di cromosomi marcatori* e loro caratterizzazione;
- la caratterizzazione di *riarrangiamenti cromosomici* complessi, sia bilanciati sia sbilanciati;
- la più fine *definizione dei punti di rottura* in riarrangiamenti cromosomici complessi;
- lo *studio delle aneuploidie* su nuclei interfasici in amniociti non coltivati, linfociti del sangue periferico o fetale.

Sono attualmente disponibili le seguenti ***sonde molecolari*** (frammenti di DNA a singola elica, marcato):

- *sonde molecolari alfoidi* ed altre sequenze ripetute, per il riconoscimento specifico dei centromeri di singoli cromosomi;
- *sonde molecolari painting cromosoma specifiche*, per il riconoscimento di un singolo cromosoma;
- *sonde molecolari painting subcromosoma specifiche*, per il riconoscimento di frammenti cromosomici appartenenti al braccio corto od al braccio lungo di un singolo cromosoma;
- *sonde molecolari a singola copia in cosmide*, per indagini mirate al singolo gene o a sindromi definite;
- *sequenze genomiche in YAC* (Yeast Artificial Chromosome) per zone specifiche del genoma umano;
- *sonde subtelomeriche telomero specifiche* che, contenendo sequenze uniche prossimali ai telomeri, possono essere utilizzate per il riconoscimento di riarrangiamenti cromosomici criptici, coinvolgenti tali regioni.

Tutte le sonde possono essere utilizzate singolarmente o in coibridazione, sia per diagnosi prenatali che postnatali. Il *materiale per l'analisi* è rappresentato dai *preparati cromosomici* ottenuti da *colture* di sangue periferico, villi coriali, liquido amniotico, sangue funicolare, sangue midollare, biopsie.

Tecniche di base per l'analisi del cariotipo

Lo studio dei cromosomi attraverso le tecniche di citogenetica convenzionale richiede la disponibilità di cellule vive e capaci di dividersi. Le cellule più utili e facilmente reperibili sono i linfociti del sangue periferico. Si possono comunque ottenere preparati cromosomici da tutti i tessuti in divisione. Possono essere ottenuti ad esempio preparati cromosomici "diretti" da tessuti in attiva proliferazione, quali ad esempio midollo osseo, linfonodi, tumori solidi, villi coriali, o preparati cromosomici dopo coltura a "medio-lungo termine" di fibroblasti o di amniociti (cellule del liquido amniotico). I linfociti del sangue periferico vengono indotti a dividersi con l'uso di sostanze stimolanti, normalmente PHA (fitoemoagglutinina) che è un mitogeno che stimola la trasformazione e la divisione dei linfociti T.

La scelta del campione per l'analisi cromosomica dipende dalla indicazione per cui viene richiesta l'indagine e se richiesta per diagnosi prenatale o postnatale. L'allestimento delle colture, il loro mantenimento, la loro durata variano da tessuto a tessuto, in generale comunque i passaggi previsti sono simili.

Allestimento colture	*Mantenimento delle colture*	*Allestimento preparati*
Cellule vive	Sterilità	Arresto della divisione
Sterilità	37°C	Trattamento ipotonico
Terreno di coltura idoneo	pH 7.2-7.4	Fissaggio
± Mitogeni	Umidità 97% circa	Preparazione dei vetrini
Antibiotici	Durata: dipende dal tessuto	Colorazione/bandeggio

Prerequisito all'analisi cromosomica è, come ricordato, la disponibilità di ***cellule vive***, pertanto la massima cura va prestata sia in fase di prelievo sia in fase di conservazione e trasporto al laboratorio. È fondamentale che i prelievi ed i contenitori siano sterili.

I ***terreni di coltura*** sono liquidi e costituiti da una soluzione salina bilanciata a cui vengono aggiunti vari additivi tra cui sali, glucosio ed un sistema tampone per mantenere il pH adeguato. Molti terreni contengono un indicatore di pH, generalmente rosso fenolo. Ai terreni devono essere aggiunti additivi necessari alla crescita cellulare, quali ad esempio L-Glutammina, siero fetale bovino, antibiotici.

I ***mitogeni*** vengono introdotti nelle sole colture di cellule che non vanno incontro spontaneamente a divisione cellulare, come i linfociti del sangue periferico.

Le ***colture*** vengono allestite in contenitori sterili (capsule, T-flask), generalmente dopo centrifugazione del campione, rappresentato nella maggior parte dei casi da sospensioni cellulari (sangue, midollo, liquido amniotico). Per l'analisi citogenetica viene utilizzato il precipitato

cellulare ed il surnatante viene scartato. Nel caso del liquido amniotico questo può essere usato per test biochimici. Se il tessuto di partenza è invece solido (biopsie, villi coriali) questo viene disgregato mediante trattamento meccanico e/o enzimatico.

Una volta allestite, le colture devono essere lasciate crescere in incubatori che garantiscono il mantenimento di temperatura, umidità, pH ottimali. La durata delle colture dipende dal tessuto, in generale i linfociti vengono coltivati per 72 ore, gli amniociti per 7-10 giorni, i tessuti solidi anche per periodi superiori ai 10-15 giorni. Le colture a medio-lungo termine esigono che il terreno di coltura venga sostituito periodicamente per assicurare la presenza degli elementi nutritivi. Le crescita cellulare viene controllata periodicamente, fino al raggiungimento del numero di cellule necessarie all'analisi. Possono allora essere allestiti i preparati cromosomici, procedura che prevede la raccolta delle cellule in divisione allo stadio di metafase, il trattamento ipotonico che consente la dispersione dei cromosomi, il fissaggio degli stessi, la distribuzione su vetrini da microscopio.

A questo punto possono essere effettuati la ***colorazione*** e l'***esame microscopico*** dei cromosomi. Colorando i vetrini con il colorante fluorescente chinacrina (Quinacrine, da cui bande Q) si ottiene, lungo l'asse principale dei cromosomi, una sequenza di regioni a diversa fluorescenza dette bande cromosomiche, caratteristiche per ogni cromosoma e quindi utilizzate per la classificazione dei cromosomi stessi. Le bande riflettono il diverso grado di condensazione della cromatina. Le regioni Q positive sono ricche in basi A-T, mentre le negative sono ricche in basi C-G. Lo stesso bandeggio viene prodotto colorando con una soluzione di Giemsa vetrini precedentemente trattati con soluzioni saline (bandeggio G). Esistono più tecniche di colorazione differenziale, che possono venire usate specificatamente per la caratterizzazione di determinati riarrangiamenti cromosomici. Il numero delle bande varia in rapporto al grado di condensazione dei cromosomi. Sulle metafasi è di circa 300-450 bande per set aploide, ma può aumentare fino a tre volte sui cromosomi in profase o prometafase. Questi preparati vengono definiti *ad alta risoluzione* e sono utili ad evidenziare anomalie fini di struttura, non riconosciute dalle tecniche tradizionali.

Le principali ***analisi di citogenetica e citogenetica molecolare*** sono:

- ✓ ANALISI CITOGENETICA PER LO STUDIO DELLA FRAGILITÀ CROMOSOMICA
- ✓ ANALISI CITOGENETICA PER LO STUDIO DEGLI SCAMBI TRA CROMATIDI FRATELLI
- ✓ CARIOTIPO SU FIBROBLASTI CUTANEI
- ✓ CARIOTIPO SU LIQUIDO AMNIOTICO
- ✓ CARIOTIPO SU MIDOLLO OSSEO
- ✓ CARIOTIPO SU SANGUE FETALE
- ✓ CARIOTIPO SU SANGUE PERIFERICO

- ✓ CARIOTIPO SU TESSUTO ABORTIVO
- ✓ CARIOTIPO SU VILLI CORIALI
- ✓ CARIOTIPO AD ALTA RISOLUZIONE
- ✓ FISH CON SEQUENZE IN YAC/BAC
- ✓ FISH CON SONDE ALFOIDI E SONDE RIPETUTE
- ✓ FISH CON SONDE IN COSMIDE SINGOLA COPIA
- ✓ FISH CON SONDE PAINTING

Ematologia

(D. Lambertenghi)

L'introduzione dei metodi automatici di analisi cellulare ha radicalmente trasformato la realtà operativa del laboratorio di ematologia. Oggi l'*esame emocromocitometrico* è un vero e proprio profilo ematologico comprendente misurazioni quantitative dirette e indici da esse derivati, che informano sulle proprità dei globuli rossi, dei leucociti e delle piastrine. La conta differenziale dei leucociti viene anch'essa eseguita con tecniche automatiche che associano metodologie di analisi diversificate. Ciò nonostante ancora oggi lo studio dello striscio periferico al microscopio ottico riveste una notevole importanza; infatti numerose malattie che coinvolgono sia la *serie rossa*, sia la *serie bianca* possono in prima istanza essere suggerite da una attenta analisi dello striscio di sangue.

Struttura e funzioni degli elementi figurati del sangue

La scoperta che il sangue è costituito da elementi corpuscolati risale alla seconda metà del 1600, ma si è impiegato molto tempo per arrivare a conoscere la forma e il numero delle cellule circolanti. La necessità di misurare accuratamente il numero delle particelle circolanti in un campione di sangue ha avuto da sempre notevole rilevanza, tanto da indurre uno studio costante della tecnologia strumentale in grado di fornire questo tipo di informazioni.

Eritrociti

L'unità anatomo-funzionale dell'eritropoiesi è definita col termine «eritrone»: questo comprende l'intera popolazione cellulare che va dalle cellule staminali orientate in senso eritroide (*progenitori eritroidi* e *precursori eritroidi*) fino agli eritrociti maturi circolanti.

I *progenitori eritroidi* sono cellule mononucleate identificabili sulla base di test funzionali, cioè in rapporto alla loro capacità di generare in vitro una progenie di cellule eritroidi. La prima tappa è rappresentata dalle CFU-GEMM, cellule progenitrici mieloidi dalle quali hanno origine le serie eritroide, granulocitaria, monocitico-macrofagica e megacariocitaria. La tappa successiva è costituita dalle BFU-E (erythroid burst-forming units), che, in terreno di coltura semisolido, sono in grado di dare origine ad aggregati cellulari i quali dopo 14-16 giorni di incubazione danno origine a macrocolonie (burst) di 30.000-40.000 cellule. Dalle BFE-U

originano le CFU-E (erythroid colony-forming units) che generano in coltura dopo circa 7 giorni aggregati più piccoli costituiti da elementi contenenti emoglobina.

La proliferazione, la maturazione e la differenziazione dei progenitori eritroidi sono stimolate da alcune *citochine* come lo "*stem cell factor*" (*SCF*), l'*interleukina 3* (*IL3*), il *GM-CSF*, l'*interleukina 9* (*IL9*) e l'*eritropoietina*.

cellula staminale pluripotente ⇨ **BFU-E** ⇨ **CFU-E** ⇨ *precursori eritroidi*

⇧ ⇧

GM-CSF EPO

IL 3

L'eritropoietina (EPO) è una glicoproteina dal peso molecolare di 30 Kd. Il gene che codifica la sintesi è localizzato sul cromosoma 7, è composto da circa 3.000 coppie di basi e contiene 5 esoni e 4 introni. Nel feto l'EPO viene prodotta principalmente nel fegato, mentre nell'adulto l'organo deputato alla sintesi dell'80% dell'ormone è il rene. L'apporto di ossigeno ai tessuti è il principale fattore fisiologico che regola la produzione di EPO: in risposta all'ipossia viene attivato un "sensore" a livello renale, la cui conformazione varia a seconda che l'ossigeno sia legato o meno: ne consegue un aumento esponenziale del numero di cellule che producono EPO, e quindi un incremento dell'ormone circolante.

La funzione principale dell'EPO sull'eritropoiesi sembra essere la prevenzione della morte cellulare programmata (apoptosi) a livello delle CFU-E e dei proeritroblasti.

L'ormone favorisce la sopravvivenza di queste cellule, espandendo in tal modo l'eritropoiesi. L'EPO, inoltre, stimola anche la proliferazione e la maturazione cellulare della serie eritrocitaria.

I *precursori eritroidi* derivano dai progenitori eritroidi, proliferano e maturano acquistando emoglobina; essi comprendono una gamma di elementi che vanno dagli eritroblasti ai reticolociti midollari e circolanti. Nell'adulto gli eritroblasti si trovano solo nel midollo osseo; quando la concentrazione di emoglobina supera il 20%, l'eritroblasto cessa di proliferare, espelle il nucleo e diventa reticolocita. Il reticolocita è un eritrocita giovane che mantiene i mitocondri, l'RNA messaggero e ribosomiale per la sintesi dell'emoglobina. Dopo 2÷4 giorni le strutture citoplasmatiche si perdono e resta l'eritrocita maturo, che ha una vita di 120 giorni.

Le caratteristiche dei ***precursori eritroidi*** e del ***pool maturativo*** sono riassunte nella seguente tabella:

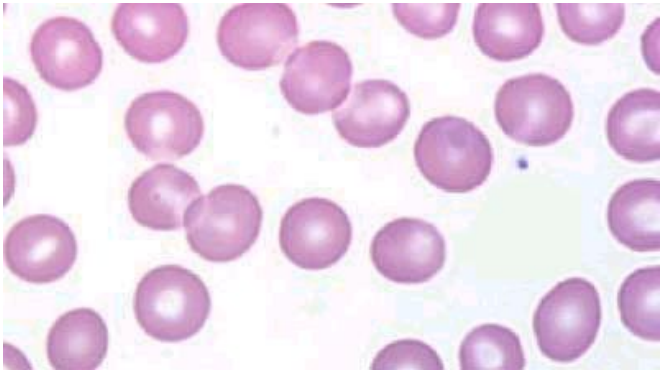
Cellula	*Diametro*	*Nucleo*	*Nucleoli*	*Citoplasma*
PRO-ERITROBLASTO	20÷25 μm	rotondo, aumento rapporto N/C	1 o 2	Intensamente basofilo; zona chiara perinucleare (arcoplasma) che corrisponde all'apparato del Golgi
ERITROBLASTO BASOFILO	16÷18 μm	Rotondo	assenti	Intensamente basofilo, presenza di arcoplasma
ERITROBLASTO POLICROMATOFILO	9÷12 μm	Rotondo	assenti	Diminuzione della basofilia per aumento del contenuto di emoglobina
ERITROBLASTO ORTOCROMATICO	8÷10 μm	Rotondo, eccentrico, in via di espulsione	assenti	Colore quasi identico a quello degli eritrociti
RETICOLOCITO	7÷8 μm	Assente		Piccola quota di sostanza basofila che si colora con blu di cresile.

Le caratteristiche dell'***eritrocita*** sono le seguenti:

Cellula priva di nucleo, a forma di disco biconcavo, dimensioni 8x2,5 μm in numero variabile da 4 a 5,5 milioni/μL di sangue.
Produzione ⇨ Midollo osseo. La produzione è regolata dall'EPO, prodotta dal rene in funzione del grado di ipossia.
Sangue ⇨ tutti gli eritrociti circolano liberamente. Vita 120 giorni.
Struttura ⇨ membrana lipoproteica plastica deformabile. Il citoplasma contiene emoglobina in soluzione.
Metabolismo ⇨ utilizzazione ATP (prodotto per glicolisi anaerobia) per il mantenimento della membrana e del gradiente osmotico Na^+K^+. Protezione dell'emoglobina dall'ossidazione permanente (metaemoglobina-reduttasi) e dalla denaturazione ossidativa (shunt esosomonofosfati e glutatione).
Funzione ⇨ respirazione tessutale (trasporto O_2 e CO_2).

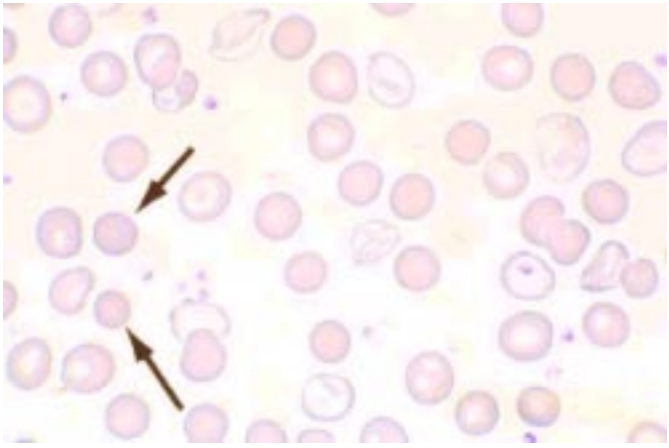
Il globulo rosso maturo è un disco biconcavo con diametro medio di 8 micrometri (μm), spessore di 2,5 μm ed un volume di 90 femtolitri (fL) [nella figura eritrociti normali, colorazione May Grünwald-Giemsa].

Priva di nucleo e di mitocondri, la cellula ha perduto la capacità di sintetizzare proteine. Il suo metabolismo è sufficiente a provvedere alle necessità durante i 4 mesi di vita in circolo.



L'eritrocita anucleato è flessibile e capace di estreme modificazioni di forma e l'emoglobina provvede efficientemente al trasporto ed alla cessione dell'ossigeno. L'appropriata funzione e durata di vita dell'eritrocita dipendono dalle relazioni tra la *membrana* ed il *metabolismo cellulare*.

La *membrana* è costituita da due strati molecolari che consistono di molecole di fosfolipidi compattamente affiancate, con estremità polari rivolte verso la fase acquosa da entrambi i lati. La superficie esterna è relativamente ricca di fosfatidilcolina, sfingomielina e glicolipidi; la porzione interna della membrana contiene prevalentemente fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositolo. Alterazioni della forma del globulo rosso possono essere la conseguenza di alterazioni dei lipidi plasmatici e capaci di influenzare la sopravvivenza cellulare. Le proteine interne, principalmente la glicoforina A, attraversano lo strato lipidico bimolecolare e sono in contatto con la fase acquosa ai due lati della membrana. Circa il 60% della molecola di glicoforina A è costituito da carboidrati e da catene oligosaccaridiche. Le catene sono attaccate all'estremità esterna della molecola e servono a fornire una carica negativa alla superficie del globulo rosso, caratteristica importante per evitare l'agglutinazione delle cellule. Le proteine periferiche formano una trama reticolare sulla superficie interna della membrana. Due sono i componenti più abbondanti, la spectrina e l'actina. La forma biconcava della cellula rossa e molte delle sue proprietà meccaniche possono proprio essere determinate dalle proteine periferiche di membrana. Si ritiene che un'anomalia di queste proteine sia responsabile delle deformazioni cellulari che si osservano nei pazienti con ellissocitosi ereditaria e sferocitosi (nella figura qui a destra sferociti. La presenza di sferociti è spesso indice di *sferocitosi ereditaria* o *anemia emolitica*).



Il *metabolismo*, poiché il globulo rosso è anucleato, è del tutto peculiare. In assenza di mitocondri, è assai scarsa la capacità di metabolizzare acidi grassi e aminoacidi. L'energia è generata pressoché esclusivamente attraverso la degradazione del glucosio. È opportuno suddividere questa attività metabolica nella principale via anaerobia ed altre vie secondarie. La via non-ossidativa o anaerobia (***ciclo di Embden-Meyerhof***) è responsabile dell'utilizzo di circa il 90% del glucosio cellulare. Nella conversione del glucosio a lattato, il guadagno netto di molecole di ATP fornisce i fosfati ad alta energia necessari per il mantenimento della forma e della flessibilità cellulare, per preservare i lipidi di membrana e per rifornire di energia le pompe metaboliche che controllano gli scambi di sodio, potassio e calcio.

Quando l'ATP è deficitario a causa dei difetti acquisiti o ereditari della glicolisi, la sopravvivenza della cellula è drasticamente ridotta e ne consegue un'anemia emolitica.

Il ciclo di Embden-Meyerhof ha un ruolo essenziale nel mantenere i piridin-nucleotidi in forma ridotta per provvedere alla riduzione della metaemoglobina (*via della emoglobina-reduttasi*) ed alla sintesi del 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (*ciclo di Rappaport-Luebering*). La quantità di 2,3-DPG prodotta dipende dall'attività della glicolisi, determinata dall'enzima fosfofruttochinasi. Questo enzima è sensibile al pH: esso aumenta l'entità della glicolisi con l'aumentare del pH e ne diminuisce l'attività con la diminuzione del pH. Il significato del 2,3-DPG sta nella sua capacità di modulare la liberazione dell'ossigeno a seconda delle esigenze dei tessuti. Questa risposta è attivata da una variazione della proporzione di ossigeno estratta dai tessuti; ogni volta che il sangue venoso contiene un'aumentata concentrazione di emoglobina deossigenata, la glicolisi viene stimolata ad una maggiore produzione di DPG. Ciò diminuisce l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno consentendo una maggiore liberazione di questo per una data tensione di ossigeno nei tessuti.

Altra via metabolica è lo ***shunt degli esoso-monofosfati*** (*via del fosfogluconato*). Questo sistema energetico accoppia il metabolismo ossidativo con la riduzione del piridin-nucleotide e del glutatione proteggendo il globulo rosso da ossidanti ambientali. Quando questa via metabolica è funzionalmente deficitaria o quando ossidanti ambientali ne eccedono la capacità riducente, si verifica una denaturazione della globina e l'emoglobina forma un precipitato noto come "Corpi di Heinz" lungo la superficie interna della membrana eritrocitaria. Questa forma di distruzione ossidativa del globulo rosso si verifica solitamente nei pazienti con deficienza della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (legata al cromosoma X), l'enzima principale della via metabolica del fosfogluconato.

Leucociti

Granulociti e monociti derivano da un unico progenitore comune *CFU-GM* (*Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte*) che è in grado di dare origine, in coltura, a colonie granulocitarie e macrofagiche.

La granulocitopoiesi ha luogo nel midollo osseo: la sua base citomorfologica è costituita da una serie di compartimenti cellulari, ossia un insieme di cellule con caratteristiche morfologiche comuni.

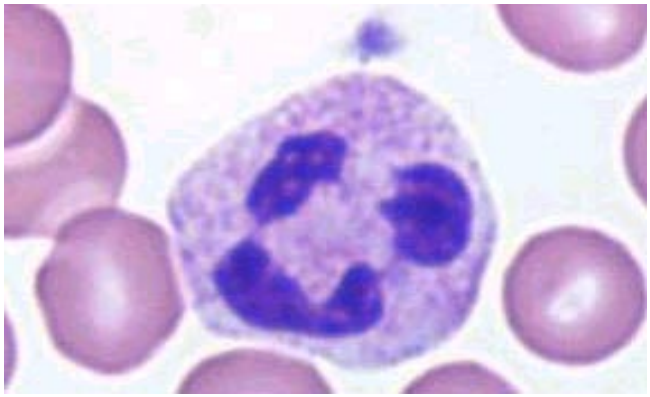
Le caratteristiche della ***granulo-monocitopoiesi*** sono:

Cellula	***Diametro***	***Nucleo***	***Nucleoli***	***Citoplasma***
MIELOBLASTO	20÷25 μm	Rotondo	Da 2 a 5	Da debolmente basofilo a intensamente basofilo. Non si apprezzano granulazioni, o queste sono molto rare
PROMIELOCITA	20÷30 μm	Ovalare	Da 1 a 2	Lievemente basofilo. Numerose granulazioni azurofile: compaiono le granulazioni specifiche.
MIELOCITO	12÷20 μm	Rotondo o ovalare	1 o 2	Debolmente acidofilo. Sono presenti fini granulazioni specifiche molto numerose, più rare le granulazioni azurofile.
METAMIELOCITO	12÷18 μm	Reniforme	Assenti	Intermedie fra quelle del mielocito e del granulocito
GRANULOCITO Neutrofilo, Eosinofilo e Basofilo	12÷20 μm	A bastoncello	Assenti	Acidofilo, con fini granulazioni specifiche, rare granulazioni azurofile.

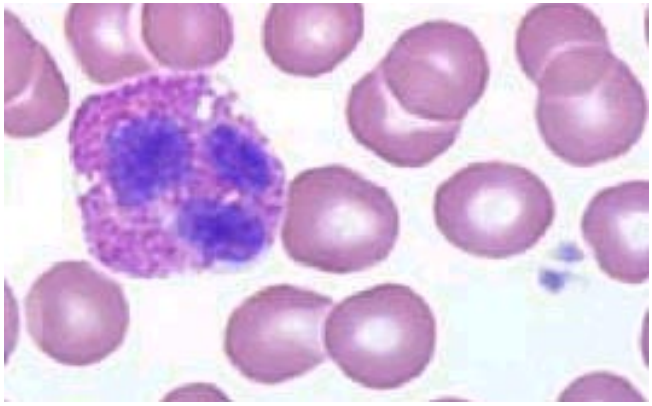
Nel sangue circolano in media $70 \cdot 10^7$ ***granulociti neutrofili***/kg di peso corporeo. Il tempo medio di permanenza in circolo dei granulociti è di 9-10 ore. Una volta che essi hanno lasciato il sangue e sono entrati nei tessuti per svolgervi le loro funzioni, non fanno più ritorno al sangue.

Quindi ogni giorno sono rinnovati in media $1{,}6 \cdot 10^9$ granulociti/Kg di peso corporeo, il che corrisponde, in un uomo di 70 Kg, a più di 110 miliardi.

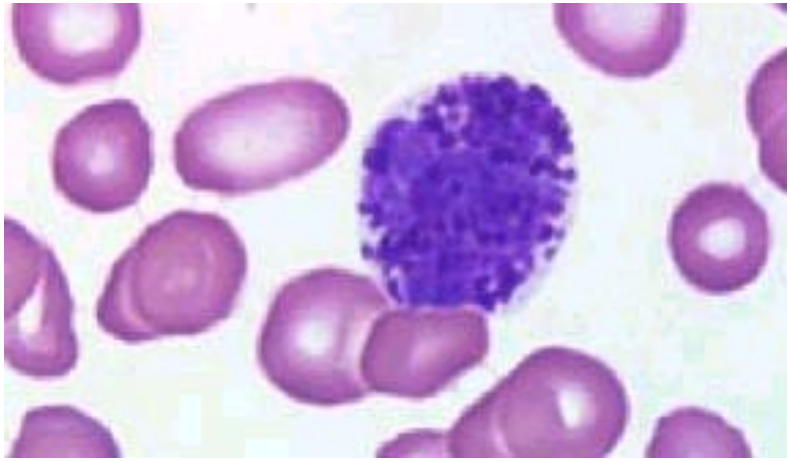
L'organo che produce i granulociti neutrofili è il midollo osseo, dove le cellule staminali proliferano e si differenziano in elementi morfologicamente riconoscibili chiamati mieloblasti. Dai mieloblasti, attraverso una serie di divisioni cellulari e di processi maturativi, si producono i mielociti, quindi i metamielociti, che non sono più capaci di dividersi e maturano a granulociti, i quali hanno inizialmente un nucleo a bastoncello e poi multilobulato (nell'immagine a destra leucocita polimorfonucleato nel sangue).



La produzione e la cinetica dei ***granulociti eosinofili*** sono simili a quelle dei granulociti neutrofili. I granulociti eosinofili possiedono le stesse caratteristiche funzionali e metaboliche dei neutrofili, ma la loro capacità di "killing" è inferiore e il loro ruolo nella difesa dalle infezioni è del tutto secondario. Gli eosinofili sono coinvolti in reazioni immunitarie evocate da proteine estranee e da complessi antigene-anticorpo capaci di fissare il complemento. Gli eosinofili sono attratti, per chemiotassi, dalla fibrina e dagli enzimi proteolitici che promuovono la formazione di fibrina e istamina, della quale modulano gli effetti. Il ruolo fisiologico degli eosinofili non è chiaro; in patologia l'eosinofilia di solito accompagna le malattie allergiche e le malattie infiammatorie su base immune o infettiva.

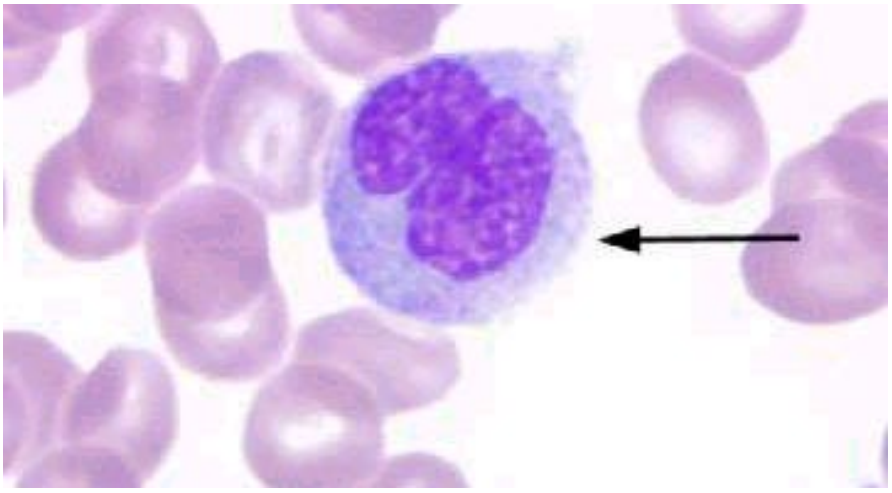


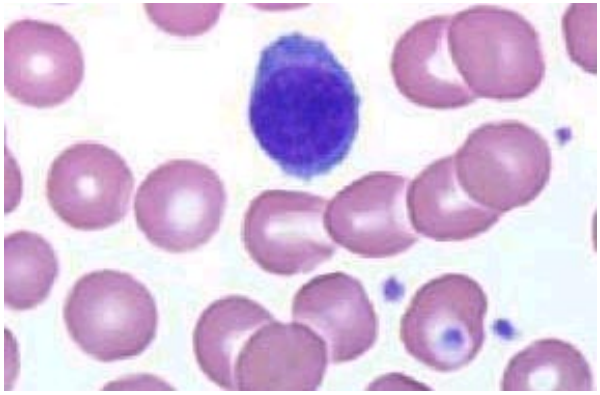
I ***granulociti basofili***, che sono generalmente meno dell'1% dei leucociti circolanti, sono prodotti nel midollo in modo analogo agli altri granulociti. Dal sangue migrano ai tessuti, dove svolgono funzioni simili a quelle dei mastociti tissutali, che originano anch'essi da cellule staminali midollari orientate in senso granulo-monocitico. Le funzioni dei basofili sono principalmente secretorie: in risposta a diversi stimoli (meccanici, fisici e immunologici) essi liberano istamina. Gli anticorpi reaginici (IgE), si legano tramite Fc a recettori specifici della



membrana del basofilo innescando un meccanismo di degranulazione con liberazione di istamina.

La *monocitopoiesi* ha sede nel midollo osseo dove a partire dalle CFU-GM si formano i monoblasti, i promonociti e infine i ***monociti*** che lasciano il midollo, circolano nel sangue (nella figura in basso monocita nel sangue) e vanno a popolare i vari tessuti. In genere le cellule del tessuto monocito-macrofagico che popolano i tessuti possono essere distinte in tre categorie. La prima è costituita da istiociti deputati a riconoscere, sequestrare e digerire materiali estranei, cellule senescenti, complessi antigene-anticorpo, eccetera, con meccanismi analoghi a quelli dei granulociti neutrofili. La seconda è costituita da macrofagi con attività altamente e variamente specializzata in funzione della loro collocazione anatomica, come ad esempio le cellule di Kuppfer del fegato, i macrofagi della polpa rossa della milza, i macrofagi degli isolotti eritroblastici del midollo. La terza è costituita da monociti con il compito di riconoscimento degli antigeni e nella dinamica della risposta immunitaria. Sono le cosiddette "antigen presenting cells" dei linfonodi e della cute (cellule di Langherans del derma).





I ***linfociti*** (immagine a destra) sono gli elementi circolanti responsabili della risposta immunitaria sia cellulo-mediata che umorale. Nel corso dei primi anni di vita i linfociti costituiscono il 30-70% del totale dei globuli bianchi presenti nel sangue periferico ed il 10-30% degli elementi cellulari midollari. Negli adulti la percentuale varia tra il 20 e il 40%; il valore assoluto in termini numerici nel soggetto sano oscilla tra 1.500 e 4.000 unità/μL.

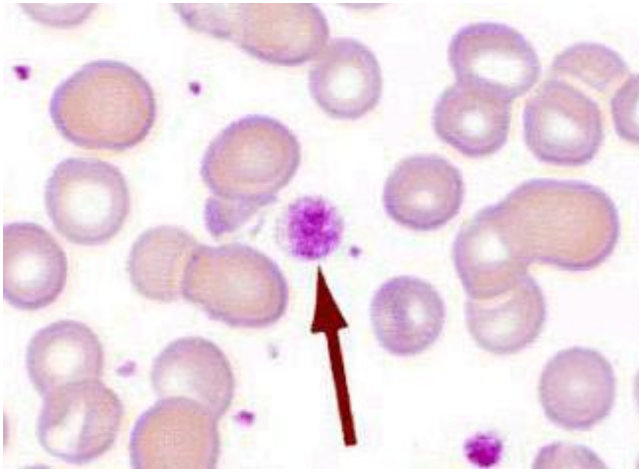
In base al tipo di risposta immunitaria cui sono deputati si possono distinguere in linfociti T, B e Null. In condizioni di non attivazione, la differenziazione morfologica tra queste popolazioni non è possibile ed è necessario ricorrere alla tipizzazione degli antigeni di membrana presenti sulla membrana citoplasmatica mediante tecniche di *citofluorimetria*. I T-linfociti, timo-dipendenti, sono responsabili dell'immunità di tipo cellulare. Queste cellule vengono a contatto con l'ospite non desiderato, *non-self*, inibendone la crescita e uccidendo gli elementi estranei. Le cellule T, insieme con altre cellule del sistema immunitario, aiutano la difesa dell'organismo contro infezioni virali o di altro tipo. Intervengono nella distruzione di elementi cellulari che siano andati incontro a mutazione spontanea. I B-linfociti sono responsabili dei meccanismi dell'immunità umorale. Alcuni linfociti della linea B, dopo stimolazione da antigene, rispondono trasformandosi in plasmacellule. Esse producono e immettono nel sangue vari tipi di immunoglobuline, dette anche anticorpi. I linfociti che non mostrano caratteristiche né di tipo B né di tipo T, sono definiti "Null". In tutti gli schemi biologici ci sono settori di regolazione che aiutano la produzione, la crescita e lo sviluppo cellulare ed altri fattori che hanno invece funzione inibitoria, in modo da mantenere un equilibrio del sistema. I linfociti T che aiutano la funzione delle cellule B e delle plasmacellule sono detti "helper". Altre cellule T capaci di deprimere l'attività delle reazioni immunitarie sono definite "suppressor". La determinazione della percentuale delle cellule T "helper" e "suppressor" è indice importante dell'integrità del sistema immunitario di un individuo.

Piastrine

Le *piastrine* sono frammenti di cellule (i megacariociti) privi di nucleo. Esse circolano in numero variabile da 150.000 a 400.000/μL. Le piastrine si distribuiscono nel circolo (70%) e nella milza (30%) e sono fra loro in continuo interscambio. Le piastrine circolanti in parte

vengono consumate durante il processo emostatico e in parte muoiono per senescenza.

Conoscendo il numero delle piastrine circolanti e la durata della sopravvivenza piastrinica, introducendo un fattore di correzione che tenga conto del numero di piastrine intrappolate nella milza, è possibile calcolare la quantità di piastrine prodotte e distrutte giornalmente, il "turnover" piastrinico.



Un soggetto normale con 300.000 piastrine/μL, sopravvivenza piastrinica di 10 giorni e recupero piastrinico del 60%, ha un turnover di 37.500 piastrine/μL/die.

Contrariamente a quanto accade per la granulocitopoiesi, non esiste un pool piastrinico di riserva a livello midollare; i meccanismi di autoregolazione fanno si che ad una piastrinopenia da aumentata distruzione periferica, segua inizialmente un aumento del numero e del volume medio dei megacariociti e, successivamente, un aumento della produzione piastrinica fino ad un massimo di 6-8 volte il valore normale. Pertanto in caso di piastrinopenia secondaria a patologia midollare, si assiste ad una diminuzione del volume dei megacariociti e ad una riduzione della produzione piastrinica.

La funzione delle piastrine è quella di impedire la fuoriuscita di sangue da una lesione endoteliale con la formazione del tappo emostatico. Il conteggio piastrinico viene anch'esso eseguito con metodo automatico. Come per gli eritrociti, anche per le piastrine i contatori automatici sono in grado di fornire la curva di distribuzione dei volumi, sulla base della quale vengono valutati il grado di anisocitosi (ampiezza di distribuzione piastrinica, PDW) e il volume piastrinico medio (MPV). Moltiplicando il parametro MPV per il numero di piastrine, viene calcolato il piastrinocrito, analogo all'ematocrito per gli eritrociti. È importante ricordare che in soggetti normali è possibile riscontrare una spiccata piastrinopenia secondaria alla formazione di aggregati a seguito dell'impiego di EDTA come anticoagulante. Si tratta di una "pseudopiastrinopenia" che deve essere sempre tenuta presente quando il conteggio piastrinico al contaglobuli fornisce un valore ridotto di piastrine in un contesto clinico normale. In queste situazioni è necessario l'esame dello striscio di sangue periferico, che consente una valutazione, anche se grossolana, del numero piastrinico, e suggerisce la necessità di ripetere l'esame utilizzando provette contenenti altri anticoagulanti come l'eparina o il sodio-citrato.

Coagulazione

Per svolgere le sue funzioni, il sangue circola nei vasi allo stato liquido. A causa di un danno vascolare può subire un cambiamento dello stato chimico-fisico, con attivazione enzimatica e passaggio dallo stato fluido allo stato "solido", attraverso il processo di coagulazione. Quando il coagulo di fibrina ha terminato la sua funzione di "tappo" emostatico, si riattivano reazioni enzimatiche che riportano il sangue allo stato fluido ed alla risoluzione del danno parietale.

È importante notare che tutte le funzioni del sangue sono legate al suo stato fluido, connesso a sua volta al movimento; il trasporto di acqua, ossigeno, anidride carbonica, metaboliti ed ormoni è appunto assicurato dal passaggio del sangue attraverso i polmoni, gli organi e i tessuti del corpo. Le due funzioni, emostatica e fibrinolitica, coinvolgono due sistemi enzimatici interdipendenti i cui elementi appartengono o al sangue stesso o alle pareti vascolari con cui esso si trova a contatto.

Il processo ***emocoagulatorio-emostatico*** è un complesso di eventi fisiologici deputati all'arresto delle emorragie, spontanee o provocate, mediante la formazione del *trombo emostatico*. In tale processo si possono distinguere due fasi:

- l'***emostasi primaria***, fase precoce (fase vasopiastrinica), che porta alla formazione del cosiddetto "trombo bianco";
- l'***emostasi secondaria*** o coagulazione del sangue, più tardiva, con formazione del "trombo rosso".

La fase vasopiastrinica

La prima risposta all'insulto ai tessuti dell'organismo è la ***vasocostrizione***. In seguito ad una lesione vasale, la contrazione delle arterie e delle arteriole è parzialmente sotto controllo neurale, mentre meta-arteriole, sfinteri precapillari e capillari rispondono a stimoli adrenergici. Gli endoteli lesi liberano *endoteline* e le piastrine attivate rilasciano *ADP, serotonina* e *trombossano A2* ad azione vasocostrittrice. Quando il vaso sanguigno subisce una lesione, le piastrine aderiscono (fase di ***adesione***), stimolate da alcuni fattori come l'esposizione delle fibre collagene e della membrana basale, la presenza della componente von Willebrand del fattore VIII e della fibronectina.

All'adesione segue l'***aggregazione*** che avviene in quattro fasi:

- *cambiamento della forma piastrinica*: la piastrine regiscono allo stimolo aggregante modificando la loro forma da discoidale a sferica, con formazione di pseudopodi;
- *aggregazione primaria*, reversibile: per effetto dell'agente aggregante esogeno (ADP, collagene, trombina, adrenalina, serotonina, eccetera) le piastrine si avvicinano l'una all'altra

e centralizzano i granuli intracellulari. Se lo stimolo non è sufficiente gli aggregati si disperdono, i granuli si distribuiscono all'interno del citoplasma e la piastrina ritorna allo stato di riposo;

- *reazione di liberazione* con attivazione dell'acido arachidonico e liberazione delle sostanze contenute nei granuli centralizzati;
- *aggregazione secondaria*, irreversibile: le sostanze contenute nei granuli (ADP, serotonina, eccetera) e quelle formate dall'acido arachidonico (prostaglandine e trombossani) aggregano le piastrine irreversibilmente.

Il meccanismo biochimico che sta alla base del fenomeno di aggregazione piastrinica è l'aumento del livello intracitoplasmatico degli ioni Ca^{++}, che è regolato dall'AMP ciclico e dal metabolismo dell'acido arachidonico. L'aggregazione piastrinica è un fenomeno che ha risvolti importanti sul piano clinico e terapeutico. Durante la reazione di liberazione, le piastrine mettono a disposizione del processo emocoagulativo la loro membrana attivata (cosiddetto fattore piastrinico 3 o FP3), importante per la via intrinseca della coagulazione plasmatica. Il primo fattore condizionante il rischio emorragico dei pazienti piastrinopenici è il numero delle piastrine. È nota l'esistenza di una relazione diretta tra questo e il tempo di sanguinamento (o tempo di stillicidio): con un numero di piastrine inferiore a $50 \cdot 10^9$/L, il tempo di sanguinamento è superiore a 20 minuti e al di sotto di $20 \cdot 10^9$/L è prolungato indefinitivamente.

Il *test di adesività piastrinica* si basa sul principio che le piastrine normali, mentre in vivo aderiscono alla parete endoteliale lesa, in vitro sono in grado di aderire ad una superficie estranea rappresentata dalla parete di vetro. Una piccola quantità di sangue venoso viene fatta scorrere a velocità costante e per un tempo costante sulla superficie di numerosissime palline di vetro contenute in un tubo standard di plastica. La riduzione percentuale del numero delle piastrine nel sangue filtrato, rispetto al sangue non filtrato, dà una misura dell'adesività delle piastrine (valore normale >70%).

Il ***test di aggregazione piastrinica*** si basa sul principio che la trasmissione della luce attraverso un plasma ricco di piastrine è direttamente proporzionale al grado di aggregazione piastrinica, indotta in vitro da alcuni stimoli aggreganti quali ADP, adrenalina, collageno, trombina, serotonina, ristocetina, acido arachidonico. Il test è utilizzato in genere per la determinazione di alcuni difetti di funzione piastrinica. L'aggregazione da ristocetina, realizzandosi solo in presenza di recettori specifici sulla membrana piastrinica (glicoproteina Ib) o in presenza del *fattore von Willebrand*, è utilizzata nella diagnosi della *piastrinopenia di Bérnard-Soulier* e della *malattia di von Willebrand*.

I fattori della coagulazione

La coagulazione del sangue è legata a un complesso di reazioni enzimatiche finalizzate alla trasformazione del fibrinogeno plasmatico in fibrina, con formazione del coagulo emostatico. Le reazioni emocoagulative si svolgono per mezzo di proteine presenti nel plasma come proenzimi inattivi, concatenate fra loro, così che ciascuno di essi viene trasformato in fattore attivato, e di altri fattori che sono substrati per dette reazioni (fattori plasmatici della coagulazione): si realizza così la "*cascata coagulativa*" che porta alla formazione del coagulo.

La coagulazione è attivata da due meccanismi differenti.

- l'attivazione da contatto (***via intrinseca***);
- l'azione del fattore tessutale (***via estrinseca***).

Questi due meccanismi convergono attivando una ***via comune*** che porta alla formazione della fibrina.

Tutti i fattori plasmatici della coagulazione sono proteine. La loro struttura e produzione sono determinate ereditariamente. La misura del fibrinogeno e del calcio viene espressa come concentrazione (mg/dL), mentre gli altri fattori sono espressi in percentuale, paragonando la loro attività a quella di un plasma normale.

Il ***fibrinogeno*** (*fattore I*) è una glicoproteina sintetizzata dagli epatociti, mentre le cellule del sistema del reticolo endoteliale (SRE) hanno la funzione di fagocitare i prodotti di degradazione del fibrinogeno-fibrina (FDP). Il fibrinogeno normalmente si trova, oltre che nel plasma in concentrazione di 200-400 mg/dl, anche a livello piastrinico, dove svolge, assieme al fattore von Willebrand, un importante ruolo nell'adesione e aggregazione piastrinica.

Il ***complesso protrombinico*** è costituito dai fattori II, IX, VII e X che hanno la funzione di attivare la trombina. La sintesi di tali fattori avviene nell'epatocita ad opera della vitamina K; per questa ragione sono anche chiamati fattori vitamina K dipendenti. Basse concentrazioni di questi fattori si riscontrano nella terapia con anti-coagulanti orali.

Il ***fattore V*** è fondamentale per la formazione della protrombina nella via comune della coagulazione. È una glicoproteina plasmatica sintetizzata dal fegato e dai megacariociti. I fattori V e Va si legano alla superficie delle piastrine.

Il ***fattore antiemofilico A*** (*fattore VIII*) è una glicoproteina con elevato peso molecolare. Il luogo di produzione non è noto, secondo alcune ipotesi la sua produzione avviene a livello del sistema reticolo endoteliale. La parte coagulante attiva della molecola del fattore VIII viene indicata come fattore VIII-C (o fattore antiemofilico). La stessa molecola ha una parte che viene indicata come fattore VIII-R:vW, che ha un ruolo importante nella adesione attiva delle piastrine sulle pareti dei vasi. Questa attività manca nella malattia di von Willebrand.

La carenza del fattore VIII porta ad una sindrome emorragica nota con il nome di *emofilia A*.

Il ***fattore XII*** non sembra avere un ruolo fisiologico determinante in vivo, in quanto soggetti con una ridotta concentrazione non presentano disordini emorragici. Il gene del fattore XII si trova sul cromosoma 5.

Il ***fattore XIII*** (*fattore stabilizzante la fibrina*), dopo il legame con il calcio, viene attivato dalla trombina. Il *fattore XIIIa* trasforma la fibrina solubile in fibrina insolubile o stabile.

Lo studio della coagulazione, mediante la determinazione del *Tempo di Trombina (TT)*, del *Tempo di Protrombina (PT)* e del *fibrinogeno*, permette di analizzare a scopo diagnostico il complesso di reazioni enzimatiche finalizzate alla trasformazione del fibrinogeno plasmatico in fibrina.

Per la limitazione e la localizzazione del processo emocoagulatorio sono indispensabili sistemi di controregolazione che, fisiologicamente, lo modulino e lo inibiscano (***inibitori della coagulazione***).

Tale ruolo inibitore è svolto da alcune proteine plasmatiche, tra cui l'inattivatore della frazione C1 del complemento, inibitore anche delle fasi iniziali della coagulazione e della fibrinolisi, l'α_2-macroglobulina e l'α_1-antitripsina, inibitori della callicreina, della trombina e del FIXa: ma particolarmente importanti sono i cofattori eparinici e il sistema delle proteine C e S.

L'***antitrombina III*** (*ATIII*) è il maggiore inattivatore della trombina e delle altre proteasi presenti nel plasma in condizioni normali. La sua azione antiproteasica si esplica nei confronti di numerosi enzimi della coagulazione, della fibrinolisi e del sistema delle chinine. L'azione di inattivazione dell'ATIII nei confronti della trombina avviene lentamente e progressivamente, ma è fortemente accelerata dalla presenza di eparina. L'eparina si lega all'ATIII inducendo una modificazione conformazionale della molecola, che ne facilita il legame con la trombina. Si forma così un complesso stabile e inattivo, successivamente eliminabile, mentre l'eparina, staccandosi dal complesso ATIII-trombina, si rende di nuovo disponibile per la sua azione anticoagulante.

La ***proteina C*** è una proteina plasmatica, vitamina K dipendente, la cui forma attiva esplica una potente attività anticoagulante, inattivando i fattori VIII e V della coagulazione. La proteina C sembra avere, anche, una potente attività fibrinolitica. Queste proprietà fanno pensare che deficit congeniti o acquisiti possano avere un ruolo importante in condizioni cliniche as-

sociate a fenomeni tromboembolici. La proteina C viene attivata (diventando *APC*) ad opera del complesso trombina-trombomodulina e richiede la presenza di ioni calcio.

La ***proteina S***, anch'essa vitamina K-dipendente, sintetizzata dal fegato, dall'endotelio e dai megacariociti midollari, circola nel plasma in parte libera (40%) e in parte legata alla *C4b-binding-protein* (60%). La proteina S libera funziona da cofattore dell'APC, mentre la forma legata è funzionalmente inattiva. Il complesso *APC-proteina S* degrada specificamente i fattori V e VIII attivati legati ai fosfolipidi sulle membrane cellulari endoteliali e piastriniche. In questo modo l'azione enzimatica della trombina, sotto il controllo della trombomodulina, innesca il sistema APC-proteina S ad effetto anticoagulante.

La ***fibrinolisi*** fisiologica ristabilisce il flusso ematico interrotto da un evento trombotico agendo sul coagulo fibrinico per mezzo di interventi coordinati di fattori attivatori e inibitori, in modo tale da mantenere l'equilibrio della bilancia emostatico-emocoagulatoria. La fibrinolisi è dovuta alla trasformazione di un proenzima plasmatico, il plasminogeno, in un enzima proteolitico, plasmina, il cui compito fisiologico si esplica sul fibrinogeno o sulla fibrina dando luogo ad una serie di frammenti minori fra cui i prodotti di degradazione del fibrinogeno (FDP). Il sistema fibrinolitico è coinvolto anche in altre funzioni, quali la riparazione delle ferite, la metastatizzazione tumorale, la funzione macrofagica, l'ovulazione e l'impianto dell'embrione.

Il ***plasminogeno*** è una glicoproteina a catena singola, presente nel fegato, nel rene e negli eosinofili midollari. Il legame del plasminogeno con la fibrina viene inibito dai farmaci antifibrinolitici. È considerata una proteina della fase acuta, infatti il suo tasso plasmatico aumenta negli stati infettivi acuti e in gravidanza, mentre diminuisce nel neonato immaturo, nelle epatopatie croniche e in corso di DIC.

La ***plasmina***, forma attiva del plasminogeno, esercita la sua attività proteasica sul fibrinogeno e sulla fibrina, ma anche sui fattori V, VIII e XI. Ha grande affinità per la fibrina dei trombi, mentre in circolo viene inattivata dall'α_2- antiplasmina.

Immunoematologia

La realizzazione di una risposta immune è dovuta ad un sistema di cellule, tessuti e organi tra loro strettamente correlati che, nell'insieme, compongono il "sistema immunitario". L'organismo acquisisce la capacità di discriminare tra "self" e "non self" già nel corso dell'embriogenesi. Tale capacità, che si stabilisce con modalità ancora non completamente chiarite, rende il feto capace di distinguere i normali costituenti del proprio corpo da tutto ciò che è estraneo ad esso. Tutto ciò che viene a contatto col sistema immune prima che tale capacità si sia sviluppata viene riconosciuto come "self" mentre le sostanze e le molecole con cui viene suc-

cessivamente in contatto sono riconosciute come estranee. Il sistema immunitario risponde alle sostanze estranee o con la produzione di anticorpi, che costituisce la cosiddetta "risposta umorale", o con l'intervento delle diverse sottopopolazioni dei linfociti T, che costituisce la risposta "cellulo-mediata". L'immunoematologia si occupa principalmente degli eventi che inducono la risposta umorale e degli effetti che tale risposta comportano; tuttavia i meccanismi che la determinano rientrano nel più ampio contesto dell'immunologia.

Gruppi Sanguigni

Il ***sistema ABO*** è stato il primo sistema gruppo ematico identificato e rimane ancora oggi il sistema antigenico più importante per la pratica trasfusionale. Infatti, la compatibilità ABO tra donatore e ricevente è il requisito fondamentale per ogni trasfusione. Normalmente ciascun soggetto possiede nel proprio siero degli anticorpi capaci di riconoscere gli antigeni del sistema AB che non sono presenti sulla superficie delle proprie emazie. Questo rapporto di complementarietà permette di eseguire le indagini per la determinazione del gruppo ABO sia sul siero sia sulle emazie.

Poiché la formazione di anticorpi gruppo-ematici inizia normalmente solo dopo la nascita, non è possibile la determinazione del gruppo ABO con il test indiretto sul siero di neonati o di bambini al di sotto dei 4-6 mesi. Inoltre nel siero dei neonati possono essere presenti anticorpi anti-A o anti-B di tipo IgG acquisiti passivamente dalla madre per passaggio transplacentare. La produzione di anticorpi anti-A e anti-B inizia nei primi mesi di vita e aumenta nei primi 5 o 6 anni dopodiché rimane più o meno costante fino all'età avanzata per poi decrescere nei soggetti anziani.

I soggetti in grado di realizzare una risposta immune reagiscono agli stimoli antigenici (tipo A e B) producendo anticorpi diretti contro quelle specificità ABO che non possiedono. Così nel siero di soggetti di gruppo O e di gruppo B si formano gli anticorpi anti-A ed in quelli di gruppo O e di gruppo A si formano gli anticorpi anti-B. I soggetti di gruppo AB, possedendo entrambi gli antigeni non formano alcun anticorpo.

I termini "*Rh-positivo*" e "*Rh-negativo*" si riferiscono alla presenza o assenza sulla membrana eritrocitaria di un antigene universalmente definito ***antigene D***. Si tratta, dopo gli antigeni A e B, del più importante antigene eritrocitario per la pratica trasfusionale. A differenza del sistema ABO i soggetti che non hanno l'antigene D (antigene "di grande") di regola non hanno l'anticorpo corrispondente, anti-D, nel siero. La formazione dell'anticorpo è dovuta all'esposizione ad emazie che possiedono l'antigene. Tale esposizione può realizzarsi in seguito a gravidanza o a trasfusione di sangue. Successivi studi familiari hanno dimostrato che la presenza dell'antigene sulle emazie è geneticamente determinata e che il gene responsabile è

autosomico dominante. Il gene "Rh" è localizzato sul cromosoma 1. L'adozione di test più sofisticati ha portato al riscontro di anticorpi che riconoscono antigeni e mostrano una evidente correlazione con l'antigene D. I 4 antigeni scoperti dopo l'antigene D sono stati denominati C ("ci grande"), E ("e grande"), c ("ci piccolo") ed e ("e piccolo"). L'associazione di questi antigeni suggerisce che l'immunogenicità Rh sia legata a molecole di superficie dotate di numerosi determinanti antigenici. In alcune di queste molecole con attività antigenica, è presente l'antigene D, mentre è assente in altre. La composizione di queste configurazioni antigeniche è geneticamente determinata. Per i 5 principali antigeni, è noto il coinvolgimento di un singolo gene nel determinare contemporaneamente la produzione dell'antigene D e degli antigeni C, c, E ed e. Nonostante siano state identificate e studiate numerose varianti e combinazioni, questi 5 antigeni, e i rispettivi anticorpi, costituiscono il fondamento del sistema Rh.

Test di Coombs

Ogni paziente affetto da anemia emolitica da anticorpi viene studiato mediante il ***test dell'antiglobulina*** (test di Coombs) diretto e indiretto.

Il ***test di Coombs diretto*** consente di svelare la presenza di anticorpi o di frazioni del complemento adesi alla superficie delle emazie preventivamente lavate per asportare proteine aspecificamente adese in superficie. Il test si esegue incubando le emazie del paziente in vitro con un siero polivalente antiglobuline umane. Qualora le emazie del paziente siano "sensibilizzate" per la presenza di anticorpi adesi alla superficie, si stabiliscono legami crociati che comportano l'agglutinazione eritrocitaria e la conseguente positività al test.

Il ***test di Coombs indiretto*** svela la presenza di anticorpi anti-eritrocitari incompleti nel siero del paziente. Si esegue incubando emazie normali con il siero in esame e con siero antiglobuline umane. In presenza di anticorpi incompleti sensibilizzanti si assiste all'agglutinazione delle emazie. La presenza di questi autoanticorpi plasmatici in forma non legata dipende dalla quantità totale di anticorpi prodotti e dall'affinità di legame fra l'anticorpo e l'antigene eritrocitario. In linea generale, i pazienti che presentano globuli rossi fortemente sensibilizzati hanno una maggiore quantità di autoanticorpi liberi nel plasma.

Un risultato positivo del test dell'antiglobulina diretto non implica necessariamente che le emazie del soggetto abbiano una ridotta sopravvivenza in "vivo". Un test dell'antiglobulina diretto positivo si riscontra con una frequenza che può raggiungere il 10% dei pazienti ospedalizzati o, nei donatori, con un'incidenza che varia tra 1 ogni 4.000 e 1 ogni 9.000, senza che siano presenti segni clinici di emolisi immune.

Diverse possono essere le cause di positività al test di Coombs, anche se in alcuni casi non è possibile individuare alcuna causa apparente:

- ➢ *autoanticorpi* diretti verso antigeni eritrocitari che sensibilizzano le emazie con immunoglobuline o complemento o con entrambi;
- ➢ *alloanticorpi* presenti in un paziente recentemente trasfuso che reagiscono con gli antigeni presenti sulle emazie del donatore;
- ➢ *alloanticorpi materni* che attraversano la placenta e sensibilizzano gli eritrociti fetali; la presenza di tali anticorpi si associa spesso con la malattia emolitica del neonato;
- ➢ anticorpi diretti contro alcuni farmaci che, come ad esempio la penicillina, si legano alla membrana eritrocitaria.

I risultati del test di Coombs diretto devono riflettere le condizioni realmente presenti in vivo; alcuni fenomeni che si verificano in vitro, associati con le procedure di raccolta, conservazione e preparazione dei campioni di sangue, possono influenzare i risultati del test e pertanto, prima di intraprendere ulteriori indagini su un paziente con test di Coombs positivo, devono essere escluse le possibili cause di sensibilizzazione eritrocitaria in "vitro". Questi quadri di autosensibilizzazione eritrocitari si verificano con frequenza variabile nelle diverse casistiche. Una positività del test all'antiglobulina diretto può essere trovata in soggetti sani donatori di sangue (1÷2 casi ogni 10.000 donatori). In questi soggetti, la positività al test può persistere per anni senza che essi sviluppino una anemia emolitica autoimmune. Inoltre, un paziente che presenta autoanticorpi anti-eritrocitari (Coombs indiretto), in assenza di una positività per il test all'antiglobulina diretto probabilmente non ha una malattia autoimmune, ma piuttosto un alloanticorpo stimolato da una precedente trasfusione o da una gravidanza.

Le principali ***analisi di ematologia*** sono:

- ✓ ANTICORPI ANTI-A, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-B, nel siero [S]
- ✓ ANTITROMBINA III, nel plasma [P]
- ✓ aPTT, nel plasma [P]
- ✓ ESAME EMOCROMOCITOMETRICO
- ✓ FDP/FSP, nel plasma [P]
- ✓ FIBRINOGENO, nel plasma [P]
- ✓ G6PDH, negli eritrociti [Er]
- ✓ GRUPPO SANGUIGNO ABO e Rh
- ✓ EMOGLOBINA FETALE, nel sangue [Sg]
- ✓ EMOGLOBINE ANOMALE, nel sangue [Sg]
- ✓ LEUCOCITI (conteggio), nel sangue [Sg]
- ✓ LEUCOCITI (formula), nel sangue [Sg]
- ✓ PIASTRINE (conteggio), nel sangue [Sg]
- ✓ PROTEINA C, nel plasma [P]
- ✓ PROTEINA S, nel plasma [P]
- ✓ PROVE EMOGENICHE
- ✓ RESISTENZE GLOBULARI
- ✓ RETICOLOCITI (conteggio), nel sangue [Sg]
- ✓ TEMPO DI PROTROMBINA (PT), nel plasma [P]
- ✓ TEST DI COOMBS DIRETTO
- ✓ TEST DI COOMBS INDIRETTO
- ✓ VALORE EMATOCRITO, nel sangue [Sg]
- ✓ VES

Endocrinologia

(A. Dubini)

Gli ormoni sono suddivisi in tre classi principali: ***ormoni steroidei***, ***ormoni proteici*** o ***polipeptidici*** e ***ormoni amminoacidici***.

Gli *ormoni steroidei* sono liposolubili, circolano legati a proteine di trasporto ed esercitano la loro azione legandosi a *recettori citoplasmatici*, hanno una emivita compresa tra i 60 minuti del *testosterone* e i 100 minuti del *cortisolo*.

Gli *ormoni proteici* o *polipeptidici*, come gli ormoni ipofisari, sono generalmente idrosolubili, si ritrovano in circolo in forma libera, i loro *recettori* sono localizzati sulla *membrana cellulare* mentre la loro emivita varia tra 5 e 60 minuti.

Gli *ormoni amminoacidici* hanno caratteristiche molto diverse tra di loro: il *T4*, ad esempio, circola legato a 3 diverse proteine di trasporto ed ha una emivita di una settimana, mentre l'*adrenalina* non ha proteine di trasporto ed ha una emivita di meno di un minuto.

L'ipotalamo

L'ipotalamo costituisce il centro di regolazione del sistema endocrino ed il suo collegamento con il sistema nervoso. Gli ormoni ipotalamici regolano la sintesi e la secrezione degli ormoni ipofisari mediante ***fattori stimolanti*** (releasing factors) o ***fattori inibenti*** (inhibiting factors). I principali fattori stimolatori sono il ***GH-RH*** che stimola la secrezione di GH, il ***TRH*** che stimola la secrezione di TSH, il ***CRH*** che stimola la secrezione di ACTH, il ***GnRH*** che stimola la produzione di gonadotropine, mentre i principali fattori inibenti sono la ***somatostatina*** per il GH e la ***dopamina*** per la prolattina.

Gli *ormoni ipotalamici* sono, a loro volta, sotto il controllo sia degli ormoni secreti dalle ghiandole periferiche che degli ormoni ipofisari (short-feedback): esiste inoltre un autocontrollo esercitato dagli ormoni ipotalamici su se stessi (ultra-short feedback).

L'ipofisi

Gli ormoni prodotti dall'ipofisi esercitano principalmente la loro azione su altre ghiandole endocrine:

- il ***TSH*** stimola la produzione degli ormoni tiroidei aumentando la produzione di *AMP-ciclico* a livello delle cellule follicolari della tiroide;

- l'***ACTH***, sintetizzato a partire dalla *pro-opiomelanocortina*, regola la secrezione degli ormoni steroidei prodotti dalla corteccia surrenale, in particolare il cortisolo. Ha una secrezione che raggiunge il massimo nelle prime ore del mattino ed un minimo in serata. Lo stress è un importante stimolo per quest'ormone;
- le ***gonadotropine*** (***LH*** e ***FSH***) stimolano, nell'adulto, sia uomo sia donna, la produzione di ormoni gonadici e la gametogenesi. I livelli circolanti variano grandemente con l'età e nella donna in età feconda presentano un tipico andamento ciclico nelle diverse fasi del ciclo mestruale. Questi ormoni subiscono poi un netto incremento in coincidenza con la menopausa per la caduta degli estrogeni circolanti;
- l'***ormone della crescita*** (***GH***) svolge una funzione stimolatoria sulle cartilagini di accrescimento, azione mediata dalla somatomedina, peptide prodotto a livello epatico. Possiede un effetto anabolizzante agendo sul metabolismo lipidico, glucidico e proteico. Viene secreto prevalentemente di notte circa un'ora dopo l'inizio del sonno profondo;
- la ***prolattina*** è sotto controllo inibitorio dopaminergico da parte dell'ipofisi, è stimolata da *estrogeni*, *TRH* e *stress*. Raggiunge i valori più elevati nel corso delle ultime ore di sonno. Aumenta notevolmente durante la gravidanza. Agisce inducendo e mantenendo la lattazione. Un suo aumento patologico è alla base di numerosi casi di amenorrea nonché di infertilità, sia maschile sia femminile.

La tiroide

È un organo presente in tutti i vertebrati e rappresenta la più grande struttura endocrina nell'uomo. È posta nella parte anteriore del collo, davanti e lateralmente alla laringe; ha una forma a farfalla con due lobi laterali uniti da una porzione trasversale denominata istmo. Ha una struttura follicolare, i follicoli contengono una sostanza detta colloide. Tra i follicoli si trovano le cellule parafollicolari secernenti calcitonina.

Gli ormoni tiroidei ***T3*** (***tiroxina***) e ***T4*** (***triiodotironina***), la cui sintesi e secrezione è regolata dal TSH, si ritrovano in circolo in piccola parte come frazione libera ed in gran parte legati a proteine di trasporto come la *thyroid binding globulin* (*TBG*) e l'*albumina*. Gli ormoni tiroidei esercitano la loro azione praticamente a livello di tutti gli organi e tessuti. Stimolano il consumo di ossigeno e la sintesi enzimatica, intervengono sul metabolismo glucidico modulando l'azione di insulina e catecolammine. Stimolano praticamente tutti gli aspetti del metabolismo lipidico, aumentano il fabbisogno delle vitamine idrosolubili. Nell'ipotiroidismo si può avere aumento del beta-carotene con manifestazioni cliniche di deficit di vitamina A.

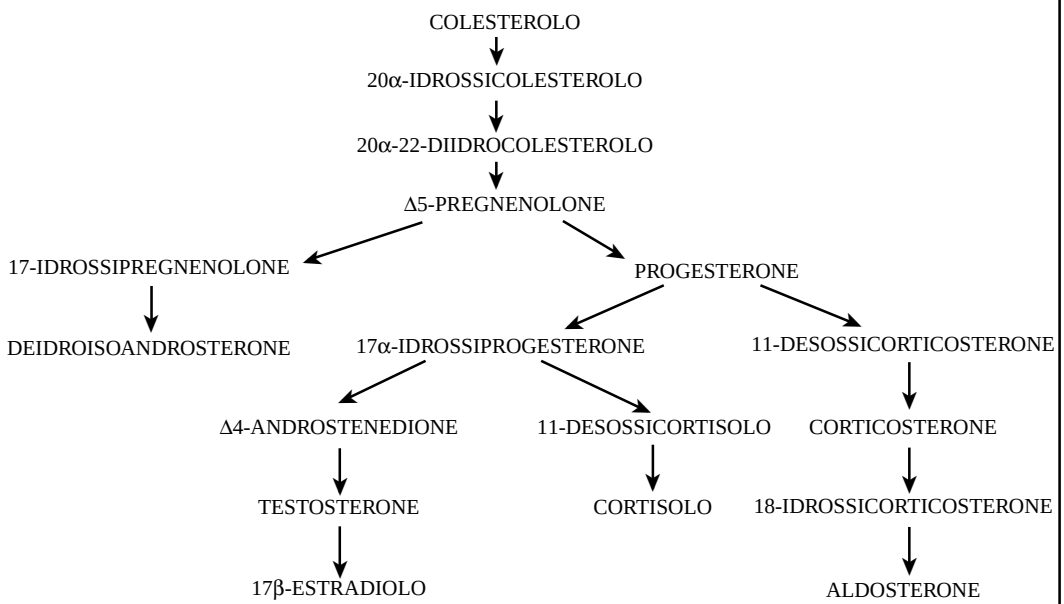
Le paratiroidi

Sono in genere in numero di quattro, situate sulla faccia posteriore della tiroide. Producono ***paratormone*** (***PTH***) che, insieme a *calcitonina* e *vitamina D*, controlla l'omeostasi del calcio. Gli organi bersaglio del PTH sono il tessuto osseo e l'apparato renale. Il paratormone stimola il riassorbimento osseo agendo sull'osteoblasto e, a livello renale, aumentando il riassorbimento del calcio nel tubulo distale e riducendo quello di fosforo in quello prossimale.

I surreni

Sono due piccole ghiandole poste al di sopra dei reni. Vi si distinguono due parti, una più esterna, la corticale, che rappresenta circa l'80% della ghiandola, deputata alla sintesi degli ormoni steroidei, ed una più interna, detta midollare, costituita da tessuto cromaffine, strettamente correlata al sistema nervoso autonomo. La sintesi degli steroidi, che è regolata dall'ACTH, avviene a partire dal colesterolo, sia captato dal torrente circolatorio sia neosintetizzato (vedi schema).

Principali vie biosintetiche degli steroidi



I prodotti della ***corticale del surrene*** si possono distinguere in due diverse categorie: i ***glucocorticoidi***, che hanno come principale rappresentante il ***cortisolo***, e i ***mineralcorticoidi*** rappresentati dall'***aldosterone***. La secrezione del cortisolo, direttamente controllata dall'ACTH, segue un tipico ritmo circadiano raggiungendo un massimo poco dopo il risveglio ed un minimo intorno alla mezzanotte. Il cortisolo in circolo viene veicolato da una proteina, la transcortina. Altro importante fattore di regolazione è lo stress (traumi, pirogeni, ipoglicemia, stati d'ansia) che, attraverso un rapido aumento dell'ACTH, provoca un innalzamento della concentrazione del cortisolo.

I glucocorticoidi agiscono aumentando i livelli circolanti di glucosio, stimolando il catabolismo proteico, hanno un forte effetto inibitorio sull'ACTH , in concentrazione soprafisiologica inibiscono le reazioni infiammatorie ed allergiche, inoltre stimolano l'emopoiesi e l'appetito mentre riducono gli eosinofili circolanti.

I mineralcorticoidi provocano un incremento dei livelli di sodio ed una diminuzione di quelli di potassio. Un eccesso di mineralcorticoidi provoca edema ed ipertensione.

La ***midollare del surrene*** produce catecolammine ed in particolare ***adrenalina***, ***noradrenalina*** e ***dopamina***. La loro secrezione è regolata principalmente da stimoli nervosi provenenti dai centri ipotalamici. La loro azione si esplica su molti organi e tessuti che presentano adrenorecettori: cuore, muscolo liscio, tessuto adiposo, eccetera.

Le ovaie

Sono le due gonadi femminili, situate lateralmente nella piccola pelvi. Hanno una funzione sia *gametogenica* sia *endocrina*.

Nell'età fertile si hanno modificazioni cicliche legate al ciclo mestruale che comprendono le variazioni che avvengono a livello di sistema nervoso centrale, anteroipofisi, ovaio e utero. Nella prima fase del ciclo (***fase follicolare***) si assiste, in presenza di concentrazioni basali di estrogeni, alla maturazione del follicolo dominante sotto il controllo delle gonadotropine, in particolare l'FSH, secrete in modo pulsatile (picchi ogni 60-90 minuti). Durante la fase follicolare intermedia la secrezione di inibina da parte del follicolo rallenta la secrezione di FSH. Nella fase follicolare tardiva il rapido aumento di estrogeni, mediante un meccanismo di feedback positivo, stimola la secrezione di LH. Contemporaneamente, l'aumento del progesterone stimola la secrezione di LH e FSH. A metà ciclo avviene l'ovulazione, LH e FSH raggiungono la massima concentrazione. Nella ***fase luteinica*** precoce il progesterone prodotto dal corpo luteo inibisce la secrezione di LH. Successivamente, la caduta del progesterone provoca un aumento dell'FSH che dà avvio ad una nuova fase follicolare.

I testicoli

Sono le due gonadi maschili, a struttura lobulare, con funzione sia gametogenica sia endocrina. L'attività endocrina si svolge, regolata dalle gonadotropine, a livello delle cellule del Leydig e, in misura minore, nelle cellule del Sertoli.

Il ***testosterone*** è il più importante androgeno prodotto dalle cellule di Leydig, circa il 2% dell'ormone è in circolo in forma libera mentre il rimanente 98% è legato a proteine di trasporto tra cui la più importante è la ***sex hormone binding globulin*** (***SHBG***). Il testicolo produce anche ***androstenedione***, importante precursore degli estrogeni, ***17-idrossiprogesterone*** e ***progesterone***.

Le *cellule del Sertoli* sintetizzano ***inibina***, un ormone polipeptidico che possiede un'azione inibitoria sulla secrezione ipofisaria di FSH.

Nel feto gli androgeni inducono la formazione del fenotipo maschile, nell'adolescente, alla pubertà, determinano lo sviluppo dei ***caratteri sessuali secondari***, e intervengono anche nell'accrescimento scheletrico e nello sviluppo muscolare; nell'adulto inducono la spermatogenesi e mantengono la funzione sessuale.

Il pancreas endocrino

È rappresentato dalle ***isole del Langerhans*** e costituisce l'1-3% dell'intero organo. Le isole sono costituite da cellule di 4 tipi istochimici diversi che secernono diversi tipi di ormoni: le ***cellule α*** producono ***glucagone***, le ***cellule β*** producono ***insulina***, le ***cellule δ*** producono ***somatostatina*** e le ***cellule F*** producono il ***polipeptide pancreatico***.

Il più importante di questi ormoni è l'insulina che viene prodotta come pro-insulina costituita da una singola catena aminoacidica che, per clivaggio enzimatico, si libera del peptide di connessione (C-peptide) dando origine all'insulina. L'ormone agisce sui tessuti bersaglio tramite un recettore specifico provocando effetti diversi a seconda del tessuto: a livello muscolare favorisce la sintesi di glicogeno, di proteine e di acidi nucleici, stimola la glicolisi e la formazione di piruvato; nel tessuto adiposo favorisce la sintesi dei trigliceridi e inibisce la lipolisi; a livello epatico promuove la glicolisi e aumenta la sintesi di glicogeno, di lipidi e proteine, inibisce la proteolisi e la lipolisi, limita la gluconeogenesi e la chetogenesi.

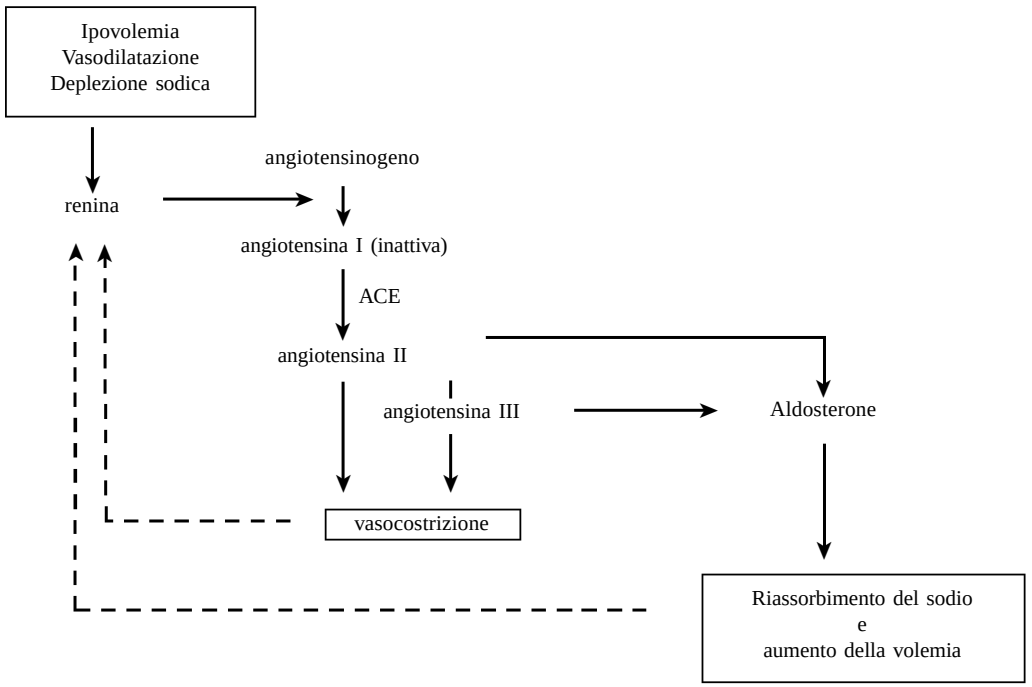
Il glucagone esplica un'azione iperglicemizzante opposta all'insulina. La somatostatina ha un effetto inibitorio locale sulla secrezione degli altri ormoni pancreatici e gastroenterici in generale.

L'apparato iuxtaglomerulare del rene

La pressione arteriosa e l'omeostasi elettrolitica sono sotto il controllo endocrino del sistema renina-angiotensina-aldosterone (vedi schema).

La ***renina*** è un enzima proteolitico prodotto, a livello renale, dalle cellule iuxtaglomerulari. La renina agisce sull'***angiotensinogeno*** epatico trasformandolo in ***angiotensina I***, questa a sua volta viene trasformata in un octapeptide attivo l'***angiotensina II*** ad opera dell'***angiotensin converting enzyme*** (***ACE***) prodotto a livello polmonare. L'angiotensina attiva favorisce la contrazione della muscolatura liscia delle arteriole, stimola la produzione di aldosterone e provoca un aumento della volemia.

Schema regolatorio del sistema renina-angiotensina-aldosterone



Le principali ***analisi endocrinologiche*** sono:

- ✓ ALDOSTERONE, nel siero [S]
- ✓ CALCITONINA, nel siero [S]
- ✓ CORTICOTROPINA (ACTH), nel plasma [P]
- ✓ CORTISOLO, nel siero [S]

- ✓ CORTISOLO LIBERO, nelle urine delle 24 ore [dU]
- ✓ C-PEPTIDE, nel siero [S]
- ✓ DHEA SOLFATO, nel siero [S]
- ✓ delta-4-ANDROSTENEDIONE, nel siero [S]
- ✓ DIIDROTESTOSTERONE, nel siero [S]
- ✓ ESTRADIOLO (E2), nel siero [S]
- ✓ ESTRIOLO (E3), nel siero [S]
- ✓ FOLLITROPINA (FSH), nel siero [S]
- ✓ GASTRINA, nel plasma [P]
- ✓ GONADOTROPINA CORIONICA, nel siero [S]
- ✓ 17-IDROSSIPROGESTERONE, nel siero [S]
- ✓ INSULINA, nel siero [S]
- ✓ LUTEOTROPINA (LH), nel siero [S]
- ✓ ORMONE SOMATOTROPO (GH), nel siero [S]
- ✓ OSTEOCALCINA, nel siero [S]
- ✓ PARATORMONE (PTH), nel siero [S]
- ✓ PROGESTERONE, nel siero [S]
- ✓ PROLATTINA (PRL), nel siero [S]
- ✓ RENINA, nel plasma [P]
- ✓ SHBG, nel siero [S]
- ✓ SOMATOMEDINA (IGF-I), nel plasma [P]
- ✓ TESTOSTERONE, nel siero [S]
- ✓ TIREOGLOBULINA (Tg), nel siero [S]
- ✓ TIREOTROPINA (TSH), nel siero [S]
- ✓ TIROXINA LIBERA (fT4), nel siero [S]
- ✓ TRIODOTIRONINA LIBERA (fT3), nel siero [S]
- ✓ TSH (test al TRH), nel siero [S]

Immunologia

(M. Gerosa, P. Riboldi)

Il sistema immunitario ha come scopo principale quello di mantenere l'omeostasi dell'organismo in collaborazione con altri sistemi quali il sistema endocrino e quello nervoso. Tale obbiettivo viene perseguito attraverso la capacità di discriminare tra ciò che è *sé* da ciò che è *diverso dal sé*, capacità che lo rende adatto a difendere l'individuo dall'attacco di microrganismi, sostanze estranee (antigeni) e dall'insorgenza di neoplasie. Questa funzione viene svolta da due sistemi integrati, l'***immunità naturale*** e l'***immunità specifica***, che collaborano all'eliminazione degli elementi riconosciuti come *diversi dal sé*.

Immunità naturale

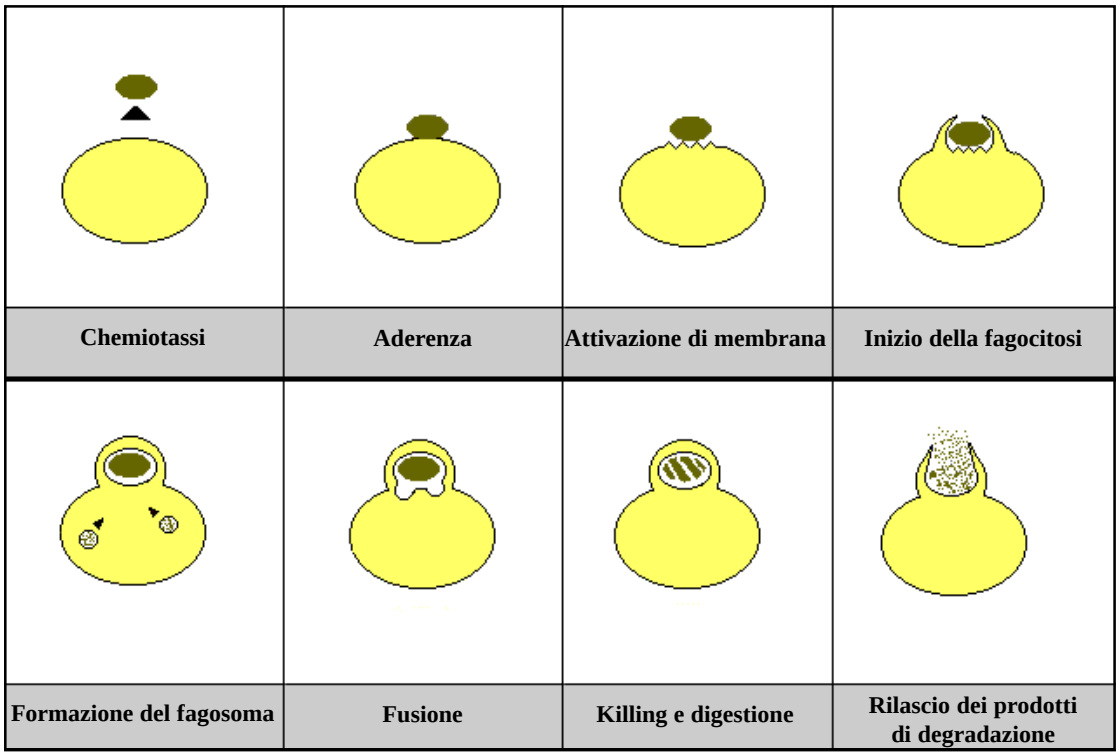
L'immunità naturale è costituita da meccanismi di difesa che sono pre-esistenti all'esposizione ad agenti estranei, non vengono potenziati da questa esposizione e non sono in grado di discriminare tra le diverse sostanze estranee. Le ***cellule fagocitiche*** e il ***sistema complementare*** sono gli attori principali che partecipano a questo tipo di immunità.

La fagocitosi

La fagocitosi è un processo complesso che avviene in varie tappe (*chemiotassi*, *aderenza*, *formazione del fagosoma* e *killing* [vedere figura a pagina seguente]) attraverso il quale i fagociti sono in grado di inglobare al loro interno e successivamente degradare microrganismi o sostanze estranee, grazie a tre diversi meccanismi di killing: a) *sostanze antimicrobiche preformate*, racchiuse in granuli citoplasmatici, rappresentate da lisozima, idrolasi, elastasi, catepsina G, defensine, lattoferrina ed altri enzimi ad azione proteolitica o idrolitica; b) *reattivi intermedi dell'ossigeno*, quali perossido di idrogeno, la cui sintesi è catalizzata da mieloperossidasi, e anione superossido e radicale idrossilico, la cui sintesi è catalizzata dal sistema NADPH; c) *intermedi reattivi dell'azoto* sintetizzati ad opera di una NO-sintetasi indotta.

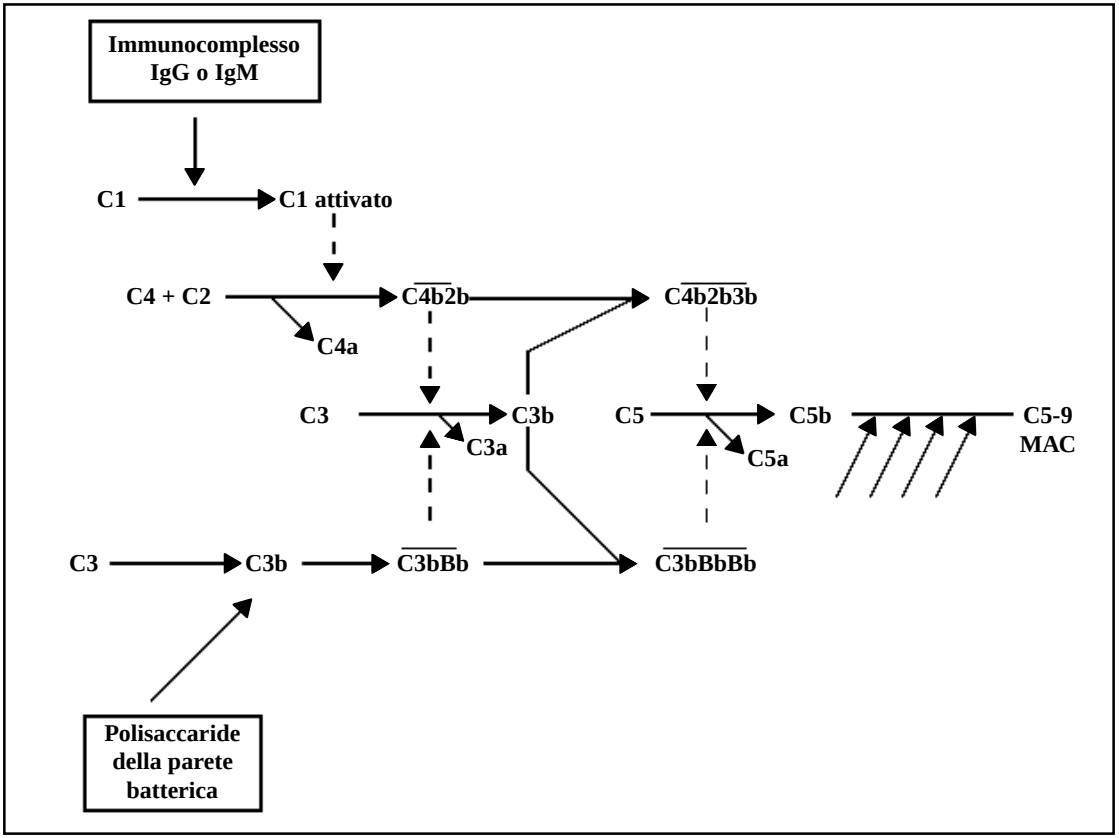
Principalmente due tipi di cellule sono deputate alla fagocitosi: i *granulociti neutrofili* o polimorfonucleati (PMN) ed i *monociti/macrofagi*. I neutrofili sono cellule circolanti nel sangue periferico, che possiedono un citoplasma ricco di granuli, che non si colorano con le normali colorazioni quali ematossilina-eosina. I macrofagi, di dimensioni maggiori rispetto ai neutrofili, rappresentano lo stadio finale di differenziazione dei monociti circolanti, quando essi fuo-

riescono dal circolo sanguigno per localizzarsi nei tessuti. In linea generale i granulociti neutrofili sono particolarmente attivi nella difesa dell'organismo da batteri piogeni, mentre i macrofagi sono più efficaci nella risposta all'infezione da microrganismi intracellulari. I macrofagi svolgono inoltre importanti funzioni nell'ambito della risposta immunitaria specifica. Essi infatti funzionano anche come *cellule presentanti l'antigene* (APC), cioè cellule che possono presentare sulla loro membrana cellulare antigeni estranei legati a proteine codificate dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità, in una forma riconoscibile dai linfociti T.



Il complemento

Il *sistema del complemento* è un sistema di proteine solubili, funzionalmente collegate, che coopera con i fagociti nell'eliminazione dei microrganismi, attraverso l'opsonizzazione e la citolisi di cellule infettate. Inoltre alcuni fattori sono importanti mediatori della flogosi in quanto potenti attivatori della chemiotassi dei neutrofili. Le proteine complementari sono in grado di attivarsi con il meccanismo a cascata qui schematicamente riportato.



L'attivazione può avvenire mediante due vie, che convergono nella formazione del *C3 attivato* (C3b), fulcro di tutte le funzioni effettrici del sistema. La ***via classica*** è innescata dal legame del primo fattore, il *C1*, complesso trimolecolare costituito dalle subunità *C1q*, *C1r* e *C1s*, con la porzione Fc di immunoglobuline complessate con antigeni. Il C1q è in grado di legarsi direttamente alla superficie cellulare dei batteri, mediante un recettore specifico per la parete batterica, la ***mannose-binding lectin***. La ***via alternativa*** viene invece iniziata dal legame di *C3b* direttamente con la parete cellulare di diversi microrganismi. Il legame del frammento C3b con la parete cellulare del microrganismo facilita l'adesione del microrganismo alle cellule fagocitiche, che possiedono sulla loro membrana cellulare un recettore per il C3b (*CR1*) e per il iC3b (*CR3*), dando il via al processo di fagocitosi. In alternativa il C3b si lega ad altre proteine del sistema complementare, *C6*, *C7*, *C8* e *C9*, a formare il complesso di attacco alla membrana (MAC), una struttura capace di penetrare nella membrana cellulare di diverse cellule eucariote, costituendo un canale, che permette il passaggio all'interno della cellula di elettroliti e acqua, provocandone la lisi osmotica. L'attivazione dei fattori della cascata complemen-

tare produce dei frammenti, *C3a* e *C5a*, detti ***anafilotossine***. Essi hanno un effetto chemiotattico sui neutrofili e stimolano l'espressione dei recettori CR1 e CR3 e la sintesi di mieloperossidasi da parte di queste cellule. Inoltre inducono la degranulazione dei mastociti e dei basofili, con liberazione di istamina e altri mediatori che determinano la contrazione di cellule muscolari lisce, l'aumento della permeabilità vascolare e contribuiscono quindi allo stabilirsi della risposta infiammatoria acuta nei siti di attivazione complementare.

Immunità acquisita

Rispetto all'immunità naturale, l'*immunità acquisita* (o *specifica*), rappresenta un sistema di difesa più sofisticato, costituito da meccanismi che vengono indotti o stimolati dall'esposizione all'antigene, sono strettamente specifici per le diverse molecole e la loro intensità ed efficacia è incrementata da ripetute esposizioni. Caratteristica del tutto particolare e unica del sistema immunitario specifico è inoltre la capacità di discriminare tra antigeni esogeni e antigeni autologhi. L'immunità acquisita ha pertanto il ruolo di potenziare la risposta immunitaria naturale, amplificando, orientando e focalizzando tale risposta nei confronti dell'agente estraneo. Possiamo schematicamente distinguere due tipi di immunità specifica: l'***immunità umorale***, rappresentata dagli anticorpi, interviene nella risposta ad antigeni extracellulari, mentre l'***immunità cellulo-mediata*** è coinvolta nell'eliminazione di cellule infettate da microrganismi intracellulari, quali i virus, miceti ed alcune specie di batteri e di cellule neoplastiche.

La ***risposta immunitaria specifica*** prevede come prima fase la ***processazione*** degli antigeni da parte di cellule macrofagiche e dendritiche (***APC***, ***antigen presenting cells***) e la ***presentazione*** ai linfociti T e B che provvedono al ***riconoscimento*** mediante recettori specifici (TCR e BCR, T e B cell receptor) espressi sulla membrana cellulare. Il legame dell'antigene a questi recettori determina l'***attivazione***, la ***proliferazione*** e la ***differenziazione*** in ***cellule effettrici***. In seguito all'allontanamento dell'antigene la risposta immunitaria gradualmente si esaurisce. Alcune cellule, prodotte durante l'espansione clonale, vanno incontro ad una fase di differenziazione in ***cellule memoria***, che sono in grado, ad un eventuale nuovo incontro con lo stesso antigene, di rispondere più rapidamente, con selettività ed efficienza. Questa capacità viene sfruttata con le vaccinazioni per suscitare uno stato di immunizzazione attiva nei confronti di agenti infettivi.

I linfociti

I più importanti elementi cellulari dell'immunità acquisita sono i linfociti, uniche cellule dell'organismo in grado di riconoscere specificamente antigeni diversi, grazie a recettori

espressi sulla membrana cellulare. Ogni individuo possiede un elevato numero di cloni linfocitari, ciascuno dei quali derivato da un singolo precursore ed esprimente un recettore per un antigene diverso da quello di tutti gli altri cloni linfocitari e capace di riconoscere un unico determinante antigenico. Il legame dell'antigene al recettore specifico seleziona il clone linfocitario con la maggiore affinità e lo attiva, stimolandone la proliferazione e la differenziazione.

I ***linfociti B*** sono le uniche cellule capaci di produrre anticorpi, inizialmente espressi sulla membrana cellulare, come recettori per l'antigene. Queste cellule hanno sviluppato complessi meccanismi genetici, che permettono la sintesi di un elevato numero di anticorpi differenti partendo da un pool genico per le immunoglobuline relativamente ristretto. Ne deriva un repertorio anticorpale altamente diversificato, che conferisce al sistema immunitario la capacità di riconoscere una enorme quantità di antigeni differenti. L'interazione dell'antigene con gli anticorpi di membrana rappresenta l'evento iniziale della attivazione dei linfociti B. Questa necessita però di un secondo segnale attivatorio, rappresentato da citochine, prodotte da una sottopopolazione di linfociti T, i *linfociti T helper*, che stimolano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule. Le plasmacellule rappresentano lo stadio finale della differenziazione dei linfociti B e hanno il compito di sintetizzare elevate quantità di anticorpi in forma solubile, non più legati alla membrana cellulare.

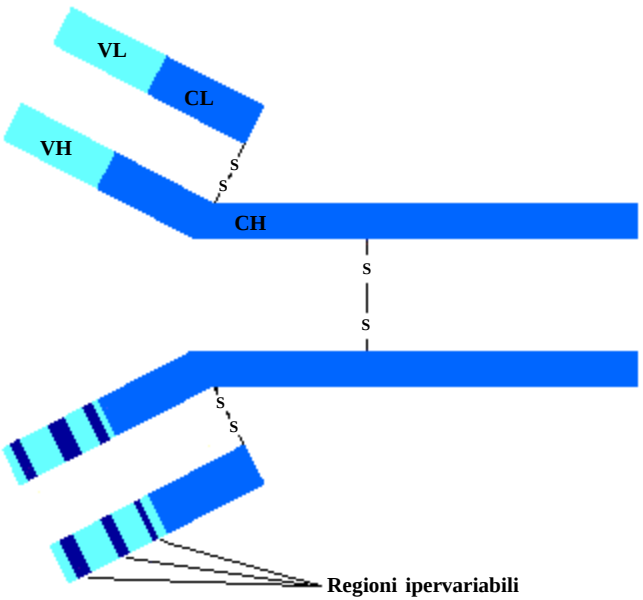
I ***linfociti T*** non producono anticorpi e il loro recettore di membrana è costituito da alcune molecole di superficie che possiedono una parziale omologia di sequenza con le immunoglobuline e che insieme costituiscono il ***T cell receptor*** (*TCR*). I linfociti T riconoscono esclusivamente antigeni espressi sulla superficie di altre cellule. Il TCR infatti è in grado di legarsi a peptidi estranei solo in forma complessata a proteine di membrana, codificate dai geni del *complesso maggiore di istocompatibilità* (MHC) e sintetizzate dalle cellule bersaglio e dalle cellule presentanti l'antigene. Esistono due sottopopolazioni funzionalmente distinte di linfociti T. I linfociti T ***helper*** hanno il compito di promuovere la risposta immunitaria attraverso la produzione di ***citochine*** di due tipi: quelle che stimolano altri linfociti T e i macrofagi (*IL-1, IL-2, IFN-γ*) e quelle che stimolano soprattutto i linfociti B (*IL-4, IL-5, IL-6, IL-10*). Le due popolazioni di linfociti con profilo citochinico differente sono denominate *Th1* e *Th2*. I ***linfociti T citotossici*** (CTL) sono in grado di eliminare cellule infettate o cellule neoplastiche che esprimono sulla loro membrana antigeni estranei, legati a molecole MHC.

Il ***complesso maggiore di istocompatibilità*** è una regione del DNA costituita da geni altamente polimorfi, i cui prodotti vengono suddivisi in due classi. Ogni cellula T riconosce antigeni estranei legati a molecole MHC di un'unica classe. Le molecole MHC di classe I sono presenti praticamente su tutti i tipi cellulari e vengono in genere espresse sulla membrana legate a peptidi sintetizzati dalla cellula stessa, in seguito all'infezione da parte di microrganismi in-

tracellulari oppure alla trasformazione neoplastica. Questo rende le cellule infette riconoscibili da parte dei linfociti T citotossici, che esprimono molecole *CD8*, le quali possiedono un'elevata affinità per le molecole MHC di classe I. Le molecole MHC di classe II sono invece espresse soltanto da cellule coinvolte nella risposta immunitaria, quali i fagociti mononucleati, le cellule dendritiche, i linfociti B e le cellule endoteliali. Questi tipi cellulari sono in grado di endocitare antigeni extracellulari, di processarli al loro interno e di presentarli sulla loro membrana cellulare legati alle molecole MHC di classe II, fungendo da APC (***cellule presentanti l'antigene***). I linfociti T helper possiedono una molecola di superficie, il *CD4*, che li rende capaci di riconoscere antigeni legati a molecole MHC di classe II.

Gli anticorpi

Le ***immunoglobuline*** (***Ig***) sono proteine costituite da due paia di ***catene leggere*** (L) e ***catene pesanti*** (H) unite tra loro da ponti disolfuro. Ciascuna catena possiede una regione costante (C) e una regione variabile (V). La porzione costante della catena pesante costituisce una regione (Fc) che determina l'isotipo ed è responsabile delle funzioni effettrici della molecola. La porzione variabile invece è diversa per ogni anticorpo ed è deputata al riconoscimento dell'antigene (vedi figura). Le Ig esistono in forma solubile o come recettori di superficie dei linfociti B, costituendo una parte essenziale del B cell receptor (BCR). Tale recettore ha funzioni di riconoscimento e di mediazione di processi di differenziazione, maturazione, attivazione, proliferazione e produzione di Ig da parte dei linfociti B.



Nell'uomo esistono cinque classi di immunoglobuline, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Le immunoglobuline ***G*** (***IgG***), di cui esistono quattro sottoclassi, sono quantitativamente le più rappresentate nel siero ma sono presenti anche a livello extravascolare, vengono prodotte durante la risposta secondaria, attivano il complemento attraverso la via clas-

sica. Svolgono un ruolo opsonizzante i microrganismi, favorendone la fagocitosi mediante recettori specifici (FcγRI) per il frammento Fc delle IgG espressi sulle membrane cellulari di neutrofili e macrofagi. Il legame delle IgG sulla superficie di cellule estranee aumenta l'efficienza della lisi cellulare da parte di *linfociti NK* (ADCC), mediante un recettore a bassa affinità espresso da queste cellule il FcγIII. Altri recettori a bassa affinità (FcγRII) sono espressi da monociti, macrofagi, neutrofili, eosinofili, piastrine e linfociti B. Questi recettori facilitano l'eliminazione degli immunocomplessi circolanti da parte delle cellule fagocitiche.

Le ***IgM*** sono Ig pentameriche a distribuzione intravascolare; attivano la via classica del complemento molto efficientemente. Rappresentano il primo livello di difesa anticorpale contro le infezioni, in quanto compaiono precocemente nella vita fetale, indipendentemente dalla stimolazione antigenica, dando origine agli anticorpi naturali caratterizzati dalla polireattività; sono sintetizzate durante la risposta primaria; sono le prime Ig espresse sulla membrana durante la maturazione/differenziazione dei linfociti B, coespresse con le ***IgD***, la cui funzione fondamentale si esplica durante i processi differenziativi nella fase che precede l'incontro con l'antigene.

Le ***IgA*** sono presenti in basse quantità nel siero, ma si concentrano elettivamente a livello delle mucose e dei secreti (saliva, lacrime, muco bronchiale, secreti gastroenterici, eccetera), dove sono presenti in forma dimerica, prodotte da plasmacellule localizzate nei tessuti linfoidi associati alle mucose (MALT). Le cellule epiteliali mucose sono dotate di uno speciale meccanismo che permette loro di secernere attivamente IgA, dopo averle endocitate grazie ad un recettore specifico presente sulla loro membrana cellulare (*FcαR*). La funzione delle IgA è quindi quella di proteggere le superfici mucose dell'organismo esposte verso l'esterno dall'attacco di microrganismi.

Le ***IgE*** intervengono nella risposta alle infestazioni parassitarie, mediante interazione con recettori specifici espressi dagli eosinofili (*FcεRII*) e dai mastociti (*FcεRI*), dei quali stimolano la degranulazione, con liberazione di potenti mediatori vasoattivi, proinfiammatori e citotossici. Inoltre le IgE sono responsabili delle reazioni da ipersensibilità immediata con meccanismo analogo (vedere le patologie allergiche).

Autoimmunità

Le patologie autoimmuni sono il risultato di una perdita della tolleranza immunitaria verso antigeni autologhi, con l'emergenza di cloni di linfociti T autoreattivi, che si manifesta con la sintesi da parte dei linfociti B di ***(auto)anticorpi*** diretti verso costituenti dell'organismo ***(autoantigeni)***. Esistono numerosissime strutture che possono divenire bersaglio di questa anor-

male risposta immunitaria. Queste possono essere localizzate esclusivamente o principalmente in un determinato organo o tessuto, oppure essere rappresentate da antigeni ubiquitari. Nel primo caso la malattia viene definita di tipo ***organo-specifico*** e si manifesta generalmente con una ipo- o iper-funzione dell'organo bersaglio, nel secondo caso invece l'alterata risposta immune dà luogo ad una malattia ***sistemica***. Questa classificazione schematizza una situazione in realtà caratterizzata da uno spettro continuo di patologie autoimmuni al cui interno troviamo forme con caratteristiche intermedie tra quelle organo specifiche e quelle sistemiche, come ad esempio la cirrosi biliare primitiva, patologia localizzata ma con anticorpi diretti verso antigeni ubiquitari.

A livello sierologico le malattie autoimmuni sono quindi caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi, che rivestono un particolare valore diagnostico e in alcune situazioni sono utili parametri di monitoraggio della malattia.

Le principali ***analisi immunologiche*** sono:

- ✓ ANTICORPI ANTI-ANTIGENI NUCLEARI ESTRAIBILI (ENA), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-Sm, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-nRNP, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-SSA/Ro, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-SSB/La, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-SCL70, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-JO1, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-PCNA, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-rRNP, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-ISTONI, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-CENTROMERO, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-β2GLICOPROTEINA I (IgG, IgA, IgM), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-CARDIOLIPINA (IgG, IgA, IgM), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-CITOPLASMA DEI NEUTROFILI (ANCA), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-MPO, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-PR3, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-DNA NATIVO, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-ENDOMISIO, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-ENDOTELIO, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-GLIADINA, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-INSULA PANCREATICA (ICA), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-LKM, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-MITOCONDRI (AMA), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-MUCOSA GASTRICA (PCA), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-MUSCOLO LISCIO (SMA), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-MUSCOLO STRIATO, nel siero [S]

- ✓ ANTICORPI ANTI-NUCLEO (ANA), nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-OVAIO, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-PARATIROIDE, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-RECETTORI TSH, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-SURRENE, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-TESTICOLO, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-TIREOGLOBULINA, nel siero [S]
- ✓ ANTICORPI ANTI-TIREOPEROSSIDASI, nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE HLA B27
- ✓ DOSAGGIO IgG, IgA, IgM, nel siero [S]
- ✓ DOSAGGIO Complemento C3, C4, CH50 nel siero [S]
- ✓ FATTORE REUMATOIDE, nel siero [S]
- ✓ REAZIONE DI WAALER-ROSE
- ✓ SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE

Allergologia

Le patologie allergiche sono il risultato di una risposta immunitaria diretta verso sostanze presenti nell'ambiente (***allergeni***) e "normalmente" non immunogene, che provoca una reazione infiammatoria. L'insorgenza della patologia allergica è sotto il controllo di più geni, non ancora del tutto noti, che in particolari soggetti determinano uno sbilanciamento della risposta immunitaria verso la sintesi delle IgE. Le manifestazioni allergiche, che conseguono a questa risposta immunitaria, sono il risultato del rilascio di numerosi mediatori solubili, preformati e di nuova sintesi da parte di basofili, eosinofili e mastociti, cellule principalmente coinvolte nelle reazioni allergiche immediate o IgE-mediate. Tali reazioni determinano quadri clinici di variabile gravità e sede comprendenti *congiuntivite, rinite, asma, orticaria, angioedema, shock anafilattico.* Gli allergeni più frequentemente responsabili di tali manifestazioni sono gli ***allergeni inalanti***, gli ***allergeni alimentari*** e i ***farmaci***.

Tra le ***analisi allergologiche*** di laboratorio si ricordano le due fondamentali: il dosaggio delle IgE totali (PRIST) e il RAST (Radio Allergo Sorbent Test), che consente di determinare la concentrazione nel siero delle IgE specifiche per i diversi allergeni.

Nella tabella che segue sono riportate le principali sostanze (allergeni) nei confronti delle quali è possibile effettuare il RAST.

Classe dell'allergene	*Denominazione dell'allergene*	*Sigla*[1]
Acari	Dermatophagoides farinae	D2
	Dermatophagoides pteronyssinus	D1
Alberi	Alnus incana / Ontano bianco	T2
	Bètula verrucosa / Betulla	T3
	Corylus avellana / Nocciolo	T4
	Fagus grandifolia / Faggio americano	T5
	Fraxinus americana / Frassino	T15
	Olea europaea / Olivo	T9
	Platanus acerifolia / Platano	T11
	Populus deltoides / Pioppo	T14
	Salix caprea / Salice	T12
Alimenti	Albume	F1
	Albicocca	F237
	Alfa-lattoalbumina	F76
	Arachidi	F13
	Aragosta	F80
	Arancia	F33
	Avena	F7
	Avocado	F96
	Banana	F92
	Beta-lattoglobulina	F77
	Carne di bue	F27
	Carne di pollo	F83
	Carne di tacchino	F284
	Carota	F31
	Caseina	F78
	Castagna	F299
	Ciliegia	F242
	Fagiolo	F15
	Finocchio	F276
	Formaggio dolce	F81
	Formaggio fermentato	F82
	Fragola	F44
	Gambero	F24
	Girasole	K84
	Glutine	F79
	Granchio	F2

[1] *La sigla dell'allergene si riferisce ad una classificazione non universale, ma ormai talmente diffusa da rappresentare uno standard "di fatto". In ogni caso si consiglia di contattare il laboratorio presso il quale sono eseguiti i RAST per verificare l'opportunità di utilizzare la sigla in luogo della descrizione per esteso dell'allergene.*

Classe dell'allergene	*Denominazione dell'allergene*	*Sigla*[1]
	Grano	F4
	Kiwi	F84
	Latte	F2
	Lievito	F45
	Mais	F8
	Mandorle	F20
	Mango	F91
	Mela	F49
	Mitili	F37
	Nocciole	F17
	Noce	F256
	Orzo	F6
	Ovoalbumina	F232
	Ovomucoide	F233
	Patata	F35
	Pera	F94
	Pesca	F95
	Pesce (merluzzo)	F3
	Piselli	F12
	Platessa	F254
	Pomodoro	F25
	Prugna	F255
	Riso	F9
	Sedano	F85
	Segale	F5
	Soia	F14
	Tuorlo	F75
Epiteli	Epitelio di cane	E2
	Epitelio di gatto	E1
	Forfora di cavallo	E3
Erbe varie	Ambrosia elatior / Artemisifolia	W1
	Ambrosia psylostachya / Ambrosia occidentale	W2
	Ambrosia trifida	W3
	Artemisia absintium / Assenzio	W5
	Artemisia vulgaris / Assenzio selvatico	W6
	Parietaria judaica	W21
	Parietaria officinalis	W19
Farmaci	Amoxicillina	C6
	Ampicillina	C5

Classe dell'allergene	*Denominazione dell'allergene*	*Sigla*[1]
	Penicilloyl G	C1
	Penicilloyl V	C2
Graminacee	Cynodon dactylon / Erba canina	G2
	Dactylis glomerata / Erba mazzolina	G3
	Poa pratensis / Gramigna dei prati	G8
Muffe e lieviti	Alternaria alternata	M6
	Aspergillus fumigatus	M3
	Candida albicans	M5
	Cladiosporium herbarum	M2
	Penicillium notatum	M1
Polveri di casa	L'allergene delle polveri di casa è rappresentato dagli acari. Pertanto il test per l'allergia alle polveri di casa non viene eseguito con un allergene specifico, bensì con gli allergeni degli ⇨ Acari.	D1 e D2

Microbiologia

(E. Cesana)

Batteriologia

I cardini della batteriologia, che si occupa della ricerca dei batteri patogeni e dei batteri opportunisti nei materiali biologici, sono costituiti dall'***esame batterioscopico***, dall'***esame colturale***, dall'***identificazione*** (generalmente ***biochimica***, talora ***sierologica***) e dall'***antibiogramma*** del ceppo o dei ceppi batterici isolati.

L'*esame batterioscopico* prevede la ricerca dei batteri mediante *esame microscopico*. Per ogni campione vengono preparati uno o più vetrini a fresco o colorati con metodi specifici (colorazione di Gram o colorazione di Ziehl-Neelsen). In genere l'esame batterioscopico non viene esplicitamente richiesto, ma viene piuttosto eseguito dal laboratorio nei casi appropriati.

L'*esame colturale* prevede inizialmente la semina del materiale biologico in appropriati terreni di crescita, l'incubazione in condizioni idonee alla riproduzione del microrganismo e successivamente l'identificazione e l'antibiogramma dei batteri patogeni e/o opportunisti eventualmente presenti. La positività dell'esame colturale viene verificata dopo 24÷48 ore dalla semina del campione in esame (tempo indispensabile per la crescita degli eventuali microrganismi).

L'*identificazione biochimica* viene effettuata, per la maggioranza dei microrganismi, con sistemi automatici, che consentono la contemporanea esecuzione di numerosi (fino a 30) test biochimici. L'identificazione viene considerata valida solo nel caso in cui abbia un livello di affidabilità superiore al 95%. Per quanto riguarda la tipizzazione e l'*identificazione sierologica* degli *Streptococchi beta-emolitici* sono utilizzati test di agglutinazione con anticorpi specifici. Il test possiede una percentuale di sensibilità e di specificità del 100% nel caso dei ***gruppi*** A, B, C, F e del 96,8% e del 87,5% rispettivamente nel caso del gruppo G. Lo *Streptococcus pneumoniae* viene tipizzato con anticorpi specifici per gli 83 ***sierotipi***.

Se l'esame colturale consente di isolare e di identificare germi patogeni e/o opportunisti, su ciascun ceppo di questi (uno stesso materiale biologico può talora contenere più ceppi/specie) è possibile effettuare l'*antibiogramma* che ha lo scopo di fornire al medico l'indicazione di quali siano gli antibiotici più efficaci. L'esecuzione degli antibiogrammi su sistemi automatici in microdiluizione necessita di 24÷48 ore. Nei laboratori avanzati i risultati sono calcolati come ***MIC*** (concentrazione minima dell'antibiotico in grado di inibire la crescita del germe) e trasformati nelle categorie di Sensibile, Intermedio e Resistente per consentire una più immediata e semplice interpretazione dei risultati dell'antibiogramma da parte del medico. I si-

stemi automatici moderni per l'esecuzione dell'antibiogramma possiedono un programma esperto incorporato che consente di evidenziare e bloccare pattern di sensibilità insoliti (fenotipi incontrati raramente, resistenze crociate non rispettate, "gerarchia" di resistenza non rispettata), così da permettere di ricontrollare il dato, di rilevare i meccanismi di resistenza, e di individuare eventualmente la correzione terapeutica da adottare in termini di posologia.

Nella tabella che segue sono riportati, per ciascuna della indagini disponibili, i batteri in genere ricercati routinariamente.

Materiale	***Analisi***	***Ricerca di routine***
Urine	Urinocoltura	Batteri aerobi (gram + e gram -) e miceti (Candida)
Urine	Ricerca bacillo di Koch	Bacilli acido-alcool resistenti
Feci	Coprocoltura	Salmonella (limitata al gruppo sierologico), Shigella, Campylobacter
Tampone vaginale e cervicale	Esame colturale	Streptococco beta emolitico di gruppo b (agalacticae), Candida, Gardnerella vaginalis, eventuali germi opportunisti (Stafilococchi, Streptococchi, batteri gram-)
Tampone vaginale e cervicale	Ricerca Chlamydia	Chlamydia trachomatis
Tampone vaginale e cervicale	Esame colturale per micoplasmi	Mycoplasma hominis Ureaplasma urealyticum
Tampone vaginale e cervicale	Esame batterioscopico	Flora batterica (gram+ e gram -), miceti
Tampone vaginale e cervicale	Esame batterioscopico a fresco	Trichomonas vaginalis[(1)]
Tampone uretrale e liquido seminale	Esame colturale	Germi opportunisti (stafilococchi, streptococchi, batteri gram-), miceti (Candida)
Tampone uretrale e liquido seminale	Esame batterioscopico	Flora batterica (gram+ e gram -), miceti
Tampone uretrale e liquido seminale	Esame batterioscopico a fresco	Trichomonas vaginalis[(1)]
Tampone uretrale	Esame colturale per micoplasmi	Mycoplasma hominis Ureaplasma urealyticum
Tampone faringeo	Esame colturale	Streptococco beta-emolitico, Stafilococco aureo, Pneumococco
Tampone faringeo	Esame batterioscopico	Flora batterica (gram + e gram -), miceti
Tampone nasale, auricolare, oculare	Esame colturale	Stafilococchi, Streptococchi, Haemophilus, Pneumococco, Batteri gram -, miceti (Candida)
Tampone nasale, auricolare, oculare	Esame batterioscopico	Flora batterica (gram + e gram -), miceti

[(1)] *Pur essendo un protozoo, viene comunemente incluso nella diagnostica batteriologica per semplice opportunità diagnostica.*

Materiale	*Analisi*	*Ricerca di routine*
Espettorato	Esame colturale	Stafilococchi, Streptococchi, Haemophilus, Pneumococco, Batteri gram negativi, miceti (Candida)
Espettorato	Esame batterioscopico	Flora batterica (gram + e gram -), miceti
Tampone rettale	Esame colturale	Salmonella, Shigella, Streptococco beta-emolitico
Emocoltura	Esame colturale	Tutti i batteri aerobi (gram + e gram -), miceti (Candida)
Liquidi cavitari, pezzi bioptici, pus, eccetera	Esame colturale	Tutti i batteri aerobi (gram + e gram -), miceti (Candida)

Micologia

La ricerca dei miceti nei materiali biologici prevede la determinazione dei ***lieviti*** (come ad esempio certi ceppi di *Candida albicans*) e delle ***muffe*** patogene. I lieviti sono miceti unicellulari che si riproducono per gemmazione, mentre le muffe hanno una forma vegetativa più complessa costituita da ife filamentose che costituiscono il micelio.

Per quanto riguarda i lieviti viene effettuata, ove possibile, un'identificazione di genere e di specie mediante sistemi automatici costituiti da diversi test di assimilazione standardizzati e miniaturizzati.

Nel caso di lieviti patogeni, è possibile effettuare un ***antimicogramma*** comprendente i più comuni antimicotici: flucitosina, anfotericina B, nistatina, miconazolo, econazolo, ketoconazolo. L'esecuzione dell'antimicogramma deve essere limitata ai casi di gravi infezioni sistemiche.

Per quanto riguarda le muffe non è possibile utilizzare sistemi automatici di identificazione, perciò la determinazione del genere e della specie (ove possibile) viene effettuata mediante caratterizzazioni morfologiche macroscopiche e microscopiche.

Attualmente non esistono per le muffe sistemi standardizzati che consentano di effettuare i test di sensibilità agli agenti chemioterapici.

Parassitologia

La ricerca dei ***parassiti intestinali*** viene effettuata su campioni di feci. Include la ricerca di protozoi, di larve e di uova di elminti. La tecnica utilizzata è l'esame microscopico diretto. Per tale esame si utilizzano sia preparati con soluzione fisiologica, sia preparati con soluzione di lugol diluita 1:5, sia preparati dopo arricchimento.

Le forme di ***elminti*** che in genere si ritrovano sono le ***larve*** e le ***uova***, sebbene si possano ritrovare anche ***vermi adulti*** o segmenti di essi. Mentre questi ultimi sono di solito visibili a occhio nudo, le larve e le uova sono visibili solo al microscopio. Per una diagnosi microscopica il più possibile attendibile è consigliabile esaminare almeno tre campioni fecali raccolti a giorni alterni, in quanto l'eliminazione dei parassiti intestinali è spesso discontinua. Per l'identificazione degli elminti (***Nematodi***, ***Cestodi***, ***Trematodi***) vengono ricercate le usuali forme diagnostiche (uova e larve), più raramente si possono ritrovare vermi adulti quali *Ascaris* ed *Enterobius*. Il ritrovamento di proglottidi di *Taenia* permette la diagnosi di specie. Comunque, nella maggior parte delle infestazioni da elminti la diagnosi viene effettuata per mezzo delle uova. Nei preparati con soluzione fisiologica si possono osservare anche le larve di *Strongyloides stercoralis*.

Le forme di ***protozoi*** riscontrabili nelle feci sono i ***trofozoiti*** e le ***cisti***. I protozoi che possono parassitare l'intestino umano appartengono a 5 gruppi: ***amebe***, ***flagellati***, ***ciliati***, ***coccidi*** e ***microsporidi***. Per quanto riguarda amebe e flagellati, nelle feci si possono ritrovare sia trofozoiti che cisti. I trofozoiti si ritrovano in genere nelle feci diarroiche o liquide, le cisti in quelle formate. Comunque le due forme possono essere presenti nel medesimo campione. Nei preparati con soluzione fisiologica si possono evidenziare trofozoiti e cisti di amebe e flagellati. In feci appena emesse (non più di un'ora) possono essere visti trofozoiti mobili che vengono identificati utilizzando obiettivi 40x (ingrandimento di 40 diametri). I preparati con soluzione allo iodio permettono di osservare le strutture peculiari all'interno delle cisti che consentono l'identificazione del genere e della specie del protozoo.

Identificazione di batteri e virus mediante tecniche di biologia molecolare

È attualmente possibile, nel caso di sospetto di infezioni particolari, ricercare direttamente l'agente infettante mediante rilevazione del suo materiale genetico (***DNA*** o ***RNA***) nel materiale biologico inviato o prelevato. Questo consente una sensibilità e una rapidità di rilevazione straordinarie: si pensi al caso del bacillo di Koch, agente eziologico della tubercolosi, per l'identificazione del quale, stante la sua crescita assai lenta, erano un tempo necessarie colture della durata da 5-6 giorni a 40 giorni, e che ora, con la rilevazione del suo DNA, può essere individuato in due soli giorni.

Le principali ***analisi di batteriologia, micologia e parassitologia*** sono:

- ✓ ANTIBIOGRAMMA
- ✓ BACILLO DI KOCH, nell'espettorato
- ✓ BACILLO DI KOCH, nelle urine [U]
- ✓ CHLAMYDIA T. DNA, nelle urine [U]
- ✓ COPROCOLTURA
- ✓ EMOCOLTURA
- ✓ ESPETTORATO, esame colturale
- ✓ LIQUIDO SEMINALE, esame colturale
- ✓ MYCOBACTERIUM T. DNA, nell'escreato
- ✓ PARASSITOLOGICO FECI
- ✓ PLASMODI DELLA MALARIA, nel sangue
- ✓ RICERCA UOVA OSSIURI, scotch-test
- ✓ SECRETO CERVICALE, esame colturale
- ✓ SECRETO URETRALE, esame colturale
- ✓ SECRETO VAGINALE, esame colturale
- ✓ TAMPONE FARINGEO, esame colturale
- ✓ TAMPONE RETTALE, esame colturale
- ✓ URINOCOLTURA

Sierologia infettiva

(G. Lissoni)

L'immunità, un meccanismo fisiologico molto importante mediato dal sistema immunitario, prevede che l'organismo produca ***anticorpi specifici*** (*immunoglobuline*) contro le sostanze (***antigeni***) estranee all'organismo stesso. Questa reazione viene messa in atto ogniqualvolta l'organismo ha la necessità di difendersi dalle infezioni.

Questa osservazione sta alla base del principio per cui la presenza di un'infezione, oltre che mediante l'evidenziazione diretta dell'agente infettante nei materiali biologici dell'organismo ospite, può essere effettuata indirettamente, evidenziando nel sangue dell'organismo ospite ***anticorpi specifici*** per un determinato agente infettante (batteri, virus, chlamiydiae, micoplasmi, rickettsie).

Nella fase iniziale dell'infezione gli anticorpi prodotti appartengono ad una classe particolare delle immunoglobuline, le ***IgM***. Successivamente, in concomitanza con il processo di guarigione dall'infezione, che in alcuni casi porta ad un'immunità permanente (vedansi ad esempio il morbillo, la rosolia, la varicella, la toxoplasmosi) le IgM vengono sostituite da immunoglobuline appartenenti alla classe delle ***IgG***.

Risulta pertanto possibile non solo identificare indirettamente un'infezione dal riscontro nel sangue di anticorpi specifici contro un determinato agente infettante, ma anche distinguere la *fase acuta* della malattia (caratterizzata dalla presenza di IgM) dalla *fase di immunità* (più o meno permanente) che segue la malattia, caratterizzata dalla presenza di IgG.

A questo va aggiunto che la sierologia infettiva, nel corso degli ultimi decenni, si è arricchita della possibilità di determinare, accanto agli anticorpi, anche ***antigeni specifici*** di varie malattie infettive.

Infine negli ultimi anni la diagnostica sierologica tradizionale è stata affiancata, e può essere utilmente complementata, dalle ricerche specifiche del ***DNA*** o dell'***RNA*** degli agenti infettanti effettuabili con l'impiego di metodi di biologia molecolare.

A partire dalla classica reazione di ***Widal***, per la diagnosi di tifo e per la diagnosi di paratifo, e dalle reazioni per la ***sierodiagnosi della lue*** (VDRL, TPHA, FTA-ABS), antesignane della sierologia infettiva, il laboratorio clinico ha saputo sviluppare nel tempo un numero molto elevato di altri metodi. La determinazione degli ***anticorpi anti-toxoplasma***, degli ***anticorpi anti-rosolia***, degli ***anticorpi anti-citomegalovirus*** e degli ***anticorpi anti-herpes virus***, rappresenta oggi un elemento fondamentale nello screening e nel monitoraggio della gravidanza. Per l'***epatite virale di tipo A*** è disponibile la determinazione degli anticorpi, mentre per la diagnostica

dell'***epatite virale di tipo B*** e dell'***epatite virale di tipo D*** sono disponibili anche le determinazioni degli antigeni espressi dall'agente infettante. Per l'***epatite virale di tipo C***, oltre alla determinazione degli anticorpi specifici, è disponibile oggi la determinazione sia qualitativa sia quantitativa, con metodi di biologia molecolare, dell'***RNA*** virale. Alla ricerca degli ***anticorpi anti-chlamydia*** si è oggi affiancata la possibilità di evidenziare (in particolare nelle urine) direttamente il ***DNA*** dell'agente infettante, ottenendo sensibilità e specificità di gran lunga maggiori di quelle consentite della tradizionale sierologia. Altre analisi disponibili, e che il medico può utilizzare in relazione a specifiche esigenze cliniche, sono rappresentate dagli ***anticorpi anti-HIV***, dagli ***anticorpi anti-tetano*** (per valutare la presenza di immunità in seguito a vaccinazione antitetanica), dagli ***anticorpi-anti bordetella*** (agente eziologico della pertosse).

Le principali ***analisi di sierologia infettiva*** sono:

- ✓ Ab ANTI-CHLAMYDIA, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-CITOMEGALOVIRUS, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-COXSACKIE, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-EPATITE A (IgM), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-EPATITE A (Ig totali), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-EPATITE C, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-EPATITE D, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-EPSTEIN BARR, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-HBcAg (Ig totali), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-HBcAg (Ig M), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-HBeAg, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-HBsAg, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-HELICOBACTER PYLORI, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-HERPES 1/2, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI HIV 1/2, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-LEGIONELLA, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-MORBILLO, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-MYCOPLASMA PNEUMONIAE, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-PAROTITE, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-PERTOSSE, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-ROSOLIA (IgG), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-ROSOLIA (IgM), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-STAFILOLISINA, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-STREPTOLISINA O, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-TETANO, nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-TOXOPLASMA (IgG), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-TOXOPLASMA (IgM), nel siero [S]
- ✓ Ab ANTI-VARICELLA/ZOSTER, nel siero [S]
- ✓ Ab FTA-ABS (Ig totali), nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE DELTA, nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE HBeAg, nel siero [S]
- ✓ ANTIGENE HBsAg, nel siero [S]
- ✓ HCV-RNA, nel siero [S]
- ✓ HIV-1 DNA, nel sangue [Sg]
- ✓ TPHA, nel siero [S]
- ✓ VDRL, nel siero [S]
- ✓ WEIL-FELIX, nel siero [S]
- ✓ WIDAL, nel siero [S]
- ✓ WRIGHT, nel siero [S]

Capitolo 3
Dal dato analitico all'informazione di laboratorio

(M. Besozzi)

Le basi metodologiche del processo decisionale medico 145
Astrarre, modellizzare, integrare e verificare 146
Procedere "more scientifico" 148
Estendere i sensi del medico 150
Dal dato all'informazione 151
La conoscenza clinica è sfumata 152
Dalla patologia medica alla clinica medica 154
Le basi probabilistiche e statistiche del processo decisionale medico 156
Il teorema di Bayes 156
Errori e sbagli 170
La confidenza (o fiducia) statistica 171
La distribuzione gaussiana 171
Precisione e accuratezza 173
Screening, diagnosi e monitoraggio 175
Confronto dei risultati con un valore soglia 177
Confronto tra due risultati: le differenze critiche 181
Test diagnostici e test predittivi 185

DOVE È LA SAPIENZA
CHE ABBIAMO SMARRITA NELLA CONOSCENZA

DOVE È LA CONOSCENZA
CHE ABBIAMO SMARRITA NELL'INFORMAZIONE

DOVE È L'INFORMAZIONE
CHE ABBIAMO SMARRITA NEI DATI

Questa frase di Mark Porat, incisa nell'ala delle Comunicazioni del Museo Scientifico dei Bambini, a Washington, ha un significato profondo.

Letta dall'alto verso il basso è la metafora della società moderna. I ritmi di vita sempre più serrati, hanno prima rotto (per sempre?) quell'armonico senso di unità tra corpo, spirito e natura che gli antichi definivano *sapienza*. Quindi hanno imposto (stanno sempre più imponendo) la necessità di suddividere l'enorme quantità di *conoscenza* globalmente disponibile, in sottoinsiemi (ecco che nasce la figura dello specialista) di dimensioni compatibili con la limitatezza della capacità di gestione della nostra mente (la corteccia cerebrale umana, ancorché sia una delle macchine più incredibilmente complesse e sofisticate presenti in natura, possiede un limite fisico finito, invalicabile). Ancora, i ritmi di vita sempre più serrati hanno imposto (stanno sempre più imponendo) la necessità di comprimere i processi di comunicazione. Il paradigma è rappresentato dalla comunicazione mediante immagini. Ma la comunicazione mediante immagini, a fronte di un aumento dell'efficienza del processo di comunicazione, comporta, ahimè, una perdita del dettaglio. Il processo di comunicazione aumenta in efficienza (per trasmettere il messaggio è necessario meno tempo), ma perde in efficacia. Inoltre il messaggio ricevuto viene tendenzialmente percepito come compiuto: la società dell'immagine spinge anche a perdere il valore aggiunto (ricchezza inestimabile) determinato dalla riflessione/analisi critica dell'individuo sul suo contenuto. La conoscenza ha ormai lasciato il posto all'*informazione*. L'informazione fine a se stessa, l'informazione-business, è il grande fratello orwelliano già presente tra noi (ma quanti se ne sono accorti?). Ma c'è di peggio nell'aria. Il flusso informativo è talmente imponente, rispetto al tempo dedicato/dedicabile alla riflessione critica su di esso da parte del singolo individuo, da rischiare di diventare semplicemente un flusso di *dati*.

Letta dal basso verso l'alto la frase di Porat rappresenta la metafora della crescita e dello sviluppo dell'individuo. Già nell'utero materno il feto riceve in continuazione *dati* provenienti dalla madre. Fino a un certo punto solo di dati si tratta. Il battito del cuore materno che rimbomba regolarmente, il rumore dell'aria che entra ed esce dagli alveoli polmonari. Appena nato però

il bambino impara subito ad integrare (operazione matematica) i dati provenienti dal mondo esterno. Lo fa solamente perché deve vivere. Pur totalmente imbelle, deve imparare immediatamente ad integrare i dati, ancora per lui confusi, provenienti dal mondo esterno (per ora solo la madre) al fine di avere una prima *informazione* essenziale: dove trovare il cibo. E impara subito a cercare il seno e a succhiare. Altre informazioni egli dovrà presto imparare a generare, integrandole, dai dati che gli provengono dal mondo in cui vive. La scuola lo aiuterà poi ad integrare le informazioni al fine di generare la *conoscenza* che gli servirà per inserirsi definitivamente nella società. Non tutti ci riescono bene. Pochi privilegiati infine riescono ad effettuare l'integrazione/salto logico che separa il livello della conoscenza da quello della *sapienza*.

L'obiettivo di questo capitolo è di presentare le basi dei processi che consentono di effettuare il passaggio *dati* ⇨ *informazione* ⇨ *conoscenza*, trasformando prima i *dati* in *informazione*, e successivamente questa in *conoscenza*.

Le basi metodologiche del processo decisionale medico

Prima di continuare vale la pena di ricordare le definizioni di *dato, informazione* e *conoscenza* fornite dallo Zingarelli[1].

Dato ⇨ *elemento o serie di elementi accertati e verificati che possono formare oggetto di indagini, ricerche, elaborazioni o che comunque consentono di giungere a determinate conclusioni*.

Informazione ⇨ *atto, effetto dell'informare o dell'informarsi* [essendo a sua volta] ***informare*** ⇨ *modellare secondo una forma*.

Conoscenza ⇨ *facoltà, atto, modo, effetto del conoscere* [essendo a sua volta] ⇨ ***conoscere*** *prendere possesso intellettualmente o psicologicamente, specialmente con un'attività sistematica, di qualunque aspetto di quella che è considerata realtà*.

Si sottolinea il fatto che questo capitolo rinuncia deliberatamente all'analisi, in quanto assolutamente impervia, dell'elemento al vertice della frase di Porat, la ***sapienza*** [definita come] ⇨ *il più alto grado di conoscenza delle cose* [ovvero definita come] ⇨ *sapere vasto e profondo uniti a doti morali e spirituali*.

È necessario infine, come ultimo passo, dare una definizione del termine ***intelligenza*** [definita dallo Zingarelli come] ⇨ *capacità generale che consente di adattarsi all'ambiente e che*

[1] *Vocabolario della lingua italiana di Nicola Zingarelli. Bologna: Zanichelli, 2002:2176pp.*

nell'essere umano si manifesta nei comportamenti e nel grado di elaborazione dei processi mentali. Ricordando che il termine intelligenza deriva dal latino *intelligere*, per il quale lo stesso Zingarelli rimanda alla voce ***intelletto*** ⇨ *facoltà di intuire le idee, le rappresentazioni e i loro rapporti*.

Astrarre, modellizzare, integrare e verificare

La corrispondenza tra gli stati attraversati dalle rappresentazioni mentali sulla via dell'*intelligere* (*dati* ⇨ *informazione* ⇨ *conoscenza*) e le azioni intraprese dall'individuo sono le seguenti:

Rappresentazione mentale	***Deriva dall'azione di…***
Dato	…ricerca [astrazione]
Informazione	…modellare secondo una forma [modellizzazione]
Conoscenza	…prendere possesso intellettualmente … della realtà [connettere]

Il dato è la prima rappresentazione mentale, quella più elementare. Ma è già di per sé una grande conquista. Il dato è il risultato di un processo di astrazione. Fornire una tabella che riporta l'altezza in centimetri di 1.000 soggetti appartenenti alla popolazione italiana, corrisponde a fornire un elenco di dati. Ma esprimere "l'altezza in centimetri" presuppone un processo di misura, che altro non è se non un'astrazione. Essendo che, come vedremo avanti, "la misura (dell'entità) di una grandezza fisica" consiste nell'esprimere la grandezza in modo quantitativo, dando ad essa un "*valore numerico*" che è un numero puro, ottenuto per confronto della "*(entità della) grandezza* in esame" con la "(entità di una) grandezza di riferimento ad essa omogenea, definita *unità di misura*". Un concetto astratto, che consente peraltro di dare misurabilità ai dati[2].

Dire che "l'altezza media, in un campione rappresentativo di 1000 italiani, è di 168,4 centimetri" corrisponde a dare un'informazione. Informazione che deriva dall'avere dato forma ai dati, applicando ad essi un qualche modello di distribuzione (per esempio il modello di distribuzione proposto da Gauss, la distribuzione gaussiana). È importante sottolineare che il dare forma ai dati, che di per sé è concepito come un fatto neutro, in taluni casi può portare a con-

[2] *Non importa che la misura sia basata su una unità di misura "arbitraria" (come ad esempio il metro e il kilogrammo). Un dato misurabile può finalmente essere confrontato con un altro dato, essendo a questo punto il confronto relativo di due dati reso "oggettivo" dal concetto soggiacente di misurabilità, che consente di eliminare l'arbitrarietà del giudizio.*

seguenze/conclusioni altamente fuorvianti[3]. Questo accade quando il dare forma, dovuto al ricercatore, prende il sopravvento sulla forma, intrinseca, soggiacente, ma incognita, dei dati. In questi casi il desiderio legittimo di dare forma ai dati, può portare ad alterarne il loro contenuto informativo primigenio, ad introdurre nei dati una distorsione. Avremo modo di soffermarci abbondantemente su questo concetto/pericolo quando parleremo del disegno sperimentale.

Il terzo elemento, la conoscenza, intesa come "prendere possesso intellettualmente … della realtà [connettere]" è il più complesso. Per capirlo è opportuno ricorrere alla teoria dei sistemi, che definisce un sistema come un "insieme di parti connesse da relazioni", e nel quale "l'insieme rappresenta qualcosa di più della somma delle singole parti"[4]. In altre parole viene riconosciuto che le relazioni che interconnettono le parti sono in grado di fornire valore aggiunto al sistema. Nel campionato di calcio, nel campionato di basket, nel campionato di baseball, praticamente ogni anno esistono almeno due squadre con lo stesso numero di "altrettanto buoni" giocatori. Ma è frequente osservare come una squadra ottenga buoni risultati mentre l'altra non riesce ad ottenere risultati. La spiegazione risiede nel fatto che nel primo caso le relazioni (quelle tra i singoli giocatori, e quelle tra questi e l'allenatore) forniscono un valore aggiunto maggiore che nel secondo. Si noti che il termine relazioni non viene utilizzato per descrivere relazioni amicali, ma relazioni funzionali (anche se nel caso specifico le relazioni amicali svolgono sicuramente un ruolo importante). A parità di bontà dei giocatori, gli allenatori sono pagati proprio per massimizzare il valore aggiunto fornito dalle relazioni [funzionali] tra gli elementi/parti della squadra/sistema. Nel caso specifico dell'esempio, conoscere l'altezza degli italiani significa non solo possedere i dati (altezza di 1.000 individui), non solo dare loro forma mediante un modello matematico (distribuzione gaussiana) dal quale derivare l'informazione riguardante la loro altezza media, ma anche ricordare che i sardi sono mediamente più bassi e i friulani mediamente più alti della media degli italiani. Dalla fusione delle altezze dei sardi e di quelle dei friulani nel crogiolo degli italiani, deriva proprio questo valore aggiunto che né i singoli dati né l'informazione "l'altezza media, in un campione rappresentativo di 1.000 italiani, è di 168,4 centimetri" sono in grado di dare. Seguendo la definizione data dalla teoria dei sistemi "l'insieme" delle altezze di 1.000 italiani "rappresenta qualcosa di più della somma delle singole parti".

---

[3] *Il concetto, qui applicato alla statistica, ha un valore assolutamente universale. Si pensi alle deviazioni introdotte dalla cultura magica medioevale, col dare forma di draghi, folletti e streghe ai dati della realtà. Ma si pensi anche a quanto accade ancora di questi tempi (per fortuna forse sempre meno) con le ideologie, in particolare quelle con deviazioni di tipo totalitario o xenofobo. Gli assunti utilizzati per dare forma ai dati sono talmente forti da alterare la visione della realtà stessa a milioni di individui, inducendo comportamenti collettivi folli.*

[4] *Capezzuto D, Gianni D. Sistemi. Modellistica, comunicazione, misura e controllo. Milano: Hoepli, 1988:367pp.*

Procedere "more scientifico"

Magia, filosofia e scienza sono state le tre tappe fondamentali sulla via della conoscenza, intesa come "prendere possesso intellettualmente… della realtà", e utilizzano tre differenti metodi di ricerca o, come anche si dice, rappresentano tre differenti "programmi di ricerca".

La possibilità di basarsi su ***misure*** anziché sull'intuizione è il primo dei due motori del passaggio dall'interpretazione/comprensione magica (e filosofica) all'interpretazione/comprensione scientifica della realtà. Il dare forma di ***legge "di natura"*** ai dati ottenuti dalle misure (anziché forma intuitiva) è il secondo motore del passaggio dall'interpretazione/comprensione magica (e filosofica) all'interpretazione/comprensione scientifica della realtà.

La magia non si preoccupa di avere dati misurabili, né di dare loro una forma. Basa il suo programma di ricerca sulla sola ***intuizione***, ignorando qualsiasi esigenza di oggettività delle fonti della conoscenza. Ma le conseguenze sono rappresentate da un mondo assolutamente irrazionale: l'uomo è in balia di Dei capricciosi, di ciclopi, draghi e streghe, dell'andamento degli astri. Per di più non si riesce a trovare la pietra filosofale, e l'alchimia non porta ad alcun risultato. La magia fallisce nel suo obiettivo più ambizioso, quello di dominare, fino a poter cambiare, il mondo reale: anche se ancor oggi c'è sicuramente qualcuno che crede nell'efficacia di una danza della pioggia.

Con la filosofia l'uomo incomincia a ragionare in termini di ***modelli***, attraverso i quali dare forma alla realtà. Modelli che prevedono anche intuizioni geniali, come quello di Democrito, che arriva all'idea di indivisibilità dei costituenti ultimi della materia. La capacità di modellizzare rappresenta un salto in avanti di importanza storica nello sviluppo della cultura umana. E alcuni risultati, come l'incommensurabilità tra misura del raggio e misura della circonferenza, oppure il modello di geometria euclidea, "scoperti" dalla scuola filosofica pitagorica, sono arrivati ai giorni nostri. Ma i pitagorici rappresentano l'unica eccezione in un mondo che continua ad ignorare il concetto di misurabilità dei dati come strumento per renderli oggettivi. Un fatto al quale ha probabilmente contribuito in modo determinante lo spregio della cultura ellenica nei confronti delle attività manuali, essendo il concetto di misura sicuramente collegato allo svolgimento di una attività manuale.

Aristotele afferma che "*i corpi leggeri* [come la fiamma, (nota dell'autore)] *si muovono verso l'altro, mentre quelli pesanti si muovono verso il basso*"[5]. Sono necessari 2000 anni prima che Galileo misuri la velocità di caduta dei gravi, con una serie di esperimenti storici. Galileo non solo modellizza, ma sottopone il modello a verifica. Esiste ovviamente il rischio di scoprire che il modello è falso. Ma Galileo accetta il rischio. Non solo, ma svolge lui stesso il

[5] *Nicola U. Atlante illustrato di filosofia. Verona:Demetra, 1999:587pp.*

lavoro manuale necessario per effettuare le misure richieste. E scopre che i gravi cadono tutti alla stessa velocità. L'insieme di *dati misurabili* e di una *legge di natura* matematica e quantitativa porta al primo *modello scientifico* di conoscenza della realtà. Galileo passa meritatamente alla storia come il fondatore del metodo sperimentale. Il metodo che consentirà a Newton, con la sua monumentale opera, *Philosophiae naturalis principia mathematica* di consolidare definitivamente l'evoluzione in scienza di una branca della filosofia[6].

Questi concetti possono essere così riassunti:

Dati	***Informazione***	***Conoscenza***
Non misurabili	In forma "intuitiva", non modellizzata, ignora il criterio di oggettività	Magica
Non misurabili	In forma di "modello filosofico", basato su modelli ovvero "leggi filosofiche" qualitative, con al più deboli elementi di oggettività (raro riscontro nelle "osservazioni")	Filosofica
Misurabili	In forma di "modello scientifico", basato su modelli ovvero "leggi matematiche" quantitative che governano il comportamento della natura, con forti elementi di oggettività (riscontro nelle "misure" effettuate)	Scientifica

Magia e filosofia hanno quindi in comune la caratteristica di essere stadi pre-scientifici della conoscenza.

Le operazioni concettuali che dai *dati* consentono di costruire *informazione* e quindi *conoscenza*, sono elencate nella tabella che segue. Resta inteso che i dati, cioè le *osservazioni*, devono essere caratterizzati da *oggettività*, intesa in senso popperiano come *falsificabilità*.

Dati non falsificabili, quindi autoconsistenti, e per definizione autoreferenziati, non consentono di innescare quel processo logico di verifica continua dell'ipotesi (nel campo medico *ipotesi diagnostica*) sulla base della coerenza osservata tra le conclusioni attese in base all'ipotesi fatta e le osservazioni, che consente il progressivo aggiustamento dell'ipotesi stessa, innescando quel circolo virtuoso di miglioramento della conoscenza che rappresenta la vera, grande forza del metodo scientifico. I cui risultati sono sotto gli occhi di tutti, visto che, ad esempio, senza il metodo scientifico saremmo ancora fermi all'alchimia, non esisterebbe la fisica quantistica, non esisterebbe la microelettronica, e anche il PC su cui questo libro è stato scritto non esisterebbe.

---

[6] *Guillen M. Le cinque equazioni che hanno cambiato il mondo. Milano: Longanesi & C, 1999, 294 pp .*

Operazione…	*Azione…*	*Esempio…*
Astrarre	I dati sono liberati dal contesto (decontestualizzazione)	Dall'osservazione di pazienti con cute e mucose di colore giallo viene astratto il concetto di "ittero"
Modellizzare	Viene costruito, sulla base di principi della teoria dei sistemi, un modello costituito da un certo numero di parti con le relative interazioni	Costruzione delle basi biochimiche e delle basi fisiopatologiche dei vari tipi di ittero
Integrare (connettere)	I modelli vengono integrati con le osservazioni (dati) del singolo caso (contestualizzazione)	La presenza di sola bilirubina diretta senza aumento delle transaminasi fa ipotizzare un ittero ostruttivo
Verificare (falsificare)	L'ipotesi adottata viene verificata con dati aggiuntivi (in senso popperiano, cioè nel senso che l'ipotesi "tutti i cigni sono bianchi" non diventa più vera ogniqualvolta si osservi un nuovo cigno bianco, ma diventa sicuramente falsa non appena si osservi un cigno nero)	L'ecografia consente di escludere i calcoli come causa dell'ittero ostruttivo

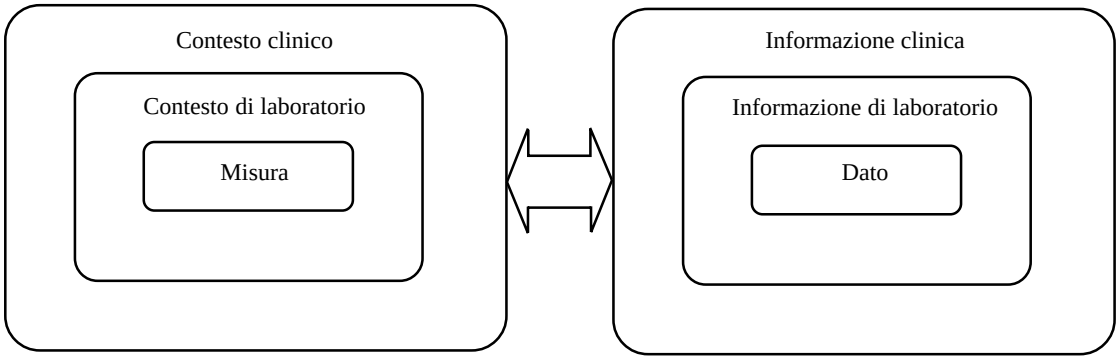
La verifica (mediante falsificazione) consente come detto di integrare i nuovi dati nel contesto, e di riformulare l'ipotesi, in un ciclo interattivo di miglioramento progressivo che porta ad affinare sempre più l'ipotesi diagnostica.

Estendere i sensi del medico

Il fatto di disporre, per indagare le malattie, solamente dei propri sensi, ha sempre rappresentato per il medico un limite. È vero che anche solo basandosi su di essi il medico è potuto arrivare ad intuizioni geniali (si pensi al diabete "mellitus", dalle urine dolci come il miele). Tuttavia è chiaro che la medicina moderna si è sviluppata solamente quando, sulla base dello studio "more scientifico" degli organismi biologici, si è innescato un circolo virtuoso tra questo e i suoi sviluppi tecnologici. E oggi nessun medico saprebbe rinunciare a quelle estensioni dei propri sensi che sono rappresentate dalle analisi di laboratorio, dalla diagnostica per immagini (radiografia, tomografia assiale computerizzata, risonanza magnetica nucleare, ecografia), dalle tecniche elettrofisiologiche (elettrocardiografia, elettroencefalografia, elettromiografia), dalle tecniche endoscopiche: in altre parole, oggi nessun medico saprebbe rinunciare all'informazione che da queste gli viene fornita.

Dal dato all'informazione

Il valore aggiunto della Medicina di Laboratorio è quindi costituito dall'informazione che le analisi di laboratorio sono in grado di fornire al medico. La trasformazione del dato analitico in informazione richiede tre passi fondamentali: (i) la *misura* della concentrazione dell'analita in questione (ci riferiremo d'ora in poi, per semplicità, alle sole situazioni nelle quali è disponibile un risultato quantitativo), (ii) la *contestualizzazione del dato* (risultato della misura) nell'ambito del quadro delle conoscenze di laboratorio (i dati sono integrati per generare l'*informazione di laboratorio*), e (iii) la *contestualizzazione dell'informazione* nell'ambito del quadro delle conoscenze cliniche (le informazioni sono integrate per generare la *conoscenza clinica*). Questi concetti sono riassunti nella figura sottostante.

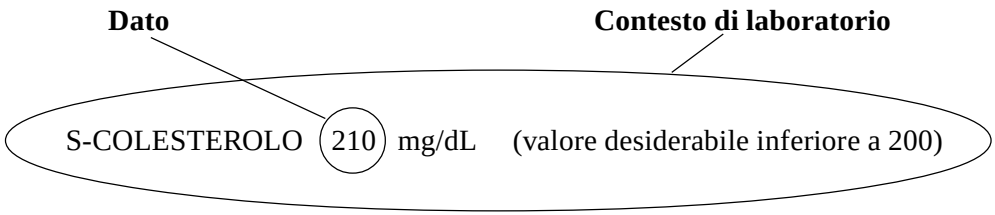


Per illustrare l'importanza del contesto, si consideri un esempio banale ma significativo: la determinazione della *concentrazione del colesterolo nel siero* in un dato soggetto, espressa come

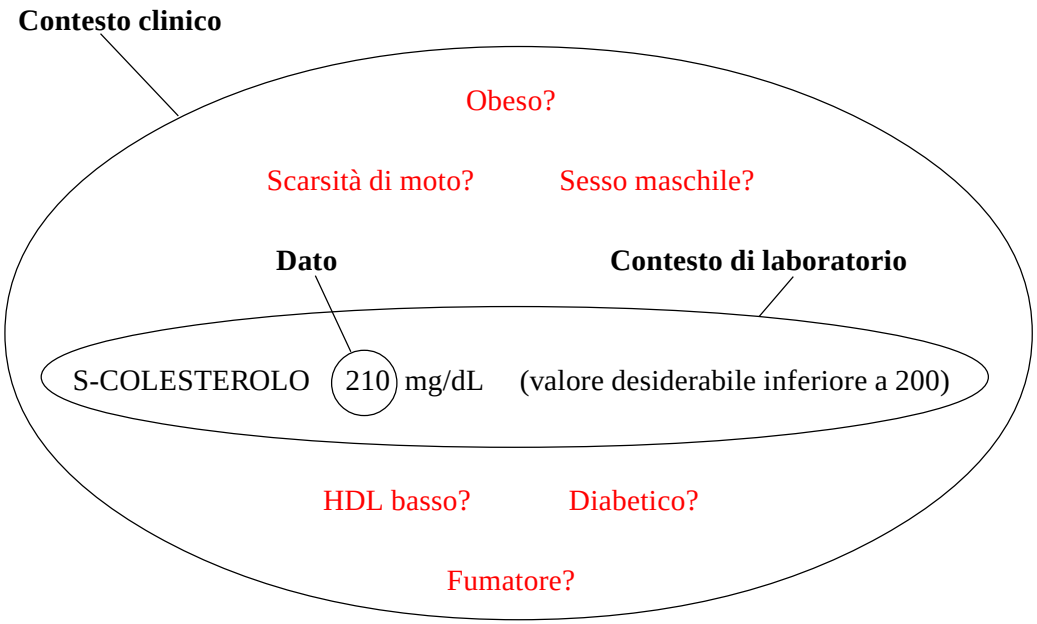
210

Si tratta di un dato. Il significato? Poco più di una macchia nera di inchiostro su un foglio bianco di carta.

Accompagnato dall'opportuno contesto di laboratorio, il dato diventa una informazione

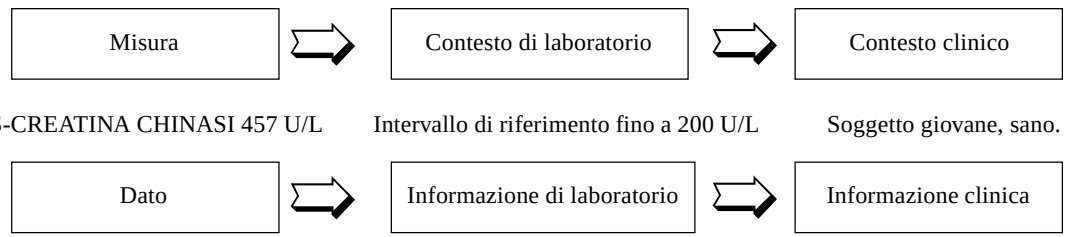


Se il tutto viene integrato nel contesto clinico, emerge un valore aggiunto ulteriore, che trasforma l'informazione in conoscenza



La conoscenza clinica è sfumata

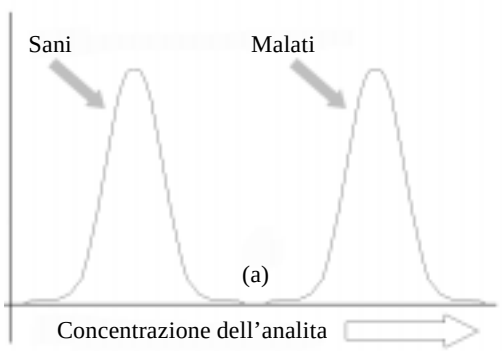
Si consideri ora il seguente esempio, relativo alla determinazione della concentrazione nel siero dell'enzima creatina chinasi (CK), che abbia fornito per un determinato soggetto un valore di concentrazione pari a 457 U/L (Unità di attività enzimatica per Litro di siero):



Il dato in sé dice poco. Integrato nel contesto di laboratorio, fornisce una prima informazione: il soggetto si discosta *significativamente* (vedremo fra poco quale significato dare a questa espressione) dal comportamento dei soggetti sani (a partire dai quali è stato determinato l'intervallo di riferimento utilizzato dal laboratorio). Ma la vera conoscenza sullo stato di sa-

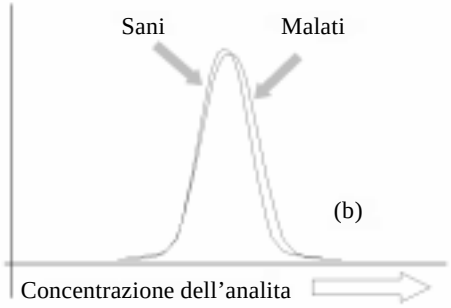
lute/malattia può derivare solamente dal successivo livello d'integrazione effettuato dal medico sulla base del contesto clinico. Tutti i medici prima o poi hanno la possibilità di osservare valori di CK elevati in soggetti clinicamente sani: e una semplice indagine anamnestica può magari evidenziare il fatto che la sera prima il soggetto abbia praticato un'attività fisica alla quale, come noto, può facilmente conseguire un innalzamento della CK di durata e di intensità variabili, ma il più delle volte ancora rilevabile nelle analisi eseguite l'indomani mattina (anche una iniezione intramuscolare, o una semplice contusione muscolare, possono avere lo stesso effetto).

Un altro esempio potrebbe essere quello di un soggetto di mezza età che per la prima volta, inaspettatamente, presenta all'esame emocromocitometrico 60.000 leucociti, e una formula leucocitaria comprendente mieloblasti, promielociti, mielociti e metamielociti. In questo caso l'informazione fornita dal laboratorio è già da sola praticamente diagnostica di una leucemia mieloide cronica (anche se questo non esime da una serie di ulteriori indagini volte a confermare e a stadiare la malattia).



Così come tra il bianco e il nero esistono infinite sfumature di grigio, tra queste due situazioni estreme, quella della CK, nella quale l'informazione fornita dal laboratorio potrebbe essere, se astratta dal contesto clinico, in sé fuorviante, e quella dell'emocromo, nella quale l'informazione fornita dal laboratorio è "quasi" diagnostica da sola, quindi è in sé autoconsistente, esistono infinite situazioni intermedie, nelle quali il significato delle analisi di laboratorio è *sfumato*. Il fatto è che, contrariamente a quanto molti ritengono[7], la maggior parte delle situazioni di laboratorio, come di quelle cliniche, è di tipo sfumato.

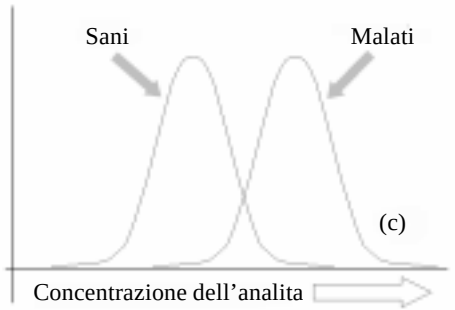
In effetti sono rari i test di laboratorio, come le situazioni cliniche, nelle quali la distribuzione dei risultati dei soggetti sani è completamente separata da quella dei malati, come nella figura (a), situazione tipica nella quale il risultato di un test è diagnostico.



[7] *Inclusi i pazienti che, in perfetta buona fede, ritengono magari di essere "malati" per un valore riscontrato di 41 U/L di aspartato-amminotransferasi (AST o GOT), quando l'intervallo di riferimento è "fino a 40".*

Il caso estremo diametralmente opposto è quello (b) di una completa sovrapposizione dei risultati dei soggetti sani con quelli dei soggetti malati: ma test di questo genere non possono essere utilizzati come test diagnostici!

Ma la maggior parte delle volte ci si trova nella situazione illustrata dalla figura (c), nella quale la distribuzione dei risultati nei soggetti sani e nei soggetti malati sono parzialmente sovrapposte.



Ora non è possibile conoscere a priori quale possa essere il valore informativo di una determinata analisi nel contesto clinico di uno specifico paziente. Se così fosse, sarebbero disponibili da tempo protocolli diagnostici applicabili meccanicisticamente, cosa che notoriamente non è. Questo non significa che le analisi di laboratorio debbano essere prescritte in modo acritico, visto che esse hanno comunque un costo, e che le risorse a disposizione della collettività, incluse quelle che possono essere dedicate alla sanità, sono per definizione limitate. Tuttavia è altrettanto chiaro che eventuali protocolli diagnostici (o percorsi diagnostici) devono essere considerati come comportamenti da seguire "in media", in base allo stato dell'arte, devono essere continuamente aggiornati, per seguire lo stato dell'arte, ma devono rappresentare solamente un "percorso guida" che garantisca comunque al medico i gradi di libertà necessari a permettere la loro personalizzazione (una personalizzazione ovviamente motivata) in relazione alle esigenze cliniche di ciascun specifico caso.

Dalla patologia medica alla clinica medica

La domanda che il medico si pone davanti al paziente è: "il paziente è malato o è sano?". Si tratta come tutti sanno di una domanda tutt'altro che banale, che ha richiesto anni di studio di numerose discipline di base e di discipline cliniche, incluse la patologia medica e la clinica medica. E la formalizzazione della *metodologia* da seguire per rispondere ad essa "more scientifico" ha comportato, e comporta ancor oggi, rilevanti difficoltà.

Si consideri il caso dell'epatite virale di tipo A. La *patologia medica* insegna che nell'epatite virale di tipo A è presente nell'80% dei casi un aumento delle transaminasi (AST/ALT) e nel 70% dei casi un aumento della bilirubina nel siero, mentre nel 20% dei casi è asintomatica (non importa se perché l'epatite è molto lieve, o perché il paziente si presenta al medico in ritardo, quando i segni sono già regrediti). In altre parole la patologia medica riconosce alle

analisi di laboratorio (come anche ad altri test, compresi i segni clinici) un valore diagnostico di tipo probabilistico, e insegna come si comportano ***i segni data la malattia***.

Data la malattia, il comportamento dei segni può essere *dedotto* dall'osservazione[8] in modo univoco (nella misura in cui la malattia è "certa", ed è stata ovviamente accertata sulla base di criteri indipendenti rispetto segni studiati, esiste una relazione "certa" tra malattia e segni, nel senso che i segni possono essere associati *univocamente* alla malattia).

La logica del ragionamento viene completamente ribaltata dalla *clinica medica*, che insegna a diagnosticare ***la malattia dati i segni***. In un soggetto con aumento delle transaminasi (potrebbe trattarsi di un'epatite anitterica, come di un'altra affezione che comporta un aumento delle transaminasi) quale è il grado di confidenza che possiamo assegnare all'affermazione "il soggetto è affetto da epatite A"?

Dato un segno, lo stato di malattia può essere oggetto solamente di una *inferenza*[9], e accertato quindi solamente in termini di *probabilità* (nella misura in cui il segno è "certo", non esiste una relazione "certa" tra segno e malattia, nel senso che la malattia non può essere associata *univocamente* al segno).

Il valore predittivo *p* di un test positivo, come l'innalzamento delle transaminasi[10], nella migliore delle ipotesi può essere uguale a 1 nei test che forniscono una diagnosi di certezza[11]. Tuttavia nella stragrande maggioranza dei casi il valore predittivo di un test positivo non è uguale a 1, ma assume un valore intermedio tra 0 e 1.

La mancanza di una relazione *biunivoca* tra segni e malattia ha come conseguenza che la metodologia scientifica applicata al campo diagnostico comporta l'introduzione del concetto di *probabilità*[12].

---

[8] *Sulla base della logica deduttiva tipica della probabilità, che si occupa di descrivere le leggi deterministiche che consentono, sulla base della conoscenza del generale (popolazione), di dedurre il comportamento del particolare (campione).*
[9] *Sulla base della logica inferenziale tipica della statistica, che si occupa di descrivere le leggi probabilistiche che consentono, sulla base della conoscenza del particolare (campione), di inferire il comportamento del generale (popolazione).*
[10] *Con p compreso per definizione tra 0 e 1 ($0 \leq p \leq 1$)*
[11] *Ad esempio la presenza di tre cromosomi 21 nel cariotipo di un soggetto fornisce con certezza la diagnosi di sindrome di Down.*
[12] *Si fa notare ancora che se esistesse una corrispondenza biunivoca certa e assoluta tra segni e malattie, sarebbe facile formalizzare algoritmi diagnostici automatici, cosa che invece notoriamente non è possibile.*

Agli effetti della diagnosi, è importante conoscere il valore esatto di *p*, sia nel caso di un test positivo che nel caso di un test negativo. Ma ancor più importante è capire come il valore predittivo possa cambiare, per esempio approfondendo le indagini con test aggiuntivi. Per illustrare questi concetti è necessario ricorre ad un minimo di trattazione formale della probabilità.

Le basi probabilistiche e statistiche del processo decisionale medico

Gli scritti di Girolamo Cardano (1501-1576) e di Galileo Galilei (1564-1642) rispettivamente intitolati *De ludo aleae* e *Sopra le scoperte de li dadi*, sono i primi che trattano specificamente e organicamente di problemi di probabilità. Che trova i suoi principali sviluppi nei lavori di Pascal (1623-1662) e di P. De Fermat (1601-1655).

Il teorema di Bayes

L'aspetto della probabilità che ha trovato maggiori applicazioni in campo medico deriva dallo scritto del reverendo inglese Thomas Bayes, pubblicato postumo nel 1763 (*Reverend Thomas Bayes: An assay toward solving a problem in the doctrine of chance. Philo. Trans. Roy. Soc., vol. 53, 379-418, 1763*). Si fa notare per inciso che, come si desume dal titolo del lavoro di Bayes, la sua analisi riguardava un generico problema di probabilità, e non aveva alcun riferimento con il problema della pratica medica, che allora era ancora molto spesso basata su interventi "magici" (come per esempio i famosi salassi e i serviziali, destinati a liberare il corpo dai cattivi umori).

Il teorema di Bayes è stato riscoperto e applicato al problema della diagnosi medica soltanto negli anni '70 (per un trattazione completa del teorema di Bayes, vedere Galen e Gambino, nel loro libro diventato da anni un classico[13]).

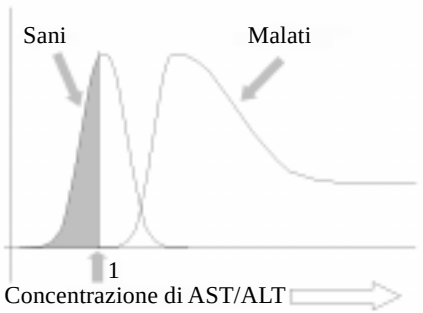
Si consideri di nuovo la situazione dell'epatite A, che è anche quella più frequente, nella quale la distribuzione dei risultati nei soggetti sani e nei soggetti malati sono parzialmente sovrapposte. Ci si domanda se sia più conveniente posizionare il valore soglia di transaminasi[14] in (1) o in (2). Nel primo caso, considereremmo malati anche alcuni soggetti sani. Nel secondo caso considereremmo sani anche alcuni soggetti malati.

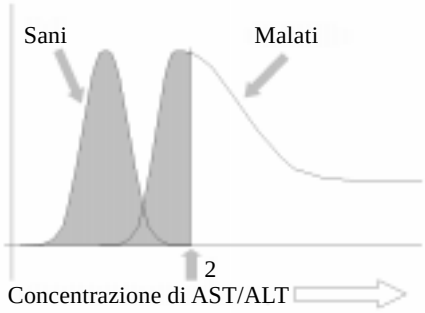
Esistono, tra questi due casi limite, anche una serie infinita di casi intermedi, per cui si po-

[13] *Galen RS, Gambino SR. Oltre il concetto di normalità: il valore predittivo e l'efficienza delle diagnosi mediche. Padova:Piccin Editore, 1980.*

[14] *Qui sono state indicate sia AST che ALT, ma ovviamente nella pratica si procede un test per volta.*

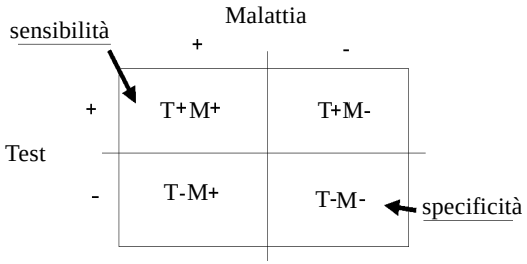
trebbe posizionare il valore soglia tra sani e malati in un punto qualsiasi compreso tra la soglia (1) e la soglia (2).





Il teorema di Bayes consente di dare un valore quantitativo, quindi oggettivo, ai vantaggi e agli svantaggi connessi con lo specifico valore soglia scelto per discriminare tra sani e malati.

Si consideri il caso di una malattia che può essere, in un soggetto, presente (soggetto malato, indicato come M+) o assente (soggetto sano, M-). Si consideri un test diagnostico per questa malattia (può essere indifferentemente un test di laboratorio o un segno clinico), test che può essere positivo (T+) o negativo (T-). Le possibili combinazioni di test e malattia sono quattro



Si definisca come *sensibilità* (T+M+) la positività del test nei malati (una sensibilità del 100% significa che il test è positivo nel 100% dei malati, una sensibilità del 90% significa che il test è positivo nel 90% dei malati, e così via).

Si definisca come *specificità* (T-M-) la negatività del test nei sani (una specificità del 100% significa che il test è negativo nel 100% dei sani, una specificità del 90% significa che il test è negativo nel 90% dei sani, e così via).

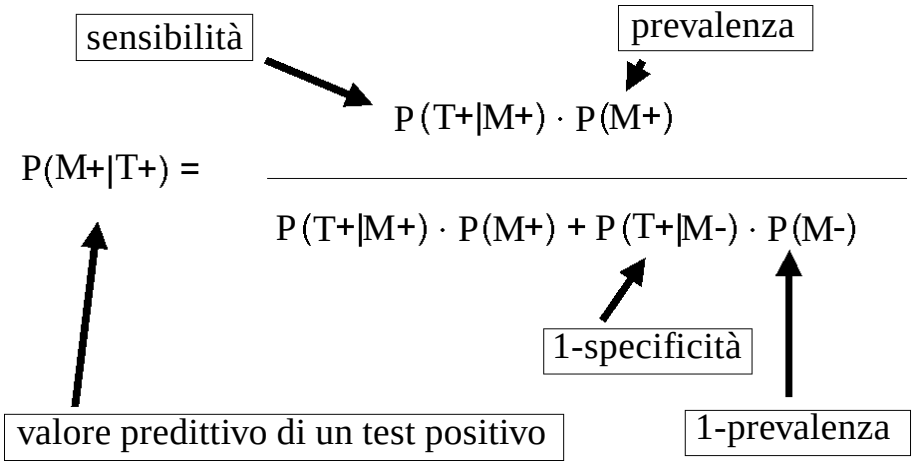
Si definisca infine come *prevalenza* della malattia il numero dei soggetti malati presenti, in un dato istante, nella popolazione.

Il teorema di Bayes, nella sua forma generale

$$P(A|B) = \frac{T(B|A) \cdot P(A)}{P(B|A) \cdot P(A) + P(B|\text{non } A) \cdot P(\text{non}A)}$$

si legge "*la probabilità di A dato B è uguale alla probabilità di B dato A per la probabilità di A e diviso per (la probabilità di B dato A per la probabilità di A più la probabilità di B dato non A per la probabilità di non A)*".

Nonostante la sua forma originale sia decisamente criptica, è sufficiente sostituire A con M+ (malati), sostituire B con T+ (test positivo) e non A con M- per ritrovare nel teorema di Bayes le grandezze elementari definite sopra: sensibilità, specificità e prevalenza. Date queste tre grandezze, è possibile di calcolare il *valore predittivo del test positivo*, ovvero la probabilità di essere malato per un soggetto che presenti un test positivo, come



che si legge " la probabilità di malattia dato un test positivo è uguale alla probabilità di test positivo data la malattia…[eccetera]…".

La patologia medica fornisce la probabilità che il test sia positivo in una data malattia. Il teorema di Bayes ribalta la logica e consente di ricavare da questa la probabilità di malattia in un soggetto con un test positivo (clinica medica)

Per brevità viene omessa la formula riguardante il valore predittivo del test negativo, e viene piuttosto introdotta la seguente terminologia semplificata, che consente di rendere ancora più intuitiva la formulazione del teorema

	Numero con risultato positivo	*Numero con risultato negativo*
Numero soggetti malati	**VP**	**FN**
Numero soggetti sani	**FP**	**VN**

essendo rispettivamente

- **VP** i veri positivi (soggetti malati correttamente classificati dal test come malati);
- **FP** i falsi positivi (numero di soggetti sani erroneamente classificati dal test come malati);
- **VN** i veri negativi (numero di soggetti sani correttamente classificati dal test come sani);
- **FN** i falsi negativi (numero di soggetti malati erroneamente classificati dal test come sani).

Se a queste grandezze si aggiunge sempre la

- **prevalenza della malattia = numero dei soggetti malati presenti, in un dato istante, nella popolazione**

risulta facilissimo calcolare, da una casistica di soggetti malati (con la malattia in esame) e di soggetti sani di riferimento (senza la malattia in esame), ai quali sia stato eseguito il test, le caratteristiche del test medesimo, e cioè:

- **sensibilità del test = [VP / (VP + FN)] · 100 =** positività nei malati
- **specificità del test = [VN/ (VN + FP)] · 100** = negatività nei sani

e combinando queste tre grandezze nella formula del teorema di Bayes, ovvero calcolandole come qui di seguito indicato, ottenere

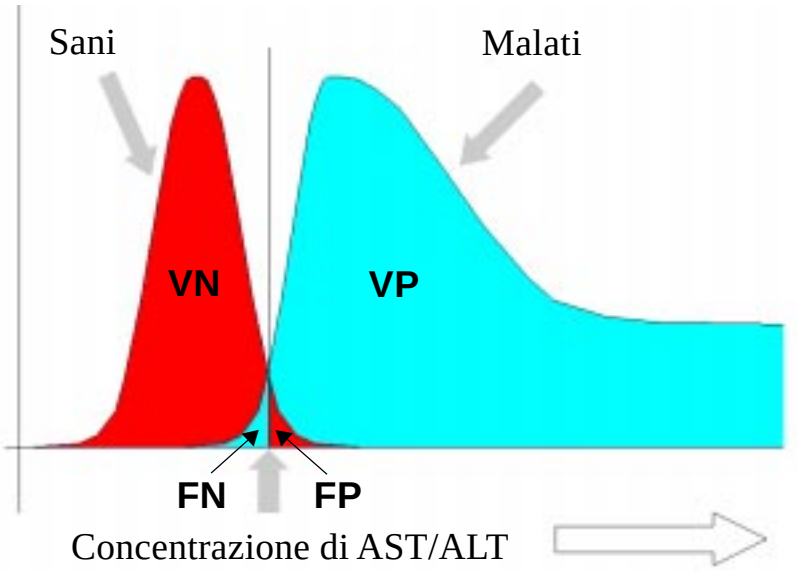
- **valore predittivo del test positivo = [VP / (VP + FP)] · 100** = probabilità di essere malato per un soggetto con il test positivo

➢ **valore predittivo del test negativo = [VN / (VN + FN)] · 100** = probabilità di essere sano per un soggetto con il test negativo

Per rispondere ad una domanda rimasta in sospeso, e cioè dove posizionare il valore soglia che discrimina tra sani e malti, si ricorre infine al calcolo della

➢ **efficienza diagnostica del test = [(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)] · 100**

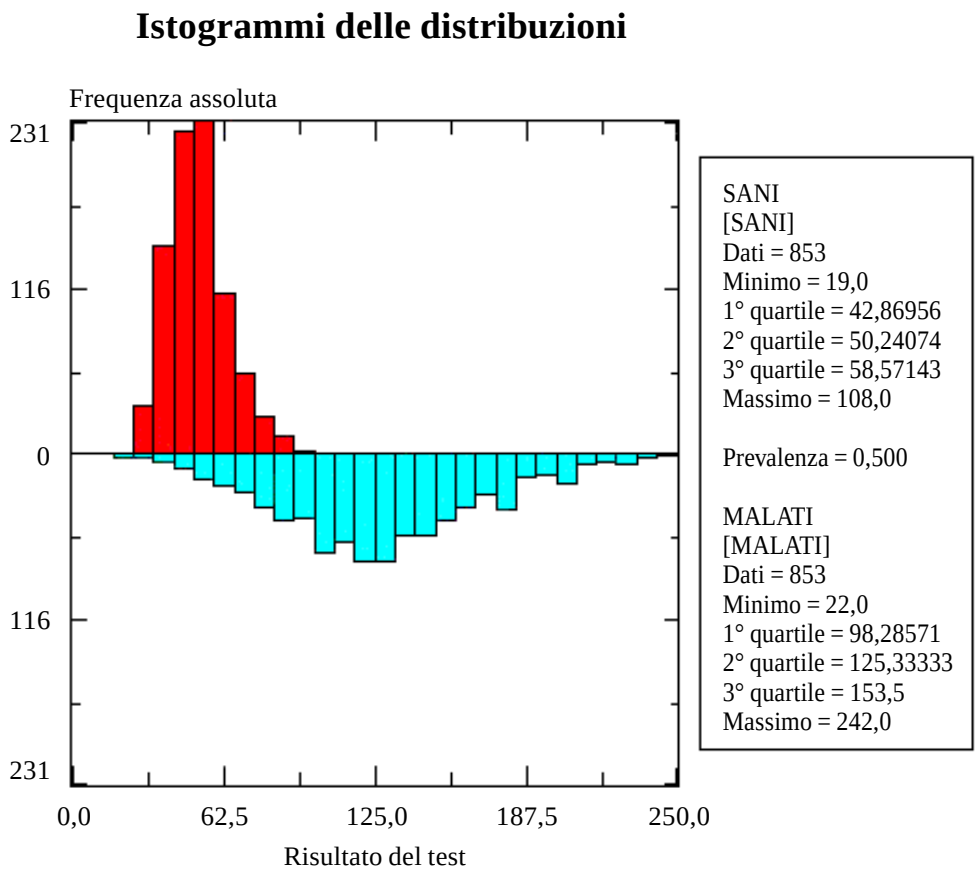
L'efficienza diagnostica massima (e questo vale anche per l'esempio dell'epatite virale di tipo A) corrisponde sempre ad un valore soglia intermedio tra quello più basso (caso 1 delle figure precedenti), che consentirebbe di classificare sempre correttamente tutti i malati, ma che corrisponde ad un massimo di soggetti sani classificati erroneamente come malati, e il valore soglia più alto (caso 2 delle figure precedenti), che consentirebbe di classificare sempre correttamente tutti i sani, ma che corrisponde ad un massimo di soggetti malati classificati erroneamente come sani. Questo concetto è illustrato nella figura.



Per una completa analisi bayesiana dei dati, che elimina il fastidio di dovere effettuare i calcoli semplici ma lunghi che essa comporta, è possibile utilizzare software statistici biomedici, come quello prodotto dall'Autore[15], cui si riferiscono le immagini del seguente esempio

[15] *Besozzi M. Ministat 2000. Un primer di biostatistica. Udine: PMS Pubblicazioni Medico Scientifiche, 2001:300pp.*

simulato. Si suppone di avere a disposizione i dati della determinazione della concentrazione nel siero di un certo analita, relativi a 853 soggetti sani e a 853 soggetti affetti da una malattia che provoca una patologia in aumento, una patologia cioè caratterizzata da un aumento della concentrazione dell'analita (nel caso di una patologia in diminuzione, cioè caratterizzata da una diminuzione della concentrazione dell'analita, bisogna semplicemente immaginare una situazione speculare a quella descritta). Le distribuzioni dei valori nei soggetti sani e nei soggetti malati sono poste a confronto nella figura seguente.



Nella tabella che segue è riportata l'analisi della casistica (VN = veri negativi, FP = falsi positivi, VP = veri positivi, FN = falsi negativi) per ciascuna delle classi in cui i dati sono stati suddivisi

			Sani		Malati	
Classe	da...	a...	VN	FP	VP	FN
1	0,0	8,33333	0	853	853	0
2	8,33333	16,66667	0	853	853	0
3	16,66667	25,0	2	851	850	3
4	25,0	33,33333	37	816	847	6
5	33,33333	41,66667	183	670	841	12
6	41,66667	50,0	408	445	831	22
7	50,0	58,33333	639	214	813	40
8	58,33333	66,66667	753	100	790	63
9	66,66667	75,0	809	44	763	90
10	75,0	83,33333	836	17	725	128
11	83,33333	91,66667	849	4	678	175
12	91,66667	100,0	852	1	632	221
13	100,0	108,33333	853	0	563	290
14	108,33333	116,66667	853	0	501	352
15	116,66667	125,0	853	0	425	428
16	125,0	133,33333	853	0	349	504
17	133,33333	141,66667	853	0	291	562
18	141,66667	150,0	853	0	233	620
19	150,0	158,33333	853	0	186	667
20	158,33333	166,66667	853	0	148	705
21	166,66667	175,0	853	0	120	733
22	175,0	183,33333	853	0	81	772
23	183,33333	191,66667	853	0	64	789
24	191,66667	200,0	853	0	48	805
25	200,0	208,33333	853	0	27	826
26	208,33333	216,66667	853	0	19	834
27	216,66667	225,0	853	0	13	840
28	225,0	233,33333	853	0	6	847
29	233,33333	241,66667	853	0	2	851
30	241,66667	250,0	853	0	0	853

Nella tabella che segue, viene riportata l'efficienza diagnostica del test (ultima colonna) in funzione dei livelli di soglia che è possibile fissare per discriminare tra sani e malati (prima colonna). Come si vede alla decima riga, la massima efficienza (0,84291) viene raggiunta se si considerano malati i soggetti con concentrazione uguale o superiore a 75, e sani i soggetti con concentrazione inferiore a 75. Si fa notare come sensibilità e specificità variano in modo opposto: fissando il valore soglia laddove si ha il massimo di sensibilità (1,0), il test risulterebbe totalmente aspecifico (darebbe cioè un risultato positivo anche a tutti i soggetti sani), mentre all'aumentare della specificità del test la sua sensibilità (la capacità cioè di identificare i malati) diminuisce.

Positivo se...	Sensibilità	Specificità	Efficienza
> 0,0	1,00000	0,00000	0,00000
> 8,33333	1,00000	0,00000	0,00000
> 16,66667	1,00000	0,00000	0,00000
> 25,0	0,99648	0,00234	0,00000
> 33,33333	0,99297	0,04338	0,03634
> 41,66667	0,98593	0,21454	0,20047
> 50,0	0,97421	0,47831	0,45252
> 58,33333	0,95311	0,74912	0,70223
> 66,66667	0,92614	0,88277	0,80891
> 75,0	0,89449	0,94842	0,84291
> 83,33333	0,84994	0,98007	0,83001
> 91,66667	0,79484	0,99531	0,79015
> 100,0	0,74091	0,99883	0,73974
> 108,33333	0,66002	1,00000	0,66002
> 116,66667	0,58734	1,00000	0,58734
> 125,0	0,49824	1,00000	0,49824
> 133,33333	0,40914	1,00000	0,40914
> 141,66667	0,34115	1,00000	0,34115
> 150,0	0,27315	1,00000	0,27315
> 158,33333	0,21805	1,00000	0,21805
> 166,66667	0,17351	1,00000	0,17351
> 175,0	0,14068	1,00000	0,14068
> 183,33333	0,09496	1,00000	0,09496

> 191,66667	0,07503	1,00000	0,07503
> 200,0	0,05627	1,00000	0,05627
> 208,33333	0,03165	1,00000	0,03165
> 216,66667	0,02227	1,00000	0,02227
> 225,0	0,01524	1,00000	0,01524
> 233,33333	0,00703	1,00000	0,00703
> 241,66667	0,00234	1,00000	0,00234
> 250,0	0,00000	1,00000	0,00000

Nella tabella che segue le caratteristiche del test il valore predittivo del test positivo e il valore predittivo del test negativo sono calcolati per ciascuno dei livelli soglia possibili.

			Valore predittivo del test	
Positivo se...	Sensibilità	Specificità	test positivo	test negativo
> 0,0	1,00000	0,00000	0,50000	###
> 8,33333	1,00000	0,00000	0,50000	###
> 16,66667	1,00000	0,00000	0,50000	###
> 25,0	0,99648	0,00234	0,49971	0,40000
> 33,33333	0,99297	0,04338	0,50932	0,86047
> 41,66667	0,98593	0,21454	0,55659	0,93846
> 50,0	0,97421	0,47831	0,65125	0,94884
> 58,33333	0,95311	0,74912	0,79163	0,94109
> 66,66667	0,92614	0,88277	0,88764	0,92279
> 75,0	0,89449	0,94842	0,94548	0,89989
> 83,33333	0,84994	0,98007	0,97709	0,86722
> 91,66667	0,79484	0,99531	0,99413	0,82910
> 100,0	0,74091	0,99883	0,99842	0,79404
> 108,33333	0,66002	1,00000	1,00000	0,74628
> 116,66667	0,58734	1,00000	1,00000	0,70788
> 125,0	0,49824	1,00000	1,00000	0,66589
> 133,33333	0,40914	1,00000	1,00000	0,62859
> 141,66667	0,34115	1,00000	1,00000	0,60283

>	150,0	0,27315	1,00000	1,00000	0,57909
>	158,33333	0,21805	1,00000	1,00000	0,56118
>	166,66667	0,17351	1,00000	1,00000	0,54750
>	175,0	0,14068	1,00000	1,00000	0,53783
>	183,33333	0,09496	1,00000	1,00000	0,52492
>	191,66667	0,07503	1,00000	1,00000	0,51949
>	200,0	0,05627	1,00000	1,00000	0,51448
>	208,33333	0,03165	1,00000	1,00000	0,50804
>	216,66667	0,02227	1,00000	1,00000	0,50563
>	225,0	0,01524	1,00000	1,00000	0,50384
>	233,33333	0,00703	1,00000	1,00000	0,50176
>	241,66667	0,00234	1,00000	1,00000	0,50059
>	250,0	0,00000	1,00000	###	0,50000

Quindi dato che, sulla base del criterio di massima efficienza del test, è stato scelto come livello di discriminazione tra sani e malati il valore di 75,0, è possibile fornire una misura quantitativa, e oggettiva, delle caratteristiche del test, che sono:

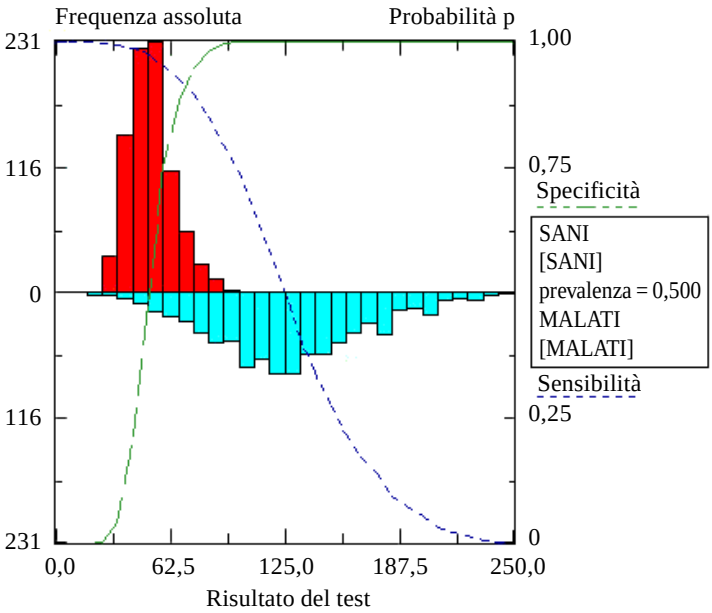
- ***sensibilità = 0,89449***
- ***specificità = 0,94842***
- ***valore predittivo del test positivo = 0,94548***
- ***valore predittivo del test negativo = 0,89989***

(chi preferisce i valori percentuali, deve solo moltiplicare tali valori per cento. I valori indicati con # non sono computabili).

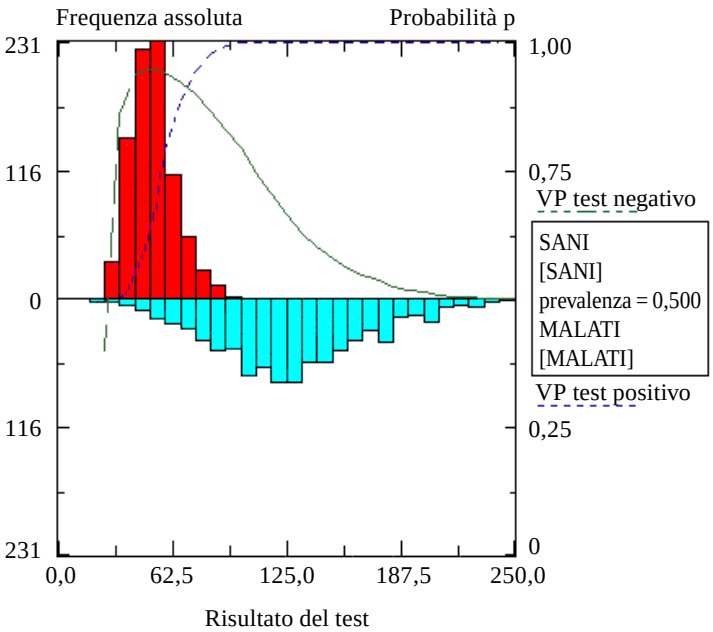
La rappresentazione grafica dell'andamento della sensibilità e della specificità in funzione del valore soglia prescelto è riportata nella prima delle due figure successive.

La rappresentazione grafica dell'andamento del valore predittivo del test positivo e del valore predittivo del test negativo in funzione del valore soglia prescelto è riportata nella seconda delle due figure successive.

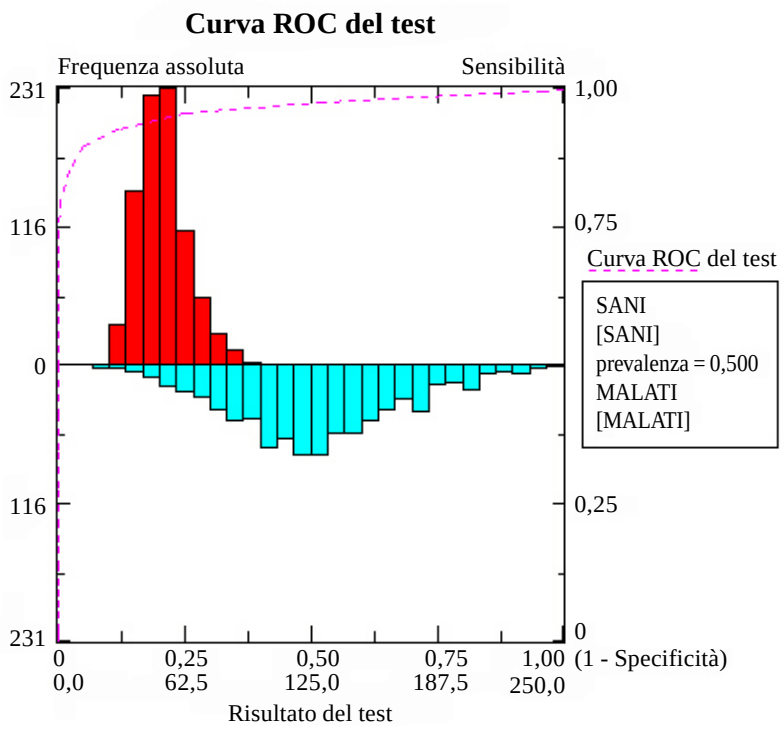
Sensibilità e specificità del test



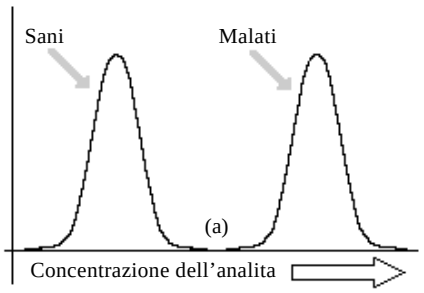
Valore predittivo del tes



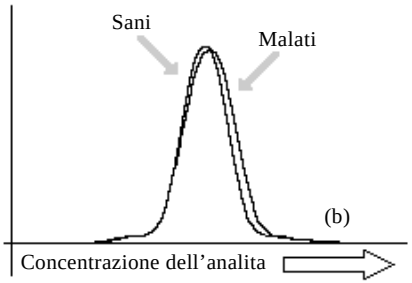
Infine riportando in un grafico in ordinate la sensibilità e in ascisse (1- specificità) si può ottenere la curva caratteristica (curva ROC) del test

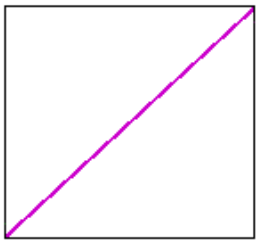


In pratica le curve ROC riassumono in un unico indice le grandezze bayesiane illustrate analiticamente in precedenza, e forniscono una descrizione cumulativa del grado di sovrapposizione tra la distribuzione dei sani e dei malati, come indicato dalla corrispondenza tra questo e le curve ROC qui riportata.

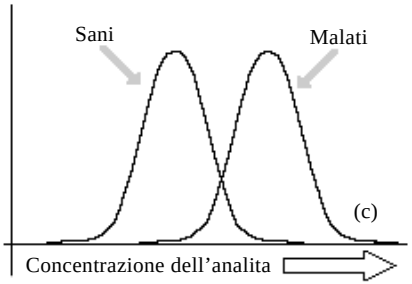


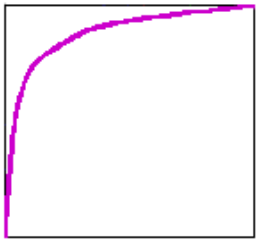
Curva ROC di un test ideale





Curva ROC di un test "inutile"





Curva ROC di un test reale

Un esempio di come il teorema di Bayes in realtà possa essere applicato in modo intuitivo, è il seguente. Si consideri un test destinato a rivelare la presenza nel siero di anticorpi anti-HIV. Si assuma che questo test abbia una sensibilità del 100% (il test, quindi, è positivo nel 100% dei malati). Si assuma che questo test abbia una specificità del 99.7% (il test, quindi, è negativo nel 99.7% dei soggetti sani). Si sa che la prevalenza della positività agli anticorpi anti-HIV è del 3 per mille (nella popolazione, su 1.000 soggetti presi a caso, 3 sono positivi agli anticorpi anti-HIV). Supponendo di effettuare il test su 1.000 soggetti presi a caso i risultati saranno i seguenti: 3 soggetti presenteranno positività agli anticorpi anti-HIV, in quanto la prevalenza è del 3 per mille (veri positivi); inoltre effettuando l'analisi su 1.000 soggetti, a causa del fatto che la specificità del test è del 99.7% ci dovremo aspettare altri 3 positivi (falsi positivi). Essendo in totale 6 i soggetti positivi, e 3 i veri positivi, avremo quindi un valore predittivo del test positivo pari a 3/6, cioè un valore predittivo del test positivo pari al 50% (*p* pari a 0.5).

L'esempio riportato si presta a una prima importante considerazione.

Il teorema di Bayes rappresenta l'unico strumento che consente di fornire una misura quantitativa, e quindi oggettiva, del valore aggiunto fornito da un test diagnostico (per esempio un'analisi di laboratorio).

Nel caso degli anticorpi anti-HIV, la differenza tra la probabilità di essere malati a posteriori (dopo avere effettuato il test, pari al 50%) e la probabilità di essere malati a priori (prima di avere effettuato il test, pari al 3 per mille) rappresenta appunto il valore aggiunto che il test è in grado di fornire, in termini di informazione, alla diagnosi clinica.

La seconda considerazione parte dal fatto che la determinazione degli anticorpi anti-HIV, un test di primo livello poco costoso, consente di restringere da 1.000 a 6 soli individui la rosa dei candidati ad essere sottoposti al test di secondo livello, la western-blot. Che è sì risolutivo dal punto di vista diagnostico, ma che ha un costo (135.100 lire il rimborso previsto da Servizio Sanitario Nazionale, tariffario del 1996) enormemente superiore a quello degli anticorpi (17.000 lire il rimborso previsto da Servizio Sanitario Nazionale, tariffario del 1996). Eseguire la western-blot a 6 individui su mille è ragionevole, mentre eseguirla a 1.000 su 1.000 sarebbe uno spreco di risorse inaccettabile.

L'analisi bayesiana è la sola che possa fornire gli indicatori necessari per effettuare una valutazione oggettiva del rapporto costi/benefici di una strategia diagnostica, e quindi di valutarne la razionalità nei confronti di strategie diagnostiche alternative.

Dal rapporto tra costi (in termini sia economici sia di diagnosi non corrette) e benefici (sia in termini economici sia di diagnosi corrette) dei diversi percorsi diagnostici si può arrivare al consenso degli operatori su una strategia diagnostica (anche se la praticabilità in sé della strategia diagnostica continuerà ovviamente a dipendere dal contesto economico e culturale, quindi sostanzialmente dai vincoli economici e dai vincoli etici che alla strategia sono attribuiti).

La terza considerazione parte dall'osservazione che un test con sensibilità del 100% e specificità del 100% è un test che ha per definizione un valore predittivo del test positivo del 100%. Nel caso esemplificato degli anticorpi anti-HIV le caratteristiche del test erano pressoché ideali (sensibilità del 100% e specificità del 99,7%). Ma nonostante questo il valore predittivo del test positivo risultava del 50% "solamente".

In condizioni di bassa prevalenza riduzioni anche minime della specificità di un test possano comportare drastiche riduzioni del valore predittivo del test positivo.

Questo non avviene per il valore predittivo del test negativo, che, essendo calcolato [VN / (VN + FN)] · 100, risulterà uguale a 994/994 cioè uguale al 100% (o se si preferisce uguale a 1): un test negativo consente di escludere la malattia.

In condizioni di bassa prevalenza associate a bassa specificità di un test, aumenta il valore predittivo del test negativo.

Errori e sbagli

Per comprendere gli altri modelli matematico-statistici alla base del processo decisionale medico, è necessario ora fare una breve digressione sul concetto di errore, e sui modelli statistici che lo descrivono.

A causa dei limiti inerenti ai sistemi (*strumenti di misura*) impiegati per rilevare i segnali provenienti dalle grandezze fisiche, ogni misura sperimentale (quindi anche quella effettuata nel laboratorio clinico) è inevitabilmente accompagnata da un qualche grado di *incertezza*. D'altra parte si può assumere che esista, ogniqualvolta viene effettuata una misura sperimentale, un valore teorico, detto *valore vero*: quello che si otterrebbe se la misura non fossa affetta da alcuna incertezza. Per effetto dell'incertezza che la caratterizza, la misura sperimentale rappresenta una *stima* più o meno approssimata del valore vero: la differenza tra una singola misura sperimentale e il suo valore vero rappresenta l'*errore*.

Ripetendo più volte una misura, è possibile pervenire ad una migliore caratterizzazione dell'errore. In un insieme di misure ripetute, si definisce come *errore casuale* l'errore per cui le singole misure differiscono (casualmente, cioè senza nessuna regola apparente al succedersi delle misure stesse) tra di loro, e come *errore sistematico* l'errore per cui l'insieme (preso globalmente) delle misure ripetute si discosta dal valore vero. L'errore, l'errore casuale e l'errore sistematico sono legati all'incertezza intrinseca alle nostre conoscenze scientifiche a causa dei limiti inerenti ai sistemi (*strumenti di misura*) impiegati per rilevare i segnali provenienti dalle grandezze fisiche.

L'errore deve essere mantenuto distinto dallo *sbaglio* (*errore grossolano*), che è un accidente tecnico, e che come tale si manifesta nel corso dell'applicazione delle conoscenze[16]. Gli sba-

[16]*Nel Vocabolario illustrato della lingua italiana di G. Devoto e G. C. Oli si trova che "[sbaglio]...condivide con errore...tutte le determinazioni, ma gnrl. differisce nel senso di un'attenuazione dell'importanza e della gravita'...". A fronte di questo impiego del termine nel linguaggio comune, sta il fatto che lo sbaglio viene dallo stesso vocabolario ulteriormente definito come "..mancanza nei confronti di un ordine corretto o di una regola...": questa definizione si avvicina molto a quella qui data di sbaglio come accidente tecnico. Più concisamente ne Lo Zingarelli 1995 di N. Zingarelli lo sbaglio viene definito come "...equivoco, disattenzione, svista...", in un senso che va ancora più chiaramente nella direzione del significato qui adottato.*

gli sono legati prevalentemente all'organizzazione e quindi ai processi di comunicazione (esempi di sbagli possono essere l'errata trascrizione di un dato numerico, l'utilizzo di un reagente scaduto, lo sbaglio nell'identificazione del campione, lo sbaglio nell'interpretazione del risultato di un test di gravidanza acquistato in farmacia ed eseguito a casa propria dalla paziente, che ha frainteso i criteri per l'interpretazione dei risultati del test). Contrariamente a quanto avviene per gli errori, gli sbagli si possono evitare operando con cura, e migliorando il sistema organizzativo. Contrariamente a quanto avviene per gli errori, non è possibile fissare un livello di tolleranza per gli sbagli, cioè definire una percentuale ammissibile di sbagli: semplicemente, gli sbagli per definizione non si devono (dovrebbero) verificare[17].

La confidenza (o fiducia) statistica

La scienza è nata con il *metodo*. Tuttavia la scienza moderna è nata dopo l'abbandono della visione deterministica, e con la nascita dell'approccio *statistico/probabilistico*. Le moderne teorie scientifiche (come la meccanica quantistica) sono teorie di tipo essenzialmente statistico. Eppure, a dimostrazione della loro efficacia, basti pensare che senza di loro non esisterebbero l'energia atomica e nucleare, il laser, i semiconduttori, la microelettronica: e anche il computer sul quale sto scrivendo non esisterebbe. Tutto ciò è stato reso possibile dall'utilizzo di strumenti matematici (*probabilità e statistica*) che, rinunciando all'ambizione di fornire conclusioni certe in assoluto (dimostratasi illusoria), consentono peraltro di ottenere, riguardo gli eventi studiati, conclusioni la cui validità è comunque caratterizzata da un grado di certezza noto. La *confidenza* (o *fiducia*) statistica fornisce una misura oggettiva del grado di affidabilità che possiamo attribuire alle nostre conclusioni. La confidenza statistica si riflette nel concetto di *significatività statistica*: risulta significativa una conclusione statistica nella quale possiamo riporre un grado sufficientemente elevato di confidenza. In genere quando la probabilità di sbagliare nel trarre dai dati una specifica conclusione risulta inferiore al 5%, la conclusione è accettata, in quanto considerata *statisticamente significativa*.

La distribuzione gaussiana

Essendo π uguale a 3,1415 ed essendo e la base dei logaritmi naturali (e = 2,7183), per un dato valore della x l'equazione della distribuzione gaussiana

---

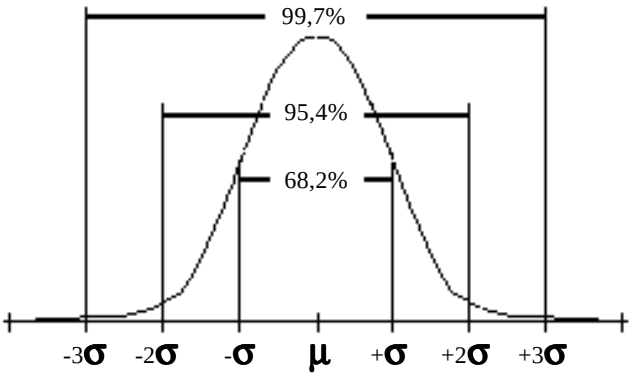
[17] *Baldini M. L'errore nella scienza. Biochim Clin 1991;15:28-38.*

$$y = [\, 1 / (\sigma \cdot \sqrt{2\pi}) \,] \cdot e^{-(x-\mu)^2 / 2\sigma^2}$$

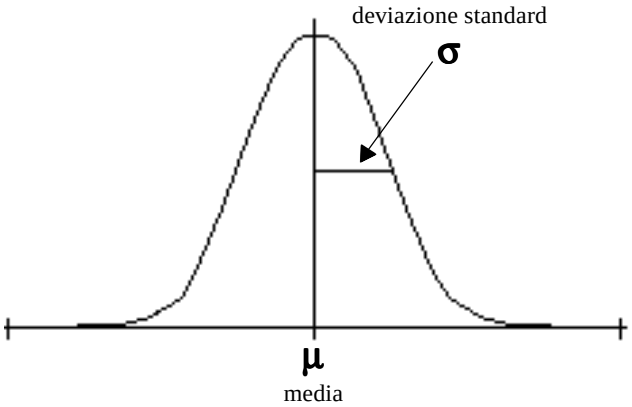
risulta completamente determinata dai due soli valori μ e σ.

Il valore μ (la *media della popolazione*) rappresenta la misura di posizione della distribuzione gaussiana, mentre il valore σ (la *deviazione standard della popolazione*) rappresenta la misura di dispersione della distribuzione gaussiana.

Per convenzione la distribuzione gaussiana teorica viene assunta come avere una media $\mu = 0$ e una deviazione standard $\sigma = 1$. In questo modo la superficie sottesa dalla curva gaussiana teorica ha una superficie uguale a 1, che corrisponde al valore di probabilità $p = 1$ che include tutte le osservazioni. Risulta pertanto facile calcolare il numero (espresso in percentuale) delle osservazioni che cadono all'interno di un dato intervallo (per esempio entro un numero dato di deviazioni standard rispetto alla media).



Per confrontare una distribuzione gaussiana (o ritenuta tale) con la gaussiana teorica è necessario standardizzare i risultati ottenuti in modo che la media osservata μ venga riportata a 0 e la deviazione standard osservata σ venga riportata a 1. In pratica ciò si ottiene trasformando ogni valore della x osservato nella corrispondente z (*deviata normale standardizzata*), essendo



$$z = (x - \mu) / \sigma$$

L'operazione inversa (trasformazione di una deviata normale standardizzata *z* nel valore *x* corrispondente ad un dato appartenente a una distribuzione gaussiana con media μ e deviazione standard σ risulta possibile applicando la trasformazione

$$x = \mu + \sigma \cdot z$$

In effetti, come riconoscono Snedecor e Cochran[18] "*...è stupefacente che la distribuzione gaussiana abbia dominato sia la teoria che la pratica statistica...*". Tuttavia sono gli stessi Autori a indicare i quattro argomenti a favore dell'utilizzo della statistica parametrica:

- la distribuzione di molte variabili è approssimativamente gaussiana;
- per distribuzioni non gaussiane, semplici trasformazioni matematiche (come per esempio la radice quadrata e la trasformazione logaritmica dei dati) consentono spesso di ottenere distribuzioni approssimativamente gaussiane;
- la distribuzione gaussiana può essere trattata facilmente in termini matematici;
- anche se la distribuzione della popolazione originaria non è gaussiana, la distribuzione delle medie campionarie tende a divenire gaussiana (teorema centrale del limite). Quest'ultimo è il singolo argomento più consistente a favore dell'utilizzo della distribuzione gaussiana in statistica.

La distribuzione gaussiana fornisce una descrizione dell'*errore* intrinseco ad ogni procedimento di misura.

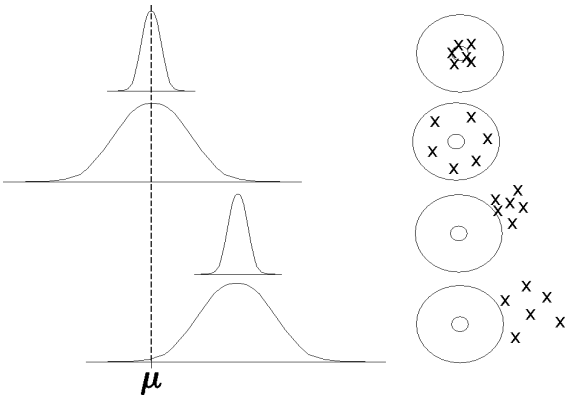
Precisione e accuratezza

Si consideri l'operazione di misura della concentrazione del colesterolo nel siero di un individuo, ripetuta *n* volte su un unico campione di siero, raccolto in un'unica volta. I concetti di base sottesi sono i seguenti:

- a causa dei limiti inerenti ai sistemi (*strumenti di misura*) impiegati per rilevare i segnali provenienti dalle grandezze fisiche, ogni *misura sperimentale* è inevitabilmente accompagnata da un qualche grado di *incertezza;*
- si può assumere che esista, ogniqualvolta viene effettuata una misura sperimentale, un valore teorico, detto *valore vero*: quello che si otterrebbe se la misura non fossa affetta da alcuna incertezza;

[18] *Snedecor G W, Cochran WG. Statistical Methods. VII Edition. Ames:The Iowa State University Press, 1980:41.*

- per effetto della incertezza che la caratterizza, la misura sperimentale rappresenta una *stima* più o meno approssimata del valore vero;
- la differenza tra una singola misura sperimentale e il suo valore vero rappresenta l'*errore*;
- ripetendo più volte una misura, è possibile pervenire ad una migliore caratterizzazione dell'errore;
- in un insieme di misure ripetute, si definisce come *errore casuale* l'errore per cui le singole misure differiscono (casualmente, cioè senza nessuna regola apparente al succedersi delle misure stesse) tra di loro;
- in un insieme di misure ripetute, si definisce come *errore sistematico* l'errore per cui l'insieme (preso globalmente) delle misure ripetute si discosta dal valore vero;
- un insieme di misure ripetute dello stesso fenomeno può essere riassunto sotto forma di una *distribuzione di frequenze*;
- nel caso degli errori di misura si assume generalmente che la distribuzione di frequenze segua un *modello gaussiano*;
- in una *distribuzione gaussiana* la *media aritmetica* è la *misura di posizione* della distribuzione, mentre la *deviazione standard* è la *misura di dispersione* dei dati attorno alla media;
- la *precisione* è il grado di concordanza di una serie di misure ripetute. Convenzionalmente la precisione, che non ha valore numerico, viene misurata in termini di una quantità (*imprecisione*) il cui valore diminuisce all'aumentare dell'attendibilità delle misure;
- l'*imprecisione*, calcolata come *deviazione standard* (*s*), può essere espressa sia come tale (e quindi nelle unità originali) che come percentuale della media (*deviazione standard relativa*, meglio nota come *coefficiente di variazione*, *CV*). L'imprecisione rappresenta una *stima* dell'errore casuale. Tale stima è tanto più attendibile quanto più numerose sono le misure utilizzate per effettuarla (*numerosità campionaria*);



- l'*accuratezza* è il grado di concordanza tra la media di una serie di misure ripetute e il valore vero. Convenzionalmente l'accuratezza viene misurata in termini di una quantità (*inaccuratezza*) il cui valore diminuisce all'aumentare dell'attendibilità delle misure;
- l'*inaccuratezza*, calcolata come differenza tra la media campionaria e il valore vero, può essere espressa sia come tale (e quindi nelle

unità originali) che come percentuale del valore vero. L'inaccuratezza rappresenta una *stima* dell'errore sistematico. Tale stima è tanto più attendibile quanto più numerose sono le misure utilizzate per effettuarla (numerosità campionaria).

Nella figura precedente, dall'alto verso il basso, rispetto al valore vero μ (valore atteso per la media) i valori sono precisi e accurati, imprecisi ma accurati, precisi ma inaccurati, imprecisi e inaccurati.

Imprecisione e inaccuratezza sono tra loro indipendenti, e forniscono una misura del grado di indeterminazione della misura effettuata.

In linea di principio l'inaccuratezza è eliminabile, e risulta oggi di fatto eliminata dalla maggior parte dei metodi analitici. Ove ciò non sia, metodi analitici diversi, che forniscono risultati diversi per lo stesso analita, sono riferiti ad intervalli di riferimento specifici per ciascun metodo, compensando con ciò il problema interpretativo.

In linea di principio l'imprecisione è ineliminabile (anche se oggi l'imprecisione dei metodi analitici è ormai contenuta entro limiti molto ristretti): di questo è necessario tenere conto nell'interpretazione dei risultati.

Screening, diagnosi e monitoraggio

Tre sono sostanzialmente gli obiettivi con i quali il medico richiede un'analisi di laboratorio: (i) effettuare una selezione (*screening*) dei pazienti candidati ad un trattamento preventivo, (ii) fare una *diagnosi* di malattia, (iii) effettuare il *monitoraggio* di un paziente per valutare l'andamento di una specifica malattia e/o di una specifica terapia. Nella seguente tabella, con alcuni semplici esempi, ciascuno di questi obiettivi clinici viene messo in relazione con il principale criterio interpretativo delle analisi di laboratorio che ad esso corrisponde.

Obiettivo clinico	***Risultato atteso***	***Esempio***	***Criterio interpretativo***	***Note***
Screening	Selezione degli individui per i quali risulta dimostrato che una diagnosi precoce consente di in-	Fenilchetonuria	Intervallo di riferimento	Il trattamento immediato del neonato previene l'instaurarsi di

	staurare un trattamento preventivo efficace			lesioni cerebrali irreversibili (oligofrenia fenilpiruvica)
		Portatori sani del HBsAg	Intervallo di riferimento	È possibile la vaccinazione del partner (trasmissione per via sessuale) e dei familiari dei portatori dell'antigene Australia (soggetti HBsAg positivi)
		Ipercolesterolemia	Valore desiderabile	Il trattamento consente di ridurre l'incidenza delle lesioni cardiovascolari
Diagnosi	Conferma o esclusione dello stato di malattia di un singolo individuo	Epatite	Intervallo di riferimento	È generalmente necessario integrare i risultati di più analisi (transaminasi, bilirubina, marcatori sierologici dell'epatite)
Monitoraggio della malattia	Valutazione dell'andamento della malattia	PSA	Differenza critica	Un aumento significativo dopo terapia radicale dell'adenocarcinoma prostatico deve indurre a ricercare le possibili recidive locali o a distanza
Monitoraggio degli effetti della terapia	Valutazione della necessità di modificare la terapia	Emoglobina glicata (HbA_{1c})	Intervallo di riferimento	Il mantenimento della HbA_{1c} entro l'intervallo di riferimento è indice di buon compenso, ed è accompagnato da riduzione delle complicanze (re-

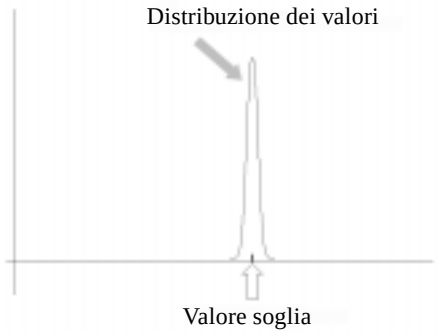
				tinopatia, nefropatia)
		Colesterolo	Differenza critica	Una riduzione significativa è indice di efficacia della terapia
Monitoraggio terapeutico dei farmaci	Mantenimento dei livelli ematici del farmaco all'interno dell'intervallo che garantisce risultati terapeutici efficaci senza o con ridotti effetti collaterali	Digossina	Intervallo terapeutico	

Come appare nella precedente tabella, il principale criterio interpretativo delle analisi di laboratorio varia nelle differenti situazioni.

Confronto dei risultati con un valore soglia

Il criterio interpretativo più comune di un risultato è quella basato sugli ***intervalli di riferimento***, che esprimono i limiti (limite inferiore, limite superiore o entrambi) all'interno dei quali si collocano i risultati dell'analisi in questione nel 95% dei soggetti sani.

Nella figura è presentata la situazione tipica della decisione quando un risultato viene confrontato con gli intervalli di riferimento. A causa dell'errore di misura (imprecisione) il risultato del paziente sarà rappresentato da uno qualsiasi dei valori che cadono all'interno della distribuzione dell'errore di misura (curva gaussiana). Quindi, nel caso specifico, se la maggior parte delle volte il valore ottenuto si troverà in prossimità del valore soglia, si daranno anche casi nei quali il valore risulterà al di sotto e casi nei quali risulterà al di sopra del valore soglia, anche se di poco (il problema non si porrà ovviamente nel caso di valori decisamente elevati o decisamente ridotti rispetto al valore soglia).



Valori prossimi al valore soglia devono essere interpretati in modo sfumato.

Nella tabella che segue è riportata la variabilità analitica osservata per alcuni comuni ana-

liti, espressa come coefficiente di variazione percentuale (CV%). Per ciascun analita, dato un valore vero di concentrazione, che corrisponde in genere ad un livello decisionale adottato nella pratica, sono riportati il limite inferiore e il limite superiore entro i quali oscilla, a causa della sola variabilità dovuta all'errore di misura, il valore che sarà effettivamente fornito. I limiti inferiore e superiore corrispondono ai limiti entro i quali è compreso il 95% delle osservazioni. In altre parole, se per esempio il valore vero della concentrazione dell'ALT in un paziente fosse uguale a 40 U/L, la sola incertezza della misura (errore di misura) porterebbe a un risultato sul referto compreso, nel 95% dei casi, tra 36 e 44 U/L. Ovviamente dato che nella distribuzione gaussiana i valori sono concentrati attorno alla media, è maggiore la probabilità di ottenere valori di 39 U/L che di ottenere valori di 38 o 37 o 36 U/L, ma resta il fatto che se si ripetesse la determinazione 100 volte, 95 valori risulterebbero compresi tra 36 e 44 U/L, ma comunque 5 valori risulterebbero addirittura superiori a 44 U/L o inferiori a 36 U/L!

Analita	*Variabilità analitica%*	*Limite inferiore*	*Valore vero*	*Limite superiore*	*Unità di misura*
17-ALFA IDROSSIPROGESTERONE	7,5	3,4	**4,0**	4,6	µg/L
ALANINA AMMINOTRANSFERASI (ALT,GPT)	5,0	36	**40**	44	U/L
ALBUMINA	1,3	3,5	**3,6**	3,7	g/L
ALDOSTERONE	7,5	128	**150**	173	ng/L
ALFA-1-GLICOPROTEINA ACIDA	5,0	108	**120**	132	mg/dL
ALFA-AMILASI	3,8	185	**200**	215	U/L
ANTIGENE CARBOIDRATICO 125	5,0	32	**35**	39	µg/L
ANTIGENE CARBOIDRATICO 15.3	3,8	28	**30**	32	kU/L
ANTIGENE CARBOIDRATICO 19.9	7,5	31	**37**	43	kU/L
ANTIGENE CARCINO-EMBRIONALE	6,3	4,4	**5,0**	5,6	µg/L
ANTIGENE PROSTATA SPECIFICO (PSA)	6,3	3,5	**4,0**	4,5	µg/L
APOLIPOPROTEINA A-I	2,5	105	**110**	116	mg/dL
APOLIPOPROTEINA B	2,5	152	**160**	168	mg/dL
APTOGLOBINA	7,5	204	**240**	276	mg/dL
APTT	2,5	1,1	**1,2**	1,3	ratio
ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI (AST, GOT)	7,5	34	**40**	46	U/L
BETA-2-MICROGLOBULINA	2,0	2,5	**2,6**	2,7	mg/L
BICARBONATO (Idrogenocarbonato)	1,3	22	**23**	24	mmol/L
BILIRUBINA DIRETTA	7,5	0,26	**0,30**	0,35	mg/dL
BILIRUBINA TOTALE	6,3	1,05	**1,20**	1,35	mg/dL
CALCIO TOTALE	0,8	8,4	**8,5**	8,6	mg/dL
CERULOPLASMINA	2,0	58	**60**	62	mg/dL
CLORURO	0,8	96	**98**	100	mmol/L
COLESTEROLO HDL	2,5	38	**40**	42	mg/dL
COLESTEROLO LDL	2,5	124	**130**	137	mg/dL

COLESTEROLO TOTALE	2,0	192	**200**	208	mg/dL
COLINESTERASI	2,5	3325	**3500**	3675	U/L
COMPLEMENTO/C3	2,5	114	**120**	126	mg/dL
COMPLEMENTO/C4	3,8	46	**50**	54	mg/dL
CORTISOLO	5,0	23	**25**	28	µg/dL
CREATINA CHINASI-MB	7,5	5,1	**6,0**	6,9	%
CREATINCHINASI	6,3	166	**190**	214	U/L
CREATININA	2,0	1,5	**1,6**	1,7	mg/dL
EMOCROMOCITOMETRICO					
Emoglobina	0,8	11,8	**12,0**	12,2	g/dL
Eritrociti	0,8	4,7	**4,8**	4,9	10^{12}/L
Leucociti	3,8	4,6	**5,0**	5,4	10^{9}/L
Piastrine	2,5	95,0	**100,0**	105,0	10^{12}/L
Ematocrito	0,8	41,3	**42,0**	42,7	%
EMOGASANALISI					
pH	0,8	7,23	**7,35**	7,47	pH
pCO2	1,3	39	**40**	41	mmHg
pO2	1,3	19	**20**	21	mmHg
EMOGLOBINA GLICATA	2,0	5,6	**5,8**	6,0	%
ESTRADIOLO	6,3	131	**150**	169	pmol/L
FARMACI DIGITALICI (DIGOSSINA)	2,5	1,9	**2,0**	2,1	µg/L
FERRITINA	3,8	185	**200**	215	µg/L
FERRO	6,3	131	**150**	169	µg/dL
FIBRINOGENO	3,8	370	**400**	430	mg/dL
FOSFATASI ALCALINA	3,8	277	**300**	323	U/L
FOSFATO INORGANICO	2,5	4,3	**4,5**	4,7	mg/dL
FRUTTOSAMMINA	2,0	274	**285**	296	µmol/L
GAMMA-GLUTAMMIL TRANSPEPTIDASI	6,3	44	**50**	56	U/L
GLUCOSIO	1,3	107	**110**	113	mg/dL
GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI	3,8	92	**100**	108	U/10^{12} eritrociti
IgA	3,8	277	**300**	323	mg/dL
IgG	2,0	1728	**1800**	1872	mg/dL
IgM	3,8	231	**250**	269	mg/dL
INSULINA	5,0	16	**18**	20	mU/L
LATTATO DEIDROGENASI	3,8	416	**450**	484	U/L
LIPASI	3,8	185	**200**	215	U/L
LIPOPROTEINA(a)	6,3	35	**40**	45	mg/dL
LITIO	2,5	1,4	**1,5**	1,6	mmol/L
LUTEOTROPINA (LH)	6,3	17	**20**	23	U/L
MAGNESIO TOTALE	1,3	2,5	**2,6**	2,7	mg/dL
MICROALBUMINURIA	5,0	18	**20**	22	mg/L
OSTEOCALCINA	5,0	16	**18**	20	µg/L
POTASSIO	1,3	5,3	**5,4**	5,5	mmol/L

PROLATTINA	5,0	18	**20**	22	µg/L
PROTEINA C REATTIVA	3,8	0,9	**1,0**	1,1	mg/L
PROTEINE (ELETTROFORESI)		0,0		0,0	
Albumina	1,3	50,6	**52,0**	53,4	%
Alfa-1-globuline	3,8	5,5	**6,0**	6,5	%
Alfa-2-globuline	2,5	13,3	**14,0**	14,7	%
Beta-globuline	2,5	13,3	**14,0**	14,7	%
Gamma-globuline	2,5	19,0	**20,0**	21,0	%
PROTEINE TOTALI	1,3	6,3	**6,5**	6,7	g/dL
RAME	2,0	144	**150**	156	µg/dL
SODIO	0,8	138	**140**	142	mmol/L
TEMPO DI PROTROMBINA	2,0	1,2	**1,2**	1,2	INR
TEOFILLINA	5,0	18	**20**	22	mg/L
TESTOSTERONE	5,0	9	**10**	11	nmol/L
TIREOTROPINA (TSH)	5,0	4,2	**4,7**	5,2	mU/L
TIROXINA LIBERA (fT4)	3,8	23	**25**	27	µmol/L
TRANSFERRINA	2,0	240	**250**	260	mg/dL
TRIGLICERIDI	7,5	170	**200**	230	mg/dL
TRIIODOTIRONINA LIBERA (fT3)	3,8	6,0	**6,5**	7,0	pmol/L
URATO	3,8	6,5	**7,0**	7,5	mg/dL
UREA	3,8	46	**50**	54	mg/dL
VES (1 ora)	6,3	17	**20**	23	mm

Una interpretazione sfumata del dato è ancora più importante nel caso di test qualitativi, per i quali la risposta è del tipo “negativo” o “positivo”. In questi casi è possibile che il laboratorio fornisca occasionalmente un risultato come “dubbio” proprio in relazione al fatto che il valore osservato cade all’interno della zona di indeterminazione (“zona grigia”).

Un altro criterio infine deve essere tenuto in conto nel caso di test sierologici, per la diagnosi di malattie infettive, per le quali il risultato atteso è quello di un aumento nel tempo degli anticorpi specifici. Qualora si sia avuta la possibilità di eseguire l’analisi sia durante la fase acuta della malattia sia durante la convalescenza (con un intervallo di circa 15 giorni fra i due prelievi), risulta indicativo di infezione recente un valore superiore a 4 del rapporto fra il titolo ottenuto durante la convalescenza e quello ottenuto durante la fase acuta della malattia

Gli stessi criteri indicati per gli intervalli di riferimento si applicano nei seguenti casi, nei quali viene effettuato il confronto tra il valore ottenuto e un valore soglia:

- ***valori desiderabili***, cioè valori definiti in apposite “Consensus Conference” in relazione ad obiettivi specifici. Tale è il caso del colesterolo, per il quale è stato definito come valore desiderabile quello inferiore a 200 mg/dL, il cui raggiungimento consente una significativa riduzione del rischio di affezioni cardiovascolari;

- ***valori di allerta***, i valori che comportano invece la necessità di un intervento medico rapido. Uno dei casi meno drammatici è quello del colesterolo, che quando supera la soglia dei 240 mg/dL, richiede un intervento farmacologico rapido;
- ***intervalli terapeutici dei farmaci***, cioè gli intervalli di concentrazione che garantiscono effetti terapeutici efficaci senza o con ridotti effetti collaterali soprattutto per quelli a ridotto indice terapeutico (quelli per i quali la dose efficace è molto vicina a quella tossica, come tipicamente avviene per i farmaci digitalici).

Intervalli di riferimento, valori desiderabili, valori critici e intervalli terapeutici dei farmaci sono riportati nel capitolo dedicato ai valori decisionali.

Confronto tra due risultati: le differenze critiche

Le differenze critiche non sono di per sé un concetto nuovo. In effetti, il medico ha sempre applicato, a livello intuitivo, l'analisi comparativa di due successivi risultati di laboratorio al fine di valutare l'andamento clinico del paziente. Quello che rappresenta la vera novità è la possibilità di sostituire ad una valutazione intuitiva, una valutazione quantitativa, quindi più oggettiva, basata su un modello matematico-statistico semplice, ma in grado di fornire delle conclusioni basate su un grado di confidenza (grado di fiducia) noto. Per comprendere questo sono necessarie ancora alcune premesse.

A causa della presenza dell'errore, qualsiasi risultato analitico presenta un certo grado di incertezza. Chiamiamo globalmente *variabilità analitica* (CV_a) questa incertezza. Ma non basta. Il risultato analitico presenta un ulteriore grado di incertezza, legato al fatto che i valori di concentrazione degli analiti presenti nel sangue (e nei fluidi interstiziali) non sono affatto costanti, ma variano in continuo, anche nel soggetto sano, attorno al punto omeostatico. E nonostante essi rimangano mediamente costanti (un concetto squisitamente statistico), in un dato istante (per esempio al momento del prelievo di sangue) possono discostarsi dal punto omeostatico anche in modo piuttosto rilevante. Chiamiamo globalmente *variabilità biologica intraindividuale* (CV_b) l'incertezza del risultato analitico legata alle fluttuazioni fisiologiche delle concentrazioni degli analiti.

In base a queste considerazioni, risulta che la *variabilità totale* (CV_{tot}), cioè il grado di incertezza globale che accompagna un singolo risultato, è uguale alla somma (quadratica, come è necessario quando si devono sommare gli errori) della variabilità analitica e della variabilità biologica, ovvero è uguale a

$$CV_{tot} = (CV_a^2 + CV_b^2)^{1/2}$$

Com'è facile intuire, poiché qualsiasi risultato analitico risulta inevitabilmente affetto da un'incertezza pari alla somma della variabilità analitica e della variabilità biologica, l'espressione sopra riportata gioca un ruolo fondamentale nel calcolo delle differenze critiche.

Un'ulteriore (ultima) precisazione. Obiettivo del moderno laboratorio clinico non è quello di fornire risultati senza errore (obiettivo irraggiungibile), e neppure quello di ridurre sempre più l'errore analitico senza tenere conto del rapporto costi/benefici di tale continua riduzione. Obiettivo del moderno laboratorio clinico è piuttosto quello, pragmatico ma razionale ed efficace, di fornire risultati nei quali l'incertezza derivante dall'errore analitico sia sostanzialmente irrilevante rispetto a quella derivante dalla variabilità biologica intrinseca al soggetto. Se mi si consente l'analogia, che dal punto di vista della teoria dell'informazione è non solo formale bensì sostanziale, il laboratorio del 2000 sta al laboratorio degli anni '50 come il Compact Disc (CD) sta alla musicassetta. Il miglioramento del rapporto segnale/rumore del CD è tale da consentire di riconoscere, nel brano musicale, tutti i dettagli che l'orecchio potenzialmente sa discernere. Ormai il rumore è ridotto a livelli ininfluenti. Aumentare la fedeltà del CD oltre questo limite sarebbe possibile, ma sostanzialmente sarebbe inutile.

Attualmente si raccomanda, come obiettivo per l'errore analitico, una variabilità analitica (CV_a) inferiore alla metà della variabilità biologica intraindividuale (CV_b), vale a dire:

$$CV_a < 0{,}5 \cdot CV_b$$

Questo fa sì che, al termine del procedimento analitico, la variabilità totale del risultato analitico sia solamente lo 11,8% (o meno) in più di quella derivante dalla sola variabilità biologica. Anche se in sé il valore dello 11,8% può apparire arbitrario, è evidente come, in tal modo, un metodo analitico finisca con l'introdurre, nel *segnale* rappresentato dalla concentrazione dell'analita, una quantità di *rumore* sostanzialmente irrilevante. Il modello delle differenze critiche qui presentato assume che la variabilità analitica sia uguale alla metà della variabilità biologica: un traguardo che è ormai stato quasi completamente raggiunto dai buoni laboratori.

Il modello delle differenze critiche richiede di considerare che le misure che portano alle conclusioni (informazioni) cliniche sono affette da errore: conseguentemente le conclusioni cui si giunge sono conclusioni valide non in assoluto, ma con un livello noto di confidenza (fiducia) statistica. Come già accennato, in genere quando la probabilità di sbagliare nel trarre dai dati una specifica conclusione risulta inferiore al 5%, la conclusione viene generalmente ac-

cettata. Nel caso del modello delle differenze critiche è utilizzato il livello di significatività del 5%.

Le differenze critiche possono essere calcolate facilmente, conoscendo la variabilità analitica e la variabilità biologica che caratterizzano un dato analita, come

$$\textit{Differenza critica} = 2{,}77 \cdot (CV_a^2 + CV_b^2)^{1/2}$$

Conoscendo il valore della variabilità analitica CV_a di un dato metodo analitico e il valore della variabilità biologica CV_b dell'analita in questione, è quindi elementare calcolare il valore della differenza critica corrispondente. Se la differenza tra due valori consecutivamente osservati in un dato soggetto eccede il valore della differenza critica, si è autorizzati a ritenere, con una probabilità del solo 5% di sbagliare (è questo il livello di confidenza statistica impiegato) che i due valori differiscono significativamente tra loro.

I valori delle differenze critiche dei principali analiti sono riportati nel capitolo dedicato ai *valori decisionali*.

Nel confrontare tra di loro due risultati in un paziente che sia in uno stato di salute stabile, è necessario tenere conto del fatto che la maggior parte della variabilità osservata è dovuta alla variabilità biologica del soggetto!

Per questo, data la grande variabilità biologica ad esempio dei trigliceridi, non ci si deve sorprendere se nello stesso paziente questi sono una volta 350 mg/dL e la volta successiva 250 mg/dL: una variazione di questa entità è spiegata dalla sola variabilità biologica.

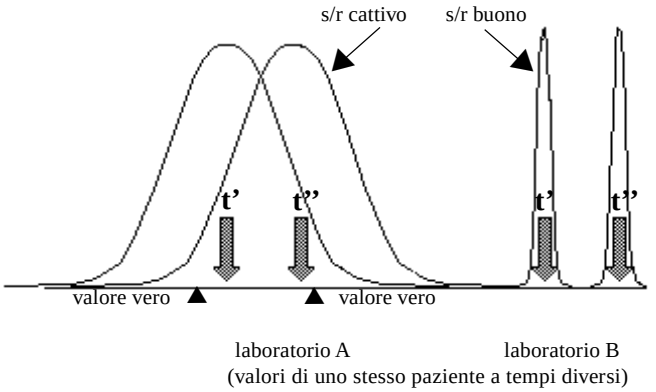
La standardizzazione delle condizioni in cui viene effettuato il prelievo (il mattino, a digiuno) ha lo scopo di ridurre la componente di incertezza legata alla variabilità biologica.

Così nel caso dei trigliceridi (e in generale di lipidi del siero) è facile osservare che garantendo sempre almeno 12 ore di digiuno la variabilità si riduce significativamente, e consente di valutare meglio lo stato di base del paziente.

Un esempio chiarisce il ruolo confondente dell'imprecisione (dovuta alla variabilità analitica e alla variabilità biologica sommate) e dell'inaccuratezza come fattori di "rumore" e quindi di disturbo del processo decisionale.

A un paziente sono effettuati due prelievi di sangue, uno al tempo t' e uno al tempo t", al fine di determinare la concentrazione di un farmaco (teofillina) nel siero. Quello che interessa, in

Il rapporto segnale/rumore



questo caso, è di stabilire se la concentrazione del farmaco al tempo t" differisca significativamente da quella rilevata al tempo t', per capire se all'aumento nella posologia del farmaco stabilito dal medico corrisponda un aumento della sua concentrazione nel siero. Per questo i due campioni sono suddivisi ciascuno in due aliquote, che sono inviate contemporaneamente in due laboratori diversi (laboratorio A e laboratorio B), che ottengono risultati diversi. Le concentrazioni rilevate nel laboratorio A sono molto vicine al "valore vero" della concentrazione del farmaco nel siero, essendo il "valore vero" il valore di concentrazione che si avrebbe se un laboratorio fosse in grado di effettuare le misure della concentrazione del farmaco senza errore. Le concentrazioni rilevate nel laboratorio B sono molto lontane dal "valore vero" della concentrazione del farmaco nel siero. Tuttavia il laboratorio A, che appare più accurato del laboratorio B, è più impreciso di questo. Se consideriamo come segnale la differenza tra la concentrazione del farmaco al tempo t' e quella al tempo t", il laboratorio A fornisce risultati che sono affetti da un rapporto segnale/rumore tale da renderli indistinguibili tra di loro. In effetti l'incertezza che caratterizza i risultati delle due determinazioni appare tale che le distribuzioni da cui essi sono tratti sono praticamente quasi indistinguibili. Diversa è la situazione del laboratorio B, per il quale il rapporto segnale/rumore appare buono, per cui l'incertezza che caratterizza i risultati delle due determinazioni appare contenuta, tanto che la concentrazione al tempo t" può essere agevolmente riconosciuta come diversa da quella presente al tempo t'.

Nell'esempio, se si fosse effettuata la determinazione al tempo t' nel laboratorio A e al tempo t" nel laboratorio B, si sarebbe introdotto un fattore confondente ulteriore, legato all'inaccuratezza di uno dei due laboratori. Un fattore che può non essere adeguatamente compensato dal fatto che i due laboratori utilizzino intervalli di riferimento differenti.

Nel confrontare tra di loro due risultati in un paziente l'inaccuratezza può essere eliminata facendo ripetere la determinazione sempre nello stesso laboratorio.

Test diagnostici e test predittivi

I ***test diagnostici*** sono quindi test che forniscono una probabilità di malattia. In alcuni casi (ma sono l'eccezione) la probabilità è uguale a 1, quindi si ha una diagnosi certa. È il caso della presenza di tre cromosomi 21 nel cariotipo di un soggetto fornisce con certezza la diagnosi di sindrome di Down (va peraltro tenuto presente che non è vero in contrario, in quanto la non presenza di tre cromosomi 21 non esclude tale sindrome, che può essere causata anche da una duplicazione della zona critica che la determina. Quindi se in questo caso il valore predittivo *p* del test positivo, rappresentato dalla presenza di tre cromosomi 21, è uguale a 1, il valore predittivo *p* del test negativo non è uguale a 1, quindi non esclude con certezza la malattia[19]).

I ***test predittivi*** sono invece quelli che prevedono la possibilità di fornire una probabilità di malattia *in futuro*. I test predittivi sono tipicamente test genetici, effettuati allo scopo di identificare nel progetto dell'organismo alterazioni in grado di determinare, nel tempo, l'insorgenza di una malattia. Allo scopo evidente di intervenire, laddove sia possibile, per prevenirla. La corea di Huntington e l'emocromatosi sono esempi di malattie su base genetica che si sviluppano nel tempo, e nelle quali una previsione di malattia può essere fatta su basi attendibili. Quello che fa più discutere è l'opportunità di effettuare analisi test predittivi in mancanza (e questo avviene ad esempio attualmente per la corea di Huntington) di qualsiasi possibile terapia. L'argomento solleva evidenti problemi bioetici (vedere ad esempio Bresciani[20]), è molto complesso, e non può essere qui ulteriormente trattato.

[19] *Ovviamente un moderno laboratorio di citogenetica è in grado di identificare anche la duplicazione della zona critica.*
[20] *Bresciani C (a cura di). Genetica e medicina preditiva: verso un nuovo modello di medicina? Collana del Centro di Bioetica, Istituto Auxologico Italiano. Milano: Giuffrè, 2000:309pp.*

Capitolo 4
Effetti pre-analitici sui risultati delle analisi

(M. Besozzi)

Effetti legati alle condizioni fisiche del paziente 189
Effetti legati all'ora del prelievo 189
Effetti legati all'assunzione di farmaci 190
Effetti legati alla raccolta e alla conservazione dei campioni 195
Analisi che richiedono condizioni particolari di conservazione del campione 196

Per una data specie biologica, e per uno stato di salute stazionario, in relazione ad alcune caratteristiche fondamentali degli individui (uomo, donna, bambino in una determinata fascia di età, donna in fase follicolinica, donna in fase luteinica, donna gravida a un certo periodo della gestazione, donna in menopausa, eccetera) si può considerare che esista, per ogni analita, un valore di concentrazione definito come valore specie-specifico.

A causa della *variabilità biologica inter-individuale* il valore riscontrabile in un singolo individuo (*valore individuale*) risulta nella realtà differente dal *valore medio specie-specifico*.

A causa della *variabilità biologica intra-individuale* il *valore attuale* osservato in un determinato individuo differisce dal *valore individuale* (che rappresenta la concentrazione media osservabile in un determinato individuo). Questo in quanto anche nello stesso *soggetto sano in uno stato di salute stazionario,* il valore di concentrazione di un analita nel sangue non è costante, ma varia in continuo attorno al punto omeostatico.

Alcuni fattori a livello dell'individuo (per esempio la terapia con farmaci in grado di alterare in-vitro o più frequentemente in-vivo le concentrazioni degli analiti), così come alcuni fattori che possono agire sul campione biologico sottoposto ad analisi (mancato rispetto del rapporto tra sangue e anticoagulanti, mancata conservazione del campione in condizioni idonee, eccetera) possono introdurre un ulteriore grado di incertezza sistematica (errore sistematico). Definiamo come *valore vero* il valore che caratterizza il campione dopo l'effetto introdotto da queste ulteriori fonti di errore, e come *variabilità pre-analitica* la variabilità che causa tale differenza.

Infine a causa dei limiti inerenti ai sistemi (*strumenti di misura*) impiegati per rilevare i

segnali provenienti dalle grandezze fisiche, ogni misura effettuata nel laboratorio clinico (come qualsiasi altro tipo di misura) è inevitabilmente accompagnata da un qualche grado di *incertezza*. Chiamiamo globalmente *variabilità analitica* questa incertezza, che contribuisce a far sì che il *valore analitico* sia più o meno differente dal *valore vero*.

Questi concetti sono riassunti nella seguente tabella, che ricorda anche come la variabilità pre-analitica, a differenza degli altri tipi di variabilità considerati, tende ad introdurre delle differenze sistematiche, che sono quelle che possono più facilmente creare problemi di tipo interpretativo.

Valore atteso	***Valore osservato***	***Variabilità all'origine della differenza***	***Errore***
Valore specie-specifico	Valore individuale	Variabilità biologica inter-individuale	Casuale
Valore individuale	Valore attuale	Variabilità biologica intra-individuale	Casuale
Valore attuale	Valore vero	Variabilità pre-analitica	Sistematico
Valore vero	Valore analitico	Variabilità analitica	Casuale

Poiché non è possibile agire sulla variabilità biologica, gli interventi necessari a contenere la variabilità globale del dato analitico devono essere orientati alle fasi pre-analitica e analitica.

In questo contesto appaiono particolarmente interessanti le azioni possibili a livello della variabilità pre-analitica.

Tipo di variabilità	***Origine della variabilità***	***Azioni possibili***
Biologica inter-individuale	Differenze biologiche tra individui	Nessuna
Biologica intra-individuale	Variazioni attorno al punto omeostatico	Nessuna
Pre-analitica	LEGATA AL SOGGETTO ✓ Condizioni fisiche del paziente (i) ✓ Ora del prelievo (ii) ✓ Assunzione di farmaci (iii) LEGATA AL CAMPIONE ✓ Raccolta e conservazione dei campioni (iv)	Per (i), (ii) e (iv) mantenere sotto stretto controllo le condizioni pre-analitiche Per (i) e (iii) tenere presente nell'interpretazione dei risultati
Analitica	Metodo analitico	Ridurre la variabilità analitica a livelli pari alla metà della variabilità biologica

Le quattro condizioni indicate per la *variabilità pre-analitica*, e cioè (i) le *condizioni fisiche del paziente*, (ii) l'*ora del prelievo*, (iii) l'*assunzione di farmaci* da parte del paziente e (iv) le *modalità di raccolta e di conservazione dei campioni*, devono necessariamente (a) essere mantenute sotto stretto controllo al fine di garantire risultati analitici accurati, e comunque (b) devono essere tenute presenti al fine dell'interpretazione dei risultati analitici (in particolare se inattesi).

Effetti legati alle condizioni fisiche del paziente

Tranne che nei casi in cui esista una diversa indicazione da parte del medico, gli accertamenti di laboratorio a scopo diagnostico devono essere eseguiti su pazienti in condizioni basali, cioè nella prima mattina poco dopo il risveglio, con un digiuno che deve essere di almeno 12 ore (non è invece necessario il digiuno per le analisi eseguite su materiali diversi dal sangue, come urine, feci, eccetera), con il paziente a riposo. Questo tipo di preparazione al prelievo è la meglio codificata, è relativamente semplice, accettata dai pazienti e facilmente inseribile nella routine sia dei reparti di degenza che dei centri ambulatoriali. Inoltre, quando non altrimenti specificato, i valori di riferimento riportati in questo volume (e in generale da tutti i laboratori) si riferiscono ai risultati ottenuti nelle predette condizioni.

Alcuni fattori possono ripercuotersi anche a distanza di tempo sui risultati delle analisi di laboratorio: così per esempio uno sforzo muscolare di media intensità può portare a innalzamenti che persistono oltre 24 ore dell'attività di alcuni enzimi nel siero, come la creatina chinasi (CK) (anche una semplice iniezione intramuscolare può portare a innalzamenti veramente cospicui della CK).

Effetti legati all'ora del prelievo

A titolo esemplificativo nella tabella che segue sono riportate le variazioni che subiscono alcuni analiti in dipendenza dall'ora del giorno.

Analita	*Ore del giorno alle quali si rileva la concentrazione massima*	*Ore del giorno alle quali si rileva la concentrazione minima*	*Differenza percentuale osservabile*
P-ACTH	6÷10	24÷4	150 %÷200 %
S-CORTISOLO	5÷8	21÷3	180 %÷200 %
S-TESTOSTERONE	2÷4	20÷24	30 %÷50 %
S-TSH	20÷2	7÷13	5 %÷15 %
T4	8÷12	23÷3	10 %÷20 %
S-SOMATOTROPINA	21÷23	1÷21	300 %÷400 %
S-PROLATTINA	5÷7	10÷12	80 %÷100 %
S-ALDOSTERONE	2÷4	12÷14	60 %÷80 %
P-RENINA	24÷6	10÷12	120 %÷140 %
Sg-EMOGLOBINA	6÷18	22÷24	8 %÷15 %
Sg-EOSINOFILI	4÷6	18÷20	30 %÷40 %
S-FERRO	14÷18	2÷4	50 %÷70 %
S-POTASSIO	14÷16	23÷1	5 %÷10 %
S-FOSFATO	2÷4	8÷12	30 %÷40 %
U-SODIO	4÷6	12÷16	60 %÷80 %
U-FOSFATO	18÷24	4÷8	60 %÷80 %

Risulta pertanto ulteriormente evidente il razionale sul quale sono basati sia l'effettuazione del prelievo in condizioni standardizzate (come detto, di regola, il mattino, al risveglio, dopo almeno 12 ore di digiuno), sia la raccolta delle urine delle 24 ore (nei casi esemplificati del sodio e del fosfato nelle urine, la raccolta di tutte le urine emesse durante l'arco delle 24 ore consente di valutarne meglio l'eliminazione "media" giornaliera).

Effetti legati all'assunzione di farmaci

È noto come la somministrazione di acido acetilsalicilico possa alterare alcune prove di coagulazione del sangue. Numerosi farmaci possono indurre aumenti dell'AST, per un meccanismo di azione tossica sul fegato o della gamma-glutammil-transferasi (gamma-GT) per induzione enzimatica. Altri farmaci, ormonali e non, possono interferire con i dosaggi ormonali. Di questi fatti è necessario tenere conto sia (ove possibile) nella preparazione del paziente, sia nell'interpretazione dei risultati.

Gli effetti dei farmaci sulle analisi di laboratorio non possono e non devono, in alcun modo, essere considerati come un'indicazione all'utilizzo o al non utilizzo di un dato farmaco. Tale indicazione, infatti, può derivare solamente dal giudizio clinico, integrato dalle opportune conoscenze farmacologiche.

Gli effetti dei farmaci sulle analisi di laboratorio devono invece essere sempre presi in considerazione, sia dal clinico sia dal laboratorista, nell'interpretazione dei risultati (soprattutto quando inattesi) delle analisi di laboratorio nei pazienti in trattamento con qualcuno dei numerosi farmaci riconosciuti in grado di determinarne, in vivo o in vitro, significative variazioni dei risultati.

Come ormai ben consolidato, anche nell'esprimere gli effetti dei farmaci sulle analisi di laboratorio, per i sistemi (i materiali su cui vengono eseguite le analisi) viene adottata la nomenclatura consigliata dalla IFCC (International Federation for Clinical Chemistry) nella versione italiana proposta dalla SIBioC (Società Italiana di Biochimica Clinica), pubblicata sul Giornale Italiano di Chimica Clinica (vedere *De Angelis G, Franzini C. Nomenclatura, grandezze e unità di misura nel laboratorio di analisi chimico-cliniche. Giorn It Chim Clin 1988;13:1-50* e vedere *Salvati AM, Maffi D, Orlando M, Berti P, Tentori L. Nomenclatura, grandezze e unità di misura nel laboratorio di ematologia. Giorn It Chim Clin 1989; 14:205-17*), come indicato nella seguente tabella:

Sigla	***Materiale su cui viene eseguita l'analisi***
a	(sangue) arterioso
Er	eritrocita/i
F	feci
Hb	emoglobina
Lc	leucocita/i
LCR	liquido cefalorachidiano
LS	liquido seminale
P	plasma
Ps	piastrina/e
Pt	paziente (nel caso di test)
S	siero
Sd	sudore
Sg	sangue
U	urine
V	(sangue) venoso

Per il tipo di effetto esplicato dal farmaco, vengono convenzionalmente adottate le seguenti sigle:

Sigla	*Significato*
VT	effetto che si verifica in vitro (ad esempio l'interferenza da parte di antibiotici appartenenti alla classe delle cefalosporine con la determinazione della creatinina nel siero con il metodo di Jaffè). Nel caso di effetto in vitro, si ha un innalzamento (o un abbassamento) apparente del componente (analita) a causa di un'azione diretta del farmaco sul metodo analitico impiegato. Contrariamente a quanto in genere si è portati a ritenere, gli effetti di questo tipo sono rari, grazie all'ottima specificità ormai raggiunta dalla maggior parte dei metodi analitici impiegati nel laboratorio clinico.
VV	effetto che si verifica in vivo (ad esempio l'innalzamento della gamma-glutammiltransferasi nel siero determinato dai barbiturici e dalla difenilidantoina, e legato a un fenomeno di induzione enzimatica a livello epatico). Nel caso di effetto in vivo, si ha un innalzamento o un abbassamento reale del componente (analita) a causa di un'azione indiretta del farmaco, che riesce in qualche modo ad alterare i meccanismi che controllano il punto omeostatico del componente stesso. Gli effetti in vivo sono, in termini numerici, di gran lunga prevalenti rispetto quelli in vitro.
+	innalzamento del componente.
-	abbassamento del componente.
=	è stata documentata l'assenza di effetti.

Nella seguente tabella sono riportati, a puro titolo esemplificativo, alcuni effetti di farmaci su alcune delle più comuni analisi di laboratorio.

Sistema	*Componente*	*Farmaco*	*Effetto*
U	ACIDO 5-IDROSSIINDOLACETICO	PARACETAMOLO	VT+
		RESERPINA	VV+
U	ACIDO VANILMANDELICO	CLONIDINA	VV-
		METILDOPA (alfa-)	VT+
S	ALANINA AMMINOTRANSFERASI	CARBAMAZEPINA	VV+
		CEFAZOLINA	VV+
		CLOFIBRATO	VV+
		DIAZEPAM	VV+
		FLURAZEPAM	VV+
		LABETALOLO	VV+
		NITROFURANTOINA	VV+
		RANITIDINA	VV+
		VALPROATO	VV+
S	ALBUMINA	IBUPROFENE	VV-
U	ALBUMINA	NIFEDIPINA	VV+

Sistema	*Componente*	*Farmaco*	*Effetto*
S	AMILASI	CAPTOPRIL	VV+
		CIMETIDINA	VV+
U	AMILASI	CAPTOPRIL	VV+
S	ANTICORPI ANTI-NUCLEO	ACEBUTOLOLO	VV+
		LABETALOLO	VV+
S	ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI	CEFALOTINA	VV+
		CIMETIDINA	VV+
		ETANOLO	VV+
		IDRALAZINA	VV+
		METILDOPA (alfa-)	VV+
		PROPILTIOURACILE	VV+
		RANITIDINA	VV+
		VALPROATO	VV+
S	BILIRUBINA	AJMALINA	VV+
		AMIODARONE	VV+
		CEFAZOLINA	VV+
		CONTRACCETTIVI ORALI	VV+
		PARACETAMOLO	VV+
		TEOFILLINA	VT+
		VALPROATO	VV+
U	CALCIO	ACETAZOLAMIDE	VV+
S	CALCIO	BARBITURATI	VV-
		DIFENILIDANTOINA	VV-
		IDROCLOROTIAZIDE	VV+
S	CLORURO	ALLOPURINOLO	VT-
S	COLESTEROLO	ACIDO ACETILSALICILICO	VV+
		AMIODARONE	VV+
		CLOFIBRATO	VV+
		ENALAPRIL	VV-
		TIAZIDICI	VV+
S	COLESTEROLO HDL	CIMETIDINA	VV+
		ESTROPROGESTINICI	VV+
		OXPRENOLOLO	VV-

Sistema	*Componente*	*Farmaco*	*Effetto*
S	CORTISOLO	BARBITURATI	VV-
		CONTRACCETTIVI ORALI	VV+
		LITIO	VV-
S	CREATINA CHINASI	LABETALOLO	VV+
S	CREATININA	ACEBUTOLOLO	VV+
		ALLOPURINOLO	VV+
		CEFALOSPORINE	VT+
		CONTRACCETTIVI ORALI	VV+
		FENOFIBRATO	VV+
		IBUPROFENE	VV+
S	FERRO	ALLOPURINOLO	VV-
		ESTROPROGESTINICI	VV+
Pt	FILTRATO GLOMERULARE	CEFALOSPORINE	VV-
		CLONIDINA	VV+
		ENALAPRIL	VV-
S	FOSFATASI ALCALINA	ACIDO ASCORBICO	VT+
		AMIODARONE	VV+
		DIAZEPAM	VV+
		DIFENILIDANTOINA	VV+
		FENOFIBRATO	VV-
		NIFEDIPINA	VV+
		TRIMETOPRIM	VV+
S	FOSFATO	FENOTIAZINE	VT-
		MAGNESIO, IDROSSIDO DI	VV-
		OXPRENOLOLO	VV+
S	GLUTAMMILTRANSFERASI (gamma-)	CLOFIBRATO	VV-
		CONTRACCETTIVI ORALI	VV+
		FENOBARBITAL	VV+
S	IMMUNOGLOBULINA A	AJMALINA	VV+
S	IMMUNOGLOBULINA G	NITROFURANTOINA	VV+
S	IMMUNOGLOBULINA M	DIFENILIDANTOINA	VV-

Sistema	*Componente*	*Farmaco*	*Effetto*
S	LATTATO DEIDROGENASI	ERITROMICINA	VV+
Sg	LEUCOCITI	DIFENILIDANTOINA	VV-
		FENOBARBITAL	VV-
S	MAGNESIO	CONTRACCETTIVI ORALI	VV-
U	MAGNESIO	DIURETICI	VV+
Sg	TEST DI COOMBS DIRETTO	ACIDO NALIDIXICO	VV+
		METILDOPA (alfa-)	VV+
S	TEST DI COOMBS INDIRETTO	DIFENILIDANTOINA	VV+
S	TRIGLICERIDI	CONTRACCETTIVI ORALI	VV+
		DIAZEPAM	VV+
		PRACTOLOLO	VV+
		TEOFILLINA	VV+
S	URATO	AMPICILLINA	VT+
		DICUMAROLO	VV-
		PARACETAMOLO	VT+
S	UREA	ACIDO ACETILSALICILICO	VV+
		CIMETIDINA	VV+
		IBUPROFENE	VV+
		PIROXICAM	VV+
Sg	VES	ALLOPURINOLO	VV+
		NITROFURANTOINA	VV+

La documentazione relativa a oltre 5.000 effetti di farmaci sulle analisi di laboratorio, i più significativi, scelti tra quelli a tutt'oggi descritti, è riportata sul CD-ROM.

Effetti legati alla raccolta e alla conservazione dei campioni

È necessario osservare scrupolosamente le modalità di raccolta e di conservazione dei campioni: esse sono state fornite al fine di garantire al meglio la loro preparazione e la loro stabi-

lità nel tempo che immediatamente fa seguito al prelievo, e che si conclude con la loro consegna in laboratorio. Va rammentato che qualsiasi attività, anche la più banale, come la semplice raccolta delle urine delle 24 ore, deve essere svolta con il massimo scrupolo in quanto influenza in modo determinante i risultati analitici.

La conservazione a ***temperatura ambiente*** (15÷25 °C), e un tempo di consegna del materiale al laboratorio contenuto ***entro 3 ore dal prelievo*** o dalla raccolta, sono condizioni sufficienti a garantire che non vi siano effetti pre-analitici sui risultati per tutte le analisi, tranne quelle riportate al paragrafo successivo.

Sarà quindi cura del laboratorio provvedere a garantire ai campioni le necessarie condizioni di conservazione, che includono (laddove le analisi siano eseguite su sangue ma non richiedano il sangue intero, come ad esempio l'esame emocromocitometrico) la *centrifugazione* dei campioni, la *separazione* del siero o del plasma, e la loro conservazione alla temperatura adatta.

Analisi che richiedono condizioni particolari di conservazione del campione

Per le seguenti analisi è indispensabile ***seguire le modalità di conservazione e i tempi di consegna indicati***:

Analisi	***Modalità di conservazione***	***Consegnare in laboratorio entro…***
ACTH [P]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
ALDOSTERONE [S]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
AMMONIO [P]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1/2 ora
APTOGLOBINA [S]		2 ore
BICARBONATO [S]	Temperatura ambiente	1 ora
CALCIO IONIZZATO [S]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
CALCITONINA [S]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
CATECOLAMMINE [P]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
CHLAMYDIA	Tampone senza terreno di trasporto	2 ore
COBALAMMINA [S]		2 ore
COMPLEMENTO C3		2 ore
COMPLEMENTO C4		2 ore
COPROCOLTURA [F]	Vedere istruzioni specifiche	
CRIOGLOBULINE [S]	Contenitore termostatico a +37 °C	1 ora

Analisi	*Modalità di conservazione*	*Consegnare in laboratorio entro…*
EMOCOLTURA [Sg]	Vedere istruzioni specifiche	
EMOGASANALISI [Sg]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	10 minuti
ESAMI CITOLOGICI	Vedere istruzioni specifiche	
ESAMI DI CITOGENETICA	Vedere istruzioni specifiche	
ESAMI ISTOLOGICI	Vedere istruzioni specifiche	
ESPETTORATO	Vedere istruzioni specifiche	
FOLATO [S]		2 ore
FOSFATO [S]		2 ore
INSULINA [S]		2 ore
LITIO [S]		2 ore
MIOGLOBINA [S]		2 ore
OMOCISTEINA [S]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
OSTEOCALCINA [S]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
PARATORMONE [S]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
POTASSIO [S]		2 ore
RENINA [P]	Contenitore termostatico a +2÷8 °C	1 ora
SANGUE OCCULTO [F]	Vedere istruzioni specifiche	
SCOTCH-TEST	Vedere istruzioni specifiche	
TAMPONE PER MICOPLASMI	Tampone con terreno di trasporto liquido	5 ore
TAMPONI PER COLTURE BATTERICHE	Tampone con terreno di trasporto	12 ore
URINOCOLTURA [U]	Vedere istruzioni specifiche	
ZINCO [S]		2 ore

Capitolo 5
Valori decisionali

(M. Besozzi)

Intervalli di riferimento 200
Intervalli di riferimento per sesso e/o per età 200
Esame emocromocitometrico nell'adulto 200
Esame emocromocitometrico in età pediatrica 201
Colesterolo totale nel siero 201
Apolipoproteine AI e B nel siero 201
Nomogramma dei percentili della creatinina clearance 202
Somatomedina (IGF-I) nel plasma 203
Intervalli di riferimento in gravidanza 204
Alfa-fetoproteina nel siero 204
Alfa-fetoproteina nel liquido amniotico 204
Estriolo (E3) nel siero 204
Gonadotropina corionica (HCG) nel siero 205
Somatomammotropina (HPL) nel siero 205
Intervalli di riferimento dei principali analiti 207
Valori desiderabili 281
Intervalli terapeutici dei farmaci 281
Valori di allerta 282
Differenze critiche 285

In presenza di uno specifico risultato, è necessario basare la decisione medica su criteri il più possibile oggettivi. Come già ampiamente trattato nei capitoli precedenti, questo può essere fatto definendo dei valori per la decisione medica in due possibili situazioni. Gli *intervalli di riferimento* (l'approccio più tradizionale utilizzato per attivare l'intervento medico), i *valori desiderabili*, gli *intervalli terapeutici dei farmaci* e i *valori di allerta* si riferiscono alla prima di queste due situazioni, cioè il confronto del risultato con un valore soglia. Le differenze critiche si riferiscono alla seconda situazione, cioè il confronto del risultato con un valore precedente.

Intervalli di riferimento

Prima dell'ultima tabella, nella quale sono riportati gli intervalli di riferimento dei principali analiti, nei paragrafi seguenti sono riportati alcuni intervalli di riferimento che possono essere utili in relazione alla loro differenziazione per sesso, per età, e per lo stato di gravidanza.

Intervalli di riferimento per sesso e/o per età

Esame emocromocitometrico nell'adulto

Analita	*Uomo*	*Donna*	*Unità di misura*
Leucociti	4,4÷10,8	4,4÷10,8	Miliardi per litro di sangue (10^9/L)
Eritrociti	4,7÷6,1	4,2÷5,4	Migliaia di miliardi per litro di sangue (10^{12}/L)
Emoglobina (Hb)	14,0÷18,0	12,0÷16, 0	Grammi per decilitro di sangue (g/dL)
Ematocrito (Ht)	42÷52	37÷47	Percentuale del volume del sangue occupata dagli eritrociti (%)
Volume globulare medio (MCV)	80÷100	80÷100	Milionesimi di miliardesimo di litro (femtolitri, fL)
Hb globulare media (MCH)	27÷33	27÷33	Millesimi di miliardesimo di grammo (picogrammi, pg)
Hb concentrazione media (MCHC)	32÷36	32÷36	Grammi per decilitro di eritrociti (g/dL)
Granulociti neutrofili	40÷75	40÷75	Percentuale dei leucociti (%)
Linfociti	20÷50	20÷50	Percentuale dei leucociti (%)
Monociti	2÷12	2÷12	Percentuale dei leucociti (%)
Granulociti eosinofili	0÷6	0÷6	Percentuale dei leucociti (%)
Granulociti basofili	0÷2	0÷2	Percentuale dei leucociti (%)
Granulociti neutrofili	1,8÷8,1	1,8÷8,1	Miliardi per litro di sangue (10^9/L)
Linfociti	0,9÷5,4	0,9÷5,4	Miliardi per litro di sangue (10^9/L)
Monociti	0,1÷1,5	0,1÷1,5	Miliardi per litro di sangue (10^9/L)
Granulociti eosinofili	0÷0,6	0÷0,6	Miliardi per litro di sangue (10^9/L)
Granulociti basofili	0÷0,2	0÷0,2	Miliardi per litro di sangue (10^9/L)
Piastrine	100÷400	100÷400	Miliardi per litro di sangue (10^9/L)

Esame emocromocitometrico in età pediatrica

Età	*WBC 10^9/L*	*N %*	*L %*	*M %*	*E %*	*B %*	*RBC 10^{12}/L*	*Hb g/dL*	*Ht %*	*MCV fL*	*MCH pg*
Nascita	9,0÷30,0	61	31	5,8	2,2	0,6	4,0÷6,6	14,5÷22,5	45÷67	98÷118	31÷37
1 mese	5,0÷19,5	35	56	6,5	2,8	0,5	3,0÷5,4	10,0÷18,0	31÷55	85÷123	28÷40
1 ÷ 3 anni	6,0÷17,5	33	59	5,0	2,6	0,5	3,7÷5,3	10,5÷13,5	33÷39	70÷86	25÷31
4 ÷ 5 anni	5,5÷15,5	42	50	5,0	2,8	0,6	3,9÷5,3	11,5÷13,5	34÷40	75÷87	24÷30
6 ÷ 7 anni	5,5÷15,5	51	42	4,7	2,7	0,6	4,0÷5,2	11,5÷15,5	35÷45	77÷95	25÷33
8 ÷ 14 anni	4,5÷13,5	54	38	4,3	2,4	0,5	4,0÷5,3	11,5÷16,0	35÷49	78÷92	25÷35

Colesterolo totale nel siero

I valori sono espressi in milligrammi per decilitro di siero (mg/dL). I valori inferiore e superiore riportati rappresentano rispettivamente il 2,5-esimo percentile e il 97,5-esimo percentile della distribuzione osservata nella popolazione generale.

Età	*Uomo (mg/dL)*	*Donna (mg/dl)*
Fino a 19 anni	115 ÷ 200	120 ÷ 200
Da 20 a 24 anni	125 ÷ 220	125 ÷ 230
Da 25 a 29 anni	135 ÷ 245	
Da 25 a 34 anni		130 ÷ 235
Da 30 a 34 anni	140 ÷ 255	
Da 35 a 39 anni	145 ÷ 270	140 ÷ 245
Da 40 a 44 anni	150 ÷ 270	145 ÷ 255
Da 45 a 49 anni		150 ÷ 270
Da 45 a 69	160 ÷ 275	
Da 50 a 54	160 ÷ 285	
Oltre i 55 anni		170 ÷ 295
Oltre i 70 anni	150 ÷ 270	

Apolipoproteine AI e B nel siero

Percentili della distribuzione per le apolipoproteine AI e B in milligrammi per decilitro di siero (mg/dL), e per il rapporto B/AI, ***nell'uomo***.

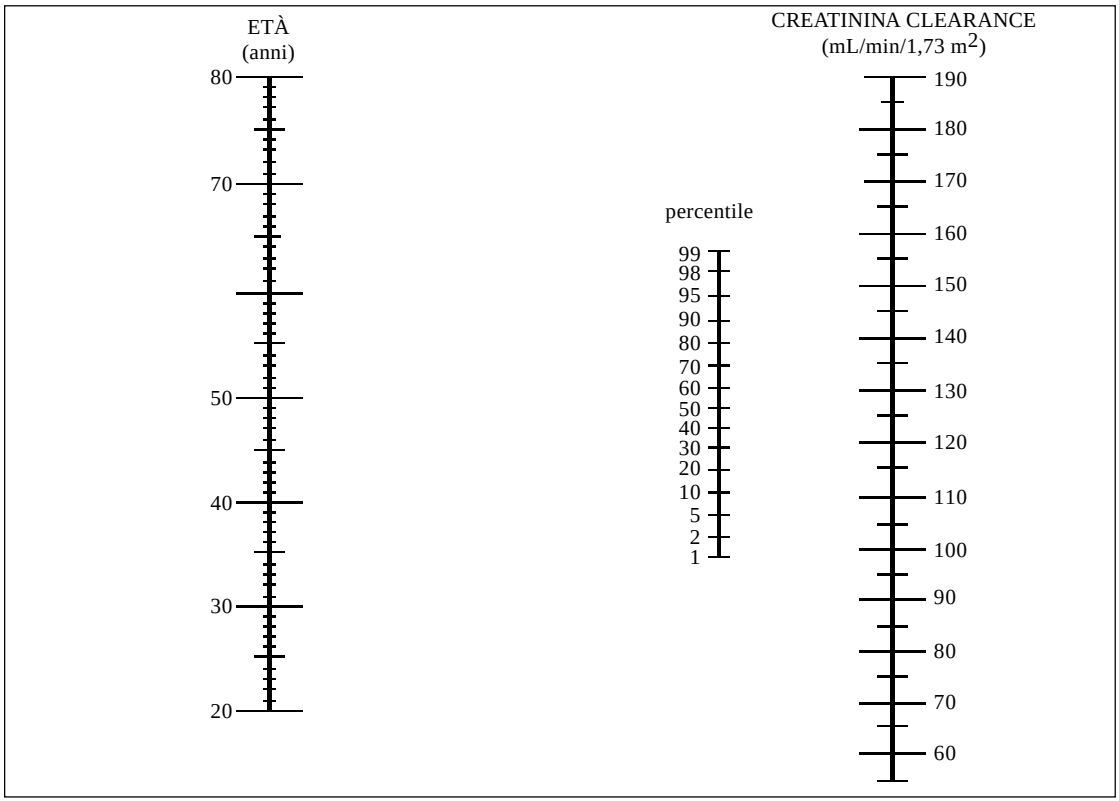
Percentile	*Apolipoproteina AI (mg/dL)*	*Apolipoproteina B (mg/dL)*	*Rapporto B/AI*
2,5	85	43	0,29
5,0	96	49	0,32
10,0	105	54	0,34
50,0	133	68	0,51
90,0	179	85	0,74
95,0	189	92	0,80
97,5	199	97	0,93

Percentili della distribuzione per le apolipoproteine AI e B in milligrammi per decilitro di siero (mg/dL), e per il rapporto B/AI, ***nella donna***.

Percentile	*Apolipoproteina AI (mg/dL)*	*Apolipoproteina B (mg/dL)*	*Rapporto B/AI*
2,5	104	40	0,25
5,0	111	41	0,27
10,0	121	50	0,29
50,0	149	61	0,41
90,0	194	77	0,55
95,0	210	83	0,61
97,5	220	87	0,64

Nomogramma dei percentili della creatinina clearance

Tracciando una retta che unisce l'età del paziente con il valore osservato della creatinina clearance, l'intersezione della retta con la colonna centrale fornisce il percentile cui il valore osservato corrisponde. I percentili riportati sono ricavati da una popolazione di soggetti sani. Si consideri l'esempio di un soggetto di 70 anni, con una clearance di 140 mL / min / 1,73 m^2. L'interpolazione sul nomogramma indica che tale valore corrisponde al 95-esimo percentile. Questo significa che la clearance del soggetto in questione è superiore a quella osservata nel 95% dei soggetti sani (della stessa età), e che, reciprocamente, solo il 5% dei soggetti sani (della stessa età) ha una clearance superiore.



Somatomedina (IGF-I) nel plasma

I valori sono espressi in microgrammi per litro di siero (μg/L). I valori inferiore e superiore riportati rappresentano rispettivamente il 2,5-esimo percentile e il 97,5-esimo percentile della distribuzione osservata nella popolazione generale.

Età	*Uomo (μg/L)*	*Donna (μg/L)*
Fino a 5 anni	58,2 ÷ 153,0	58,2 ÷ 153,0
Da 5 a 8 anni	95,7 ÷ 288,9	95,7 ÷ 288,9
Da 8 a 11 anni	111,6 ÷ 433,6	161,6 ÷ 607,1
Da 11 a 15 anni	184,0 ÷ 581,0	335,5 ÷ 877,2
Da 15 a 24 anni	229,5 ÷ 546,4	229,5 ÷ 546,4
Da 24 a 39 anni	139,3 ÷ 339,5	139,3 ÷ 339,5
Da 39 a 54 anni	88,1 ÷ 253,0	88,1 ÷ 253,0
Oltre i 54 anni	48,6 ÷ 199,9	48,6 ÷ 199,9

Intervalli di riferimento in gravidanza

Alfa-fetoproteina nel siero

I valori sono espressi in migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L). I valori inferiore e superiore riportati rappresentano rispettivamente il 2,5-esimo percentile e il 97,5-esimo percentile della distribuzione osservata nella gravidanza normale.

Epoca gestazionale	*Concentrazione (kU/L)*
Alla quattordicesima settimana	9 ÷ 62
Alla quindicesima settimana	9 ÷ 41
Alla sedicesima settimana	10 ÷ 50
Alla diciassettesima settimana	11 ÷ 65
Alla diciottesima settimana	13 ÷ 61
Alla diciannovesima settimana	13 ÷ 65
Alla ventesima settimana	17 ÷ 88

Alfa-fetoproteina nel liquido amniotico

I valori sono espressi in milligrammi per litro di liquido amniotico (mg/L). I valori inferiore e superiore riportati rappresentano rispettivamente il 2,5-esimo percentile e il 97,5-esimo percentile della distribuzione osservata nella gravidanza normale.

Epoca gestazionale	*Concentrazione (mg/L)*
Alla quindicesima settimana	13,0 ÷ 22,4
Alla sedicesima settimana	12,0 ÷ 18,2
Alla diciassettesima settimana	10,9 ÷ 15,7
Alla diciottesima settimana	7,8 ÷ 13,6
Dalla diciannovesima alla ventesima settimana	6,4 ÷ 13,0
Dalla ventesima alla ventiduesima settimana	1,6 ÷ 7,2

Estriolo (E3) nel siero

I valori sono espressi in microgrammi per litro di siero (μg/L). I valori inferiore e superio-

re riportati rappresentano rispettivamente il 2,5-esimo percentile e il 97,5-esimo percentile della distribuzione osservata nella gravidanza normale.

Epoca gestazionale	*Concentrazione (μg/L)*
Alla ventottesima settimana	38 ÷ 140
Alla trentesima settimana	31 ÷ 140
Alla trentaduesima settimana	35 ÷ 330
Alla trentaquattresima settimana	45 ÷ 350
Alla trentaseiesima settimana	59 ÷ 570
Alla quarantesima settimana	95 ÷ 460

Gonadotropina corionica (HCG) nel siero

I valori sono espressi in migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L). I valori inferiore e superiore riportati rappresentano rispettivamente il 2,5-esimo percentile e il 97,5-esimo percentile della distribuzione osservata nella gravidanza normale.

Epoca gestazionale	*Concentrazione (kU/L)*
Dalla terza alla quarta settimana	0,009 ÷ 0,13
Dalla quarta alla quinta settimana	0,075 ÷ 2,60
Dalla quinta alla sesta settimana	0,85 ÷ 20,8
Dalla sesta alla settima settimana	4,0 ÷ 100
Dalla settima alla dodicesima settimana	11,5 ÷ 289
Dalla dodicesima alla sedicesima settimana	18,3 ÷ 137
Al secondo trimestre	1,4 ÷ 53,0
Al terzo trimestre	0,94 ÷ 60,0

Somatomammotropina (HPL) nel siero

I valori sono espressi in milligrammi per litro di siero (mg/L). I valori inferiore e superiore riportati rappresentano rispettivamente il 2,5-esimo percentile e il 97,5-esimo percentile della distribuzione osservata nella gravidanza normale.

Epoca gestazionale	*Concentrazione (mg/L)*
Dall'ottava alla dodicesima settimana	1,0 ÷ 2,2
Dalla dodicesima alla sedicesima settimana	1,8 ÷ 3,5
Dalla sedicesima alla ventesima settimana	2,0 ÷ 5,0
Dalla ventesima alla ventiquattresima settimana	2,9 ÷ 6,8
Dalla ventiquattresima alla ventottesima settimana	3,2 ÷ 7,3
Dalla ventottesima alla trentaduesima settimana	4,0 ÷ 10,0
Dalla trentaduesima alla trentasettesima settimana	5,0 ÷ 12,2

Intervalli di riferimento dei principali analiti[1]

Analisi	*Metodo*	*Espressione dei risultati*	*Intervalli di riferimento*	*Note*
17-alfa-IDROSSIPROGESTERONE, vedere 17-IDROSSIPROGESTERONE				
17-beta-ESTRADIOLO, vedere ESTRADIOLO (E2)				
17-CHETOSTEROIDI, nelle urine delle 24 ore [dU]	cromatografico	milligrammi eliminati nel corso di 24 ore (mg)	uomo da 6 a 22 mg, nedonna da 4 a 16 mg	
17-IDROSSICORTICOSTEROIDI, nelle urine delle 24 ore [dU]	cromatografico	milligrammi eliminati nel corso di 24 ore (mg)	uomo da 3 a 18 mg, donna da 2 a 12 mg	
17-IDROSSIPROGESTERONE, nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	uomo da 0,7 a 3,6 µg/L; donna da 0,09 a 4,0 µg/L; donna in trattamento con contraccettivi orali da 0,1 a 1,7 µg/L; donna in menopausa da 0,1 a 1,2 µg/L	
17-OH-P (test da stimolo), nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	soggetti prepuberi fino a 0,6 µg/L; uomo da 0,4 a 3,3 µg/L; donna in fase follicolinica da 0,1 a 1,2 µg/L; donna in fase luteinica da 0,3 a 4,8 µg/L; donna in trattamento con contraccettivi orali da 0,1 a 1,2 µg/L; donna in menopausa da 0,1 a 0,6 µg/L	cinque prelievi, al tempo zero (0') e dopo 30, 60, 90 e 120 minuti

[1]Nota bene: gli intervalli di riferimento riportati hanno solamente un valore orientativo. Rifarsi sempre a quelli riportati di volta in volta sui singoli referti.

2,5 ESANDIONE, nelle urine [U]	gascromatografia	milligrammi per litro di urina (mg/L)	fino a 5 mg/L nei soggetti professionalmente esposti	
4-IDROSSI-3-METOSSIMANDELATO, vedere ACIDO VANILMANDELICO				
5-IDROSSIINDOLILACETATO, vedere ACIDO 5-IDROSSIINDOLACETICO				
AAG, vedere alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA				
AAT, vedere alfa-1-ANTITRIPSINA				
Ab ANTI-A, nel siero [S]	agglutinazione eritrocitaria in soluzione fisiologica a diverse temperature (a +4 °C, a temperatura ambiente e a +37 °C), e test di Coombs indiretto (a +37 °C)	"assenti" o "presenti" separatamente per gli anticorpi anti-A naturali e gli anticorpi anti-A immuni. In caso di presenza di anticorpi viene fornita la loro concentrazione espressa come titolo	assenti	
Ab ANTI-ACETILCOLINA, nel siero [S]	RIA	nanomoli per litro di siero (nmol/L)	fino a 0,5 nmol/L	
Ab ANTI-ANTIGENI NUCLEARI ESTRAIBILI (ENA), nel siero [S]	immunoblot	"assenti" o "presenti" per ciascuno dei sei anticorpi ricercati (Ab anti-RNP/Sm, Ab anti-Sm, Ab-anti SSA/Ro, Ab-anti SSB/La, Ab-anti Scl70, Ab anti-Jo1)	assenti	
Ab ANTI-B, nel siero [S]	agglutinazione eritrocitaria in soluzione fisiologica a diverse temperature (a +4 °C, a temperatura ambiente e a	"assenti" o "presenti" separatamente per gli anticorpi anti-B naturali e gli anticorpi anti-B immuni. In caso di pre-	assenti	

	+37 °C), e test di Coombs indiretto (a +37 °C)	senza di anticorpi viene fornita la loro concentrazione espressa come titolo		
Ab ANTI-BRUCELLA, vedere WRIGHT				
Ab ANTI-CARDIOLIPINA, nel siero [S]	EIA	Unità (U) separatamente per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgG e per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgM	IgG inferiore a 23 U; IgM inferiore a 11 U	
Ab ANTI-CHLAMYDIA (PLT), nel siero [S]	ELISA	titolo anticorpale	negativo inferiore a 1:5; dubbio da 1:5 a 1:40; positivo superiore a 1:40	vengono dosati gli anticorpi totali (Ig totali) contro antigeni di gruppo comuni ai generi Chlamydia trachomatis e Chlamydia psittaci
Ab ANTI-CITOMEGALOVIRUS, nel siero [S]	ELFA	Unità per millilitro di siero (UA/mL) per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgG e come “assenti” o “presenti” per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgM	per le IgG il risultato è negativo se inferiore a 4 UA/mL; dubbio da 4 a 6 UA/mL; positivo superiore a 6 UA/mL Le IgM sono normalmente “assenti”	
Ab ANTI-CITOPLASMA DEI NEUTROFILI (ANCA), nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	“assenti” ovvero riportando il titolo anticorpale, con eventuale specifica della varietà di anticorpi osservata, espressa come pattern	inferiore a 1:20	

Ab ANTI-COXSACKIE, nel siero [S]	fissazione del complemento	titolo anticorpale, separatamente per i sei tipi sierologici di virus attualmente noti (CBV1, CBV2, CBV3, CBV4, CBV5, CBV6)	inferiore a 1:64 per tutti i sei tipi sierologici	
Ab ANTI-DELTA, nel siero [S]	EIA	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-DNA NATIVO, nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" ovvero riportando il titolo anticorpale	inferiore a 1:10	
Ab ANTI-ENDOMISIO, nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-EPATITE A (IgM), nel siero [S]	MEIA	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-EPATITE A, nel siero [S]	MEIA	"assenti" o "presenti" separatamente per le immunoglobuline totali (IgG+IgM) e per le IgM	assenti sia per le immunoglobuline totali (IgG+IgM) che per le IgM	
Ab ANTI-EPATITE C, nel siero [S]	EIA, con successivo test di conferma	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-EPSTEIN BARR, nel siero [S]	EIA	"assenti" o "presenti", separatamente per gli anticorpi appartenenti alla classe delle IgG diretti contro l'antigene VCA, per gli anticorpi appartenenti alla classe delle IgM diretti contro l'antigene VCA, e per gli anticorpi appartenenti alla classe delle IgG diretti contro l'antigene EBNA	assenti per tutti e tre gli anticorpi	
Ab ANTI-EPSTEIN-BARR (MONOTEST), nel siero [S]	agglutinazione	"assenti" o "presenti" con riferimento alla presenza di anticorpi eterofili agglutinanti	assenti	

Ab ANTI-FOSFOLIPIDI, vedere Ab ANTI-CARDIOLIPINA				
Ab ANTI-GAD, nel siero [S]	RIA	Unità per millilitro di siero (U/mL)	fino a 1 U/mL	
Ab ANTI-GLIADINA, nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L), separatamente per gli anticorpi appartenenti alla classe delle IgA e per gli anticorpi appartenenti alla classe delle IgG	IgA inferiore a 3 mg/L; IgG nel bambino inferiore a 30 mg/L e nell'adulto inferiore a 18 mg/L	
Ab ANTI-HBcAg (IgM), nel siero [S]	EIA	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-HBcAg, nel siero [S]	MEIA	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-HBeAg, nel siero [S]	MEIA	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-HBsAg, nel siero [S]	MEIA	Unità per litro di siero (U/L)	non immune inferiore a 10 U/L, immune superiore a 10 U/L	
Ab ANTI-HELICOBACTER PYLORI, nel siero [S]	EIA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	dubbio inferiore a 9 kU/L; dubbio da 9 a 11 kU/L; negativo superiore a 11 kU/L	
Ab ANTI-HERPES 1/2, nel siero [S]	EIA	i risultati sono espressi separatamente per il virus erpetico di tipo 1 e per quello di tipo 2. Per ciascuno dei due tipi di virus "assenti" o "presenti" separatamente per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgG e per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgM	assenti per entrambi i tipi di virus e per entrambe la classi di immunoglobuline (IgG e IgM)	

Ab ANTI-HIV 1/2, nel siero [S]	MEIA	"assenti" o "presenti"	assenti	in caso di positività viene eseguito un primo test di conferma con metodo EIA, e un ulteriore test di conferma con western-blot (ricerca di anticorpi contro le frazioni proteiche p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120, gp160 del virus HIV-1 e la frazione proteica gp36 dell'HIV-2)
Ab ANTI-INSULA PANCREATICA (ICA), nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-INSULINA, nel siero [S]	RIA	millesimi di Unità (milliunità) per litro di siero (mU/L)	da 2,0 a 20,0 mU/L	
Ab ANTI-LEPTOSPIRA, nel siero [S]	fissazione del complemento	"assenti" ovvero riportando il titolo anticorpale, separatamente per le specie L. canicola, L. sjroe, L. pomona, L. icterohaemorragiae e L. grippo-typhosa	negativo inferiore a 1:5; dubbio da 1:4 a 1:40; positivo superiore a 1:40	
Ab ANTI-MITOCONDRI (AMA), nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" ovvero riportando il titolo anticorpale, con eventuale specifica della varietà di anticorpi osservata, espressa come tipo di fluorescenza	inferiore a 1:40	

Ab ANTI-MORBILLO, nel siero [S]	ELFA	sono espressi separatamente per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgG e per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgM. Per le IgG migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L). Per le IgM titolo	per le IgG negativo inferiore a 0,5 kU/L; dubbio da 0,5 a 0,7 kU/L; positivo superiore a 0,7 kU/L. Per le IgM negativo inferiore a 1:5; dubbio da 1:5 a 1:40; positivo superiore a 1:40	
Ab ANTI-MUCOSA GASTRICA (APCA), nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-MUSCOLO LISCIO (ASMA), nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" ovvero riportando il titolo anticorpale, con eventuale specifica della varietà di anticorpi osservata, espressa come tipo di fluorescenza	inferiore a 1:40	
Ab ANTI-MUSCOLO STRIATO, nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-MYCOPLASMA PNEUMONIAE, nel siero [S]	EIA	titolo anticorpale	negativo inferiore a 1:5; dubbio da 1:4 a 1:40; positivo superiore a 1:40	
Ab ANTI-NUCLEO (ANA), nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" ovvero riportando il titolo anticorpale, con eventuale specifica della varietà di anticorpi osservata, espressa come pattern	inferiore a 1:40	
Ab ANTI-OVAIO, nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-PARATIROIDE, nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	

Ab ANTI-PAROTITE, nel siero [S]	EIA	sono espressi separatamente per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgG e per le immunoglobuline appartenenti alla classe delle IgM Per le IgG migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L) Per le IgM titolo	per le IgG negativo inferiore a 0,35 kU/L; dubbio da 0,35 a 0,50 kU/L; positivo superiore a 0,50 kU/L Per le IgM negativo inferiore a 1:5; dubbio da 1:5 a 1:40; positivo superiore a 1:40	
Ab ANTI-PERTOSSE, nel siero [S]	microagglutinazione	titolo anticorpale Viene effettuata la ricerca degli anticorpi totali presenti nel siero, senza distinzione tra IgG e IgM	negativo inferiore a 1:16; dubbio da 1:16 a 1:32; positivo superiore a 1:32	
Ab ANTI-RECETTORI TSH, nel siero [S]	RIA	Unità per litro di siero (U/L)	negativo inferiore a 9; dubbio da 9 a 14; positivo superiore a 14	
Ab ANTI-RICKETTSIE, vedere WEIL-FELIX				
Ab ANTI-ROSOLIA (IgG), nel siero [S]	ELFA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 10 kU/L; dubbio da 10 a 15 kU/L; positivo superiore a 15 kU/L	
Ab ANTI-ROSOLIA (IgM), nel siero [S]	ELFA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 0,8 kU/L; dubbio da 0,8 a 1,2 kU/L; positivo superiore a 1,2 kU/L	
Ab ANTI-SALMONELLA, vedere WIDAL				
Ab ANTI-STAFILOLISINA, nel siero [S]	agglutinazione	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	fino a 2 kU/L	
Ab ANTI-STREPTOLISINA O, nel siero [S]	turbidimetrico	migliaia di Unita' (kilounità) per litro di siero (kU/L)	nel bambino fino a 150 kU/L; nell'adulto fino a 200 kU/L	

Ab ANTI-SURRENE nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-TESTICOLO, nel siero [S]	immunofluorescenza indiretta	"assenti" o "presenti"	assenti	
Ab ANTI-TETANO, nel siero [S]	immunocromatografia	Unità per millilitro di siero (UI/mL)	non immune inferiore a 0,1 U; dubbio da 0,1 a 0,2; immune superiore a 0,2	
Ab ANTI-TIREOGLOBULINA, nel siero [S]	IRMA	migliaia di Unita' (kilounità) per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 100 kU/L; dubbio tra 100 e 200 kU/L; positivo superiore a 200 kU/L	
Ab ANTI-TIREOPEROSSIDASI, nel siero [S]	RIA	migliaia di Unita' (kilounità) per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 70 kU/L; dubbio tra 70 e 130 kU/L; positivo superiore a 130 kU/L	
Ab ANTI-TIROIDE, nel siero [S], vedere Ab ANTI-TIREOGLOBULINA e Ab ANTI-TIREOPEROSSIDASI				
Ab ANTI-TOXOPLASMA (IgG), nel siero [S]	ELFA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 8 kU/L; dubbio da 8 a 10 kU/L; positivo superiore a 10 kU/L	
Ab ANTI-TOXOPLASMA (IgM), nel siero [S]	ELFA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 0,55 kU/L; dubbio da 0,55 a 0,65 kU/L; positivo superiore a 0,65 kU/L	
Ab ANTI-VARICELLA/ZOSTER, nel siero [S]	ELFA	migliaia di Unità (kilounità) di immunoglobuline G (IgG) per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 0,6 kU/L; dubbio da 0,6 a 0,9 kU/L; positivo superiore a 0,9 kU/L	
Ab FTA-ABS (Ig totali), nel siero [S]	immunofluorescenza	"assenti" o "presenti" con riferimento alla pre-	assenti	la sigla FTA-ABS sta per Fluore-

		senza di anticorpi specifici per le spirochete appartenenti alla specie Treponema pallidum		scent Treponemal Antibody-AB-Sorbed
Ab, Sigla utilizzata per indicare gli ANTICORPI				
ACETONE, nel siero [S]	cromatografico	milligrammi per litro di siero (mg/L)	fino a 10 mg/L nei soggetti non esposti	
ACETONE, nelle urine [U]	cromatografico	milligrammi per litro di urina (mg/L)	fino a 100 mg/L	
ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	cromatografico	milligrammi eliminati nel corso di 24 ore (mg)	da 2 a 10 mg	
ACIDO delta-AMMINOLEVULINICO, nelle urine [U]	fluorimetrico	milligrammi per litro di urina (mg/L)	da 1,3 a 7,0 mg/L	
ACIDO FENILGLIOSSILICO, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	inferiore a 250, mg/L nei soggetti professionalmente esposti	
ACIDO FOLICO, vedere FOLATO				
ACIDO FORMICO, nelle urine [U]	gascromatografico	milligrammi per litro di urina (mg/L)	inferiore a 100 mg/L nei soggetti professionalmente esposti	
ACIDO IPPURICO, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	inferiore a 3000 mg/L	
ACIDO MANDELICO, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	inferiore a 1000 mg/L	
ACIDO METILIPPURICO, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	inferiore a 1690 mg/L	
ACIDO TRICLORACETICO, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	non esposti inferiore a 5 mg/L, esposti inferiore a 100 mg/L	
ACIDO URICO, vedere URATO				
ACIDO VALPROICO, nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	intervallo terapeutico da 50 a 100 mg/L	
ACIDO VANILMANDELICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	cromatografico	milligrammi emessi con le urine delle 24 ore (mg)	da 2,0 a 11,0 mg	

ACP, vedere FOSFATASI ALCALINA				
ACPP, vedere FOSFATASI PROSTATICA				
ACTH (test da stimolo), nel plasma [P]	IRMA	nanogrammi per litro di plasma (ng/L), separatamente per i cinque prelievi, indicati rispettivamente come 0', 15', 30', 60', 90' e 120'	alle ore 8 del mattino da 10 a 50 ng/L	cinque prelievi, al tempo zero (0) e dopo 15, 30, 60, 90 e 120 minuti. Il test viene effettuato stimolando la secrezione dell'ACTH mediante ipoglicemia insulinica oppure CRH
ACTH, vedere anche CORTICOTROPINA				
ADNA, vedere Ab ANTI-DNA NATIVO				
ADRENALINA, vedere CATECOLAMMINE				
AFG, vedere alfa-FETOPROTEINA				
AFP, vedere alfa-FETOPROTEINA				
Ag, sigla utilizzata per indicare gli ANTIGENI				
AGOASPIRATO, vedere CITOLOGICO AGOASPIRATO				
Al, vedere ALLUMINIO				
ALA DEIDRASI, nel sangue [Sg]	fluorimetrico	unità per millilitro di eritrociti (U/mL di eritrociti)	da 28 a 65 U/mL di eritrociti	
ALANINA-AMMINOTRANSFERASI, vedere ALT				
ALAT, vedere ALT				
ALCOOL BUTILICO, nel sangue [Sg]	gascromatografico	milligrammi per litro di sangue (mg/L)	assente	

ALCOOL ISOBUTILICO, nel sangue [Sg]	gascromatografico	milligrammi per litro di sangue (mg/L)	assente	
ALCOOL METILICO, vedere METANOLO				
ALCOOL, nelle urine [U]	gascromatografia	milligrammi per litro di urina (mg/L)	fino a 15 mg/L nei soggetti professionalmente esposti	
ALDOLASI, nel siero [S]	enzimatico	Unità per litro di siero (U/L)	da 1,0 a 10,0 U/L	
ALDOSTERONE (clinostatismo), nel siero [S]	RIA	nanogrammi litro di siero (ng/L)	da 10 a 150 ng/L	
ALDOSTERONE (ortostatismo), nel siero [S]	RIA	nanogrammi litro di siero (ng/L)	da 30 a 320 ng/L	
ALDOSTERONE, nelle urine delle 24 ore [dU]	RIA	microgrammi eliminati nel corso di 24 ore (µg)	da 3,0 a 30 µg	
alfa-1-ANTITRIPSINA, nel siero [S]	immunodiffusione	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 200 a 350 mg/dL	
alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA, nel siero [S]	immunoturbidimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 55 a 140 mg/dL	
alfa-2-MACROGLOBULINA, nel siero [S]	immunoturbidimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 150 a 380 mg/dL	
alfa-AMILASI, nel siero [S]	PNP-G7 a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 220 U/L	
alfa-AMILASI, nelle urine delle 24 ore [dU]	PNP-G7 a 37 °C	Unità eliminate nel corso di 24 ore (U)	inferiore a 500 U	
alfa-FETOPROTEINA, nel liquido amniotico [LA]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	vedere tabella	specificare la settimana di gravidanza
alfa-FETOPROTEINA, nel siero [S]	MEIA	migliaia di Unità per litro di siero (kU/L)	fino a 10 kU/L. Per la gravida vedere tabella al Capitolo 5	specificare la settimana di gravidanza
alfa-IDROSSIBUTIRRATO DEIDROGENASI, vedere HBDH				
alfa-IDROSSIPROGESTERONE, vedere 17-IDROSSIPROGESTERONE				

ALLUMINIO, nel plasma [P]	assorbimento atomico	microgrammi per decilitro di plasma (µg/dL)	fino a 3,8 µg/dL	
ALLUMINIO, nelle urine [U]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di urina (µg/L)	fino a 26 µg/L	
ALP, vedere FOSFATASI ALCALINA				
ALS, vedere ALDOLASI				
ALT (GPT), nel siero [S]	IFCC a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 40 U/L	
AMA, vedere Ab ANTI-MITOCONDRI				
AMG, vedere alfa-2-MACROGLOBULINA				
AMILASI, vedere alfa-AMILASI				
AMINOMAL, vedere TEOFILLINA				
AMMINE AROMATICHE, nelle urine [U]	cromatografico	milligrammi per litro di urina (mg/L)	inferiore a 1,0 mg/L	
AMMONIO, nel plasma [P]	colorimetrico	microgrammi di ione ammonio per decilitro di plasma (µg/dL)	da 30 a 75 µg/dL	
AMP-CICLICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	RIA	picomoli eliminate nel corso di 24 ore (pmol)	da 1500 a 5000 pmol	
AMS, vedere alfa-AMILASI				
ANA, vedere Ab ANTI-NUCLEO				
ANALISI CITOGENETICA FRAGILITÀ CROMOSOMICA	coltura cellulare del materiale con e senza sostanze inducenti, allestimento dei relativi preparati cromosomici, e analisi al microscopio di 100 cellule	sono riportati la frequenza di lesioni cromosomiche osservate (espressa come percentuale delle cellule con rotture rispetto alle cellule totali analizzate), e il tipo di lesioni osservate	in tutti i casi, i risultati sono riferiti ad uno standard di laboratorio, costruito mediante una popolazione di controllo costituita da soggetti confrontabili per sesso e per età, e non esposti ad agenti in grado di causare alterazioni cromosomiche	

ANALISI CITOGENETICA DEI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI INDOTTI, vedere VALUTAZIONE DEL DANNO CROMOSOMICO				
ANALISI CITOGENETICA SCAMBI CROMATIDI FRATELLI, vedere VALUTAZIONE DEL DANNO CROMOSOMICO				
ANALISI CITOGENETICA PER LO STUDIO DEL MOSAICISMO CROMOSOMICO	coltura cellulare del materiale, allestimento dei relativi preparati cromosomici, e analisi al microscopio di 50-100 cellule	vengono riportati il cariotipo, il materiale analizzato, il tipo di bandeggio impiegato, il numero di metafasi analizzate, e un commento esplicativo dei risultati. Viene inoltre allegata la ricostruzione del cariogramma. Nel caso di più linee cellulari, viene allegata la ricostruzione del cariogramma di ciascuna di loro.	non definiti	
ANALISI DI POLIMORFISMI (STR,VNTR)	analisi del DNA	viene fornito un referto interpretativo	non definiti	quest'analisi viene utilizzata per la diagnosi delle affezioni genetiche per le quali si rimanda alle informazioni specifiche
ANALISI DNA CON PCR	analisi del DNA	viene fornito un referto interpretativo	non definiti	quest'analisi viene utilizzata per la diagnosi delle affezioni geneti-

				che per le quali si rimanda alle informazioni specifiche
ANALISI DNA E IBRIDAZIONE CON SONDA MOLECOLARE	analisi del DNA	viene fornito un referto interpretativo	non definiti	quest'analisi viene utilizzata per la diagnosi delle affezioni genetiche per le quali si rimanda alle informazioni specifiche
ANCA, vedere Ab ANTI-CITOPLASMA DEI NEUTROFILI (ANCA)				
ANTIBIOGRAMMA	CMB	i risultati esprimono un giudizio di sensibilità (S = sensibile, I = intermedio, R = resistente), per ciascuno degli antibiotici testati	non definiti	l'antibiogramma viene eseguito esclusivamente qualora le colture effettuate in laboratorio evidenzino la presenza di germi patogeni nel materiale biologico esaminato, separatamente su ciascun ceppo isolato
ANTICORPI, vedere Ab				
ANTIGENE Au, vedere ANTIGENE HBsAg				
ANTIGENE CA 125, nel siero [S]	MEIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	nell'adulto sano, fino a 35 µg/L	
ANTIGENE CA 15.3, nel siero [S]	MEIA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	fino a 30 kU/L	

ANTIGENE CA 19.9 (GICA), nel siero [S]	MEIA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	fino a 37 kU/L	
ANTIGENE CARCINOEMBRIOGENICO, vedere CEA				
ANTIGENE CARCINOEMBRIONARIO, vedere CEA				
ANTIGENE CARCINOGENICO GASTROINTESTINALE, vedere ANTIGENE CA 19.9				
ANTIGENE HBeAg, nel siero [S]	MEIA	"assente" o "presente"	assente	
ANTIGENE HBsAg, nel siero [S]	MEIA	"assente" o "presente"	assente	
ANTIGENE HLA B27, nel sangue [Sg]	test di linfotossicità	"assente" o "presente"	assente	
ANTIGENE POLIPEPTIDICO TISSUTALE, vedere ANTIGENE TPA				
ANTIGENE PROSTATICO SPECIFICO, vedere ANTIGENE PSA				
ANTIGENE PSA, nel siero [S]	IFMA	microgrammi per litro di siero (µg/L), separatamente per il PSA totale e per il PSA libero Viene inoltre riportato il rapporto tra PSA libero e PSA totale, espresso in percentuale	PSA totale fino a 4,0 µg/L, PSA libero fino a 0,8 µg/L, rapporto libero/totale superiore al 18% per valori del PSA totale compresi tra 4,0 e 10 µg/L. In altre parole, il rapporto libero/totale deve essere preso in considerazione solamente per valori del PSA totale compresi tra 4,0 e 10 µg/L: e in questi casi, il valore del rapporto deve essere superiore al 18%	

ANTIGENE TPA, nel siero [S]	RIA	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 85 U/L	
ANTITRIPSINA, vedere alfa-1-ANTITRIPSINA				
ANTITROMBINA III, nel plasma [P]	cromogenico	attività percentuale rispetto a una miscela di plasmi di soggetti sani, per i quali è assunta un'attività pari al 100%	dall'80% al 120%	
AP, vedere FOSFATASI ACIDA				talora questa sigla viene impropriamente utilizzata per indicare l'Attività Protrombinica (sigla corretta PT) o l'Aggregazione Piastrinica (nessuna sigla prevista).
APCA, vedere Ab ANTI-MUCOSA GASTRICA (APCA)				
APOLIPOPROTEINA AI, nel siero [S]	immunoturbidimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 110 a 190 mg/dL I percentili della distribuzione nell'uomo e nella donna sono riportati al Capitolo 5	
APOLIPOPROTEINA B, nel siero [S]	immunoturbidimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 70 a 160 mg/dL I percentili della distribuzione nell'uomo e nella donna sono riportati al Capitolo 5	
APTT, nel plasma [P]	coagulativo	rapporto (ratio) tra il tempo di coagulazione del soggetto in esame e	da 0,90 a 1,17	

		quello di una miscela di plasmi normali		
ARGENTO, nelle urine [U]				
ASAT, vedere AST				
ASMA, vedere Ab ANTI-MUSCOLO LISCIO				
ASPARTATO-AMMINOTRANSFERASI, vedere AST				
AST (GOT), nel siero [S]	IFCC a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 40 U/L	
AZOTEMIA, vedere UREA, nel siero				
AZOTO UREICO, vedere UREA				
AZOTO, vedere UREA				
AZOTURIA, vedere UREA, nelle urine				
BACILLO DI KOCH, nelle urine (esame batterioscopico)	ricerca microscopica dopo colorazione di Ziehl-Neelsen	"negativa" (con riferimento alla ricerca), ovvero come "positiva", in questo caso con specifica semiquantitativa del numero di bacilli acido-alcol resistenti osservati	non definiti	
BACILLO DI KOCH, nell'espettorato (esame batterioscopico)	ricerca microscopica dopo colorazione di Ziehl-Neelsen	"negativa" (con riferimento alla ricerca), ovvero come "positiva", in questo caso con specifica semiquantitativa del numero di bacilli acido-alcol resistenti osservati	non definiti	
BARBITUREMIA, vedere FENOBARBITAL				
BATTERIOSCOPICO, vedere BACILLO DI KOCH, ESSUDATO				

AURICOLARE, ESSUDATO FARINGEO, SECRETO CERVICALE, SECRETO NASALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE				
beta-2-MICROGLOBULINA, nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	fino a 2,6 mg/L	
beta-2-MICROGLOBULINA, nelle urine [U]	IFMA	milligrammi per litro di urina (mg/L)	da 0,010 a 0,330 mg/L	
beta-ESTRADIOLO, vedere ESTRADIOLO (E2)				
beta-HCG, vedere GONADOTROPINA CORIONICA				
BICARBONATI, nel siero [S]	enzimatico	millimoli per litro di siero (mmol/L)	da 23 a 29 mmol/L	
BILIRUBINA TOTALE + FRAZIONATA, nel siero [S]	DPD per la bilirubina totale, Jendrassik-Grof per la bilirubina frazionata (diretta e indiretta)	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL), separatamente per la bilirubina totale, per la bilirubina diretta e per la bilirubina indiretta	bilirubina totale da 0,10 a 1,15 mg/dL, bilirubina diretta da 0,01 a 0,30 mg/dL; bilirubina indiretta da 0,10 a 0,85 mg/dL	
C1-INIBITORE, nel siero [S]	immunodiffusione	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 15 a 35 mg/dL	
CA 125, vedere ANTIGENE CA 125				
CA 15.3, vedere ANTIGENE CA 15.3				
CA 19.9, vedere ANTIGENE CA 19.9				
Ca, vedere CALCIO TOTALE				
Ca++, vedere CALCIO IONIZZATO				
CADMIO, nel sangue [Sg]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di sangue (µg/L)	inferiore a 10 µg/L	
CADMIO, nelle urine [U]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di urina (µg/L)	inferiore a 15 µg/L	
CALCIO IONIZZATO, nel siero [S]	potenziometria	millimoli di ione calcio per litro di siero (mmol/L)	da 1,28 a 1,60 mmol/L	

CALCIO TOTALE, nel siero [S]	colorimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 8,1 a 10,4 mg/dL	
CALCIO TOTALE, nelle urine delle 24 ore [dU]	colorimetrico	milligrammi eliminati con le urine delle 24 ore (mg)	da 100 a 300 mg	
CALCITONINA, nel siero [S]	RIA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	fino a 10,0 ng/L	
CALCOLI URINARI	viene eseguita l'analisi chimico-fisica del materiale inviato		sono riportati numero, dimensione, colore e consistenza dei calcoli Se il materiale si presenta in quantità sufficiente per l'applicazione dei metodi di indagine utilizzati, viene fornita una risposta interpretativa con l'indicazione della composizione del calcolo relativamente ai seguenti componenti: fosfati, ossalati, calcio, sali di ammonio, acido urico, magnesio e cistina	
CANDIDA NELLE FECI, esame colturale	colturale	"negativa" o "positiva" con riferimento alla ricerca della Candida	negativa	
CARBAMAZEPINA, nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	intervallo terapeutico da 4,1 a 10,0 mg/L	
CARBOLITHIUM, vedere LITIO				
CARBOSSIEMOGLOBINA, nel sangue [Sg]	spettrofotometrico	percentuale dell'emoglobina totale (%)	non fumatori inferiore al 3%, fumatori inferiore al 10%	
CARDIOREG, vedere DIGOSSINA				
CARIOTIPO SU FIBROBLASTI CUTANEI	coltura cellulare del materiale, allestimento dei	vengono riportati il cariotipo, il materiale ana-	non definiti	

	relativi preparati cromosomici, analisi delle metafasi al microscopio, e ricostruzione del cariotipo	lizzato, il tipo di bandeggio impiegato, il numero di metafasi analizzate, il numero di aree di crescita e di colture indipendenti analizzate, e un commento esplicativo dei risultati		
CARIOTIPO SU LIQUIDO AMNIOTICO	coltura cellulare "in-situ" del materiale, allestimento dei relativi preparati cromosomici, analisi delle metafasi al microscopio, e ricostruzione del cariotipo	vengono riportati il cariotipo, il materiale analizzato, il tipo di bandeggio impiegato, il numero di metafasi analizzate, il numero di colonie e di colture indipendenti analizzate, e un commento esplicativo dei risultati. Viene inoltre allegata la ricostruzione del cariogramma	non definiti	
CARIOTIPO SU MIDOLLO OSSEO	coltura cellulare del materiale, allestimento dei relativi preparati cromosomici, analisi delle metafasi al microscopio, e ricostruzione del cariogramma	vengono riportati il cariotipo, il materiale analizzato, il tipo di bandeggio impiegato, il numero di metafasi analizzate, e un commento esplicativo dei risultati	non definiti	
CARIOTIPO SU SANGUE PERIFERICO	coltura cellulare del materiale con e senza sostanze inducenti, allestimento dei relativi preparati cromosomici, e analisi al microscopio di 100 cellule	viene fornito un referto interpretativo		

CARIOTIOPI SU VILLI CORIALI	coltura cellulare a breve e medio termine del materiale, allestimento dei relativi preparati cromosomici, analisi delle metafasi al microscopio, e ricostruzione del cariotipo	vengono riportati il cariotipo, il materiale analizzato, il tipo di bandeggio impiegato, il numero di metafasi analizzate, il numero di aree di crescita e di colture indipendenti analizzate, e un commento esplicativo dei risultati. Viene inoltre allegata la ricostruzione del cariotipo	non definiti	
CATECOLAMMINE, nel plasma [P]	HPLC	nanogrammi per litro di plasma (ng/L), separatamente per l'adrenalina e per la noradrenalina	adrenalina da 10 a 196 ng/L, noradrenalina da 78 a 521 ng/L	
CATECOLAMMINE, nelle urine delle 24 ore [dU]	HPLC	microgrammi (µg), separatamente per l'adrenalina e per la noradrenalina	adrenalina da 2,5 a 33,6 µg; noradrenalina da 18,1 a 128,2 µg	
CEA, nel siero [S]	MEIA	microgrammi per millilitro di siero (µg/L)	non fumatori fino a 5 µg/L, fumatori fino a 10 µg/L	
CERULOPLASMINA, nel siero [S]	immunodiffusione	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 15 a 60 mg/dL	
CHE, vedere COLINESTERASI				
CHLAMYDIA T. DNA, nelle urine [U]	PCR (Polymerase Chain Reaction)	"assente" o "presente" con riferimento al DNA (acido desossiribonucleico) della Chlamydia trachomatis	assente	
CITOLOGICO AGOASPIRATO	nel caso di liquidi da cisti tutto il materiale viene o centrifugato o strisciato su vetrini e fissa-	a parte situazioni particolari, i risultati sono compendiati nelle quattro categorie diagnosti-	non definiti	

	to con citospray. Le colorazioni standard sono Papanicolau e May-Grünwald-Giemsa. In casi specifici, e in relazione al problema diagnostico, vengono lasciati strisci in bianco per effettuare colorazioni istochimiche speciali o immunoistochimiche	che di "materiale inadeguato", ovvero di reperto "negativo", "sospetto" o "positivo per cellule tumorali maligne (CTM)"		
CITOLOGICO CERVICO VAGINALE [PAP test]	colorazione degli strisci con Papanicolau	dopo indicazione dell'adeguatezza del materiale inviato ("materiale adeguato", "materiale subottimale" o "materiale inadeguato"), i risultati sono espressi secondo le categorie diagnostiche (i) "negativo: cellule normali", (ii) "reperto infiammatorio" con eventuale specifica del tipo di flogosi, (iii) "lesioni intraepiteliali di tipo pavimentoso di basso grado" con la specifica HPV o CIN I, (iv) "lesioni intraepiteliali di tipo pavimentoso di alto grado" con la specifica CIN II o CIN III, (v) "presenza di CTM", con specifica caratterizzazione del reperto	non definiti	

CITOLOGICO DI VERSAMENTI	concentrazione degli elementi figurati mediante centrifugazione, seguita da allestimento degli strisci. Se la quantità di sedimento risulta sufficiente, si procede inoltre all'inclusione in paraffina. Gli strisci sono colorati con Papanicolau e May-Grünwald-Giemsa. Le sezioni dell'incluso in paraffina sono colorate con ematossilina-eosina e Alcian-PAS. In casi specifici, e in relazione al problema diagnostico, vengono lasciati strisci in bianco per effettuare colorazioni istochimiche speciali o immunoistochimiche	sono utilizzate le tre categorie di "materiale inadeguato", ovvero di reperto "negativo" o "positivo per CTM" (specificando quando possibile l'origine primitiva o metastatica)	non definiti	
CITOLOGICO ESPETTORATO	inclusione in paraffina ed esame di sezioni istologiche colorate con ematossilina-eosina	sono utilizzate le tre categorie di "materiale inadeguato", ovvero di reperto "negativo" o "positivo per CTM"	non definiti	
CITOLOGICO URINE	concentrazione degli elementi figurati mediante centrifugazione, seguita da allestimento degli strisci Vengono allestiti due vetrini, successivamente colorati con Papanicolau In casi specifici,	sono utilizzate le tre categorie di "materiale inadeguato", ovvero di reperto "negativo" o "positivo per CTM"	non definiti	

	e in relazione al problema diagnostico, vengono lasciati strisci in bianco per effettuare colorazioni istochimiche speciali o immunoistochimiche			
CITOLOGICO, vedere CITOLOGICO AGOASPIRATO, CITOLOGICO CERVICO-VAGINALE [PAP test], CITOLOGICO DI VERSAMENTI, CITOLOGICO ESPETTORATO, CITOLOGICO URINE, ESAME CITOLOGICO				
CITOMEGALOVIRUS DNA, nel siero [S]	PCR (Polymerase Chain Reaction) e ibridazione	numero di copie del virus per millilitro (mL) di siero, e precisamente come "< 400" (se inferiori a quattrocento copie per mL), come "> 100000" (se superiori a un centomila copie per mL), ovvero come numero esatto di copie per mL se il risultato è compreso entro i due limiti indicati	assente	
CK, vedere CREATINA CHINASI		Unità per litro di siero		
CK-MB, nel siero [S]	immunologico	(U/L)	inferiore al 6% della CK totale, per valori della CK totale superiori a 190 U/L	
Cl, vedere CLORURO				
CLEARANCE DELLA CREATININA, vedere CREATININA CLEARANCE				

CLEARANCE DELL'UREA, vedere UREA CLEARANCE				
CLORO, vedere CLORURO				
CLORURO, nel siero [S]	potenziometria	millimoli per litro di siero (mmol/L)	da 98 a 112 mmol/L	
CLORURO, nelle urine delle 24 ore [dU]	potenziometria	millimoli emesse con le urine delle 24 ore (mmol)	da 110 a 250 mmol	
COBALAMMINA (Vitamina B12), nel siero [S]	IFMA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	da 211 a 911 ng/L	mantenere il prelievo al riparo dalla luce
COBALTO, nelle urine [U]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di urina (µg/L)	fino a 30 µg/L	
COLESTEROLO HDL, nel siero [S]	Trinder	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	valore desiderabile (in base alle raccomandazioni degli organismi internazionali) ai fini della prevenzione del rischio cardiovascolare superiore a 35 mg/dL nell'uomo e superiore a 40 mg/dL nella donna	
COLESTEROLO LDL, nel siero [S]	Trinder (il colesterolo delle lipoproteine a bassa densità [LDL] viene misurato direttamente e non più calcolato mediante la formula di Friedewald)	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	valore desiderabile (in base alle raccomandazioni degli organismi internazionali) ai fini della prevenzione del rischio cardiovascolare inferiore a 130 mg/dL sia nell'uomo che nella donna	
COLESTEROLO TOTALE, nel siero [S]	Trinder	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	valore desiderabile (in base alle raccomandazioni degli organismi	

			internazionali) ai fini della prevenzione del rischio cardiovascolare inferiore a 200 mg/dL sia nell'uomo che nella donna	
COLINESTERASI, nel siero [S]	BTC a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	da 4000 a 14000 U/L	
COLTURALE FECI, vedere COPROCOLTURA				
COLTURALE SANGUE, vedere EMOCOLTURA				
COLTURALE URINE, vedere URINOCOLTURA				
COLTURALE, vedere ESPETTORATO, LIQUIDO SEMINALE, SECRETO CERVICALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE, TAMPONE AURICOLARE, TAMPONE FARINGEO, TAMPONE NASALE, TAMPONE OCULARE, TAMPONE RETTALE				
COMIZIAL, vedere FENOBARBITAL				
COMPLEMENTO C3, nel siero [S]				
COMPLEMENTO C4, nel siero [S]	immunoturbidimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 55 a 120 mg/dL	
COMPLEMENTO, vedere COMPLEMENTO C3, COMPLEMENTO C4, C1-INIBITORE	immunoturbidimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 20 a 50 mg/dL	
COMPLETO FECI, vedere ESAME COMPLETO FECI				
COMPLETO URINE, vedere URINE				
CONTA DI ADDIS, nelle urine [U]				

	esame microscopico con conteggio degli elementi	numero degli elementi eliminati nel corso di 24 ore, separatamente per leucociti, eritrociti e cilindri (numero/24ore) I leucociti sono espressi in milioni/24 ore (10^6/24 ore), gli eritrociti sono espressi in milioni/24 ore (10^6/24 ore), i cilindri in migliaia/24 ore (10^3/24 ore)	leucociti fino a 2 (10^6/ 24 ore), eritrociti fino a 1 (10^6/24 ore), cilindri fino a 10 (10^3/24 ore)	
COOMBS DIRETTO, vedere TEST DI COOMBS DIRETTO				
COOMBS INDIRETTO, vedere TEST DI COOMBS INDIRETTO				
COOMBS, vedere TEST DI COOMBS DIRETTO e TEST DI COOMBS INDIRETTO				
COPROCOLTURA	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni appartenenti ai generi Salmonella, Shigella e Campylobacter. L'antibiogramma viene effettuato solamente sugli eventuali ceppi di Salmonella e/o Shigella isolati. Nel caso del Campylobacter l'antibiogramma non viene eseguito in quanto si tratta di un germe sicuramente sensibile a eritromicina e gentamicina	negativa la ricerca di Salmonella, Shigella e Campylobacter	

CORPI ASBESTOSICI ESCREATO	inclusione in paraffina ed esame di almeno due sezioni istologiche colorate con ematossilina-eosina	"assenti" o "presenti"	assenti	
CORTICOTROPINA (ACTH), nel plasma [P]	IRMA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	alle ore 8 del mattino da 10 a 50 ng/L	
CORTISOLO (test da stimolo), nel siero [S]	RIA	microgrammi per decilitro di siero (µg/dL), separatamente per i cinque prelievi, indicati rispettivamente come 0', 30', 60', 90' e 120'	mattino da 5,0 a 25,0 µg/dL	cinque prelievi, al tempo zero (0) e dopo 30, 60, 90 e 120 minuti
CORTISOLO LIBERO, nelle urine delle 24 ore [dU]	RIA	microgrammi emessi con le urine delle 24 ore (µg)	da 10 a 80 µg	
CORTISOLO, nel siero [S]	RIA	microgrammi per decilitro di siero (µg/dL)	da 5,0 a 25,0 µg/dL	
C-PEPTIDE (test da stimolo), nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L), separatamente per i cinque prelievi, indicati rispettivamente come 0', 30', 60', 90' e 120'	nel prelievo basale da 0,4 a 4,0 µg/L	cinque prelievi, al tempo zero (0) e dopo 30, 60, 90 e 120 minuti durante l'esecuzione della curva da carico di glucosio
C-PEPTIDE, nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	da 0,4 a 4,0 µg/L	
C-PEPTIDE, nelle urine delle 24 ore [dU]	RIA	nanogrammi eliminati nel corso di 24 ore (ng)	da 0,2 a 1,4 ng	
CPK, vedere CREATINA CHINASI				
CREATINA CHINASI, nel siero [S]	DGKC a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 190 U/L	
CREATININA CLEARANCE	Jaffè cinetico	millilitri di siero che il rene, in un minuto, depura della creatinina (mL/min)	da 60 a 160 mL/min	

CREATININA, nel siero [S]	Jaffè cinetico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 0,5 a 1,5 mg/dL	
CREATININA, nelle urine delle 24 ore [dU]	Jaffè cinetico	grammi eliminati con le urine delle 24 ore (g)	da 0,8 a 2,0 g	
CRIOGLOBULINE, nel siero [S]	crioprecipitazione spontanea	"assenti" o "presenti"	assenti	
CROMO, nelle urine [U]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di urina (µg/L)	inferiore a 35 µg/L	
CUPREMIA, vedere RAME, nel siero				
delta-4-ANDROSTENEDIONE, nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	soggetto prepubere da 0,1 a 0,2 µg/L, uomo da 0,2 a 3,1 µg/L, donna da 0,2 a 3,1 µg/L, donna in menopausa da 0,3 a 1,8 µg/L	
DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE	Ibridazione In Situ Fluorescente (FISH)	sono riportati il cariotipo, il materiale analizzato, la tecnica utilizzata, le caratteristiche della/e sonda/e utilizzata/e, un commento esplicativo dei risultati. Viene inoltre allegata la documentazione fotografica dei risultati	non definiti	
DHEA SOLFATO, nel siero [S]	RIA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	nella donna da 0,35 a 4,30 mg/L, nell'uomo da 0,80 a 5,60 mg/L	
DIFENILIDANTOINA, vedere FENITOINA				
DIFFUMAL, vedere TEOFILLINA				
DIGOMAL, vedere DIGOSSINA				
DIGOSSINA, nel siero [S]	IFMA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	intervallo terapeutico da 0,80 a 2,00 µg/L	

DIIDROTESTOSTERONE, nel siero [S]	RIA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	soggetto prepubere da 5 a 25 ng/L, uomo da 40 a 200 ng/L, donna da 15 a 50 ng/L, donna in menopausa da 5 a 25 ng/L	
DINTOINA, vedere FENITOINA				
E2, vedere ESTRADIOLO				
E3, vedere ESTRIOLO				
EBV, vedere Ab-ANTI EPSTEIN-BARR e Ab-ANTI EPSTEIN-BARR (MONOTEST)				
ELETTROFORESI DELL'EMOGLOBINA, vedere EMOGLOBINE ANOMALE				
ELETTROFORESI LIPOPROTEINE	separazione elettroforetica e scansione densitometrica	sono riportati i valori delle quattro frazioni elettroforetiche, espressi come percentuale delle lipoproteine totali (chilomicroni, alfa-lipoproteine, pre-beta-lipoproteine, beta-lipoproteine) e il valore del rapporto tra la somma delle pre-beta lipoproteine e le beta-lipoproteine (al numeratore) e le alfa proteine (al denominatore)	chilomicroni "assenti"; alfa-lipoproteine dal 16,0 al 40,0%; pre-beta lipoproteine fino al 27,0%; beta-lipoproteine dal 40,0 al 57,0%; rapporto tra la somma delle pre-beta lipoproteine e le beta-lipoproteine (al numeratore) e le alfa-lipoproteine (al denominatore) da 1,0 a 5,3	
ELETTROFORESI PROTEICA, vedere ELETTROFORESI PROTEINE				
ELETTROFORESI PROTEINE, nel siero [S]	separazione elettroforetica e scansione densitometrica	sono riportati il valore del rapporto albumina/globuline e i valori delle cinque frazioni elettro-	rapporto albumina/globuline da 1,22 a 2,23; albumina dal 52,0 al 69,0 %; alfa-1-globuli-	

		foretiche, espressi come percentuale delle proteine totali (albumina, alfa-1-globuline, alfa-2-globuline, beta-globuline e gamma-globuline). Eventuali componenti monoclonali vengono segnalate e, se quantitativamente significative, vengono separate ed espresse in grammi per decilitro di siero (g/dL)	ne dall'1,0 al 6,0; alfa-2-globuline dal 4,5 al 14,0%, beta-globuline dal 7,0 al 14,0%, gamma-globuline dal 9,0 al 20,0%	
ELETTROFORESI URINE	separazione elettroforetica e ispezione visiva della striscia	viene riportata la concentrazione delle proteine urinarie in milligrammi per litro di urina (mg/L), quindi viene riportato un giudizio semiquantitativo sulla presenza delle bande che riflettono il grado di proteinuria tubulare e delle bande che riflettono il grado di proteinuria glomerulare	per le proteine nelle urine fino a 90 mg/L	
ELETTROLITI , nelle urine delle 24 ore [dU], vedere le singole analisi SODIO, POTASSIO e CLORURO, nelle urine delle 24 ore [dU]				
ELETTROLITI, nel siero [S], vedere le singole analisi SODIO, POTASSIO e CLORURO, nel siero [S]				
EMATOCRITO, vedere VALORE EMATOCRITO				

EMOCOLTURA	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	assenza di germi	
EMOCROMO	analisi quantitativa e qualitativa degli elementi corpuscolati del sangue con contaglobuli ed eventuale (nel caso di anomalie maturative a carico della serie bianca) osservazione microscopica dello striscio di sangue periferico colorato con colorazione panottica (May-Grünwald-Giemsa) per l'esame morfologico di eritrociti, leucociti e piastrine, e per il conteggio differenziale dei leucociti	numero degli elementi contenuti in un litro di sangue per i leucociti (10^9/L) e per gli eritrociti (10^{12}/L), in grammi per decilitro di sangue (g/dL) per l'emoglobina, in percentuale (%) per l'ematocrito, in femtolitri (fl) per il volume globulare medio (MCV), in picogrammi (pg) per l'emoglobina globulare media (Hb globulare media o MCH), in g/dL per la concentrazione emoglobinica globulare media (Hb concentrazione media, MCHC), come numero degli elementi contenuti in un litro di sangue per le piastrine (10^9/L) Viene inoltre riportata la formula leucocitaria sia come percentuale (%) sia come numero degli elementi contenuti in un litro di sangue (10^9/L) per le cellule mature normalmente presenti (granulociti neutro-	vedere tabella Capitolo 5	qualora nel campione siano presenti agglutinazione degli eritrociti o aggregazione piastrinica, si consiglia, alla ripetizione dell'analisi, di richiedere prelievo a caldo (nel caso di agglutinazione degli eritrociti), o doppio prelievo, in EDTA e in sodio citrato (nel caso di aggregazione piastrinica)

		fili, linfociti, monociti, granulociti eosinofili, granulociti basofili). Vengono infine segnalate in termini quantitativi o descrittivi eventuali elementi anomali		
EMOGLOBINA A1c, vedere EMOGLOBINA GLICATA				
EMOGLOBINA ALCALI-RESISTENTE, vedere EMOGLOBINA FETALE				
EMOGLOBINA FETALE, nel sangue [Sg]	HPLC	percentuale dell'emoglobina totale del sangue (%)	dallo 0,5% all'1,5%	
EMOGLOBINA GLICATA, nel sangue [Sg]	HPLC	percentuale dell'emoglobina totale del san+F23gue (%)	dal 3,8 al 5,8%	
EMOGLOBINA GLICOSILATA, vedere EMOGLOBINA GLICATA				
EMOGLOBINE ANOMALE, nel sangue [Sg]	HPLC	percentuale dell'emoglobina totale del sangue (%) separatamente per l'emoglobina A1, per l'emoglobina A2, per l'emoglobina F. Viene inoltre riportata segnalazione qualitativa relativa alla presenza di eventuali componenti emoglobiniche anomale	emoglobina A1 dal 95,0% al 98,4%, emoglobina A2 dall'1,5% al 3,2%, emoglobina F dallo 0,1% all'1,5% Le varianti emoglobiniche sono di norma "assenti"	
EMOGRUPPO, vedere GRUPPO SANGUIGNO ABO E FATTORE Rh				
ENA, vedere Ab ANTI-ANTOGENI NUCLEARI ESTRAIBILI (ENA)				

EOSINOFILI, nel sangue [Sg]	analisi quantitativa e qualitativa degli elementi corpuscolati del sangue con contaglobuli ed eventuale (nel caso di anomalie maturative) osservazione microscopica dello striscio di sangue periferico colorato con colorazione panottica (May-Grünwald-Giemsa) per l'esame morfologico	percentuale dei leucociti (%)	fino al 6%	
EPINEFRINA, vedere CATECOLAMMINE				
ESAME BATTERIOSCOPICO, vedere BACILLO DI KOCH, ESSUDATO AURICOLARE, ESSUDATO FARINGEO, SECRETO CERVICALE, SECRETO NASALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE				
ESAME CITOLOGICO	vengono allestiti gli strisci. Se la quantità di sedimento risulta sufficiente, si procede inoltre all'inclusione in paraffina. Gli strisci sono colorati con Papanicolau e May-Grünwald-Giemsa. Le sezioni dell'incluso in paraffina sono colorate con ematossilina-eosina e Alcian-PAS. In casi speci-	a parte situazioni particolari, i risultati sono compendiati nelle quattro categorie diagnostiche di "materiale inadeguato", ovvero di reperto "negativo", o "positivo per CTM"	non definiti	

	fici, e in relazione al problema diagnostico, vengono lasciati strisci in bianco per effettuare colorazioni istochimiche speciali o immunoistochimiche			
ESAME CITOLOGICO, vedere CITOLOGICO AGOASPIRATO, CITOLOGICO CERVICO-VAGINALE [PAP test], CITOLOGICO DI VERSAMENTI, CITOLOGICO ESPETTORATO, CITOLOGICO URINE, ESAME CITOLOGICO				
ESAME COLTURALE FECI, vedere COPROCOLTURA				
ESAME COLTURALE SANGUE, vedere EMOCOLTURA				
ESAME COLTURALE URINE, vedere URINOCOLTURA				
ESAME COLTURALE, vedere ESPETTORATO, LIQUIDO SEMINALE, SECRETO CERVICALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE, TAMPONE AURICOLARE, TAMPONE FARINGEO, TAMPONE NASALE, TAMPONE OCULARE, TAMPONE RETTALE				
ESAME COMPLETO FECI	esame chimico e microscopico	viene fornita una risposta qualitativa descrittiva riguardante l'aspetto, il colore, la reazione, la presenza di muco, di eritrociti, di fibre carnee,	nelle feci normali, in relazione alla dieta, possono essere presenti da piccole e moderate quantità di fibre carnee, di fibre vegetali, di	

		fibre vegetali, di amidi, di acidi grassi, di grassi neutri, di saponi, e di eventuali parassiti che includono elminti, uova di elminti, cisti di protozoi e forme vegetative (trofozoiti) di protozoi	amidi. Sono normalmente assenti muco, eritrociti, acidi grassi, grassi neutri e saponi. I parassiti sono anch'essi normalmente assenti	
ESAME COMPLETO URINE, vedere URINE ESAME COMPLETO				
ESAME DI TRASUDATO/ESSUDATO	sul liquido inviato sono effettuati (i) l'esame chimico-fisico, (ii) l'esame batterioscopico per la ricerca del bacillo di Koch e (iii) l'esame colturale per la ricerca di germi patogeni	i risultati sono espressi separatamente per (i) esame chimico-fisico (aspetto, colore, peso specifico, proteine, glucosio, AST, ALT, LDH, amilasi, fosfatasi alcalina), (ii) esame batterioscopico (viene effettuata la ricerca del bacillo di Koch, con eventuale specifica semi-quantitativa del numero di bacilli acido-alcool resistenti), (iii) esame colturale (viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i)	il peso specifico nei trasudati è inferiore a 1,015 e negli essudati è superiore a 1,015. Le proteine nei trasudati sono inferiori a 3,0 g/dL e negli essudati sono superiori a 3,0 g/dL. L'esame batterioscopico e l'esame colturale in condizioni normali sono negativi	
ESAME EMOCROMOCITOMETRICO, vedere EMOCROMO				
ESAME ISTOLOGICO	colorazione sistematica delle sezioni istologiche con ematossilina-eosi-	sono riportati in termini descrittivi	non definiti	

	na. In casi specifici, e in relazione al problema diagnostico, vengono lasciati strisci in bianco per effettuare colorazioni istochimiche speciali o immunoistochimiche			
ESPETTORATO, esame batterioscopico	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	
ESPETTORATO, esame citologico, vedere CITOLOGICO ESPETTORATO				
ESPETTORATO, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	
ESSUDATO AURICOLARE Dx, esame batterioscopico	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	
ESSUDATO AURICOLARE Sn, esame batterioscopico	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	
ESSUDATO FARINGEO, esame batterioscopico	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	

ESTRADIOLO (E2) , nel siero [S]	ECLIA	picomoli per litro di siero (pmol/L)	uomo da 40 a 161 pmol/L; donna nella fase follicolare da 90 a 715 pmol/L; donna al picco da 242 a 1509 pmol/L; donna nella fase luteinica da 146 a 958 pmol/L; donna in menopausa fino a 145 pmol/L; donna gravida primo trimestre da 2883 a 16823 pmol/L, secondo trimestre da 2938 a 21150 pmol/L, terzo trimestre da 6642 a 50976 pmol/L	
ESTRIOLO (E3) , nel siero [S]	IFMA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	vedere tabella Capitolo 5	
EUDIGOX, vedere DIGOSSINA				
EUPHILLINA, vedere TEOFILLINA				
FATTORE REUMATOIDE, nel siero [S]	immunoturbidimetrico	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	fino a 14 kU/L	
FATTORI DEL COMPLEMENTO, vedere COMPLEMENTO C3, COMPLEMENTO C4 e C1-INIBITORE				
FDP/FSP, nel plasma [P]	agglutinazione	microgrammi per litro di plasma (µg/L)	fino a 200 µg/L	
Fe, vedere FERRO				
FECI ESAME COLTURALE, vedere COPROCOLTURA				
FENITOINA, nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	intervallo terapeutico da 10 a 20 mg/L	
FENOBARBITAL , nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	intervallo terapeutico da 15 a 40 mg/L	

FENOLI, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina	nei soggetti non esposti inferiore a 25 mg/L, nei soggetti esposti a benzene inferiore a 50 mg/L, nei soggetti esposti a fenolo inferiore a 250 mg/L	
FENOMENO LE	agglutinazione	"assente" o "presente" con riferimento al fenomeno LE	assente	
FERRITINA , nel siero [S]	MEIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	nell'uomo da 30 a 280 µg/L; nella donna fertile da 6 a 81 µg/L; nella donna in menopausa da 14 a 186 µg/L	
FERRO, nel siero [S]	ferrozina	microgrammi per decilitro di siero (µg/dL)	nell'uomo da 60 a 170 µg/dL, nella donna da 40 a 145 µg/dL	
FERRO, nelle urine delle 24 ore [dU]	assorbimento atomico	microgrammi eliminati nelle urine delle 24 ore (µg)	da 100 a 400 µg	
FETOPROTEINA, vedere alfa-FETOPROTEINA				
FIBRINOGENO, nel plasma [P]	fibrinogeno derivato	milligrammi per decilitro di plasma (mg/dL)	da 200 a 400 mg/dL	
FISH CON SEQUENZE IN YAC, vedere DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE				
FISH CON SONDE ALFOIDI E SEQUENZE RIPETUTE, vedere DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE				
FISH CON SONDE IN COSMIDE SINGOLA COPIA, vedere DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE				

FISH CON SONDE PAINTING, vedere DETERMINAZIONE CITO-GENETICA MOLECOLARE				
FLUORESCENT TREPONEMAL ANTIBODY, vedere Ab FTA-ABS				
FLUORURO, nelle urine [U]	potenziometria	milligrammi per litro di urina (mg/L)	da 0,2 a 1,1 mg/L	
FOLATO, nel siero [S]	IFMA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	da 2,6 a 17,0 µg/L	
FOLLITROPINA (FSH) , nel siero [S]	ECLIA	Unità (2nd IRP 78/549) per litro di siero (U/L)	uomo da 1,4 a 12,4 U/L; donna nella fase follicolare da 3,5 a 12,5 U/L; donna al picco da 4,7 a 21,5 U/L; donna nella fase luteinica da 1,7 a 7,7 U/L; donna in menopausa da 25,8 a 135 U/L; donna gravida fino a 0,2 U/L	
FOSFATASI ACIDA, nel siero [S]	colorimetrico	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 7,0 U/L	
FOSFATASI ALCALINA, nel siero [S]	DGKC a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	nel bambino da 200 a 900 U/L; nell'adulto 50 a 300 U/L	
FOSFATASI PROSTATICA , nel siero [S]	IFMA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	da 0,1 a 2,4 µg/L	
FOSFATO INORGANICO , nel siero [S]	colorimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 2,5 a 4,5 mg/dL	
FOSFATO INORGANICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	colorimetrico	grammi eliminati con le urine delle 24 ore (g)	da 0,1 a 1,5 g	
FOSFOESOSOISOMERASI , nel siero [S]	cinetico	Unità per litro di siero (U/L)	da 10 a 70 U/L	
FOSFORO, vedere FOSFATO				
FRAGILITÀ OSMOTICA, vedere RESISTENZE GLOBULARI				

FRAZIONI DEL COMPLEMENTO, vedere COMPLEMENTO C3, COMPLEMENTO C4, C1-INIBITORE				
FRUTTOSAMMINA , nel siero [S]	colorimetrico	micromoli di proteine glicate (fruttosammine) per litro di siero (µmol/L)	in soggetti non diabetici, da 50 a 285 µmol/L	
FSH (test da stimolo) , nel siero [S]	ECLIA	Unità (2nd IRP 78/549) per litro di siero (U/L), separatamente per i cinque prelievi, indicati rispettivamente come 0', 15', 30', 60' e 120'	uomo da 1,4 a 12,4 U/L; donna nella fase follicolare da 3,5 a 12,5 U/L; donna al picco da 4,7 a 21,5 U/L; donna nella fase luteinica da 1,7 a 7,7 U/L; donna in menopausa da 25,8 a 135 U/L; donna gravida fino a 0,2 U/L Gli intervalli di riferimento riportati si riferiscono alle condizioni basali	cinque prelievi, rispettivamente al tempo zero (0), e dopo 15, 30, 60 e 120 minuti
FTA-ABS, vedere Ab FTA-ABS				
G6PDH, negli eritrociti [Er]	cinetico a 25 °C	Unità per 10^{12} eritrociti (U/10^{12} eritrociti)	superiore a 110 U/10^{12} eritrociti	
gamma-GLUTAMMILTRANSFERASI, vedere gamma-GT				
gamma-GLUTAMMILTRANSPEPTIDASI, vedere gamma-GT				
gamma-GT, nel siero [S]	Szasz a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 50 U/L	
GARDENAL, vedere FENOBARBITAL				
GARDENALE, vedere FENOBARBITAL				
GASTRINA , nel plasma [S]	RIA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	da 15 a 80 ng/L	

GB, vedere LEUCOCITI				
GGT, vedere gamma-GT				
GH (test da stimolo), nel siero [S]	IRMA	microgrammi per litro di siero (µg/L), separatamente per i cinque prelievi, indicati rispettivamente come 0', 15', 30', 60' e 120'	nel prelievo basale, inferiore a 4,0 µg/L	cinque prelievi, rispettivamente al tempo zero (0), e dopo 15, 30, 60 e 120 minuti
GH, vedere anche ORMONE SOMATOTROPO (GH)				
GICA, vedere ANTIGENE CA 19.9				
GLICEMIA, vedere GLUCOSIO, nel siero o nel plasma				
GLICOPROTEINA ACIDA, vedere alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA				
GLICOSURIA, vedere GLUCOSIO, nelle urine				
GLOBULI BIANCHI, vedere LEUCOCITI				
GLUCOSIO, nelle urine [U]	Trinder	“assente” ovvero come grammi per litro di urina (g/L)	assente	
GLUCOSIO (curva 6 prelievi), nel plasma [P]	Trinder	milligrammi per decilitro di plasma (mg/dL), separatamente per i sei prelievi	vedere interpretazione	
GLUCOSIO, nel siero [S]	Trinder	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	nell’adulto non diabetico, a digiuno, da 65 a 110 mg/dL	
GLUCOSIO, nelle urine delle 24 ore [dU]	Trinder	“assente” ovvero come grammi eliminati con le urine delle 24 ore (g)	assente	
GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI, vedere G6PDH				
GLUTAMMILTRANSFERASI, vedere gamma-GT				

GONADOTROPINA CORIONICA, nel siero [S]	MEIA	migliaia di Unità (kilounità) per litro di siero (kU/L)	inferiore a 0,005 kU/L. Per la gravida vedere tabella al Capitolo 5	specificare la settimana di gravidanza
GONADOTROPINE, vedere FSH e LH				
GOT, vedere ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI				
GPT, vedere ALANINA AMMINOTRANSFERASI				
GRUPPO SANGUIGNO ABO e Rh	agglutinazione eritrocitaria con antisieri specifici e, per il sistema ABO, controllo della presenza delle agglutinine naturali Come previsto dalla legislazione vigente, il gruppo ABO viene determinato sia con metodo diretto che con metodo indiretto, e il fattore Rh viene determinato con due differenti antisieri	viene fornito il gruppo e indicata la positività o meno del fattore Rh sia per l'antigene D che per il complesso degli antigeni CDE; il fenotipo viene indicato solo nel caso di debole reazione con anti-D (Dw), Du e CDE positivo	non definiti	
Hb A1c, vedere EMOGLOBINA GLICATA				
Hb A2, vedere EMOGLOBINE ANOMALE				
Hb F, vedere EMOGLOBINA FETALE				
Hb, sigla utilizzata per indicare l'EMOGLOBINA, vedere EMOCROMO				
HBDH , nel siero [S]	DGKC a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 140 U/L	
HCG, vedere GONADOTROPINA CORIONICA				

HCS, vedere SOMATOMAMMOTROPINA				
Hct, sigla utilizzata per indicare l'EMATOCRITO, vedere EMOCROMO				
HCV GENOTIPO, nel siero [S]	RDP (Reverse Dot Blot)	viene riportato il genotipo, espresso come 1, 1a, 1b, 2, 2a, 2b, 3, 3a, 3b, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a	non definiti	
HCV-RNA QUANTITATIVO, nel siero [S]	PCR (Polymerase Chain Reaction) e ibridazione	numero di copie del virus per millilitro (mL) di siero, e precisamente come "< 1000" (se inferiori a mille copie per mL), come "> 1000000" (se superiori a un milione di copie per mL), ovvero come numero esatto di copie per mL se il risultato è compreso entro i due limiti indicati	non definiti	
HCV-RNA, nel siero [S]	PCR (Polymerase Chain Reaction)	"assente" o "presente" con riferimento all'RNA (acido ribonucleico) del virus dell'epatite C	assente	
Hg, vedere MERCURIO				
HGH (test al GHRH), nel siero [S]	IRMA	microgrammi per litro di siero (µg/L), separatamente per gli otto prelievi, indicati rispettivamente come -30', 0', 15', 30', 45', 60', 90' e 120'	il valore basale è inferiore a 4 µg/L	otto prelievi, rispettivamente 30 minuti prima dell'inizio del test, al tempo zero (0), e dopo 15, 30, 45, 60 90 e 120 minuti, tem-

				porizzati rispetto alla somministrazione di GnRH
HIAA, vedere ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO				
HIV-1 DNA, nel sangue [Sg]	PCR (Polymerase Chain Reaction)	"assente" o "presente" con riferimento al DNA (acido desossiribonucleico) dell'HIV-1	assente	
HPL, vedere SOMATOMAMMOTROPINA				
ICA, vedere Ab ANTI-INSULA PANCREATICA (ICA)				
IDROSSI-3-METOSSIMANDELATO, vedere ACIDO VANILMANDELICO				
IDROSSIBUTIRRATO DEIDROGENASI, vedere HBDH				
IDROSSIINDOLILACETATO, vedere ACIDO 5-IDROSSIINDOLACETICO				
IDROSSIPROGESTERONE, test da stimolo, vedere 17-OH-P (test da stimolo), nel siero [S]				
IDROSSIPROGESTERONE, vedere 17-IDROSSIPROGESTERONE				
IDROSSIPROLINA , nelle urine delle 24 ore [dU]	colorimetrico	milligrammi eliminati con le urine delle 24 ore (mg)	fino a 1 anno, da 55 a 220 mg; da 1 a 13 anni, da 25 a 80 mg; da 14 a 65 anni, da 6 a 22 mg; oltre i 65 anni, da 5 a 17 mg	
IgA, vedere IMMUNOGLOBULINA A				
IgE SPECIFICHE, nel siero [S], vedere RAST				

IgE TOTALI , nel siero [S]	ELFA	migliaia di Unità (kU) per litro di siero (kU/L)	nell'adulto sano fino a 100 kU/L	
IgG, vedere IMMUNOGLOBULINA G				
IgM, vedere IMMUNOGLOBULINA M				
IMMUNOFISSAZIONE, nel siero [S]	separazione elettroforetica e immunofissazione	"assenza di componenti monoclonali" oppure con segnalazione e identificazione delle componenti monoclonali eventualmente presenti Nel soggetto sano si ha assenza di componenti monoclonali	non definiti	
IMMUNOGLOBULINA A (IgA), nel siero [S]	immunoturbidimetria	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 70 a 300 mg/dL	
IMMUNOGLOBULINA G (IgG), nel siero [S]	immunoturbidimetria	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 800 a 1800 mg/dL	
IMMUNOGLOBULINA M (IgM), nel siero [S]	immunoturbidimetria	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 50 a 250 mg/dL	
IMMUNOGLOBULINE E, nel siero [S], vedere IgE				
IMMUNOGLOBULINE, nel siero [S], vedere le singole analisi IMMUNOGLOBULINA A (IgA), IMMUNOGLOBULINA G (IgG), e IMMUNOGLOBULINA M (IgM), nel siero [S]				
INSULINA (curva da carico), nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L), separatamente per i cinque prelievi, indicati rispettivamente come 0', 30', 60', 90', 120'	è necessaria l'interpretazione clinica dei risultati	sangue raccolto durante l'esecuzione della curva da carico di glucosio
INSULINA , nel siero [S]	RIA	millesimi di Unità (milliunità) per litro di siero (mU/L)	da 2,5 a 18,0 mU/L	

INTRADERMOREAZIONE ALLA TUBERCOLINA, vedere INTRADERMOREAZIONE PPD e TEST TINE				
INTRADERMOREAZIONE DI MANTOUX, vedere INTRADERMOREAZIONE PPD				
INTRADERMOREAZIONE PPD	iniezione intradermica di 5 UI di PPD, preferibilmente sulla superficie volare dell'avambraccio	sono espressi riportando in termini semiquantitativi il grado di positività della reazione evidenziato dopo 72 ore dall'iniezione intradermica	negativa	
ISOENZIMI FOSFATASI ALCALINA	enzimatico	percentuale (%) separatamente per l'isoenzima epatico e per l'isoenzima osseo	per l'isoenzima epatico dal 65 a 100%, per l'isoenzima osseo fino al 35%	
ISOENZIMI LDH	enzimatico	Unità per litro di siero (U/L) solamente i valori della frazione cardiaca (LDH 1)	per la frazione cardiaca (LDH 1) da 24 a 49 U/L	
ISTOLOGICO SISTEMA ENDOCRINO	nel caso di liquidi da cisti tutto il materiale viene centrifugato. Le colorazioni standard effettuate sono Papanicolaou e May-Grünwald-Giemsa	vengono utilizzate quattro categorie "materiale inadeguato", "negativo", "sospetto" e "positivo" Quando è possibile e con carattere orientativo si indica la compatibilità con diagnosi di tiroidite (acuta, subacuta di De Quervain, linfocitica di Hashimoto) o di neoformazioni oncocitarie. Per i carcinomi, ove possibile, viene spe-	non definiti	

		cificato l'istotipo (papillare, follicolare, midollare, anaplastico)		
K, vedere POTASSIO				
LANICOR, vedere DIGOSSINA				
LANOXIN, vedere DIGOSSINA				
LAP, vedere LEUCINAMMINOPEPTIDASI				
LATTATO DEIDROGENASI , nel siero [S]	DGKC a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	da 250 a 450 U/L	
LDH, vedere LATTATO DEIDROGENASI				
LEUCINAMMINOPEPTIDASI, nel siero [S]	cinetico a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	da 2 a 80 U/L	
LEUCOCITI (conteggio), nel sangue [Sg]	analisi quantitativa degli elementi corpuscolati del sangue con contaglobuli	numero degli elementi contenuti in un litro di sangue (10^9/L)	vedere emocromo	
LEUCOCITI (formula), nel sangue [Sg]	analisi quantitativa e qualitativa degli elementi corpuscolati del sangue con contaglobuli ed eventuale (nel caso di anomalie maturative a carico della serie bianca) osservazione microscopica dello striscio di sangue periferico colorato con colorazione panottica (May-Grünwald-Giemsa) per l'esame morfologico dei leucociti e per il conteggio differenziale dei leucociti	viene riportata la formula leucocitaria sia come percentuale (%) sia come numero degli elementi contenuti in un litro di sangue (10^9/L) per le cellule mature normalmente presenti (granulociti neutrofili, linfociti, monociti, granulociti eosinofili, granulociti basofili). Vengono infine segnalate in termini quantitativi o descrittivi eventuali elementi anomali	vedere emocromo	

LH (test da stimolo), nel siero [S]	ECLIA	Unità (2nd IRP 78/549) per litro di siero (U/L), separatamente per gli otto prelievi, indicati rispettivamente come -30', 0', 15', 30', 45', 60', 90' e 120'	uomo da 1,7 a 8,6 U/L; donna nella fase follicolare da 2,4 a 12,6 U/L; donna al picco da 14 a 95,5 U/L; donna nella fase luteinica da 1,0 a 11,4 U/L; donna in menopausa fino a da 7,7 a 58,5 Gli intervalli di riferimento riportati si riferiscono alle condizioni basali	cinque prelievi, rispettivamente al tempo zero (0), e dopo 15, 30, 60 e 120 minuti
LH, vedere anche LUTEOTROPINA				
Li, vedere LITIO				
LIPASI, nel siero [S]	cinetico a 37 °C	Unità per litro di siero (U/L)	fino a 200 U/L	
LIPIDI TOTALI	colorimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 500 a 900 mg/dL	
LIQUIDO SEMINALE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	
LITATREX, vedere LITIO				
LITIO, nel siero [S]	potenziometria	millimoli per litro di siero (mmol/L)	intervallo terapeutico da 0,5 a 1,5 mmol/L	
LUE, vedere VDRL, TPHA, FTA-ABS				
LUMINAL, vedere FENOBARBITAL				
LUMINALE, vedere FENOBARBITAL				
LUMINALETTE, vedere FENOBARBITAL				
LUTEOTROPINA (LH), nel siero [S]	ECLIA	Unità internazionali (1st IRP 68/40) per litro di siero (U/L)	uomo da 1,7 a 8,6 U/L; donna nella fase follicolare da 2,4 a 12,6 U/	

			L; donna al picco da 14 a 95,5 U/L; donna nella fase luteinica da 1,0 a 11,4 U/L; donna in menopausa fino a da 7,7 a 58,5	
MACROGLOBULINA, vedere alfa-2-MACROGLOBULINA				
MAGNESIO TOTALE, nel siero [S]	colorimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 1,5 a 2,6 mg/dL	
MAGNESIO TOTALE, nelle urine delle 24 ore [dU]	colorimetrico	milligrammi eliminati nel corso di 24 ore (mg)	da 10 a 150 mg	
MALARIA, vedere PLASMODI DELLA MALARIA				
MANGANESE, nel plasma [P]	assorbimento atomico	milligrammi per litro di siero (mg/L)	fino a 0,84 mg/L	
MANIALIT, vedere LITIO				
MARCATORI TUMORALI, vedere alfa-FETOPROTEINA, ANTIGENE CA 125, ANTIGENE CA 15.3, ANTIGENE CA 19.9 (GICA), ANTIGENE PSA, ANTIGENE TPA, CEA				
MAU, vedere MICROALBUMINURIA				
MCH, sigla utilizzata per indicare l'Hb CORPUSCOLARE MEDIA (Mean Corpuscolar Hemoglobin), , vedere EMOCROMO				
MCHC, sigla utilizzata per indicare l'Hb CONCENTRAZIONE MEDIA (Mean Corpuscolar Hemoglobinic Concentration), vedere EMOCROMO				

MCV, sigla utilizzata per indicare il VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (Mean Corpuscolar Volume), vedere EMOCROMO				
MELITENSE, vedere WRIGHT				
MERCURIO, nelle urine [U]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di urina (µg/L)	fino a 100 µg/L nei soggetti professionalmente esposti	
METAEMOGLOBINA, nel sangue [Sg]	spettrofotometrico	percentuale dell'emoglobina totale	fino all'1,5%	
METAEMOGLOBINA, nelle urine [U]	spettrofotometrico	"presente" o "assente"	assente	
METANOLO, nel sangue [Sg]	HPLC	milligrammi per litro di sangue (mg/L)	nei soggetti esposti fino a 10 mg/L	
METANOLO, nelle urine [U]	gascromatografia	milligrammi per litro di urina (mg/L)	fino a 15 mg/L nei soggetti professionalmente esposti	
METILETILCHETONE, nelle urine [U]	gascromatografia	milligrammi per litro di urina (mg/L)	fino a 2,0 mg/L	
Mg, vedere MAGNESIO				
MICOPLASMI UROGENITALI, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di micoplasmi delle specie Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum, con i rispettivi eventuali antibiogrammi concentrazione (milligrammi per litro di urina, mg/L) ed eliminazione (microgrammi di albumina eliminati in un minuto, µg/min)	negativo	
MICROALBUMINURIA, nelle urine delle 24 ore [dU]	immunoturbidimetrico		concentrazione fino a 20 mg/L, eliminazione fino a 20 µg/min	
MICROGLOBULINA, vedere beta-2-MICROGLOBULINA				

MIOGLOBINA, nel siero [S]	ECLIA	nanogrammi per millilitro di siero (ng/mL)	fino a 72 ng/mL	
Mn, vedere MANGANESE				
MONOTEST, vedere Ab-ANTI EPSTEIN-BARR (MONOTEST) MUCOPROTEINE, vedere alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA				
MUTAZIONI EMOCROMATOSI, nel sangue [Sg]	PCR (Polymerase Chain Reaction) e digestione enzimatica	viene fornito un referto interpretativo	non definiti	
MUTAZIONI FIBROSI CISTICA, nel sangue [Sg]	PCR (Polymerase Chain Reaction) e reverse dot-blot	viene fornito un referto interpretativo	non definiti	
MUTAZIONI GENE UBE3A, nel sangue [Sg]	PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenziamento automatico	viene fornito un referto interpretativo	non definiti	
MYCOBACTERIUM T. DNA, nell'escreato	PCR (Polymerase Chain Reaction)	"assente" o "presente" con riferimento al DNA (acido desossiribonucleico) del Mycobacterium tubercolosis	assente	
Na, vedere SODIO				
Ni, vedere NICKEL				
NICKEL, nel siero [S]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di siero (µg/L)	fino a 10 µg/L nei soggetti professionalmente esposti	
NICKEL, nelle urine [U]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di urina (µg/L)	fino a 20 µg/L	
NITRODERIVATI, nelle urine [U]	cromatografico	milligrammi per litro di urina (mg/L)	nei soggetti non esposti fino a 10 mg/L, nei soggetti esposti fino a 50 mg/L	
NORADRENALINA, vedere CATECOLAMMINE				

NOREPINEFRINA, vedere CATECOLAMMINE				
OCT, vedere ORNITINA-CARBAMILTRANSFERASI				
OMOCISTEINA, nel siero [S]	MEIA	micromoli per litro di siero (µmol/L)	fino a 15 µmol/L	dato che la sintesi endogena dell'omocisteina da parte dei globuli rossi continua dopo il prelievo, con falso innalzamenti della concentrazione, tenere il prelievo a +2÷8 °C
ORMONE ADRENOCORTICOTROPO, vedere CORTICOTROPINA e ACTH				
ORMONE DELLA CRESCITA, vedere ORMONE SOMATOTROPO e GH				
ORMONE FOLLICOLO STIMOLANTE, vedere FOLLITROPINA e FSH				
ORMONE LATTOGENO PLACENTARE, vedere SOMATOMAMMOTROPINA				
ORMONE LUTEINIZZANTE, vedere LUTEOTROPINA e LH				
ORMONE LUTEOTROPO, vedere LUTEOTROPINA e LH				
ORMONE SOMATOTROPO (GH), nel siero [S]	IRMA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	fino a 4 µg/L	
ORMONE TIREOTROPO, vedere TIREOTROPINA e TSH				

ORNITINA-CARBAMILTRANSFERASI, nel siero [S]	colorimetrico	Unità per litro di siero (U/L)	da 1 a 19 U/L	
OROMUCOIDE, vedere alfa-1-GLICOPROTINA ACIDA				
OROSOMUCOIDE, vedere alfa-1-GLICOPROTINA ACIDA				
OSMOLALITÀ, nel siero [S]	abbassamento del punto crioscopico	millesimi di Osm per chilogrammo di solvente (mOsm/Kg)	da 275 a 295 mOsm/Kg	
OSMOLALITÀ, nelle urine [U]	abbassamento del punto crioscopico	millesimi di Osm per chilogrammo di solvente (mOsm/Kg)	da 300 a 800 mOsm/Kg	
OSSALATI, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	nel bambino da 13 a 38 mg/L; nell'uomo da 7 a 44 mg/L; nella donna da 4 a 31 mg/L	
OSTEOCALCINA, nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	da 5 a 18 µg/L	
P, vedere FOSFATO				
PAP test, vedere CITOLOGICO CERVICO VAGINALE				
PAP, vedere FOSFATASI PROSTATICA				
PARASSITOLOGICO FECI	osservazione microscopica a fresco	"assenti" o "presenti" relativamente alla presenza di (i) vermi adulti, (ii) uova e larve di elminti, (iii) forme vegetative di protozoi (trofozoiti) e (iv) cisti di protozoi. In caso di positività viene fornita l'identificazione della/e specie	assenti	
PARATIFO, vedere WIDAL				
PARATORMONE (PTH), nel siero [S]	RIA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	da 13 a 54 ng/L	

Pb, vedere PIOMBO				
PCR, vedere PROTEINA C REATTIVA				
PIAS, vedere PIASTRINA				
PIASTRINE, nel sangue [Sg]	analisi quantitativa degli elementi corpuscolati del sangue con contaglobuli	numero degli elementi contenuti in un litro di sangue (10^9/L)	da 100 a 400 10^9/L	
PIOMBO, nel sangue [Sg]	assorbimento atomico	microgrammi per decilitro di sangue (µg/dL)	fino a 60 µg/dL	
PIOMBO, nelle urine [U]	assorbimento atomico	microgrammi per litro di urina (µg/L)	non esposti inferiore a 20 µg/L, valori tollerabili da 20 a 80 µg/L, valori eccessivi superiore a 80 µg/L	
PLASMODI DELLA MALARIA	osservazione microscopica dopo colorazione panottica	"assenti" o "presenti", con eventuale specificazione delle forme parassitarie presenti Nel caso di forme dubbie o positive viene effettuata la denuncia prevista per legge	assenti	
Plt, vedere PIASTRINE				
PORFIRINE TOTALI, nelle urine delle 24 ore [dU]	spettrofotometrico	microgrammi per litro di urina (µg/L) separatamente per le porfirine totale, per le uroporfirine e per le coproporfirine	porfirine totali da 50 a 200 µg/L; uroporfirine da 15 a 50 µg/L; coproporfirine da 35 a 150 µg/L	
POTASSIO, nel siero [S]	potenziometria	millimoli per litro di siero (mmol/L)	da 3,5 a 5,4 mmol/L	
POTASSIO, nelle urine delle 24 ore [dU]	potenziometria	millimoli eliminate nel corso di 24 ore (mmol)	da 25 a 125 mmol	
PRA, vedere RENINA				

PRIMIDONE, nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	intervallo terapeutico, da 5 a 15 mg/L	
PRIST, vedere IgE TOTALI				
PRL, vedere PROLATTINA				
PRODOTTI DI DEGRADAZIONE DEL FIBRINOGENO/FIBRINA, vedere FDP/FSP				
PRODOTTI SOLUBILI DEL FIBRINOGENO/FIBRINA, vedere FDP/FSP				
PROGESTERONE, nel siero [S]	ECLIA	nanomoli per litro di siero (nmol/L)	uomo da 0,50 a 1,66 nmol/L; donna nella fase follicolare da 0,50 a 3,54 nmol/L; donna nella fase luteinica da 4,9 a 71,8 nmol/L; donna gravida primo trimestre da 52,2 a 154 nmol/L, secondo trimestre da 62,7 a 164 nmol/L, terzo trimestre da 80,4 a 297 nmol/L	
PROLATTINA (PRL), nel siero [S]	ECLIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	uomo da 2,5 a 17,0 µg/L; donna da 3,0 a 20,0	
PROLATTINA (test da stimolo), nel siero [S]	ECLIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	uomo da 2,5 a 17,0 µg/L; donna da 3,0 a 20,0 Gli intervalli di riferimento riportati si riferiscono alle condizioni basali	cinque prelievi, rispettivamente al tempo zero (0), e dopo 15, 30, 60, e 120 minuti
PROTEINA C REATTIVA, nel siero [S]	immunoturbidimetrico	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	fino a 1,0 mg/dL	
PROTEINE DI BENCE-JONES, nelle urine [U]	immunoturbidimetrico	“assenti” o “presenti” con riferimento alle proteine di Bence-Jones	assenti	

PROTEINE TOTALI, nel siero [S]	biureto	grammi per decilitro di siero (g/dL)	da 6,5 a 8,5 g/dL	
PROTEINE, nelle urine delle 24 ore [dU]	colorimetrico	milligrammi eliminati con le urine delle 24 ore (mg)	assenti	
PROTOPORFIRINA IX, nel sangue [Sg]	fluorimetria	microgrammi per decilitro di sangue (µg/dL)	fino a 60 µg/dL	
PROVE EMOGENICHE	viene effettuata la prova del laccio, e vengono misurati il tempo di stillicidio (secondo Ivy) e il tempo di coagulazione	per la prova del laccio termini qualitativi. Per il tempo di stillicidio minuti necessari per l'arresto spontaneo del sanguinamento indotto da puntura, mediante l'apposita lancetta, della superficie volare dell'avambraccio. Per il tempo di coagulazione minuti necessari per la coagulazione a 37 °C del sangue in provetta di vetro	prova del laccio "negativa"; tempo di stillicidio da 1,0 a 7,6 minuti; tempo di coagulazione da 1,0 a 10,5 minuti	
PSA, vedere ANTIGENE PSA				
PSCH, vedere COLINESTERASI				
PSCS, vedere COLINESTERASI				
PSEUDO-COLINESTERASI, vedere COLINESTERASI				
PT, vedere TEMPO DI PROTROMBINA				
PTH, vedere PARATORMONE				
PTT, vedere APTT				
QUICK, vedere TEMPO DI PROTROMBINA				
QUILONUM, vedere LITIO				
RAME, nel siero [S]	colorimetrico	microgrammi per decilitro di siero (µg/dL)	da 65 a 165 µg/dL	

RAST, nel siero [S]	IFMA	migliaia di Unità per litro di siero (kU/L)	negativo inferiore a 0,35 kU/L, positivo superiore a 0,35 kU/L	
RA-TEST, vedere FATTORE REUMATOIDE				
REAZIONE DI WAALER ROSE, nel siero [S]	agglutinazione	titolo	inferiore a 1:160	
RENINA (clinostatismo), nel plasma [P]	radioimmunologico (RIA)	nanogrammi di substrato trasformato per millilitro di plasma e per ora (ng/mL/h)	da 0,2 a 2,0 ng/mL/h	
RENINA (ortostatismo), nel plasma [P]	radioimmunologico (RIA)	nanogrammi di substrato trasformato per millilitro di plasma e per ora (ng/mL/h)	da 1,5 a 5,0 ng/mL/h	
RESISTENZA OSMOTICA, vedere RESISTENZE GLOBULARI				
RESISTENZE GLOBULARI	misura spettrofotometrica dell'emolisi	percentuale di emolisi (%) misurata separatamente con cinque soluzioni ipo-osmotiche di cloruro di sodio (NaCl) alle concentrazioni rispettivamente di 0,30 g/dL, 0,35 g/dL, 0,40 g/dL, 0,45 g/dL e 0,50 g/dL	dal 97 al 100% per la soluzione di NaCl 0,30 g/dL; dal 90 al 99% per la soluzione di NaCl 0,35 g/dL; dal 50 al 100% per la soluzione di NaCl 0,40 g/dL; dal 5 al 45% per la soluzione di NaCl 0,45 g/dL; dallo 0 al 6% per la soluzione di NaCl 0,50 g/dL	
RETICOLOCITI, nel sangue [Sg]	colorazione vitale automatica e conteggio automatico con contaglobuli	i risultati sono espressi sia come numero dei reticolociti osservato per cento eritrociti (%), sia in valore assoluto in miliardi di reticolociti per litro di sangue (10^9/L)	da 0,5% a 2,0%, e da 20 a 90 (10^9/L)	

REUMA-TEST, vedere FATTORE REUMATOIDE				
RGO, vedere RESISTENZE GLOBULARI OSMOTICHE				
RICERCA DELLE EMOGLOBINE ANOMALE, vedere EMOGLOBINE ANOMALE				
RICERCA DELL'EMOGLOBINA F, vedere EMOGLOBINA FETALE				
RICERCA DELL'EMOGLOBINA FETALE, vedere EMOGLOBINA FETALE				
RICERCA SANGUE OCCULTO, vedere SANGUE OCCULTO FECI				
RICERCA UOVA OSSIURI, scotch-test	osservazione microscopica	"positivo" o "negativo" con riferimento allo scotch-test	negativo	
RIST, vedere IgE TOTALI				
ROTAVIRUS NELLE FECI	agglutinazione	"assenti" o "presenti" con riferimento ai virus del genere Rotavirus	assenti	
SANGUE ESAME COLTURALE, vedere EMOCOLTURA				
SANGUE OCCULTO FECI	immunologico	"assente" o "presente. In quest'ultimo caso viene fornita un'indicazione semiquantitativa	assente	
SCOTCH TEST, vedere RICERCA UOVA OSSIURI, scotch-test				
SCREENING ALLERGOLOGICO	IFMA	"negativo" o "positivo" per le IgE specifiche di un mix bilanciato dei principali allergeni respiratori	negativo	

SECRETO CERVICALE, esame batterioscopico	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	
SECRETO CERVICALE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	
SECRETO NASALE , esame batterioscopico.	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	
SECRETO URETRALE, esame batterioscopico	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	
SECRETO URETRALE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	
SECRETO VAGINALE, esame batterioscopico	osservazione microscopica dopo colorazione di Gram	viene riportata in modo descrittivo la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di flora batterica	non definiti	
SECRETO VAGINALE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i, e la presenza di Gardnerella vaginalis	negativa la ricerca di germi patogeni e della Gardnerella vaginalis	oltre al tampone localizzato con terreno di trasporto, inviare un vetrino strisciato su un vetrino microscopico porta-

				oggetti e lasciato asciugare a temperatura ambiente
SEROTONINA (determinata come ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO), vedere ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO				
SEX HORMON BINDING-GLOBULIN, vedere SHBG				
SGOT, vedere AST				
SGPT, vedere ALT				
SH, vedere ORMONE SOMATOTROPO e GH				
SHBG, nel siero [S]	IFMA	nanomoli per litro di siero (nmol/L)	bambino da 15 a 130 nmol/L; uomo da 10 a 70 nmol/L; donna da 20 a 118 nmol/L	
SIDEREMIA, vedere FERRO				
SIEROLOGIA DELLA LUE, vedere VDRL, TPHA, FTA-ABS				
SIFILIDE, vedere VDRL, TPHA, FTA-ABS				
SODIO, nel siero [S]	potenziometria	millimoli per litro di siero (mmol/L)	da 136 a 147 mmol/L	
SODIO, nelle urine delle 24 ore [dU]	potenziometria	millimoli eliminate con le urine delle 24 ore (mmol)	da 40 a 220 mmol	
SOMATOMAMMOTROPINA (HPL), nel siero [S]	radioimmunologico (RIA)	milligrammi per litro di siero (mg/L)	vedere tabella al Capitolo 5	
SOMATOMEDINA (IGF-I), nel siero [S]	IRMA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	vedere tabella al Capitolo 5	
SOMOFILLINA, vedere TEOFILLINA				

SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE	citofluorimetria con anticorpi monoclonali	percentuale (%) separatamente per i linfociti CD3, per i linfociti CD4, per i linfociti CD8, per i linfociti CD19, per i linfociti "natural killer". Viene inoltre fornito il valore del rapporto CD4/CD8	linfociti CD3 dal 60 all'85%, linfociti CD4 dal 30 al 60%, linfociti CD8 dal 10 al 40%, linfociti CD19 dal 5 al 15%, linfociti "natural killer" dal 6 al 30%	
SPERMIOCOLTURA, vedere LIQUIDO SEMINALE, esame colturale				
STREPTOZYME TEST, nel siero [S]	agglutinazione	titolo	fino a 1:100	
T3, vedere TRIIODOTIRONINA				
T4, vedere TIROXINA				
TAF, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA				
TAFS, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA				
TAMPONE AURICOLARE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	
TAMPONE FARINGEO, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	
TAMPONE NASALE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	

TAMPONE OCULARE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	negativa la ricerca di germi patogeni	
TAMPONE RETTALE, esame colturale	colturale	viene riportata l'eventuale presenza di germi patogeni appartenenti ai generi Salmonella e Shigella (non è possibile la ricerca del Campylobacter, che può essere effettuata solamente su campioni di feci), e l'eventuale presenza dello streptococco beta-emolitico nelle donne, in particolare nelle gravide. L'antibiogramma viene effettuato sugli eventuali ceppi isolati	negativa la ricerca di Salmonella, Shigella e "negativa la ricerca di streptococco beta-emolitico" (quest'ultima espressione è limitata ai soggetti di sesso femminile)	
TAOS, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O				
TAS, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O				
TASF, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA				
TASL, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O				
TBG, vedere TIREOGLOBULINA				
TCA, vedere ACIDO TRICLORACETICO				
TE, vedere PROVE EMOGENICHE				
TEFAMIN, vedere TEOFILLINA				
TEGRETOL, vedere CARBAMAZEPINA				

TELOPEPTIDE (NTx) , nelle urine [U]	EIA	nanomoli per millimole di creatinina (nmol/mmol di creatinina)	uomo da 25 a 49 nmol/mmol di creatinina; donna da 25 a 49 nmol/mmol di creatinina; donna in menopausa da 40 a 58 nmol/mmol di creatinina	
TEMPO DI COAGULAZIONE, vedere PROVE EMOGENICHE				
TEMPO DI EMORRAGIA, vedere PROVE EMOGENICHE				
TEMPO DI PROTROMBINA, nel plasma [P]	coagulativo a lettura ottica	sono espressi sia come attività percentuale (%) sia come "International Normalized Ratio" (INR) rispetto a una miscela di plasmi normali (i cui valori sono assunti come uguali rispettivamente al 100% e a 1,00 INR)	dal 70% al 120%, ovvero da 0,90 a 1,25 INR	
TEMPO DI QUICK, vedere TEMPO DI PROTROMBINA				
TEMPO DI STILLICIDIO, vedere PROVE EMOGENICHE				
TEMPO DI TROMBOPLASTINA PARZIALE ATTIVATA, vedere APTT				
TEOFILLINA, nel siero [S]	IFMA	milligrammi per litro di siero (mg/L)	intervallo terapeutico da 8,0 a 20,0 mg/L	
TEONOVA, vedere TEOFILLINA				
TEST DI ADDIS, vedere CONTA DI ADDIS				
TEST DI COOMBS DIRETTO	agglutinazione eritrocitaria con antisiero antiglobulina	"negativo" o "positivo"	negativo	

TEST DI COOMBS INDIRETTO	agglutinazione eritrocitaria con antisiero antiglobulina	“negativo” o “positivo”	negativo	
TEST DI GRAVIDANZA, nelle urine [U]	immunologico	“positivo” o “negativo”	negativo	
TEST TINE	test effettuato mediante multipuntura intradermica secondo Rosenthal	viene riportato in termini semiquantitativi il grado di positività della reazione evidenziato dopo 72 ore dalla puntura intradermica	negativo	
TESTOSTERONE LIBERO, nel siero [S]	RIA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	donna prepubere fino a 1,90 ng/L; donna fertile fino a 3,90 ng/L; donna in trattamento con contraccettivi orali fino a 1,70 ng/L; donna in menopausa fino a 1,80 ng/L; uomo prepubere fino a 5,30 ng/L; uomo da 20 a 49 anni da 12,4 a 40,0 ng/L; uomo sopra i 50 anni da 10,8 a 24,6 ng/L	
TESTOSTERONE, nel siero [S]	ECLIA	nanomoli per litro di siero (nmol/L)	uomo da 9,85 a 27,8 nmol/L; donna da 0,22 a 2,86 nmol/L	
Tg, vedere TIREOGLOBULINA				
THEO 24, vedere TEOFILLINA				
THEODUR, vedere TEOFILLINA				
THEOLAIR, vedere TEOFILLINA				
TIFO ADDOMINALE, vedere WIDAL				
TIFO ESANTEMATICO, vedere WEIL-FELIX				
TIFO PETECCHIALE, vedere WEIL-FELIX				

TIOCIANATI, nelle urine [U]	colorimetrico	milligrammi per litro di urina (mg/L)	non fumatori fino a 4,0 mg/L, fumatori fino a 17,0 mg/L	
TIREO BINDING-GLOBULIN, vedere TIREOGLOBULINA				
TIREOCALCITONINA, vedere CALCITONINA				
TIREOGLOBULINA (Tg), nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L). Viene effettuato anche il test di recupero	per la tireoglobulina fino a 30 µg/L, per il test di recupero uguale o superiore all'80%	
TIREOTROPINA (TSH), nel siero [S]	ECLIA	millesimi di Unità per litro di siero (mU/L)	da 0,25 a 4,70 mU/L	
TIREOTROPINA, vedere anche TSH				
TIROXINA (T4), nel siero [S]	ECLIA	nanomoli per litro di siero (nmol/L)	da 60 a 174 nmol/L	
TIROXINA LIBERA (fT4), nel siero [S]	ECLIA	picomoli per litro di siero (pmol/L)	da 11,8 a 24,6 pmol/L	
TITOLO ANTISTAFILOLISINICO, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA				
TITOLO ANTISTREPTOLISINICO, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O				
TPHA, nel siero [S]	agglutinazione	"positivo" o "negativo". In caso di positività viene riportato il titolo anticorpale	negativo	TPHA sta per Treponema Pallidum HemAgglutination
TRANSAMINASI GLUTAMMICO-OSSALACETICA, vedere AST				
TRANSAMINASI GLUTAMMICO-PIRUVICA, vedere ALT				
TRANSFERRINA, nel siero [S]	immunoturbidimetrico per la transferrina e colorimetrico per la capacità totale e per la capa-	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL) per la transferrina, e in microgrammi per decilitro	transferrina da 200 a 336 mg/dL; capacità totale di legare il ferro da 250 a 420 µg/dL;	

	cità latente di legare il ferro	di siero (µg/dL) per la capacità totale e per la capacità latente di legare il ferro	capacità latente di legare il ferro da 150 a 340 µg/dL	
TREPONEMA PALLIDUM HEMAGGLUTINATION, vedere TPHA				
TRICLOROETANOLO (fine turno), nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	non esposti inferiore a 5 mg/L, esposti inferiore a 100 mg/L	
TRICLOROETANOLO, nelle urine [U]	HPLC	milligrammi per litro di urina (mg/L)	non esposti inferiore a 5 mg/L, esposti inferiore a 100 mg/L	
TRIGLICERIDI, nel siero [S]	Trinder	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	valore desiderabile (in base alle raccomandazioni degli organismi internazionali) ai fini della prevenzione del rischio cardiovascolare inferiore a 200 mg/dL sia nell'uomo che nella donna	
TRIIODOTIRONINA (T3), nel siero [S]	ECLIA	nanomoli per litro di siero (nmol/L)	da 0,90 a 2,80 nmol/L	
TRIIODOTIRONINA LIBERA (fT3), nel siero [S]	ECLIA	picomoli per litro di siero (pmol/L)	da 2,8 a 6,5 pmol/L	
TROMBOCITI, vedere PIASTRINE				
TROPONINA T, nel siero [S]	ECLIA	nanogrammi per millilitro di siero (ng/mL)	inferiore a 0,100 ng/mL	
TSH (test da stimolo), nel siero [S]	ECLIA	millesimi di Unità per litro di siero (mU/L), separatamente per i cinque prelievi, indicati rispettivamente come 0', 15', 30', 60' e 120'	per il prelievo basale da 0,25 a 4,70 mU/L	cinque prelievi, al tempo zero (0) e dopo 15, 30 60 e 120 minuti

TSH, vedere anche TIREOTROPINA				
TUBERCOLINA, vedere INTRADERMOREZIONE PPD e TESTTINE				
URATO, nel siero [S]	Trinder	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	nell'uomo da 2,0 a 7,0 mg/dL, nella donna da 2,0 a 5,7 mg/dL	
URATO, nelle urine delle 24 ore [dU]	Trinder	grammi eliminati con le urine delle 24 ore (g)	da 0,25 a 0,75 g	
UREA CLEARANCE	ureasi-GLDH	millilitri di siero che il rene, in un minuto, depura dell'urea (mL/min)	superiore a 60 mL/min	
UREA, nel siero [S]	ureasi-GLDH	milligrammi per decilitro di siero (mg/dL)	da 10 a 50 mg/dL	
UREA, nelle urine delle 24 ore [dU]	ureasi-GLDH	grammi eliminati nel corso di 24 ore (g)	da 5 a 40 g	
URICEMIA, vedere URATO, nel siero				
URICURIA, vedere URATO, nelle urine				
URINE ESAME COMPLETO	esame chimico fisico e microscopico	viene fornita una risposta comprendente aspetto, colore, reazione, peso specifico (in grammo per millilitro di urina, g/mL), e presenza (in termini semiquantitativi) o assenza dei seguenti componenti: albumina, glucosio, emoglobina, corpi chetonici, bilirubina, urobilinogeno, nitriti. Limitatamente a glucosio e proteine, in caso di presenza in	le urine del primo mattino sono tipicamente limpide, con un colore variabile dal paglierino al giallo oro, una reazione acida, un peso specifico compreso tra 1,005 e 1,035. Albumina, glucosio, emoglobina, corpi chetonici, bilirubina, urobilinogeno, nitriti sono assenti	

		quantità superiori a una soglia prefissata, viene fornito il dosaggio quantitativo. Viene inoltre fornita una descrizione microscopica del sedimento ottenuto dopo centrifugazione		
URINOCOLTURA	colturale	viene riportata la carica batterica espressa come numero di colonie batteriche che si sviluppa da un millilitro (mL) di urina (colonie/mL) e, qualora la carica batterica risulti significativa, viene riportata la presenza di germi patogeni, con identificazione e antibiogramma del/i germe/i isolato/i	l'urinocoltura viene considerata negativa in presenza di una carica batterica inferiore o uguale a 1000 (10^3) colonie/mL, viene considerata dubbia in presenza di una carica batterica compresa tra 10.000 (10^4) e 100.000 (10^5) colonie/mL, viene considerata positiva in presenza di una carica batterica superiore a 100.000 (10^5) colonie/mL. Oltre che nelle urinocolture positive, l'identificazione del/i germe/i e l'antibiogramma sono forniti anche nelle urinocolture dubbie	raccogliere le urine con la tecnica del mitto intermedio
VALORE EMATOCRITO, nel sangue [Sg]	analisi quantitativa degli elementi corpuscolati del sangue con contaglobuli	percentuale (%)	vedere emocromo	

VALUTAZIONE DANNO CROMOSOMICO	per l'analisi citogenetica dei riarrangiamenti cromosomici indotti vengono effettuati la coltura di linfociti periferici con PHA, l'allestimento dei preparati cromosomici dopo 48 ore di incubazione, la colorazione con Giemsa, l'analisi citogenetica della frequenza di aberrazioni cromosomiche in almeno 100 cellule. Per l'analisi citogenetica degli scambi tra cromatidi fratelli, vengono effettuati la coltura (addizionata con BrdU, e tenuta al riparo dalla luce) di linfociti periferici con PHA, l'allestimento dei preparati cromosomici dopo 72 ore di incubazione, l'analisi degli scambi su 25-50 metafasi del secondo ciclo cellulare	per l'analisi citogenetica dei riarrangiamenti cromosomici indotti, viene riportata la frequenza di aberrazioni cromosomiche, espressa come percentuale delle cellule con mutazione rispetto alle cellule totali analizzate. Per l'analisi citogenetica degli scambi tra cromatidi fratelli, viene riportata la frequenza media di scambi per cellula, e la frequenza media di scambi per cromosoma	in tutti i casi, i risultati sono riferiti ad uno standard di laboratorio, costruito mediante una popolazione di controllo costituita da soggetti confrontabili per sesso e per età, e non esposti ad agenti in grado di causare alterazioni cromosomiche	
VDRL, nel siero [S]	microflocculazione	"positiva" o "negativa"	negativa	VDRL è l'acronimo di Veneral Disease Reaction Laboratory
VELOCITÀ DI ERITROSEDIMENTAZIONE, vedere VES				

VELOCITÀ DI SEDIMENTAZIONE DEGLI ERITROCITI, vedere VES				
VENEREAL DISEASE REACTION LABORATORY, vedere VDRL				
VES	Westergreen con lettura dopo 1 ora	millimetri (mm)	fino a 20 mm	
VITAMINA D (1,25-OH), nel siero [S]	RIA	nanogrammi per litro di siero (ng/L)	da 18 a 62 ng/L	
VITAMINA D (25-OH), nel siero [S]	RIA	microgrammi per litro di siero (µg/L)	da 8,9 a 46,7 µg/L	
VMA, vedere ACIDO VANILMANDELICO				
WAALER-ROSE, vedere REAZIONE DI WAALER-ROSE				
WASSERMANN, vedere TPHA				
WBC, vedere LEUCOCITI				
WEIL-FELIX, nel siero [S]	agglutinazione	titolo anticorpale, separatamente per gli anticorpi anti-Proteus OX 19, anti-Proteus OX 2, anti-Proteus OX K	assenti	
WIDAL, nel siero [S]	agglutinazione	titolo anticorpale, separatamente per gli anticorpi (Ab) diretti contro l'antigene somatico (O) della Salmonella typhi, gli anticorpi diretti contro l'antigene ciliare (H) della Salmonella typhi, gli anticorpi diretti contro l'antigene somatico (O) della Salmonella paratyphi A, gli anticorpi diretti contro l'antigene ciliare (H) della Salmo-	fino a 1:80	

		nella paratyphi A, gli anticorpi diretti contro l'antigene somatico (O) della Salmonella paratyphi B, gli anticorpi diretti contro l'antigene ciliare (H) della Salmonella paratyphi B		
WIDAL-WRIGHT, nel siero [S]	agglutinazione	titolo anticorpale, separatamente per gli anticorpi (Ab) diretti contro i generi (melitensis, abortus e suis) delle specie Brucella, gli anticorpi diretti contro l'antigene somatico (O) della Salmonella typhi, gli anticorpi diretti contro l'antigene ciliare (H) della Salmonella typhi, gli anticorpi diretti contro l'antigene somatico (O) della Salmonella paratyphi A, gli anticorpi diretti contro l'antigene ciliare (H) della Salmonella paratyphi A, gli anticorpi diretti contro l'antigene somatico (O) della Salmonella paratyphi B, gli anticorpi diretti contro l'antigene ciliare (H) della Salmonella paratyphi B	fino a 1:80	

WRIGHT, nel siero [S]	agglutinazione	titolo anticorpale per gli anticorpi (Ab) diretti contro i generi (melitensis, abortus e suis) del genere Brucella	fino a 1:80	
XILOSIO, nel siero e nelle urine	colorimetrico	i risultati dello xilosio nel siero sono espressi in milligrammi per decilitro di siero (mg/dL), e quelli dello xilosio nelle urine come percentuale (%) della dose di xilosio somministrata	per lo xilosio nel siero nei bambini superiore a 15 mg/dL; nell'adulto superiore a 33 mg/dL. Per lo xilosio nelle urine nei bambini tra 3 e 10 anni dal 25 al 45%; nei bambini di età superiore a 10 anni dal 25 al 50%; nell'adulto superiore al 16%	
ZINCO, nel plasma [P]	assorbimento atomico	microgrammi per decilitro di siero (µg/dL)	da 57 a 141 µg/dL	
ZINCOPROTOPORFIRINA, nel sangue [Sg]	fluorimetrico	microgrammi per decilitro di siero (µg/dL)	inferiore a 60 µg/dL	

Valori desiderabili

Come già accennato in precedenza, i criteri interpretativi delle analisi di laboratorio possono variare nelle differenti situazioni. Il criterio interpretativo più tradizionale è rappresentato dagli *intervalli di riferimento*, che esprimono i limiti (limite inferiore, limite superiore o entrambi) all'interno dei quali si collocano i risultati dell'analisi in questione nel 95% dei soggetti sani. Nel caso dei *valori desiderabili*, il criterio è costituito dal superamento o meno di uno o più valori soglia, definiti in apposite "Consensus Conference", in relazione ad obiettivi specifici. Tale è il caso del colesterolo (e delle sua frazioni) e dei trigliceridi, per i quali sono stati definiti come valori desiderabili quelli il cui raggiungimento, con norme igieniche (comportamenti di vita), con norme dietetiche o con opportune terapie, consente una significativa riduzione del rischio di affezioni cardiovascolari.

Sono qui riportati i valori desiderabili degli analiti del quadro lipidico, espressi in milligrammi per decilitro di siero (mg/dL).

Analita	***Uomo (mg/dL)***	***Donna (mg/dL)***
S-COLESTEROLO TOTALE	Inferiore a 200	Inferiore a 200
S-COLESTEROLO HDL	Superiore a 35	Superiore a 40
S-COLESTEROLO LDL	Inferiore a 130	Inferiore a 130
S-TRIGLICERIDI	Inferiore a 200	Inferiore a 200

Intervalli terapeutici dei farmaci

Nel caso dei farmaci, soprattutto di quelli a ridotto indice terapeutico (quelli per i quali la dose efficace è molto vicina a quella tossica, come tipicamente avviene per i farmaci digitalici), il criterio interpretativo è rappresentato dall'*intervallo terapeutico*, vale a dire quello che garantisce effetti terapeutici efficaci senza o con ridotti effetti collaterali. Un ulteriore tipo di criterio interpretativo, utile nel caso del monitoraggio, è rappresentato dalle *differenze critiche*, intese come la minima differenza significativa tra due risultati consecutivi della stessa analisi ottenuti nel medesimo paziente.

Sono riportati gli intervalli terapeutici nel siero dei principali farmaci, con le unità di misura corrispondenti.

Analita	*Intervallo terapeutico*	*Unità di misura*
S-ACIDO VALPROICO	50 ÷ 100	mg/L
S-CARBAMAZEPINA	4,1 ÷ 10,0	mg/L
S-DIGOSSINA	0,80 ÷ 2,00	mg/L
S-FENITOINA	10 ÷ 20	mg/L
S-FENOBARBITAL	15 ÷ 40	mg/L
S-LITIO	0,5 ÷ 1,5	mmol/L
S-PRIMIDONE	5 ÷ 15	mg/L
S-TEOFILLINA	8,0 ÷ 20,0	mg/L

Valori di allerta[1]

Con questa dizione si fa riferimento a valori di concentrazione che implicano una rapida decisione medica in merito ad un intervento diagnostico e terapeutico che può essere estremamente urgente.

Nella seguente tabella sono riportati i principali valori di allerta, e le loro implicazioni:

Analita	*Valore di allerta*	*Implicazioni*
dU-17-CHETOSTEROIDI	> 24 mg	Possibile Cushing
dU-17-IDROSSICORTICOSTEROIDI	> 20 mg	Possibile Cushing
dU-ACIDO VANILMANDELICO	> 15 mg	Considerare la possibilità di tumore secernente catecolammine
S-ALBUMINA	< 2,0 g/dL	Edemi
S-ALT (GPT)	> 300 U/L	Infarto del miocardio, epatite acuta virale o da tossici, fegato da shock
S-AMILASI	> 300 U/L	Pancreatite acuta (da supportare con ulteriori dati clinici e strumentali)
P-ANTITROMBINA III	< 50%	Tromboembolie spontanee
P-aPTT (TEMPO DI TROMBOPLASTINA)	> 3,0 ratio	In pazienti in terapia eparinica va ridotta la dose
S-AST (GOT)	> 300 U/L	Infarto del miocardio, epatite acuta virale o da tossici, fegato da shock
S-BICARBONATO	< 6,0 mmol/L	Acidosi metabolica da trattare come emergenza medica
S-BILIRUBINA	> 20 mg/dL	Nel neonato possibilità di ittero nucleare con danno cerebrale

[1] *Statland BE. Livelli decisionali per test clinici di laboratorio. Edizione italiana a cura di Beckman Analytical spa, 180pp.*

Analita	*Valore di allerta*	*Implicazioni*
S-CALCIO	< 7,0 mg/dL	Possibile tetania
S-CALCIO	> 13,5 mg/dL	Stato tossico
S-CARBAMAZEPINA	> 14 mg/L	Effetti tossici
S-CEA	> 20 µg/L	In soggetto operato per neoplasia possibile recidiva
S-CLORURO	< 90 mmol/L	Vanno considerate le possibili cause di ipocloremia
S-CLORURO	> 115 mmol/L	Vanno considerate le possibili cause di ipocloremia
S-COLESTEROLO	> 240 mg/dL	Valore prognostico negativo per lo sviluppo di malattia aterosclerotica grave
S-CREATINA-CHINASI	> 2.000 U/L	Considerare la possibilità di rabdomiolisi
S-DIGOSSINA	> 2,5 ng/L	Effetti tossici
Sg-EMATOCRITO	< 14%	Necessaria terapia trasfusionale
Sg-EMATOCRITO	> 70%	Necessario salasso
Sg-EMOGLOBINA	< 4,5 g/dL	Necessaria terapia trasfusionale
Sg-EMOGLOBINA	> 23 g/dL	Necessario salasso
S-FENOBARBITAL	> 120 mg/L	Effetti tossici
P-FIBRINOGENO	< 30 mg/dL	Emorragie spontanee
S-FOLATI	< 1,5 µg/L	Possibile carenza di folati
S-FOLLITROPINA (FSH)	> 60 U/L	Nella donna fertile considerare la possibilità di insufficienza ovarica primaria
S-FOLLITROPINA (FSH)	< 1 U/L	Considerare la possibilità di ipogonadismo
S-FOSFATO	< 1,5 mg/dL	Valori associati a possibile anemia emolitica
S-FOSFATO	> 7,0 mg/dL	Considerare la possibilità di una insufficienza renale
P-GLUCOSIO	< 45 mg/dL	Ansietà, spasmi, sudorazione, tremori e senso di spossatezza profonda
S-LATTATO DEIDROGENASI	> 2000 U/L	Fegato da shock. Considerare possibili malattie ematologiche
Sg-LEUCOCITI	< 500 10^9/L	Possibili gravi infezioni
Sg-LEUCOCITI	> 30.000 10^9/L	Possibile malattia ematologica
S-LITIO	> 1,6 mmol/L	Effetti tossici
S-LUTEOTROPINA (LH)	> 100 U/L	Nella donna fertile considerare la possibilità di insufficienza ovarica primaria

Analita	*Valore di allerta*	*Implicazioni*
S-LUTEOTROPINA (LH)	< 1 U/L	Considerare la possibilità di ipogonadismo
S-MAGNESIO	< 1,2 mg/dL	Astenia, irritabilità, tetania e possibili episodi convulsivi
S-MAGNESIO	> 3,5 mg/dL	Considerare la possibilità di una insufficienza renale
Sg-MCV	> 110 fL	Considerare le cause di anemia megaloblastica
Sg-PIASTRINE	< 10^3 10^{12}/L	Emorragie spontanee
Sg-PIASTRINE	> 10^6 10^{12}/L	Trombosi spontanee
S-POTASSIO	< 3,0 mmol/L	Astenia e possibili aritmie cardiache. Considerare la possibilità che si tratti di un segno d'intossicazione da digitalici
S-POTASSIO	> 7,5 mmol/L	Possibili aritmie cardiache
S-PROTEINE TOTALI	< 4 g/dL	Edemi
U-PROTEINE TOTALI	> 3,0 g/24 ore	Edemi e ipoalbuminemia, possibile sindrome nefrosica
U-PROTEINE TOTALI	> 8,0 g/24 ore	Perdita massiva di proteine, considerare la possibilità di instaurare trattamento con corticosteroidi
P-PT (TEMPO DI PROTROMBINA)	> 4,0 ratio	In pazienti in terapia con anticoagulanti orali va ridotta la dose
S-SODIO	< 115 mmol/L	Stato confusionale, cefalea, nausea, vomito e anoressia
S-SODIO	< 110 mmol/L	Stato soporoso, convulsioni, coma
S-SODIO	> 155 mmol/L	Considerare le possibili cause di ipernatremia
Pt-TEMPO DI EMORRAGIA	> 15 minuti	Valutare numero e funzionalità delle piastrine
S-TEOFILLINA	> 60 mg/L	Effetti tossici
S-URATO	> 11,0 mg/dL	Nefrolitiasi uratica e tofi articolari
S-UREA	> 70 mg/dL	Considerare le possibili cause di insufficienza renale

Differenze critiche[2]

Il modello delle differenze critiche richiede di considerare che le misure che portano alle conclusioni (informazioni) cliniche sono affette da errore: conseguentemente le conclusioni cui si giunge sono conclusioni valide non in assoluto, ma con un livello noto di confidenza (fiducia) statistica. Come già accennato, in genere quando la probabilità di sbagliare nel trarre dai dati una specifica conclusione risulta inferiore al 5%, la conclusione viene generalmente accettata. Nel caso del modello delle differenze critiche è utilizzato il livello di significatività del 5%.

Le differenze critiche possono essere calcolate facilmente, conoscendo la variabilità analitica e la variabilità biologica che caratterizzano un dato analita, come

$$Differenza\ critica = 2{,}77 \cdot (CV_a^{\,2} + CV_b^{\,2})^{1/2}$$

Conoscendo il valore della variabilità analitica CV_a di un dato metodo analitico e il valore della variabilità biologica CV_b dell'analita in questione, è quindi possibile calcolare il valore della differenza critica corrispondente. Se la differenza tra due valori consecutivamente osservati in un dato soggetto eccede il valore della differenza critica, si è autorizzati a ritenere, con una probabilità del solo 5% di sbagliare (è questo il livello di confidenza statistica qui impiegato) che i due valori differiscono significativamente tra loro. Nella tabella che segue sono riportati i valori delle differenze critiche dei principali analiti, assumendo $CV_a = 0{,}5 \cdot CV_b$.

Analita	*Variabilità biologica%*	*Variabilità analitica%*	*Differenza critica%*
17-ALFA IDROSSIPROGESTERONE	15,0	7,5	46
ALANINA AMMINOTRANSFERASI (ALT,GPT)	10,0	5,0	31
ALBUMINA	2,5	1,3	8
ALDOSTERONE	15,0	7,5	46
ALFA-1-GLICOPROTEINA ACIDA	10,0	5,0	31
ALFA-AMILASI	7,5	3,8	23
ANTIGENE CARBOIDRATICO 125	10,0	5,0	31
ANTIGENE CARBOIDRATICO 15.3	7,5	3,8	23
ANTIGENE CARBOIDRATICO 19.9	15,0	7,5	46
ANTIGENE CARCINO-EMBRIONALE	12,5	6,3	39
ANTIGENE PROSTATA SPECIFICO (PSA)	12,5	6,3	39
APOLIPOPROTEINA A-I	5,0	2,5	15

[2] *Tratto da: Besozzi M. Dal laboratorio alla clinica: le differenze critiche. In: Cabrini E, Ottomano C, Pagano A. Argomenti di medicina di laboratorio per il medico pratico. Volume II. Milano: Edizioni Recordati, 1998:138pp.*

Analita	*Variabilità biologica%*	*Variabilità analitica%*	*Differenza critica%*
APOLIPOPROTEINA B	5,0	2,5	15
APTOGLOBINA	15,0	7,5	46
APTT	5,0	2,5	15
ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI (AST, GOT)	15,0	7,5	46
BETA-2-MICROGLOBULINA	4,0	2,0	12
BICARBONATO (Idrogenocarbonato)	2,5	1,3	8
BILIRUBINA DIRETTA	15,0	7,5	46
BILIRUBINA TOTALE	12,5	6,3	39
CALCIO TOTALE	1,5	0,8	5
CERULOPLASMINA	4,0	2,0	12
CLORURO	1,5	0,8	5
COLESTEROLO HDL	5,0	2,5	15
COLESTEROLO LDL	5,0	2,5	15
COLESTEROLO TOTALE	4,0	2,0	12
COLINESTERASI	5,0	2,5	15
COMPLEMENTO/C3	5,0	2,5	15
COMPLEMENTO/C4	7,5	3,8	23
CORTISOLO	10,0	5,0	31
CREATINA CHINASI-MB	15,0	7,5	46
CREATINCHINASI	12,5	6,3	39
CREATININA	4,0	2,0	12
EMOCROMOCITOMETRICO			
Emoglobina	1,5	0,8	5
Eritrociti	1,5	0,8	5
Leucociti	7,5	3,8	23
Piastrine	5,0	2,5	15
Ematocrito	1,5	0,8	5
EMOGASANALISI			
pH	1,5	0,8	5
pCO_2	2,5	1,3	8
pO_2	2,5	1,3	8
EMOGLOBINA GLICATA	4,0	2,0	12
ESTRADIOLO	12,5	6,3	39
FARMACI DIGITALICI	5,0	2,5	15
FERRITINA	7,5	3,8	23
FERRO	12,5	6,3	39
FIBRINOGENO	7,5	3,8	23
FOSFATASI ALCALINA	7,5	3,8	23
FOSFATO INORGANICO	5,0	2,5	15
FRUTTOSAMMINA	4,0	2,0	12
GAMMA-GLUTAMMIL TRANSPEPTIDASI	12,5	6,3	39

Analita	*Variabilità biologica%*	*Variabilità analitica%*	*Differenza critica%*
GLUCOSIO	2,5	1,3	8
GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI	7,5	3,8	23
IgA	7,5	3,8	23
IgG	4,0	2,0	12
IgM	7,5	3,8	23
INSULINA	10,0	5,0	31
LATTATO DEIDROGENASI	7,5	3,8	23
LIPASI	7,5	3,8	23
LIPOPROTEINA(a)	12,5	6,3	39
LITIO	5,0	2,5	15
LUTEOTROPINA (LH)	12,5	6,3	39
MAGNESIO TOTALE	2,5	1,3	8
MICROALBUMINURIA	10,0	5,0	31
OSTEOCALCINA	10,0	5,0	31
POTASSIO	2,5	1,3	8
PROLATTINA	10,0	5,0	31
PROTEINA C REATTIVA	7,5	3,8	23
PROTEINE (ELETTROFORESI)			
Albumina	2,5	1,3	8
Alfa-1-globuline	7,5	3,8	23
Alfa-2-globuline	5,0	2,5	15
Beta-globuline	5,0	2,5	15
Gamma-globuline	5,0	2,5	15
PROTEINE TOTALI	2,5	1,3	8
RAME	4,0	2,0	12
SODIO	1,5	0,8	5
TEMPO DI PROTROMBINA	4,0	2,0	12
TEOFILLINA	10,0	5,0	31
TESTOSTERONE	10,0	5,0	31
TIREOTROPINA (TSH)	10,0	5,0	31
TIROXINA LIBERA (fT4)	7,5	3,8	23
TRANSFERRINA	4,0	2,0	12
TRIGLICERIDI	15,0	7,5	46
TRIIODOTIRONINA LIBERA (fT3)	7,5	3,8	23
URATO	7,5	3,8	23
UREA	7,5	3,8	23
VES (1 ora)	12,5	6,3	39

Si consideri il caso di un paziente al quale una prima volta sia stata rilevata una concentrazione del colesterolo nel siero pari a 243 mg/dL. Il paziente, dopo un periodo di dieta di opportuna durata, effettua una seconda determinazione del colesterolo, che risulta ora pari a 225 mg/dL. La differenza tra la prima e la seconda determinazione è uguale a 18 mg/dL.

La differenza critica riportata nella tabella precedente è pari al 12%. Il 12% di 243 mg/dL è uguale a 29,16 mg/dL (arrotondato a 29 mg/dL).

Conclusione: la differenza osservata (18 mg/dL) non è significativa, in quanto risulta inferiore alla differenza critica (29 mg/dL). Per un paziente con una concentrazione iniziale di 243 mg/dL, il successivo valore avrebbe dovuto essere pari o inferiore a 214 mg/dL (243 - 29) per consentire di concludere, con un adeguato grado di confidenza (solo il 5% di probabilità di sbagliare nel trarre la conclusione), che la dieta è stata efficace nel ridurre la concentrazione del colesterolo nel siero.

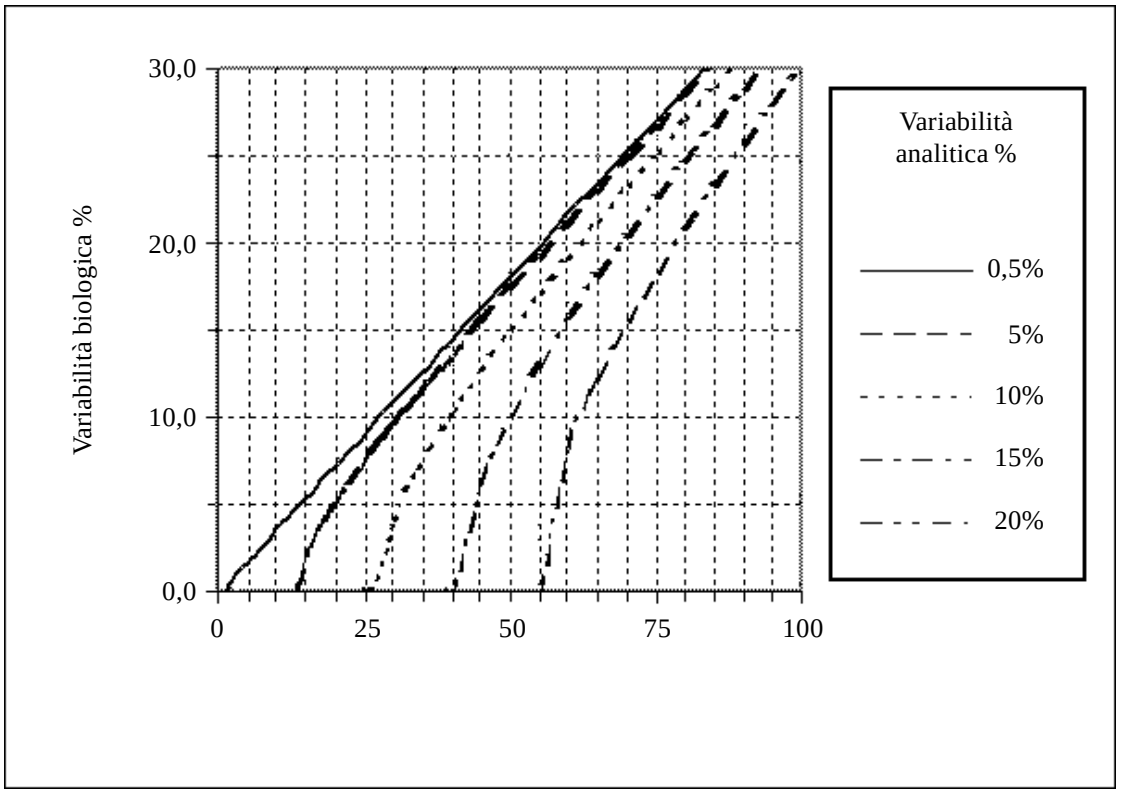
Simmetricamente, con una concentrazione iniziale di 243 mg/dL, il successivo valore avrebbe dovuto essere pari o superiore a 272 mg/dL (243 - 29) per consentire di concludere, con un adeguato grado di confidenza, che la dieta ha indotto piuttosto un aumento della concentrazione del colesterolo nel siero (come può avvenire veramente: esiste un meccanismo di retroazione negativa sulla sintesi endogena del colesterolo mediato appunto dal colesterolo di origine alimentare, e la ridotta introduzione di colesterolo con gli alimenti può pertanto determinare un'attivazione della sua sintesi endogena, con un conseguente, ancorché indesiderato, aumento della concentrazione del colesterolo nel siero).

Al fine di consentire un'adeguata familiarizzazione con lo strumento presentato, la tabella che segue contiene alcuni ulteriori esempi. Nella prima colonna viene riportato l'analita, nella seconda colonna il valore della differenza critica corrispondente, nella terza colonna un possibile obiettivo clinico del monitoraggio, nella quarta colonna il valore (ipotetico) riscontrato alla prima osservazione, e nella quinta il valore al quale (e oltre il quale) si deve considerare significativa la differenza alla seconda osservazione, con un rischio minimo di sbagliare (solo il 5%) accettando la conclusione che la concentrazione dell'analita si è effettivamente modificata. Alla seconda osservazione, qualsiasi valore compreso tra il primo ed il secondo (colonne (a) e (b) rispettivamente) deve essere attribuito al caso, impersonato nella fattispecie dalla variabilità analitica (ridotta) e dalla variabilità biologica (prevalente).

Un'ultima chiave di lettura della tabella. Un paziente che, nel corso di indagini multiple successive, si presentasse con valori che oscillano, ma sempre compresi tra quello della colonna (a) e quello della colonna (b), deve essere visto come un paziente nel quale non vi sono cambiamenti significativi: quello che si sta osservando è in sostanza la sua variabilità biologica.

Analita	*Differenza critica%*	*Obiettivo clinico*	*Valore (ipotetico) riscontrato alla prima osservazione (a)*	*Valore al quale (oltre il quale) considerare significativa la differenza alla seconda osservazione (b)*
ALANINA AMMINOTRANSFERASI (ALT,GPT)	31	Valutare la riduzione della concentrazione dell'enzima	120 U/L	83 U/L
ANTIGENE PROSTATA SPECIFICO (PSA)	39	Valutare il possibile aumento in un soggetto con problemi specifici in atto	10,0 µg/L	13,9 µg/L
CREATININA	12	Monitorare l'eventuale innalzamento in paziente con insufficienza renale	8,5 mg/dL	9,5 mg/dL
EMOCROMOCITOMETRICO				
Emoglobina	5	Valutare la correzione dell'anemia	10,8 g/dL	11,3 g/dL
FERRO	39	Monitorare la sideremia in un donatore abituale di sangue	86 mg/L	53 mg/L
GLUCOSIO	8	Valutare il miglioramento della glicemia	180 mg/dL	166 mg/dL
MICROALBUMINURIA	31	Valutare il peggioramen-mento della funzione renale in un paziente diabetico	40 mg/L	52 mg/L
VES (1 ora)	39	Monitorare la scomparsa della flogosi	36 mm	22 mm

Per gli analiti non riportati nella tabella è possibile, conoscendone le rispettive variabilità analitica e biologica, calcolare le differenze critiche anche mediante il grafico seguente.



A fronte di una perdita di dettaglio, il grafico fornisce un vantaggio: consente di visualizzare in modo conciso ma efficace gli ordini di grandezza delle grandezze in gioco. Così, anche non conoscendo con esattezza la variabilità biologica di un dato analita, si può facilmente osservare come, anche ipotizzando una variabilità analitica minima (0,5%) anche ad una variabilità biologica ridotta (del 10%) corrisponda in ogni caso una differenza critica pari al 27% circa.

Capitolo 6
Cenni interpretativi sui risultati delle analisi

Cenni interpretativi sulle analisi di biochimica clinica *(M. Di Lernia)* 293
Alterazioni del metabolismo dei lipidi e delle lipoproteine 293
Marcatori del danno miocardico 296
Marcatori del danno epatico 305
Marcatori del danno renale 308
Marcatori del danno pancreatico 314
Marcatori del ricambio osseo 314
Marcatori tumorali 319
Elettroforesi delle sieroproteine 326
Immunofissazione e componenti monoclonali 329
Cenni interpretativi sulle analisi di biologia molecolare. *(A. Di Blasio, S. Russo)* 331
Diagnostica batteriologica e virologica 331
Genetica molecolare 331
Sindrome della X fragile 332
Fibrosi cistica 333
Sindrome di Angelman e sindrome di Prader-Willi 334
Sindrome di Silver-Russel 335
Microdelezioni del cromosoma Y 336
Emocromatosi 337
Cenni interpretativi sulle analisi di citogenetica e citogenetica molecolare *(D. Giardino)* 338
Analisi citogenetica costituzionale 338
Citogenetica delle anomalie cromosomiche acquisite 343
Mutagenesi 343
Citogenetica oncologica 343
Citogenetica molecolare 345
Problematiche associate all'interpretazione dei risultati nella diagnosi prenatale 348
Cenni interpretativi sulle analisi di ematologia *(D. Lambertenghi)* 350
Anemie 350
Alterazioni quantitative dei leucociti 359
Leucocitosi 359
Linfocitosi 361
Leucopenie 365
Linfocitopenie 368
Alterazioni quantitative delle piastrine 369
Trombocitosi 369
Trombocitopenie 371

Alterazioni congenite e acquisite della coagulazione 373
Applicazioni citoflorimetriche in ematologia 376
Cenni interpretativi sulle analisi di immunologia *(M. Gerosa, P. Riboldi)* 378
Immunodeficienze 378
Difetti dell'immunità naturale 378
Diagnosi dei deficit dei fagociti e del complemento 382
Difetti primitivi a carico dei linfociti B, T e immunodeficienze combinate 384
Immunodeficienze secondarie 386
Diagnosi dei difetti dell'immunità specifica 387
Autoimmunità 389
Anticorpi anti-nucleo 392
Anticorpi anti-antigeni nucleari estraibli 394
Anticorpi anti-DNA 394
Anticorpi anti-citoplasma del neutrofili 395
Fattore reumatoide 397
Anticorpi anti-fosfolipidi 397
Anticorpi anti-endotelio 398
Il complesso maggiore di istocompatibilità 398
Cenni interpretativi sulle analisi di microbiologia *(E. Cesana)* 400
Infezioni delle vie urinarie 400
Infezioni cervico-vaginali 402
Infezioni dell'apparato gastroenterico 404
Infezioni delle vie respiratorie 408
Infezioni sistemiche 412
Parassititosi 413
Infezioni da protozoi 413
Infestazioni da elminti 416
Cenni interpretativi sulle analisi di sierologia infettiva *(G. Lissoni)* 424
Epatite virale di tipo A 424
Epatite virale di tipo B 425
Epatite virale di tipo C 427
Epatite virale di tipo D 429
Infezioni da Toxoplasma gondii (toxoplasmosi) 430
Infezioni da virus della rosolia 431
Infezioni da citomegalovirus 431
Infezioni da virus di Epstein-Barr 432
Infezioni da Herpes virus di tipo 1 e di tipo 2 433
Infezioni da Salmonella 433

Cenni interpretativi sulle analisi di biochimica clinica

(M. Di Lernia)

Alterazioni del metabolismo dei lipidi e delle lipoproteine

Il metabolismo dei lipidi e delle lipoproteine viene comunemente indagato mediante il dosaggio del colesterolo totale, delle sue frazioni HDL e LDL, dei trigliceridi, delle apolipoproteine AI e B. Per i criteri interpretativi dei risultati, basati su intervalli di riferimento, valori desiderabili e differenze critiche, si rimanda al capitolo che tratta dei valori decisionali.

Alterazioni patologiche del metabolismo dei lipidi causano patologie denominate genericamente iperlipoproteinemie, che possono essere primarie o acquisite. Fra le lipoproteinemie primarie, causate cioè da difetti congeniti, le principali sono classificate in 6 tipi, come riportato nella tabella.

Classificazione delle iperlipoproteinemie secondo Fredrickson[1]

Tipo	*CM*	*VLDL*	*LDL*	*Colesterolo*	*Trigliceridi*
I	↑	N	N	N	↑↑
IIa	-	N	↑↑	↑↑	N
Iib	-	↑	↑	↑	↑
III	-	Banda “broad beta”		↑	↑
IV	-	↑	N	N (↑)	↑
V	↑	↑	N	N (↑)	↑↑

Le caratteristiche essenziali delle iperlipoproteinemie sono:

➢ ***tipo I*** *(iper-chilomicronemia)*. Rara malattia autosomica recessiva causata da un difetto congenito della Apo CII, l’attivatore della lipoproteina lipasi. La concentrazione di chilomicroni rimane elevata anche dopo 24 ore dall’ultimo pasto e non si chiarifica con la somministrazione di eparina. La concentrazione dei trigliceridi nel siero può raggiungere anche valori di 10.000 mg/dL. Il paziente soffre di dolori addominali e presenta epatosplenomegalia e xantomatosi;

[1] *N = normale, ↑ = aumento, ↑↑ = forte aumento, CM = chilomicroni*

- ***tipo II*** *(iper-betalipoproteinemia)*. Malattia causata dall'assenza dei recettori per le LDL nelle cellule periferiche sia per il tipo IIa che per il tipo IIb. Il tipo IIb, a differenza del IIa, oltre ad accumulare le LDL accumula anche le VLDL. Il colesterolo totale in entrambi i casi è superiore a 400 mg/dL ed è causa di aterosclerosi prematura e xantomatosi;
- ***tipo III*** *(broad-beta)*. Rara malattia causata dalla mutazione del gene che codifica la Apo E. La mutazione causa un accumulo di chilomicroni "remnant" e delle LDL con conseguente ipercolesterolemia totale e ipertrigliceridemia;
- ***tipo IV*** *(iper-prebetalipoproteinemia)*. Malattia comune causata dall'aumento delle VLDL a causa di un aumento nella sintesi dei trigliceridi nel fegato. Le cause sono diverse e possono essere di origine familiare, o conseguenza di eccessivo apporto glucidico e/o calorico, alcolismo, diabete, ipertiroidismo;
- ***tipo V*** *(o chilomicronemia)*. Malattia rara che causa un aumento dei chilomicroni e delle VLDL e ridotta tolleranza ai glucidi. Il tipo V si distingue dal tipo I per la chiarificazione del sangue in seguito a somministrazione di eparina.

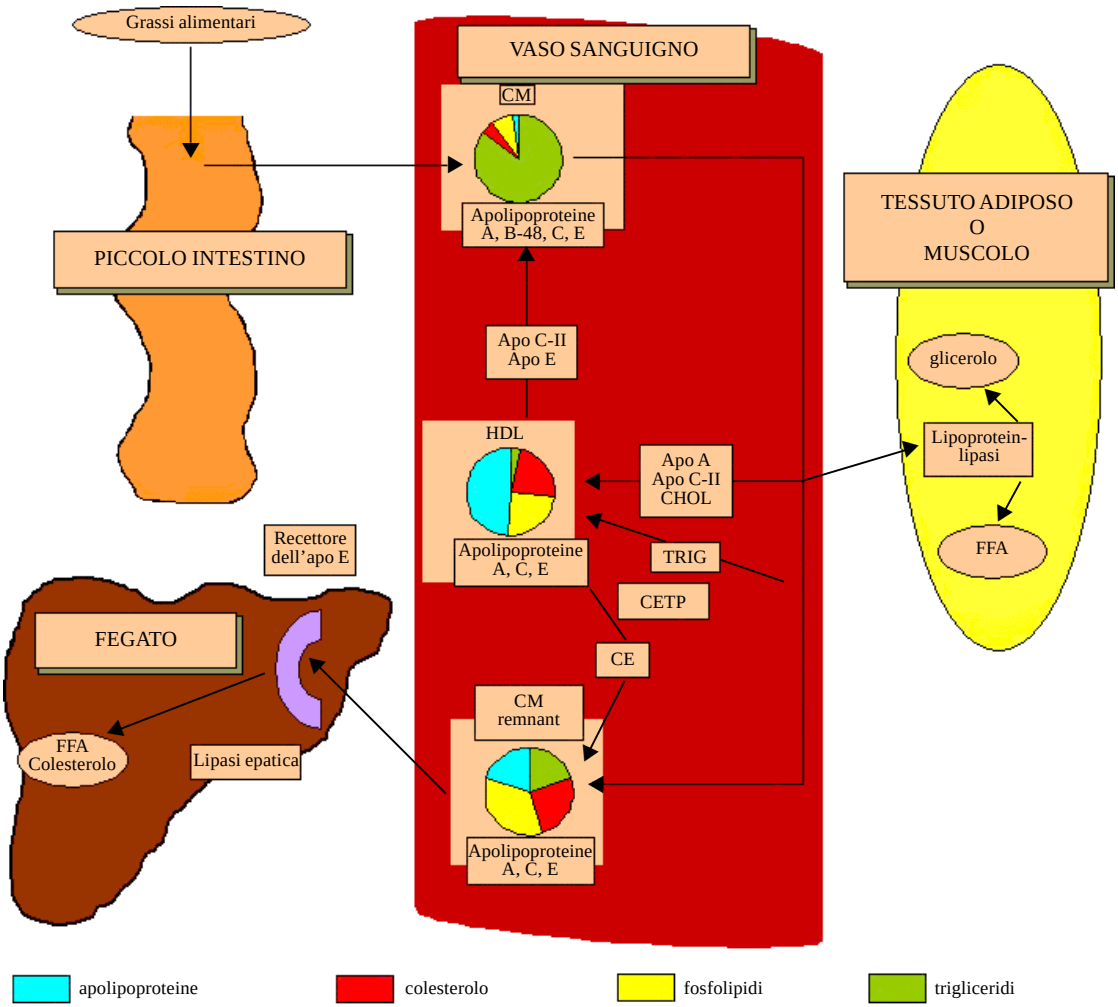
Altre dislipidemie primarie non incluse nella tabella sono:

- *morbo di Tangier o analfalipoproteinemia.* Rara malattia causata dalla mancanza di Apo-AI, con conseguente riduzione della concentrazione di HDL e da un difetto di CII, con conseguente aumento di VLDL e chilomicroni. L'ipercolesterolemia accompagnata a basse HDL induce l'aterosclerosi;
- *iper-lipoproteinemia X*. La lipoproteina è presente nel circolo ematico in conseguenza dell'ostruzione delle vie biliari. È una lipoproteina costituita da fosfolipidi, colesterolo non esterificato, Apo C, sali biliari e albumina.

Le iperlipoproteinemie acquisite sono più frequenti di quelle primarie e legate ad una predisposizione genetica. Ad esempio, le VLDL aumentano in seguito a iperalimentazione o abuso di alcool; le LDL aumentano in seguito ad una dieta sbilanciata con elevato contenuto in grassi oppure si accompagna a nefrosi o a colestasi. Esiste, infine, anche una forma di ipolipoproteinemia che va sotto il nome di *abetalipoproteinemia*, rara malattia trasmessa come carattere autosomico recessivo. È causata da mancata sintesi delle apolipoproteine B, che genera una sindrome da malassorbimento con effetti secondari rappresentati da acantocitosi, distrofia osteo-muscolare, retinite pigmentosa e atassia grave, e con colesterolo totale inferiore a 100 mg/dL, trigliceridi inferiori a 30 mg/dL e totale assenza di chilomicroni VLDL e LDL.

Per maggior comprensione viene qui schematicamente illustrato il metabolismo dei lipidi introdotti con la dieta. I chilomicroni (CM) trasportano i trigliceridi (TRIG) ai tessuti dove sono rimossi dalla lipoproteina lipasi, con liberazione di glicerolo e di acidi grassi liberi (FFA). Impoveriti, i CM si trasformano in CM-remnant che si legano al recettore epatico per le apolipo-

proteine E e vengono rimossi dal torrente circolatorio. Gli esteri del colesterolo (CE) vengono scambiati con i trigliceridi dei CM-remnant mediante l'azione della proteina di trasporto degli esteri del colesterolo (CETP).



Marcatori del danno miocardico[2]

La mortalità per malattie cardiovascolari è in decisa diminuzione nella maggior parte dei Paesi industrializzati, pur rappresentando ancora la maggiore causa singola di morte. Nel 1997, su un totale di 52,2 milioni di decessi, oltre 15 milioni sono stati causati da disturbi circolatori di cui 7,2 milioni dovuti ad infarto, 4,6 milioni a lesioni cerebrovascolari e 3 milioni ad altri disturbi cardiaci. La diminuzione è particolarmente evidente in alcuni Paesi del Nord Europa e negli USA, in cui più attiva è stata la campagna di sensibilizzazione nei confronti dei fattori promotori la malattia aterosclerotica e riguarda sia la mortalità per la cardiopatia ischemica, sia quella per gli incidenti cerebrovascolari. Anche l'Italia si sta allineando con gli altri Paesi occidentali e la mortalità per malattie cardiovascolari ha avuto nell'ultimo decennio una diminuzione che, pur con forti differenze regionali, si è attestata intorno ad un valore medio dell'11%.

Da un'analisi eseguita negli USA alcuni anni or sono, è stato stimato che oltre il 60% della riduzione della mortalità per cardiopatia ischemica è attribuibile direttamente al controllo dei principali fattori di rischio coronarico e cioè il 30% è dovuto alla diminuzione della colesterolemia media della popolazione, il 24% alla diminuzione del tabagismo e il 9% al trattamento dell'ipertensione arteriosa. Solo il 32% della riduzione della mortalità è ascrivibile al trattamento medico e chirurgico della malattia coronarica. Le aspettative per l'immediato futuro si basano dunque, più che sulla terapia, sulla prevenzione che tuttavia non può essere limitata alla individuazione e alla correzione delle anormalità lipidemiche, all'abolizione del fumo di sigaretta, alla terapia dell'ipertensione e alla terapia ormonale sostitutiva della menopausa. Questi fattori di rischi non sono infatti presenti in oltre un terzo dei pazienti che sviluppa una malattia cardiovascolare. È vero che la presenza anche a livello minimale di più fattori di rischio comporta un rischio finale molto più elevato, tuttavia l'effetto moltiplicativo di più fattori nello stesso soggetto è spesso insufficiente a spiegare l'insorgenza della malattia aterosclerotica. Del resto la patogenesi dell'aterosclerosi sfugge ancora ad un'interpretazione chiara ed il maggior ostacolo alla programmazione di una valida strategia di prevenzione è proprio rappresentato dall'incompleta conoscenza dei fenomeni alla base dello sviluppo della placca ateromasica e dell'evoluzione stenosante della lesione.

Dei 246 ***fattori di rischio*** per l'aterosclerosi descritti da Hopkins e Williams nel 1981, solo i maggiori (***dislipidemia***, ***fumo***, ***ipertensione***, ***diabete***, ***età***, ***sesso*** e ***familiarità***) hanno confermato nel tempo la loro validità di indicatori clinici di rischio cardiovascolare. A questi se ne

[2] *Si ringraziano il Dott. Roberto Rosso e la Dott.ssa Olivia Turri, che hanno fornito il materiale per la stesura di questa parte del capitolo.*

sono aggiunti di nuovi, alcuni derivati dall'osservazione sperimentale, altri dalla rilevazione epidemiologica e clinica. Per nessuno di essi si hanno al momento prove certe di un loro ruolo nel processo ateromasico o nella patogenesi dell'evento occlusivo, anche se non mancano elementi suggestivi di un loro significato predittivo che potrebbero sostanzialmente cambiare il modello di stima del rischio cardiovascolare individuale e aprire nuove prospettive di prevenzione. Essi sono:

- le ***lipoproteine perossidate***: è stato ampiamente dimostrato il nesso causale tra la concentrazione plasmatica delle *lipoproteine a bassa densità* (*LDL*) e la malattia aterosclerotica. Si è infatti constatato che l'accumulo di colesterolo nella cellula schiumosa, che rappresenta il fenomeno iniziale dell'intero processo aterogenetico, è determinato dall'interazione tra LDL perossidate e recettori specifici situati sulla membrana dei macrofagi. È evidente che tanto maggiore è la concentrazione plasmatica delle LDL, tanto maggiore è la probabilità di una loro perossidazione per opera dei radicali liberi dell'ossigeno prodotti dal metabolismo cellulare. Il ruolo delle LDL perossidate non sembra esaurirsi con l'arricchimento in esteri del colesterolo dei macrofagi. Alle LDL perossidate vengono infatti attribuiti effetti tossici sulle cellule endoteliali, un ruolo inibitore diretto sulla produzione da parte dell'endotelio del fattore di rilasciamento endoteliale (EDRF o ossido nitrico), uno stimolo della risposta infiammatoria ed immune, un'attivazione delle piastrine e della cascata coagulativa. In sintesi le LDL perossidate entrerebbero in gioco nel determinismo della cosiddetta "*disfunzione endoteliale*" cui si tende oggi attribuire un peso determinante nell'evoluzione della malattia aterosclerotica. Lo studio delle LDL perossidate può pertanto essere un mezzo di stima del rischio cardiovascolare più utile della stessa determinazione quantitativa delle LDL. Al momento sono risultati poco affidabili i metodi di dosaggio delle LDL perossidate;
- le ***sottofrazioni delle lipoproteine ad alta densità*** (***HDL***): studi clinici hanno dimostrato che le HDL contenenti solo *apolipoproteina A1* (*APO A1*) sono più strettamente correlate con la cardiopatia coronarica rispetto alle HDL contenenti sia APO A1 che APO A2, confermando clinicamente la maggiore attività della *lipoproteina A1* (*Lp A1*) nel trasporto inverso del colesterolo;
- la ***Lipoproteina (a)***, che si presenta come una LDL circondata da un'apoproteina specifica, APO (a), unita all'APO B-100 della LDL da un ponte disolfuro. La Lp (a) interagisce con i recettori dei macrofagi e contribuisce pertanto alla loro trasformazione in cellule schiumose e all'avvio ed accrescimento della placca aterosclerotica. Inoltre, la composizione aminoacidica dell'APO (a) è straordinariamente simile a quella del plasminogeno e conferisce alla lipoproteina un'azione di competizione con il sistema fibrinolitico. Ne risulta un'attività tendenzialmente trombogena che, almeno in via teorica, può essere causa delle complicanze

trombotiche tipiche della fase avanzata della malattia aterosclerotica. Sebbene numerosi studi abbiano portato prove convincenti di una positiva associazione tra Lp (a) e rischio di cardiopatia coronarica, il suo significato come marcatore di rischio cardiovascolare manca ancora di un'evidenza conclusiva;

- il ***fibrinogeno***, al quale viene attribuito un indubbio peso predittivo nei confronti sia della cardiopatia ischemica, sia dell'ictus cerebrale. Il meccanismo attraverso il quale l'iperfibrinogenemia può promuovere l'aterosclerosi e la trombosi non è ancora chiaro. Il fibrinogeno inoltre è caratteristicamente una proteina della fase acuta ed aumenta in risposta ad un qualunque processo infiammatorio. Una componente cellulare infiammatoria è del resto sempre presente nel processo aterosclerotico e sembra svolgere un ruolo rilevante nella patogenesi della malattia stessa e delle sindromi cliniche acute quali l'angina instabile e l'infarto del miocardio. Se l'aterosclerosi è associata ad una risposta infiammatoria o evoca, almeno in alcune condizioni cliniche, una reazione infiammatoria, non è sorprendente l'osservazione di una elevazione delle proteine della fase acuta, come il fibrinogeno e la Proteina C reattiva;
- i ***fattori della coagulazione***: già da tempo è stato sottolineato il valore predittivo nei confronti della cardiopatia ischemica di alcuni fattori della coagulazione quali ad esempio il *fattore VII* e l'*inibitore dell'attivatore del Plasminogeno* (*PAI-1*).

Il primo analita utilizzato nella diagnostica dell'*infarto miocardico acuto* (*IMA*) fu l'***aspartato-amminotransferasi*** (AST), il cui metodo di dosaggio nel siero venne descritto per la prima volta nel 1954. Questo fu gradualmente sostituito a partire dalla metà degli anni '60 dalla *creatina-chinasi* (*CK*). Successivamente con lo sviluppo dei metodi elettroforetici si riconobbe la maggior specificità del pattern isoenzimatico rispetto alla CK totale. Nel 1975 fu sviluppato il metodo di dosaggio dell'*isoenzima MB della creatina-chinasi* (*CK-MB*) per immunoinibizione, mentre qualche anno dopo fu messo a punto il dosaggio RIA della *mioglobina*. Poco dopo la metà degli anni '80 fu prodotto il primo anticorpo specifico per la CK-MB. Nel 1989 fu dimostrata l'utilità diagnostica della *Troponina T cardiaca* (*cTnT*), mentre nel 1992 comparve il dosaggio della *Troponina I cardiaca* (*cTnI*). Nel 1994 un grosso studio dimostrò l'utilità delle *isoforme della CK-MB* nella diagnosi o esclusione di IMA in pazienti afferenti al Pronto Soccorso. Infine, entrambe le Troponine si sono rivelate utili per la stratificazione del rischio in ampi studi clinici pubblicati nel 1996.

I principali ***marcatori del danno miocardico*** attualmente disponibili sono qui illustrati.

La ***lattato-deidrogenasi*** (***LD***) manteneva una certa utilità nella diagnosi di infarto pregresso prima della messa a punto del dosaggio delle Troponine cardiache. La LD è un enzima della via glicolitica che catalizza la seguente reazione di ossidoriduzione:

$$Piruvato + NADH + H^+ \Leftrightarrow Lattato + NAD^+$$

È in grado di generare le molecole di NAD^+ necessarie alla via glicolitica in condizioni anaerobie, quando cioè il ciclo di Krebs non è attivo. Dal punto di vista strutturale la LD è un *tetramero* del peso molecolare di circa 135 kilo-Dalton (kD) costituito da due tipi di ***subunità***, ***M*** e ***H***, che, variamente combinate, danno luogo alla formazione di 5 diversi ***isoenzimi*** (***H_4***, ***MH_3***, ***M_2H_2***, ***M_3H***, ***M_4***). In relazione alla loro mobilità elettroforetica questi isoenzimi vengono indicati (dal più anodico al più catodico) rispettivamente ***LD1***, ***LD2***, ***LD3***, ***LD4***, ***LD5***. Una così vasta distribuzione ha come conseguenza una scarsa specificità dell'LD sierica totale come indice di danno miocardico; infatti l'attività di questo enzima si eleva in circolo nel corso di parecchie condizioni fisiopatologiche. A questo inconveniente si può ovviare, almeno in parte, dosando non solo l'attività totale, ma anche quella dei diversi isoenzimi o, per lo meno, di quelli che si trovano in più elevata concentrazione nel muscolo cardiaco (LD1 e LD2). Dal punto di vista analitico la IFCC ha raccomandato, per il dosaggio dell'attività totale, l'utilizzo della reazione diretta (da lattato a piruvato) perché è più lineare nel tempo, si può facilmente seguire monitorando l'incremento di assorbanza a 340 nm dovuto alla produzione di NADH, ed infine risulta più facile ottimizzare le condizioni di reazione in modo da favorire l'attività dell'isoenzima più concentrato nel miocardio (LD1). L'elettroforesi resta invece il metodo di scelta per la separazione e il dosaggio degli isoenzimi dell'LD. I tempi di rilascio in seguito a danno miocardico con perdita di integrità delle membrane cellulari sono piuttosto tardivi sia per l'LD totale che per l'LD1, perché, pur essendo enzimi citoplasmatici, hanno un PM relativamente elevato. In pratica si verifica un aumento a 8-12 h dall'insorgenza del dolore toracico, un picco di attività a 24-72h, seguito da un ritorno alla normalità dopo 7-12 giorni. È chiaro, pertanto, che l'LD totale e l'LD1 sono utili come markers di infarto pregresso, anche se oggi, per problemi di scarsa specificità (ricordiamo che l'LD1 si trova in abbondanza anche negli eritrociti e nei reni), questi test sono stati superati dall'introduzione dei più specifici dosaggi delle Troponine cardiache.

La ***creatina-chinasi*** (***CK***), che catalizza la seguente reazione:

$$Creatina + ATP \Leftrightarrow Creatin\text{-}P + ADP$$

è presente, come enzima citoplasmatico in vari tessuti sotto forma di dimero costituito da due tipi di subunità M e B, che danno luogo alla formazione di tre ***isoenzimi*** diversi, ***BB***, ***MB*** e ***MM***, i quali vengono identificati in relazione alla diversa mobilità elettroforetica. Esiste anche un *isoenzima mitocondriale* (*mitCK*). Importanti, infine, per le interferenze analitiche che possono determinare, sono le cosiddette *macroforme* (*macro-CK*), di cui se ne conoscono due tipi:

- *tipo1* (*Macro1-CK*), che consiste di un complesso tra CK-BB ed una IgG nel rapporto di 2:1;
- *tipo2* (*Macro2-CK*), non è altro che un oligomero del mit-CK: negli adulti questa variante si trova esclusivamente nel siero di pazienti con cirrosi epatica o neoplasie metastatiche.

La CK è distribuita in vari tessuti con una conseguente scarsa specificità del CK totale quale indice di danno miocardico, soprattutto in presenza di traumi al muscolo scheletrico anche di modesta entità. Questo ha portato allo sviluppo di metodi per il dosaggio dell'isoenzima a maggior concentrazione nella cellula miocardica (CK-MB). Per quanto riguarda il dosaggio di questo isoenzima nel 1975 è stata sviluppata una tecnica facilmente automatizzabile: l'immunoinibizione. Si sfrutta un anticorpo policlonale anti-monomero M e si determina successivamente l'attività residua della CK attribuibile al monomero B non inibito; si moltiplica il risultato per 2 poiché la struttura del CK-MB è dimerica. Purtroppo questo metodo risente delle interferenze dovute all'eventuale presenza di macroforme, CK-BB o dell'isoenzima mitocondriale. Dopo il 1985 sono state introdotte tecniche immunochimiche rapide ed accurate che consentono il dosaggio del CK-MB come massa: oggi questi metodi risultano essere quelli più affidabili, precisi e praticabili poiché non risentono di alcun tipo di interferenze e prevedono ridotti tempi di esecuzione. I tempi di rilascio del CK e del CK-MB dopo infarto miocardico sono più precoci rispetto a quelli dell'LD probabilmente a causa del peso molecolare inferiore. Generalmente la CK-MB è presente nel siero in tracce, mentre aumenta nell'IMA 4-6 ore dopo l'insorgenza del dolore, raggiunge il picco di concentrazione dopo 18-22 ore per rientrare nei valori di riferimento 48-72 ore dopo i primi sintomi. Per distinguere patologie a carico del muscolo scheletrico da quelle cardiache, o in casi dubbi di IMA in soggetti in cui la sintomatologia insorge durante o al termine di attività sportiva, è utile ricorrere al calcolo del rapporto percentuale tra CK-MB (ng/mL) e CK totale (U/L a 37°C), che può essere interpretato come indice di necrosi miocardica se superiore a 2,5. L'isoenzima CK-MM è costituito da tre isoforme, indicate, a seconda della mobilità elettroforetica (dalla più anodica alla più catodica), CK-MM1, CK-MM2, CK-MM3. La CK-MM3 è la cosiddetta isoforma tissutale o intracellulare (perché è quella che si ritrova all'interno della cellula): è caraterizzata dalla presenza di due lisine carbossiterminali sui monomeri M (una lisina su ciascun monomero). In circolo i monomeri subiscono in due momenti successivi il clivaggio da parte di una carbossipeptidasi sierica, dando così luogo alla trasformazione dell'isoforma CK-MM3 in CK-MM2 (per perdita di una lisina) e CK-MM1 (per perdita di entrambe le lisine). CK-MM2 viene definita isoforma intermedia mentre CK-MM1 isoforma sierica. La presenza nel siero di CK-MM3 è indice di necrosi miocellulare recente, poiché la carbossipeptidasi sierica non ha ancora avuto il tempo di staccare le lisine, mentre nel siero di soggetti sani la quasi totalità del CK-MM è rappresentata dalla isoforma sierica CK-MM1. Nella diagnostica dell'IMA è preferibile l'utilizzo delle isoforme dell'isoenzima CK-MB, data la sua maggiore cardiospecificità. La CK-MB è costi-

tuita da due isoforme, una tissutale o CK-MB2 con una lisina carbossi-terminale sulla subunità M ed una sierica o CK-MB1 che ha perso la lisina ad opera della carbossipeptidasi. La presenza di CK-MB2 nel siero rappresenta un precoce segno di necrosi miocellulare con specificità miocardica molto più elevata rispetto alla isoforma CK-MM3. A questo proposito è stato dimostrato che CK-MB2 entro le due ore dall'insorgenza dei sintomi ha una sensibilità intermedia tra quella della mioglobina e quella del CK-MB; rimane pertanto il dubbio sull'utilità di questa isoforma come marker precoce di infarto miocardico.

La ***mioglobina*** è una proteina citoplasmatica localizzata nelle cellule muscolari e cardiache. Purtroppo la forma cardiaca non differisce da quella muscolare scheletrica, per cui non ha nessuna cardiospecificità. Tuttavia grazie al suo basso peso molecolare ed alla sua localizzazione citoplasmatica è la prima molecola rilasciata in circolo dopo un IMA; è pertanto molto sensibile anche se scarsamente specifica. La concentrazione sierica supera i livelli di normalità a 1-3 ore dall'insorgenza dei sintomi, raggiunge il picco dopo 6-9 ore e ritorna normale nelle successive 24-36 ore. Il tasso ematico di mioglobina può aumentare nel corso di numerose situazioni fisiologiche (intenso e prolungato esercizio muscolare) e patologiche (non solo a carico del muscolo scheletrico ma anche a carico dei reni). La scarsa specificità suggerisce di interpretare un valore negativo di mioglobina come ottimo indice di esclusione di IMA, alla condizione che il dosaggio venga effettuato entro la tipica finestra diagnostica compresa tra 1-3 ore dall'insorgenza dei sintomi. È comunque preferibile valutare cineticamente le eventuali modificazioni dei valori di mioglobina anziché basarsi su un singolo dato soprattutto nei casi in cui permanga anche il minimo dubbio di IMA. Questa molecola viene utilizzata con successo per la valutazione della terapia trombolitica: in caso di riperfusione coronarica il picco di mioglobina è il più precoce rispetto a quello degli altri markers. In particolare, il rapporto tra il valore ottenuto dopo un'ora dal termine della trombolisi e quello basale pretrombolisi è significativo di avvenuta riperfusione se superiore ad un valore soglia. All'inizio di questo decennio è anche stato messo a punto un immunodosaggio fluorimetrico con doppia marcatura per la determinazione simultanea di Mioglobina e Anidrasi Carbonica III. Questo enzima si trova nel citoplasma delle cellule muscolari scheletriche, ma non in quelle miocardiche; pertanto la contemporanea misura di entrambi consente di ottenere un'ottima specificità. L'unica limitazione è rappresentata dal lungo tempo di esecuzione che non soddisfa le ovvie caratteristiche di urgenza di questa determinazione.

Troponine cardiache: l'unità funzionale delle fibre muscolari striate, scheletriche (lente e rapide) e cardiache, è il sarcomero, compreso tra due strie Z e costituito da filamenti spessi di miosina e filamenti sottili. L'unità strutturale minima del filamento sottile consiste di 7 monomeri di actina legati al complesso troponina-tropomiosina, localizzato lungo il filamento sottile ad intervalli di circa 3.800 nm. Ognuno di questi complessi è costituito di 3 molecole diverse di troponina:

- ***troponina I*** (TnI), che inibisce il legame actomiosinico;
- ***troponina C*** (TnC), che in presenza di calcio sposta la TnI bloccando l'effetto inibitore di quest'ultima;
- ***troponina T*** (TnT) che è legata alla tropomiosina ed ha una funzione di amplificatore di segnale.

Mentre esiste una sola forma della TnC, sono note *tre isoforme* (prodotte da altrettanti geni distinti) sia della TnT che della TnI: *scheletrica lenta* (sTnT ed sTnI), *scheletrica rapida* (fTnT e fTnI) e *miocardica* (cTnT e cTnI). In seguito ad un danno miocardico cTnT e cTnI vengono liberate in circolo e possono essere dosate con metodi immunochimici basati sull'utilizzo di anticorpi monoclonali che riconoscono specificatamente le isoforme cardiache. Purtroppo la situazione è complicata dal fatto che, nel corso dello sviluppo embrionale e fetale, il gene per la cTnT è attivato e trascritto anche nelle fibre muscolari scheletriche e, pertanto, potrebbe essere riespresso anche nell'adulto in seguito ad un danno alla muscolatura scheletrica. Per quanto riguarda la cTnT i dosaggi effettuati con metodi di prima generazione manifestavano una certa cross-reattività per le isoforme scheletriche, dovuta al fatto che l'anticorpo utilizzato era diretto contro la porzione amino-terminale, la quale presenta un elevato grado di omologia tra le diverse isoforme. Questi problemi sono stati superati con i test di seconda generazione nei quali i due anticorpi utilizzati riconoscono epitopi situati 6 aminoacidi a valle rispetto alla porzione amino-terminale rilevata con i test di prima generazione. Il dosaggio della troponina I cardiaca non ha presentato sin dall'inizio questi inconvenienti perché la presenza, nella regione amino-terminale, di una sequenza addizionale di 31 aminoacidi la rende estremamente specifica. Esistono tuttavia dei problemi comuni ad entrambe le troponine cardiache, dovuti, per esempio, a mancanza di standardizzazione, per cui i valori di riferimento variano da un metodo all'altro. Un ulteriore inconveniente è determinato dal fatto che cTnT e cTnI vengono liberate in circolo non solo in forma libera, ma anche in forma complessata tra di loro e con la TnC; inoltre la cTnI può essere presente in circolo in forma ossidata o in forma ridotta; è chiaro che un metodo ideale dovrebbe riconoscere in modo equimolare tutte queste forme. È stato recentemente pubblicato uno studio nel quale si è dimostrato che tutti i metodi commerciali per il dosaggio della cTnI, riconoscono entrambe le forme (libera e complessata); in alcuni metodi si è dimostrata una risposta equimolare mentre per altri la risposta per la forma legata è risultata significativamente superiore a quella per la forma libera. È stata inoltre riscontrata una sostanziale differenza tra i valori misurati con diversi metodi. L'unico kit commerciale per il dosaggio della cTnT è risultato riconoscere le forme libera e complessata in modo pressoché equimolare. In conclusione, quindi, nonostante l'indubbia utilità della cTnI, si sono riscontrate differenze nei risultati ottenuti con i diversi metodi a causa della mancanza di standardizzazione e della eterogeneità delle cross-reazioni degli anticorpi alle diverse forme di cTnI. Per quanto

riguarda i tempi di rilascio, entrambe le troponine cardiache hanno la stessa precocità del CK-MB (4-6 ore dopo l'insorgenza dei sintomi), raggiungono il picco dopo 14-36 ore e tornano ai livelli di normalità dopo 5-9 giorni (cTnI) o dopo 12-14 giorni (cTnT). La lunga permanenza in circolo di queste molecole, dovuta non tanto alla loro emivita (inferiore alle 3 ore) quanto al continuo rilascio, consente di utilizzare le troponine cardiache come markers di infarto pregresso in luogo della LD, con il vantaggio di una maggiore specificità. È stato dimostrato che anche modesti aumenti di cTnT o cTnI nel siero identificano pazienti con "danno miocardico minimo" che a breve o medio termine possono presentare un maggior rischio di IMA. A questo proposito sembrano esserci delle differenze tra i due markers dovuti alla diversità della distribuzione intracellulare ed al diverso peso molecolare.

	Troponina I Cardiaca	***Troponina T Cardiaca***
Frazione Citoplasmatica	3% - 4%	6% - 8%
Peso Molecolare	23.500	33.000

Una maggior percentuale citoplasmatica faciliterebbe il rilascio in caso di danno miocardico minimo, di contro un maggior peso molecolare lo ostacolerebbe.

Catene pesanti e leggere della Miosina: il principale componente dei filamenti spessi delle fibrille muscolari scheletriche e cardiache è la miosina, eteropolimero composto da due catene pesanti (MHC, PM = 220 KD) e due paia di catene leggere (MLC1, PM= 27 KD; MLC2, PM= 20 KD). Nel miocardio sono presenti 2 isoforme di MHC, α che è esclusiva del muscolo cardiaco e β che è presente anche nel muscolo scheletrico; questo ha fatto sperare che si potesse mettere a punto un dosaggio specifico. In realtà si è poi visto che in circolo non compaiono le molecole intere, ma solo i frammenti e questo, probabilmente, è la causa della scarsa specificità dei test finora descritti in letteratura. La cinetica di rilascio delle MHC è molto lenta ed i frammenti si ritrovano nel siero solo dopo 2-10 giorni dall'IMA e sono quindi un indice di infarto pregresso. Non esiste a tutt'oggi un dosaggio specifico per le MLC cardiache. Hanno gli stessi tempi di comparsa in circolo del CK-MB (3-6 ore dall'IMA) e permangono elevate fino a 10 giorni e, in questo caso, possono essere considerate un indice di infarto pregresso. Tuttavia sia le catene pesanti sia le catene leggere della miosina non hanno trovato molto spazio nella diagnostica cardiologica.

Infine un discorso a parte merita il razionale sulla base del quale alcune molecole attualmente studiate potrebbero rappresentare dei nuovi marcatori di danno miocardico:

➢ la sindrome coronarica acuta si associa con un processo infiammatorio, con il conseguente rilascio in circolo delle proteine della fase acuta. Tra queste, si è visto che la concentrazio-

ne sierica di ***Proteina C Reattiva*** (CRP) è aumentata nei pazienti affetti da IMA e correla con l'estensione dell'infarto;

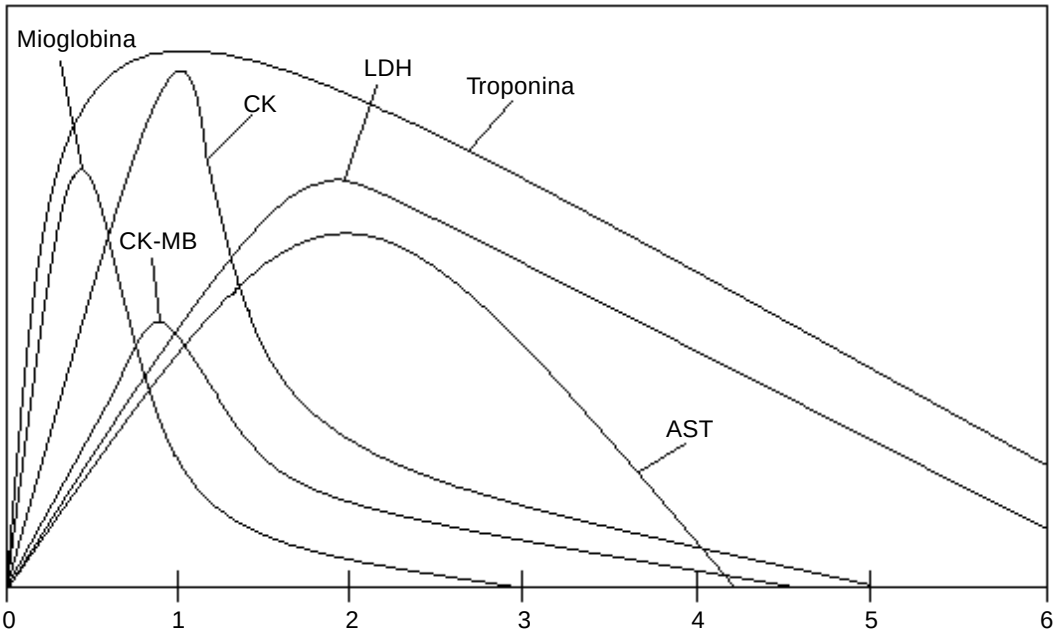
- dato che il trombo svolge un ruolo fondamentale nell'arteriopatia coronarica, indicatori plasmatici di attivazione della via coagulativa forniscono utili informazioni diagnostiche: infatti la diagnosi di IMA potrebbe essere esclusa in assenza di trombosi attiva. Oggi è disponibile in commercio un kit per il dosaggio dei ***polimeri di fibrina solubile***, derivati dal fibrinogeno in seguito al distacco, ad opera della trombina, dei fibrinopeptidi A e B. Purtroppo questo test non può che essere aspecifico dato che l'attivazione della via coagulativa si verifica anche in altre patologie;
- l'attivazione e l'aggregazione piastrinica costituiscono un altro importante processo verso la formazione di coaguli insolubili. Nel corso dell'attivazione piastrinica una proteina nota come ***GMP-140*** o ***P-Selectina*** viene traslocata dagli α granuli alla superficie del trombocita e successivamente liberata in circolo, per cui può essere utilizzata come marker di attivazione. Il ruolo di questa molecola nella diagnosi di IMA è attualmente oggetto di studio;
- la ***glicogeno fosforilasi*** (*GP*) è un enzima situato nel reticolo endoplasmico dove catalizza la degradazione del glicogeno. È un dimero di 188 KD e se ne conoscono 3 isoenzimi: BB che si trova nel cervello e nel cuore, MM che si trova nei muscoli scheletrici, LL che si trova nel fegato. In corso di ischemia la GP viene dapprima rilasciata nel citoplasma e successivamente, quando la permeabilità della membrana cellulare è compromessa, viene liberata in circolo. Alcuni studi hanno dimostrato che, rispetto ai markers classici di IMA (mioglobina, cTnT, CK-MB), GP-BB è più sensibile entro le prime 2-4 ore dall'insorgenza dei sintomi;
- la ***proteina legante gli acidi grassi*** (*FABP*), situata nel citoplasma dove funziona come trasportatore di acidi grassi a lunga catena, grazie al suo basso PM (14 KD), come la mioglobina viene rapidamente liberata in circolo in seguito a danno della membrana cellulare. L'isoforma cardiaca è distinta da quella intestinale ed epatica, ma purtroppo, come la mioglobina, si trova in quantità significative nel muscolo scheletrico. Tuttavia il contenuto di FABP in questa sede rappresenta solo il 10-30% del contenuto nel miocardio, mentre il contenuto di mioglobina nel muscolo scheletrico è pari a circa il doppio del contenuto nel miocardio. Il dosaggio della FABP cardiaca si è dimostrato essere un marker più precoce della mioglobina.

Le basi per un razionale utilizzo dei marcatori di lesione miocardica sono state poste sia dal gruppo di studio interdisciplinare ANMCO-SIBioC-SIMeL che dal National Academy of Clinical Biochemistry (NACB): entrambi concordano che il terzo criterio delle raccomandazioni OMS per la diagnosi di IMA dovrebbe prevedere l'utilizzo di marcatori biochimici sierici più

sensibili e specifici rispetto ai classici marcatori enzimatici (AST, LD, CK totale, attività catalitica del CK-MB che sarebbero da considerarsi obsoleti). Poiché non esiste attualmente un marcatore ideale, sarebbe utile ricorrere al dosaggio di almeno 2 marcatori: il primo, caratterizzato da precocità di comparsa in circolo, è rappresentato dalla mioglobina che con un tempo di comparsa di 2-3 ore ha un elevato valore predittivo negativo; il secondo, caratterizzato da una maggiore specificità, è rappresentato dalle troponine cardiache che compaiono in circolo in tempi relativamente precoci (4-10 ore) e rimangono elevate per 4-9 giorni.

L'andamento dei marcatori illustrati è riassunto nella seguente figura.

Mioglobina, troponina ed enzimi nell'infarto del miocardio



Marcatori del danno epatico

Il fegato è il più importante laboratorio biochimico dell'organismo. Fra le diversi funzioni del fegato vanno ricordate la biosintesi degli amminoacidi, la biosintesi di numerose proteine (albumina, fattori della coagulazione, eccetera), la biosintesi del glicogeno, la gluconeogene-

si, la biosintesi delle lipoproteine, i processi di detossificazione, la chetogenesi, la biosintesi dei sali biliari, la biosintesi dei pigmenti biliari, l'ureogenesi.

Tra i marcatori di danno epatico, quelli più comunemente utilizzati sono le transaminasi (AST, ASpartato amminoTransferasi, nota anche come GOT, ovvero Glutammico-Ossalacetica Transaminasi e ALT, Alanina amminoTransferasi, nota anche come GPT, ovvero Glutammico-Piruvica Transaminasi), la lattato deidrogenasi (LDH, in particolar modo l'isoenzima LDH_5), la fosfatasi alcalina (ALP), la gamma-glutammiltransferasi (γGT), la bilirubina totale e le sue frazioni diretta e indiretta. A queste analisi si devono aggiungere ulteriori test specifici per le diverse patologie (ad esempio, in caso di sospetta epatite virale si ricercheranno i markers dei più comuni virus epatici).

Nelle ***epatiti acute***, causate in genere da agenti virali o (meno frequentemente) da lesioni tossiche (da tossine o altre sostanze tossiche), prima della comparsa dell'ittero si osserva un incremento della bilirubina plasmatica, delle transaminasi, della bilirubina e dell'urobilinogeno urinari. La fosfatasi alcalina, in questo stadio rientra nell'intervallo di riferimento. Successivamente, quando l'epatite acuta si manifesta con ittero, nel plasma aumentano la bilirubina e la fosfatasi alcalina, mentre nelle urine scompare l'urobilinogeno.

Alterazioni biochimiche nell'epatite acuta prima e durante l'ittero[3]

	Epatite acuta pre-ittero	***Epatite acuta con ittero***
S-BILIRUBINA	↑	↑↑
S-AST, S-ALT	↑↑	↑
S-ALP	N	↑
U-BILIRUBINA	↑	↑
U-UROBILINOGENO	↑	assente

L'*epatite virale di tipo A* è causata dall'HAV, un virus isolabile nelle feci dei malati. Si ricercano IgM anti HAV nella fase precoce della malattia, e le IgG nella fase tardiva.

L'*epatite virale di tipo B* è causata dall'HBV, un virus a DNA identificato nel sangue e nei diversi liquidi biologici dei pazienti. Nella fase precoce, compaiono nel sangue prima gli antigeni HBsAg (antigene di superficie) e HBeAg (antigene legato al core in posizione superficiale). Contestualmente compaiono anche gli anticorpi anti HBc (anticorpi diretti contro l'HbcAg, l'antigene legato al core in posizione centrale). Successivamente compaiono gli anticor-

[3] N=valori nella norma, ↑ = aumento, ↑↑ = forte aumento

pi anti-HBe che hanno un significato prognostico positivo. Per ultimi compaiono gli anticorpi anti-HBsAg che indicano epatite B pregressa.

L'*epatite virale di tipo C* è causata dall'HCV. Il test più sensibile e più specifico della presenza dell'HCV è la ricerca dell'HCV-RNA.

L'*epatite virale di tipo D* si manifesta in soggetti portatori di HBV. È costituito da una particella virale a RNA il cui antigene delta è incapsulato dall'HBsAg. Durante la fase acuta è possibile identificare nel siero del paziente gli anticorpi anti HDV di classe IgM

Altri virus responsabili di epatite acuta sono il *virus dell'epatite E*, il *virus di Epstein-Barr* e il *citomegalovirus*.

I rispettivi quadri sierologici, fondamentali nell'orientare alla diagnosi, sono riportati nella sezione relativa alle analisi di sierologia infettiva.

Nelle ***epatiti croniche*** i livelli delle transaminasi plasmatiche sono elevati, mostrando quindi un persistente danno cellulare. L'attività della fosfatasi alcalina è normale. Si distingue la forma cronica attiva da quella persistente per la presenza di alterazioni degli indici della funzionalità sintetica (albumina, tempo di protrombina). I test più comunemente richiesti nell'indagine dell'epatite cronica sono ***AST*** e ***ALT*** (l'incremento di entrambi è indice di epatopatia), ***HbsAg***, ***HCV RNA***, ***autoanticorpi antinucleo*** e ***anti muscolatura liscia***, ***elettroforesi*** delle plasmaproteine (nelle epatopatie si osserva un incremento delle gammaproteine e una riduzione delle albumine), ***colinesterasi*** sierica (diminuisce in seguito a sofferenza del parenchima epatico).

Le epatiti e le steatosi alcoliche e nutrizionali possono evolvere in ***cirrosi***, che in alcuni casi si possono manifestare anche senza apparenti cause (cirrosi criptogeniche). Nelle cirrosi i test più consigliati sono l'***elettroforesi*** delle sieroproteine (che oltre a mostrare un incremento delle gammaglobuline è caratterizzato dalla formazione del ponte β-γ), ***AST*** e ***ALT***, ***colinesterasi*** (che diminuisce in modo proporzionale alla diminuzione della massa di parenchima epatico funzionante).

La ***colestasi*** è caratterizzata dalla impossibilità della bilirubina di raggiungere il duodeno. Le indagini di laboratorio mostrano valori aumentati soprattutto per la ***bilirubina*** sierica, l'attività della ***fosfatasi alcalina*** e quella della **γGT**. Dalle indagini di laboratorio, spesso non è possibile distinguere una colestasi *intraepatica* da una *extraepatica*.

Oltre al ***carcinoma epatico***, di genesi primitiva, il fegato può essere sede di tumori di origine metastatica. Un test con elevata specificità per i tumori epatici è l'***α-fetoproteina***, che si presenta elevata nel 70% dei casi. L'indicatore biochimico più significativo è l'attività della fosfatasi alcalina, che risulta essere aumentata.

Marcatori del danno renale

Il rene svolge diverse funzioni, fra le quali vanno ricordate la regolazione del pH plasmatico, la regolazione del bilancio idrico ed elettrolitico, la regolazione della pressione osmotica dei liquidi dell'organismo e l'eliminazione dei cataboliti e delle sostanze tossiche.

L'unità funzionale del rene è il ***nefrone***: ciascun rene ne contiene circa 1.200. Ogni nefrone è composto da un ***glomerulo*** e da un ***tubulo***. Il glomerulo (descritto per le prima volta dall'italiano Malpighi) è costituito da un gomitolo di capillari arteriosi inseriti tra una arteriola afferente ed una efferente. Il glomerulo è avvolto dalla ***capsula di Bowman*** formata da due foglietti, uno più esterno, lamina parietale, ed uno più interno, lamina viscerale, che aderisce alla parete dei capillari. Fra i due foglietti vi è uno spazio, lo spazio capsulare, che continua nel tubulo renale. La funzione del glomerulo è quella di filtrazione del plasma. La disposizione di cellule mesoteliali denominate podociti, determina la formazione di pori che consentono il passaggio di acqua e di molecole di dimensioni inferiori a 80 Å. Questo significa che molecole con peso molecolare superiore a 70.000 generalmente non vengono filtrate. Il volume del *filtrato glomerulare* di un uomo adulto di 70 Kg è di 180 L/die, di cui solo 1-2 L vengono eliminati sotto forma di urina.

La forza che produce l'ultrafiltrato è la pressione idrostatica del sangue (P_S) alla quale si contrappone la pressione oncotica (π_0) dovuta alle macromolecole e la pressione intracapsulare (P_B). Pertanto, la pressione utile di filtraggio è

$$P_f = P_S - P_B - \pi_0$$

essendo ripettivamente:

- P_f = 25÷35 mm Hg
- P_S = 60÷70 mm Hg
- P_B = 10 mm Hg
- π_0 = 25 mm Hg

Proseguendo dalla capsula il primo tratto del tubulo renale prende il nome di ***tubulo contorto prossimale***. Questo prosegue in un secondo tratto denominato ***ansa di Henle***, che è una ansa a forma di U contraddistinta da un tratto discendente ed uno ascendente. Al termine prosegue il ***tubulo contorto distale*** che si immette nel dotto collettore. Il riassorbimento dell'80% di acqua Na^+, K^+, e Cl^- avviene a livello del tubulo contorto prossimale per trasporto attivo dei cationi allo spazio interstiziale peritubulare. Gli anioni, tra cui Cl^-, vengono trasportati per compensare la carica. L'acqua viene riassorbita come conseguenza delle variazioni osmotiche indotte dal movimento degli ioni. Il meccanismo principale di trasporto del Na^+ è espletato

dalla ATPasi Na^+-K^+ dipendente. Anche il controtrasporto Na^+/H^+ contribuisce a scambiare Na^+ con una quantità equivalente di H^+, che rientra dall'interstizio peritubulare. Nel tratto discendente dell'ansa di Henle l'acqua diffonde nell'interstizio aumentando la concentrazione degli ioni. Nel tratto ascendente, che è impermeabile all'acqua, la riduzione dell'osmoticità si esplica mediante l'estrusione passiva di ioni Na^+ e Cl^-. Nel tratto distale il Na^+ viene ulteriormente assorbito grazie all'azione dell'aldosterone. Come conseguenza, lo ione K^+ rientra passivamente nel tubulo contorto distale a causa di un gradiente elettrochimico più negativo. Sempre a livello del tubulo contorto distale e del collettore vi è un ulteriore riassorbimento facoltativo dell'acqua regolato dall'azione della vasopressina o ormone antidiuretico (ADH). L'azione dell'ADH consiste nel rendere permeabili all'acqua le pareti di questi ultimi tratti.

Il glucosio è riassorbito a livello del tubulo contorto prossimale mediante un meccanismo attivo espletato da un trasportatore che richiede ATP e Na^+, che viene inibito dall'azione competitiva della florizina. Tale trasporto è a saturazione e la soglia è di 170÷180 mg/dL. Quantità superiori di glucosio non vengono riassorbite e vengono perse con le urine (glicosuria diabetica). In alcuni casi, su base congenita, esiste un difetto del riassorbimento del glucosio, che viene eliminato anche con livelli di glicemia fisiologici (glicosuria renale).

Gli aminoacidi sono riassorbiti a livello del tubulo contorto prossimale mediante l'azione di quattro carrier distinti, uno per gli amminoacidi basici e la cisteina, uno per gli amminoacidi neutri, uno per gli amminoacidi acidi e l'ultimo per la glicina.

Un'altra funzione importante del rene consiste nella regolazione del pH ematico mediante tre distinti meccanismi: riassorbimento dello ione HCO_3^-, escrezione di protoni sotto forma di $H_2PO_4^-$ e di NH_4^+.

Si riportano brevemente alcune tra le affezioni renali più diffuse ed il loro comportamento dal punto di vista biochimico.

La ***glomerulonefrite acuta*** è una affezione di natura infiammatoria riguardante sia i glomeruli che il parenchima nella forma diffusa con fenomeni di degenerazione dei tubuli. Le infezioni da streptococco β-emolitico sono tra le cause più frequenti. Dal punto di vista laboratoristico, l'emissione delle urine, di colore rosso intenso, è scarsa (oliguria). Il peso specifico delle urine (PS) è elevato, vi sono modesta proteinuria, presenza nel sedimento di emazie, leucociti, cilindri ialini, granulosi ed ematici. I valori ematici mostrano un aumento lieve di urea e di creatinina. Ridotte le clearance dell'urea e della creatinina. Aumentano anche VES e titolo antistreptolisinico.

La ***glomerulonefrite cronica*** è l'esito finale di una forma acuta che non ha presentato il decorso di guarigione. I glomeruli sono trasformati in masserelle fibro-ialine. Gli esami di laboratorio mostrano oliguria con PS basso, proteinuria, presenza nel sedimento di emazie, leucociti, cilindri ialini, raramente granulosi. I valori ematici mostrano un aumento marcato di urea, di creatinina. Riduzione delle clearance.

La ***pielonefrite*** è un processo infiammatorio che interessa le pelvi e il tessuto interstiziale dei reni, causato da batteri non specifici. Può degenerare in grave insufficienza renale cronica. Fondamentale analisi di laboratorio è l'urinocoltura. Le urine mostrano piuria, proteinuria, abbondante perdita di bicarbonato con conseguente stato di acidosi. Le clearances della creatinina e dell'urea sono normali o lievemente diminuite.

La ***sindrome nefrosica*** è un quadro morboso ad eziologia varia con proteinuria elevata, edemi generalizzati, ipoproteinemia, iperlipidemia e ipercolesterolemia. Conseguentemente alla iperlipidemia e ipercolesterolemia le urine presentano gocce lipidiche e cristalli di colesterolo.

La ***nefrosclerosi arteriolare*** è una patologia caratterizzata dalla sclerosi delle arteriole dei reni. L'esordio della malattia è caratterizzato solamente da ipertensione: dopo diversi anni compaiono segni di sofferenza renale con poliuria, proteinuria modesta, cilindruria. Il quadro si aggrava nel tempo con aumento dell'azotemia.

Le ***nefropatie tubulari*** (***tubulopatie***) possono essere congenite o acquisite. Le congenite si manifestano nei primi anni di vita, e sono patologie legate al mancato riassorbimento di una o più sostanze, come la glicosuria renale con glicemia normale, il diabete insipido renale causato dall'insensibilità del tubulo distale e del dotto collettore all'azione dell'ADH, l'ipercalciuria idiopatica con calciuria normale, la cistinuria con cistinemia normale, glicinuria, il pseudoipoparatiroidismo, il diabete fosfaturico, l'acidosi tubulare renale idiopatica. Fra le tubulopatie congenite con difetto multiplo va ricordata la sindrome di Fanconi, De Toni, Debrè, caratterizzata da glicosuria, aumento della fosfaturia, aminoaciduria. I livelli ematici degli analiti sono normali per il glucosio, diminuiti per i fosfati e i bicarbonati, aumentati per i cloruri.

Una tubulopatia acquisita può conseguire ad una pielonefrite. Si manifesta con poliuria con ipostenuria, accompagnata talvolta da acidosi renale, perdita abbondante di sodio, e può degenerare fino a necrosi tubulare acuta.

Nell'***insufficienza renale acuta*** gli esami di laboratorio mostrano valori aumentati dell'azotemia e della creatininemia, oliguria o anuria. Le urine sono isostenuriche. Vi è la presenza di modesta proteinuria, emoglobina nelle forme da emolisi intravascolare, emazie, cilindri ialino-granulosi. Le clearance diminuite. I valori di azoto e creatinina sierici sono molto elevati, il sodio è diminuito per iperdiluizione, mentre sono aumenti il potassio, il magnesio e i fosfati. La diminuzione di bicarbonati può portare ad uno stato di acidosi scompensata.

L'***insufficienza renale cronica*** insorge per una graduale e progressiva riduzione della funzionalità renale, generalmente come conseguenza di glomerulonefrite, pielonefrite o nefrosclerosi arteriolare. Fra i sintomi ricordiamo la poliuria con isostenuria come forma compensativa iniziale. Il progredire della malattia si manifesta con il passaggio a poliuria. Azotemia e creatininemia aumentano, diminuisce il sodio, mentre aumenta il potassio. Nelle fasi più avanzate

si instaura anche una ipocalcemia. All'insufficienza renale segue la ridotta produzione di eritropoietina con conseguente anemia. L'uremia aumenta fino all'insorgere del coma.

L'***esame chimico–fisico delle urine*** è l'indagine più comune. Nella tabella che segue sono presentati gli intervalli di riferimento e le possibili alterazioni patologiche.

Parametro	***Valori di riferimento***	***Patologie associate a valori anomali***
Volume	800 ÷ 1800	<500 diminuita filtrazione glomerulare (oliguria), insufficienza renale acuta (anuria); >2000 patologie associate all'impossibilità di concentrare i soluti (poliuria), diuresi osmotica (diabete)
Colore	Giallo paglierino	tonalità diverse indicano la presenza di sostanze coloranti (es. rosso per la presenza di emoglobina)
Aspetto	limpido	torbido per la presenza di batteri, proteine, cellule, cristalli
PS	1,010 ÷ 1,030	nefropatie con ipostenuria ed isostenuria
pH	5,5 ÷ 6,5	
Glucosio	<150 mg/L	diabete, abbassamento della soglia renale, tubulopatie
Proteinuria	< 0,5 g/L	0,5 g/L (proteinuria minima) nelle glomerulonefriti croniche, rene policistico, malattie tubulari, calcolosi renale; 0,5 ÷ 4 g/L (proteinuria moderata) nelle glomerulonefrite acuta, sindrome nefrosica, LES, glomerulonefrite cronica, nefrosclerosi, pielonefrite con ipertensione, mielosa multiplo, nefropatia diabetica; >4 g/L (proteinuria grave) nella sindrome nefrosica, LES, glomerulonefrite acuta.
Hb	Assente	nefropatie di varia natura
Urobilinogeno		aumentato nell'ittero emolitico e nell'ittero epatotossico, assente nell'ittero da occlusione delle vie biliari
Emazie	< 2000/min	nefropatie di varia natura
Leucociti	Assenti	processi infiammatori
Cilindri	Assenti	nefropatie
Cristalli	Assenti	fra i vari cristalli merita attenzione la cistina

La ***clearance*** consente di valutare la funzionalità renale, e indica la capacità del rene di purificare il plasma da certe sostanze. La clearance di una sostanza è la quantità di plasma (in mL) che viene depurata di quella sostanza nell'unità di tempo (1 minuto). La clearance di una sostanza è calcolata come:

$$C = \frac{UV}{P}$$

dove: C è il valore della clearance in mL/min
U è la concentrazione della sostanza nelle urine
V è il volume raccolto nel tempo ed è espresso in mL/min
P è la concentrazione della sostanza nel siero o plasma

Gli intervalli di riferimento sono definiti per adulti che abbiano peso e altezza nei limiti normali con superficie corporea media di 1,73 m^2. Se la superficie corporea differisce sensibilmente, la formula della clearance necessita di un fattore di correzione

$$C = \frac{UV}{P} \cdot \frac{1{,}73}{A}$$

dove A è la superficie corporea in m^2.

Per calcolare la superficie corporea si può utilizzare la formula di Dubois e Dubois:

$$A = \frac{H^{0{,}725} \cdot W^{0{,}425} \cdot 71{,}84}{10.000}$$

essendo rispettivamente H l'altezza in cm e W il peso in kg.

La sostanza ideale per misurare la clearance è quella che viene filtrata dal glomerulo e non viene più riassorbita nel tubulo. Una di queste sostanze è l'inulina, un polisaccaride formato da D-fruttosio. Tuttavia, la clearance dell'inulina presenta problemi tecnici dovuti al fatto che è una sostanza esogena e che quindi deve essere somministrata a velocità costante per infusione venosa. Nella pratica quotidiana si usa la clearance della creatinina. La creatinina è l'anidride interna della creatina e mostra come caratteristica quella di avere una escrezione costante. Nella prima fase dell'insufficienza renale, la clearance della creatinina aumenta nei soggetti che mostrano valori di cretininemia nell'intervallo di riferimento. Valori di riferimento della clearance della creatinina sono: negli uomini 105 ± 20 mL/min, nelle donne 97 ± 20 mL/min.

Per quanto concerne l'***elettroforesi delle proteine urinarie***, va ricordato che la maggior parte delle proteine urinarie, tranne la proteina di Tamm-Horsfall ed alcuni enzimi, è di origine plasmatica. La filtrazione delle proteine a livello del glomerulo dipende da diversi fattori: il PM (proteine con PM superiore a quello dell'albumina non vengono filtrate), la carica elettrica, la conformazione e la concentrazione sierica. Le proteine a basso PM vengono riassorbite a livello del tubulo contorto prossimale.

Un ***aumento della permeabilità glomerulare*** si manifesta come aumento delle proteine di PM crescente al crescere del danno. Un ***difetto nel riassorbimento tubulare*** si manifesta invece

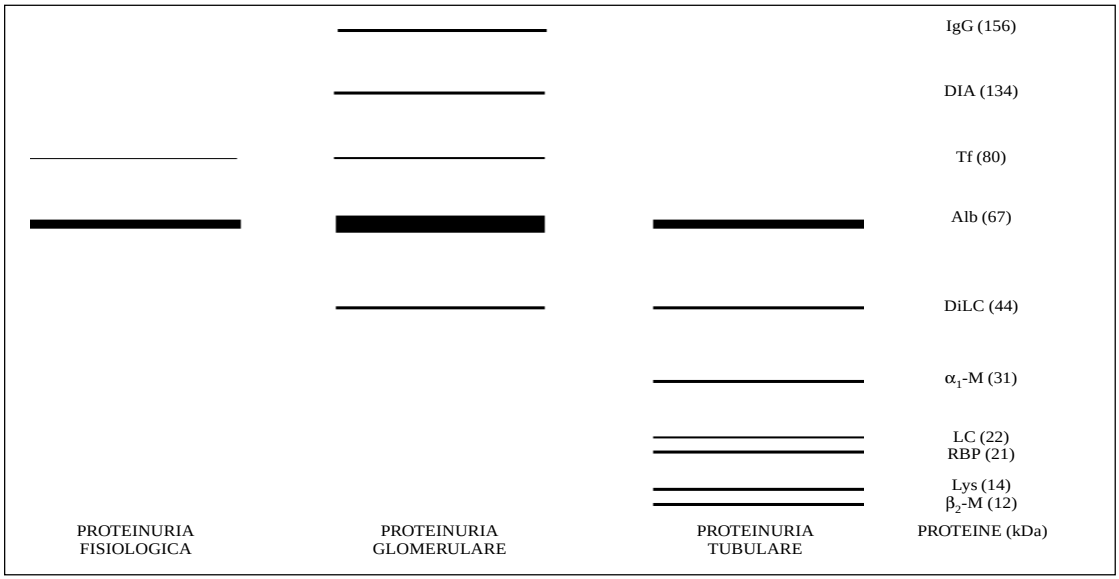
con un aumento delle proteine a basso PM. Un terzo meccanismo, quello dell'***iperafflusso*** (overflow), si manifesta quando una proteina del siero è presente in concentrazioni elevate. In tal caso aumenta la possibilità di filtraggio glomerulare se si tratta di proteine ad alto PM oppure, nel caso di proteine a basso PM, si supera la capacità di riassorbimento tubulare per le microglobuline (come nella proteinuria di Bence Jones).

Con l'elettroforesi zonale è difficile riconoscere la presenza delle microglobuline per due diversi motivi. In primo luogo perché sono poco concentrate nelle urine, in secondo luogo perché, in caso di proteinuria mista, la loro migrazione elettroforetica si sovrappone a quella delle proteine ad alto PM. Il problema può essere ovviato dalla tecnica dell'immunofissazione con antisieri anti-microglobuline.

La tecnica elettroforetica in SDS-PAGE separa, invece, le proteine in base al loro PM, rendendo semplice l'interpretazione (vedi figura). I sistemi di rivelazione utilizzabili sono quelli ad alta sensibilità, uno dei quali è l'oro colloidale. Questo colorante ha una sensibilità di 6 mg/L contro i 75 mg/L del Blu di Coomassie. La sensibilità può abbassarsi fino a 0,6 mg/L nel caso di immunofissazioni con colorante oro colloidale.

La tecnica elettiva per la ricerca e la tipizzazione della proteinuria di Bence-Jones è rappresentata dall'immunofissazione.

Distribuzione delle proteine urinarie in SDS-PAGE[4]



[4]*DIA = dimero dell'albumina, Tf = transferrina, Alb = albumina, DiLC = dimero di catene leggere, α_1-M = α_1-microglobulina, LC = monomero di catene leggere, RBP = proteina legante il retinolo, Lys = lisozima, β_2-M = β_2-microglobulina.*

Marcatori del danno pancreatico

Gli enzimi pancreatici digeriscono le proteine mediante l'azione di enzimi proteolitici come tripsina, chimotripsina, aminopeptidasi, carbossipeptidasi e collagenasi; riducono i polisaccaridi in disaccaridi mediante l'amilasi; trasformano i trigliceridi in di- e monogliceridi, glicerolo e acidi grassi liberi per mezzo della lipasi. La maggior parte degli enzimi è secreta in forma inattiva (zimogeni), attivati in seguito al contatto con la mucosa intestinale.

Nella ***pancreatite acuta*** di estrema importanza è il dosaggio dell'***amilasi*** e della ***lipasi***. L'amilasi sierica aumenta rapidamente in poche ore ritornando a livelli basali entro 2÷3 giorni dall'esordio della patologia. L'amilasi urinaria aumenta tardivamente rispetto a quella sierica (2÷4 giorni dopo la sintomatologia dolorosa) e ritorna a valori basali solo dopo 8÷10 giorni. La sua misura è utile anche per escludere un aumento dell'attività dell'amilasi sierica dovuto ad insufficienza renale o a macroamilasemia. La lipasi sierica aumenta con un certo ritardo rispetto all'amilasi e rimane elevata per oltre 15 giorni, consentendo così di diagnosticare la malattia anche dopo l'attacco acuto. Nel plasma compare anche la *metaemalbumina*, albumina legante eme ossidato proveniente dalla demolizione dell'emoglobina.

Nella ***pancreatite cronica*** l'indagine laboratoristica mediante dosaggio dell'attività sierica ed urinaria dell'amilasi e della lipasi ha poco valore diagnostico, in quanto questi enzimi rimangono nell'intervallo di riferimento. Utile è invece la determinazione della ***steatorrea*** (grassi nelle feci). Nelle pancreatiti croniche è possibile osservare la diminuzione dell'attività sierica del tripsinogeno e dell'isoenzima pancreatico dell'amilasi. Solo le prove di stimolazione del pancreas permettono di evidenziare anche le forme leggere di pancreatite cronica. La prova di stimolazione più utilizzata è quella con la secretina, un polipeptide di 27 aminoacidi.

Marcatori del ricambio osseo[5]

L'osso è un tessuto metabolicamente molto attivo, nel quale i processi di formazione e riassorbimento sono continui per tutta la vita. Il tessuto osseo è costituito da ***cellule*** e da una matrice extracellulare comprendente sia una ***componente organica*** (il 35%, principalmente, *collagene di tipo I*) sia una ***componente inorganica*** (il 65%, principalmente *calcio* (*Ca*) e *fosfato* (*P*) sotto forma di *cristalli di idrossiapatite*).

Due sono i tipi di *cellule* ossee:

➢ gli ***osteoblasti***, che sono cellule di origine mesenchimale. Sono ricchi di piridossalfosfato,

[5]*Si ringraziano la Dott.ssa Benedetta Cavanna e il Dott. Luca Massaccesi, che hanno fornito il materiale per la stesura di questo parte del capitolo.*

sintetizzano il collagene di tipo I e l'osteocalcina. Inoltre sono provvisti di recettori per il paratormone;

- gli ***osteoclasti***, che fanno parte della famiglia dei monociti/macrofagi, e quindi derivano dal midollo osseo. I precursori mononucleati si fondono ed originano cellule giganti multinucleate aventi da 2 a molte centinaia di nuclei. Sono ricchi di mitocondri e di lisosomi (proprio a dimostrazione della loro attività catabolica) ed hanno un gran numero di recettori per la calcitonina. Presentano una caratteristica polarizzazione in senso basale-apicale con un bordo superiore assai frastagliato con ripiegamenti multipli. Tra i loro enzimi lisosomiali ricordiamo la fosfatasi acida.

Per quanto concerne la *componente organica*, il ***collagene di tipo I*** rappresenta circa il 90% della matrice organica ossea. È una struttura a tripla elica fatta da tre catene, ricche di prolina e idrossiprolina. Il collagene viene sintetizzato come precursore avente una lunga serie di amminoacidi amminoterminali e carbossiterminali. Queste estensioni verranno poi clivate durante i processi di secrezione e formazione.

Per quanto concerne la *componente inorganica*, l'entrata e l'uscita degli ioni Ca e P nella fase minerale dell'osso sono sotto il controllo di 3 differenti ormoni.

- il ***paratormone (PTH)*** regola il livello di calcio ionizzato nei liquidi extracellulari in 3 modi: (i) ne fa aumentare il riassorbimento osseo, (ii) ne fa aumentare il riassorbimento nei tubuli renali, (iii) ne fa aumentare il riassorbimento a livello intestinale favorendo la trasformazione della vitamina D nel suo derivato attivo $1,25(OH)_2D3$;
- la ***vitamina D*** si forma nella cute grazie alla conversione del 7-deidrocolesterolo in vitamina D3 o colecalciferolo (CC) che verrà idrossilato a 25 OH nel fegato e poi, nel rene, passerà a calcitriolo (1,25 OH). Il calcitriolo è un potentissimo stimolatore dell'assorbimento del calcio e del fosfato a livello intestinale. In condizioni normali il calcitriolo promuove la crescita ossea e la formazione di osso fornendo adeguati livelli di minerale. Se però l'assunzione con la dieta è insufficiente il calcitriolo agisce direttamente sullo scheletro promuovendo il riassorbimento di Ca e P;
- la ***calcitonina*** inibisce il riassorbimento di Ca dall'osso, riducendo di conseguenza la concentrazione di Ca nel siero; diminuisce l'escrezione fecale di Ca ed esercita, analogamente al PTH, un effetto fosfaturico.

L'osteoporosi affligge approssimativamente metà delle donne e un quarto degli uomini sopra i cinquant'anni, per un costo stimato di oltre 10 miliardi di dollari nei soli Stati Uniti. Dal momento che l'età media della popolazione è in aumento, la diagnosi, il trattamento ed il monitoraggio dell'osteoporosi e di altre malattie metaboliche dell'osso diventeranno temi sempre più importanti. I marcatori ossei costituiscono un nuovo e potenzialmente rilevante strumento clinico per la diagnosi ed il monitoraggio del metabolismo osseo, essendo *non invasivi*, *poco*

costosi, e dando *risposte molto più rapide* rispetto allo strumento diagnostico classico, cioè la mineralometria a raggi X. La densità minerale ossea impiega infatti 2 o 3 anni per mostrare variazioni significative, per esempio in risposta ad una terapia anti-riassorbitiva. I marcatori ossei segnalano invece molto più velocemente eventuali cambiamenti: entro 1÷3 mesi per i marcatori di riassorbimento ed entro 6÷9 mesi per i marcatori di formazione.

I marcatori ossei riflettono i meccanismi fisiopatologici della malattia dell'osso. Sono generalmente aumentati in pazienti con malattie in cui il turnover osseo è aumentato come il Morbo di Paget, l'iperparatiroidismo o l'ipotiroidismo. Diminuiscono invece in quei pazienti in cui il turnover è rallentato, come l'ipotiroidismo o l'ipopituitarismo.

Tra i ***marcatori di formazione*** dell'osso vanno ricordati:

- la ***fosfatasi alcalina ossea***: questo marcatore aumenta solitamente in quei disordini primitivamente associati ad un'aumentata velocità di formazione dell'osso, come il morbo di Paget, l'iperparatiroidismo, l'osteomalacia, il rachitismo ed il carcinoma metastatico. Aumenti minori sono presenti in altre condizioni che comprendono l'osteoporosi, l'ipertiroidismo, le epatopatie croniche e l'insufficienza renale cronica. I metodi immunologici attualmente disponibili per il dosaggio della ALP ossea sono stati approvati dalla FDA per l'utilizzo nel monitoraggio del morbo di Paget. Tuttavia un test è stato utilizzato con successo per il monitoraggio della terapia con bisfosfonati dell'osteoporosi. Gli studi clinici dimostrano che la ALP ossea è un indicatore sensibile ed affidabile del metabolismo osseo. In generale i dosaggi dei marcatori su siero sono meno influenzati dalla variabilità diurna e biologica rispetto ai dosaggi effettuati sulle urine; inoltre l'emivita di questo enzima è relativamente lunga e questo probabilmente contribuisce alla bassa variazione diurna che è stata segnalata per la ALP ossea. L'utilità del dosaggio della ALP per valutare la risposta alla terapia anti-riassorbitiva è stata ben documentata in corso di morbo di Paget. Questa malattia viene frequentemente trattata con bisfosfonati e calcitonina, con successivo monitoraggio della risposta biochimica utilizzando la determinazione della ALP totale. Nei casi meno gravi, dove è necessario un dosaggio più sensibile e specifico, la ALP ossea si è dimostrata più efficace. Ci sono dati incoraggianti anche per quanto riguarda l'utilizzo di questo marcatore nel valutare il rischio di fratture indipendentemente dalla densità minerale ossea. Benché siano necessari ulteriori studi di conferma, questi risultati suggeriscono la possibilità che l'ALP ossea possa essere un test complementare alla mineralometria a raggi X per donne che si trovano di fronte a una importante decisione circa le cure e le terapie da intraprendere quando raggiungono la menopausa;
- l'***osteocalcina***: dal momento che i dosaggi immunologici per l'osteocalcina utilizzano l'osteocalcina bovina come standard e la processazione metabolica della proteina rilasciata in circolo produce frammenti con epitopi molto diversi fra loro, si assiste ad una grossa

discrepanza nel riconoscere queste forme molecolari da parte dei vari tipi di dosaggio disponibili. L'applicazione dei dosaggi dell'osteocalcina nella pratica clinica di routine è stata quindi ostacolata a causa di questa grossa variabilità nei risultati. In base alle conoscenze attuali sulla sintesi ed il catabolismo dell'osteocalcina si può affermare che il dosaggio della molecola intatta insieme ad un grande frammento N-terminale ed intermedio della molecola fornisce la valutazione più accurata di formazione ossea. Un importante problema non ancora del tutto chiarito è la possibilità che il riassorbimento osteoclastico contribuisca alle specie immunoreattive dell'osteocalcina che sono individuate da alcuni dosaggi. In generale, i livelli sierici di osteocalcina sono elevati nei pazienti con malattie caratterizzate da elevato turnover osseo, come l'iperparatiroidismo primario e secondario, l'ipertiroidismo e l'acromegalia. Il morbo di Paget rappresenta un'eccezione in quanto l'ALP (sia totale che ossea) è un predittore migliore della gravità della malattia rispetto all'osteocalcina. La proteina diminuisce nell'ipotiroidismo, nell'ipoparatiroidismo, nei pazienti trattati con corticosteroidi ed in alcuni pazienti affetti da mieloma e ipercalcemia maligna. Riflette inoltre i cambiamenti attesi nella formazione dell'osso dopo interventi terapeutici o chirurgici;

- i ***peptidi di estensione del procollagene 1 (PINP, PICP)***: sono stati sviluppati dosaggi immunologici per entrambi i marcatori. Per quanto riguarda il PINP la concentrazione può variare anche di 100 volte secondo il metodo utilizzato, fatto che sembra indicare una probabile eterogeneità delle forme circolanti di PINP. Nonostante il PINP correli con l'osteocalcina sierica e con la fosfatasi alcalina, è generalmente meno sensibile di questi altri due marcatori nell'evidenziare anormalità nel turnover osseo. Il PICP sierico è debolmente correlato con la formazione ossea misurata istomorfometricamente (valori di r da 0,36 a 0,5) in pazienti con osteoporosi. La menopausa induce un significativo ma marginale (20%) aumento nel PICP, che però non correla con il successivo tasso di perdita di massa ossea misurato in densitometria.

Tra i ***marcatori di riassorbimento*** dell'osso vanno ricordati:

- la ***fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP)***: si possono trovare valori elevati in diverse malattie metaboliche dell'osso in cui il turnover è aumentato e nell'osteoporosi vertebrale Tuttavia, la scarsa specificità della TRAP plasmatica per l'attività osteoclastica, la sua instabilità in campioni congelati e la presenza di enzimi inibitori nel siero, hanno notevolmente limitato l'utilizzo clinico di questo marcatore. I dati presenti in letteratura indicano che la caratterizzazione di questo enzima è ancora largamente incompleta. Ciò potrebbe essere dovuto a difficoltà analitiche non ancora risolte e al fatto che l'enzima è rilasciato a livello del microambiente creato dagli osteoclasti, piuttosto che direttamente in circolo. In conclusione, ulteriori studi sono necessari per migliorare le prestazioni analitiche dei dosaggi e per valutare l'effettiva utilità di questo marcatore nel monitoraggio del metabolismo osseo;

- l'***idrossiprolina***: per molti anni la misura dell'idrossiprolina urinaria è stata considerata il dosaggio standard per determinare il riassorbimento osseo. Tuttavia la mancanza di tessuto-specificità rende debole la correlazione tra questo marcatore ed il riassorbimento osseo misurato mediante biopsia ossea. Valutazioni più accurate si possono ottenere utilizzando l'HPLC, anche se questo metodo non consente una facile applicabilità alla routine clinica;
- il ***telopeptide-N-terminale (NTX)***: la valutazione del telopeptide N-terminale del collagene mediante dosaggio immunologico è indicata per il controllo della terapia ormonale antiriassorbitiva nella post-menopausa, della terapia antiriassorbitiva nell'osteoporosi e nel morbo di Paget. Le caratteristiche di questo marcatore non sono ancora state completamente chiarite, invece, per quanto riguarda la predizione del rischio di frattura nei pazienti con osteoporosi e per il monitoraggio dei pazienti con iperparatiroidismo e ipertiroidismo. È stato dimostrato che l'NTX costituisce un marcatore in grado di rilevare in modo particolarmente sensibile e precoce i cambiamenti nel riassorbimento osseo che si verificano in condizioni fisiologiche, come l'inizio della menopausa, dovuti ad una diminuzione di estrogeni, o a una terapia anti-riassorbimento. I valori medi dell'NTX per le donne peri- e post-menopausa si sono dimostrati rispettivamente del 24 e del 133% più alti della media (pre-menopausa). In pazienti osteoporotiche in tarda menopausa è stato osservato addirittura un aumento del 171% rispetto alla media pre-menopausa. La semplificazione del dosaggio dell'NTX ha permesso un suo più ampio utilizzo nella pratica clinica e la realizzazione di linee guida per il medico. Un altro utilizzo potenzialmente importante del dosaggio dell'NTX è nella gestione dei pazienti con tumori. In uno studio di Demers e collaboratori è stato riportato che i valori di NTX discriminano tra pazienti con e senza metastasi ossee;
- il ***C-telopeptide (CTX)***: gli studi clinici effettuati per valutare i dosaggi del CTX si sono concentrati soprattutto sull'uso potenziale di tali marcatori per il follow-up della terapia e sull'uso prognostico per stimare il rischio di perdita ossea e di fratture osteoporotiche, sia da solo che in combinazione con le determinazioni di massa ossea. Recentemente è stato messo in commercio un dosaggio ELISA per il CTX sierico, che elimina gli inconvenienti e la variabilità dovuti alla correzione dei risultati sull'escrezione urinaria di creatinina. Per quanto riguarda il follow-up della terapia il dosaggio del CTX si è rivelato utile per definire la giusta dose di farmaco anti-riassorbimento e per prevedere la risposta del paziente alla terapia stessa. Numerosi studi confermano che le donne in post-menopausa che subiscono fratture osteoporotiche, mostrano un marcato aumento dei valori ottenuti con il dosaggio ELISA rispetto non solo ai valori pre-menopausa, ma anche rispetto a donne sane della stessa età. È stato inoltre dimostrato che i valori di base (ovvero i valori ottenuti precedentemente alla frattura) del CTX e di altri marcatori del riassorbimento osseo possono essere usati per prevedere le fratture dell'anca. Questo studio indica poi che l'aumentato riassorbimento osseo (evidenziato da elevati valori del CTX) è in grado di predire le fratture dell'anca *in-*

dipendentemente dalla bassa massa ossea. Di conseguenza, la bassa massa ossea e l'aumento del CTX sono fattori di rischio ulteriori per questo tipo di frattura; la combinazione della densità ossea e delle determinazioni del riassorbimento osseo è perciò utile per migliorare la predizione di rischio di fratture osteoporotiche;

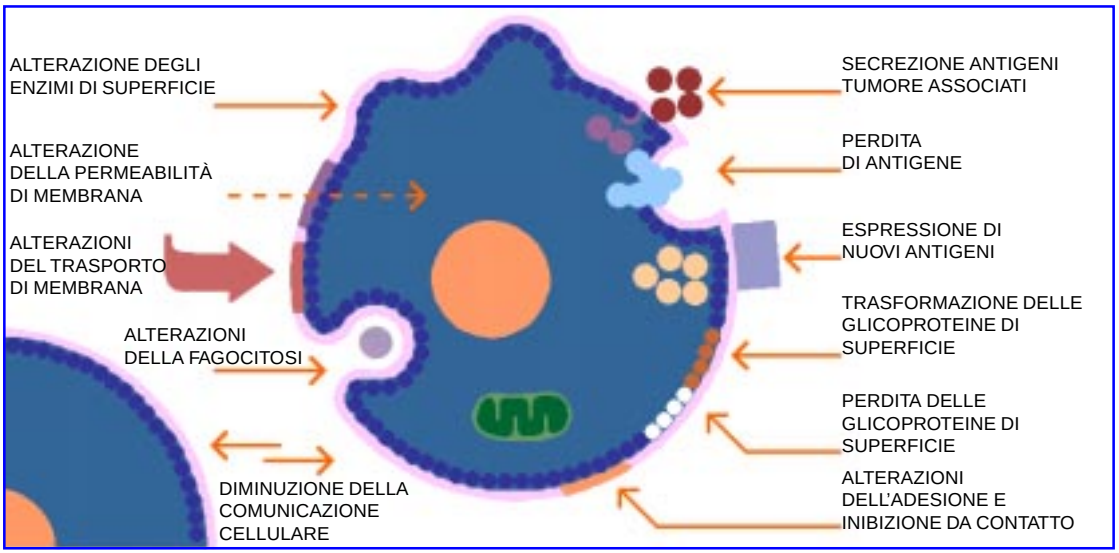
- i ***crosslink del piridinolinio (Pyr e D-Pyr)***: l'escrezione di Pyr e D-Pyr è significativamente elevata nelle malattie con un turnover osseo aumentato, soprattutto quando predomina un aumentato riassorbimento. Tali malattie includono il morbo di Paget, le osteopatie secondarie a carcinomi, l'iperparatiroidismo primario, l'osteodistrofia renale, l'osteomalacia, l'ipertiroidismo, l'ipercalcemia da immobilizzazione e l'osteoporosi. L'entità dell'aumento nell'escrezione può essere un indice della gravità della malattia. Sono stati fatti notevoli sforzi nel tentativo di definire il valore del dosaggio dei crosslink del piridinolinio nel trattamento dell'osteoporosi. Nelle donne in post-menopausa con osteoporosi si osserva un incremento significativo dei marcatori nelle urine ed è possibile dimostrare una maggiore variabilità nei valori in caso di osteoporosi rispetto alle donne normali in post-menopausa. È stata riscontrata una distribuzione bimodale dell'escrezione in donne in post-menopausa, fatto che potrebbe riflettere l'esistenza di un sottogruppo di soggetti che perdono tessuto osseo velocemente, i cosiddetti "fast loosers". I crosslink correlano negativamente con la densità minerale ossea dell'anca, della colonna vertebrale e dell'avambraccio, come dimostrato con la mineralometria a raggi X a doppia energia (DXA). In un ampio gruppo di donne anziane, l'escrezione di D-Pyr libero al di sopra del limite superiore dell'intervallo di riferimento in pre-menopausa era associata ad un rischio significativamente aumentato di fratture dell'anca. La combinazione della densità minerale ossea con il dosaggio dei crosslink può quindi migliorare la capacità di predire chi è ad elevato rischio di frattura. Infine il dosaggio dei crosslink, come osservato anche per altri marcatori, può essere utilizzato per confermare la risposta a terapie antiriassorbitive, molto prima che possa essere evidenziato un significativo cambiamento della densità minerale ossea.

Marcatori tumorali[6]

Le alterazioni che caratterizzano la cellula tumorale, illustrate nell'immagine seguente[7], trovano un loro corrispettivo sia in alterazioni morfologiche, sia in alterazioni biochimiche, che possono essere rilevate a distanza (nel sangue), misurando la concentrazione di molecole (marcatori tumorali) prodotte e liberate dalla cellula neoplastica.

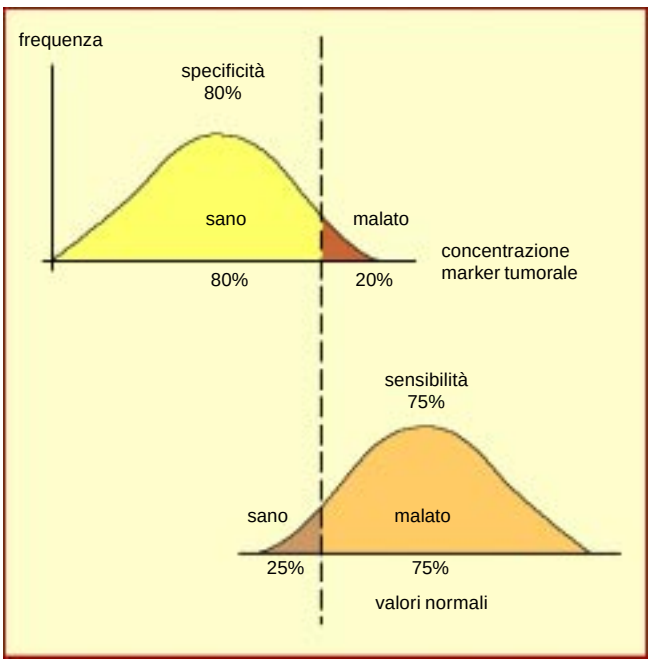
---

[6]*Si ringrazia la Dott.ssa Lucia Mascolo, che ha fornito il materiale per la stesura di questo parte del capitolo.*
[7]*Si ringrazia Abbott SpA per la concessione della riproduzione dell'immagine.*



La carenza metodologica degli studi eseguiti per la valutazione dei marcatori tumorali, condotti spesso su casistiche relativamente ridotte e retrospettive, ha portato a risultati spesso controversi.

Innanzitutto nessun marcatore tumorale è caratterizzato da sensibilità e specificità assolute. La situazione è piuttosto quella illustrata a fianco, di una parziale sovrapposizione delle distribuzioni delle concentrazioni rilevate nei soggetti sani e nei soggetti affetti da tumore. Risulta quindi fondamentale, e critica, la scelta, sulla base di un'attenta analisi statistica dei dati (analisi bayesiana) del valore soglia che consente di discriminare tra le due popolazioni.



In particolare per i marcatori mucinici non sembra esistere un'assoluta specificità d'organo. Si può solo dire che ciascun marcatore mucinico

è espresso preferenzialmente da un particolare tipo di tumore, tuttavia non è infrequente l'espressione del marcatore anche in tumori diversi da quelli dai quali è stato ottenuto l'immunogeno per ricavare l'anticorpo monoclonale. Questa caratteristica è dovuta alla biologia delle mucine e alla loro ubiquitarietà di distribuzione. Pertanto, quando si parla di marcatori tumorali di tipo mucinico, è preferibile usare il temine marcatore mucinico "preferenzialmente associato" ad una neoplasia piuttosto che marcatore mucinico "specifico" della neoplasia.

Anche per quanto riguarda marcatori tumorali tradizionalmente considerati specifici (come ad esempio il PSA e la gonodotropina corionica), il problema della specificità tessutale è un punto da rimettere in discussione. Le dimostrate produzioni ectopiche degli ormoni e degli isoenzimi e la recente descrizione di elevati livelli di PSA anche in associazione a tumori diversi da quelli prostatici, hanno contribuito ad aumentare la relatività della cosiddetta "tessuto-specificità", che comunque può essere mantenuta come indicazione generale per alcuni marcatori, ma che soffre di eccezioni sempre più numerose.

Su di un piano strettamente clinico-operativo le ***indicazioni cliniche per il dosaggio dei marcatori tumorali*** sui quali esiste un accordo sono:

- ***follow-up*** dei pazienti in seguito a trattamenti di exeresi chirurgica della neoplasia, incluso il monitoraggio delle terapie oncologiche;
- ***valutazione prognostica***.

Esiste inoltre un accordo sul fatto che ***i marcatori tumorali NON devono essere usati***, in quanto possiedono una sensibilità e una specificità troppo basse:

- ***per lo screening di popolazione asintomatica*** (fa eccezione il carcinoma midollare della tiroide, che nella forma multifocale bilaterale può avere una trasmissione ereditaria. Pertanto è indicato eseguire uno screening nei consanguinei di pazienti in cui è stato diagnosticato questo tipo di neoplasia, dosando la calcitonina in condizioni di base o dopo stimolazione con pentagastrina);
- ***per la diagnosi di tumore primitivo*** (fanno eccezione alcune neoplasie [carcinoma a piccole cellule del polmone, carcinoma midollare della tiroide, carcinoma del testicolo, carcinoma dell'ovaio, neoplasie neuroendocrine] per le quali esistono marcatori tumorali ad elevata specificità, che possono essere di aiuto nell'orientamento diagnostico).

Nella tabella a pagina seguente sono riportate le fondamentali caratteristiche dei marcatori tumorali.

Marcatore tumorale	*Sigla*	*Tipo*	*Tempo di dimezzamento nel sangue*
Antigene carcinoembrionario	CEA	Antigene tumore-associato	6÷8 giorni
Alfa-fetoproteina	AFP	Antigene tumore-associato	5÷6 giorni
Antigene polipeptidico tessutale	TPA	Frammenti solubili delle citocheratine 8, 18 e 19	4÷5 giorni
Antigene polipeptidico tessutale cyk	TPAcyk	Frammenti solubili delle citocheratine 8 e 18	ignoto
Antigene polipeptidico tessutale specifico	TPS	Frammento solubile della citocheratina 18	ignoto
Antigene CYFRA 21.1	CYFRA 21.1	Frammento solubile della citocheratina 19	ignoto
Antigene CA 125	CA 125	Mucina	5 giorni
Gastrointestinal cancer antigen	GICA, CA 19.9	Mucina	ignoto
Antigene CA 50	CA 50	Mucina	ignoto
Antigene CA 195	CA 195	Mucina	ignoto
Antigene CA 72.4	CA 72.4	Mucina	ignoto
Antigene CA 15.3	CA 15.3	Mucina	ignoto
Antigene MCA	MCA	Mucina	ignoto
Antigene CA 549	CA 549	Mucina	ignoto
Squamous cell carcinoma associated antigen	SCC	Enzima	inferiore alle 24 ore
Gonadotropina corionica umana	HCG	Ormone	14÷48 ore
Gonadotropina corionica umana, subunità beta (β)	β-HCG	Subunità ormonale	14÷48 ore
Tireoglobulina	TG	Ormone	ignoto
Calcitonina	CT	Ormone	2÷15 minuti
Fosfatasi acida prostatica	PAP	Enzima	ignoto
Antigene prostatico specifico	PSA	Enzima	2,2÷3,2 giorni
Antigene prostatico specifico, frazione libera	PSA libero	Enzima	ignoto
Enolasi specifica del neurone	NSE	Enzima	ignoto
Ferritina	Ferritina	Proteina di accumulo del ferro	ignoto
Antigene S-100	S-100	Proteina legante il calcio	ignoto

Nella seguente tabella sono riassunte le indicazioni all'utilizzo e le cause non oncologiche di aumento della concentrazione dei vari marcatori tumorali nel siero.

Marcatore umorale	***Indicazioni all'utilizzo***	***Cause non oncologiche di aumento della concentrazione nel siero***
CEA	Carcinomi del colon-retto, della mammella, del polmone, dello stomaco, del pancreas e delle vie biliari, della tiroide, dell'ovaio e dell'utero	Patologia benigna del tratto gastroenterico, del fegato, del polmone, e insufficienza renale cronica
AFP	Carcinoma del fegato, dell'ovaio e del testicolo	Epatopatie croniche, gravidanza
TPA	Carcinoma della mammella, dell'ovaio, dell'utero e della cervice, carcinoma della prostata e carcinomi gastrointestinali	Patologia benigna del tratto gastroenterico, del fegato (acuta e cronica), del pancreas, del rene, processi infiammatori acuti, traumatismi recenti
TPAcyk	Carcinoma della mammella, dell'ovaio, dell'utero e della cervice, carcinoma della prostata e carcinomi gastrointestinali	Patologia benigna del tratto gastroenterico, del fegato (acuta e cronica), del pancreas, del rene, processi infiammatori acuti, traumatismi recenti
TPS	Carcinoma della mammella, dell'ovaio, dell'utero e della cervice, carcinoma della prostata e carcinomi gastrointestinali	Patologia benigna del tratto gastroenterico, del fegato (acuta e cronica), del pancreas, del rene, processi infiammatori acuti, traumatismi recenti
CYFRA 21.1	Carcinoma della mammella, dell'ovaio, dell'utero e della cervice, carcinoma della prostata e carcinomi gastrointestinali	Epatopatie, malattie broncopolmonari croniche
CA 125	Carcinoma dell'ovaio, dell'endometrio e delle tube	Mestruazioni, cirrosi con ascite, versamenti pleurici e peritoneali, insufficienza cardiaca congestizia, polmoniti
GICA, CA 19.9	Carcinoma del pancreas, del colon-retto, dello stomaco e delle vie biliari	Ittero, patologia benigna del tratto gastroenterico, del pancreas, del fegato, della colecisti e del polmone, nefropatia diabetica, malattie reumatiche
CA 50	Carcinoma del pancreas, del colon-retto, dello stomaco e delle vie biliari	Ittero, patologia benigna del tratto gastroenterico, del pancreas, del fegato, della colecisti e del polmone, diabete mal controllato
CA 195	Carcinoma del pancreas, del colon-retto, dello stomaco e delle vie biliari	Ittero, patologia benigna del tratto gastroenterico
CA 72.4	Carcinoma dello stomaco	Ittero, patologia benigna del tratto gastroenterico
CA 15.3	Carcinoma della mammella	Epatopatie
MCA	Carcinoma della mammella	Epatopatie
CA 549	Carcinoma della mammella	Epatopatie
SCC	Carcinoma di tipo squamoso	Psoriasi, fumo
HCG	Tumori testicolari, mola vescicolare, coriocarcinoma	Gravidanza

Marcatore umorale	*Indicazioni all'utilizzo*	*Cause non oncologiche di aumento della concentrazione nel siero*
β-HCG	Tumori testicolari, mola vescicolare, coriocarcinoma	Gravidanza
TG	Carcinoma differenziato della tiroide	Patologia benigna della tiroide, fumo, agobiopsia tiroidea, insufficienza renale
CT	Neoplasie midollari della tiroide smo, morbo di Paget	Insufficienza renale cronica, iperparatiroidi-
PAP	Carcinoma prostatico	Prostatite acuta, ipertrofia prostatica benigna, ritenzione urinaria, ispezione rettale
PSA	Carcinoma prostatico	Prostatite acuta, ipertrofia prostatica benigna, ritenzione urinaria, ispezione rettale
PSA libero	Differenziazione tra carcinoma prostatico e ipertrofia prostatica benigna	Prostatite acuta, ipertrofia prostatica benigna, ritenzione urinaria, ispezione rettale
NSE	Microcitoma polmonare	Emolisi del campione
Ferritina	Leucemie acute, carcinoma epatico, linfoma di Hodgkin	Emotrasfusione e terapia marziale recente, epatopatie acute e croniche
S-100	Melanoma	Danni del sistema nervoso centrale

In definitiva la decisione di misurare un marcatore tumorale è legata direttamente alla utilità della misura, ovvero alla importanza dell'informazione ottenibile sul piano clinico, che si traduce in valutazioni prognostiche, in opportunità di monitoraggio, in anticipazioni diagnostiche, che devono ovviamente apportare un vantaggio, considerando il rapporto costi/benefici, nell'ambito delle strategie diagnostiche correnti.

Ci sono marcatori ormai entrati stabilmente nei protocolli clinici perché da tutti riconosciuti utili (ed esempio il PSA nel carcinoma prostatico, la tireoglobulina nel carcinoma tiroideo differenziato, la calcitonina nel carcinoma midollare, il CEA nel carcinoma del colon, l'AFP negli epatocarcinomi, l'HCG nei tumori trofoblastici, l'AFP e l'HCG nei tumori germinali, il CA125 nei tumori ovarici, la NSE nei microcitomi e nei neuroblastomi, alcuni peptidi e prodotti differenziati ad attività ormonale nei tumori neuroendocrini, eccetera).

Altri marcatori sono ancora in valutazione o in discussione, sia perché sovrapponibili ad altri più studiati, sia perché non esistono dimostrazioni definitive che la loro determinazione, pur essendo in grado di anticipare la diagnosi, determini vantaggi nella scelta di strategie terapeutiche efficaci o nel miglioramento della sopravvivenza (come, ad esempio, impiego del CA15-3 nei tumori mammari e dei marcatori citocheratinici nei tumori polmonari e urologici). Fatto salvo l'ovvio obbiettivo di arrivare ad un razionale utilizzo di tali test e ad una standardizzazione dei protocolli clinici che attualmente sono applicati in maniera disomogenea, nel

complesso la tendenza attuale da parte delle società scientifiche e degli esperti è quella di orientare verso un uso restrittivo dei marcatori tumorali, come è facilmente desumibile dalle indicazioni fornite dalle "Linee Guida della American Society of Clinical Oncology" (ASCO), adottate il 17 maggio 1996, per l'impiego dei marcatori tumorali nel cancro della mammella e del colon-retto, qui riassunte.

Cancro del colon-retto

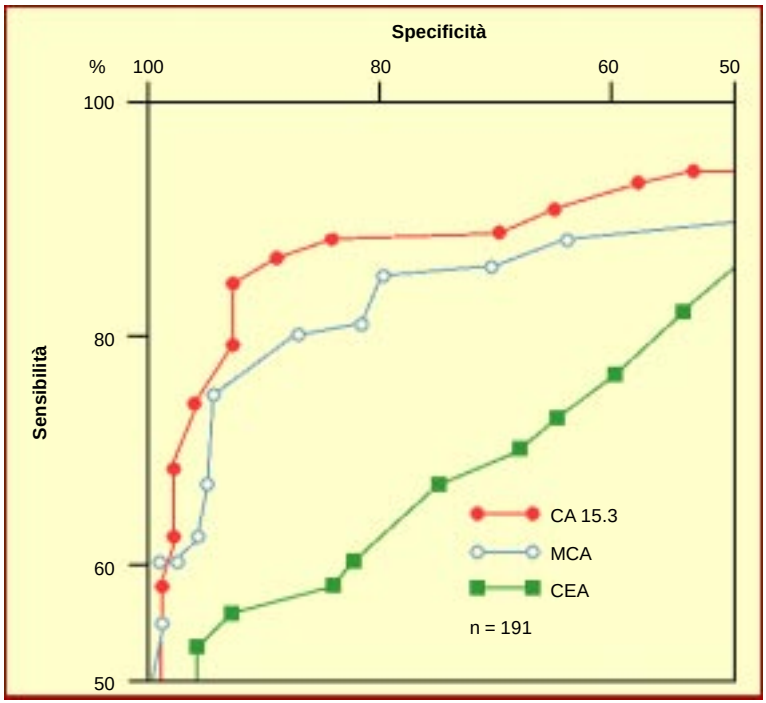
- ➢ il CEA è il marcatore di scelta per il monitoraggio del cancro del colon-retto. Non vi sono dati sufficienti per raccomandare l'utilizzo di altri test ;
- ➢ il CEA non deve essere usato nello screening del cancro del colon-retto;
- ➢ una elevata concentrazione prima dell'intervento è compatibile con una percentuale più elevata di recidiva. La misurazione del CEA prima dell'intervento può quindi orientare l'approccio chirurgico;
- ➢ il CEA non deve essere misurato immediatamente dopo l'intervento ma dopo 4÷6 settimane. Il permanere di una concentrazione elevata di CEA post-intervento rappresenta un indicatore prognostico negativo;
- ➢ il CEA va misurato dopo l'intervento ogni 2÷3 mesi per 2 o più anni nei pazienti in stadio II e III. Un aumento del CEA, se confermato, suggerisce di ricercare eventuali metastasi con altre indagini ma non giustifica l'inizio di terapia adiuvante o sistemica per sospetto di malattia metastatica;
- ➢ la riduzione della concentrazione del CEA dopo trattamento chemioterapico indica una risposta ed è associata con una maggiore sopravvivenza rispetto ai pazienti in cui il CEA non diminuisce. Si raccomanda che il CEA sia misurato ogni 2÷3 mesi; due risultati successivi al di sopra della linea di base nel corso del trattamento sono indicativi di progressione della malattia e suggeriscono l'interruzione della terapia anche in assenza di dati radiologici di conferma.

Cancro della mammella

- ➢ la determinazione dei recettori per estrogeni e progesterone è raccomandata per ogni paziente con cancro della mammella primitivo e può essere eseguita su lesioni metastatiche se i risultati possono influenzare il trattamento;
- ➢ non vi sono dati sufficienti per raccomandare il CA15.3 per lo screening, la diagnosi, la sorveglianza e il monitoraggio delle pazienti con cancro della mammella e per il monitoraggio della risposta al trattamento;
- ➢ non viene raccomandata la determinazione del CEA per lo screening, la diagnosi, la stadia-

zione e la sorveglianza delle pazienti con cancro della mammella e per il monitoraggio della risposta della malattia metastatica al trattamento;

➢ non vi sono dati sufficienti per raccomandare l'uso di altri test.



Le indicazioni fornite dalle "Linee Guida della American Society of Clinical Oncology" sono corroborate dall'immagine a lato. La curva ROC del CEA corrisponde a quella di un test con valore informativo (efficienza diagnostica) nullo nei confronti del cancro della mammella, per cui risulta giustificata con un dato oggettivo l'affermazione per cui "non viene raccomandata la determinazione del CEA per lo screening, la diagnosi, la stadiazione e la sorveglianza delle pazienti con cancro della mammella e per il monitoraggio della risposta della malattia metastatica al trattamento". A sua volta la curva ROC del CCA 15.3 corrisponde a quella di un test con valore informativo talmente scarso da giustificare l'affermazione successiva per cui "non vi sono dati sufficienti per raccomandare il CA15.3 per lo screening, la diagnosi, la sorveglianza e il monitoraggio delle pazienti con cancro della mammella e per il monitoraggio della risposta al trattamento".

Elettroforesi delle sieroproteine

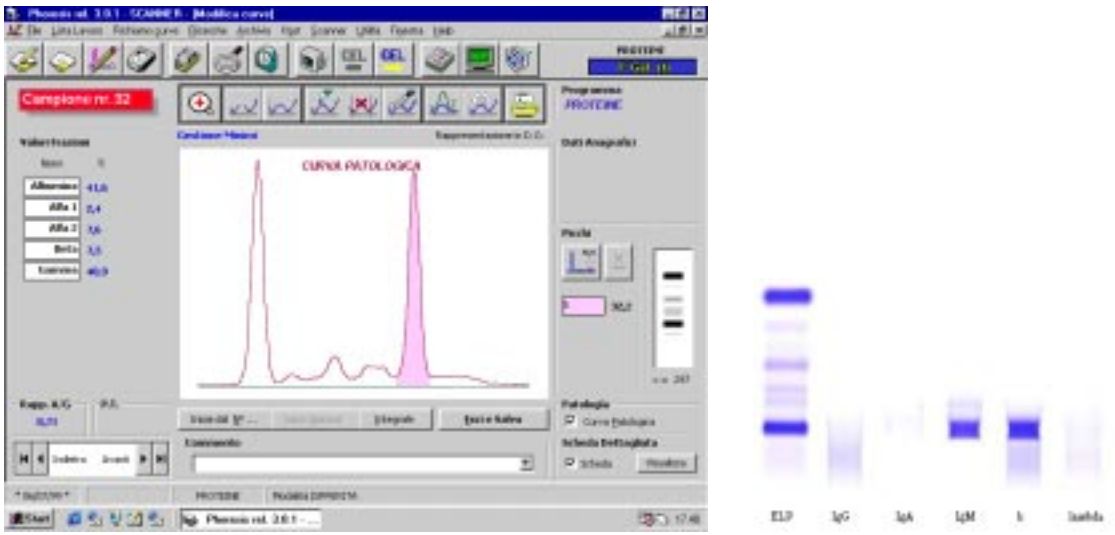
L'elettroforesi delle sieroproteine consente di separare le proteine del siero in base alla loro carica elettrica netta. Le proteine separate ed evidenziate mediante una colorazione specifica si distribuiscono a formare un tracciato a bande omogenee denominate albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gamma. Ogni banda contiene a sua volta una o più sieroproteine. Poiché il dosaggio delle singole proteine del siero viene eseguito con tecniche spettrofotometriche o nefelometriche, attualmente il principale impiego dell'elettroforesi è quello della ricerca di componenti

monoclonali (CM). I risultati dell'elettroforesi sono espressi sia in termini quantitativi sia in termini descrittivi. I ***risultati quantitativi*** riguardano la determinazione in percentuale delle cinque frazioni. Gli intervalli di riferimento sono riportati nella seguente tabella.

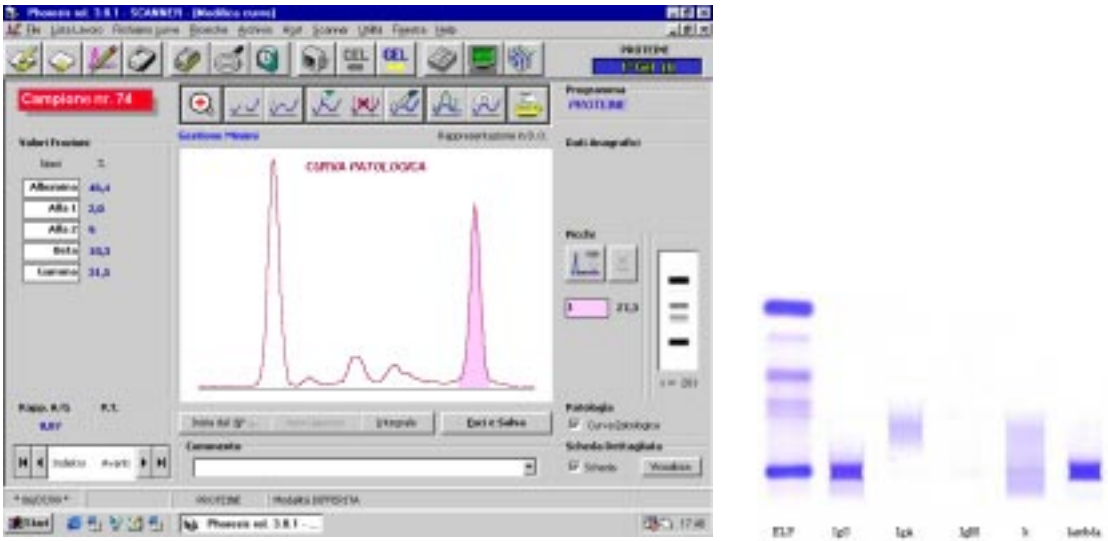
Albumina	52,0 ÷ 69,0%
Alfa-1	1,0 ÷ 6,0%
Alfa-2	4,5 ÷ 14,0%
Beta	7,0 ÷ 14,0%
Gamma	9,0 ÷ 20,0%
Rapporto albumina/globuline	1,22 ÷ 2,23

La ***parte descrittiva*** riguarda la segnalazione di bande anomale, principalmente dovute alla presenza di componenti monoclonali. Tale ricerca viene eseguita mediante ispezione visiva, come raccomandato dalla SIBioC (Società Italiana di Biochimica Clinica e di Biologia Molecolare Clinica). In tal modo è possibile apprezzare anche la presenza di lievi bande monoclonali in zona gamma, presumibilmente di tipo MGUS (gammopatie monoclonali di significato incerto) ma comunque degne di nota, non osservabili sul tracciato densitometrico. La conferma o l'esclusione di una componente monoclonale si ottiene solo con la tecnica denominata "immunofissazione", che combina la migrazione elettroforetica con la precipitazione selettiva mediante l'uso di antisieri specifici.

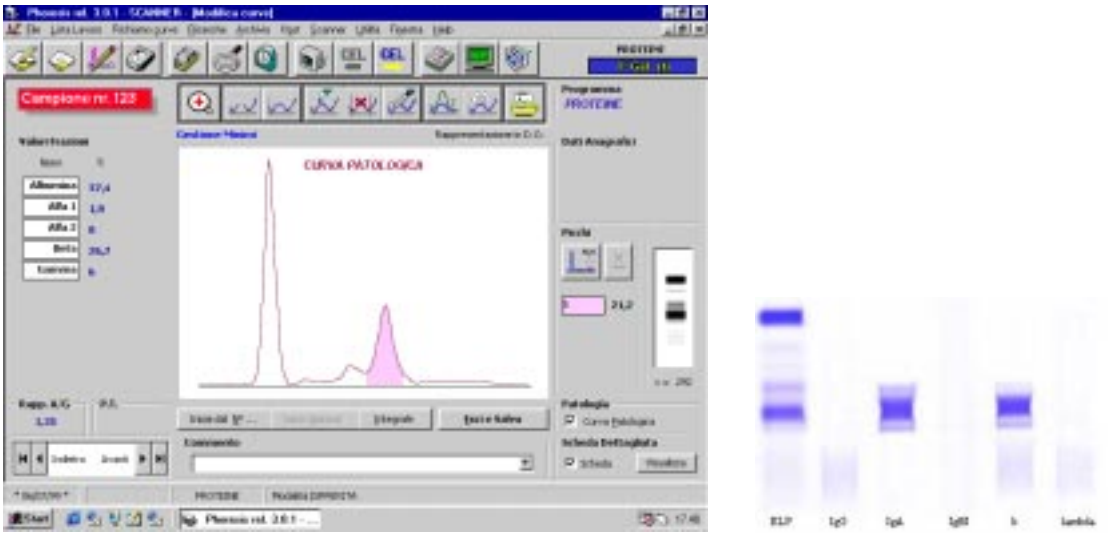
Nella figura seguente sono illustrate una elettroforesi (immagine a sinistra) e la rispettiva immunofissazione (immagine a destra) di un siero con componente monoclonale di tipo IgM con catene leggere di tipo kappa, che migra nella zona delle beta-globuline.



Nella figura seguente sono illustrate una elettroforesi (immagine a sinistra) e la rispettiva immunofissazione (immagine a destra) di un siero con componente monoclonale di tipo IgG con catene leggere di tipo lambda.



Nella figura seguente infine sono illustrate una elettroforesi (immagine a sinistra) e la rispettiva immunofissazione (immagine a destra) di un siero con componente monoclonale di tipo IgA con catene leggere di tipo kappa.



Immunofissazione e componenti monoclonali

L'immunofissazione è la sola tecnica che consente di identificare e tipizzare le componenti monoclonali (CM).

Il significato da attribuire alla rilevazione di una CM è complesso e deve necessariamente sposarsi sia con la clinica del paziente al momento della rilevazione sia con il monitoraggio nel tempo della progressione della CM. Questo aspetto così delicato è da anni oggetto di studio di una commissione apposita della SIBioC (Società Italiana di Biochimica Clinica), la quale nel 1986 ha documentato il risultato di uno studio condotto per un anno in Italia, nel quale si dimostrava che allora (oggi la situazione è migliorata) il 70% dei laboratori partecipanti non era in grado di riconoscere la presenza di una "piccola" CM.

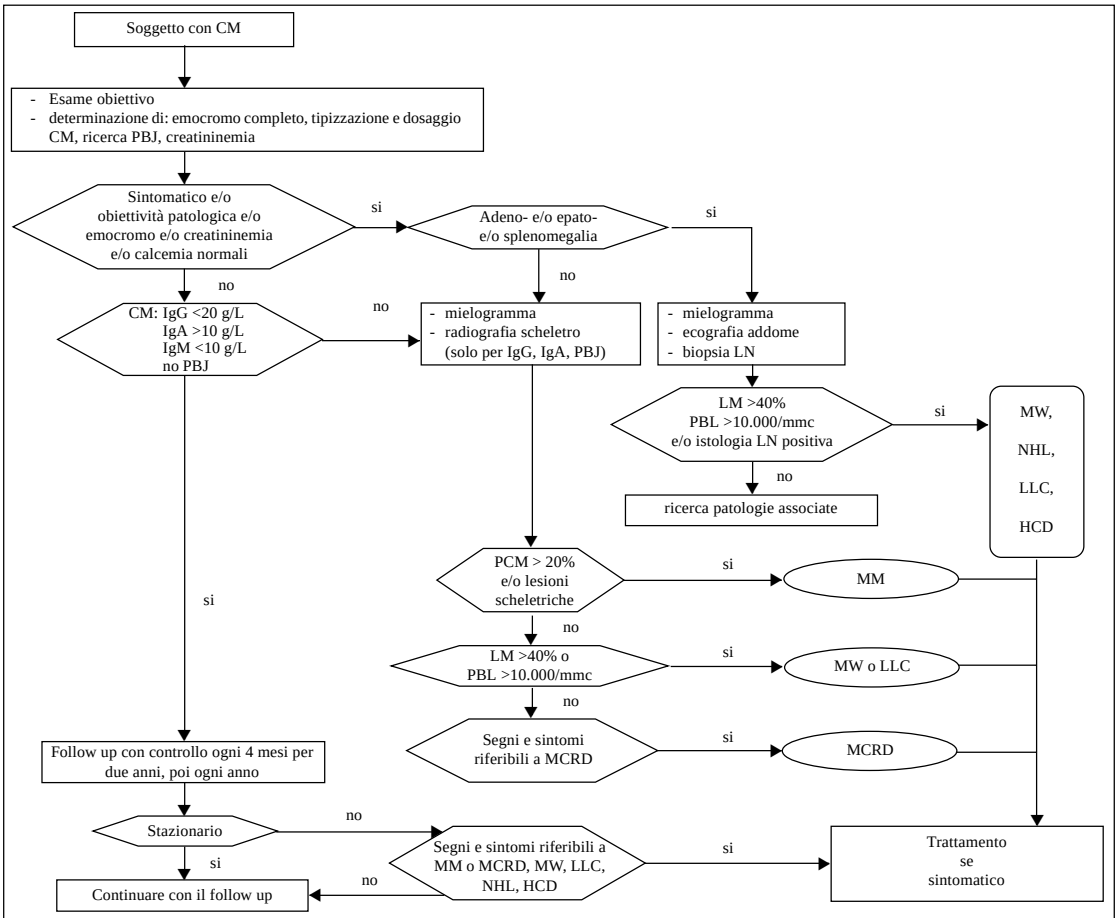
Poiché la CM è un marcatore spesso preclinico di decenni, è importante che il laboratorio utilizzi tecniche elettroforetiche estremamente sensibili nella routine quotidiana e l'immunofissazione come tecnica elettiva nella ricerca e nella tipizzazione delle CM. È importante comunque sottolineare che circa l'80% delle CM di riscontro occasionale è di modestissime dimensioni: non misurabile densitometricamente nel 59% dei casi ed inferiore a 0,5g/dL nel 19% dei casi.

Le gammopatie monoclonali possono essere associate a forme cliniche occulte (come nelle gammopatie monoclonali di incerto significato [MGUS] o nelle gammopatie monoclonali transitorie), a forme clinicamente manifeste dovute alla presenza del clone neoplastico (mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenstrøm, leucemia linfatica cronica e malattia da catene pesanti), a forme clinicamente manifeste dovute agli effetti patologici delle CM (amiloidosi, malattia da deposizione di immunoglobuline o catene leggere, systemic capillary leak syndrome). Pertanto una CM può essere indice di svariate condizioni che possono essere raggruppate in quattro categorie:

- malattie proliferative di derivazione B-linfocitaria (mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenstrøm, linfoma non-Hodgkin, leucemia linfatica cronica e malattie delle catene pesanti);
- manifestazioni cliniche dovute agli effetti patologici delle CM;
- immunodeficienze primitive o secondarie (a questo gruppo appartengono soggetti con sbilanciamento linfociti B > T dovuto all'invecchiamento del sistema immunitario, che molto probabilmente rappresentano la grande maggioranza dei soggetti con CM di piccole dimensioni di riscontro occasionale);
- gammopatie monoclonali benigne.

Attualmente non vi sono tecniche in grado di discriminare precocemente le forme benigne da quelle maligne: pertanto *la progressione clinica rimane il più valido criterio differenziale*. Alla presentazione, le CM occasionali sono tutte di "significato incerto"; dopo un iniziale pe-

riodo di follow-up (quattro anni) è possibile discriminare le forme progressive da quelle stazionarie. Va ricordato che le forme progressive, se pur clinicamente rilevanti, rappresentano solamente l'1% delle CM riscontrate occasionalmente. La parte più cospicua delle CM occasionali (circa 60-70%), è espressione del fisiologico invecchiamento del sistema immunitario con indebolimento del controllo T sulla proliferazione B. L'approfondimento diagnostico in un paziente con CM è complesso, e può essere guidato da flow-chart apposite[8], come quella proposta dalla Twelfth Annual Meeting of Society for Medical Decision (Boston 1990), che si allega a puro titolo esemplificativo della complessità del processo medico.



Legenda: CM = componente monoclonale, HCD = malattia da catene pesanti, LLC = leucemia linfatica cronica, LM = infiltrato midollare linfo-plasmacellulare, LN = linfonodi, MCRD = condizioni cliniche causate dalla CM, MM = mieloma multiplo, MW = macroglobulinemia di Waldenstrøm, NHL = linfoma non hodgkin, PBJ = proteinuria di Bence Jones, PBL = linfociti di sangue periferico, PCM = infiltrato midollare plasmacellulare.

[8]Adattata da "F. Aguzzi, G. Merlini. Aspetti clinici dell'analisi delle plasmaproteine. Milano: Beckma Analytical, 1993:193pp", per concessione degli Autori

Cenni interpretativi sulle analisi di biologia molecolare

(A. Di Blasio, S. Russo)

Diagnostica batteriologica e virologica

La diagnosi molecolare delle infezioni batteriche e virali si basa sulla identificazione del *DNA* o *RNA* specifici per i vari batteri o virus. Conseguentemente, sul referto sono riportati:

- la positività o negatività del test indicata rispettivamente dalla dizione "presente" o "assente";
- nel caso dei virus, ove possibile, la misura diretta della carica virale espressa come numero di copie del virus per mL di sangue.

Per alcuni virus, quali quello dell'*epatite C* o dell'*immunodeficienza acquisita*, in caso di positività, ha un valore prognostico la determinazione del genotipo virale, identificato mediante un numero che fa riferimento alla classificazione internazionale delle varianti geniche fin ora identificate. Il numero è generalmente seguito da una sigla alfanumerica indicante i sottotipi individuati nell'ambito di uno stesso ceppo virale.

Genetica molecolare

Il referto è in genere composto da tre sezioni che riportano nell'ordine:

- le tecniche molecolari utilizzate per l'identificazione dei difetti genetici responsabili delle differenti sindromi;
- i risultati ottenuti dai test eseguiti;
- il giudizio diagnostico che indica se il paziente risulti o meno affetto dal difetto molecolare sospettato.

È opportuno sottolineare che il risultato dei ***test molecolari*** conferma il sospetto clinico nei casi in cui vengano evidenziati i principali difetti molecolari responsabili della malattia. Tuttavia, in presenza di risultato negativo, i test attualmente eseguiti non consentono di escludere al 100% la patologia sospettata.

Nel referto diagnostico indicativo della presenza di un'alterazione genica, viene consigliata la consulenza con un Medico Genetista.

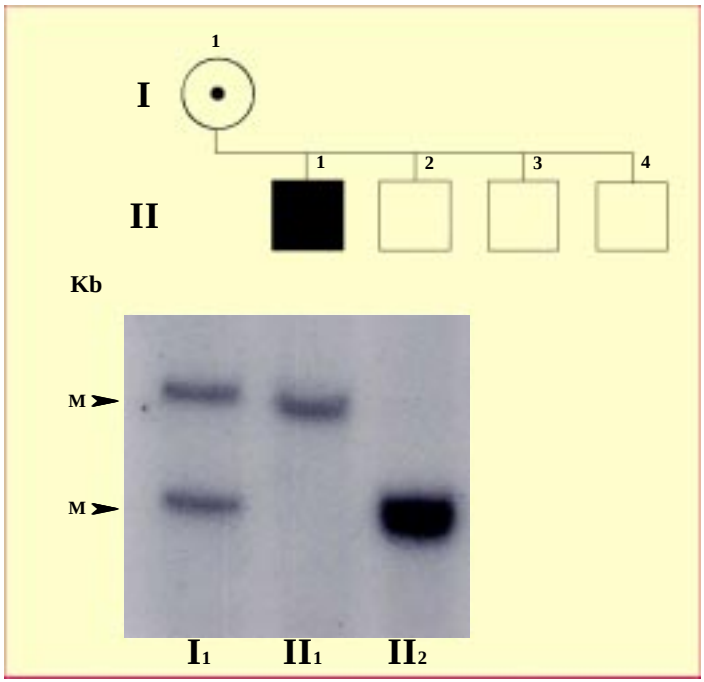
A scopo esemplificativo, si riporta l'interpretazione dei referti dei test eseguiti per alcune delle sindromi genetiche più note.

Sindrome della X fragile

L'analisi molecolare identifica il numero di ripetizioni CGG, poste entro il 5'UTR del ***gene FMR1*** (*locus FRAXA*) ed il numero di ripetizioni GGC nel 5' UTR del gene ***FMR2*** (*locus FRAXE*). Si possono distinguere 4 diversi genotipi differenziati in base al numero di ripetizioni:

- ➢ un numero di CGG compreso tra 6 e 45 (6<CGG<45) indica un genotipo nella norma;
- ➢ un numero di CGG compreso tra 46 e 60 (46< CGG<60) indica un genotipo appartenente alla "zona grigia" che corrisponde ad una condizione a rischio per lo stato di portatrice/portatore;
- ➢ un numero di CGG compreso tra 61 e 199 (61<CGG<199) indica un genotipo "premutato" che corrisponde allo stato di portatrice/trasmettitore;
- ➢ un numero di maggiore di 200 (CGG>200) indica un genotipo "fullmutato" che corrisponde alla condizione di affetto dalla sindrome.

Nella figura a lato sono riportati i risultati dell'analisi molecolare per la sindrome della X fragile. Il test molecolare permette di verificare l'espansione delle triplette ripetute del gene FMR1. Nella parte superiore dell'immagine è evidenziato l'albero genealogico della famiglia studiata; nella parte inferiore è riportato l'autoradiogramma. La paziente I_1 presenta un ***allele*** di dimensione normale (5.2 Kb) ed un allele espanso di 6.1 Kb. Il figlio affetto (II_1) ha ereditato l'allele espanso mentre il figlio sano (II_2) ha ereditato l'allele normale.



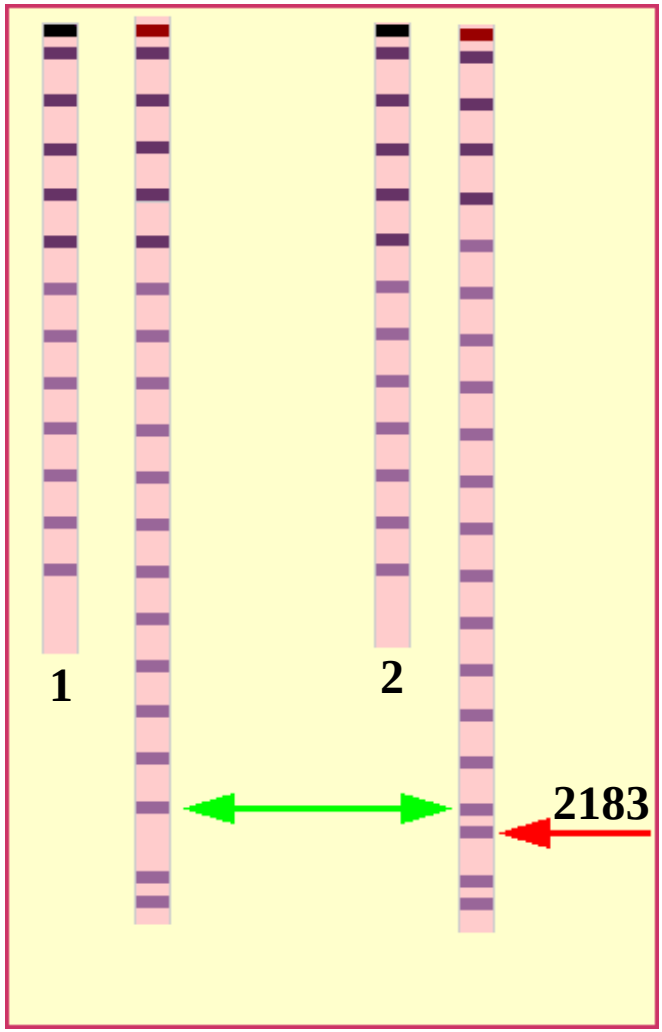
In un 20% circa di pazienti la condizione di affetto è definita da una combinazione di alleli "*premutato*" e "*fullmutato*", indicativa di un genotipo a "mosaico". I valori osservati per il numero di triplette GGC di FMR2 differiscono per i valori dei soggetti sani, variabili tra 6 e 25 GGC e della zona grigia, tra 26 e 60.

Fibrosi cistica

La malattia è dovuta a mutazioni puntiformi del ***gene CFTR***. A tutt'oggi sono state descritte più di 400 mutazioni che presentano una diversa distribuzione regionale. I test attualmente in commercio consentono di valutare la presenza di circa 30 mutazioni che permettono l'identificazione del 90% dei portatori di fibrosi cistica nella popolazione dell'Europa Occidentale.

L'esecuzione dell'indagine molecolare permette di identificare:

- l'assenza di mutazioni che indica lo stato di non portatore delle mutazioni indagate;
- la presenza di una mutazione in eterozigosi che indica lo stato di portatore sano;
- la presenza di una mutazione in omozigosi o di due mutazioni in eterozigosi che indica la condizione di affetto.



Nella figura a lato sono presentati i risultati dell'analisi molecolare per la ricerca delle mutazioni del *gene CFTR* (il gene della fibrosi cistica). Il test molecolare, eseguito con la tecnica della ***reverse dot-blot***, consente di identificare le 29 mutazioni presenti in più del 90% dei portatori nella popolazione dell'Europa Occidentale. Nel paziente numero 1 si osserva la comparsa delle sole bande corrispondenti alle sequenze normali del gene. Il paziente numero 2 risulta eterozigote per la *mutazione 2183* poiché presenta sia la banda corrispondente all'allele normale (freccia verde), sia la banda corrispondente all'allele mutato (freccia rossa).

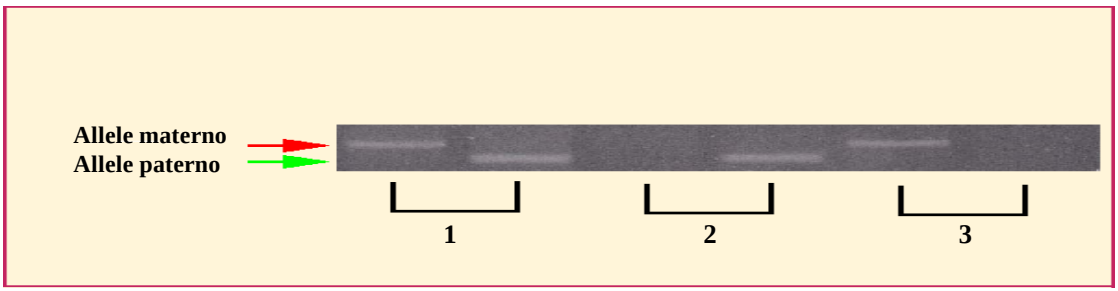
Sindrome di Angelman e sindrome di Prader-Willi

Queste sindromi sono esempi paradigmatici dei meccanismi che determinano alterazioni dell'imprinting quali: ***delezione*** della regione 15q11-q13, ***disomia uniparentale***, ***microdelezioni del centro dell'imprinting*** **(IC)**. In un soggetto normale, per questa regione è presente un allele materno metilato (imprinted o inattivo) ed un allele paterno non metilato (attivo) che definiscono il pattern di metilazione normale.

Il test di metilazione è un test di screening che consente di valutare l'occorrenza di un ***pattern di metilazione*** normale o alterato. L'esecuzione di questo test può identificare tre diversi genotipi:

- presenza di contributo biparentale degli alleli che corrisponde ad un normale pattern di metilazione;
- assenza del contributo paterno, risultato che indica una diagnosi di sindrome di Prader-Willi;
- assenza del contributo materno, risultato che indica una diagnosi di sindrome di Angelman.

Nella successiva figura sono presentati i risultati del test di metilazione per le sindromi di Angelman e Prader-Willi. Il test molecolare, eseguito mediante amplificazione del gene SNRPN, consente di differenziare l'allele paterno da quello materno. Nel paziente numero 1, come indicato dalle frecce, si osserva la presenza di entrambi gli alleli. Il paziente numero 2 è affetto da sindrome di Angelman in quanto possiede il solo allele paterno, mentre il paziente numero 3 è affetto da sindrome di Prader-Willi in quanto possiede il solo allele materno.



Nel caso di un pattern di metilazione alterato, il test non consente di definire quale dei tre possibili meccanismi molecolari sia coinvolto nella sindrome. Per approfondire questo aspetto, che consentirà di stabilire il rischio di ricorrenza della patologia nelle successive gravidanze, si prosegue lo studio con test specifici (analisi del cariotipo e FISH per verificare le delezioni, analisi dei polimorfismi per verificare la presenza di disomia uniparentale, Southern-blot con sonde specifiche per le microdelezioni dell'IC).

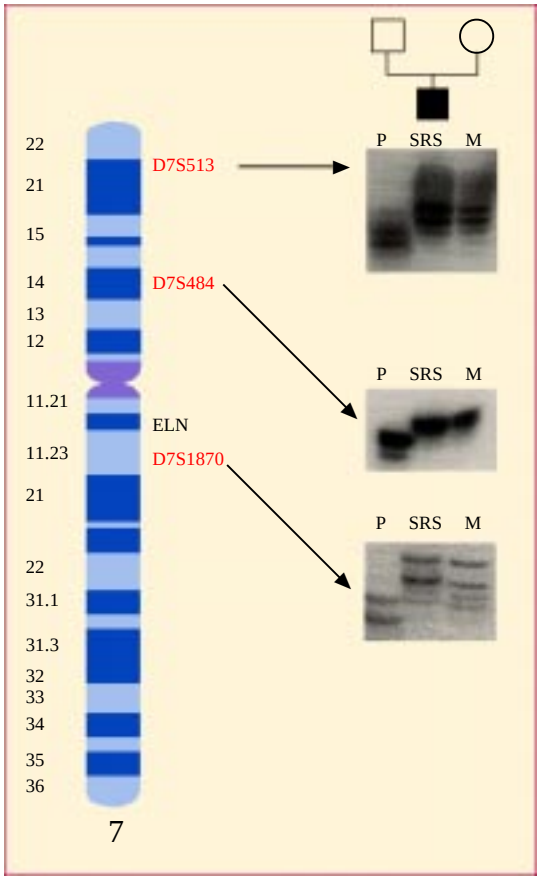
Bisogna considerare che solo l'80% dei pazienti con sindrome di Angelman ha un pattern di metilazione anomalo. Circa la metà dei rimanenti pazienti presenta mutazioni de novo o di origine materna del gene UBE3A. In questo caso il test molecolare può evidenziare:

- la presenza di mutazione che conferma la diagnosi clinica;
- l'assenza di mutazione che esclude le alterazioni di UBE3A come causa della sindrome.

Sindrome di Silver-Russel

Il 10% dei pazienti con sindrome di Silver-Russell presenta ***disomia uniparentale materna del cromosoma 7*** come causa della sindrome. Il test molecolare permette di verificare la trasmissione al probando di entrambi i cromosomi 7 parentali. Nel referto sono riportati l'albero genealogico dei soggetti studiati, i marcatori testati ed i rispettivi alleli. Per escludere/verificare l'occorrenza di disomia uniparentale è necessario identificare almeno un marcatore informativo, vale a dire che permetta di distinguere da quale dei due genitori è stato ereditato l'allele. Il risultato del test può indicare:

- la presenza di contributo biparentale per il cromosoma 7, escludendo la disomia uniparentale come causa della sindrome;
- l'assenza del contributo paterno e la presenza di entrambi i cromosomi materni confermando il sospetto diagnostico.



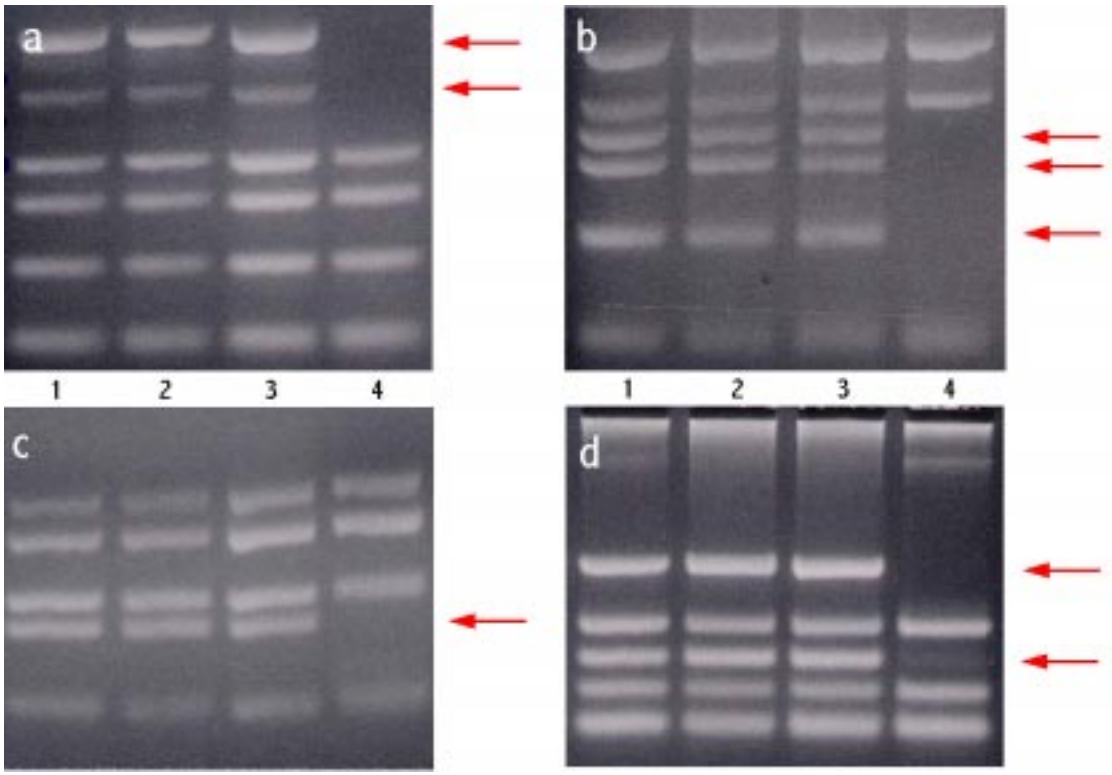
Nella figura accanto sono riportati i risultati dell'analisi molecolare per la valutazione della disomia uniparentale del cromosoma 7. Il test molecolare valuta la segregazione allelica di marcatori polimorfici dai genitori al probando. Sulla sinistra è riportato l'ideogramma del cromosoma 7 che indica la posizione dei loci testati. Sulla destra dell'immagine, gli autoradiogrammi indicano che il probando (SRS) ha ereditato entrambi i cromosomi materni (M) e manca del contributo paterno (P). Tale risultato permette la diagnosi di sindrome di Silver-Russell.

Microdelezioni del cromosoma Y

Alcune forme di sterilità maschile sono dovute a microdelezioni del cromosoma Y che interessano la ***regione AZF*** in cui sono stati identificati dei geni coinvolti nel meccanismo di regolazione della spermatogenesi. L'esecuzione del test molecolare consente di verificare:

- la presenza di tutti i loci della regione interessata escludendo questo meccanismo come causa di sterilità;
- l'assenza di uno o più loci della regione AZF confermando questo meccanismo genetico come causa di sterilità.

Nella figura successiva sono riportati i risultati dell'analisi molecolare per la ricerca delle microdelezioni del cromosoma Y. Le figure A, B, C e D riportano il risultato di 4 differenti PCR amplificanti 18 loci nella regione del cromosoma Y in esame. Sono stati analizzati quattro pazienti. Nei pazienti 1, 2 e 3 è evidente l'amplificazione di tutti i loci esaminati. Il paziente numero 4 presenta una delezione che interessa i loci indicati dalle frecce.



Emocromatosi

In una alta percentuale di pazienti affetti da emocromatosi sono state identificate due mutazioni (*C282Y* e *H63D*) del ***gene HLA-H***. Il test molecolare permette di verificare:

- ➢ la presenza di entrambe le mutazioni, confermando la diagnosi clinica;
- ➢ l'assenza delle mutazioni o la presenza di una sola di essa, escludendo il sospetto clinico.

Bisogna sottolineare che il test molecolare, che consente di confermare con grande anticipo la presenza delle mutazioni che porteranno all'insorgenza della malattia, ed è quindi un tipico *test predittivo*, offre un ausilio fondamentale in termini di prevenzione, in quanto permette di attivare per tempo le azioni necessarie per impedire l'insorgenza delle temibili complicanze cui i soggetti vanno incontro.

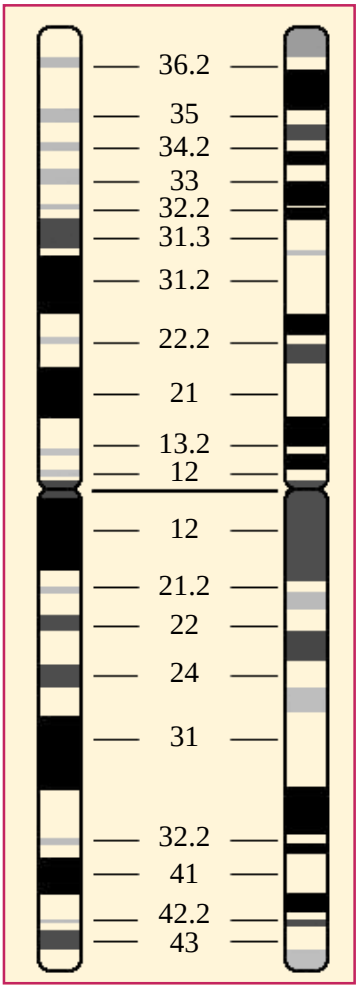
Cenni interpretativi sulle analisi di citogenetica e citogenetica molecolare

(D. Giardino)

Il cariotipo umano normale delle cellule somatiche contiene ***46 cromosomi***, suddivisi in 23 coppie, ***22 coppie di autosomi*** ed ***1 coppia di gonosomi***, dai quali dipende la differenziazione del sesso. Nel maschio i 2 gonosomi sono diversi per forma e dimensioni e sono indicati con la formula ***XY***, nella femmina invece sono simili tra loro e sono indicati con la formula ***XX***.

Le altre coppie sono numerate in maniera progressiva dall'1 al 22, secondo una convenzione internazionale (International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 1995: ISCN,1995). Ogni coppia è rappresentata da due cromosomi simili (detti omologhi), mentre le varie coppie differiscono tra loro per struttura e grandezza.

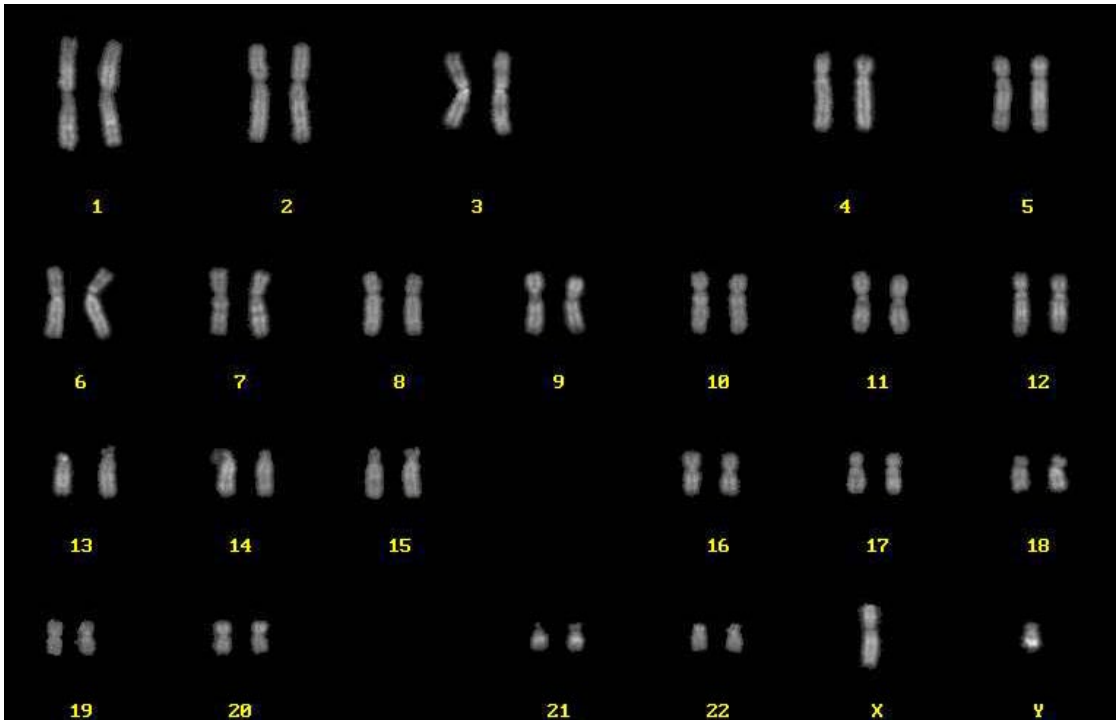
Il braccio corto di un cromosoma è definito "***p***" e quello lungo "***q***". Ogni braccio è suddiviso in regioni, classificati con numeri progressivi a partire dal ***centromero*** verso l'estremità del braccio corto e del braccio lungo. Ogni regione è suddivisa in bande ed in sottobande, classificate anch'esse con numerazione standardizzata a partire dal centromero. Nella figura a lato è riportato, come esempio, il diagramma del cromosoma 1 umano, a sinistra ad una risoluzione di 400 bande per set aploide, e a destra ad una risoluzione di 850 bande per set aploide.



Analisi citogenetica costituzionale

I cromosomi vengono studiati in *metafase*, colorati con coloranti idonei, osservati al microscopio, fotografati e classificati in base alle dimensioni ed alle caratteristiche rilevate con il bandeggiamento. Si ottiene in questo modo la *ricostruzione fotografica del cariotipo*, che viene allegata al referto.

Il cariotipo, cioè l'assetto cromosomico di un individuo, viene formulato utilizzando la simbologia standardizzata dall'ISCN. La descrizione comprende: il numero dei cromosomi della cellula, la formula dei cromosomi sessuali, ed eventuali anomalie. Un ***cariotipo femminile normale*** è descritto come ***46,XX*** e un ***cariotipo maschile normale*** come ***46,XY*** (nella figura seguente un cariogramma maschile normale in bande Q).



Il referto di citogenetica contiene la descrizione del cariotipo del paziente, che può risultare di complessa interpretazione soprattutto se patologico, ed ancor più se sono presenti riarrangiamenti strutturali complessi o più linee cellulari.

L'interpretazione dei risultati viene facilitata se si prendono in considerazione separatamente le sue parti componenti. Per prima cosa occorre stabilire se sono presenti una o più linee cellulari. Nel primo caso il cariotipo è omogeneo, nel secondo è ***a mosaico***. Quando è presente un mosaicismo, alla descrizione del cariotipo viene anteposta la sigla ***mos*** e i cariotipi delle singole linee cellulari sono separati dalla barra (/). La prima voce che viene riportata nel cariotipo è il numero di cromosomi osservati (corrispondente al numero dei centromeri), seguito da una virgola (**,**) e dalla formula dei cromosomi del sesso (XX = femmina; XY = maschio). Se

sono presenti anomalie cromosomiche, queste vengono riportate dopo la formula dei cromosomi del sesso, usando le abbreviazioni o i simboli specifici che le distinguono (vedere tabella seguente). Le anomalie vengono riportate in un ordine anch'esso specifico: le anomalie dei cromosomi del sesso vengono elencate per prime, seguite dalle anomalie degli autosomi ordinate secondo il loro numero progressivo. Per ciascun cromosoma descritto, le anomalie numeriche vengono riportate prima delle strutturali e queste ultime vengono elencate in ordine alfabetico, usando le abbreviazioni specifiche per il tipo di alterazione (ad esempio ***del***, ***der***, ***dic***). La virgola (**,**) separa sempre le singole anomalie descritte per cui, esaminando il cariotipo da virgola a virgola, possono essere interpretate le singole anomalie descritte.

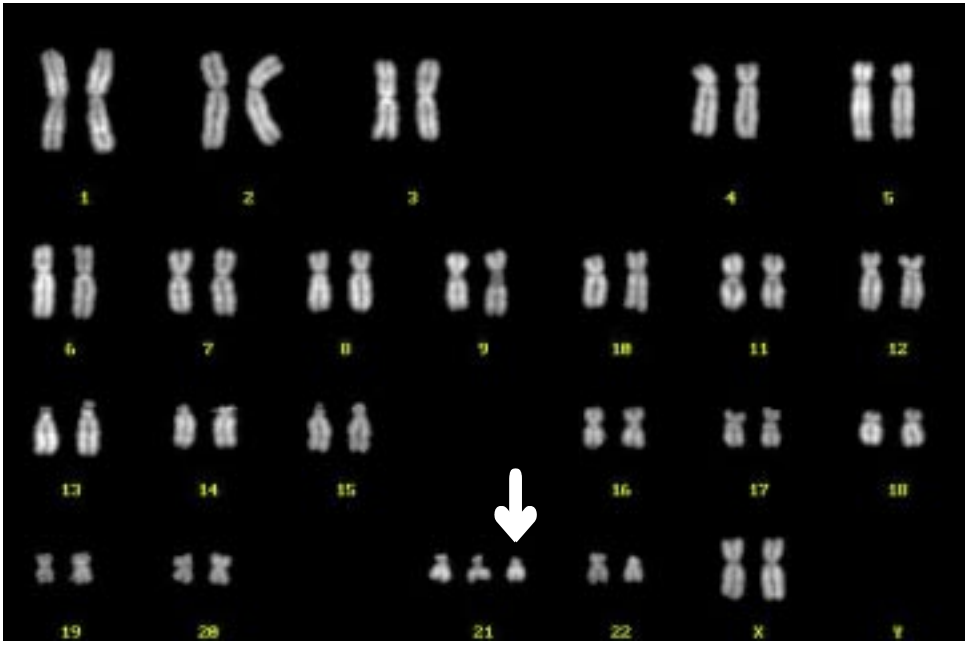
Le abbreviazioni più frequentemente utilizzati per descrivere il cariotipo

Abbreviazione	***Significato***
del	delezione di un tratto di cromosoma
de novo	origine ex novo, in contrapposizione ad ereditato
der	cromosoma derivato da un riarrangiamento
dic	cromosoma dicentrico (con 2 centromeri)
dup	duplicazione di un tratto di cromosoma
i	isocromosoma
ins	inserzione cromosomica
inv	inversione cromosomica
mar	cromosoma marcatore, di origine da determinare
mat	origine materna
mos	mosaico o mosaicismo
p	braccio corto di un cromosoma
pat	origine paterna
q	braccio lungo di un cromosoma
r	cromosoma ad anello (ring)
t	traslocazione
/	simbolo che separa le linee di un mosaico
+/-	prima del numero di un cromosoma indicano acquisizione o perdita di quel cromosoma. (+/- non vengono utilizzati per indicare acquisizione o perdita dei cromosomi del sesso)

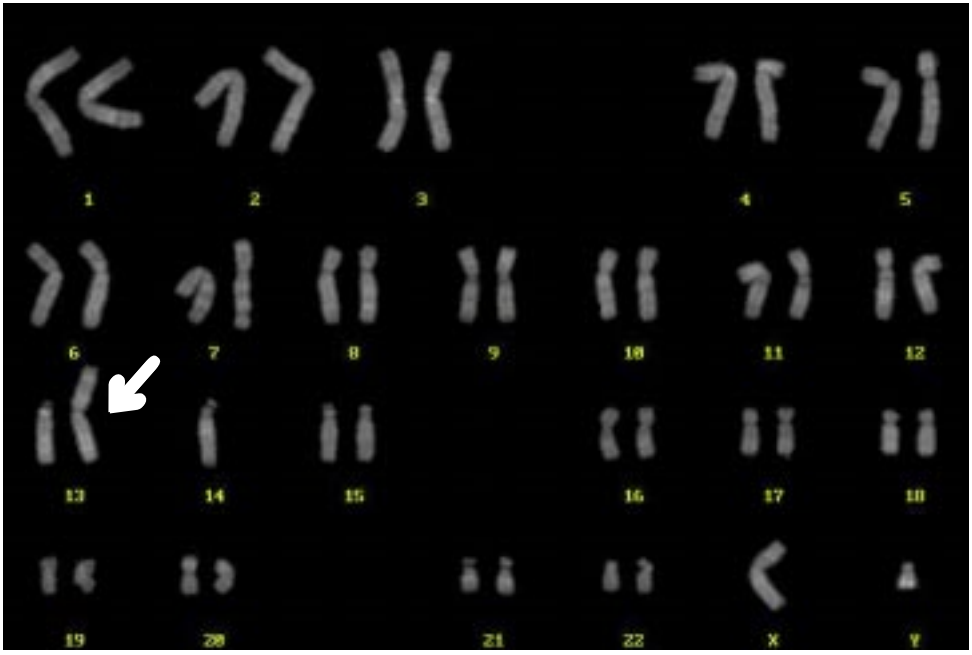
Esaminando in sequenza i componenti di un referto di citogenetica, utilizzando le regole sopra descritte assieme alle abbreviazioni ed ai simboli riportati nella tabella seguente ed agli esempi che seguono, quello che appariva come un'indecifrabile combinazione di numeri e simboli diviene un metodo conciso ed universale per descrivere il risultato di un'analisi cromosomica.

Esempi di cariotipi anomali e loro interpretazione

Cariotipo	*Significato*
47,XX,+21	Cariotipo femminile (XX) a 47 cromosomi (47), per la presenza di un cromosoma 21 sovrannumerario (+) [Sindrome di Down]
47,XY,+21	Cariotipo maschile (XY) con cromosoma 21 sovrannumerario (+)
45,X	Cariotipo con monosomia del cromosoma X, solitamente associato alla sindrome di Turner
47,XXX	Cariotipo con trisomia del cromosoma X
47,XXY	Cariotipo con costituzione XXY dei cromosomi del sesso, associato alla sindrome di Klinefelter
46,XY,t(1;3)(p32;q12)	Cariotipo maschile in cui è presente una traslocazione (t) coinvolgente un cromosoma 1 ed un cromosoma 3. I punti di rottura della traslocazione sono localizzati a livello della banda 32 sul braccio corto (p) del cromosoma 1 ed a livello della banda 12 del braccio lungo (q) del cromosoma 3
46,XY, del (5p)	Cariotipo maschile in cui è presente una delezione (del) del braccio corto (p) di un cromosoma 5 [Sindrome del cri-du-chat]
46,XX, del (1)(p32.2)	Cariotipo femminile in cui è presente una delezione (del) di parte del braccio corto (p) di un cromosoma 1, a livello della regione 3, nella banda 2, sottobanda 2
45,XY,der(13;14)(q10;q10)mat	Cariotipo maschile con cromosoma derivativo (der), costituito dal braccio lungo del cromosoma 13 e dal braccio lungo del cromosoma 14, che ha sostituito un cromosoma 13 ed un cromosoma 14. La rottura e la riunione sono avvenute a livello delle bande q10, corrispondenti al centromero. Il cromosoma derivativo è stato ereditato dalla madre (mat)
46,XY,der(13;21)(q10;q10)pat,+21	Cariotipo maschile con cromosoma derivativo (der) ereditato dal padre (pat), costituito dal braccio lungo del cromosoma 13 e dal braccio lungo del cromosoma 21, ma poiché sono comunque presenti due copie del cromosoma 21, il risultato è la presenza di un 21 sovrannumerario [Sindrome di Down per trisomia 21 secondaria a traslocazione]
mos 45,X/46,XX	Cariotipo a mosaico (mos) per la presenza di 2 linee cellulari, una con monosomia del cromosoma X ed (/) una a cariotipo normale



Nell'immagine sopra, cariotipo femminile a 47 cromosomi per la presenza di un *cromosoma 21 sovrannumerario* (freccia), causa della ***Sindrome di Down***.



Nell'immagine precedente, cariotipo maschile con ***traslocazione Robertsoniana*** tra il braccio lungo del cromosoma 13 ed il braccio lungo del cromosoma 14. Il ***cromosoma derivativo*** così formato (freccia) ha sostituito un cromosoma 13 ed un cromosoma 14. Le traslocazioni Robertsoniane prendono il nome dal ricercatore che per primo le descrisse. Originano dalla fusione di *due cromosomi acrocentrici* (cromosomi il cui centromero si trova ad un'estremità) ed hanno una frequenza di circa 1:1000 nella popolazione. L'assetto cromosomico risultante è a 45 cromosomi. I portatori di queste traslocazioni sono clinicamente normali, tuttavia sono a rischio di produrre gameti sbilanciati e prole con *trisomie secondarie a traslocazione sbilanciata*.

Citogenetica delle anomalie cromosomiche acquisite

Mutagenesi

L'esposizione ad *agenti mutageni* può indurre mutazioni geniche e/o cromosomiche. L'analisi citogenetica costituisce un parametro indiretto di valutazione delle mutazioni.

Citogenetica oncologica

Alcuni errori cromosomici "somatici" possono verificarsi nel periodo postnatale ed essere confinati in uno specifico tessuto. Questa situazione è caratteristica dei tumori, che di solito hanno un corredo cromosomico anomalo rispetto a quello presente costituzionalmente nella persona in cui si sviluppano. L'esempio più noto di anomalia cromosomica acquisita è il cosiddetto ***cromosoma Philadelphia*** (o Ph') riscontrato nelle cellule del midollo osseo nel 90% dei pazienti con leucemia mieloide cronica. Il cromosoma Ph' è il prodotto di una traslocazione reciproca di parte del braccio lungo di un cromosoma 22 sul braccio lungo di un cromosoma 9. La nomenclatura adottata per descrivere le anomalie cromosomiche nei tumori è inserita in un apposito capitolo dell'ISCN, 1995. La formula usata per descrivere le anomalie cromosomiche è identica a quella utilizzata per la citogenetica tradizionale e molecolare, a cui si aggiungono con alcuni simboli specifici.

Le abbreviazioni più frequentemente utilizzate per descrivere il cariotipo nei tumori

Abbreviazione	*Significato*
del	delezione di un tratto di cromosoma
der	cromosoma derivato da un riarrangiamento
t	traslocazione
/	simbolo che separa le diverse linee cellulari (cloni)
+/-	prima del numero di un cromosoma indicano acquisizione o perdita di quel cromosoma (+/- non vengono utilizzati per indicare acquisizione o perdita dei cromosomi del sesso)
[ ]	tra parentesi quadre si inserisce il numero di metafasi analizzate
c	anomalia cromosomica costituzionale, la lettera "c" segue la descrizione della anomalia

Esempi di cariotipi anomali osservati in tumori e loro interpretazione

Cariotipo	*Significato*
46,XY,t(9;22)(q34;q11)[21]	Cariotipo tumorale in cui è presente una traslocazione (t) coinvolgente un cromosoma 9 ed un cromosoma 22. I punti di rottura della traslocazione sono localizzati a livello della banda 34 sul braccio lungo (q) del cromosoma 9 ed a livello della banda 11 del braccio lungo (q) del cromosoma 22. Questo assetto cromosomico è stata osservato in 21 cellule. L'anomalia osservata è presente nel 90% dei pazienti con leucemia mieloide cronica.
46,XY,t(9;22)(q34;q11)[21]/46,XY [12]	Cariotipo tumorale in cui sono presenti due cloni: a) in uno è presente la traslocazione (t) coinvolgente un cromosoma 9 ed un cromosoma 22. I punti di rottura della traslocazione sono gli stessi dell'esempio precedente. Questo assetto cromosomico è stata osservato in 21 cellule. b) Il secondo clone ha un corredo cromosomico normale (46,XY) ed è stato osservato in 12 cellule.
47,XXYc,t(9;22)(q34;q11)	Cariotipo in cui è presente anomalia numerica costituzionale (cromosoma X extranumeriario = 47,XXYc) ed un'anomalia cromosomica acquisita, la t (9;22) già descritta negli esempi precedenti

Sono oggi noti oltre 100 riarrangiamenti cromosomici caratteristici di diversi tipi di tumori.

Alcuni esempi di tumori associati ad anomalie cromosomiche non casuali

Tumore	*Anomalia/e comune/i*
Leucemie	
Leucemia mieloide cronica	t(9;22)(q34;q11)
Leucemia acuta mieloblastica	t(8;21)(q22;q22.2)
Leucemia acuta promielocitica	t(15;17)(q22;q11.2-12)
Leucemia acuta non linfoide	+8, -7, -5, del(5q), del(20q)
Tumori solidi	
Linfoma di Burkitt	t(8;14)(q24;q32)
Sarcoma di Ewing	t(11;22)(q24;q12)
Meningioma	-22
Retinoblastoma	del(13q14)
Tumore di Wilms	del(11p13)

Questi esempi documentano l'importanza della caratterizzazione citogenetica dei tumori, che consente spesso diagnosi più precise o più precoci e può orientare le scelte terapeutiche.

Citogenetica molecolare

Con l'avvento delle tecniche di Citogenetica molecolare si è reso necessario aggiornare la nomenclatura idonea a descrivere i cariotipi, per rappresentare in maniera adeguata i risultati ottenuti con le *tecniche di FISH*.

I simboli più frequentemente utilizzati per descrivere il cariotipo ottenuto dopo applicazione di tecniche di FISH

Simbolo	*Significato*
+/-	presenza / assenza del segnale di ibridazione su di uno specifico cromosoma
++	duplicazione del segnale su di uno specifico cromosoma
x	segno di moltiplicazione, che precede il numero dei segnali osservati
.	il "punto" separa il risultato ottenuto in citogenetica tradizionale dai risultati ottenuti dopo l'applicazione della fish
;	il "punto e virgola" separa le singole sonde sui diversi cromosomi derivativi
ish	ibridazione in situ (in situ hybridization) su cromosomi metafasici
nuc ish	ibridazione in situ (in situ hybridization) su nuclei interfasici
pcp	painting cromosomico parziale
wcp	painting cromosomico totale

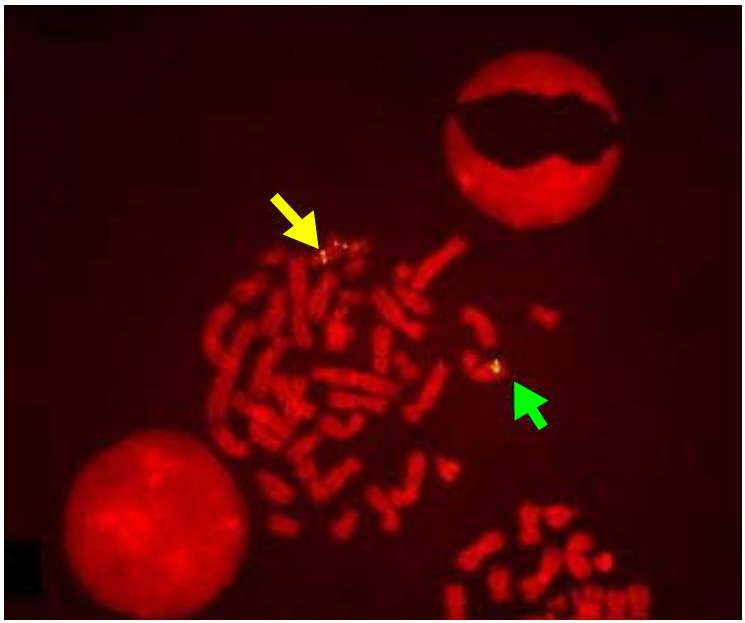
Quindi, se è stato eseguito un cariotipo con l'impiego di tecniche tradizionali, va riportato il risultato del cariotipo seguito da un punto (.), a cui segue l'abbreviazione ***ish*** ed il risultato ottenuto con la FISH. Se l'analisi citogenetica standard non è stata eseguita, ma si sono applicate solo tecniche FISH allora si riporta nella descrizione del cariotipo ish seguito dal risultato ottenuto.

I risultati ottenuti con tecniche FISH su cromosomi con anomalie di struttura vengono espressi con il simbolo ***ish*** seguito dal simbolo dell'anomalia strutturale osservata (ad esempio ***del***, ***dup***, ***t***, eccetera) a cui segue fra parentesi il/i cromosoma/i implicato/i nel riarrangiamento, seguito dalla localizzazione dei punti di rottura del riarrangiamento anch'essi tra parentesi: infine segue il/i locus/i riconosciuto/i dalla/e sonda/e utilizzata/e. Il locus è designato secondo il Genome Data Base (GDB), la sigla con cui viene descritto consiste nella lettera "***D***" (da ***D***NA), seguita dal numero del cromosoma a cui esso è assegnato, dalla lettera "***S***" (da ***S***egment cioè segmento) e dal numero assegnato dal GDB alla sonda molecolare. Per esempio *D15S10* indica il decimo segmento di DNA assegnato al cromosoma 15.

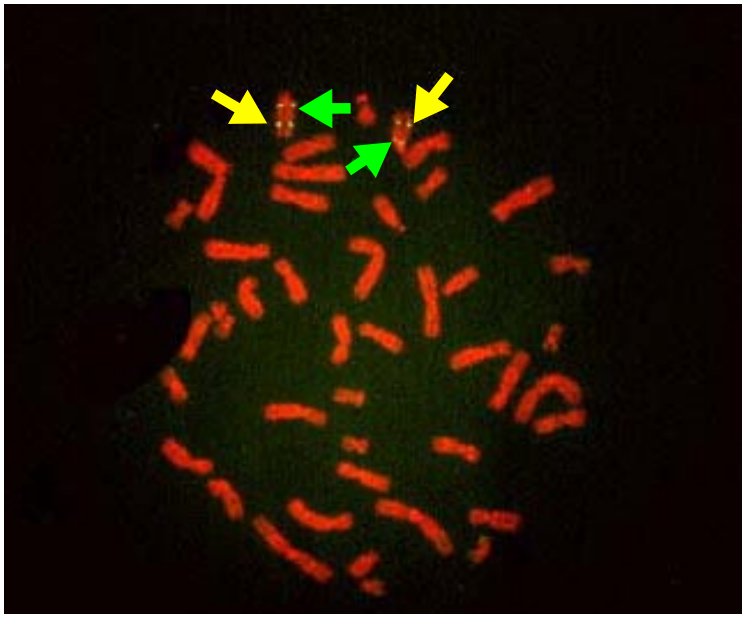
Il *locus* viene scritto in maiuscole ed i singoli loci sono ordinati a partire dalla regione del braccio corto più lontana dal centromero (regione distale) verso il centromero ed il braccio lungo. I singoli loci sono tra loro separati da virgole e lo "stato" del locus (assente o presente) è scritto immediatamente dopo il locus: presente +, assente -.

Cariotipo	***Significato***
46,XY.ish del (15)(q11.2q11.2) (D15S10-)	Cariotipo maschile, rilevato attraverso l'uso di tecniche di citogenetica standard (46,XY), in cui l'analisi FISH (ish) ha identificato invece una microdelezione (del) sul cromosoma 15 nella regione critica per la sindrome di Angelman (q11.2q11.2) con l'impiego di una sonda per il locus D15S10. Il simbolo - indica l'assenza del segnale di ibridazione su uno dei 2 cromosomi 15. (Il sospetto diagnostico di sindrome di Angelman in questo caso è confermato).
46,XX.ish 15q11.2 (SNRPNx2)	Cariotipo femminile, rilevato attraverso l'uso di tecniche di citogenetica standard (46,XX), in cui l'analisi FISH (ish) ha permesso di escludere una microdelezione sul cromosoma 15 nella regione critica per la sindrome di Prader-Willi (q11.2) con l'impiego di una sonda per il locus SNRPN. Il simbolo x2 indica infatti la presenza del segnale di ibridazione su entrambi i cromosomi 15.

Nelle due successive figure sono riportati esempi di metafasi analizzate in FISH e l'interpretazione dei risultati (tra i meno complessi).



Analisi in FISH di sindrome da microdelezione (sospetta sindrome di Angelman = AS). Sul cromosoma 15 normale (freccia gialla) sono evidenti i segnali di ibridazione sia nella regione di controllo (subtelomerica) sia nella regione AS. Il cromosoma deleto (freccia verde) mostra solo il segnale di controllo, indicando una delezione a livello del locus della sindrome di Angelman.



Analisi in FISH di sindrome da microdelezione (sospetta sindrome di Prader-Willi = PWS). Su entrambi i cromosomi 15 sono evidenti i segnali di ibridazione sia nella regione di controllo (frecce gialle) sia nella regione PWS (frecce verdi). Ciò indica la presenza della regione critica per la sindrome su entrambi gli omologhi e quindi l'assenza della delezione.

Problematiche associate all'interpretazione dei risultati nella diagnosi prenatale

La diagnosi citogenetica prenatale, benché ampiamente utilizzata, pone alle volte il citogenetista di fronte a risultati ambigui, che richiedono una buona esperienza per essere risolti.

L'ambiguità del risultato può dipendere:

- dalla "contaminazione" del campione con cellule di origine materna. In tal caso crescono in coltura tanto cellule fetali che materne, quindi due diverse linee cellulari, potenzialmente non distinguibili se il feto ha cariotipo anch'esso femminile (*46,XX*), mentre sono facilmente evidenziabili se il feto ha sesso maschile (*46,XY*). Nel caso poi una delle linee sia patologica (ad esempio *47,XX,+21*) mentre l'altra è normale (*46,XX*), l'interpretazione del risultato si complica ulteriormente, dovendo discernere tra la presenza di entrambe le linee cellulari nel cariotipo fetale (*mos 47,XX,+21/46,XX*) o la presenza di un'unica linea cellulare patologica nel feto (*47,XX,+21*) e la contemporanea presenza in coltura di cellule materne (*46,XX*);
- dalla presenza di una seconda linea cellulare originata da una mutazione insorta *in vitro* e non presente pertanto nel cariotipo fetale. È indispensabile discriminare tra mosaicismo vero ed artefatto di coltura (pseudomosaicismo), in quanto le implicazioni cliniche per il feto sono diametralmente opposte (feto affetto da patologia cromosomica o feto sano, rispettivamente). Questi risultati si possono osservare dopo coltura a medio termine di amniociti o di cellule del citotrofoblasto;
- dalla presenza di un mosaicismo confinato alla placenta (CPM, da Confined Placental Mosaicism), che non riflette il cariotipo fetale. Nell'1% dei campioni analizzati dopo preparazione diretta dei villi coriali ad esempio si possono ottenere, come conseguenza di questo fenomeno, risultati falsi positivi o falsi negativi.

Il CPM è definito come una discrepanza tra il cariotipo fetale e la costituzione cromosomica della placenta, sulle cui cellule viene analizzato il cariotipo. Quindi, seppur in un numero limitato di casi, l'analisi citogenetica dei tessuti placentari può non essere rappresentativa del cariotipo fetale. L'esito di gravidanze in cui sia stato diagnosticato un CPM varia da normale a presenza di grave ritardo della crescita intrauterino.

Vari accorgimenti e controlli, nonché l'eventuale ripetizione dell'analisi su di un altro tessuto, consentono di differenziare tra mosaicismi veri ed artefatti di coltura, o tra CPM e mosaicismo presente nel cariotipo fetale.

Sempre inerente la tematica dell'interpretazione dei risultati in diagnosi prenatale è il problema della correlazione, in situazioni particolari, tra cariotipo fetale osservato e implicazioni fenotipiche incerte. In sintesi, a fronte di un corretto risultato diagnostico, non sempre è pos-

sibile predire il quadro fenotipico corrispondente ad un dato fenotipo. È questo il caso di riscontro nel cariotipo fetale di anomalie cromosomiche strutturali sbilanciate, oppure apparentemente bilanciate ma insorte ***de novo***, di piccoli cromosomi sovrannumerari. In queste circostanze viene attribuito un rischio empirico di patologia e, nella maggior parte dei casi, non può essere predetto un fenotipo caratteristico.

Cenni interpretativi sulle analisi di ematologia

(D. Lambertenghi)

Anemie

Per *anemia* si intende una riduzione della quantità totale di emoglobina nel sangue. Le anemie si possono distinguere in 4 gruppi secondo la classificazione patogenetica delle anemie:

- ➢ anemia con ridotta formazione di eritroblasti (aplasia);
- ➢ anemia con ridotta formazione di eritrociti (eritropoiesi inefficace);
- ➢ anemia con ridotta sintesi di emoglobina;
- ➢ anemia con ridotta sopravvivenza eritrocitaria (emolisi).

In diverse anemie più fattori concorrono al risultato finale e la classificazione viene attuata in base al meccanismo patogenetico fondamentale. Ad esempio, nella β-talassemia omozigote il danno fondamentale è il difetto di sintesi della catena β dell'emoglobina, ma si associano un'eritropoiesi inefficace e una ridotta sopravvivenza eritrocitaria.

Le ***anemie con ridotta formazione di eritroblasti*** sono anemie per lo più normocromiche e normocitiche, con riduzione dell'ematocrito, del numero di eritrociti e dell'emoglobina; i reticolociti sono ridotti o assenti; nel midollo non si trovano eritroblasti. Il ferro sierico è aumentato.

Nelle ***anemie con ridotta formazione di eritrociti*** il problema fondamentale è il difetto di maturazione dei precursori eritroidi, che si accumulano a livello midollare. Gli eritrociti, per effetto dello squilibrio maturativo tra nucleo e citoplasma, sono in genere di maggiori dimensioni (macrociti o megalociti). Il numero di reticolociti è molto basso.

Le ***anemie con ridotta sintesi di emoglobina*** sono tipicamente anemie ipocromiche microcitiche. Il difetto di maturazione risiede a livello del citoplasma. Il numero degli eritrociti è normale o aumentato.

Nell'***anemia con ridotta sopravvivenza eritrocitaria*** in genere gli eritrociti vivono meno di 20 giorni, non consentendo dunque all'eritrone di compensare adeguatamente. L'anemia è normocromica e normocitica; spesso però si osserva una macrocitosi determinata dall'elevata reticolocitosi.

L'emoglobina (Hb) e l'ematocrito sono le misure di uso più comune nello studio clinico di un'anemia. Poiché sono tra loro in stretta correlazione (emoglobina x 3 = ematocrito) è soprattutto scelta del clinico quale dei due utilizzare. Il valore medio normale di emoglobina dipen-

de sia dall'apparente errore di misura sia dalla variabilità attesa tra individui e nel singolo individuo. I valori di emoglobina che si rilevano in un ampia popolazione di maschi adulti ha una distribuzione simmetrica (Gaussiana) con un valore medio di 15 g/dL di sangue intero ed una deviazione standard (DS) di ± 1 g. La distribuzione normale dei valori di emoglobina varia quindi tra 12 e 17 g/dL, con picco della curva gaussiana a 15 g/dL. Convenzionalmente si definisce anemia una riduzione dei valori di emoglobina al di sotto di 12,5 g/dL nel soggetto adulto di sesso maschile e di 11,5 g/dL nella donna in età fertile. Si usa distinguere tra anemia lieve (Hb >10 g/dL), moderata (Hb = 8÷10 g/dL) e grave (Hb <8 g/dL). I parametri di laboratorio che di routine vengono presi in considerazione nella diagnostica delle anemie sono esaminati qui di seguito.

L'***esame emocromocitometrico***, nello studio dei pazienti anemici, è fondamentale per conoscere le dimensioni degli eritrociti, il contenuto e la concentrazione di emoglobina al loro interno.

L'***MCV*** (Mean Corpuscolar Volume) viene calcolato dividendo la somma dei volumi cellulari per il numero dei globuli rossi; nel soggetto sano, non anemico, si considerano normali i valori di MCV 90 ± 10 femtolitri (fL). Un valore superiore a 100 fL è indice di difetto di maturazione nucleare, un valore inferiore a 85 fL è indicativo di un difetto di sintesi dell'emoglobina. Pertanto esistono cause di errori legati alle metodologie elettroniche o a patologie annesse. Per esempio le agglutinine fredde danno origine ad un MCV falsamente aumentato, poiché un aggregato di molti eritrociti viene rilevato come un unico globulo rosso. Aggregati più grossi della soglia superiore fissata per i globuli rossi non sono contati comunque, dal che risulta un ematocrito falsamente basso, e quindi valori erroneamente elevati di Hb corpuscolare media (MCH) e di concentrazione Hb corpuscolare media (MCHC). Di solito riscaldando il campione di sangue e mantenendolo a 37°C si correggono l'ematocrito, l'MCV, l'MCH e l'MCHC. Una iperglicemia grave provoca un falso aumento dell'MCV e dell'ematocrito e comporta bassi valori di MCH. Questo è dovuto all'acqua che gonfia i globuli rossi al momento della diluizione con soluzioni saline isotoniche.

La quantità di Hb contenuta in ogni cellula può essere valutata dall'***MCH*** (Mean Corpuscolar Hemoglobin), espressa in picogrammi (pg). L'anemia viene detta normocromica per valori di MCH compresi tra 27 e 31 pg, ipocromica per valori < 27 pg. L'MCH può essere alterato in condizioni di iperlipidemia, che provoca un falso aumento del livello di Hb. Anche un numero di leucociti maggiore di $50 \square 10^9$/L aumenta in modo significativo la misura di emoglobina, per la torbidità del plasma. L'MCH è di solito strettamente correlato con il MCV ed aumenta o diminuisce parallelamente a questo.

L'***MCHC*** (Mean Corpuscolar Hemoglobin Concentration) misura la concentrazione dell'emoglobina in grammi per decilitro di eritrociti ed è un indicatore poco sensibile in quanto, tranne che in condizioni di anemia severa, si presenta con valori di normalità.

L'MCV, l'MCH e l'MCHC sono misure medie e quindi possono non rilevare anomalie in sangue contenente popolazioni cellulari disomogenee. Per esempio, pazienti con anemia sideroblastica (MDS), presentano un quadro dimorfico con presenza di cellule sia ipocromiche che normocromiche. In questi casi, l'analisi dell'istogramma delle cellule ematiche e dello striscio periferico risultano fondamentali per lo studio del sangue, dal momento che sono in grado di svelare alcune anomalie che altrimenti passerebbero inosservate.

Infine, l'***RDW*** (Red Cell Distribution Width o ampiezza della distribuzione eritrocitaria) misura il grado di anisocitosi. In genere è espresso come coefficiente di variazione (deviazione standard della distribuzione dei volumi eritrocitari/MCV) e i valori normali sono compresi tra 11,5 e 14,5. La più ampia irregolarità nei volumi eritrocitari, e quindi il maggior aumento di RDW, si osserva nelle anemie emolitiche secondarie alla presenza di reticolocitosi. Un RDW aumentato si riscontra nelle anemie microcitiche e in particolare nell'anemia sideropenica, nelle anemie da malattie infiammatorie croniche, nelle emoglobinopatie e nelle sindromi talassemiche. Esso ha suscitato molto interesse per l'aiuto che può dare nel differenziare una talassemia eterozigote non complicata (RDW normale e MCV basso) dalla carenza di ferro (RDW elevato e MCV da normale a basso). Nelle anemie macrocitiche si osserva un RDW normale o leggermente ridotto.

La classificazione delle anemie in base a MCV e RDW è qui riassunta:

MCV	***RDW normale***	***RDW alto***
Microcitosi	Talassemia minor, anemia da malattia cronica, emoglobinopatia	Deficit di ferro, emoglobina H, emolisi
Normocitosi	Anemia da malattia cronica, sferocitosi ereditaria, sanguinamento acuto	Deficit di ferro, anemia a cellule falciformi
Macrocitosi	Anemia aplastica, mielodisplasie	Deficit di B12 e acido folico, anemia emolitica autoimmune, crioglobuline, epatopatia, tiroidite, alcool

La ***morfologia eritrocitaria***, studiata mediante l'esame dello striscio di sangue periferico, fornisce ulteriori informazioni sulla natura dell'anemia, come modificazione della forma e delle caratteristiche tintoriali delle emazie, e la presenza di cellule immature o anomale. L'esame dello striscio di sangue di un paziente anemico consente alcune generali valutazioni interpre-

tative. Uno striscio che presenta poche modificazioni di dimensioni o forma degli eritrociti è solitamente indice di anemia ipoproliferativa. Mentre numerose e diffuse alterazioni di forma e di dimensioni indicano proliferazione midollare con eritropoiesi inefficace o emolisi. L'esame dello striscio è complemento degli indici eritrocitari. Le variazioni dell'MCV evolvono con una certa lentezza, a causa del ritardo dovuto al tempo di rinnovamento delle cellule rosse circolanti. In un paziente con deficienza di ferro insorta di recente, la presenza di microciti può rivelare la diminuzione di sintesi dell'emoglobina e la riduzione delle dimensioni cellulari prima che si evidenzi la complessiva diminuzione del MCV. Analogamente, l'anemia megaloblastica in fase iniziale è accompagnata dalla comparsa di occasionali macrociti nello striscio prima che vi sia un aumento dell'MCV.

Una modificazione di dimensioni senza alterazioni di forma delle cellule è denominata *anisocitosi*. La presenza di piccole cellule ipocromiche indica sempre un deficit di sintesi dell'emoglobina. Se sono presenti macrociti, occorre precisare se si tratta di policromatofili, di macrociti veri, o dei macrociti a bersaglio delle epatopatie. La presenza di macrociti veri indica di solito un difetto di maturazione nucleare, anche se coesistono cellule piccole. Le modificazioni di spessore delle emazie sono rivelate nello striscio da una variazione della densità della colorazione eosinofila. La presenza di microciti di più intensa colorazione ha un importante significato in quanto queste cellule hanno solitamente sia una riduzione della membrana cellulare che un aumento della concentrazione di emoglobina. Queste cellule sono gli *sferociti* e indicano un processo emolitico. All'estremo opposto si trovano le cellule appiattite e scarsamente colorate con un deposito centrale rosato: sono indicate come *cellule a bersaglio*. Esse risultano da un'alterazione della sintesi di emoglobina, o di un anormale accumulo di membrana cellulare. La forma a bersaglio è più marcata in certe emoglobinopatie, specialmente le emoglobine C ed S, ma si incontrano anche nelle epatopatie e nell'iposplenismo. La frammentazione degli eritrociti si verifica o nelle forme con eritropoiesi inefficace oppure nel caso di danneggiamento meccanico delle emazie circolanti dovuto ad anormalità dell'endotelio vascolare. Alcune condizioni patologiche sono diagnosticabili in base ad alterazioni morfologiche caratteristiche: l'anemia falciforme e l'ellissocitosi ereditaria ne sono un esempio. Infine certe alterazioni di forma (policromatofilia) e la presenza di inclusioni intracellulari forniscono informazioni relative alla produzione ed alla distruzione eritrocitaria da parte della milza e del sistema reticoloendoteliale. La presenza di residui nucleari (corpi di Howell-Jolly) può indicare un'ipofunzione o l'assenza della milza (iposplenismo). Le emazie a goccia o quelle nucleate sono spesso associate a mielofibrosi ed ematopoiesi extramidollare.

Le principali alterazioni morfologiche degli eritrociti, alterazioni patognomoniche, sono:

Echinociti	Emazie spiculate con proiezioni citoplasmatiche corte a distribuzione regolare. Frequenti nell'uremia.
Acantociti	Emazie spiculate, con proiezioni di varie dimensioni distribuite irregolarmente. Presente nelle epatopatie alcoliche, in caso di splenectomia, nei malassorbimenti.
Sferociti	Emazie sferiche a denso contenuto di Hb. Presenti nelle sferocitosi ereditaria e nelle forme emolitiche.
Schistociti	Emazie frammentate, con estremità spiculate. Tipiche delle sindromi da emolisi microangiopatica e nei portatori di valvole cardiache.
Ellissociti	Emazie ellissoidi. Presenti nella ellissocitosi ereditaria, ma anche nelle talassemie e nelle anemie sideropeniche.
Drepanociti	Emazie a falce. Anemia falciforme.
Codociti	Emazie a campana. Emoglobinopatie, anemie ferropriva, malattie epatiche.
Dacriociti	Emazie sottili con estremità allungata (cellula a lacrima). Anemia mieloftisica, mielofibrosi idiopatica.
Leptociti	Emazie sottili con emoglobina alla periferia. Talassemia, sideropenia.
Cheratociti	Emazie a forma di mezzaluna per rottura di un vacuolo (emazie a elmetto). Presente nella DIC e nei portatori di valvole cardiache.

L'***indice di produzione dei reticolociti*** sostituisce oggi la conta dei reticolociti, che da sempre è stata considerata uno strumento diagnostico di primo livello per l'iniziale inquadramento classificativo delle anemie.

La produzione di globuli rossi è un processo dinamico e il numero dei reticolociti circolanti dovrebbe essere confrontato col numero atteso in soggetti non anemici. Questo valore è calcolato come l'1% di $5 \square 10^6/\mu L$ eritrociti, con produzione assoluta di reticolociti di $50 \square 10^3/\mu L$. Tuttavia per una corretta conta reticolocitaria è importante considerare anche il valore di ematocrito del soggetto in esame secondo la formula:

$$\textit{Conta Reticolocitaria Corretta} = (\%\ \textit{Reticolociti} \cdot \textit{Hct}) / 45$$

Spesso si verificano situazioni in cui il paziente anemico rilascia reticolociti prematuramente in circolo. I reticolociti, prima di espellere l'RNA residuo e diventare globuli rossi maturi, rimangono nel sangue periferico per 24 ore. Tuttavia, con l'aumento dello stimolo da eritropoietina, il periodo di maturazione midollare si accorcia, mentre si allunga quello della maturazione dei reticolociti in circolo. In queste condizioni le cellule permangono in circolo per 2 o 3 giorni. Al fine di ottenere una reale misura della produzione eritrocitaria, è necessario avere presente che i reticolociti midollari si sono spostati fuori dal midollo ("shift cells") e che è

necessario apportare una correzione per il prolungamento del loro soggiorno in circolo. Lo spostamento dei reticolociti è diverso in base alla gravità dell'anemia o dell'ipossia, ed il fattore di correzione viene ricavato in base alla concentrazione di Hb e dell'ematocrito. Questo fattore è chiamato "Indice di Produzione dei Reticolociti" (IPR):

$$IPR = [(\%\ reticolocita \cdot Hct) / 45] \cdot [1 / Fattore\ di\ Correzione]$$

per il calcolo del Fattore di Correzione si ricorre alla seguente tabella:

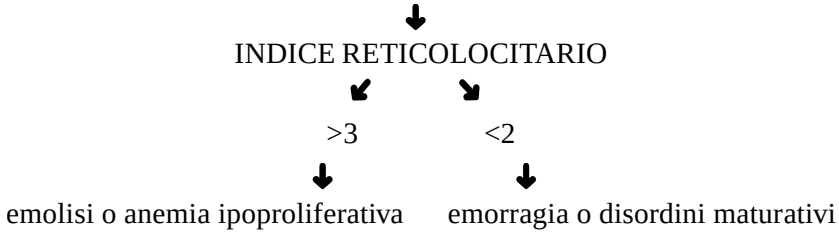
Ematocrito (%)	*Fattore di Correzione*
40÷45	1,0
35÷39	1,5
25÷34	2,0
15÷24	2,5
<15	3,0

L'introduzione della metodica automatica basata sulla citometria a flusso ha portato ad una riscoperta della conta reticolocitaria e alla sua applicazione ad un gran numero di condizioni in cui è utile un controllo fine e ravvicinato della funzione eritropoietica. Se è aumentata, essa indica che l'eritropoiesi midollare è efficiente e stimolata dall'eritropoietina in rapporto alla distruzione periferica e alla ridotta sopravvivenza in circolo dei globuli rossi. Riduzione dell'emoglobina associata a reticolocitosi si osserva nelle anemie acute post-emorragiche e in tutte le anemie emolitiche. I livelli più elevati si osservano nelle crisi di deglobulizzazione acuta che caratterizza il decorso di anemie emolitiche croniche costituzionali, come la sferocitosi ereditaria, nelle anemie emolitiche autoimmuni e nell'infestazione malarica. Nelle crisi aplastiche dei pazienti con anemia emolitica, spesso legate a infezioni da parvovirus B19, la caduta dei reticolociti è un segno precoce. La splenectomia causa una reticolocitosi lieve e transitoria, così come lo shock e altre condizioni di ipossia acuta.

Un secondo impiego clinico della conta reticolocitaria riguarda il monitoraggio della risposta eritropoietica alla terapia con i fattori carenti nelle anemie megaloblastica e sideropenica. La risposta alla somministrazione di vitamina B12 e acido folico nei pazienti con anemia megaloblastica, è caratterizzata da una trasformazione normoblastica dell'eritropoiesi midollare che comincia entro 24÷48 ore dall'inizio del trattamento. I reticolociti aumentano nel sangue midollare dopo 2÷4 giorni. La risposta reticolocitaria nel sangue periferico inizia a partire dal quarto-sesto giorno, e continua in modo uniforme e progressivo fino all'acme del settimo-ottavo giorno, che può raggiungere livelli anche superiori al 20%; segue, poi, un periodo di di-

minuzione della conta reticolocitaria, che ritorna a valori normali tra il quindicesimo e il ventesimo giorno dall'inizio della terapia. La crisi reticolocitaria che segue la somministrazione di ferro nell'anemia sideropenica ha un andamento pressoché sovrapponibile, ma è meno rapida e intensa e si mantiene più a lungo. L'acme avviene, infatti, tra l'ottavo e il decimo giorno, con livelli massimi tra il 10% e il 15%; segue una fase di plateau di due o tre giorni e, quindi, una fase discendente della durata di una settimana circa.

CLASSIFICAZIONE INIZIALE DELL'ANEMIA



La ***bilirubina*** ed il livello della ***lattato-deidrogenasi*** (***LDH***) nel siero forniscono misure semiquantitative della produzione e della distruzione cellulare. La concentrazione della bilirubina ematica, ed in particolare la frazione indiretta (bilirubina non coniugata) è correlata con l'entità della distruzione delle emazie. La concentrazione normale della bilirubina ematica è tra 0,4 ed 1 mg/dL, di cui il 70% - 80% è in forma non coniugata. Valori inferiori alla norma si osservano in pazienti con anemie ipoproliferative, in particolare nella deficienza di ferro e negli stati infiammatori. Valori normali o lievemente aumentati, da 0,8 a 2 mg/dL si osservano nei pazienti con eritropoiesi inefficace ed anemia emolitica; l'aumento è in gran parte a carico della frazione non coniugata. La capacità del fegato di eliminare la bilirubina coniugata è tale che questa frazione non aumenta nei pazienti con elevato turnover degli eritrociti. Un aumento della concentrazione di bilirubina coniugata è di solito indice di un disordine della funzionalità epatica.

L'attività della LDH sierica aumenta, oltre che in presenza di un danno a carico di tessuti come il fegato o il miocardio, anche in presenza di anemia emolitica, specialmente in corso di emolisi intravascolare dove l'enzima è rimosso dal circolo più lentamente dell'emoglobina. Concentrazioni sieriche di LDH da 800 a 2000 U/L (intervallo di riferimento nel soggetto sano 300÷600 U/L) si ossservano in pazienti con anemie emolitiche compensate. Aumenti si osservano anche in certi casi di eritropoiesi inefficace come le anemie megaloblastiche. Inoltre, vi è la tendenza all'inversione del normale profilo isoenzimatico LDH (l'LDH-1 eccede l'LDH-2), che indica se un aumento dell'LDH è secondario ad emolisi o ad epatopatia.

Il rifornimento di ferro svolge un ruolo fondamentale nel determinare la proliferazione e la maturazione del midollo eritroide. Poiché il deficit di ferro è la causa di anemia più frequente, la sua valutazione è spesso una componente essenziale delle indagini di un paziente anemico.

Il ***ferro nel siero*** e la ***capacità totale di legare il ferro*** (***TIBC***) con calcolo della saturazione della transferrina, riflettono lo stato reale di rifornimento del ferro ai tessuti. In condizioni normali il ferro oscilla da un valore medio di 110 μg/dL di plasma al mattino a 70 μg/dL nelle ore serali (l'intervallo di normalità è 50÷150 μg/dL). Questa variazione diurna non è influenzata dai pasti eccetto che nei soggetti con carenza di ferro. La TIBC nei soggetti normali si mantiene nell'intervallo 250÷450 μg/dL, ma si modifica in alcuni stati patologici come nel corso di infezioni o anemia emolitica. Un aumento a più di 350 μg/dL è diagnostico di deficienza di ferro.

Di maggior utilità diagnostica nell'anemia sideropenica, è la determinazione del rifornimento di ferro plasmatico tramite il calcolo della percentuale di saturazione della transferrina ([ferro/TIBC]□100). Questa, in condizioni normali, è il 40% (20÷50%). Quando la saturazione della transferrina scende a valori inferiori a 16% la sintesi dell'emoglobina non può più essere mantenuta al livello di base ed il globulo rosso comincia ad assumere le alterazioni tipiche del deficit marziale.

La percentuale di saturazione della transferrina varia notevolmente in funzioni delle diverse condizioni patologiche:

- ➢ sideropenia 5%
- ➢ eritropoiesi inefficace 80%
- ➢ infezioni 15%
- ➢ sovraccarico marziale 100%
- ➢ emolisi 45%

Quindi nei pazienti con deficit assoluto di ferro la TIBC tende ad aumentare, mentre lo stato infiammatorio si accompagna ad una diminuzione della TIBC.

Le scorte di ferro possono essere stimate in base alla misura della concentrazione della ***ferritina*** nel siero o all'esame al microscopio dell'emosiderina nell'aspirato midollare. La concentrazione della ferritina è misurata mediante metodi immunoenzimatici. La validità della sua determinazione sta nel fatto che la quantità della ferritina circolante è proporzionale alla quantità del ferro che si trova nei depositi. La concentrazione della ferritina sierica varia col sesso e con l'età del soggetto parallelamente alle variazioni delle scorte marziali. I valori normali oscillano tra 20 e 200 μg/dL. Una concentrazione inferiore a 12 μg/dL indica deficit di ferro. Se un paziente anemico ha una bassa saturazione della transferrina ed un'elevata ferritina nel plasma, è probabile uno stato infiammatorio. La normale relazione tra la concentrazione del-

la ferritina sierica e i depositi di ferro nell'organismo viene alterata da una condizione ipermetabolica, da uno stato infiammatorio o da un danno ai tessuti ricchi di ferritina come il fegato: tutte queste condizioni hanno come risultato un aumento aspecifico della concentrazione della ferritina. L'emosiderina nel midollo può essere esaminata negli strisci dei frustoli midollari colorati con Blu di Prussia. Ulteriori informazioni possono essere date dalle dimensione delle particelle nelle cellule reticoloendoteliali. Numerose piccole particelle di emosiderina suggeriscono un rapido turnover del ferro come si osserva nell'anemia emolitica. Grosse particelle indicano un rallentamento del turnover marziale e sono caratteristiche degli stati infiammatori. Sideroblasti evidentemente anomali si osservano nei pazienti con difetti della sintesi della globina o della porfirina. I soggetti talassemici presentano nelle emazie da due a dieci granuli blu che rappresentano un aumento degli aggregati semicristallini di ferritina che si accumulano nel citoplasma dei normoblasti in fase maturativa.

L'***aspirato midollare*** e la ***biopsia osteomidollare***, in un paziente con anemia ed anormalità dello striscio periferico, aggiungono importanti informazioni. La lettura al microscopio ottico inizia con la stima del rapporto tra precursori eritroidi e granulocitari (rapporto E:G), che in condizioni normali è di circa 1:3. Successivamente si procede all'esame della sequenza di maturazione della serie rossa ponendo attenzione alle dimensioni cellulari, allo sviluppo nucleare, alle caratteristiche citoplasmatiche e al contenuto di emoglobina. Da questo è possibile evidenziare anormalità specifiche dello sviluppo del nucleo e del citoplasma. Per esempio, la stimolazione da eritropoietina produce un midollo macronormoblastico caratterizzato da focolai di normoblasti in fase di maturazione sincrona con modesto ingrossamento nucleare e lieve immaturità citoplasmatica. In contrasto, l'eritropoiesi megaloblastica si caratterizza per la presenza di nuclei molto più grandi con cromatina fine ed una marcata discrepanza tra maturazione nucleare e sintesi dell'emoglobina. Questa anomalia è nota col termine di dissociazione nucleo-citoplasmatica, e consiste in un nucleo che appare meno maturo di quanto ci si aspetterebbe in rapporto all'entità della sintesi dell'emoglobina.

Concludendo è evidente che la ricerca della principale causa di anemia nel soggetto deve essere inizialmente guidata da una attenta anamnesi e un completo esame obiettivo del paziente. La presenza di sintomi e segni di un processo infiammatorio o di una malattia cronica sistemica può dare spiegazione di un anemia ipoproliferativa di modesta severità. La splenomegalia mette il medico sull'avviso della possibilità di un anemia emolitica; l'artrite orienta verso un disordine immunologico.

Ma la precisazione della natura e della causa di un'anemia richiede solitamente l'ausilio del laboratorio. Un'indagine completa che comprende lo studio della produzione eritrocitaria midollare, del rifornimento di ferro e della distruzione eritrocitaria è requisito fondamentale per un accurata classificazione in una delle tre principali categorie: anemie ipoproliferative, da difetti di maturazione, anemie emolitiche.

La ***classificazione funzionale delle anemie*** è qui riassunta:

Anemia ipoproliferativa	*Anemia da difetto di maturazione*	*Anemia emorragica/emolitica*
➢ Danno midollare: mieloftisi, aplasia, tossine esogene, mal. Intrinseca midollare.	➢ Citoplasmatico (microcitico): grave deficit ferro, talassemia, anemia sideroblastica.	➢ Perdita acuta di sangue
➢ Carenza di ferro: sanguinamento cronico, deficit di ferro, infiammazione.	➢ Nucleare (megaloblastica): deficit B12, deficit folato.	➢ Emolisi intravascolare: endotossine, autoimmune, farmaci.
➢ Ridotta eritropoietina: malattie renali, aumentata liberazione di O_2, ridotto fabbisogno di O_2, infiammazione.		➢ Frammentazione: DIC, vasculite, anemia a cellule falciformi.
		➢ Fagocitosi RE: autoimmune, anemia a corpi di Heinz, deficit enzimatici.

Alterazioni quantitative dei leucociti

Leucocitosi

La leucocitosi è una condizione caratterizzata dall'aumento dei leucociti al di sopra di $10 \cdot 10^9$/L con ripercussioni sul numero degli altri elementi cellulari.

La ***neutrofilia*** è un evento di frequente osservazione nella pratica clinica ed è rappresentato da un gruppo eterogeneo di condizioni caratterizzate da un aumento del numero assoluto dei granulociti neutrofili circolanti che normalmente è compreso tra i 4.000 e i 9.500/μL. L'eziopatogenesi del disturbo è dominata da un fenomeno reattivo a numerose e varie patologie infettive, autoimmuni e neoplastiche extra-midollari; la neutrofilia può anche essere espressione di malattie ematologiche, come le sindromi mieloproliferative e più raramente le sindromi mielodisplastiche, e può rappresentare un segno associato ad alterazioni congenite della funzione granulocitaria. Inoltre causa di neutrofilia si riscontra anche nei fenomeni tossici e iatrogeni.

Le possibili cause di neutrofilia sono rappresentate da:

Infezioni acute	Batteriche, fungine, micobatteriche, da rickettsie
Stimoli aspecifici o multifattoriali	Eventi fisici, eventi psico-emozionali (dolore, stress), traumatismi, interventi chirurgici, infarto

Condizioni ostetriche	Gravidanza, eclampsia, travaglio
Farmaci	Corticosteroidi, adrenalina, anestetici, litio, piombo, fattori di crescita G-CSF e GM-CSF, vaccini e veleni
Disordini ematologici	Neutrofilia ereditaria, leucocitosi cronica idiopatica, malattia di Down, iposplenismo, sindrome mieloproliferativa, anemia emolitica, emorragie, associate a neutropatie
Neoplasie maligne	Carcinomi, malattia di Hodgkin, mieloma multiplo, alcuni linfomi non-Hodgkin, melanoma
Eventi infiammatori sistemici	Febbre reumatica, artrite reumatoide, vasculiti, polimiosite, gotta
Patologie endocrine	Tireotossicosi, acromegalia, sindrome di Cushing, sindromi virilizzanti
Flogosi d'organo	Glomerulonefrite, pancreatite, tiroidite, colite ulcerosa, Crohn

Nella maggior parte dei casi la neutrofilia è solo un sintomo di laboratorio nell'ambito di un quadro clinico specifico di malattia; a volte il riscontro è del tutto occasionale in pazienti totalmente asintomatici. L'anamnesi e l'esame clinico inizialmente sono rivolti verso segni rivelatori di una patologia extraematologica (ad esempio, malattia infettiva), mentre la presenza di splenomegalia orienta verso una diagnosi di sindrome mieloproliferativa. La contemporanea alterazione di altri parametri emocromocitometrici rappresenta un indizio a favore dell'esistenza di una malattia ematologica, mentre l'incremento degli indici infiammatori suggerisce una patologia sistemica. L'esame al microscopio ottico della morfologia dei granulociti circolanti è fondamentale in quanto permette di osservare modificazioni del nucleo e dei granulociti citoplasmatici di rilevanza diagnostica in alcune malattie. In alcuni casi è opportuno lo studio della funzionalità granulocitaria. In casi di neutrofilia persistente ed isolata potrà essere necessario l'esame del midollo osseo per il sospetto di sindrome mieloproliferativa o mielodisplastica in fase preclinica. In conclusione, un incremento dei neutrofili può essere espressione di una *pseudoneutrofilia* (dovuta ad aumentata dismissione dal midollo, ad una mobilizzazione del "pool" marginato, alla inibizione della migrazione e della chemiotassi) secondaria in genere al trattamento corticosteroideo. Negli altri casi la diagnosi differenziale della neutrofilia riguarda le diverse condizioni che possono determinarla. Tuttavia è da considerare che in un certo numero di pazienti con neutrofilia isolata non è possibile giungere ad una conclusione diagnostica definitiva.

La **leucemia mieloide cronica** (LMC) è una sindrome mieloproliferativa principalmente dell'età adulta, predominante nel sesso maschile, con una incidenza intorno a circa 2 casi/100.000/anno. È caratterizzata da iperplasia dei precursori mieloidi nel midollo, da screzio mieloide nel sangue periferico e da un marker citogenetico patognomonico, denominato cromosoma Philadelphia. All'esordio della malattia possono essere presenti sintomi legati all'anoma-

la espansione della mielopoiesi (sudorazione e calo ponderale), all'anemia, all'iperviscosità secondaria a leucocitosi e trombocitosi (vertigini, parestesie disturbi visivi, eccetera), alla splenomegalia o alle sue complicazioni (dolore all'ipocondrio sinistro, dispepsia). Spesso la malattia è asintomatica e viene diagnosticata per il riscontro occasionale di alterazioni dei valori emocromocitometrici. Il dato di laboratorio saliente è la leucocitosi quasi sempre al di sopra di 25.000/μL, accompagnata da basofilia ed eosinofilia; l'emoglobina può essere normale o lievemente diminuita; la fosfatasi alcalina leucocitaria è sempre al disotto del valore normale. L'*aspirato midollare* e la *biopsia osteomidollare* mostrano un aumento della cellularità per iperplasia della serie mieloide. Diagnostica è l'analisi citogenetica che rivela la presenza del cromosoma Philadelphia [traslocazione (9;22)] e l'amplificazione mediante PCR del trascritto ibrido corrispondente dimostra la presenza del *gene di fusione bcr-abl* anche nei pazienti Philadelphia negativi.

La storia naturale della LMC prevede, dopo una "fase cronica", l'evoluzione verso la "crisi blastica", spesso preceduta da una fase accelerata. La "crisi blastica" presenta un quadro ematologico simile alla leucemia acuta, caratterizzata da una particolare resistenza alla chemioterapia e da una prognosi sfavorevole. L'intervallo fra la diagnosi e la crisi blastica è di circa 4 anni. Per la presenza di una leucocitosi marcata la diagnosi differenziale viene fatta in prima istanza con le leucemie acute. In particolare le leucemie linfatiche acute possono esordire con leucocitosi, screzio mieloide, valori piastrinici normali e presenza di un tipico cromosoma Philadelphia; tuttavia l'ambiguità del quadro ematologico è solo transitoria e l'analisi molecolare mostra un riarrangiamento bcr-abl che dà luogo alla sintesi di una proteina (p190) diversa dalla p210 tipica della LMC. Le sindromi mielodisplastiche possono mostrare nel sangue periferico delle alterazioni simili alla LMC e nel midollo un aumento della cellularità soprattutto a carico della serie mieloide; ma depongono per la diagnosi di LMC l'assenza nel midollo di blocco maturativo e di alterazioni displastiche, la presenza di megacariociti di dimensioni elevate, raccolti in aggregati e il riarrangiamento bcr-abl. La presenza di quest'ultima anomalia è fondamentale per la diagnosi differenziale con le altre sindromi mieloproliferative, rappresentate dalla policitemia vera, dalla trombocitemia essenziale e dalla mielofibrosi idiopatica.

Linfocitosi

Un incremento del numero assoluto dei linfociti del sangue periferico al di sopra dei valori di normalità (> 4.000/μL) può osservarsi in numerose patologie infettive e soprattutto di natura virale.

In questi casi la funzionalità dei linfociti non risulta alterata e l'immunofenotipo orienta verso una malattia proliferativa di natura policlonale. La linfocitosi di solito rappresenta una specifica risposta a determinate condizioni e disordini.

Le cause di *linfocitosi benigne* possono essere:

A morfologia reattiva	***A morfologia non reattiva***
Mononucleosi (EBV)	Whoopin cough
Infezioni mononucleosi like-syndromes: ➢ infezioni da Citomegalovirus ➢ toxoplasmosi ➢ infezioni da Adenovirus ➢ infezioni da HIV ➢ infezioni da Human herpesvirus-6	Linfocitosi infettiva
Altre infezioni virali: ➢ epatite virale ➢ rosolia ➢ roseola	Stress linfocitario transitorio
Reazione farmacologica	Persistenza linfociti B policlonali

La diagnosi di linfocitosi secondaria alle infezioni virali è di solito esemplificata dalla presenza di elevati titoli anticorpali IgM specifici del virus coinvolto (IgM anti-EBV, IgM anti-CMV, o altro). L'esame emocromocitometrico evidenzia una linfocitosi assoluta e relativa (5.000÷40.000/μL) a volte accompagnata da una anemia e/o piastrinopenia autoimmune. L'esame morfologico dello striscio periferico spesso evidenzia dei linfociti che presentano caratteri di attivazione fino allo stadio immunoblastico (frequente nella mononucleosi). L'esame immunofenotipico delle sottopopolazioni linfocitarie ematiche evidenzia un'inversione del rapporto tra i linfociti CD4 e CD8, alterazione che tende a regredire dopo qualche settimana. Nel caso di infezione da EBV, la concentrazione sierica delle transaminasi risulta elevata, il test di Coombs è positivo nel 3-5% dei casi. Una linfocitosi reattiva si può osservare anche dopo l'assunzione di alcuni farmaci come la fenitoina; in questi soggetti la conta leucocitaria è variabile e spesso la linfocitosi si accompagna ad eosinofilia e neutrofilia. Nello striscio periferico si possono osservare plasmacellule circolanti.

Difficilmente si può trovare un quadro di linfocitosi reattiva dopo una infezione batterica, ad eccezione, forse, della infezione da *Bordetella pertussis* (pertosse) che spesso si manifesta nei bambini scatenando una importante faringite con linfoadenomegalia laterocervicale. La *Bordetella pertussis* sembra produrre un fattore solubile che ha la capacità di accumulare i linfociti, prima a livello del sangue circolante e poi dei linfonodi. All'esame dell'emocromo la

conta linfocitaria raggiunge i 10.000÷30.000/μL, è presente anche neutrofilia. Allo striscio periferico i linfociti sono maturi con cromatina densa e scarso citoplasma; spesso il nucleo può essere clivato e convoluto. Si tratta, allo studio del fenotipo, di linfociti T CD4+.

La linfocitosi da "stress transitoria" si osserva occasionalmente in pazienti con infarto del miocardio, traumi, stato epilettico e altre condizioni patogene acute. In queste condizioni la linfocitosi è moderata, tra i 6.000 e gli 8.000/μL. Si tratta di linfociti maturi e linfociti tipo LGL (large granular lymphocytes).

La "persistenza di linfocitosi policlonale tipo B", è una linfocitosi benigna di più frequente riscontro nelle donne. La causa è sconosciuta, ma c'è una stretta correlazione col fumo di sigaretta. I pazienti sono spesso asintomatici; l'unico segno è dato da una conta linfocitaria assoluta mediamente elevata solitamente non superiore ai 10.000/μL su circa 15.000/μL leucociti totali. La citofluorimetria mostra antigeni di superficie appartenenti alla linea B (CD19+) con un normale rapporto κ/λ.

All'emocromo la concentrazione di emoglobina, la conta piastrinica e i neutrofili sono normali; spesso si riscontra un incremento policlonale delle IgM.

Una situazione di linfocitosi benigna entra spesso in diagnosi differenziale con alcuni disordini linfoproliferativi maligni, più frequentemente con la leucemia linfoblastica acuta (LLA) e la leucemia linfatica cronica (LLC).

Il dubbio deve sussistere quando ci si trova di fronte ad una conta leucocitaria elevata (>30.000/μL). Pertanto l'assenza di specifici anticorpi IgM, l'assenza delle caratteristiche morfologiche dei linfociti tipiche dell'infezione, aiutano ad escludere una eventuale linfocitosi reattiva. In aggiunta, anemia e trombocitopenia sono spesso presenti nelle leucemie acute e assenti o moderatamente lievi nelle forme benigne reattive.

La **leucemia linfoblastica acuta** (LLA) è un'emopatia maligna caratterizzata dalla proliferazione clonale e dall'accumulo di cellule linfoidi immature. La LLA si riscontra più frequentemente nel bambino, nel quale rappresenta la più comune forma di leucemia, ma si riscontra anche negli adulti e anziani. Nell'adulto l'incidenza è di circa 1/100.000/anno, è molto più rara delle leucemie acute mieloidi e costituisce il 20% del totale delle leucemie acute. L'eziologia è sconosciuta anche se alcune sostanze chimiche, fattori genetici e alcuni virus (virus Epstein-Barr nel linfoma di Burkitt) sono responsabili nel determinarne l'insorgenza.

Nell'adulto la LLA è per la maggior parte di tipo B linfocitaria, mentre circa il 20-30% è di derivazione T. Il decorso clinico è molto rapido e, se non trattate, portano rapidamente a morte il paziente. La chemioterapia, oggi, ha notevolmente migliorato la prognosi della malattia,

e mentre nel bimbo si ottiene una guarigione in circa il 70% dei casi, per la maggior parte degli adulti la guarigione non è tuttora possibile. Questa differenza è probabilmente dovuta al fatto che la biologia della malattia nell'adulto, presenta una maggior incidenza di fattori di rischio, come il cariotipo sfavorevole Philadelphia positivo [traslocazione (9;22)] e le condizioni fisiologiche dell'adulto sono comunque peggiori rendendo più problematica la sopportazione della chemioterapia. Tuttavia la diagnosi di LLA non dovrebbe essere eseguita senza che venga prima confermata da un attento esame dello *striscio periferico* in cui sono, di solito, presenti cellule immature, linfoblasti che possono essere distinti morfologicamente in tre gruppi (secondo la classificazione FAB). A questo segue un altrettanto attento esame del *mieloaspirato* che rivela un ricca cellularità midollare e un'infiltrazione massiva da parte di elementi immaturi di aspetto linfoide. L'esame *immunofenotipico* tramite l'uso di anticorpi monoclonali ne consente l'attribuzione alla linea B o T e il rispettivo livello di differenziazione. Lo *studio citogenetico* ha una importante valenza sia diagnostica ma soprattutto prognostica, in particolare per evidenziare anomalie cromosomiche sfavorevoli come le traslocazioni (9;22) e (4;11) o le traslocazioni (8;14), (8;22) e (2;8) tipiche della leucemia di Burkitt. Infine, da non sottovalutare, sono le indagini di *biologia molecolare*, necessarie per evidenziare eventuali riarrangiamenti genici [(BCR/ABL), c-MYC] che hanno un'importanza decisiva agli effetti diagnostici, terapeutici e prognostici. Queste indagini permettono anche di definire il persistere della "malattia minima residua", o la sua ricomparsa, spesso con ampio anticipo rispetto all'esame morfologico.

La diagnosi differenziale con la **leucemia linfatica cronica** (LLC) è generalmente facile e alla portata del medico non specialista. L'età adulta-senile del paziente, la scarsità di sintomi, i reperti dell'esame emocromocitometrico e dello striscio di sangue periferico consentono per lo più l'esclusione di altre condizioni. La LLC è un'emopatia maligna caratterizzata dalla progressiva espansione di piccoli linfociti di derivazione B, apparentemente maturi ma immunoincompetenti, che si accumulano progressivamente nel sangue, nel midollo osseo e negli organi linfoidi. L'*esame emocromocitometrico* evidenzia una leucocitosi con inversione della formula leucocitaria per presenza di linfocitosi di grado variabile, di solito compresa tra 15.000 e 50.000/μL. L'esame microscopico dello *striscio periferico* mostra linfociti di piccole dimensioni e di aspetto maturo, indistinguibili dai linfociti di un soggetto normale. Molti di questi linfociti appaiono come cellule rotte, le cosiddette "ombre di Gumprecht". In più del 50% dei casi è presente ipogammaglobulinemia e iperuricemia. L'*aspirato midollare* e la *biopsia osteomidollare* mostrano un'infiltrazione variabile di linfociti. Infine per una determinazione diagnostica completa, è necessario l'esecuzione dell'*immunofenotipo* dei linfociti circolanti che dimostra una espansione di cellule B (CD19+) che coesprimono CD5, CD23 e immunoglobu-

line a bassa densità con restrizione clonale per le catene leggere (solo κ o solo λ). L'*analisi citogenetica*, non utile ai fini diagnostici in questo caso, evidenzia vari tipi di anomalie, la più frequente delle quali è la trisomia 12.

Leucopenie

La leucopenia è una condizione caratterizzata dalla diminuzione del numero dei leucociti al di sotto di 4.000/μL.

Tale diminuzione si può osservare a carico dei neutrofili o dei linfociti o di entrambi; più frequentemente la leucopenia è caratterizzata da una diminuzione del numero dei neutrofili.

La ***neutropenia*** o ***granulocitopenia*** è una condizione caratterizzata da una diminuzione del numero assoluto dei neutrofili circolanti. Dal momento che la concentrazione dei neutrofili varia notevolmente nel sangue circolante a seconda di età, sesso, razza, attività fisica e momento della giornata in cui viene effettuato il prelievo.

Per convenzione si parla di neutropenia quando il conteggio dei neutrofili in un soggetto adulto di razza bianca è al di sotto di 2.000/μL e di agranulocitosi se il valore è inferiore a 500/μL.

Le neutropenie vengono classificate, in base alla loro eziopatogenesi, in due categorie: ***da diminuita produzione*** a livello del tessuto emopoietico e da ***aumentata distruzione*** periferica.

Nel primo gruppo è frequente osservare una diminuzione del numero dei precursori emopoietici spesso associata ad anomalie di maturazione della serie mieloide; le cause possono essere congenite (neutropenia cicilica e neutropenia cronica benigna) oppure acquisite per malattie intrinseche midollari (emopatie sistemiche come le leucemie, le sindromi mielodisplastiche, l'aplasia midolare, le anemie perniciosiformi) o per tossicità dei farmaci sul compartimento proliferativo emopoietico con meccanismo dose-dipendente o idiosincrasico. Nel secondo gruppo la distruzione dei granulociti avviene preferibilmente a livello periferico secondariamente a risposte immunologiche di tipo cellulare o umorale nell'ambito di malattie autoimmuni (collagenopatie, sindrome di Felty) o di reazioni autoanticorpali spesso scatenate da farmaci.

Alterazioni quantitative dei granulociti neutrofili (neutropenie):

Da diminuita produzione		*Da aumentata distruzione*	
Congenite	Neutropenia ciclica Neutropenia cronica benigna Sindrome di Kostman Associata ad agamma-globulinemia Associata a deficit di trans-cobalamina II Associata a neutropatie congenite	*Ipersplenismo*	
Acquisite	Emopatie sistemiche (aplasie, leucemie, mielodisplasie ecc.) Metastasi midollari di neoplasie non ematologiche Deficit di Vit. B12 o folati Infezioni (mononucleosi, epatite, HIV, gram-negativi, malaria, TBC ecc.) Farmaci: ➢ radiochemiotrapia antineoplastica ➢ cloramfenicolo ➢ fenotiazine ➢ clozapina ➢ antitiroidei ➢ sali d'oro	*Associate a malattie autoimmuni*	LES Artrite reumatoide Sindrome di Sjögren Sindrome di Felty
		Neonatale alloimmune o isoimmune	
		Da attivazione del complemento	Emodialisi By-pass cardiopolmonari Aferesi
		Da farmaci	Analgesici Penicillina Chinidina Procainamide Cefalosporine

La neutropenia determina essenzialmente una suscettibilità alle infezioni sostenuta da germi normalmente presenti sulla cute e sulle mucose delle vie aeree e dell'apparato digerente. Il rischio di queste complicanze è strettamente legato al numero assoluto dei granulociti neutrofili: basso se la conta varia da 1.000 a 2.000/μL, alto se inferiore a 500/μL. In caso di agranuloci-

tosi l'infezione si manifesta con un quadro di setticemia: febbre elevata preceduta da brividi, lesioni orofaringee e anorettali, focolai broncopneumonici. Un'attenta anamnesi del paziente neutropenico permette di valutare la presenza di malattie concomitanti di natura ematologica o immunologica, nonché la precedente esposizione a farmaci; con l'esame obiettivo si valutano la presenza di focolai infettivi soprattutto a livello delle mucose del cavo orale e della regione anale, l'esistenza di una splenomegalia e di altri segni correlati ad una eventuale malattia sistemica.

Gli esami di laboratorio devono anzitutto escludere le pseudoneutropenie che si verificano quando nel sangue esistono paraproteine capaci di aggregare i leucociti o quando il conteggio viene effettuato dopo molto tempo dal prelievo. L'esame emocromocitometrico viene ripetuto più volte per valutare il grado ed il comportamento della neutropenia nel tempo (neutropenia ciclica) nonché per evidenziare la compromissione di altre componenti cellulari (monocitopenia, linfocitopenia) che potrebbero aumentare il rischio infettivo. Altri esami (immunoglobuline, autoanticorpi, fattore reumatoide) sono consigliati nel sospetto di neutropenie immunomediate. Lo studio morfologico del sangue periferico e midollare è importante per identificare le forme di neutropenia secondaria a malattie congenite (neutropatie) o sistemiche (emopatie neoplastiche). In caso di agranulocitosi il quadro midollare varia da una ipocellularità a forme ipercellulari con un blocco maturativo a livello dei promielociti. Infine in presenza di setticemia grave si possono avere segni di coagulopatia da consumo e piastrinopenia. L'obiettivo principale degli esami ematologici sopra citati e dell'esame obiettivo è l'identificazione di malattie sistemiche che compromettono il tessuto midollare. Mentre la raccolta di una attenta anamnesi è utile per correlare la neutropenia alla eventuale somministrazione di farmaci a livello midollare o periferico. Negli adulti, spesso è difficile differenziare una neutropenia cronica benigna da una sindrome mielodisplastica iniziale, pertanto è importante programmare studi di ordine citogenetico e colturale "in vitro".

La **leucemia mieloide acuta** (LMA) è una emopatia neoplastica dovuta all'invasione del midollo e del sangue periferico da parte di precursori emopoietici che presentano un blocco differenziativo e maturativo più o meno completo. Colpisce prevalentemente il sesso maschile ed è più frequente nell'età adulta o avanzata; infatti la sua incidenza, stimata tra 2 e 5 casi/100.000/anno, aumenta progressivamente dopo i 30 anni. Diversi studi epidemiologici indicano una stretta correlazione eziologica tra LMA e agenti mutageni chimici o fisici: elevata è l'incidenza della malattia nei sopravvissuti ad esplosioni nucleari, nei pazienti sottoposti a röntgenterapia e chemioterapia. Un altro fattore eziologico è l'immunodepressione: infatti la LMA insorge con maggior frequenza nei soggetti sottoposti a terapie immunodepressive protratte o affetti da malattie linfoproliferative croniche. L'*esame del mieloaspirato* mostra la sostituzione parziale o completa del parenchima emopoietico midollare da parti di blasti della serie mieloide.

Secondo la classificazione FAB vengono distinte 8 varietà che presentano determinate caratteristiche morfologiche, citochimiche, immunofenotipiche, citogenetiche e cliniche. Gli *esami di laboratorio* presentano quasi sempre anemia e piastrinopenia, pressoché costante è la neutropenia che può accompagnarsi a leucopenia. Altri esami mettono in evidenza una iperuricemia, aumento dell'LDH e per la varietà M3, segni di CID (coagulazione intravascolare disseminata), come l'allungamento del PT e del PTT, il calo del fibrinogeno e l'incremento degli FDP/XDP. Ma la diagnosi di LMA si basa sull'esame del midollo completata dalle indagini citochimiche, immunofenotipiche e citogenetiche. Nella M3 è particolarmente utile per la diagnosi la ricerca della traslocazione cromosomica t(15;17) e del corrispettivo marker molecolare costituito dal riarrangiamento pml-rar-α. La storia naturale della LMA è quella di una malattia che conduce a morte il paziente in poche settimane. Attualmente il decorso è radicalmente mutato nei pazienti giovani, che possono giovarsi di trattamenti aggressivi (chemioterapia), e negli anziani dove la sola terapia di supporto permette di migliorare anche sensibilmente la sopravvivenza. La terapia convenzionale consente la guarigione clinica nel 25-35% dei casi trattati. Risultati più significativi (>50%) si possono ottenere con il trapianto allogenico, a prezzo di una mortalità precoce e di complicanze tardive legate alla "graft versus host desease" (GVHD). La relazione tra LMA e mutageni chimici o fisici ha portato a limitare l'esposizione lavorativa agli idrocarburi aromatici, alla abolizione della röntgenterapia a scopo anti-infiammatorio. Dato che la LMA può insorgere come complicanza secondaria alla radio-chemiotearpia, in alcuni pazienti neoplastici è importante bilanciare l'aggressività terapeutica con l'esigenza di ridurre il rischio leucemico a distanza.

Linfocitopenie

Nell'adulto si parla di linfocitopenia quando la conta dei linfociti totali nel sangue periferico è inferiore a 1.000/μL .

Circa l'80% dei linfociti circolanti è di tipo T CD3+ e circa i due terzi dei linfociti T sono CD4+ (T-helper); la maggioranza dei soggetti con linfocitopenia hanno una carenza del numero assoluto dei linfociti T CD4+.

Le principali condizioni cliniche associate a linfocitopenia sono:

Immunodeficienze congenite	Immunodeficienza severa combinata Aplasia timica congenita Sindrome di Wiskott-Aldrich
Deficienze nutrizionali	Carenza di dieta proteica

Infezioni	Virali (HIV, epatite) Tubercolosi Tifo Sepsi
Malattie autoimmuni	Artrite reumatoide LES Miastenia grave
Malattie sistemiche	Sarcoidosi Insufficienza renale Malattia di Hodgkin
Iatrogene	Radioterapia Chemioterapia Terapia corticosteroidea Anestesia e chirurgia
Idiopatica	T-linfocitopenia CD4+ idiopatica

I segni e sintomi del paziente con linfocitopenia sono quelli legati alla patologia di base. Solitamente pazienti con immunodeficienza umorale e/o cellulare sono soggetti a frequenti infezioni di basso grado o da agenti opportunisti. In questi pazienti è facile il riscontro di neoplasie maligne, soprattutto linfomi.

L'immunodeficienza severa combinata è caratterizzata da una condizione di severa deficienza immunitaria sia cellulare sia umorale. I pazienti sono affetti da frequenti infezioni batteriche, virali, fungine e da protozoi fino dall'età di 3 anni. Pazienti affetti da AIDS hanno frequenti riscontri di infezione soprattutto da agenti opportunisti come la polmonite da Pneumocystis carinii, la polmonite da Mycoplasma o infezioni sistemiche da candida, virus dell'epatite B, citomegalovirus e herpesvirus. Frequente è il riscontro di neoplasie maligne (sarcoma di Kaposi, linfoma) e di malattie autoimmuni (trombocitopenia). Una attenta anamnesi è necessaria per determinare la reale causa o concausa di una condizione di linfocitopenia. La conta leucocitaria con formula leucocitaria e un aspirato midollare permettono di ricercare una eventuale causa ematologica. Importanti sono anche la determinazione quantitativa delle immunoglobuline, l'analisi citofluorimetrica dell'immunofenotipo dei linfociti, test per l'HIV, anticorpi antinucleo (LES) e la biopsia linfonodale (sarcoidosi).

Alterazioni quantitative delle piastrine

Trombocitosi

Per trombocitosi (o piastrinosi) si intende un incremento del numero delle piastrine nel sangue periferico dovuto ad un incremento del numero totale dei megacariociti.

Un incremento del numero delle piastrine nel sangue periferico oltre il valore massimo di riferimento, 400.000/μL, viene definito trombocitosi e distinto in forme lievi per valori inferiori a 600.000/μL, di media gravità se compresi tra 600.000 e 1.000.000/μL, gravi se superiori a 1.000.000/μL.

Le condizioni che si possono associare a piastrinosi sono numerose ed eterogenee, ma sul piano fisiopatologico si possono raggruppare in due gruppi: primarie e secondarie

Classificazione delle piastrinosi.

Primaria	Trombocitemia essenziale Policitemia vera Leucemia mieloide cronica Mielofibrosi con metaplasia mieloide
Secondaria (reattiva)	Emorragica Anemia sideropenica Post-splenectomia Malattie infiammatorie croniche (collagenopatie, vasculiti) Neoplasie Da farmaci: vincristina, eritropoietina ad alte dosi

Le *trombocitemie* appartengono alla categoria delle piastrinosi clonali cioè malattie dovute alla trasformazione neoplastica delle cellule staminali emopoietiche. Si riscontrano soprattutto nelle sindromi mieloproliferative croniche che, oltre alla leucemie mieloide cronica, la mielofibrosi idiopatica e la policitemia vera, comprendono la trombocitemia essenziale (TE) caratterizzata da una prevalente espansione del compartimento megacariocitario, dall'assenza del cromosoma Philadelphia e della fibrosi midollare, dalla normalità della massa eritrocitaria. L'eziopatogenesi di tale malattia sembra essere legata ad un'alterazione dell'asse Trombopoietina (TPO)-recettore MPL; infatti nei modelli sperimentali murini la super-espressione del gene MPL causa una sindrome mieloproliferativa analoga a quella della specie umana ed in alcuni pazienti sono stati dimostrati livelli elevati di TPO con una riduzione quantitativa del recettore MPL. Analoga alterazione dell'asse TPO-recettore MPL sarebbe alla base anche della *trombocitosi famigliare*, malattia genetica rara, a trasmissione dominante autosomica. Nelle trombocitosi reattive il ruolo delle citochine è determinante, soprattutto nelle forme secondarie ad infezioni, malattie infiammatorie croniche (collagenopatie, vasculiti), neoplasie e condizioni sideropeniche. Nella maggior parte di questi casi il mediatore che determina l'incremento dei livelli plasmatici, indipendentemente dalle necessità ematiche, è l'interleuchina-6. Quest'ultima viene prodotta da monociti, T-linfociti e cellule endoteliali, che a loro volta possono essere stimolati da altri mediatori della risposta infiammatoria come l'interleuchina-1 e

TNF-α. Nei pazienti con eventi trombotici ed emorragici sono state evidenziate alterazioni a carico della funzionalità piastrinica, della coagulazione e della fibrinolisi, dell'endotelio e dei leucociti, che probabilmente interagiscono con i fattori individuali di rischio aterosclerotico. Le piastrine presentano spesso anomalie qualitative con alterazione dei granuli e delle membrane ed un'iperaggregabilità da trombina che si accompagna ad alterazioni del citoscheletro. Nei pazienti trombocitemici le piastrine vengono consumate rapidamente nel circolo periferico (la sopravvivenza delle piastrine marcate con ^{51}Cr è significativamente diminuita), in quanto aderiscono alle superfici endoteliali con maggiore avidità non solo rispetto ai soggetti normali ma anche a quelli portatori di trombosi primitivamente vascolari senza trombocitosi.

Trombocitopenie

Una piastrinopenia si evidenzia quando il numero delle piastrine circolanti è inferiore a 150.000/μL

Tuttavia una piastrinopenia è grave per valori inferiori a 20.000/μL, livello al di sopra del quale è rara l'insorgenza di emorragie, a meno di un coesistente deficit di funzione piastrinica o di altri difetti emostatici. L'intuitiva correlazione tra rischio trombotico e piastrinosi da un lato, e tra rischio emorragico e piastrinopenia dall'altro, non si rivela sempre vera; esistono infatti alcune situazioni nelle quali questo rapporto appare addirittura invertito; per esempio si possono verificare emorragie in corso di sindromi mieloproliferative che decorrono con numero di piastrine elevato, e viceversa trombosi in corso di piastrinopenia come quelle in corso di trattamento eparinico. Una corretta classificazione delle piastrinopenie deve tenere conto degli aspetti fisiopatologici che stanno alla base di tale condizione. Generalmente vengono individuate come cause una ridotta o alterata produzione da parte del midollo (congenita ereditaria o acquisita), un consumo piastrinico periferico non immuno-mediato, una iperdistruzione periferica su base immune, un sequestro periferico o un eccessivo supporto trasfusionale.

Classificazione delle piastrinopenie.

Da ridotta produzione	Ereditarie e congenite (sindrome di Fanconi) Acquisite (anemia aplastica, neoplasia, farmaci mielotossici, infezioni virali)
Da iperdistruzione periferica su base non immune	Porpora trombotica trombocitopenica Emangiomi Farmaco indotte Veleno di serpente Sindrome da insufficienza respiratoria acuta (ARDS) Turbolenza circolatoria (by-pass cardiopolmonare, stenosi aortica)

Da iperdistruzione periferica su base immune	Porpora trombocitopenica idiopatica (morbo di Werlhof) Infezione da HIV Farmaco indotta Eparina indotta Porpora post-trasfusionale
Da sequestro	Ipersplenismo
Da emodiluizione	Ipotermia Conseguente ad abbondante supporto trasfusionale con globuli rossi concentrati
Pseudopiastrinopenia	

È importante ricordare che la metodologia automatica nel conteggio delle piastrine, per quanto moderna e perfezionata, non è esente da errori e non deve mai sostituirsi al ragionamento clinico. È necessaria una verifica microscopica della forma e del numero di piastrine presenti nello striscio di sangue.

A volte il numero delle piastrine è sovrastimato, perché vengono conteggiate come piastrine particelle di dimensioni simili (schistociti, batteri, inclusi intracellulari). Oppure può verificarsi che piastrine di dimensioni aumentate, o più spesso aggregati piastrinici, non vengano conteggiati come tali, per una particolare reattività delle piastrine all'anticoagulante EDTA. In questo caso si parla di falsa piastrinopenia o pseudopiastrinopenia.

Gli studi di cinetica piastrinica, condotti con l'impiego di piastrine marcate con traccianti radioisotopici (^{51}Cr-sodio cromato e più recentemente con ^{111}In-oxina), hanno consentito di valutare la sopravvivenza media piastrinica, cioè la durata di permanenza in circolo delle piastrine marcate e reinfuse, che normalmente è intorno ai 9 giorni. Tale parametro può essere utile nei casi in cui si debba distinguere tra una piastrinopenia da iperdistruzione periferica e una piastrinopoiesi inefficace, condizioni nelle quali il numero dei megacariociti midollari può essere parimenti aumentato. L'utilizzo della gamma-camera ha permesso inoltre di valutare la sede prevalente del sequestro piastrinico (splenica, epatica o diffusa), informazione utile dal punto di vista diagnostico e terapeutico.

Un altro parametro cinetico, importante per valutare la quantità di piastrine prodotte giornalmente, è la determinazione del "turnover" piastrinico: si calcola dividendo il numero delle piastrine/μL per il numero di giorni della sopravvivenza piastrinica. Molto recentemente è stato possibile, mediante metodiche citofluorimetriche, valutare la percentuale delle piastrine reticolate, un parametro simile ai reticolociti nell'eritropoiesi, che da un contributo, forse più semplice e diretto, allo studio della capacità di produzione piastrinica da parte del midollo osseo.

Alterazioni congenite e acquisite della coagulazione

Quando nel sistema esiste un difetto di fattori che normalmente sono coinvolti nel sistema procoagulante o una prevalenza di fattori che si oppongono all'emostasi, si determina la ***diatesi emorragica***.

Mentre l'occlusione di un vaso, in particolari situazioni patologiche, determina ischemia distrettuale dell'organo interessato (trombosi arteriosa) o stasi (trombosi venosa). Nelle malattie emorragiche da difetti plasmatici, si riconoscono forme *congenite* (malattia di von Willebrand, sindromi emofiliche), e forme *acquisite* (varianti acquisite di malattia di von Willebrand e di emofilia, ipovitaminosi K, insufficienza epatica, coagulazione intravascolare disseminata, anticoagulante lupico).

La clinica è caratterizzata da emorragie tessutali (ematomi muscolari, intraparenchimali), emartri, sanguinamenti post-chirurgici e post-traumatici. La malattia di von Willebrand presenta aspetti clinici e di laboratorio duplici, associando un difetto di adesione piastrinica a un difetto coagulativo; analogamente i gravi deficit di fibrinogeno presentano un disturbo della coagulazione associato a un deficit di aggregazione. Per l'esplorazione del processo emocoagulatorio, alcuni test di laboratorio di facile esecuzione e sufficiente sensibilità eseguibili su plasma povero di piastrine, sono utili per lo screening delle sindromi emorragiche.

Il ***tempo di tromboplastina parziale attivato*** (***aPTT***) esplora elettivamente i fattori antiemofilici della via intrinseca dell'attivazione del FX (FXII, FXI, FIX e FVIII), oltre ai FII, FV, FX e al fibrinogeno della via comune. L'interpretazione dei risultati è qui riassunta:

- l'aPTT è un test sensibile ai difetti coagulativi del sistema intrinseco, in particolare alla carenza del F VIII;
- è sensibile al deficit di alcuni fattori implicati nella fase di contatto del sistema intrinseco quali la precallicheina e l'HMW chininogeno;
- rappresenta uno dei metodi per il controllo della terapia eparinica;
- è sensibile all'azione degli anticoagulanti circolanti, "tipo lupus", ad azione inibente sul sistema intrinseco della coagulazione.

Il ***tempo di protrombina*** (***PT***) è sensibile ai difetti della via di attivazione estrinseca del FX e della via comune della coagulazione (FII, FV, FVII, FX). Il PT ha un importante valore diagnostico nei seguenti casi:

- carenze congenite di fattori del complesso protrombinico. In genere questa carenza è di un singolo fattore;
- carenze acquisite di fattori del complesso protrombinico. In genere uno o più fattori associati, in seguito ad epatopatie o deficienze di vitamina K;

➢ per il monitoraggio della terapia anticoagulante orale, in quanto sensibile ai fattori della vitamina K dipendenti indotta dalla terapia stessa.

Il PT viene, oggi, espresso in ***INR***, ossia in *International Normalized Ratio,* che è il rapporto tra il tempo di coagulazione del plasma in esame e il tempo del plasma o del pool di plasmi normali di controllo, elevato all'ISI (*International Sensitivity Index*). L'effetto innovatore dell'INR consiste nel fatto che, pur permettendo ad ogni laboratorio di scegliere la tromboplastina da usare, permette di compensare la diversa sensibilità delle tromboplastine commerciali, di considerare dei risultati di riferimento standard, e quindi di indicare degli intervalli terapeutici uguali per tutti. Il monitoraggio dell'INR viene oggi utilizzato per assicurare al paziente sottoposto a terapia anticoagulante un adeguato dosaggio terapeutico. Secondo recenti studi, è emerso che il monitoraggio della variabilità dell'INR è indicata per anticipare un rischio emorragico nel paziente durante trattamento con cumarinici, più che un rischio tromboembolico.

Il ***tempo di trombina*** (***TT***) esplora la fase finale della coagulazione ed è allungato nelle deficienze organiche o funzionali del fibrinogeno, oltre che in presenza di anticoagulanti antitrombotici naturali o terapeutici e di prodotti di degradazione del fibrinogeno (FDP).

L'approccio diagnostico delle malattie emorragiche mediante il PT, aPTT e TT, può essere schematizzato nella seguente tabella:

PT	***aPTT***	***TT***	***Significato***
Normale	*Allungato*	*Normale*	Carenza di FXII, FXI, FIX, FVIII
Allungato	*Normale*	*Normale*	Carenza di FVII
Allungato	*Allungato*	*Normale*	Carenza di fibrinogeno, protrombina, FV, FX
Allungato	*Allungato*	*Allungato*	Carenza di fibrinogeno, presenza di FDP o di anticoagulanti antitrombinici.

Il ***fibrinogeno*** ha un'importanza notevole sia nel sistema coagulativo sia in quello fibrinolitico. La sua determinazione è indispensabile nella coagulazione intravascolare disseminata (CID) e nelle condizioni pretrombotiche. In generale le alterazioni del fibrinogeno si suddividono in:

➢ alterazioni quantitative (afibrinogemia, iperfibrinogemia, ipofibrinogemia);
➢ alterazioni qualitative (disfibrinogemia).

Un aumento del fibrinogeno si può avere, quando è in corso un processo infiammatorio.

La ***malattia emorragica da anticoagulanti circolanti*** è dovuta alla comparsa di un anticorpo neutralizzante diretto contro un fattore della coagulazione in pazienti precedentemente coagulopatici. In genere si tratta di un anticorpo diretto contro il fattore VIII che può sporadicamente comparire nel post-partum o in associazioni a patologie autoimmuni (LES, artrite reu-

matoide), ematologiche (mieloma multiplo e gammopatie monoclonali) e neoplasie. La comparsa dell'inibitore comporta una diatesi emorragica spesso grave. Più raramente sono segnalati anticorpi diretti contro altri fattori (IX, XI, V, XIII).

La ***malattia da anticoagulante tipo lupico*** (***LA***) è una condizione caratterizzata dalla presenza di un anticorpo che interferisce con le reazioni della coagulazione in cui sono coinvolti i fosfolipidi, determinando un prolungamento di tutti i test in vitro dipendenti da questi, in associazione ad una diatesi di tipo trombofilico in vivo (per attivazione piastrinica, danno endoteliale). Indicativo della presenza di LA è un prolungamento dell'aPTT: test più sensibili sono il kaolin clotting time (KCT) e il PTT modificato eseguito con il veleno di vipera di Russel.
Oltre alla LA, esistono altre situazioni di anomalie dell'emostasi in cui si riscontra una predisposizione alla trombosi. Sono indicate come cause di trombosi condizioni geneticamente determinate come la *carenza di antitrombina III* (AT III), la *carenza di proteina C* e la *carenza di proteina S*.

Un ***deficit di AT III*** si riscontra nei seguenti casi:

- deficit ereditari: la carenza ereditaria è trasmessa con un meccanismo di tipo autosomico dominante. Si manifesta con trombosi fin dall'età giovanile;
- deficit acquisiti: epatopatie;
- coagulazione intravascolare disseminata (CID): in cui si verifica una coagulopatia da consumo e ipereattività trombinica, con una diminuzione dei livelli di AT III.

Un'***alterazione quantitativa o qualitativa della proteina C*** è associata ad una storia di episodi tromboembolici ricorrenti in alcuni pazienti. La maggioranza dei pazienti ha livelli pari a circa la metà del normale, e il difetto è trasmesso dai genitori ai figli di entrambi i sessi. La prevalenza del difetto di proteina C tra pazienti di età inferiore ai 45 anni con manifestazioni trombotiche a genesi sconosciuta è compresa tra il 5% e l'8%.

La carenza di proteina C è decisamente più frequente della carenza di AT III, e uno studio eseguito nei donatori di sangue ha permesso di calcolare una prevalenza pari a 1 su 300 individui. Da ciò si deduce che solo una parte dei soggetti con ridotti livelli di proteina C manifesta disordini trombotici.

Nelle forme acquisite di deficit di proteina C, la manifestazione peculiare è la necrosi cutanea indotta da cumarinici, caratterizzata da trombosi progressive nella microcircolazione della cute. È necessario eseguire test sia funzionali sia immunologici per lo screening di questi soggetti.

Soggetti con ***carenza di proteina S*** presentano un rischio significativo di sviluppare episodi tromboembolici venosi. La prevalenza del deficit di proteina S nella popolazione generale (1 su 20.000), e la frequenza in pazienti con trombosi venose giovanili (5-8%), sono simili a quelle della carenza di proteina C.

La deficienza di proteina C o di proteina S, per mancata inattivazione dei fattori V e VIII attivati, rappresenta un importante fattore di rischio per la trombosi venosa.

La ***mutazione del gene del fattore V*** (***G1691→A***) e la ***mutazione del fattore V*** (***fattore V Leiden***), induce uno stato di resistenza alla proteina C attivata (APC-R), condizione piuttosto frequente, con una prevalenza stimata intorno al 5% nella popolazione generale europea, e un rischio di trombosi di circa 5-10 volte per gli eterozigoti e di circa 50-100 volte per gli omozigoti. Un problema che ricorre con frequenza nella diagnosi di carenza di proteina C e proteina S è che i livelli delle due proteine sono ridotti dagli antagonisti della vitamina K, e la maggior parte dei pazienti con trombosi venose ricorrenti è in trattamento con anticoagulanti orali a lungo termine. Nella pratica clinica, si considera diagnostico nei pazienti trattati con antagonisti della vitamina K il riscontro di una riduzione del rapporto proteina C o proteina S con i fattori II o X. Infine una condizione relativamente frequente, circa l'1% della popolazione, è l'eterozigosi per il gene dell'omocisteina. Ne consegue l'***iperomocisteinemia moderata*** che si associa ad una aumentata incidenza di trombosi venose e arteriose probabilmente dovute ad un danno endoteliale che promuove l'aterogenesi e attiva la coagulazione, e inibizione della fibrinolisi.

Applicazioni citofluorimetriche in ematologia

Lo studio dell'immunofenotipo dei linfociti, ossia dei marcatori cellulari di superficie, è oggi ampiamente utilizzato grazie all'introduzione della citofluorimetria (CFM), la quale è una metodica che consente la misurazione delle caratteristiche fisiche e/o chimiche di particelle microscopiche. La CFM è una metodica utilizzata per l'analisi dell'espressione cellulare di alcune molecole e del contenuto di DNA, per il monitoraggio di alcuni eventi biologici e per lo studio dinamico di alcune caratteristiche cellulari. La sua applicazione clinica e di laboratorio è ampiamente conosciuta nei settori dell'*immunologia* (lo studio e la classificazione delle immunodeficienze, il monitoraggio della terapia immunosopressiva) e dell'*ematologia* (caratterizzazione e classificazione delle leucemie acute, croniche, dei linfomi e dei mielomi).

L'***immunofenotipo***, insieme allo studio citologico, citogenetico e di biologia molecolare, è oggi considerato indispensabile nella diagnosi e nel monitoraggio di diverse malattie ematologiche. L'utilizzo di un adeguato pannello di anticorpi monoclonali, viene oggi proposto anche per la valutazione prognostica dei pazienti e per la determinazione della malattia minima residua. Gruppi cooperativi internazionali hanno caratterizzato numerosi anticorpi e quelli che riconoscono lo stesso antigene sono attribuiti ad un gruppo differenziativo identificato da un numero che segue la sigla CD. La CFM presenta il vantaggio di essere una metodica rapida e precisa riuscendo a valutare, potendone identificare la positività, un gran numero di cel-

lule. È anche possibile identificare la co-espressione di tre antigeni e di quantificarne l'espressione. I risultati di citofluorimetria sono più precisi se l'analisi viene eseguita su una popolazione cellulare anomala inizialmente selezionata utilizzando una procedura conosciuta come "gating", utilizzando l'espressione del CD45 (antigene leucocitario comune) con analisi di dispersione della luce. L'espressione del CD45 aumenta con la maturità delle cellule ed anche la dispersione della luce aumenta nelle cellule più mature. Sono stati proposti numerosi pannelli standardizzati per la tipizzazione immunologica iniziale di una leucemia acuta. Ma oltre al suo ruolo nel riconoscimento delle leucemie acute mieloide, linfoide e bifenotipica, la tipizzazione immunologica spesso mette in evidenza un fenotipo aberrante. Ciò può essere utilizzato per il monitoraggio della malattia minima residua dopo l'induzione della remissione. Marcatori immunologici che identificano una LAM e la differenziano da una LAL includono la positività agli anticorpi CD13, CD33, CD65 e CD 117 e la positività ad anticorpi che riconoscono la proteina mieloperossidasi (MPO), anche nella sua forma di proenzima.

La tipizzazione immunologica conferma la diagnosi di LAL e suddivide le leucemie linfoidi in quelle di linea B e quelle di linea T.

Gli anticorpi monoclonali utili per l'identificazione dei blasti di linea B sono il CD19, il CD79a e il CD22. Il CD3 è l'anticorpo più utilizzato e specifico per i blasti di linea T, e anche il più sensibile nella determinazione degli antigeni citoplasmatici. Simile specificità hanno inoltre gli anti-TCR$\alpha\beta$ e gli anti-TCR$\gamma\delta$. Con le tecniche di tipizzazione immunologica attualmente utilizzate meno dell'1% di casi di leucemia acuta non può essere classificato come LAL, LAM o leucemia bifenotipica; tuttavia esistono dei casi le cui cellule leucemiche non presentano marcatori linea-specifici che possono essere definiti come "non classificabili" o come leucemia acuta indifferenziata della cellula staminale. Tali forme esprimono CD34 e HLA-DR e possono esprimere TdT e CD38. Non esprimono marcatori specifici per la linea mieloide, né marcatori specifici della linea linfoide.

Riassumendo diciamo che lo studio dei markers immunologici nelle sindromi proliferative croniche e nelle leucosi acute, permette di:

- distinguere la leucemia linfoblastica acuta/immatura (TdT+) e disordini linfatici cronici con linfociti maturi (TdT-);
- caratterizzare i linfociti B o T. Nei disordini delle cellule B, i markers permettono di evidenziare anche la clonalità e quindi la differenziazione di una linfocitosi reattiva da una malattia monoclonale (espressione di k/λ);
- confermare la diagnosi di un particolare tipo di malattia;
- stabilire l'entità della "malattia minima residua" dopo terapia citostatica.

Cenni interpretativi sulle analisi di immunologia

(M. Gerosa, P. Riboldi)

Le alterazioni del sistema immunitario si possono schematicamente suddividere in due gruppi a seconda che si manifestino con una ridotta funzione del sistema oppure con una risposta esaltata. Nel primo gruppo troviamo le **immunodeficienze**, primitive e secondarie, caratterizzate da una maggiore suscettibilità alle infezioni. Nel secondo gruppo vi sono invece le patologie caratterizzate da una reazione da **ipersensibilità** nei confronti di antigeni esogeni (ad esempio, malattie allergiche), oppure da una perdita di tolleranza nei confronti di antigeni endogeni, che porta allo sviluppo delle **patologie autoimmuni**.

Immunodeficienze

Le immunodeficienze **primitive** sono un gruppo di malattie congenite, dovute a differenti difetti genetici che precludono il corretto funzionamento di uno o più elementi del sistema immunitario. Sono piuttosto rare ed hanno quasi sempre una trasmissione ereditaria di tipo mendeliano, frequentemente legata al cromosoma X. Più frequenti sono invece le immunodeficienze **secondarie,** che possono conseguire a malnutrizione, trattamenti terapeutici, patologie infettive, neoplastiche, metaboliche e patologie d'organo croniche (vedi Tab. 6). La classificazione delle immunodeficienze, primitive e secondarie, si basa sullo stipite cellulare o sistema biologico coinvolto dal difetto, che può riguardare l'immunità naturale oppure l'immunità specifica.

Difetti dell'immunità naturale

Comprendono deficit quantitativi o funzionali dei fagociti e alterazioni del sistema complementare. Si manifestano clinicamente con infezioni ricorrenti, più frequentemente da batteri piogeni oppure da altri microrganismi extracellulari. Nelle tabelle 1, 2, 3 e 4 vengono forniti elementi classificativi e accenni sui singoli quadri clinici.

Tabella 1. ***Difetti delle cellule fagocitiche: classificazione***

Quantitativi	• Neutropenie congenite	- Sindrome di Kostmann - Neutropenia cronica benigna - Neutropenia ciclica - Altre
	• Neutropenie acquisite	- Farmaci - Patologie ematologiche - Deficit di vitamina B12 e folati - Infezioni
Qualitativi	• Deficit primitivi dei fagociti	- Deficit di mieloperossidasi - Malattia granulomatosa cronica - Sindrome di Chediak-Higashi - Deficit di adesione leucocitaria I - Deficit di adesione leucocitaria II - Difetto dei granuli specifici
	• Associati ad altre patologie	- Leucemie acute - Diabete - Drepanocitosi - Altre
	• Iatrogeni	- Corticosteroidi - FANS - Colchicina - Antibiotici - Etanolo - Altri

Tabella 2. ***Principali difetti congeniti dei fagociti: quadri clinici***

Patologia	*Difetto genetico o molecolare*	*Difetto cellulare*	*Caratteristiche cliniche*
Neutropenia severa congenita (Sindrome di Kostmann)	Sconosciuto	Arresto della maturazione dei PMN allo stadio di promielociti	Infezioni batteriche severe fin dalla prima infanzia, quali onfalite, ascessi sottocutanei, gengiviti, IVU, polmoniti
Neutropenia cronica benigna	Sconosciuto	↓↓ del numero di PMN nel sangue periferico senza sintomi clinici	Lievi infezioni per lo più localizzate alla cute e alle mucose
Neutropenia ciclica	ELA2, gene che codifica per elastasi dei neutrofili	Oscillazioni cicliche regolari, ogni 21 gg, nel n° di PMN, monociti, linfociti e PLT	Infezioni cicliche (ogni 21 gg) a carico di cute, cavo orale, faringe
Malattia granulomatosa cronica	Diverse subunità del citocromo p_{-558} (vedi tab. 3)	↓↓↓ produzione di radicali liberi dell'ossigeno	Infezioni da microrganismi catalasi + (Stafilococchi, Candida, bacilli gram -). Ascessi polmonari, cutanei ed epatici, linfoadeniti suppurative, osteomieliti.
Deficit di mieloperossidasi	Difetti trascrizionali o post-trascrizionali di mieloperassidasi su cromosoma 17 (q11-21, q22-24, q21.3-23)	↓↓↓ contenuto di mieloperossidasi in monociti e neutrofili	Asintomatica nella maggior parte dei casi. Infezioni da Candida soprattutto in caso di fattori di rischio aggiunti quali diabete
Sindrome di Chediak-Higashi	LYST, gene (1q43) che codifica per una proteina citoplasmatica regolatrice del traffico lisosomiale	Lisosomi giganti nei GB, melanosomi giganti nei melanociti, ↓↓ capacità battericida dei neutrofili, perdita citotossicità di CTL ed NK	Infezioni ricorrenti specialmente da S. Aureus, parziale albinismo, neuropatia periferica, grave periodontopatia, malattie linfoproliferative

Patologia	*Difetto genetico o molecolare*	*Difetto cellulare*	*Caratteristiche cliniche*
Deficit di adesione leucocitaria tipo I	CD18 - subunità β delle β_2-integrine su 21q22.3	Difetto di chemiotassi e di adesione da parte dei neutrofili	Ricorrenti infezioni necrotiche, incapacità di produrre pus, neutrofilia periferica, ritardato distacco del cordone ombelicale
Deficit di adesione leucocitaria tipo II	Fucosilazione dei carboidrati, con incapacità di sintetizzare il ligando $Lewis^x$ per le selectine	Difetto di chemiotassi e di adesione da parte dei neutrofili	Neutrofilia con infezioni ricorrenti
Difetto dell'asse IFN-γ/IL-12	Ligand-binding chain o signaling chain del recettore per IFN-γ, catena β_1 del recettore per IL-2, catena β_2 di IL-2	Incapacità di formare granulomi, ridotta risposta ad alte dosi di IFN-γ	Maggiore suscettibilità alle infezioni da microrganismi intracellulari, specialmente micobatteri. Osteomielite
Difetto dei granuli specifici	C/EBP∈ gene che codifica per un fattore di trascrizione	Assenza di granuli specifici secondari nei neutrofili, alterazione della chemiotassi dei neutrofili e dei meccanismi battericidi	Infezioni ricorrenti cutanee, mucose e polmonari

Tabella 3. ***Difetti molecolari della Malattia Granulomatosa Cronica***

Proteina	*Trasmissione*	*Locus*	*Frequenza %*
gp91-phox (subunità β)	X	Xp21.1	56
p22-phox	AR	16q24	5
p47-phox	AR	7q11.23	33
p67-phox	AR	1q25	5

Tabella 4. ***Difetti del sistema complementare***

Deficit	*Localizzazione cromosomica*	*Caratteristiche cliniche*
Via classica		
C1q	1p	Sindrome simil-lupica
C1r /C1s	12p /12p	Sindrome simil-lupica
C4	6p	Sindrome simil-lupica
C2	6p	Sindrome simil-lupica
C3	19q13	Infezioni piogeniche ricorrenti, sindrome simil-lupica
C5	9q	Infezioni da Neisseriae
C6	5q	Infezioni da Neisseriae
C7	5q	Infezioni da Neisseriae
C8γ, C8α	1p, 9q	Infezioni da Neisseriae
C8β	1p	Infezioni da Neisseriae
C9	5p	Infezioni da Neisseriae
Via alterna		
Properdina	Xp	Infezioni da Neisseriae
Fattore D	?	Infezioni da Neisseriae
Proteine regolatorie		
Inibitore di C1	11q	Angioedema ereditario
DAF	1q	Emoglobinuria parossistica notturna (PNH)

Diagnosi dei deficit dei fagociti e del complemento

L'***esame emocromocitometrico con formula leucocitaria*** evidenzia riduzioni o aumenti del numero assoluto dei granulociti neutrofili e dei monociti nel sangue periferico ed è quindi utile nella diagnosi delle immunodeficienze caratterizzate da difetti *quantitativi* dei fagociti.

La diagnosi delle patologie conseguenti a difetti *qualitativi* si basa sullo studio delle funzioni dei fagociti in vitro, quali la chemiotassi, la fagocitosi, il burst ossidativo e l'espressione di recettori di membrana. Questa valutazione funzionale è talvolta preliminare e complementare alla definizione del difetto genetico alla base della patologia, quando questo è noto, mediante tecniche di ***biologia molecolare.***

Lo studio della ***chemiotassi*** valuta la migrazione dei polimorfonucleati (PMN) o dei monociti attraverso filtri posti in camere di migrazione composte da due compartimenti, il superiore contenente la sospensione di cellule fagocitiche e l'inferiore contenente il mezzo chemiotattico, separati da una membrana con pori di dimensioni inferiori al diametro cellulare. L'esame permette di studiare sia la risposta chemiotattica dei fagociti del paziente, sia l'attività chemiotattica del siero in esame. Nel primo caso una sospensione di fagociti del paziente è messa a contatto con sostanze chemiotattiche standard, quali N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), oppure un pool di sieri normali attivato con Zymosan (per ottenere chemioattrattanti complemento-derivati, prevalentemente C5a). Nel secondo caso una sospensione di fagociti normali viene posta in camera di filtrazione con il siero del paziente attivato con Zymosan. I risultati dell'esame si esprimono come distanza massima percorsa dalle cellule nello spessore del filtro, oppure come numero di cellule per campo microscopico presenti all'ultimo piano del filtro. Un difetto lieve-moderato di chemiotassi è di riscontro frequente in quanto associato a numerose patologie o secondario a trattamenti farmacologici. Raramente questi difetti hanno valore clinico. Un'attività chemiotattica inferiore al 40% rispetto ad un controllo normale si può accompagnare a manifestazioni cliniche.

La funzione fagocitica può essere valutata con il ***test morfologico di fagocitosi di Candida albicans***. Uguali volumi di sospensione di neutrofili o monociti, siero e sospensione di C. albicans vengono incubati. Successivamente vengono allestiti vetrini colorati con May-Grunwald-Giemsa. L'osservazione al microscopio ottico valuta la *percentuale di fagocitosi*, o il numero di cellule fagocitanti almeno un lievito e l'*indice fagocitico*, ossia il numero medio di lieviti fagocitati per cellula. La capacità opsonizzante del siero di un paziente è studiata con la stessa metodica utilizzando concentrazioni scalari del siero in esame e fagociti di un controllo sano. La capacità fagocitica può essere compromessa in situazioni quali la LAD I per assenza del recettore di membrana CR3 (CD11b/CD18) implicato in questo test di fagocitosi o, ancora, nei difetti del sistema complementare nei quali sia compromessa la produzione di opsonine termolabili (C3b in particolare).

La ***chemiluminescenza*** valuta il *burst* ossidativo nei neutrofili e nei monociti e la produzione di radicali liberi ad esso conseguente. Il metabolismo ossidativo si associa alla generazione di energia luminosa, che è notevolmente amplificata dall'utilizzo di substrati come il luminolo e la lucigenina. Il test consiste quindi nella rilevazione con un apposito apparecchio, il luminometro, dell'energia luminosa prodotta dai fagociti spontaneamente e dopo aggiunta di sostanze attivanti quali Zymosan opsonizzato e PMA (forbolo miristato acetato). Il test permette una diagnosi rapida di *malattia granulomatosa cronica* (assenza totale di chemiluminescenza) e consente di sospettare un *deficit di mieloperossidasi* (difetto parziale di chemiluminescenza) che andrà confermato con un dosaggio diretto dell'enzima.

Infine, l'***immunofluorescenza indiretta*** (con anticorpi monoclonali specifici) e analisi citofluorimetrica permette di valutare l'espressione di membrana del complesso molecolare CD11/CD18, assente nella LAD I, e dell'antigene CD15, assente nella LAD II.

Il ***sistema complementare*** può essere studiato con il dosaggio quantitativo o funzionale dei singoli fattori. Nella comune pratica clinica vengono misurati i livelli dei fattori ***C3, C4*** e ***C1INH***. La funzione del complemento in toto è studiata con la determinazione del ***CH50***, che misura l'attività emolitica totale del sistema complementare, attivato attraverso la via classica. Il ***C1INH*** viene dosato anche funzionalmente nei casi in cui a fronte di un quadro clinico suggestivo per edema angioneurotico si riscontra un livello di ***C1INH*** non significativamente ridotto.

Difetti primitivi a carico dei linfociti B, T e immunodeficienze combinate

Sono patologie congenite che si manifestano entro il primo anno di vita (Tab. 5). Alcune (ATM, Di George, Wiskott-Aldrich, sindrome da iper-IgE) si accompagnano a manifestazioni cliniche e alterazioni di laboratorio che esulano dall'interessamento del sistema immunitario e riflettono il ruolo del gene interessato nello sviluppo di altri stipiti cellulari. Le immunodeficienze che possono manifestarsi in età adulta e che sono relativamente più frequenti sono il deficit selettivo di IgA, in assoluto la più frequente con un tasso stimato di 1:700, e la ipogammaglobulinemia comune variabile. Tutte queste patologie si manifestano con infezioni recidivanti o cronicizzanti dovute a batteri, virus, miceti e agenti opportunisti. Altre manifestazioni comprendono lo sviluppo di malattie autoimmuni e di neoplasie.

Tabella 5 Difetti primitivi dei linfociti B, T e combinati: classificazione

Patologia	***CD3 Linfociti T***	***CD4 T helper***	***CD8 CTL***	***CD16 NK***	***CD20 Linfociti B***	***Ig***	***Gene e Prodotto***
Agammaglobulinemia di Bruton	N	N	N	N	↓↓↓↓	↓↓↓↓	Bruton tirosin-chinasi su Xq21.3
Agammaglobulinemia autosomica recessiva	N	N	N	N	↓↓↓↓	↓↓↓↓	Catena μ su 14q32.3 λ5/ 14 del B cell receptor su 22q11.2 CD79a su 19q13.2
Deficit selettivo di IgA	N	N	N	N	N	IgA ↓↓↓ IgG,IgM N	Sconosciuto

Patologia	*CD3 Linfociti T*	*CD4 T helper*	*CD8 CTL*	*CD16 NK*	*CD20 Linfociti B*	*Ig*	*Gene e Prodotto*
Deficit immunoglobulinico selettivo	N	N	N	N	N	IgG ↓ oppure IgE	Geni della catena pesante delle Ig su 14q32.3
Immunodeficienza comune variabile	N	N	N	N	N	↓↓↓	Sconosciuto
Sindrome da iper-IgM	N	N	N	N	N	IgM ↑ IgA, IgG ↓↓	CD40L su Xq26.3-27.1
Sindrome di DiGeorge	↓↓	↓↓	↓↓	N	N - ↑	N - ↓	Difetto embriogenetico III e IV tasca faringea
Atassia-teleangectasia	↓	↓	↓	↓	N	IgA↓ IgG ↓	ATM su 11q22.3
Sindrome di Wiskott-Aldrich	↓	↓	↓	N	N	N	Proteina di WA su Xp11.22
Difetti dei geni del complesso CD3	↓↓	N	N	N	N	N-↓	catena γ o ε del CD3 su 11q23
SCID X-linked	↓↓↓	↓	↓	↓↓↓ ↓	↑	N	catena γ_c del recettore comune per IL2,4,7,9,15 su Xq13.1
SCID autosomica recessiva T-,B+,NK+	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	N	N	Catena α del recettore per interleuchina 7 su 5p13
SCID autosomica recessiva T+,NK+,B+	N	↓	N	N	N	N	$p56^{lck}$
SCID da deficienza linfoproliferativa di linfociti T	↓↓	↓	↓	↓	N	IgG,IgM↑ IgA↓↓	Catena α del recettore per interleuchina 2 su 10p14-15
SCID da deficit di ADA	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	adenosina deaminasi su 20q13.2-20q13.11
SCID da deficit di PNP	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓ purinica	fosforilasi nucleosidica
SCID da deficit di linfociti T CD8+	↓	N - ↑	↓↓↓↓ ↓	N	N	N	ZAP-70 su 2q12
CD4+ T-linfocitopenia idiopatica	↓	↓↓↓	↓	N	N	N-↓	Sconosciuto
Deficit di MHC di classe II	↓	↓↓	N-↑	N	N	N	RFXANK su 13q

CTL: linfociti T citotossici; NK: linfociti natural killer; N: normale; SCID: Immunodeficienza severa combinata ↓ = diminuzione; ↑ = aumento

Immunodeficienze secondarie

Le immunodeficienze secondarie sono conseguenti a diverse condizioni cliniche (Tab. 6), che attraverso meccanismi patogenetici vari e spesso poco conosciuti determinano un difetto della risposta immunitaria. Esse sono molto più frequenti delle immunodeficienze primitive e la loro incidenza aumenta con l'età. Alcune forme sono transitorie e si risolvono in seguito all'eliminazione della causa che le ha determinate, altre invece possono essere permanenti.

Tabella 6. ***Cause di immunodeficienze secondarie***

Infezioni	Rosolia Morbillo CMV EBV HIV Plasmodium malariae Micobatteri
Neoplasie	Leucemie acute e croniche Linfomi Mieloma multiplo Neoplasie solide
Iatrogene	Chemioterapici Farmaci immunosoppressivi Corticosteroidi Radiazioni Interventi chirurgici maggiori
Metabolico-nutrizionali	Diabete Insufficienza renale cronica Insufficienza epatica Alcolismo Denutrizione
Patologie croniche	BPCO Scompenso cardiaco congestizio grave Cirrosi epatica Malattie autoimmuni sistemiche
Malattie con perdita proteica	Sindrome nefrosica Enteropatie proteinodisperdenti Ustioni
Età	Immaturità Senescenza

Diagnosi dei difetti dell'immunità specifica

L'***emocromo con formula leucocitaria*** consente una stima quantitativa dei leucociti e dei linfociti totali. Utile anche il numero delle piastrine che è ridotto in alcune patologie.

Il ***dosaggio delle immunoglobuline*** nel siero ed eventualmente in altri liquidi e secreti corporei, rappresenta la prima tappa nello studio delle immunodeficienze con alterata produzione di anticorpi. La determinazione delle Ig nel siero è eseguita come esame routinario mediante nefelometria. Essa può evidenziare una riduzione delle immunoglobuline, suggestiva di patologie quali la *Agammaglobulinemia di Bruton* o *autosomica recessiva*, il *Deficit selettivo di IgA* e l'*Immunodeficienza comune variabile*. Un incremento selettivo di un isotipo è osservato nella *Sindrome da iper-IgM* e nella *Sindrome da iper-IgE*. In presenza di una diminuzione delle immunoglobuline nel siero, può essere utile un approfondimento con lo studio della produzione spontanea e stimolata con mitogeno (pokweed) delle immunoglobuline in vitro da parte di cellule mononucleate di sangue periferico.

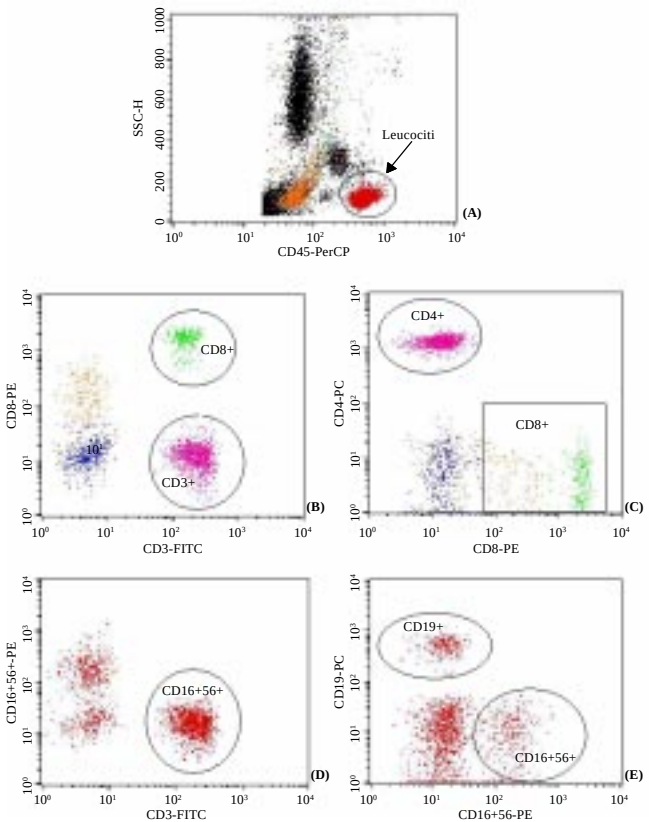
Lo studio delle ***sottopopolazioni linfocitarie*** si è rivelato uno strumento utile per la diagnostica delle immunodeficienze primitive e secondarie e delle malattie ematologiche di tipo proliferativo (linfomi, leucemie). Lo studio viene eseguito mediante ***citofluorimetria,*** utilizzando un citometro a flusso automatizzato che analizza cellule in sospensione liquida fatte passare ad una ad una davanti ad un fascio focalizzato di luce laser. Lo strumento è in grado di determinare il diametro relativo, la granularità relativa o la complessità interna e l'intensità relativa di fluorescenza di una cellula. La fluorescenza cellulare si ottiene mediante l'impiego di anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi in grado di emettere luce a diverse lunghezze d'onda. Il fluorocromo, infatti, assorbe energia dal laser e la rilascia sotto forma di vibrazione, dissipazione di calore ed emissione di fotoni a lunghezze d'onda superiori. Gli anticorpi monoclonali marcati utilizzati nell'analisi citofluorimetrica legano specificamente determinanti di superficie diversi, espressi selettivamente da alcuni stipiti cellulari. Con questo metodo le diverse sottopopolazioni cellulari sono identificate mediante gli anticorpi monoclonali specifici coniugati con fluorocromi che emettono luce a lunghezze d'onda diverse e possono pertanto essere riconosciute dal sistema ottico del citofluorimetro. Gli antigeni di superficie che vengono utilizzati come marcatori per lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie sono riassunti nella tabella 7. Nella figura seguente è illustrata l'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie su sangue periferico da soggetto sano, dopo lisi degli eritrociti:

- **A** - marcatura dei leucociti con monoclonale anti-CD45;
- **B** - determinazione dei linfociti T in toto e dei linfociti T citotossici mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD3 e anti-CD8;

- **C** - determinazione delle due sottopopolazioni di linfociti T, helper e citotossici, mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD4 e anti-CD8;
- **D** - determinazione dei linfociti Natural Killer mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD16/CD56 e antiCD3;
- **E** - determinazione dei linfociti B mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD19 e anti-CD16/CD56.

Tabella 7. ***Marcatori di superficie (CD) per sottopopolazioni linfocitarie***

Popolazione	*CD3*	*CD4*	*CD8*	*CD19*	*CD16/CD56*	*CD45*
Linfociti B-	-	-	+	-	+	
Linfociti T helper	+	+	-	-	-	+
Linfociti T citotossici	+	-	+	-	-	+
Linfociti NK	-	-	-	-	+	+



Incrementi e riduzioni nel numero assoluto o relativo di linfociti T, B ed NK, caratterizzano le diverse immunodeficienze (vedere la tabella 5 *Difetti primitivi dei linfociti B, T e combinati: classificazione* riportata in precedenza). In particolare lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie viene utilizzato per monitorare l'andamento della malattia in pazienti con infezione da HIV, nella quale il numero dei linfociti T CD4+ è considerato un indicatore della competenza immunologica del paziente.

Autoimmunità

Le patologie autoimmuni sono il risultato di una risposta immunitaria diretta verso i costituenti dell'organismo (***autoantigeni***). Questa risposta immunitaria, caratterizzata dalla presenza di ***autoanticorpi***, provoca una patologia infiammatoria che può indurre un danno d'organo che determina la malattia. Le malattie autoimmuni possono essere schematicamente suddivise in:

Tabella 8. ***Malattie autoimmuni organo-specifiche: classificazione***

Malattia	***Organo Bersaglio***	***Autoanticorpi caratteristici***
Tiroidite di Hashimoto	Tiroide	Ab anti-tireoglobulina Ab anti-tireoperossidasi
M. di Graves-Basedow	Tiroide	Ab anti-recettore TSH
Anemia perniciosa	Stomaco	Ab anti-fattore intrinseco Ab anti-mucosa gastrica (PCA)
M. di Addison	Surrene	Ab anti-surrene
Infertilità maschile	Testicolo	Ab anti-testicolo
Menopausa precoce	Ovaio	Ab anti-ovaio
IDDM	Pancreas	Ab anti-insula pancreatica (ICA)
Miastenia Grave	Placca neuro-muscolare	Ab anti-recettore acetilcolina
Pemfigo	Cute, mucose	Ab anti-desmosomi
S. di Goodpasture	Polmone, rene	Ab anti-membrana basale
Anemia emolitica immune	Globulo rosso	Ab anti-eritrociti
ITP	Piastrine	Ab anti-piastrine
Cirrosi biliare primitiva	Fegato	Ab anti-mitocondrio M2 (AMA)
Epatite autoimmune tipo I	Fegato	Ab anti-SMA
Epatite autoimmune tipo II	Fegato	Ab anti-LKM
Morbo celiaco	Intestino	Ab anti-gliadina Ab anti-endomisio

- *organo-specifiche*: la risposta immune è diretta nei confronti di un solo organo o apparato con conseguente danno localizzato allo stesso, che clinicamente si manifesta con ipofunzione o iperfunzione dell'organo bersaglio; sono caratterizzate dalla presenza in circolo di autoanticorpi diretti contro antigeni caratteristici dell'organo colpito; è in genere presente una sola specificità autoanticorpale, e, infine, questi autoanticorpi spesso svolgono un ruolo patogenetico diretto (Tab. 8);
- *non organo-specifiche o sistemiche*: la risposta immune è diretta contro antigeni ubiquitari, con manifestazioni cliniche a carico di diversi organi e apparati; sono in genere presenti molteplici specificità autoanticorpali che possono avere un ruolo patogenetico indiretto (Tab. 9).

Gli autoanticorpi che si possono riscontrare nel siero di un paziente sono marcatori molto utili per la diagnosi e/o il monitoraggio delle malattie autoimmuni. Tuttavia il loro significato non è sempre di immediata lettura, per cui è necessario che qualunque risultato di laboratorio venga correttamente inquadrato nel contesto clinico di ogni paziente. Sono però possibili alcune *considerazioni generali*:

Tabella 9. ***Frequenza di alcuni autoanticorpi nelle malattie autoimmuni sistemiche***

Autoanticorpo	*Patologie*	*Frequenza (%)*
Ab anti-nucleo (ANA)	Lupus Eritematoso Sistemico (LES)	99
	Lupus discoide (LED)	5÷25
	Lupus indotto da farmaci	100
	Lupus cutaneo subacuto (SCLE)	99
	Sclerodermia (SSc)	60÷90
	Sindrome di Sjögren	70÷80
	Artrite Reumatoide	30÷50
	Polimiosite/Dermatomiosite	30÷80
	Malattia Mista del Connettivo	100
	Epatite autoimmune	100
*Ab anti-dsDNA**	Lupus Eritematoso Sistemico	50÷80
*Ab anti-centromero**	Sclerodermia limitata (S. CREST^)	90
	Sclerodermia diffusa	5
Ab-anti-Scl-70 (Topoisomerasi I)*	Sclerodermia diffusa	60
*Ab anti-Sm**	Lupus Eritematoso Sistemico	15÷30
Ab anti-nRNP	Malattia Mista del Connettivo	100
	Lupus Eritematoso Sistemico	30
	Sclerodermia	5
	Polimiosite	2

Ab anti-SSA/Ro	Sindrome di Sjögren	40÷70
	Lupus Eritematoso Sistemico	40
	Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi	20÷30
	BAV congenito	100
	Lupus neonatale	90
	SCLE	60
	Artrite Reumatoide	5
	Polimiosite	3
	Sclerodermia	5
Ab anti-SSB/La	Sindrome di Sjögren	30÷60
	LES neonatale	60
	Lupus Eritematoso Sistemico	10÷15
	BAV congenito	80
	Artrite Reumatoide	3
*Ab anti-Jo1**	Polimiosite	30
*Ab anti-PL7**	Polimiosite	5
*Ab anti-PL11**	Polimiosite	3
*Ab anti-PL12**	Polimiosite	2
*Ab anti-ribosomi**	LES	10
Ab anti-PCNA	LES	5
Ab anti-istoni	Lupus da farmaci	100
	LES	50
	Artrite reumatoide	30
Fattore Reumatoide	Artrite Reumatoide	80
	Sindrome di Sjögren	90
	Crioglobulinemia	>90
	Lupus Eritematoso Sistemico	30
	Poliarterite Nodosa	40
*c-ANCA (anti-PR3)**	Granulomatosi di Wegener	90
p-ANCA (anti-MPO)	Malattia di Churg-Strauss	70÷80
	Micropoliarterite	80
*Ab anti-cardiolipina**	Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi	70÷80
	Lupus Eritematoso Sistemico	30÷40
*Ab anti-β_2 glicoproteina I**	Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi	60÷70
	Lupus Eritematoso Sistemico	20÷30
Ab anti-endotelio	Tromboangioite obliterante	30
	Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi	60
	Lupus Eritematoso Sistemico	88
	Granulomatosi di Wegener	50÷80
	Vasculite associata ad AR	80
	Malattia di Kawasaki	65

^CREST: variante di SSc caratterizzata da **C**alcinosi, **R**aynaud, Interessamento **E**sofageo, **S**clerodattilia, **T**elangectasia.
*Autoanticorpo con valore di marcatore diagnostico.

- nel sospetto di una patologia organo-specifica il riscontro dell'autoanticorpo corrispondente conferma la diagnosi e spesso l'andamento nel tempo del titolo anticorpale rispecchia l'andamento clinico della malattia;
- nel sospetto di patologie sistemiche la situazione è più complessa: uno stesso autoanticorpo può essere presente in malattie diverse; inoltre nella stessa malattia possono essere presenti autoanticorpi diversi. Così ad esempio gli ANA (Anti-Nuclear-Antibodies o anticorpi anti-nucleo) sebbene costituiscano un criterio diagnostico di LES, non sono tuttavia specifici in quanto si ritrovano anche in pazienti con altre connettiviti;
- il titolo e l'andamento di alcuni autoanticorpi segue quello della malattia: diminuisce o scompare se la malattia è in remissione, aumenta in presenza di una recidiva. È questo il caso degli anticorpi anti-DNA nel LES e degli ANCA nelle vasculiti, che rivestono pertanto un ruolo diagnostico e di monitoraggio della malattia.

Alcuni anticorpi sono particolarmente significativi per lo studio delle malattie autoimmuni in fase preclinica e pertanto possono essere utilmente impiegati nei programmi di screening finalizzati ad individuare i soggetti a rischio. È il caso degli anti-ICA (anticorpi anti-insula pancreatica) e anti-gliadina, considerati rispettivamente marcatori di diabete mellito insulinodipendente e di celiachia, questi ultimi utili soprattutto in età adulta quando la malattia si presenta in forma atipica o silente.

Le immagini relative alle determinazione degli autoanticorpi illustrate nei paragrafi che seguono sono disponibili nella galleria delle immagini di immunologia che si trova sul CD-ROM.

Anticorpi anti-nucleo

Gli *anticorpi anti-nucleo* (***ANA***) costituiscono un gruppo di autoanticorpi diretti verso antigeni presenti nel nucleo cellulare. Il metodo di riferimento per la determinazione degli ANA è la tecnica di ***immunofluorescenza indiretta*** (***IFI***). Il siero è diluito per raddoppio e successivamente messo a contatto con un substrato, costituito in genere da linee cellulari in coltura continua provenienti da neoplasie umane, come le cellule HEp2 (da carcinoma laringeo). Gli autoanticorpi eventualmente presenti nel siero in esame si legano agli antigeni nucleari del substrato. L'aggiunta di anticorpi anti-Ig totali (IgA, IgG, IgM) umane, coniugati con isotiocianato di Fluorescina, determina la formazione di un complesso fluorescente con gli anticorpi del campione legati al substrato. La lettura al microscopio in fluorescenza permette di evidenziare la positività per gli ANA e definire il pattern di fluorescenza, legato alla distribuzione della struttura che funge da bersaglio dell'autoanticorpo. Il risultato viene espresso come positività o negatività alla diluizione utilizzata e come pattern. Si distinguono i seguenti pattern principali: *omogeneo, periferico, granulare, nucleolare, centromerico e citoplasmatico.* A ciascuno di questi pattern può corrispondere una reazione con uno o più antigeni (vedere la tabella

10), che può orientare verso la ricerca di specificità più precise. Questo esame rappresenta il test fondamentale di primo livello nella diagnostica delle malattie autoimmuni sistemiche. In un solo caso può essere ritenuto diagnostico e precisamente quando il pattern della fluorescenza è di tipo centromerico. In tutti gli altri casi è opportuno proseguire le indagini con test di secondo livello (ENA, DNA, AMA, SMA, LKM). Nei casi in cui l'esame risultasse negativo a fronte di fondati sospetti di malattia autoimmune è opportuno procedere con la ricerca di autoanticorpi che si legano a strutture non nucleari o a strutture scarsamente rappresentate nel nucleo (FR, ANCA, anti-fosfolipidi, anti-Jo1, anti-SSA). Gli ANA possono essere presenti anche in pazienti con malattie infettive acute e croniche (epatiti virali, mononucleosi, endocardite batterica subacuta, malaria, tubercolosi), con neoplasie, in trattamento con farmaci noti per indurre ANA positività e non sempre associati a manifestazioni cliniche (procainamide, idralazina, isoniazide, etc.), in parenti di pazienti con malattie autoimmuni e occasionalmente in soggetti senza alcuna patologia clinicamente evidente soprattutto se anziani e/o di sesso femminile. Per dare quindi un giusto valore ad un risultato positivo di ANA è necessario prendere in considerazione: a) il titolo anticorpale; b) l'opportunità di eseguire altre indagini, quali la ricerca di anticorpi anti-dsDNA e anti-ENA; c) il contesto clinico. Infatti, un titolo ≥ 1:160 si associa con elevata frequenza a patologie autoimmuni, mentre titoli inferiori sono spesso riscontrabili anche in soggetti senza patologie evidenti e il riscontro di anticorpi anti-dsDNA e anti-ENA può essere elemento determinante ai fini di una diagnosi specifica.

Tabella 10. ***Possibile corrispondenza tra pattern in IFI e principali antigeni coinvolti.***

Antigene	*Omogeneo*	*Periferico*	*Granulare*	*Nucleolare*	*Citoplasmatico*
Istoni	+				
dsDNA	+				
Sm			+		
nRNP			+		
SSA/Ro			+		+
SSB/La			+		+
Topoisomerasi I			+		
Fibrillarina				+	
RNA polimerasi				+	
Aminoacil-tRNAsintetasi					+
rRNP					+
AMA					+
ANCA					+
SMA					+
Laminina		+			

Anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili

La ricerca degli *anticorpi anti-Antigeni Nucleari Estraibili* (***ENA***) viene utilizzata per la caratterizzazione degli ANA. La ricerca può essere effettuata con metodo ELISA, immunodiffusione doppia, controimmunoelettroforesi (CIE), Western Blot e Dot blot. Questi metodi differiscono spiccatamente per sensibilità e specificità oltre che per le caratteristiche dei preparati antigenici utilizzati. Il test ELISA utilizza antigeni nucleari estrattivi o ricombinanti, in miscellanea o singoli, immobilizzati a pozzetti di plastica. L'indagine mediante Western Blot utilizza antigeni estratti da cellule HEp-2 umane, frazionati secondo il loro peso molecolare in presenza di SDS mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide. Il dot blot impiega singoli antigeni ricombinanti blottati su nitrocellulosa. L'immunodiffusione radiale doppia in gel d'agarosio e la CIE impiegano estratti di timo di coniglio o vitello, di milza umana oppure di linee cellulari. Con il termine ENA intendiamo classicamente la ricerca di anticorpi diretti verso sei antigeni: Sm, nRNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo1. Tuttavia con metodiche di Western blot o CIE che impiegano estratti totali è possibile mettere in evidenza anticorpi diretti verso altri antigeni nucleari (ad es. aminoacyl-tRNA sintetasi, fibrillarina, RNA-polimerasi, PCNA, ribosomi, etc). Il significato diagnostico di questo test è illustrato nella tabella 9. Alcuni di questi autoanticorpi hanno particolare valore diagnostico in quanto di quasi esclusivo riscontro in alcune patologie (ad es. Sm nel Les, Scl-70 nella SSc). Nessuno di questi anticorpi ha utilità nel monitoraggio della malattia. Il titolo non ha alcuna utilità ad eccezione degli anticorpi anti-nRNP che sono presenti a titoli molto più elevati nella malattia mista del connettivo rispetto al LES.

Anticorpi anti-DNA

Le metodiche in uso per la ricerca degli *anticorpi anti-DNA* sono rappresentate dalla IFI che utlizza come substrato la Crithidia Luciliae, la tecnica di Farr e l'ELISA. Il primo metodo si basa sulla caratteristica del chinetoplasto di C. luciliae, un microrganismo unicellulare flagellato, di contenere esclusivamente DNA a doppia elica. La tecnica di Farr consiste nell'incubare il siero in esame con dsDNA radiomarcato e precipitare i complessi DNA-anti-DNA con una soluzione di Solfato di Ammonio saturo. L'ELISA utilizza dsDNA plasmidico replicato in E. coli e trattato per rimuovere ssDNA, oppure DNA estrattivo. Queste tre metodiche differiscono quanto a sensibilità e specificità; le caratteristiche a confronto sono riportate nella tabella 11. Gli anti-dsDNA sono autoanticorpi specifici per la diagnosi di LES in quanto non vengono in genere riscontrati in altre patologie, ad eccezione di rarissimi casi di S. di Sjögren ed epatite cronica attiva. Anticorpi anti-ssDNA sono invece riscontrabili in numerose patologie; è pertanto importante che il DNA impiegato nei test non contenga tracce di ssDNA. La loro determina-

zione è un utile strumento per monitorare la malattia: il titolo degli anticorpi nel siero in genere riflette l'attività della malattia, riducendosi o scomparendo durante le fasi di remissione. È stata inoltre segnalata un'associazione tra la presenza di anti-dsDNA ad alta affinità e interessamento renale nei pazienti affetti da LES.

Tabella 11. ***Caratteristiche dei diversi test per la ricerca degli anticorpi anti-DNA***

	Tecnica di Farr	***IFI su C. Luciliae***	***ELISA***
Principio	Precipitazione	Fase solida	Fase solida
Caratteristiche del DNA			
Origine	Timo, E. Coli, plasmide	Protozoo	Timo, fago
Struttura	ds/ss oppure ds	ds	ds/ss oppure ds
Parametro misurato	Antigene legato	Anticorpo legato	Anticorpo legato
Affinità anticorpale	Alta	Alta	Bassa e alta
Isotipo	No	Si/No	Si/No
Caratteristiche			
Sensibilità	Elevata	Bassa	Elavata
Specificità	Elevata	Elevata	Bassa/Elevata
Precisione	Bassa	Bassa	Elevata
Durata	Lenta	Lenta	Rapida
Emivita dei componenti	Breve	Lunga	Breve
Punto debole	Radioattività	Soggettività	Sensibilità
Sistema di misurazione	Cpm	Fluorescenza	Assorbanza
Unità di misura	µg DNA legato	Titolo	Assorbanza
Costo	Elevato	Basso	Elevato

Anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili

Gli *anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili* (***ANCA***) sono un gruppo eterogeneo di anticorpi diretti verso antigeni citoplasmatici di granulociti neutrofili e monociti. Essi vengono in genere rilevati mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta, utilizzando come substrato granulociti neutrofili, monociti ed eosinofili umani. Questa tecnica premette di differenziare almeno tre tipi di pattern di fluorescenza, che vengono indicati con l'acronimo *cANCA* (*pattern granulare citoplasmatico*), *pANCA* (*pattern di fluorescenza perinucleare*) ed *aANCA* (*pattern atipico*). La caratterizzazione dell'antigene che determina la fluorescenza è ottenibile con la tecnica ELISA. Le due principali specificità antigeniche sono rappresentate da *mieloperossi-*

dasi (*MPO-ANCA*) e *proteinasi 3* (*PR3-ANCA*), che nel 90% dei casi corrispondono, rispettivamente, al pattern perinucleare e al pattern di tipo citoplasmatico. La determinazione dei PR3-ANCA è un utile strumento nella diagnosi di *Granulomatosi di Wegener* (Tab. 12), possedendo una specificità del 95% ed una sensibilità che varia dal 50%, nelle fasi iniziali della malattia fino a quasi il 100% nella malattia in fase attiva generalizzata. La determinazione degli anticorpi anti-PR3 costituisce, inoltre, un parametro di valutazione di attività della malattia. Gli anticorpi anti-MPO sono meno specifici, ma ugualmente utili dal punto di vista diagnostico e prognostico: essi infatti possono essere ritrovati nel 70-80% dei casi di *sindrome di Churg-Strauss* e di *micropoliarterite*. Gli ANCA atipici sono di frequente riscontro nelle patologie infiammatorie intestinali. L'anticorpo è diretto nei confronti di Ag non ancora identificati.

Tabella 12. ***Patologie associate a positività per ANCA***

Patologia	*ANCA in IFI*	*Frequenza*	*Antigene bersaglio*	*Frequenza*
Vasculiti sistemiche				
Granulomatosi di Wegener	cANCA pANCA	85÷90%	PR3 MPO	80÷90% 10÷20%
Poliangioite microscopica	cANCA pANCA	80÷85%	PR3 MPO	20% 80%
Sindrome di Churg-Strauss	pANCA cANCA	50%	PR3 MPO	30÷40% 60÷70%
Poliarterite nodosa classica	pANCA	10%	MPO	90%
Glomerulonefrite necrotizzante pauci-immune idiopatica	cANCA pANCA	80%	PR3 MPO	20% 80%
Malattie reumatiche				
Artrite reumatoide	pANCA ANCA atipici	80%	LF*, sconosciuto	
Lupus Eritematoso Sistemico	pANCA	<20%	LF, ELA*, MPO	
Malattie infiammatorie intestinali croniche				
Colite ulcerosa	pANCA	50÷80%	Sconosciuto	
Morbo di Crohn	pANCA	<10%	Sconosciuto	
Altre malattie				
Epatite cronica autoimmune	pANCA	?	sconosciuto	
Infezioni	ANCA?	?	sconosciuto	

*LF: lattoferrina; ELA: elastasi

Fattore reumatoide

Il *fattore reumatoide* (***FR***) è rappresentato nella maggior parte dei casi da IgM dirette verso il frammento Fc delle IgG umane. La ricerca del FR viene effettuata routinariamente mediante tecnica di nefelometria. Il fattore reumatoide è presente nel 70-80% dei casi di Artrite Reumatoide, ma può essere associato anche a diverse altre patologie (come illustrato nella tabella 13) ed anche in soggetti sani, specialmente oltre i 65 anni di età.

Tabella 13. ***Malattie in cui è presente il fattore reumatoide***

Malattie autoimmuni	*Infezioni*	*Malattie polmonari*	*Miscellanea*
Artrite reumatoide (80%)	Endocardite batterica	Fibrosi interstiziale	Cirrosi epatica
Artrite cronica giovanile (20%)	Epatite virale	Bronchite cronica	Epatite cronica attiva
LES (30%)	Infezioni acute virali	Silicosi	Neoplasie
Malattia mista del connettivo	Infezioni parassitarie	Sarcoidosi	Infarto del miocardio
Sindrome di Sjögren (90%)	Tubercolosi		Post vaccinazione
Crioglobulinemia (>90%)	Lebbra		Età

Anticorpi anti-fosfolipidi

Gli *anticorpi anti-fosfolipidi* (***APL***) rappresentano un gruppo di anticorpi che reagiscono con fosfolipidi a carica elettrica negativa. Nella pratica clinica sono misurati anticorpi di classe IgG e IgM, mediante ELISA, utilizzando come antigene la cardiolipina, un fosfolipide estratto da tessuto cardiaco bovino, oppure la β_2-glicoproteina I (β_2GPI), una apolipoproteina rappresentata in buona concentrazione nel siero di tutti i mammiferi. Quest'ultima costituisce un cofattore che si lega alla cardiolipina e media il legame dell'anticorpo con il fosfolipide e sembra essere il vero bersaglio degli anticorpi. Un terzo tipo di anticorpo è il lupus anticoagulant (LA), la cui presenza si evidenzia con alcuni esami della coagulazione (PT, PTT, dVVRT, KCT, CSCT) e il cui bersaglio antigenico non è ancora noto. La presenza di questi anticorpi costituisce un criterio diagnostico per la Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi, caratterizzata da trombosi arteriose e venose ricorrenti, poliabortività e piastrinopenia. Un altro autoanticorpo descritto in questa sindrome è l'anti-mitocondrio tipo M5. Questa sindrome può essere primitiva (PAPS), oppure secondaria ad altre patologie autoimmuni (SAPS), di cui la più frequente è il Lupus Eritematoso Sistemico. Una positività per anticorpi antifosfolipidi può essere inoltre riscontrata in altre condizioni quali infezioni, neoplasie o trattamenti farmacologici. In queste

situazioni sono presenti per lo più anticorpi anti-cardiolipina di classe IgM e sono assenti gli anticorpi anti-β_2-glicoproteina I.

Anticorpi anti-endotelio

Gli *anticorpi anti-endotelio* (***AECA***) sono anticorpi che reagiscono con differenti strutture delle cellule endoteliali, anche se è stata evidenziata una cross-reattività con fibroblasti umani. Questi anticorpi sono evidenziati nel siero con metodica ELISA utilizzando come antigene cellule endoteliali isolate da vena di cordone ombelicale umano e fatte crescere in monostrato in pozzetti a fondo piatto. Il legame Ab-Ag viene rivelato con anticorpi anti-IgG o IgM umane.

Gli anticorpi anti-endotelio sono stati evidenziati in diverse patologie (vedere la tabella *Frequenza di alcuni autoanticorpi nelle malattie autoimmuni sistemiche*) e attualmente rivestono uno scarso ruolo diagnostico e/o prognostico. La loro ricerca può tuttavia fornire un supporto nella diagnosi di malattia di Kawasaki: essi sono infatti gli unici autoanticorpi ad essere stati individuati in questa patologia e sembrano svolgere un ruolo patogenetico diretto. Nelle vasculiti sistemiche il livello di questi autoanticorpi può essere utilizzato per monitorare la malattia. Il loro titolo infatti sembra incrementare nella fasi di attività della malattia.

Il complesso maggiore di istocompatibilità

Il *complesso maggiore di istocompatibilità* (***MHC***), situato sul cromosoma 6, è costituito da un gruppo di geni altamente polimorfi che codificano per due classi di molecole, che rappresentano gli ***antigeni di istocompatibilità*** (***HLA*** classe I A, B, C e classe II DP, DQ e DR). Esiste una associazione più o meno marcata tra alcune patologie autoimmuni e uno specifico fenotipo HLA, per cui soggetti portatori di questi specifici fenotipi presentano un maggior rischio relativo di sviluppare la malattia (vedere la tabella 14). Pur non essendo diagnostici, la loro ricerca può pertanto essere utile nel supportare un sospetto clinico. La loro ricerca viene effettuata mediante tecnica di biologia molecolare.

Tabella 14. ***Associazione di HLA e patologia***

Malattia	***Allele HLA***	***Rischio relativo***
Associata a MHC di classe II		
Malattia di Hashimoto	DR5	3.2
Mixedema primario	DR3	5.7
Tireotossicosi (Graves)	DR3	3.7
Diabete insulino-dipendente	DQ8, DQ2/8, DQ6	14, 20, 0.2
Morbo di Addison	DR3	6.3
Sindrome di Goodpasture	DR2	13.1
Artrite reumatoide	DR4	5.8
Artrite reumatoide giovanile	DR8	8.1
*Sindrome di Sjögren*DR3	9.7	
Epatite autoimmune	DR3	13.9
Morbo celiaco	DQ2	250
Sclerosi multipla	DR2, DR6	12
Dermatite erpetiforme	DR3	56.4
Narcolessia	DQ6	38
Associata a HLA-B27 (MHC di Classe I)		
Spondilite Anchilosante	B27	87.4
Morbo di Reiter	B27	37
Artrite post-salmonellosi	B27	29.7
Artrite post-shigella	B27	20.7
Artrite post-yersinia	B27	17.6
Artrite post-gonococcica	B27	14
Uveite	B27	14.6
Amiloidosi in artrite reumatoide	B27	8.2
Associazioni con altre molecole di classe I		
Tiroidite subacuta	B35	13.7
Psoriasi	Cw6	13.3
Emocromatosi idiopatica	A3	8.2
Miastenia Grave	B8	4.4
Malattia di Behçet	B51	5-10

Cenni interpretativi sulle analisi di microbiologia

(E. Cesana)

Infezioni delle vie urinarie

Dal punto di vista dell'***eziologia***, gli agenti più frequentemente responsabili delle infezioni delle vie urinarie (IVU) sono i microrganismi d'origine fecale (appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*). In pazienti con struttura anatomica e funzionalità normali delle VU l'80% delle IVU acute sono causate da ceppi di *Escherichia coli*. Altri microrganismi responsabili di IVU sono *Staphylococcus saprophyticus* (in particolare in donne giovani sessualmente attive), enterococchi, streptococco di gruppo B e *Chlamydia*. In casi di IVU complicate, per esempio derivanti da ostruzione anatomica o cateterismi, i più comuni agenti eziologici sono batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee: in particolare *E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Serratia* e *Klebsiella*. Un micete, la *Candida*, è a volte causa di IVU, in particolare nei pazienti diabetici, mentre i batteri anaerobi stretti sono rarissimamente implicati in questa patologia.

L'agente eziologico più frequente responsabile di IVU è *Escherichia coli*.

Dal punto di vista dell'***epidemiologia***, le IVU occupano il secondo posto, dopo le infezioni respiratorie, tra i più frequenti eventi morbosi. La donna sotto i 45 anni è maggiormente colpita rispetto all'uomo, mentre sopra i 45 anni le IVU prevalgono nell'uomo. Le IVU hanno inoltre un'elevata incidenza nei pazienti ospedalizzati.

Per quanto concerne la ***patogenesi***, l'ingresso dei microrganismi avviene solitamente in modo ascendente tramite l'uretra. Le infezioni derivanti dal circolo sanguigno sono rare e in genere determinano ascessi renali. Il normale flusso delle urine ed il continuo sfaldamento delle cellule epiteliali che rivestono il tratto urinario sono degli importanti fattori di protezione. I reni sono, invece, protetti dalle valvole uretro-vescicali che prevengono il reflusso delle urine e dalla costante peristalsi degli ureteri.

I fattori predisponenti le IVU nella donna sono: le ridotte dimensioni dell'uretra, l'attività sessuale, la gravidanza, il parto, l'aborto e l'alterazione della normale flora batterica vaginale dovuta ad antibiotici o contraccettivi orali. Nell'uomo, l'iperplasia prostatica costituisce la causa favorente più comune, provocando ristagno vescicale e rallentato transito delle urine attraverso l'uretra. Rappresentano condizioni facilitanti in entrambi i sessi le indagini strumenta-

li, l'urolitiasi, le neoplasie dell'apparato urogenitale, le anomalie anatomiche o funzionali che non permettono un completo svuotamento della vescica e le affezioni sistemiche, in particolare il diabete.

Esistono anche fattori batterici che facilitano l'insorgenza di IVU: i pili che permettono al microrganismo di aderire alle cellule epiteliali, la produzione di diversi fattori di virulenza ovvero i polisaccaridi che inibiscono la fagocitosi, le emolisine che provocano danni tessutali e le endotossine che favoriscono il processo infiammatorio e danni al parenchima renale. L'infezione del rene è determinata dalla ascesa dei microrganismi dalle basse vie. I fattori che favoriscono questo processo sono il reflusso urinario, la presenza di cateteri e l'insorgenza di calcoli.

La ***sintomatologia*** è caratteristica: disuria (dolore o fastidio durante la minzione), stranguria e pollachiuria, con dolore e senso di tensione sovrapubica in quanto la vescica infiammata è poco distensibile e quindi va svuotata frequentemente. La febbre e gli altri sintomi sistemici sono abitualmente modesti. Talora, tuttavia, compaiono puntate febbrili elevate ed improvvise, precedute da brivido intenso e della durata di poche ore, espressione della massiva immissione in circolo di gettate batteriche o di loro prodotti ad attività pirogena. Se le puntate febbrili recidivano, sono più probabili complicanze quali la prostatite e la pielonefrite. L'intensità dei sintomi è molto variabile: molte infezioni aspecifiche decorrono in modo asintomatico, altre presentano quadri acuti molto disturbanti e molesti.

Per quanto concerne infine la ***diagnosi di laboratorio***, l'esame che permette di stabilire l'eventuale presenza di batteri (specificando genere, specie ed antibiogramma) nel campione di urine, e di precisarne la carica batterica, è l'urinocoltura.

La carica infettante è espressa in Unità Formanti Colonia (CFU). Sono considerate diagnostiche di un'infezione urinaria in atto cariche batteriche superiori a 10^5 microrganismi/mL (> di 10^5 CFU/mL).Valori compresi tra10^4 CFU/mL e 10^5 CFU/mL devono essere considerati positivi in presenza di sintomatologia clinica e/o assunzione di antibiotici, e negativi in loro assenza. Valori inferiori a 10^4 CFU/mL sono attribuibili a processi di contaminazione del campione, a meno che non si tratti di soggetti in trattamento antibiotico o di pazienti portatori di catetere a permanenza. La presenza nella coltura di più di due specie batteriche è indice di contaminazione. Non essendo possibile discriminare le specie contaminanti da quelle eventuali responsabili di infezione è necessario ripetere il prelievo attenendosi scrupolosamente alle procedure di prelievo.

L'urinocoltura è considerata negativa per cariche inferiori a 10^3 a CFU/mL, dubbia per cariche comprese tra 10^4 CFU/mL e 10^5 CFU/mL e positiva per cariche superiori a 10^5 CFU/mL

Infezioni cervico-vaginali

L'equilibrio della flora vaginale può essere influenzato da diversi fattori: dalle condizioni fisiologiche della donna (ciclo mestruale), dagli stati parafisiologici (gravidanza) e da trattamenti particolari (contraccezione); a ciò si aggiungono la posizione contigua della vagina a zone infette (area perianale) e la contaminazione dovuta a rapporti sessuali. Uno dei principali meccanismi dell'equilibrio ecologico vaginale è rappresentato della fermentazione ad acido lattico del glicogeno presente nelle cellule della mucosa da parte della flora lattobacillare. Tale processo permette un mantenimento del pH vaginale intorno a valori decisamente bassi, ostacolando così la moltiplicazione di molte specie patogene.

Numerosi sono gli ***agenti eziologici*** in grado di provocare infezioni cervico-vaginali.

Trichomonas vaginalis è un protozoo che esiste soltanto in forma di trofozoite, senza fasi cistiche. Misura 10÷25 x 7÷8 μm; è dotato anteriormente di quattro flagelli e di una membrana ondulante. Vive a pH acido e temperatura compresa tra i 35 e i 37 °C. L'incidenza di questo protozoo è correlata all'igiene intima e l'unica via di contagio è quella sessuale, in modo particolare tramite uomini asintomatici. La sintomatologia è dominata dalla comparsa di secrezione vaginale accompagnata da prurito o bruciori, leucorrea di colore verdastro, maleodorante e cremosa.

I miceti di più frequente rinvenimento a livello vaginale sono *Candida albicans* e *Candida glabrata.*

Tuttavia molte altre specie del genere *Candida* si ritrovano frequentemente. I fattori predisponenti a questo tipo di infezione sono gli stati di immunodepressione, il diabete, l'ipotiroidismo, la gravidanza, la terapia antibiotica e l'utilizzo di contraccettivi orali. Questo genere di infezione si manifesta con intenso prurito, eritema vaginale e labiale, e con secrezioni tenaci, asciutte, aderenti e biancastre.

Gardnerella vaginalis è un coccobacillo pleomorfo, anaerobio facoltativo, che mostra un comportamento variabile alla colorazione di Gram. Sebbene possa venire isolato dalla vagina di donne che non presentano segni di infezione vaginale, sembra essere il principale responsabile della vaginite non specifica, condizione caratterizzata da aumento delle secrezioni vaginali, ma non da leucorrea, senza prurito né bruciore vulvare.

Gli *Enterobatteri* determinano solo raramente infezioni dell'apparato genitale femminile in donne in età fertile. La colonizzazione delle mucose sembra favorita in donne con infezioni urinarie ricorrenti e con un difetto a livello cellulare che faciliterebbe l'adesione batterica. Il pH vaginale acido dovrebbe invece costituire un meccanismo di difesa. Gli enterobatteri di più frequente isolamento sono *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella spp.*

Streptococcus agalactiae (beta-emolitico di gruppo b) riveste un ruolo importante nella flogosi dell'apparato genitale femminile, anche se spesso non provoca spiccata sintomatologia vulvo–vaginale. Questo microrganismo assume un ruolo di primaria importanza nella gestante causando aborti e nascite premature; inoltre, può causare gravi patologie al neonato (setticemie, meningiti, osteomieliti, otiti) che può infettarsi durante il passaggio nel canale del parto.

Staphylococcus aureus raramente determina infezioni a livello vaginale. La sua azione patogena sembra dovuta ad una *tossina super-antigenica TSST-1* che determina la sindrome da shock tossico. Questa patologia si manifesta con febbre, vomito, diarrea, mialgia, ipotensione, rash eritematoso con desquamazione cutanea.

Neisseria gonorrhoeae è un diplococco Gram-negativo, tipicamente aggregato a coppie con i lati piani affiancati. Questo microrganismo, agente eziologico della gonorrea, si trasmette quasi sempre per via sessuale: il rischio di contagio nelle donne è del 50% mentre negli uomini è del 20%. Nella donna esplica la sua azione patogena a diversi livelli. L'infezione uretrale determina essudati purulenti, disuria e stimolo ad urinare frequentemente. L'infezione anorettale provoca dolore e sanguinamento mentre l'infezione cervicale e del tratto alto genitale determina cervicite, salpingite, endometrite, ascessi tubarici ed alle ovaie. In alcune donne l'infezione è asintomatica o presenta sintomi lievi e aspecifici. Nella gestante può determinare parto prematuro, rottura prematura delle membrane, corioamniositi, mentre al nascituro può causare gravi infezioni oculari. Nell'uomo eterosessuale l'infezione uretrale si manifesta con infiammazione, eritema, secrezioni purulente e disuria e può evolvere in gravi complicazioni come linfoadenopatia inguinale, restringimento uretrale, epididimite, prostatite e disseminazione settica. Nell'uomo omosessuale l'infezione può riguardare oltre all'uretra anche il canale anale ed il faringe, determinando dolore rettale con secrezioni purulente, ed infezioni alle alte vie respiratorie.

I *Micoplasmi* sono procarioti privi di parete batterica, quindi pleiomorfi, con specifiche esigenze nutrizionali ma capaci di replicarsi autonomamente. La loro azione patogena, facilitata dalla loro adesività alle cellule delle mucose, si esplica mediante la liberazione di sostanze tossiche come il perossido e l'ammoniaca, tossine ed enzimi. Le due specie più comunemente implicate nelle infezioni dell'apparato genitale sono: *Mycoplasma hominis* ed *Ureaplasma urealyticum*. Il *Mycoplasma hominis* può essere isolato da individui asintomatici ma è in grado di svolgere un'azione patogena a diversi livelli. Gli effetti più frequenti associati all'infezione da parte di questo microrganismo sono: vaginite aspecifica, cervicite, ascesso della ghiandola di Bartolino, infezioni neonatali, aborti settici, febbre post-parto, rottura prematura delle membrane, corionamniositi ed infertilità. *Ureaplasma urealyticum*, nonostante si riveli frequentemente in pazienti asintomatici, è stato isolato in patologie annessiali suppurative e si ritiene possa avere un ruolo nella genesi di tali infezioni. Il suo ruolo patogeno come agente eziologico di vaginiti, cerviciti, infezioni neonatali ed infertilità è ancora discusso.

Chlamydia trachomatis è un batterio gram-negativo di piccole dimensioni, parassita intracellulare obbligato, in quanto mancante di sistemi enzimatici propri per la produzione di ATP. Questo microrganismo presenta due forme di sviluppo: il corpo elementare che è la forma infettante ed il corpo reticolare, metabolicamente attivo, che è la forma replicativa intracellulare. La trasmissione può avvenire per via sessuale o attraverso il passaggio nel canale del parto. La valutazione dell'esatto ruolo della *Chlamydia trachomatis* nelle infezioni del tratto genitale non è facile, sia perché talvolta essa non comporta sintomatologia evidente sia perché può essere concomitante con altri agenti patogeni. Può comunque essere causa di uretriti acute e di cerviciti mucopurulente. La localizzazione cervicale, sia sintomatica sia asintomatica, può essere considerata punto di partenza di un'infezione ascendente determinando in questo modo salpingiti, endometriti post-parto, parti prematuri, gravidanze extrauterine, linfogranuloma venereo ed infertilità tubarica.

I più frequenti agenti di infezione a livello cervicale sono *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* e micoplasmi, a livello vaginale sono *Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis* e miceti.

Infezioni dell'apparato gastro-enterico

L'apparato gastro-enterico è popolato, in condizioni fisiologiche, da numerose specie batteriche che svolgono diverse funzioni tra cui la prevenzione di infezioni, la collaborazione ai processi digestivi, la produzione delle vitamine. Lo stomaco presenta un numero di batteri piuttosto ridotto, circa qualche centinaio/mL, in quanto gran parte dei microrganismi provenienti dal cavo orale sono distrutti dal succo gastrico, mentre il digiuno e l'intestino tenue contengono un numero di batteri man mano crescente, che nel colon raggiunge un numero davvero imponente. Il numero di batteri complessivo per grammo di peso secco di feci può raggiungere 10^{12} CFU/mL.

La normale flora saprofita intestinale è rappresentata da *Enterobacteriaceae*, cocchi aerobi ed anaerobi, bacilli Gram-negativi non fermentanti, e bacilli anaerobi sia Gram-positivi che Gram-negativi (in particolare *Bacteroides).* In genere gli anaerobi sono più numerosi degli aerobi nell'ordine di 10.000/1.

Per quanto concerne l'***eziologia***, le tossinfezioni alimentari e le infezioni gastrointestinali sono provocate rispettivamente dall'ingestione di cibi contaminati da tossine batteriche o da microrganismi patogeni. I batteri patogeni del tratto gastro-enterico appartengono perlopiù alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* anche se Stafilococchi, Vibrioni e Clostridi sono in grado di esplicare azione patogena.

Il genere *Salmonella* appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è rappresentato da bastoncini Gram-negativi mobili per flagelli peritrichi. Le Salmonelle sono trasmesse da uomo a uomo attraverso la contaminazione fecale di acqua ed alimenti. La loro struttura antigenica è rappresentata da antigeni polisaccaridici somatici O termostabili, localizzati sulla parete cellulare e da antigeni proteici H termolabili, localizzati nei flagelli, altamente specifici per questo genere. Alcune specie presentano anche antigeni polisaccaridici di superficie Vi, non specifici. Le specie *S. typi* e *S. paratypi* sono in grado di resistere ai meccanismi di difesa e di determinare un'infezione sistemica soprattutto a carico del sistema monocitico-macrofagico (febbre tifoide). Le enterocoliti da Salmonelle sono affezioni acute, in genere a limitazione spontanea, caratterizzare da diarrea, dolori addominali, febbre e talvolta vomito. Le specie più comunemente coinvolte in questa patologia sono *S. enteritidis*, *S. typhimurim* e *S. choleraeisuis.* Le infezioni extra intestinali possono praticamente coinvolgere tutti gli organi e tessuti, e verificarsi soprattutto come complicanza della febbre enterica ma anche raramente in seguito ad infezione gastroenterica.

Il genere *Shigella* appartiene all'ordine delle *Enterobacteriaceae* ed è rappresentato da bacilli Gram-negativi immobili. Questo genere è rappresentato da quattro specie (*S. dysenteriae*, *S, flexneri*, *S. boydi* e *S. sonnei*) che possono essere antigenicamente suddivise in sierotipi in base all'antigene somatico O. Le shigelle si trasmettono da uomo a uomo tramite cibo ed acqua contaminati da materiale fecale. Questi microrganismi determinano un'infiammazione acuta del tratto digerente con ulcerazione dell'epitelio che si manifesta con diarrea mucosanguinolenta, febbre e dolori addominali.

Il genere *Campylobacter* è rappresentato da bacilli Gram-negativi incurvati o spiraliformi, asporigeni, microaerofili, non fermentanti e non ossidanti. La specie più frequentemente isolata da materiale biologico umano è principalmente *C. jejuni*, ma non di rado è possibile riscontrate *C. coli* (specie nei paesi sottosviluppati) e *C. fetus* (soprattutto in pazienti immunocompromessi). Questi microrganismi sono in grado di determinare enteriti acute in bambini ed adulti e setticemie con conseguenti localizzazioni extraintestinali. La malattia si manifesta con diarrea acquosa mucosanguinolenta, dolori addominali, febbre, malessere, cefalea e vertigini. L'enterocolite da *C. jejuni* è considerata una zoonosi in quanto tale microrganismo è stato isolato da numerose specie di mammiferi (bovini, cavalli, pecore, scimmie ed altri) ed uccelli che rappresentano il serbatoio naturale. La trasmissione avviene tramite via oro-fecale, per contagio interumano diretto o tramite acqua ed alimenti contaminati.

Il genere *Yersinia* appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è rappresentato da batteri Gram-negativi, asporigeni, aerobi facoltativi. La specie principalmente coinvolta nel determinare sindrome enterocolitica è *Y. enterocolitica*. Questa specie presenta diversi tipi di antigene somatico O, che ne permette la suddivisione in sierotipi, antigeni capsulari K e flagellari H. La *Y. enterocolitica* è in grado di produrre un'enterotossina termostabile in grado di

aumentare il livello di guanosin-monofosfato ciclico nell'intestino tenue. L'affezione intestinale si manifesta provocando enterite acuta con diarrea generalmente localizzata alla porzione terminale dell'ileo, anche se questo microrganismo può invadere i linfonodi intestinali e determinare adenite mesenterica ed infine invadere il circolo sanguigno e determinare lesioni suppurative a vari organi.

Escherichia coli appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è rappresentata da bastoncini Gram-negativi mobili per flagelli peritrichi. *E. coli* presenta un antigene somatico O, un antigene capsulare K e un antigene flagellare H: inoltre la maggior parte dei ceppi possiede numerose fimbrie che conferiscono al batterio una buona adesività nei confronti delle mucose. *E. coli* nonostante sia un normale commensale intestinale, può causare affezioni diarroiche con diversi meccanismi d'azione. I ceppi che provocano diarrea sono distinti in *enterotossigeni*, *enteroinvasivi*, *enteropatogeni*, ed *enteroemorragici*. I ceppi enterotossigeni (ETEC) sono i maggiori responsabili di diarrea infantile nei paesi sottosviluppati e di "diarrea del viaggiatore" negli adulti. La patogenicità è dovuta alla produzione o di una tossina termostabile che, aumentando il livello di AMP ciclico nelle cellule dell'epitelio intestinale, induce una forte secrezione di liquidi ed elettroliti nel lume, o ad una tossina termolabile che agisce analogamente aumentando il livello di guanosin-monofosfato ciclico. I ceppi ETEC possiedono inoltre particolari fimbrie che ne aumentano l'adesione alle cellule intestinali opponendosi alla rimozione attuata dai movimenti peristaltici. I ceppi enteroinvasivi (EIEC) hanno la capacità di penetrare e moltiplicarsi nelle cellule epiteliali del colon provocando desquamazione della mucosa, che si manifesta con una sindrome dissenteriforme particolarmente grave. I ceppi enteropatogeni (EPEC) sono responsabili di diarrea nei bambini, specie nei paesi poco sviluppati. La patogenicità di questi ceppi è legata ad un fattore di adesività localizzata in grado di distruggere i microvilli delle cellule della mucosa intestinale. I ceppi enteroemorragici (EHEC) provocano casi sporadici di colite emorragica. La patogenicità dei ceppi EHEC è determinata dalla produzione di una citotosssina in grado di danneggiare gli endoteli dei vasi sanguigni intestinali. Le proprietà di virulenza, associate a questi ceppi di *E. coli*, sono codificate da plasmidi: inoltre tali ceppi appartengono generalmente ad alcuni particolari *sierotipi O* e *H*.

Clostridium difficile è un bacillo gram-positivo, pressoché ubiquitario, sporigeno, anaerobio obbligato, produttore in quantità variabile di tossine. La tossina A è un'enterotossina che modifica la secrezione dei fluidi, e favorisce l'infiammazione, mentre la tossina B è una citotossina che causa lesioni e desquamazione delle cellule epiteliali con conseguente formazione di pseudomembrane. Il microrganismo può provocare una vasta gamma di quadri clinici intestinali, compresi tra una modesta diarrea a risoluzione spontanea e una colite pseudomembranosa a decorso grave. Questa patologia è caratterizzata dalla presenza di lesioni giallastre a placca della mucosa del colon e si manifesta con una diarrea acquosa o sanguinolenta che può

essere accompagnata da crampi addominali, leucocitosi, febbre, e nausea. Tale sintomatologia può aggravarsi per disidratazione e perdita di elettroliti fino allo shock. Nella gran parte dei casi la colite pseudomembranosa insorge durante o subito dopo una terapia antibiotica, in quanto il dismicrobismo creato dalla terapia antibiotica facilita lo sviluppo del *C. difficile* che da commensale si trasforma in patogeno.

Vibrio cholerae appartiene alla famiglia delle *Vibrionaceae* ed è rappresentato da bastoncini Gram-negativi incurvati, aerobi, mobili per un flagello polare. La struttura antigenica è costituita da un antigene flagellare H ed un antigene somatico O, che ne permette la differenziazione in sei sierogruppi (al sierogruppo OI appartengono i vibrioni colerici veri e propri) ed in alcuni sottotipi (Ogawa, Inaba ed Hikojima), mentre le caratteristiche biochimiche consentaono la distinzione in due differenti biotipi (*cholaere* ed *eltor*). *V. cholerae* è l'agente eziologico del colera. L'infezione si contrae attraverso l'ingestione di acqua o cibi contaminati da feci infette. I vibrioni che riescono a superare la barriera gastrica si moltiplicano rapidamente nell'intestino tenue e provocano una diarrea acquosa con conseguente disidratazione. La patogenicità di questo microrganismo è legata alla produzione di un'esotossina termolabile di natura proteica, che fa crescere il livello di AMP ciclico nelle cellule intestinali con conseguente ipersecrezione di elettroliti e di acqua dalle cellule. La mucosa intestinale rimane tuttavia intatta, in quanto tale microrganismo non ha capacità invasive.

Per quanto concerne la ***diagnosi di laboratorio***, l'esame microbiologico principale che permette di stabilire la presenza di batteri patogeni nelle feci è la ***coprocoltura*** che prevede la coltura, l'identificazione e l'antibiogramma del ceppo in esame. Nel campione di feci sono routinariamente cercati *Salmonella, Shigella* e *Campylobacter.* L'identificazione dei ceppi di *Salmonella* e *Shigella* è normalmente eseguita sia con metodo sierologico, utilizzando anticorpi specifici, sia con metodo biochimico, in modo da avere una doppia conferma. Per gli altri batteri patogeni è necessaria una specifica richiesta affinché siano ricercati nel campione. Per *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio cholerae* sono previsti specifici esami colturali, mentre per il quanto riguarda *Clostridium difficile* ed *E. coli* enterotossigeni sta prendendo sempre più piede la ricerca delle tossine con metodo immunoenzimatico. Per gli E. coli enteroemorragici è prevista una diagnosi sierologica ricercando gli anticorpi diretti contro il lipopolisaccaride O157. È importante tenere presente che un solo campione di materiale biologico è poco indicativo, in quanto la quantità dei batteri o delle tossine eliminate con le feci non avviene in modo continuo; pertanto è consigliabile esaminare almeno tre campioni di feci raccolti in diversi momenti.

La ***terapia*** è chiaramente dipendente dall'agente eziologico responsabile dell'infezione. È comunque consigliabile mirare la terapia antibiotica consultando l'antibiogramma quando disponibile, in quanto l'antibiotico-resistenza presenta una sempre maggiore diffusione.

Infezioni delle vie respiratorie

Il tratto respiratorio è il più comune sito di infezione da parte dei patogeni. Il gran numero e la varietà dei possibili agenti eziologici sono in parte interpretabili considerando la peculiarità delle vie aeree. Queste, infatti, sono in continua e diretta comunicazione con l'esterno; sono ininterrottamente percorse dal flusso aereo, frequente veicolo di cause irritative (contaminanti atmosferici, fumo, aria fredda e polveri professionali). L'apparato respiratorio è comunque dotato di efficienti meccanismi di difesa: l'apparato linfatico rinofaringeo, l'apparato ciliare, lo strato mucoso a pH acido e ricco di lisozima, frazioni anticorpali, interferone ed infine l'abbondanza del sistema macrofagico nell'interstizio polmonare.

Va ricordato che esiste una ***flora normale colonizzante il tratto respiratorio***: la maggior parte delle superfici delle alte vie respiratorie è comunemente colonizzata da microrganismi, che costituiscono la normale flora di quel distretto e difficilmente causano malattie. I batteri più frequenti nella cavità nasale sono gli stafilococchi in particolare *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis,* ma possono colonizzare questa cavità anche i corinebatteri aerobi. *Streptococcus pneumoniae* ed *Haemophilus influenzae* possono colonizzare la cavità naso faringea: si tratta comunque di ceppi non capsulati e non virulenti. L'orofaringe contiene grandi quantità di *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* ma il più importante gruppo di microrganismi che colonizzano questa sede è quello degli streptococchi alfa-emolitici o viridanti, in particolare *Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus milleri* e *Streptococcus salivarius.* Si pensa che questi microrganismi possano svolgere un'azione antagonista nei confronti degli streptococchi patogeni. La cavità orofaringea può inoltre essere colonizzata da difteroidi, *Moraxella catarrhalis* e da alcune specie del genere Neisseria. La flora colonizzante svolge un ruolo di competizione nei confronti dei patogeni: inoltre alcuni microrganismi sono in grado di produrre tossine o acidi ad effetto battericida. È importante sottolineare che l'alterazione del normale rapporto numerico fra le diverse specie (dismicrobismo) può dar luogo ad uno stato di malattia. Le vie aeree inferiori, al di sotto della laringe, sono praticamente sterili.

Prima che si stabilisca un'infezione alle alte vie respiratorie è necessario che i microrganismi patogeni inalati siano in grado di colonizzare il tratto respiratorio, ovvero abbiano una dose infettante sufficiente e siano ancora in grado di riprodursi dopo essere transitati nell'aria. Alla colonizzazione segue la capacità di indurre la malattia, processo reso possibile da diversi ***fattori di patogenicità***: fattori di aderenza batterica (proteine F e M di *Streptococcus pyogenes*, emoagglutinine di *Bordetella pertussis*), tossine extracellulari (tossina difterica o della pertosse), capacità di crescita nei tessuti ospite (virus e *Chlamydia*), evasione dei meccanismi di difesa dell'ospite (capsule inibenti la fagocitosi in *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes, Haemophylus influenzae*).

Dal punto di vista dell'***eziologia***, gli agenti più frequenti delle infezioni respiratorie comprendono virus (rhinovirus, RSV, adenovirus, virus influenzali e parainfluenzali), batteri (*Streptococcus pnemoniae*, streptococchi di gruppo A, B, *C, Mycoplasma pneumoniae, Haemophylus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Enterobatteri, Staphylococcus aureus*), miceti, protozoi ed elminti. Sono descritti qui di seguito i ***batteri più comuni responsabili di infezioni alle vie respiratorie***.

Streptococcus pyogenes è uno streptococco Gram-positivo, asporigeno, aerobio facoltativo ed immobile. Appartiene al gruppo A di Lancefield ed è in grado di produrre beta-emolisi. Possiede una capsula di acido ialuronico con attività antifagocitarie, una parete contenente proteine M (con attività antifagocitaria), T (conferisce resistenza alla tripsina), R ed il polisaccaride C. *S. pyogenes* produce molte sostanze extracellulari tra cui la streptolisina O (tossina proteica immunogena con potente attività litica), la streptolisina S (proteina non immunogena con attività litica in particolare su cellule ematiche e tessutali), desossiribonucleasi, ialuronidasi, ed esotossina pirogenica (responsabile dell'esantema scarlattinoso). L'uomo è il principale serbatoio ed ospita i microrganismi nel cavo orale o a livello delle mucose nasali, talora in modo occasionale e transitorio, talora come portatore sano o soggetto malato. Il contagio avviene prevalentemente per contatto diretto. *S. pyogenes* provoca infezioni di tipo suppurativo prevalentemente localizzate alle prime vie aeree (tonsillite, faringite, otite, sinusite, mastoidite), e talvolta il processo può estendersi alle vie inferiori provocando la broncopolmonite. I ceppi eritrogenici nei soggetti non immuni causano la scarlattina. Tutte le infezioni da *S. pyogenes* possono essere accompagnate dalle complicanze post-streptococciche a patogenesi immunologica: glomerulonefrite acuta, reumatismo articolare acuto, *corea minor*, eritema nodoso.

Streptococcus pneumoniae, detto comunemente pneumococco, è uno streptococco Gram-positivo caratterizzato dall'aggregazione a paia di cellule batteriche lanceolate. Lo pneumococco presenta il corredo antigenico tipico degli streptococchi: l'antigene specie specifico C somatico, polisaccaridico, e l'antigene M tipo-specifico proteico. *S. pneumoniae* è caratterizzato da una capsula polisaccaridica che conferisce virulenza al ceppo in quanto possiede attività antifagocitarie. Si conoscono diversi sierotipi di *S. pneumoniae* che si differenziano in base ai polisaccaridi della capsula. Lo pneumococco causa la maggioranza delle polmoniti batteriche. Dal cavo orale, ove è frequentemente presente come commensale, può raggiungere aree adiacenti e causare otite, mastoidite, sinusite e meningite. Può provocare infezioni generalizzate con localizzazioni a distanza.

Haemophylus influenzae è un piccolo cocco-bacillo Gram-negativo aerobio facoltativo, immobile, asporigeno. Dal punto di vista nutrizionale è esigente dei fattori X e V (protoporfirine e NAD). *H. influenzae* possiede una capsula, correlata con la viruenza, sede di antigeni

polisaccaridici che permettono l'identificazione in sei sierotipi (a, b, c, d, e, f). Il tipo b risulta il responsabile della quasi totalità di infezioni nell'uomo, in particolare nel bambino determina meningiti e laringiti ostruttive. Il sierotipo b sostiene setticemie che possono sfociare in polmoniti, celluliti, ed occasionalmente in artriti suppurative, osteomieliti e pericarditi. Le infezioni respiratorie da *H. influenzae* comprendono forme di laringite, epiglottite, tracheite, bronchite e broncopolmonite alveolare.

Klebsiella pneumoniae è un bacillo Gram-negativo, asporigeno, immobile, anaerobio facoltativo, capsulato, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Sono noti 80 antigeni capsulari K e 11 somatici O, che ne permettono la differenziazione in sierotipi. È un importante patogeno nosocomiale, incidendo per circa il 10% di tutte le infezioni contratte in ospedale; in questo ambiente sono spesso endemici i ceppi multiresistenti. Il tratto gastrointestinale è considerato il principale serbatoio e le mani del personale il più importante fattore di trasmissione. Le infezioni più frequenti sostenute da *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* sono quelle urinarie, seguite da quelle respiratorie (in particolare è causa di polmonite soprattutto negli etilisti e nei diabetici).

Il principale agente eziologico della ***faringite batterica*** è lo *Streptococcus pyogenes* . La faringite inizialmente è abitualmente eritematosa, mentre in seguito può comparire essudato purulento. La faringite streptococcica va tenuta in particolare considerazione per le complicanze immediate dovuta alla diffusione dello streptococco ai distretti contigui o per via ematogena, e per le complicanze tardive a patogenesi immunologica. La diagnosi va posta principalmente sulla base dell'isolamento dello *S. pyogenes* dal ***tampone faringeo***. In alcuni rari casi, in particolare in pazienti immunocompromessi, anche l'isolamento di streptococchi beta-emolitici del gruppo C e G può risultare significativo: tale infezione non presenta però complicanze tardive ad origine immunologica. La terapia è diretta principalmente alla prevenzione delle possibili complicanze. *S. pyogenes* ha mantenuto una buona sensibilità nei confronti dei beta-lattamici; al contrario la resistenza di questo microrganismo è aumentata nei confronti dell'eritromicina e delle tetracicline.

Gli agenti eziologici più comuni responsabili di ***sinusite acuta*** sono *S. pneumonie* ed *H. influenzae* che sono coinvolti nel 70% dei casi, mentre *S. aureus*, batteri anaerobi, bacilli Gram-negativi e *S. pyogenes* sono più raramente causa di questa infezione. La sinusite batterica acuta è in genere la complicanza di un'infezione virale delle prime vie aeree; in alcuni casi può verificasi in soggetti affetti da rinite allergica o da anomalie anatomiche delle ossa nasali, o per estensione da un'infezione dentaria. La sintomatologia è caratterizzata dalla comparsa di dolore nella regione del seno interessato, ostruzione nasale, cefalea, febbre e, nei bambini, da tosse ed edema facciale. La diagnosi è essenzialmente clinica, la coltura del tampone nasale è in questo caso poco significativa in quanto sono evidenziati principalmente i batteri contaminante residenti nelle narici.

L'***otite media*** può decorrere in modo acuto o cronico. Nel decorso acuto si manifesta con presenza di essudato purulento o sieroso, dolore, febbre, e perforazione della membrana timpanica. I microrganismi più comunemente coinvolti sono *S. pneumoniae* ed *H. influenzae* ma anche batteri come *Branhamella catarrhalis, S. aureus, S. pyogenes, S. agalactiae* (nei neonati) possono dar luogo ad otiti. Bacilli Gram-negativi possono determinare questa patologia nelle primissime età e *Chlamydia trachomatis* nei lattanti. Occasionalmente anche *Mycoplasma pneumonie* è stato ritenuto responsabile di otite media acuta. La somministrazione di antimicrobici è sempre opportuna per prevenire le complicanze (mastoidite, labirintite, meningite) e le recidive, anche se la risoluzione dell'episodio può avvenire spontaneamente. L'otite media cronica può essere definita come una sequela dell'otite acuta dovuta all'insuccesso della terapia o al mancato funzionamento delle tube per cause anatomiche o allergiche. È caratterizzata da episodi ricorrenti di infezione acuta con effusione prolungata legata alla perforazione permanente della membrana timpanica. La diagnosi microbiologica dell'otite media è effettuata prelevando con tampone sterile il materiale patologico che fuoriesce naturalmente ed eseguendo l'esame colturale. Nell'interpretazione dell'esame colturale è necessario tenere conto che nel condotto uditivo è normalmente presente una flora batterica residente che deve essere attentamente discriminata da quella responsabile di infezione; comunque, in particolari condizioni locali, anche la flora residente può svolgere un ruolo patogeno.

La ***bronchite acuta*** si manifesta soprattutto nei mesi invernali ed è caratterizzata da tosse, raucedine e febbre. L'eziologia e prevalentemente virale, ma in piccola percentuale può essere di origine batterica, in particolare *H. influenzae, M. pneumoniae, B. catarrhalis*; esiste, comunque, una reale difficoltà nell'attribuire loro un ruolo patogeno, in quanto questi microrganismi possono essere presenti in condizioni normali nelle vie respiratorie.

La ***bronchite cronica*** è caratterizzata da tosse ed iperproduzione di muco nell'albero respiratorio. Di particolare interesse microbiologico è la riacutizzazione di questa patologia in quanto lo stato di compromissione dei meccanismi di difesa superficiale e l'eccesso di muco favoriscono l'impianto da parte dei commensali o di contaminanti occasionali dell'orofaringe. I microrganismi più frequentemente coinvolti sono *H. influenzae, S. pneumoniae, B. catarrhalis* ma non di rado si possono riscontrare *K. pneumoniae, Enterobacter spp* e *Pseudomonas aeruginosa*, specie in pazienti ospedalizzati. L'esame colturale è di notevole importanza considerata la varietà dei microrganismi coinvolti e la loro frequente resistenza a numerosi chemioterapici. L'esame microbiologico può essere eseguito su liquido di lavaggio, broncoaspirato ed espettorato purché possiedano le caratteristiche che consentano di garantire la provenienza dalle basse vie respiratorie e l'assenza di contaminazione da parte della flora orale o delle alte vie.

La ***polmonite*** occupa uno dei primi posti tra le cause di morte, soprattutto nelle età estreme e nel sesso maschile. Gli agenti eziologici possono raggiungere le vie aeree inferiori per via

inalatoria o per aspirazione di flora batterica residente nelle vie aeree superiori. Le più comuni cause favorenti l'approfondimento dei microrganismi nel parenchima polmonare sembrano essere le infezioni virali e le manovre strumentali; comunque ogni condizione in grado di compromettere i meccanismi di difesa facilita la comparsa della malattia. Gli agenti eziologici più comunemente riconosciuti causa di polmoniti sono *S. pneumoniae, S. aureus, H. influenzae, Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, M. pneumoniae, Legionella pneumophila e Mycobacterium tubercolosis. S. pneumoniae* determina un'infezione endogena, non condizionata da particolari modalità di contagio. *H. influenzae* è scarsamente invasivo: il sierotipo b in particolare è responsabile di polmonite nel bambino e nell'adulto. *S. aureus* colpisce soprattutto neonati (in particolare prematuri) ed anziani ed è frequente in pazienti sottoposti a manovre invasive ed interventi chirurgici. Le polmoniti da *P. aeruginosa* e da *Enterobatteriaceae* sono tipiche nei pazienti immunocompromessi ed hanno elevata incidenza nell'età neonatale. *M. pneumoniae* è responsabile di polmoniti atipiche specie nei giovani mentre *M. tubercolosis* è spesso causa di polmoniti acquisite in comunità. *Legionella pneumophila* dà luogo a polmoniti con frequenza variabile da regione a regione, ma non sembra avere particolare incidenza in Italia. La diagnosi microbiologica prevede la ricerca dell'agente eziologico nell'espettorato o nel liquido di lavaggio bronchiale. Anche l'emocoltura può risultare utile in quanto, nei primi giorni di malattia ed in assenza di terapia antibiotica, si possono verificare gettate batteriemiche.

Infezioni sistemiche

Il sangue è normalmente sterile, ma vari microrganismi possono transitarvi in modo occasionale. La presenza di microrganismi nel torrente circolatorio non accompagnata da manifestazioni di interessamento sistemico è definita batteriemia. Per setticemia o sepsi deve invece intendersi una persistente presenza di microrganismi, in replicazione, nel sangue; questo determina la disseminazione dei batteri nei diversi organi ed apparati, con coinvolgimento multisistemico, spesso dovuto al rilascio di tossine nel torrente circolatorio. La sepsi si manifesta con una risposta sistemica dell'organismo al processo infettivo: tachicardia, tachipnea, ipertermia o ipotermia. La setticemia può facilmente evolvere in sindrome settica (alterata perfusione e ipossia tessutale associate ai sintomi della sepsi) e shock settico (sindrome settica con marcata ipotensione).

Alcuni dati di ***eziologia*** ed ***epidemiologia***. Quasi tutti i batteri sono in grado di causare una setticemia, anche se la frequenza di isolamento di ciascun germe è differente. In era preantibiotica i batteri prevalenti erano sostanzialmente Gram-positivi (*S. pneumoniae, S. pyogenes , S. aureus*) a partire dagli anni settanta si è notato un incremento dei Gram-negativi *(E. coli,*

Klebsiella spp, Enterobacter spp, Pseudomonas) e delle sepsi dovute a miceti (*Candida spp*) ed anaerobi. Nell'ambito delle infezioni nosocomiali occupano una parte rilevante le sepsi dovute a manovre invasive diagnostiche o terapeutiche. L'utilizzo di cateteri, l'inserimento di protesi vascolari, cardiache, pacemaker e le manovre strumentali facilitano l'insediamento nel torrente circolatorio di microrganismi, in particolare Stafilococchi, Enterobatteri, miceti e batteri cutanei. Altre sepsi importanti in ambiente ospedaliero sono quelle riscontrate nel reparto di terapia intensiva specie in pazienti con ventilazione assistita, causate soprattutto da *Pseudomonas aeruginosa*, stafilococchi ed enterobatteri. Tra i batteri Gram-positivi i più frequenti agenti eziologici di setticemia sono: *S. pneumonie, S. pyogenes, S. agalactiae, Enterococchi, S. aureus* e *S. epidermidis*. Sono particolarmente esposti al rischio di setticemia i pazienti granulocitopenici, neoplastici, cirrotici, trapiantati, diabetici scompensati, i prematuri ed i defedati in genere.

In termini di ***diagnosi di laboratorio***, il principale accertamento diagnostico è l'***emocoltura***. Il prelievo deve essere effettuato più volte durante la giornata, possibilmente prima di iniziare la terapia antibiotica, e durante la presenza di brivido o d'innalzamento della temperatura. L'esecuzione di almeno tre prelievi durante la giornata consente di aumentare molto la sensibilità del test. Il risultato dell'emocoltura, con identificazione ed antibiogramma del ceppo isolato, consente di mirare la terapia antimicrobica, sicuramente indispensabile.

Parassitosi

I parassiti sono organismi in grado di sopravvivere e riprodursi in un organismo superiore (ospite) traendone vantaggio. In alcuni casi il parassita può determinare fenomeni patologici a carico dell'organismo ospite pertanto il parassita è considerato patogeno, in altri casi l'interazione non provoca danni all'ospite pertanto il microrganismo è considerato un commensale. Non sempre però la situazione è così chiaramente suddivisa, in quanto numerosi parassiti possono vivere come commensali ed in particolari condizioni di defedamento dell'ospite assumere un ruolo patogeno. I parassiti sono in grado, nell'uomo, di invadere numerosi distretti ed apparati: l'apparato gastroenterico, la cute e il sottocute, il sangue ed il sistema reticolo-endoteliale, l'apparato broncopolmonare e l'apparato urogenitale. I parassiti si suddividono in due grandi categorie: i ***protozoi*** e gli ***elminti***.

Infezioni da protozoi

I protozoi sono *organismi unicellulari* che misurano da pochi micrometri (μm) fino a 50÷60 micrometri. La cellula protozoaria rispecchia la struttura della cellula eucariota: possiede, infat-

ti, un nucleo (plurimo nella fase cistica) contenente DNA in cromosomi e RNA in nucleoli, circondato da una membrana nucleare fenestrata. Il citoplasma, in cui si distinguono un endoplasma ed un ectoplasma, contiene un citoscheletro, numerosi organelli tra cui ribosomi, mitocondri (solo negli aerobi), reticolo citoplasmatico, apparato di Golgi, idrogenosomi (Trichomonas), glicosomi (tripanosomi e leishmanie) e lisosomi, ed è circondato da una membrana citoplasmatica. Molti protozoi sono in grado di movimento grazie all'emissione di pseudopodi (amebe) o a particolari strutture, le ciglia e i flagelli. La morfologia e la funzionalità di tutte queste strutture può variare secondo la fase del ciclo: nella fase di vita attiva dell'organismo (*trofozoita*) essi hanno maggiore evidenza rispetto a quanto avviene nella forma quiescente (*cisti*).

I fenomeni riproduttivi nei protozoi possono essere *sessuati* o *asessuati*. La riproduzione sessuata è presente con certezza solo in alcuni generi (Plasmodium), e avviene tramite meiosi e produzione di gameti che possono formarsi per *isogamia* o *anisogamia*. La riproduzione asessuata avviene per mitosi e per successiva divisione binaria. In alcuni casi la divisione citoplasmatica può non avvenire o può permanere incompleta, quindi i corpi dei protozoi restano uniti per un'estremità (corpi a rosetta). Nel caso dei coccidi e dei plasmodi avvengono ripetute moltiplicazioni nucleari seguite dalla suddivisione del citoplasma con formazione di numerose cellule mononucleate (*merozoiti*); questa fase è denominata *schizogonia*.

I ***protozoi flagellati*** hanno in comune numerose caratteristiche morfologico-funzionali tra cui quella di possedere glicosomi, e di non possedere invece la catalasi e la perossidasi. Molti sono patogeni per l'uomo e per gli animali. Sono qui descritti in modo sintetico i protozoi flagellati di interesse medico

Tripanosoma brucei gambiense è l'agente eziologico della malattia del sonno, che si manifesta nel primo stadio con una reazione infiammatoria localizzata, nel secondo stadio, parassitemico, con febbre, anemia, astenia, deperimento, splenomegalia, e linfoadenopatia e nel terzo stadio con una meningoencefalite che evolve verso il coma e la morte. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo. *Tripanosoma cruzi* determina la distruzione delle cellule in cui si localizza (miocardiociti, leiomiociti, gangli dei plessi nervosi autonomi nelle pareti degli organi cavi) provocando cardiomiopatia e sindrome megaviscerale con veloce decorso verso la morte. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo. La diagnosi è effettuata evidenziando i Tripanosomi nello striscio di sangue: è comunque molto frequente ottenere falsi negativi in quanto il parassita possiede una scarsa ed intermittente parassitemia

Le *Leishmaniae* sono parassiti intracellulari dell'ospite vertebrato, sono trasmesse da artropodi ematofagi, e determinano una patologia localizzata alla cute (*leishmaniosi cutanea*) o alle mucose (*leishmaniosi mucocutanea*) oppure una malattia generalizzata (*leishmaniosi viscera-*

le). La leishmaniosi cutanea e la leishmaniosi mucocutanea si manifestano con ulcere a stampo che evolvono in cicatrici ad anello, permanenti e deturpanti, mentre la leishmaniosi viscerale determina una compromissione dei parenchimi in particolare fegato, milza, e midollo osseo, con evoluzione spesso letale. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo. La diagnosi è effettuata evidenziando la presenza di *amastigoti* in prelievi bioptici dalle lesioni cutanee mediante esame microscopico.

Giardia intestinalis è un protozoo flagellato che si trasmette tramite ingestione di acqua o cibo contaminati o per contaminazione fecale delle mani. L'infezione si manifesta in alcuni casi asintomaticamente mentre in altri determina disturbi intestinali seguiti da nausea ed anoressia. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo. La diagnosi è effettuata comunemente ricercando le cisti e/o trofozoiti nelle feci o nel liquido duodenale mediante esame microscopico. Generalmente è più probabile trovare i trofozoiti nelle feci diarroiche mentre le cisti si riscontrano nelle feci formate, comunque l'emissione di queste forme è particolarmente discontinua pertanto è necessario esaminare più campioni, preferibilmente raccolti a giorni alterni (nella foto, cisti di *Giardia intestinalis*).

Trichomonas vaginalis è un protozoo che esiste soltanto in forma di trofozoite, senza fasi cistiche. Misura 10÷25 x 7÷8 μm; è dotato anteriormente di quattro flagelli e di una membrana ondulante. Vive a pH acido e a temperatura compresa tra i 35 e i 37 °C. L'unica via di contagio è quella sessuale, in modo particolare tramite uomini asintomatici. La sintomatologia è dominata dalla comparsa di secrezione vaginale accompagnata da prurito o bruciori, leucorrea di colore verdastro, maleodorante e cremosa nella donna mentre nell'uomo è causa di uretrite e può essere considerato come potenziale concausa di sterilità. La diagnosi è effettuata mediante esame microscopico a fresco dell'essudato vaginale ed uretrale, o mediante coltura liquida del materiale prelevato tramite tampone vaginale o uretrale o del liquido seminale.

Le ***amebe*** hanno come caratteristica comune quella di muoversi alterando la forma con l'emissione o la retrazione di pseudopodi.

La specie di maggior interesse medico è *Entamoeba histolytica*, la cui trasmissione avviene tramite via oro-fecale diretta o attraverso cibo ed acqua contaminati. L'infezione può essere di tipo non invasivo e determinare una sindrome gastrointestinale, o di tipo invasivo ed avere effetti più gravi. L'nvasione della mucosa della mucosa intestinale determina una dissenteria

che può essere accompagnata dalla formazione di ulcere, necrosi ed ascessi fino alla perforazione intestinale. *Entamoeba histolytica,* tramite la via ematica, può anche provocare localizzazioni extraintestinali a livello epatico, polmonare ed encefalico (ascesso amebico). Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo. La diagnosi è comunemente effettuata mediante esame microscopico diretto a fresco o previa concentrazione. Utilizzando queste tecniche, non è però possibile distinguere la specie *E. histolytica* da *E. dispar.* La distinzione di tale specie può essere effettuata solo utilizzando l'indagine elettroforetica degli enzimi, PCR e tecniche immunoenzimatiche ed ultimamente tecniche ELISA che permettono la ricerca diretta nelle feci di antigeni specifici. Tali metodiche non sono comunemente in uso e pertanto è necessario rivolgersi a centri di riferimento. Nelle feci diarroiche appena emesse è possibile riscontrare la presenza di trofozoiti mentre nelle feci solide o semisolide è più probabile trovare cisti, di 10÷15 micron, sia mature (tetranucleate) che immature (uno o due nuclei, corpi cromatoidi, vacuolo di glicogeno).

I ***plasmodi*** sono gli agenti eziologici della malaria, trasmessa all'uomo per mezzo della puntura di zanzare del genere *Anopheles*. Tutte le quattro specie appartenenti a questo genere determinano tale patologia anche se con gravità differente.

Plasmodium malariae determina la malaria quartana che persiste anche per molti anni nell'uomo. Si manifesta, dopo18÷40 giorni di incubazione, con un attacco febbrile ogni 72 ore, con ingrossamento della milza. Come grave complicanza può determinare una sindrome nefrosica che porta ad una grave insufficienza renale. *Plasmodium vivax* determina la malaria terzana benigna. I sintomi si manifestano con un attacco febbrile ogni 48 ore dopo un periodo di incubazione di 12÷17 giorni. La febbre è comunque preceduta da brividi e sudorazione ed accompagnata da nausea e vomito e spesso da splenomegalia ed anemia. Tale patologia non presenta comunemente complicanze. *Plasmodium falciparum* determina la forma di malaria più grave. Si manifesta dopo 7÷15 giorni dall'infezione con costante febbre elevata e brivido. La localizzazione degli schizonti a livello dei visceri provoca stasi, edemi perivascolari, emorraggie petecchiali, e disfunzione del parenchima. La localizzazione nei vasi encefalici determina stati confusionali, fino al coma, con rapida evoluzione letale. *Plasmodium ovale* determina una malaria clinicamente sovrapponibile a quella di *P. vivax,* anche se causa meno ricadute. Il periodo di incubazione è solitamente di 16÷18 giorni, ma può essere anche più lungo. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo. La diagnosi della malaria è basata sulla ricerca del parassita malarico mediante esame microscopico dello striscio sottile e della goccia spessa del sangue periferico.

Infestazioni da elminti

Gli elminti importanti in patologia umana appartengono a tre classi: Nematodi, Cestodi, Tre-

matodi. Le infestazioni da elminti variano da forme subcliniche a forme gravi in relazione alle specie, alla carica infettante e alle difese dell'ospite.

I ***Nematodi*** sono vermi con corpo cilindrico e canale alimentare completo. La loro lunghezza varia da un millimetro a più di un metro. Il corpo, solitamente arrotondato alle due estremità, non presenta segmentazione, ed è costituito da strato cuticolare esterno elastico, ipoderma di cellule epiteliali, strato muscolare e cavità interna. I sessi sono normalmente separati e lo sviluppo sessuale avviene in modo diretto e semplice. Le diverse specie colonizzano differenti distretti dell'ospite: tratto alimentare, linfonodi, circolo sanguigno, cellule epiteliali e fegato. La copulazione tra il maschio e la femmina avviene normalmente nella regione dell'ospite dove vivono entrambi i sessi. Le uova o le larve infettanti vengono trasmesse tramite le feci, le urine o tramite il circolo sanguigno utilizzando un insetto come vettore. *Ascaris lumbricoides, Ancylostoma, Enterobius vermicularis, Strongyloides stercoralis, Trichiuris trichiura* sono i principali Nematodi di interesse medico.

Ascaris lumbricoides infesta l'uomo tramite l'ingestione di uova presenti su alimenti o mani contaminate. Può determinare numerose reazioni infiammatorie e di ipersensibilità durante l'eventuale migrazione al cuore e ai polmoni. A livello intestinale i vermi adulti determinano malassorbimento, in caso di infestazione massiva possono causare ostruzione e/o perforazione intestinale con conseguenze anche letali. I vermi adulti possono uscire attivamente dall'ano, dalla bocca e dalle narici. La diagnosi si effettua evidenziando la presenza di uova nelle feci mediante esame microscopico diretto o previa concentrazione oppure, quando possibile, con l'identificazione dei vermi adulti. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo.

Ancylostoma si contrae andando a piedi nudi o toccando il terreno con le mani. Questo parassita determina inizialmente una lieve dermatite ed eosinofilia. Giunto a livello intestinale induce un'anemia ipocromica microcitica. La frequente reinfestazione consente la cronicizzazione dell'ancilostomiasi. La diagnosi è effettuata dimostrando la presenza di uova mediante esame microscopico diretto o previa concentrazione. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo.

La trasmissione di *Enterobius vermicularis* avviene per via oro-fecale tramite mani, lenzuola, oggetti, cibo contaminati da feci infette. L'infezione si manifesta con prurito anale e nelle infestazioni intense anche con infiammazioni catarrali della mucosa intestinale. La diagnosi viene effettuata mediante scotch-test, ovvero ricercando, mediante esame microscopico diretto, la presenza di uova su scotch precedentemente adeso alla zona perianale del paziente ed applicato su vetrino portaoggetti. Tale procedure deve essere effettuata di mattina prima che il paziente si sia lavato e ripetuta per almeno tre giorni (preferibilmente alterni), in modo da aumentare la sensibilità del test. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo.

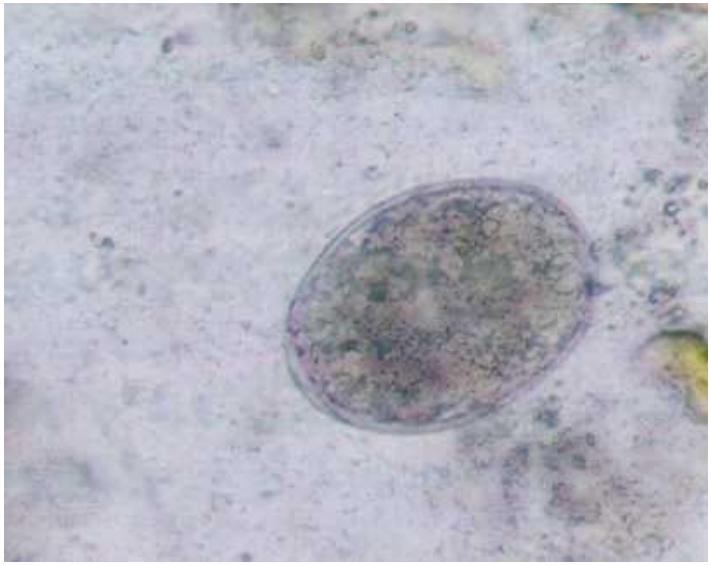
La penetrazione delle larve di *Strongyloides stercoralis*, che avviene attraverso la cute, determina una lieve dermatite con eosinofilia. La successiva localizzazione intestinale, specie se massiva, provoca un'infiammazione catarrale cronica dell'intestino con diarrea e dolori epigastrici. L'endoinfestazione causa emorragie ed ispessimento della parete intestinale, gravi diarree, disidratazione e grave stato di denutrizione. La diagnosi viene effettuata dimostrando la presenza di uova mediante esame microscopico diretto o previa concentrazione.

Trichiuris trichiura determina una geoelmintiasi trasmessa con la polvere o con il cibo contaminato con terra inquinata. Questo parassita rappresenta un esempio di equilibrio tra ospite e parassita, anche se nelle infestazioni gravi determina anemizzazione, ed un grave stato di emaciazione specie in bambini malnutriti. La diagnosi viene effettuata dimostrando la presenza di uova mediante esame microscopici diretto o previa concentrazione.

I ***Cestodi*** sono vermi piatti di lunghezza variabile da pochi millimetri a 12 metri. Non possiedono un apparato digestivo ma sono strutturati con una testa a scolice, un collo ed un corpo suddiviso in segmenti o proglottidi variabili di numero e forma secondo la specie. Le proglottidi si generano dal collo ed una volta raggiunta la maturità presentano al loro interno gli organi riproduttivi (ermafroditi). La maggioranza dei Cestodi provoca infezioni intestinali. Le infezioni sono spesso clinicamente benigne.

Taenia solium e *Taenia saginata* presentano diversa trasmissione e patogenicità. *T. saginata*, trasmessa da carne bovina cruda contaminata, determina sintomatologia intestinale con perdita di appetito, ma difficilmente l'infestazione ha serie conseguenze. L'infestazione da *T. solium* è provocata dall'ingestione di carne suina cruda contaminata da cisticerchi. *T. solium* determina un'infestazione intestinale, che si manifesta come quella da *T. saginata*, ed una forma più grave denominata cisticercosi, provocata dalla migrazione delle larve in tutti gli organi con formazione di noduli calcificati. La gravità della cisticercosi dipende dalla localizzazione, l'infestazione del sistema nervoso centrale determina la morte. La diagnosi di genere viene effettuata evidenziando le uova nelle feci mediante esame microscopico diretto o previa concentrazione. Per effettuare una diagnosi di specie è necessaria l'identificazione delle proglottidi gravide emesse con le feci e/o dello scolice. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo.

L'infestazione da *Diphyllobotrium latum* è causata dalle larve ingerite con pesci d'acqua dolce crudi o poco cotti. La sintomatologia può essere assente o minima con vaghi disturbi intestinali, dolori addominali, diarrea e talvolta anemia. L'entità dei sintomi dipende dal numero di vermi presenti, e dalla quantità e dal tipo dei cataboliti prodotti e dalla sensibilità individuale. La patogenicità di *D. latum* è legata alla sua azione di blocco dell'assorbimento della vitamina B12. La diagnosi viene effettuata dimostrando la presenza di uova mediante esame microscopico diretto o previa concentrazione (nella foto, uovo di *Diphyllobothrium latum*).



I ***Trematodi*** sono vermi piatti dorsoventralmente, non segmentati. Sono dotati di un apparato digestivo a fondo cieco. Tutti i generi appartenenti a questa classe hanno un ciclo di riproduzione asessuata nel primo ospite intermedio.

Schistosoma mansoni e Schistosoma haematobium sono le due specie di maggior interesse medico. L'infestazione avviene durante l'immersione in acque contaminate da *cercarie* o per via orale. *S. mansoni* determina la schistosomiasi intestinale caratterizzata da disturbi dissenterici e nei casi più gravi, da interessamento epatico con ipertensione portale. *S. haematobium* è l'agente eziologico della schistosomiasi urinaria, la cui sintomatologia è molto variabile ma sempre accompagnata da ematuria: determina complicanze vescicali, renali e talvolta genitali. La diagnosi viene effettuata principalmente dimostrando la presenza di uova nelle feci o nelle urine mediante esame microscopico diretto o previa concentrazione. Il prelievo urinario deve essere effettuato tra le ore 10 e le ore 14, in quanto durante questa fascia oraria il numero delle uova nelle urine è più elevato. Il ciclo del parassita è illustrato nella tabella al termine del capitolo.

I ***cicli biologici*** dei principali parassiti sono riassunti nella seguente tabella.

Parassita	***Modalità di contagio***	***Ciclo biologico***			
Ancylostoma spp.	Tramite contatto con terreno contaminato.	Le larve nel terreno si sviluppano nella forma infettiva, che penetra attraverso la pelle e migra, attraverso il circolo sanguigno, nei polmoni.	Le larve, tramite i capillari polmonari, raggiungono gli alveoli e tramite colpi di tosse risalgono le vie aeree e vengono inghiottite.	Le larve entrano nell'intestino, aderiscono alla sua superficie e maturano nella forma adulta che, attaccandosi alla superficie intestinale, si nutre di sangue.	Le femmine producono le uova, che passano nelle feci dell'ospite e successivamente si schiudono nel terreno.
Ascaris lumbricoides	Tramite alimenti o mani contaminate.	Le uova ingerite dall'ospite si schiudono nell'intestino e le larve penetrano nei tessuti intestinali e nel circolo sanguigno ed arrivano ai polmoni dove raggiungono il terzo stadio larvale.	Le larve al terzo stadio larvale migrano attraverso i capillari polmonari agli alveoli, e tramite colpi di tosse. risalgono le vie aree.	Le larve raggiungono l'intestino, dopo essere state espettorate ed inghiottie, e completano il loro sviluppo. .	Le femmine producono le uova che passano nelle feci dell'ospite. Le larve all'interno delle uova raggiungono lo stadio infettivo.
Diphyllobothrium latum	Tramite carne cruda o poco cotta di pesce di lago.	L'uomo si infetta quando ingerisce plerocercoidi contenuti in pesce crudo o poco cotto.	I plerocercoidi aderiscono all'intestino e si trasformano in vermi adulti.	Le uova prodotte passano nelle feci e successivamente nelle acque dolci, dove si schiudono e rilasciano il coracidio, che ingerito da un copepode si trasforma in procercoide.	Il copepode viene mangiato da un pesce ed il procercoide si trasforma nei muscoli del pesce in plerocercoide.

Entamoeba histolytica	Tramite acqua o alimenti contaminati	Le cisti vengono ingerite dall'uomo tramite acqua o cibo contaminati.	Nell'intestini le cisti si schiudono ed i trofozoiti colonizzano l'intestino.	I trofozoiti si riproducono tramite una semplice divisione e possono invadere il circolo sanguigno ed essere trasportati a diversi organi.	Le cisti passano nelle feci.
Enterobius vermicularis	Contagio oro-fecale.	L'uomo si infetta ingerendo le uova contenenti le larve infettive.	Nell'intestino le uova si schiudono ed i vermi raggiungono la maturità sessuale.	Le femmine depositano le uova a livello dell'ano.	Le uova possono restare adese all'ano e schiudersi (le rispettive larve tornano nell'intestino e si trasformano in vermi adulti: retroinfezione) oppure contaminare mani od oggetti.
Giardia lamblia	Tramite acqua o alimenti contaminati.	Cisti vengono ingerite dall'uomo tramite acqua o cibo	Nell'intestini le cisti escidono ed i trofozoiti colonizzano l'intestino	Le cisti passano nelle feci che infettano acque o cibo.	I roditori sono spesso implicati come serbatoio.
Leishmania spp	Tramite insetto vettore	L'ospite vertebrato si infetta con i promastigoti (P) quando viene punto dal vettore	I P penetrano nei macrofagi circolanti e si riproducono come amastigoti (A).Il macrofago muore, gli A sono rilasciati ed infettano altri macrofagi	Il vettore ingerisce i macrofagi durante il pasto di sangue.	Gli A vengono rilasciati nell'intestino e si riproducono come P.

Plasmodium spp	Tramite insetto vettore.	La zanzara inietta gli sporozoiti (S) quando punge l'uomo. Gli S penetrano nelle cellule del fegato, si riproducono asessualmente ed invadono il circolo sanguigno.	Il parassita invade e distrugge gli eritrociti rilasciando merozoiti. Alcuni merozoiti si trasformeranno in gametociti maschili o femminili.	I gametociti sono ingeriti dalla zanzara durante il pasto di sangue.	I gametociti si fondono nell'intestino del vettore producendo sporozoiti che migrano nelle ghiandole salivari del vettore.
Schistosoma spp	Tramite acqua contaminata.	Le cercarie penetrano nella pelle dell'uomo immerso in acqua ed invadono il circolo sanguigno.	I vermi immaturi raggiungono la maturità sessuale nelle vene della cavità addominale.	Le femmine producono le uova che penetrano nel tratto intestinale o nella vescica e passano nelle urine e nelle feci e poi nelle acque.	Il miracidio si schiude dalle uova ed infetta l'ospite primario (chioccio-la) e si trasforma in cercaria.
Strongyloides stercoralis	Tramite terreno contaminato.	La larva filariforme penetra nella pelle dell'ospite, entra nel circolo sanguigno e raggiunge i polmoni, gli alveoli e successivamente l'intestino.	Nell'intestino la larva filariforme matura nel parassita femmina e produce le uova che si schiudono in larve rabditoidi.	Le larve rabditoidi possono trasformarsi in larve strongiloidi e penetrare nel circolo sanguigno (reinfezione) o passare nelle feci e poi nel terreno.	Nel terreno possono trasformarsi in larve strongiloidi o trasformarsi in maschi o femmine a vita libera.
Taenia spp	Tramite carne cruda di maiale o bue.	L'uomo si infetta ingerendo i cisticerchi contenuti nella carne cruda o poco cotta.	Nell'intestino i cisticerchi si trasformano in vermi adulti che producono uova.	Le uova e/o le proglottidi, passate nelle feci, vengono ingerite dagli ospiti (maiale o bue).	Le uova si schiudono nell'intestino dell'ospite e le larve migrano nei muscoli dove si trasformano in cisticerchi.

Trichiuris spp	Tramite cibo o polvere contaminata.	I vermi adulti raggiungono l'intestino dell' ospite e producono le uova che passano nelle feci.	Le larve contenute nelle uova si trasformano in larve infettive.	Le uova vengono ingerite dall'ospite.	Le uova si schiudono nell'intestino e le larve raggiungono la maturità sessuale e si accoppiano.
Tripanosoma cruzi	Tramite insetto vettore.	Il parassita si riproduce asessualmente nell'intestino dell'insetto. I tripomastigoti metaciclici (TM) migrano nel retto del vettore.	L'insetto punge e defeca sulla cute dell'uomo che grattandosi veicola i TM negli occhi o nell'intestino.	I TM penetrano nelle cellule e si riproducono asessualmente come amastigoti che si liberano dopo la morte cellulare. Alcuni amastigoti infettano altre cellule mentre altri si trasformano in tripomastigoti e restano nel circolo sanguigno.	Il vettore si infetta ingerendo amastigoti o tripomastigoti durante il pasto di sangue.
Tripanosoma spp	Tramite insetto vettore.	Il parassita si riproduce asessualmente nell'intestino dell'insetto, migra nelle ghiandole salivari e si trasforma in tripomastigoti metaciclici (TM).	L'insetto inietta nell'uomo i TM mentre si nutre di sangue.	I TM si trasformano in tripanosomi e si riproducono asessualmente nel circolo sanguigno.	L'insetto si infetta con i tripanosomi mentre si nutre di sangue.

Cenni interpretativi sulle analisi di sierologia infettiva

(G. Lissoni)

In tutti i casi vale il seguente ***primo principio generale***…

…la presenza d'immunoglobuline della classe ***IgM*** caratterizza la ***fase acuta*** dell'infezione, mentre la presenza d'immunoglobuline della classe ***IgG*** testimonia un'***infezione in via di guarigione o di vecchia data***.

Quando la clinica e/o i risultati delle analisi indicano un'infezione acuta o sospetta tale, vale il ***secondo principio generale***, per cui…

…è solamente la ***dinamica dell'andamento anticorpale***, studiata mediante ripetizione seriata nel tempo delle analisi, che può fornire indicazioni risolutive.

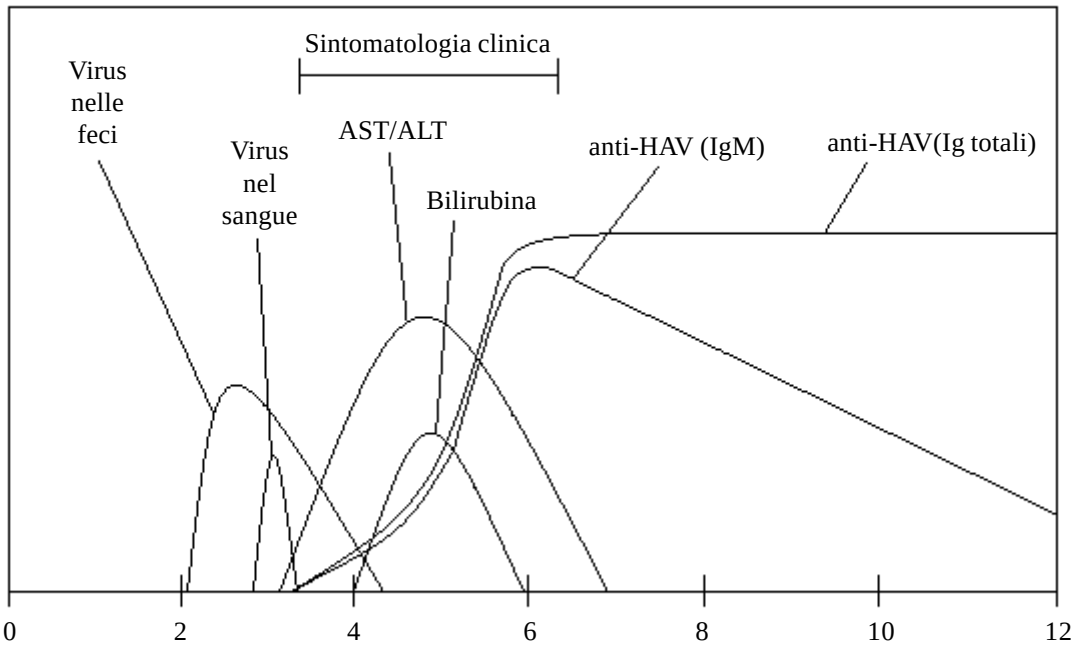
Infine per l'interpretazione dei risultati delle analisi nelle quali la concentrazione degli anticorpi specifici sia espressa come ***titolo anticorpale*** (reciproco della massima diluizione alla quale si evidenziano ancora anticorpi nel siero), vale il seguente ***terzo principio generale***…

…qualora si sia avuta la possibilità d'eseguire l'analisi sia durante la fase acuta della malattia sia durante la convalescenza (con un intervallo di circa 15 giorni fra i due prelievi), ***risulta indicativo d'infezione recente un valore superiore a 4 del rapporto fra il titolo ottenuto durante la convalescenza e quello ottenuto durante la fase acuta della malattia***.

Epatite virale di tipo A

Alla ***fase iniziale***, caratterizzata dalla presenza del virus prima nelle feci e poi nel sangue, segue la ***fase sintomatica***, con aumenti variabili delle transaminasi e della bilirubina (epatite). Le **IgM,** che caratterizzano la fase iniziale della reazione anticorpale, sono progressivamente sostituite dalle ***IgG***, che permangono tutta la vita, un fenomeno reso possibile da successivi ulteriori contatti con il virus.

Profilo sierologico dell'epatite virale A



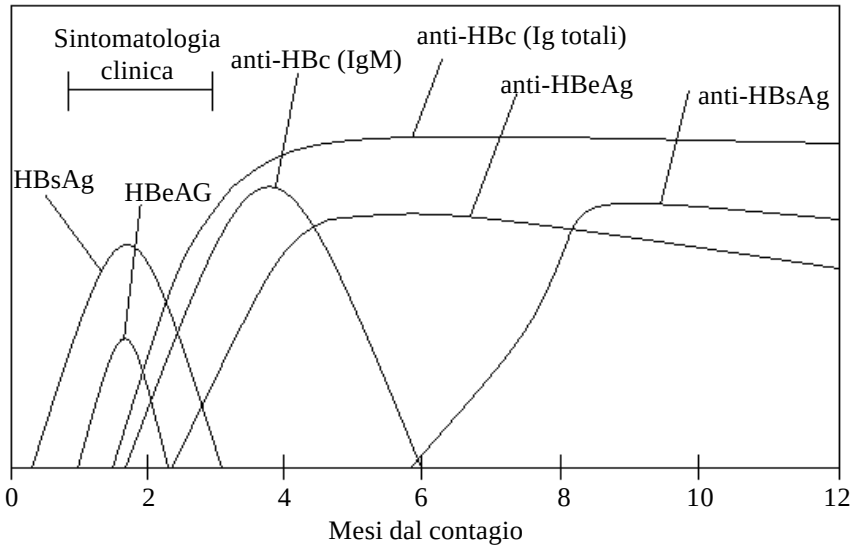
Sulla base del profilo sierologico, i criteri interpretativi sono semplici, e così riassumibili:

Ab anti-HAV (Ig totali)	*Ab anti-HAV (IgM)*	*Interpretazione*
Negativi	Negativi	Soggetto non immune
Positivi	Negativi	Soggetto immune (infezione pregressa o vaccinazione)
Positivi	Positivi	Infezione in atto o recente

Epatite virale di tipo B

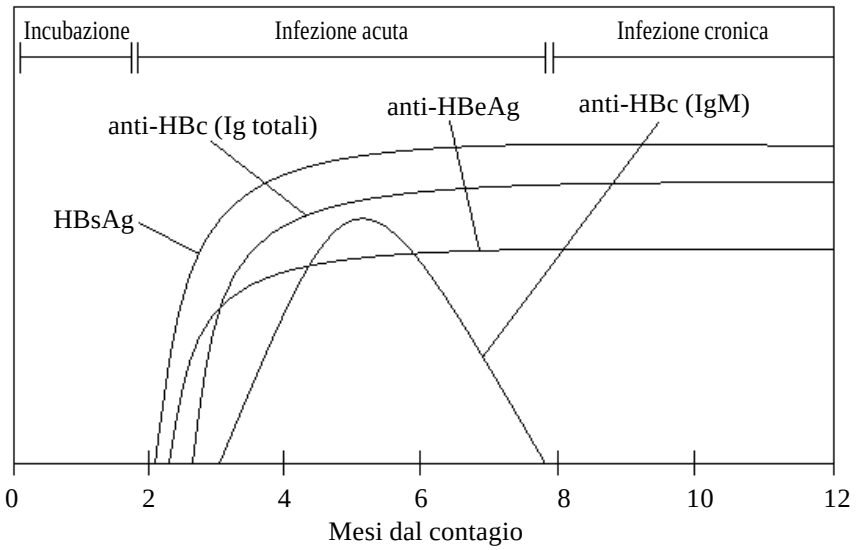
Nella maggior parte dei casi la malattia evolve verso la guarigione.

Profilo sierologico dell'epatite B (guarigione)



In una minoranza dei casi l'epatite B evolve verso la cronicizzazione, caratterizzata dalla mancata comparsa degli anticorpi anti-*HBsAg* e degli anticorpi anti-*HBeAg*, cui corrisponde la persistenza dei corrispondenti antigeni, HBsAg e HBeAg

Profilo sierologico dell'epatite B (cronicizzazione)



Sulla base dei profili sierologici illustrati, i criteri interpretativi sono piuttosto articolati

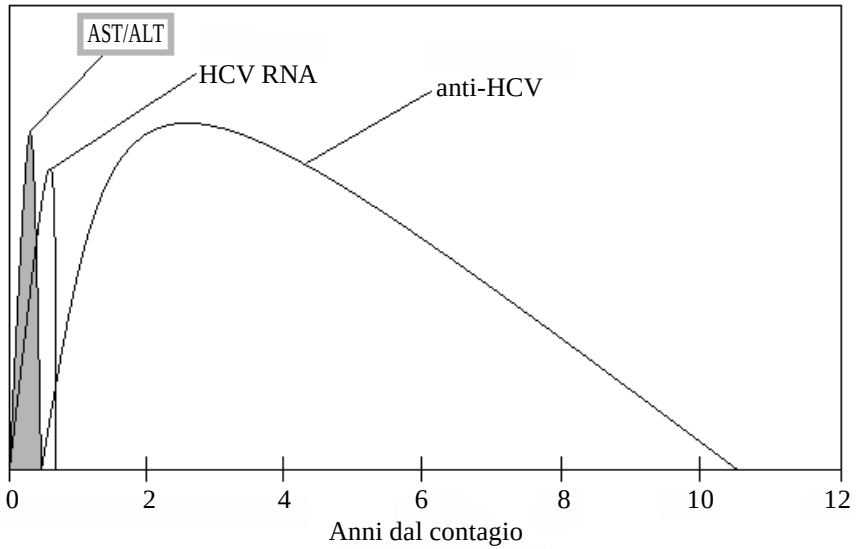
HBsAg	***Ab anti-HBcAg (Ig totali)***	***Ab anti-HBcAg (IgM)***	***HBeAg***	***Ab anti-HBeAg***	***Ab anti-HBsAg***	***Interpretazione***
Positivo	Positivi	Positivi	Positivo	Negativi	Negativi	Fase acuta
Positivo	Positivi	Positivi	Negativo	Positivo	Negativi	Fase di guarigione
Positivo	Positivi	Negativi	Positivo	Negativi	Negativi	Cronicizzazione
Positivo	Negativi	Negativi	Positivo	Negativi	Negativi	Fase precoce
Positivo	Negativi	Negativi	Negativo	Negativi	Negativi	Portatore sano
Negativo	Positivi	Positivi	Negativo	Positivi	Negativi	Fase finestra
Negativo	Positivi	Positivi	Negativo	Positivi	Positivi	Fase di guarigione
Negativo	Positivi	Negativi	Negativo	Negativi	Positivi	Infezione di vecchia data
Negativo	Negativi	Positivi	Negativo	Positivi	Positivi	Fase di guarigione
Negativo	Negativi	Negativi	Negativo	Negativi	Positivi	Soggetto immune (infezione pregressa o vaccinazione)

HB = Hepatitis B, *Ab* = anticorpi, *Ag* = antigene, *c* = core (parte centrale della particella virale), *e* = envelope (involucro della particella virale), *s* = surface (superficie della particella virale).
HBsAg = antigene di superficie dell'epatite B
HBeAg = antigene e dell'epatite B
Ab anti-HBcAg = anticorpi diretti contro l'antigene del core dell'epatite B
Ab anti-HBeAg = anticorpi diretti contro l'antigene dell'envelope dell'epatite B
Ab anti-HBsAg = anticorpi diretti contro l'antigene di superficie dell'epatite B

Epatite virale di tipo C

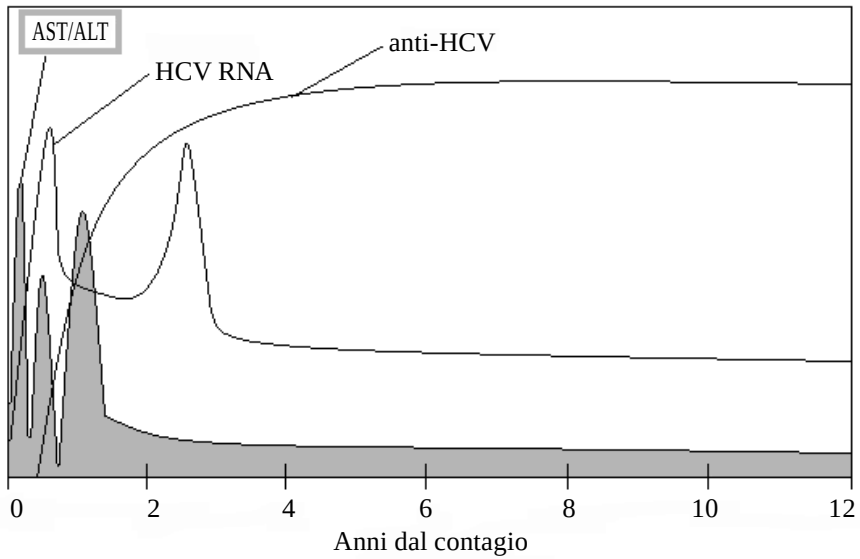
Se in molti casi la malattia evolve verso la guarigione

Profilo sierologico dell'epatite C (guarigione)



in molti altri evolve verso la cronicizzazione, con un'epatite cronica attiva caratterizzata principalmente dalla persistenza dell'aumento delle transaminasi e dalla persistenza dell'*RNA* del virus

Profilo sierologico dell'epatite C (cronicizzazione)



In questi casi il monitoraggio delle poussèes è effettuato con la determinazione quantitativa del numero delle copie virali presenti nel siero.

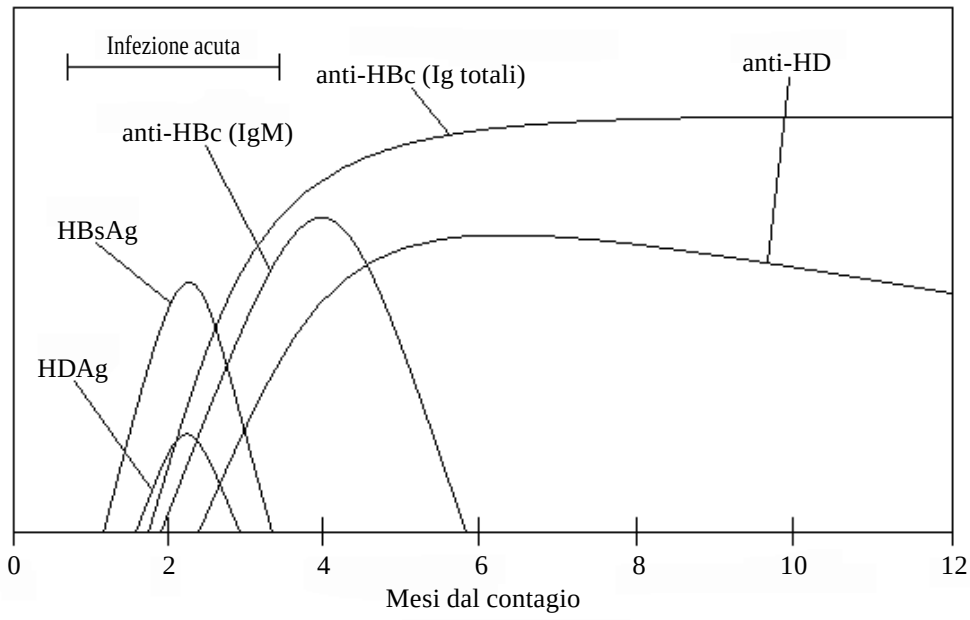
Sulla base dei profili sierologici illustrati, i criteri interpretativi sono i seguenti

HCV RNA	*Ab anti-HCV*	*Interpretazione*
Positivo	Negativi	Fase precoce
Positivo	Positivi	Fase acuta o cronicizzazione (le due alternative sono distinguibili solamente con il monitoraggio dell'evoluzione nel tempo)
Negativo	Positivi	Infezione pregressa

Epatite virale di tipo D

Il virus dell'epatite D è un virus difettivo, in grado di moltiplicarsi solamente in presenza del virus dell'epatite B, del quale utilizza l'involucro (HBsAg). Viene qui riportato il quadro sierologico misto che caratterizza la coinfezione da parte dei due virus

Profilo sierologico dell'epatite virale D (coinfezione)



Sulla base del profilo sierologico illustrato, i criteri interpretativi sono i seguenti

HBsAg	*Ab anti-HBcAg (Ig totali)*	*Ab anti-HBcAg (IgM)*	*HDAg*	*Ab anti-HDAg*	*Interpretazione*
Positivo	Negativi	Negativi	Positivo	Negativi	Fase precoce
Positivo	Positivi	Positivi	Positivo	Negativi	Fase acuta
Negativo	Positivi	Positivi	Negativo	Positivi	Fase di risoluzione
Negativo	Positivi	Negativi	Negativo	Positivi	Infezione di vecchia data

Infezioni da Toxoplasma gondii (toxoplasmosi)

Per le IgG il test viene considerato:

- negativo se IgG < 8 U/mL;
- dubbio se 8 ≤ IgG < 10 U/mL;
- positivo se IgG ≥ 10 U/mL.

Per le IgM il test viene considerato:

- negativo se IgM <0,55 U/mL;
- dubbio se 0,55 ≤ IgM < 0,65 U/mL;
- positivo se IgM ≥ 0,65 U/mL.

Anche nel caso in cui venissero utilizzati valori soglia differenti da quelli indicati, rimane valida la seguente tabella interpretativa

IgG	*IgM*	*Interpretazione*
Negativo	Negativo	Soggetto non immune
Negativo	Dubbio	Infezione in atto (fase iniziale)*
Negativo	Positivo	Infezione in atto*
Positivo	Negativo	Soggetto immune (infezione pregressa)
Positivo	Dubbio	Siero conversione*
Positivo	Positivo	Siero conversione*
Dubbio	Negativo	Residuo di infezione di vecchia data*
Dubbio	Dubbio	Siero conversione*
Dubbio	Positivo	Siero conversione*

(*) In caso di positività o di risultato dubbio è necessario ripetere dopo 15 giorni l'analisi al fine di valutazione l'andamento dell'infezione. La persistenza in due controlli successivi alla distanza di 15 giorni di un risultato positivo o dubbio delle IgM in assenza di un aumento delle IgG, è indice di infezione pregressa o di una possibile reazione aspecifica.

Infezioni da virus della rosolia

Per le IgG il test viene considerato:

- ➢ negativo se IgG < 10 U/mL;
- ➢ dubbio se 10 ≤ IgG < 15 U/mL;
- ➢ positivo se IgG ≥ 15 U/mL.

Per le IgM il test viene considerato:

- ➢ negativo se IgM <0,80 U/mL;
- ➢ dubbio se 0,80 ≤ IgM < 1,2 U/mL;
- ➢ positivo se IgM ≥ 1,2 U/mL.

Anche nel caso in cui venissero utilizzati valori soglia differenti da quelli indicati, rimane valida la seguente tabella interpretativa

IgG	***IgM***	***Interpretazione***
Negativo	Negativo	Soggetto non immune
Negativo	Dubbio	Infezione in atto (fase iniziale)*
Negativo	Positivo	Infezione in atto*
Positivo	Negativo	Soggetto immune (infezione pregressa)
Positivo	Dubbio	Siero conversione*
Positivo	Positivo	Siero conversione*
Dubbio	Negativo	Residuo di infezione di vecchia data*
Dubbio	Dubbio	Siero conversione*
Dubbio	Positivo	Siero conversione*

(*) In caso di positività o di risultato dubbio è necessario ripetere dopo 15 giorni l'analisi al fine di valutazione l'andamento dell'infezione. La persistenza in due controlli successivi alla distanza di 15 giorni di un risultato positivo o dubbio delle IgM in assenza di un aumento delle IgG, è indice di infezione pregressa o di una possibile reazione aspecifica.

Infezioni da citomegalovirus

Per le IgG il test viene considerato:

- ➢ negativo se IgG < 4 U/mL;
- ➢ dubbio se 4 ≤ IgG < 6 U/mL;
- ➢ positivo se IgG ≥ 6 U/mL.

Per le IgM il test viene considerato:

➢ negativo se IgM <0,70 U/mL;

➢ dubbio se 0,70 ≤ IgM < 0,9 U/mL;

➢ positivo se IgM ≥ 0,9 U/mL.

Anche nel caso in cui venissero utilizzati valori soglia differenti da quelli indicati, rimane valida la seguente tabella interpretativa

IgG	***IgM***	***Interpretazione***
Negativo	Negativo	Soggetto non immune
Negativo	Dubbio	Infezione in atto (fase iniziale)*
Negativo	Positivo	Infezione in atto*
Positivo	Negativo	Soggetto immune (infezione pregressa)
Positivo	Dubbio	Siero conversione*
Positivo	Positivo	Siero conversione*
Dubbio	Negativo	Residuo di infezione di vecchia data*
Dubbio	Dubbio	Siero conversione*
Dubbio	Positivo	Siero conversione*

(*) In caso di positività o di risultato dubbio è necessario ripetere dopo 15 giorni l'analisi al fine di valutazione l'andamento dell'infezione. La persistenza in due controlli successivi alla distanza di 15 giorni di un risultato positivo o dubbio delle IgM in assenza di un aumento delle IgG, è indice di infezione pregressa o di una possibile reazione aspecifica.

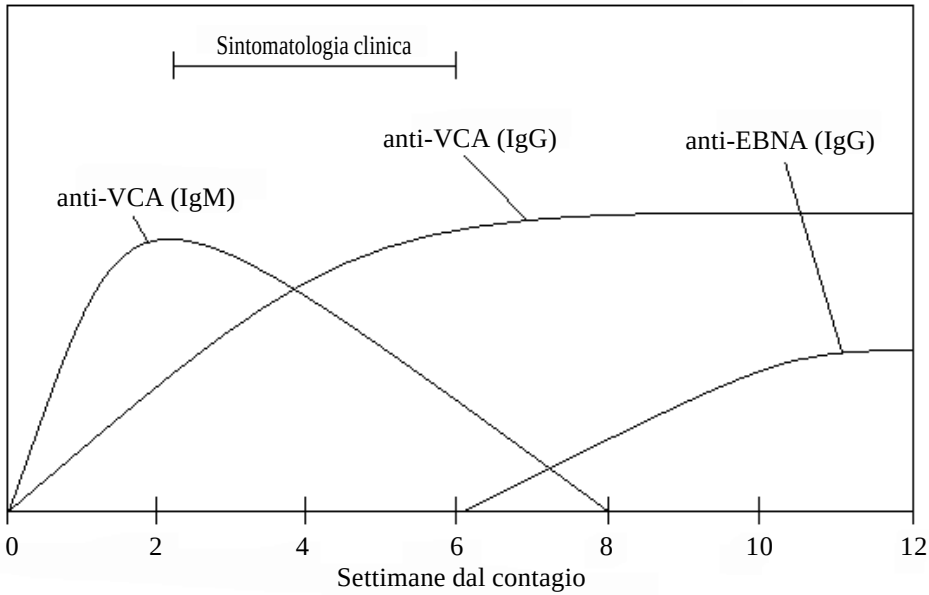
Infezioni da virus di Epstein-Barr

Il quadro sierologico è di facile interpretazione

VCA IgG	***VCA IgM***	***EBNA IgG***	***Interpretazione***
Negativo	Negativo	Negativo	Soggetto non immune
Negativo	Positivo	Negativo	Infezione in atto
Positivo	Negativo	Positivo	Soggetto immune

VCA = Antigene del Core virale, EBNA = Antigene nucleare del virus di Epstein-Barr

Profilo sierologico dell'infezione da virus di Epstein-Barr



Infezioni da Herpes virus di tipo 1 e di tipo 2

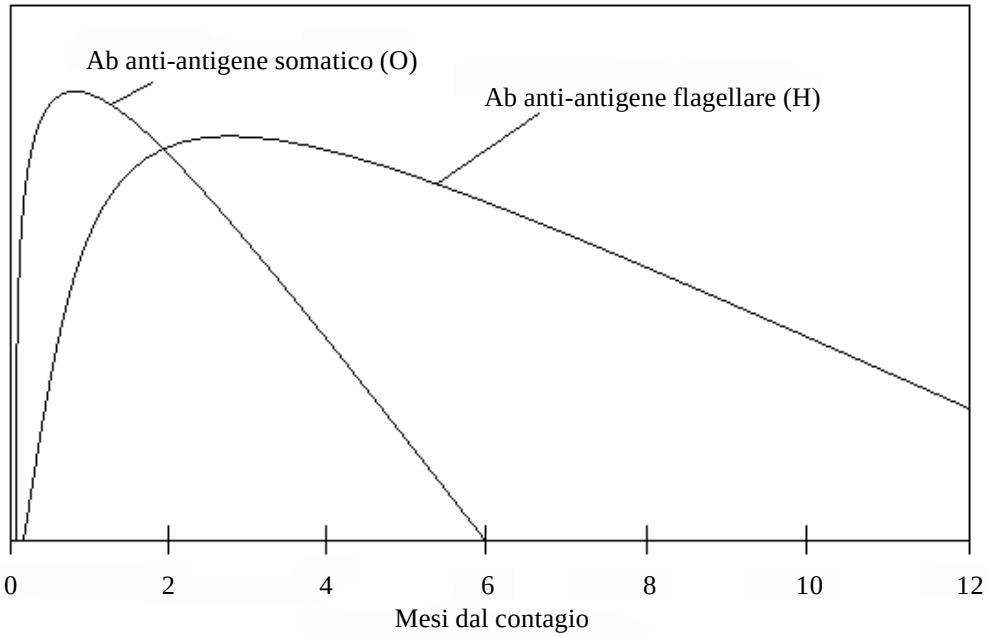
Il quadro sierologico è di facile interpretazione

IgG	***IgM***	***Interpretazione***
Negativo	Negativo	Soggetto non immune
Negativo	Positivo	Infezione in atto
Positivo	Negativo	Infezione pregressa

Infezioni da Salmonella

Con la classica ***reazione di Widal***, antesignana della sierologia infettiva, si determinano mediante agglutinazione i titoli degli anticorpi anti-*Salmonella typhi*, anti-*Salmonella paratyphi A* e anti-*Salmonella paratyphi B*. I titoli sono determinati separatamente per l'*antigene somatico (O)* e per l'*antigene flagellare o ciliare (H)*.

Profilo sierologico delle infezioni da Salmonella



Gli anticorpi diretti contro l'antigene O aumentano entro 5÷10 giorni dall'infezione, raggiungono il valore massimo dopo circa 3 settimane, quindi decrescono progressivamente, e in genere scompaiono entro 5÷6 mesi. Gli antigeni diretti contro l'antigene H iniziano ad aumentare qualche giorno dopo l'inizio dell'aumento degli anticorpi contro l'antigene O, e in genere permangono a lungo, anche per anni.

Il quadro sierologico è di facile interpretazione

Ab anti-O	***Ab anti-H***	***Interpretazione***
Positivi	Negativi	Fase precoce
Positivi	Positivi	Infezione in atto
Negativi	Positivi	Infezione pregressa o soggetto vaccinato

Naturalmente è essenziale seguire il decorso clinico della malattia e ripetere la determinazione degli anticorpi per seguire la dinamica del titolo anticorpale.

Capitolo 7
Prelievi e raccolta dei materiali biologici

(M. Besozzi)

Prelievo venoso 435
Presidi 436
Operazioni preliminari al prelievo 436
Modalità d'esecuzione 436
Prelievi pediatrici 439
Operazioni conclusive 439
Raccolta dei materiali biologici 440
Materiali richiesti e preparazione del paziente 440
Istruzioni per la raccolta dei materiali biologici 465
Urine 465
Urine delle 24 ore 466
Idrossiprolina nelle urine 466
Urinocoltura 467
Espettorato 468
Emocoltura 469
Coprocoltura ed esami delle feci 469
Sangue occulto nelle feci 470
Scotch-test 471
Micoplasmi urogenitali 472
Esami citologici e istologici 472
Esami di citogenetica e citogenetica molecolare 474
Esecuzione del tempo di emorragia 476
Esecuzione del test-tine 477

Prelievo venoso[1]

Il rispetto di rigorose procedure nell'esecuzione dei prelievi ha come scopo sia tutelare la salute del paziente e del personale sanitario addetto al prelievo controllando il rischio di ma-

[1] *Tranne che nei casi in cui esista una diversa indicazione da parte del medico, i prelievi devono essere eseguiti su pazienti in condizioni basali, cioè il mattino, con un digiuno che deve essere di almeno di 12 ore. Durante l'esecuzione delle curve glicemiche i pazienti non devono bere, non devono mangiare, non devono fumare e devono restare a riposo.*

lattie a trasmissione ematogena (HBV, HCV, HIV, CMV, eccetera) sia garantire al laboratorio campioni di sangue adeguati alle analisi da effettuare.

Presidi

Il prelievo del sangue deve essere effettuato utilizzando una ***metodica che garantisca l'asepsi e dispositivi non riutilizzabili***:

- aghi o butterfly sterili monouso da 19 e 21 G per gli adulti e 23 G per i bambini;
- adattatori o aghi a doppie punte;
- cilindro porta-aghi (camicia);
- provette sterili sottovuoto;
- tamponi (cotone in batuffoli)
- soluzione antisettica (ad esempio Citrosil®);
- laccio emostatico;
- guanti in lattice non sterili monouso;
- cerotto a nastro ipoallergenico (ad esempio 3M Micropore®).

Operazioni preliminari al prelievo

- Accertarsi che il locale in cui il prelievo viene eseguito possieda caratteristiche igieniche e di illuminazione adeguate;
- accertarsi della presenza e dell'idoneità dei presidi e del materiale necessario;
- accogliere il paziente con cortesia e farlo sedere, accertandosi che la posizione assunta sia comoda ed adeguata;
- ***chiedere sempre al paziente il nome e cognome*** e controllare che il nominativo corrisponda a quello presente sull'etichetta di ogni provetta da riempire;
- valutare se il paziente è affetto da alterazioni della coagulazione e/o se assume farmaci che possono predisporre al sanguinamento dopo l'estrazione dell'ago;
- valutare se il paziente ha subito traumi recenti o interventi chirurgici al braccio o all'ascella (ad esempio, asportazione dei linfonodi ascellari) che possono alterare la vascolarizzazione dell'arto;
- ***indossare i guanti in lattice***.

Modalità di esecuzione

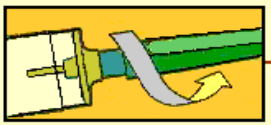
- Far distendere il braccio con il pugno ben chiuso;
- applicare il laccio emostatico, avendo cura che sia sufficientemente stretto da impedire il

flusso refluo del sangue venoso, ma non tanto da ostacolare il flusso arterioso. Il laccio deve essere applicato 15÷20 cm al di sopra del punto di introduzione dell'ago. Per fissare il laccio emostatico, circondare il braccio ed annodare in modo serrato le due estremità, in modo che l'estremità che rimane al di sotto descriva un'ansa. Il laccio può essere così rimosso facilmente tirando una delle due estremità;

- palpare l'apparato venoso superficiale con il dito indice, fino all'identificazione del tronco venoso più idoneo. Le zone da valutare, in ordine di preferenza, sono (1) la piega del gomito, (2) l'area prossimale alla tabacchiera anatomica, (3) il dorso della mano e (4) la superficie volare del polso;
- ***disinfettare accuratamente la cute***, passando con una discreta pressione un batuffolo di cotone su cui sia stata applicata la soluzione antisettica (Citrosil®), avendo cura di eseguire l'operazione su un'area sufficientemente ampia;
- in base alle caratteristiche del tronco venoso individuato, scegliere il tipo di ago maggiormente indicato. Estrarre e preparare il materiale monouso necessario. Questa operazione deve avvenire sempre in presenza del paziente;
- quando le caratteristiche del tronco venoso lo consentono, eseguire il prelievo con l'ago di maggior diametro, che consente un miglior deflusso del sangue;
- avvitare l'ago alla camicia (se si intende utilizzare un ago butterfly, avvitare l'adattatore alla camicia e quindi applicare il butterfly all'adattatore);
- appoggiare un pollice sulla zona cutanea posta distalmente alla sede di introduzione dell'ago e distendere delicatamente la cute del paziente, in modo da facilitare la stabilizzazione della vena e della cute quando l'ago viene introdotto;
- inserire l'ago in vena, formando un angolo di circa 30° rispetto alla superficie cutanea. L'ago deve avere il becco di clarino rivolto verso l'alto e deve essere introdotto nella cute 1 cm circa prossimalmente alla sede di penetrazione nella vena. Una volta che l'ago è stato introdotto attraverso la cute, abbassarlo in modo che diventi quasi parallelo alla cute. Seguire il decorso della vena;
- ***se il prelievo non è difficoltoso, togliere subito il laccio emostatico per evitare la stasi venosa***;
- ***se si utilizza la camicia con l'ago*** inserire le provette con la seguente successione: per prime le provette con anticoagulante (lavanda, nera, azzurra, verde, grigia), quindi le provette per il siero (senza anticoagulante);
- ***se si utilizza la camicia con il butterfly e il raccordo*** inserire le provette con la seguente successione: prima una provetta per il siero (senza anticoagulante), quindi le provette con anticoagulante (lavanda, nera, azzurra, verde, grigia), quindi le (eventuali) rimanenti provette per il siero (senza anticoagulante). (***Nota bene***: l'utilizzo per prima di una provetta senza anticoagulante ha lo scopo di riempire completamente di sangue il raccordo del butter-

fly e di permettere che anche nella prima provetta con anticoagulante sia rispettato il rapporto sangue/anticoagulante);

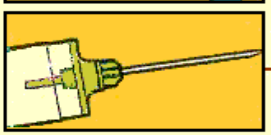
➢ una volta riempite, ***le provette con anticoagulante devono essere capovolte con delicatezza per almeno tre volte***, al fine di completare il miscelamento del sangue con l'anticoagulante in esse contenute;



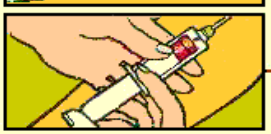
Aprire l'involucro dell'ago senza rimuovere il cappuccio colorato. Avvitare a fondo l'ago sul supporto (holder).

Scegliere il punto dove eseguire la venipuntura.

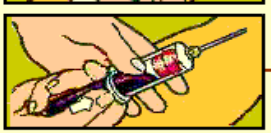
Applicare il laccio emostatico. Disinfettare la zona destinata alla venipuntura con adeguato antisettico. Non toccare la zona interessata dopo la disinfezione.



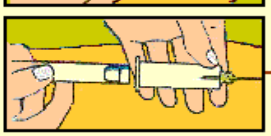
Togliere il cappuccio di protezione dall'ago ed eseguire la venipuntura. Il braccio del paziente deve essere disteso e rivolto verso il basso.



Inserire la provetta nel supporto (holder). Indice e medio afferrano le flange dell'holder, mentre il pollice spinge a fondo la provetta all'interno del supporto come per iniettare.

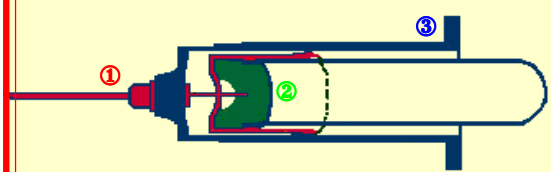


Attendere il riempimento della provetta e rimuoverla usando le flange come appoggio sul quale esercitare una leggera pressione con il pollice. AGITARE CON CURA LE PROVETTE CON ADDITIVO.



Inserire le successive provette rispettando la manualità già descritta.

Rimuovere l'ultima provetta. Sfilare l'ago dalla vena e medicare. **NON REINCAPPUCCIARE L'AGO. NON RIMUOVERE L'AGO DALL'HOLDER. GETTARE AGO E HOLDER**



① **Ago a due punte**
② **Chiusura perforabile**
③ **Supporto (holder)**

- ***in caso di prelievi eseguiti da cateteri venosi o da dispositivi per fleboclisi, avere cura di eliminare i primi 5 mL di sangue prelevato***;
- concluso il prelievo, disinserire l'ultima provetta riempita dalla camicia, appoggiare un tampone con soluzione disinfettante sulla sede del prelievo e quindi estrarre l'ago mantenendolo in linea con la vena. Esercitare una lieve pressione con il tampone sulla sede di puntura e applicare il cerotto.

Prelievi pediatrici

In caso di prelievi pediatrici, è consigliabile:

- far sedere il bambino in braccio alla mamma;
- accertarsi della presenza di personale che assicuri l'immobilità dell'arto del bambino;
- rimuovere il laccio non appena raggiunto il tronco venoso;
- immettere l'ago in vena avendo cura di tenere il becco d'oca rivolto verso l'alto;
- appena l'ago è in vena, togliere il laccio per evitare la stasi venosa. Solo in caso di prelievi difficoltosi riapplicare il laccio, chiedendo al paziente di eseguire, lentamente e con forza, un movimento alternato di chiusura e di apertura del pugno, per aumentare il deflusso sanguigno distrettuale;
- qualora si effettui il prelievo da cateteri venosi o dispositivi per fleboclisi avere cura di eliminare sempre i primi 5 mL di sangue prelevato;
- ***se si utilizza la camicia con l'ago*** inserire le provette con la seguente successione: per prime le provette con anticoagulante (lavanda, nera, azzurra, verde, grigia), quindi le provette per il siero (senza anticoagulante);
- ***se si utilizza la camicia con il butterfly e il raccordo*** inserire le provette con la seguente successione: prima una provetta per il siero (senza anticoagulante), quindi le provette con anticoagulante (lavanda, nera, azzurra, verde, grigia), quindi le (eventuali) rimanenti provette per il siero (senza anticoagulante). (***Nota bene***: l'utilizzo per prima di una provetta senza anticoagulante ha lo scopo di riempire completamente di sangue il raccordo del butterfly e di permettere che anche nella prima provetta con anticoagulante sia rispettato il rapporto sangue/anticoagulante);

Operazioni conclusive

- ***Dire al paziente di tenere ben premuto il cotone e di non piegare il braccio per almeno tre minuti***;
- accertarsi che il paziente stia bene e che sia in grado di alzarsi.

Quindi eliminare il materiale utilizzato con le seguenti modalità:

- ***non inserire il copri-ago ad aghi e butterfly utilizzati***. Svitare completamente aghi ed adattatori dalla camicia, inserendoli nell'apposita fessura del contenitore porta-aghi monouso per rifiuti speciali, che deve essere sempre disponibile, lasciandoli cadere all'interno del contenitore. Non lasciare la camicia con l'ago ancora inserito appoggiata al porta-aghi, ma accertarsi sempre che l'ago sia stato completamente svitato e sia caduto all'interno del contenitore;
- eliminare batuffoli di cotone, cerotti utilizzati, guanti ed altro materiale venuto in contatto con sangue e/o altro materiale biologico direttamente negli ***appositi contenitori in cartone per rifiuti speciali ospedalieri trattati*** (R.O.T.).

Raccolta dei materiali biologici

Materiali richiesti e preparazione del paziente

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
17-alfa-IDROSSIPROGESTERONE, vedere 17-IDROSSIPROGESTERONE			
17-beta-ESTRADIOLO, vedere ESTRADIOLO (E2)			
17-CHETOSTEROIDI, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
17-IDROSSICORTICOSTEROIDI, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
17-IDROSSIPROGESTERONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
17-OH-P (test da stimolo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
2,5 ESANDIONE, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
4-IDROSSI-3-METOSSIMANDELATO, vedere ACIDO VANILMANDELICO			
5-IDROSSIINDOLILACETATO, vedere ACIDO 5-IDROSSIINDOLACETICO			
AAG, vedere alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA			
AAT, vedere alfa-1-ANTITRIPSINA			
Ab ANTI-A, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-ACETILCOLINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-ANTIGENI NUCLEARI ESTRAIBILI (ENA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-B, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-BRUCELLA, vedere WRIGHT			
Ab ANTI-CARDIOLIPINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-CHLAMYDIA (PLT), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-CITOMEGALOVIRUS, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-CITOPLASMA DEI NEUTROFILI (ANCA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
Ab ANTI-COXSACKIE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-DELTA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-DNA NATIVO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-ENDOMISIO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-EPATITE A (IgM), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-EPATITE A, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-EPATITE C, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-EPSTEIN BARR, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-EPSTEIN-BARR (MONOTEST), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-FOSFOLIPIDI, vedere Ab ANTI-CARDIOLIPINA			
Ab ANTI-GAD, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-GLIADINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-HBcAg (IgM), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-HBcAg, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-HBeAg, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-HBsAg, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-HELICOBACTER PYLORI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-HERPES 1/2, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-HIV 1/2, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-INSULA PANCREATICA (ICA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-INSULINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-LEPTOSPIRA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-MITOCONDRI (AMA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-MORBILLO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-MUCOSA GASTRICA (APCA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-MUSCOLO LISCIO (ASMA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-MUSCOLO STRIATO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-MYCOPLASMA PNEUMONIAE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-NUCLEO (ANA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-OVAIO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-PARATIROIDE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-PAROTITE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-PERTOSSE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-RECETTORI TSH, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-RICKETTSIE, vedere WEIL-FELIX			
Ab ANTI-ROSOLIA (IgG), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-ROSOLIA (IgM), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-SALMONELLA, vedere WIDAL			
Ab ANTI-STAFILOLISINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-STREPTOLISINA O, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-SURRENE nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-TESTICOLO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
Ab ANTI-TETANO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-TIREOGLOBULINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-TIREOPEROSSIDASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-TIROIDE, nel siero [S], vedere Ab ANTI-TIREOGLOBULINA e Ab ANTI-TIREOPEROSSIDASI			
Ab ANTI-TOXOPLASMA (IgG), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-TOXOPLASMA (IgM), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab ANTI-VARICELLA/ZOSTER, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab FTA-ABS (Ig totali), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Ab, Sigla utilizzata per indicare gli ANTICORPI			
ACETONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ACETONE, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
ACIDO delta-AMMINOLEVULINICO, nelle urine [U]	urine	raccogliere in contenitore di vetro scuro tutte le urine emesse 2 ore dopo il pasto principale, e consegnare entro un'ora	nessuna
ACIDO FENILGLIOSSILICO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
ACIDO FOLICO, vedere FOLATO			
ACIDO FORMICO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
ACIDO IPPURICO (fine turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine alla fine del turno lavorativo	nessuna
ACIDO IPPURICO (inizio turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine all'inizio del turno lavorativo	nessuna
ACIDO MANDELICO (fine turno) [U]	urine	raccogliere le urine alla fine del turno lavorativo	nessuna
ACIDO MANDELICO (inizio turno) [U]	urine	raccogliere le urine all'inizio del turno lavorativo	nessuna
ACIDO METILIPPURICO (fine turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine alla fine del turno lavorativo	nessuna
ACIDO METILIPPURICO (inizio turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine all'inizio del turno lavorativo	nessuna
ACIDO TRICLORACETICO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
ACIDO URICO, vedere URATO			
ACIDO VALPROICO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ACIDO VANILMANDELICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
ACP, vedere FOSFATASI ALCALINA			
ACPP, vedere FOSFATASI PROSTATICA			
ACTH (test da stimolo), nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
ACTH, vedere anche CORTICOTROPINA			
ADNA, vedere Ab ANTI-DNA NATIVO			
ADRENALINA, vedere CATECOLAMMINE			
AFG, vedere alfa-FETOPROTEINA			
AFP, vedere alfa-FETOPROTEINA			
Ag, sigla utilizzata per indicare gli ANTIGENI			
AGOASPIRATO, vedere CITOLOGICO AGOASPIRATO			
Al, vedere ALLUMINIO			
ALA DEIDRASI, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
ALANINA-AMMINOTRANSFERASI, vedere ALT			
ALAT, vedere ALT			
ALCOOL BUTILICO, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	nessuna
ALCOOL ISOBUTILICO, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	nessuna
ALCOOL METILICO, vedere METANOLO			
ALCOOL, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
ALDOLASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ALDOSTERONE (clinostatismo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ALDOSTERONE (ortostatismo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ALDOSTERONE, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
alfa-1-ANTITRIPSINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
alfa-2-MACROGLOBULINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
alfa-AMILASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
alfa-AMILASI, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
alfa-FETOPROTEINA, nel liquido amniotico [LA]	liquido amniotico	1 mL di liquido amniotico	digiuno
alfa-FETOPROTEINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
alfa-IDROSSIBUTIRRATO DEIDROGENASI, vedere HBDH			
alfa-IDROSSIPROGESTERONE, vedere 17-IDROSSIPROGESTERONE			
ALLUMINIO, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
ALLUMINIO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
ALP, vedere FOSFATASI ALCALINA			

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
ALS, vedere ALDOLASI			
ALT (GPT), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
AMA, vedere Ab ANTI-MITOCONDRI			
AMG, vedere alfa-2-MACROGLOBULINA			
AMILASI, vedere alfa-AMILASI			
AMINOMAL, vedere TEOFILLINA			
AMMINE AROMATICHE (fine turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine alla fine del turno lavorativo	nessuna
AMMINE AROMATICHE (inizio turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine all'inizio del turno lavorativo	nessuna
AMMONIO, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
AMP-CICLICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
AMS, vedere alfa-AMILASI			
ANA, vedere Ab ANTI-NUCLEO			
ANALISI CITOGENETICA FRAGILITÀ CROMOSOMICA	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	nessuna
ANALISI CITOGENETICA RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI INDOTTI, vedere VALUTAZIONE DANNO CROMOSOMICO			
ANALISI CITOGENETICA SCAMBI CROMATIDI FRATELLI, vedere VALUTAZIONE DANNO CROMOSOMICO			
ANALISI CITOGENETICA STUDIO MOSAICISMO CROMOSOMICO	sangue periferico, sangue fetale, fibroblasti cutanei, liquido amniotico, villi coriali	sangue (periferico o fetale) in provetta con anticoagulante (proverde con litio-eparina), fibroblasti cutanei in matraccino fornito dal laboratorio, liquido amniotico in provetta sterile fornita dal laboratorio, villi coriali	sulla base delle indicazioni mediche
ANALISI DI POLIMORFISMI (STR,VNTR)	sangue	con anticoagulante (EDTA)	nessuna
ANALISI DNA CON PCR	sangue	con anticoagulante (EDTA)	nessuna
ANALISI DNA E IBRIDAZIONE CON SONDA MOLECOLARE	sangue	con anticoagulante (EDTA)	nessuna
ANCA, vedere Ab ANTI-CITOPLASMA DEI NEUTROFILI (ANCA)			
ANTIBIOGRAMMA	stipite batterico isolato in laboratorio dal materiale biologico sottoposto ad esame colturale	microdiluizione in brodo	nessuna

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
ANTICORPI, vedere Ab			
ANTIGENE Au, vedere ANTIGENE HBsAg			
ANTIGENE CA 125, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ANTIGENE CA 15.3, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ANTIGENE CA 19.9 (GICA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ANTIGENE CARCINOEMBRIOGENICO, vedere CEA			
ANTIGENE CARCINOEMBRIONARIO, vedere CEA			
ANTIGENE CARCINOGENICO GASTROINTESTINALE, vedere ANTIGENE CA 19.9			
ANTIGENE HBeAg, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ANTIGENE HBsAg, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ANTIGENE HLA B27, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
ANTIGENE POLIPEPTIDICO TISSUTALE, vedere ANTIGENE TPA			
ANTIGENE PROSTATICO SPECIFICO, vedere ANTIGENE PSA			
ANTIGENE PSA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ANTIGENE TPA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ANTITRIPSINA, vedere alfa-1-ANTITRIPSINA			
ANTITROMBINA III, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (0,5 mL di citrato trisodico, per un rapporto finale di 9 parti di sangue e 1 parte di soluzione anticoagulante)	digiuno
AP, vedere FOSFATASI ACIDA			
APCA, vedere Ab ANTI-MUCOSA GASTRICA (APCA)			
APOLIPOPROTEINA AI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
APOLIPOPROTEINA B, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
APTT, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (0,5 mL di citrato trisodico, per un rapporto finale di 9 parti di sangue e 1 parte di soluzione anticoagulante)	digiuno
ASAT, vedere AST			
ASMA, vedere Ab ANTI-MUSCOLO LISCIO			
ASPARTATO-AMMINOTRANSFERASI, vedere AST			
AST (GOT), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
AZOTEMIA, vedere UREA, nel siero			
AZOTO UREICO, vedere UREA			
AZOTO, vedere UREA			
AZOTURIA, vedere UREA, nelle urine			
BACILLO DI KOCH, nelle urine (esame batterioscopico)	urine	è consigliato effettuare la raccolta per tre giorni consecutivi, salvo diverse indicazioni mediche	nessuna

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
BACILLO DI KOCH, nell'espettorato (esame batterioscopico)	espettorato	è consigliato effettuare la raccolta per tre giorni consecutivi, salvo diverse indicazioni mediche	digiuno
BARBITUREMIA, vedere FENOBARBITAL			
BATTERIOSCOPICO, vedere BACILLO DI KOCH, ESSUDATO AURICOLARE, ESSUDATO FARINGEO, SECRETO CERVICALE, SECRETO NASALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE			
beta-2-MICROGLOBULINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
beta-2-MICROGLOBULINA, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
beta-ESTRADIOLO, vedere ESTRADIOLO (E2)			
beta-HCG, vedere GONADOTROPINA CORIONICA			
BICARBONATI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
BILIRUBINA TOTALE + FRAZIONATA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
BILIRUBINA TOTALE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
C1-INIBITORE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CA 125, vedere ANTIGENE CA 125			
CA 15.3, vedere ANTIGENE CA 15.3			
CA 19.9, vedere ANTIGENE CA 19.9			
Ca, vedere CALCIO TOTALE			
Ca++, vedere CALCIO IONIZZATO			
CADMIO, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
CADMIO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
CALCIO IONIZZATO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CALCIO TOTALE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CALCIO TOTALE, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
CALCITONINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CALCOLI URINARI	calcoli urinari	raccogliere tutto il materiale emesso con le urine, mediante loro filtrazione su uno strato multiplo di garza da medicazione	nessuna
CANDIDA NELLE FECI, esame colturale	feci	raccogliere una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide) nell'apposito contenitore sterile munito di coperchio con spatola	nessuna
CARBAMAZEPINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
CARBOLITHIUM, vedere LITIO			
CARBOSSIEMOGLOBINA, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	nessuna
CARDIOREG, vedere DIGOSSINA			
CARIOTIPO SU FIBROBLASTI CUTANEI	fibroblasti cutanei	campione bioptico	sulla base delle indicazioni mediche
CARIOTIPO SU LIQUIDO AMNIOTICO	liquido amniotico	campione di liquido amniotico (20 mL) prelevato per via transaddominale o transcervicale sotto guida ecografica in pazienti gravide, generalmente dalla 14-esima alla 19-esima settimana	sulla base delle indicazioni mediche
CARIOTIPO SU MIDOLLO OSSEO	midollo osseo	con anticoagulante (litio-eparina)	sulla base delle indicazioni mediche
CARIOTIPO SU SANGUE PERIFERICO	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	sulla base delle indicazioni mediche
CARIOTIPO SU VILLI CORIALI	villi coriali	almeno 5 mg di villi coriali	sulla base delle indicazioni mediche
CATECOLAMMINE, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
CATECOLAMMINE, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
CEA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CERULOPLASMINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CHE, vedere COLINESTERASI			
CHLAMYDIA T. DNA, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
CITOLOGICO AGOASPIRATO	agoaspirati di noduli mammari solidi o liquidi, agoaspirati di linfonodi superficiali o profondi, agoaspirati delle ghiandole salivari, agoaspirati di	striscio su vetrino microscopico portaoggetti	sulla base delle indicazioni mediche

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
	cisti solide o liquide, ago-aspirati di masse superficiali e profonde		
CITOLOGICO CERVICO VAGINALE [PAP test]	secreto cervico-vaginale	striscio su vetrino microscopico portaoggetti	digiuno
CITOLOGICO DI VERSAMENTI	liquido pleurico, liquido ascitico, liquido pericardico, liquido sinoviale	raccogliere in contenitore sterile	sulla base delle indicazioni medica
CITOLOGICO ESPETTORATO	espettorato	raccogliere al mattino al risveglio del paziente in recipiente a bocca larga	digiuno
CITOLOGICO URINE	urine	contenitore di plastica sterile	digiuno
CITOLOGICO, vedere CITOLOGICO AGOASPIRATO, CITOLOGICO CERVICO-VAGINALE [PAP test], CITOLOGICO DI VERSAMENTI, CITOLOGICO ESPETTORATO, CITOLOGICO URINE, ESAME CITOLOGICO			
CITOMEGALOVIRUS DNA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CK, vedere CREATINA CHINASI			
CK-MB, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Cl, vedere CLORURO			
CLEARANCE DELLA CREATININA, vedere CREATININA CLEARANCE			
CLEARANCE DELL'UREA, vedere UREA CLEARANCE			
CLORO, vedere CLORURO			
CLORURO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CLORURO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
COBALAMMINA (Vitamina B12), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
COBALTO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
COLESTEROLO HDL, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
COLESTEROLO LDL, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
COLESTEROLO TOTALE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
COLINESTERASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
COLTURALE FECI, vedere COPROCOLTURA			
COLTURALE SANGUE, vedere EMOCOLTURA			
COLTURALE URINE, vedere URINOCOLTURA			
COLTURALE, vedere CANDIDA NELLE FECI, ESPETTORATO, LIQUIDO SEMINALE, SECRETO CERVICALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE, TAMPONE AURICOLARE, TAMPONE FARINGEO, TAMPONE NASALE, TAMPONE OCULARE, TAMPONE RETTALE			

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
COMIZIAL, vedere FENOBARBITAL			
COMPLEMENTO C3, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
COMPLEMENTO C4, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
COMPLEMENTO, vedere COMPLEMENTO C3, COMPLEMENTO C4, C1-INIBITORE			
COMPLETO FECI, vedere ESAME COMPLETO FECI			
COMPLETO URINE, vedere URINE ESAME COMPLETO			
CONTA DI ADDIS, nelle urine [U]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
COOMBS DIRETTO, vedere TEST DI COOMBS DIRETTO			
COOMBS INDIRETTO, vedere TEST DI COOMBS INDIRETTO			
COOMBS, vedere TEST DI COOMBS DIRETTO e TEST DI COOMBS INDIRETTO			
COPROCOLTURA	feci	raccogliere una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide) nell'apposito conteni tore sterile munito di coperchio con spatola	nessuna
CORPI ASBESTOSICI ESCREATO	espettorato	raccogliere al mattino al risveglio del paziente in recipiente a bocca larga	digiuno
CORTICOTROPINA (ACTH), nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	nessuna
CORTISOLO (bioritmo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno solo per il prelievo del primo del mattino
CORTISOLO (test da stimolo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CORTISOLO LIBERO , nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
CORTISOLO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
C-PEPTIDE (test da stimolo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
C-PEPTIDE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
C-PEPTIDE, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
CPK, vedere CREATINA CHINASI			
CREATINA CHINASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CREATININA CLEARANCE	urine 24h e sangue	senza anticoagulante, il prelievo deve essere effettuato il mattino al termine della raccolta delle urine	digiuno
CREATININA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CREATININA, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
CRIOGLOBULINE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
CROMO (fine turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine alla fine del turno	nessuna

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
CROMO (inizio turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine all'inizio del turno lavorativo	nessuna
CUPREMIA, vedere RAME, nel siero			
delta-4-ANDROSTENEDIONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE	tutti i tipi di tessuto	matraccino sterile	sulla base delle indicazioni mediche
DHEA SOLFATO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
DIAGNOSI PRENATALE, vedere CARIOTIPO SU LIQUIDO AMNIOTICO, CARIOTIPO SU SANGUE FETALE, CARIOTIPO SU VILLI CORIALI			
DIFENILIDANTOINA, vedere FENITOINA			
DIFFUMAL, vedere TEOFILLINA			
DIGOMAL, vedere DIGOSSINA			
DIGOSSINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
DIIDROTESTOSTERONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
DINTOINA, vedere FENITOINA			
E2, vedere ESTRADIOLO			
E3, vedere ESTRIOLO			
EBV, vedere Ab-ANTI EPSTEIN-BARR e Ab-ANTI EPSTEIN-BARR (MONOTEST)			
ELETTROFORESI DELL'EMOGLOBINA, vedere EMOGLOBINE ANOMALE			
ELETTROFORESI LIPOPROTEINE	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ELETTROFORESI PROTEICA, vedere ELETTROFORESI PROTEINE			
ELETTROFORESI PROTEINE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ELETTROFORESI URINE	urine	raccogliere un campione estemporaneo di urina o le urine delle 24 ore	nessuna
ELETTROLITI , nelle urine delle 24 ore [dU], vedere le singole analisi SODIO, POTASSIO e CLORURO, nelle urine delle 24 ore [dU]			
ELETTROLITI, nel siero [S], vedere le singole analisi SODIO, POTASSIO e CLORURO, nel siero [S]			
EMATOCRITO, vedere VALORE EMATOCRITO			
EMOCOLTURA	sangue	sangue in asepsi con apposito dispositivo per il trasferimento diretto in terreno di coltura	nessuna
EMOCROMO	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
EMOGLOBINA A1c, vedere EMOGLOBINA GLICATA			
EMOGLOBINA ALCALI-RESISTENTE, vedere EMOGLOBINA FETALE			
EMOGLOBINA FETALE, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
EMOGLOBINA GLICATA, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
EMOGLOBINA GLICOSILATA, vedere EMOGLOBINA GLICATA			

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
EMOGLOBINE ANOMALE, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
EMOGRUPPO, vedere GRUPPO SANGUIGNO ABO E FATTORE Rh			
ENA, vedere Ab ANTI-ANTOGENI NUCLEARI ESTRAIBILI (ENA)			
EOSINOFILI, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
EPINEFRINA, vedere CATECOLAMMINE			
ESAME BATTERIOSCOPICO, vedere BACILLO DI KOCH, ESSUDATO AURICOLARE, ESSUDATO FARINGEO, SECRETO CERVICALE, SECRETO NASALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE			
ESAME CITOLOGICO	scraping o spazzolati di lesioni cutanee o mucose, liquidi di lavaggio (bronchiale, gastrico, duodenale, colon-sigmoido-rettale, eccetera), secreto mammario (spontaneo o provocato), altri tipi di secrezione (secreto nasale, secreto oculare, eccetera).	striscio su vetrino microscopico portaoggetti	sulla base delle indicazioni mediche
ESAME CITOLOGICO, vedere CITOLOGICO AGOASPIRATO, CITOLOGICO CERVICO-VAGINALE [PAP test], CITOLOGICO DI VERSAMENTI, CITOLOGICO ESPETTORATO, CITOLOGICO URINE, ESAME CITOLOGICO			
ESAME COLTURALE FECI, vedere COPROCOLTURA			
ESAME COLTURALE SANGUE, vedere EMOCOLTURA			
ESAME COLTURALE URINE, vedere URINOCOLTURA			
ESAME COLTURALE, vedere CANDIDA NELLE FECI, ESPETTORATO, LIQUIDO SEMINALE, SECRETO CERVICALE, SECRETO URETRALE, SECRETO VAGINALE, TAMPONE AURICOLARE, TAMPONE FARINGEO, TAMPONE NASALE, TAMPONE OCULARE, TAMPONE RETTALE			
ESAME COMPLETO FECI	feci	raccogliere una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide) nell'apposito contenitore sterile munito di coperchio con spatola	nessuna
ESAME COMPLETO URINE, vedere URINE ESAME COMPLETO			
ESAME DI TRASUDATO/ESSUDATO	liquido pleurico, liquido	raccogliere il liquido in un contenitore ste-	sulla base delle indicazioni

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
	ascitico, liquido pericardico, liquido sinoviale	rile di plastica	mediche
ESAME EMOCROMOCITOMETRICO, vedere EMOCROMO			
ESAME ISTOLOGICO	frammenti bioptici o pezzi operatori	raccogliere in contenitore con formalina tamponata al 10%	sulla base delle indicazioni mediche
ESPETTORATO, esame batterioscopico	espettorato	raccogliere l'espettorato evitando la commistione con il materiale salivare	digiuno
ESPETTORATO, esame citologico, vedere CITOLOGICO ESPETTORATO			
ESPETTORATO, esame colturale	espettorato	espettorato non commisto a materiale salivare	digiuno
ESSUDATO AURICOLARE, esame batterioscopico	essudato auricolare	striscio su vetrino microscopico portaoggetti	nessuna
ESSUDATO FARINGEO, esame batterioscopico	essudato faringeo	striscio su vetrino microscopico portaoggetti	nessuna
ESTRADIOLO (E2) , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ESTRIOLO (E3) , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
EUDIGOX, vedere DIGOSSINA			
EUPHILLINA, vedere TEOFILLINA			
FATTORE REUMATOIDE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FATTORI DEL COMPLEMENTO, vedere COMPLEMENTO C3, COMPLEMENTO C4 e C1-INIBITORE			
FDP/FSP, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (0,5 mL di citrato trisodico, per un rapporto finale di 9 parti di sangue e 1 parte di soluzione anticoagulante)	digiuno
Fe, vedere FERRO			
FECI ESAME COLTURALE, vedere COPROCOLTURA			
FENITOINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FENOBARBITAL , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FENOLI (fine turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine alla fine del turno lavorativo	nessuna
FENOLI (inizio turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine all'inizio del turno lavorativo	nessuna

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
FENOMENO LE	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FERRITINA , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FERRO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FERRO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
FETOPROTEINA, vedere alfa-FETOPROTEINA			
FIBRINOGENO, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (0,5 mL di citrato trisodico, per un rapporto finale di 9 parti di sangue e 1 parte di soluzione anticoagulante)	digiuno
FISH CON SEQUENZE IN YAC, vedere DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE			
FISH CON SONDE ALFOIDI E SEQUENZE RIPETUTE, vedere DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE			
FISH CON SONDE IN COSMIDE SINGOLA COPIA, vedere DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE			
FISH CON SONDE PAINTING, vedere DETERMINAZIONE CITOGENETICA MOLECOLARE			
FLUORESCENT TREPONEMAL ANTIBODY, vedere Ab FTA-ABS			
FLUORURO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
FOLATO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FOLLITROPINA (FSH) , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FOSFATASI ACIDA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FOSFATASI ALCALINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FOSFATASI PROSTATICA , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FOSFATO INORGANICO , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FOSFATO INORGANICO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
FOSFOESOSOISOMERASI , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FOSFORO, vedere FOSFATO			
FRAGILITÀ OSMOTICA, vedere RESISTENZE GLOBULARI			
FRAZIONI DEL COMPLEMENTO, vedere COMPLEMENTO C3, COMPLEMENTO C4, C1-INIBITORE			
FRUTTOSAMMINA , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
FSH (test da stimolo) , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	sulla base delle indicazioni mediche
fT4, vedere anche TIROXINA LIBERA			
FTA-ABS, vedere Ab FTA-ABS			
G6PDH, negli eritrociti [Er]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
gamma-GLUTAMMILTRANSFERASI, vedere gamma-GT			
gamma-GLUTAMMILTRANSPEPTIDASI, vedere gamma-GT			
gamma-GT, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
GARDENAL, vedere FENOBARBITAL			
GARDENALE, vedere FENOBARBITAL			
GASTRINA , nel plasma [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
GB, vedere LEUCOCITI			
GGT, vedere gamma-GT			
GH (test da stimolo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
GH, vedere anche ORMONE SOMATOTROPO (GH)			
GICA, vedere ANTIGENE CA 19.9			
GLICEMIA, vedere GLUCOSIO, nel siero o nel plasma			
GLICOPROTEINA ACIDA, vedere alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA			
GLICOSURIA, vedere GLUCOSIO, nelle urine			
GLOBULI BIANCHI, vedere LEUCOCITI			
GLUCOSIO (3 campioni), nelle urine [U]	urine	raccogliere tre campioni di urina nella stessa giornata, estemporaneamente o in un arco di tempo definito (per esempio tutte le urine emesse nell'arco di un terzo della giornata, cioè ogni 8 ore), sulla base delle indicazioni mediche	nessuna
GLUCOSIO (basale + postprandiale), nel plasma [P]	sangue	con antiglicolitico	digiuno solo per il prelievo basale
GLUCOSIO (curva 6 prelievi), nel plasma [P]	sangue	con antiglicolitico	digiuno
GLUCOSIO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
GLUCOSIO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI, vedere G6PDH			
GLUTAMMILTRANSFERASI, vedere gamma-GT			
GONADOTROPINA CORIONICA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
GONADOTROPINE, vedere FSH e LH			
GOT, vedere ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI			
GPT, vedere ALANINA AMMINOTRANSFERASI			
GRUPPO SANGUIGNO ABO e Rh	sangue	con anticoagulante (EDTA) e senza anticoagulante	digiuno
Hb A1c, vedere EMOGLOBINA GLICATA			
Hb A2, vedere EMOGLOBINE ANOMALE			
Hb F, vedere EMOGLOBINA FETALE			
Hb, sigla utilizzata per indicare l'EMOGLOBINA, vedere EMOCROMO			
HBDH , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
HCG, vedere GONADOTROPINA CORIONICA			
HCS, vedere SOMATOMAMMOTROPINA			
Hct, sigla utilizzata per indicare l'EMATOCRITO, vedere EMOCROMO			
HCV GENOTIPO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
HCV-RNA QUANTITATIVO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
HCV-RNA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Hg, vedere MERCURIO			
HGH (test al GHRH), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	sulla base delle indicazioni mediche
HIAA, vedere ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO			
HIV-1 DNA, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
HPL, vedere SOMATOMAMMOTROPINA			
ICA, vedere Ab ANTI-INSULA PANCREATICA (ICA)			
IDROSSI-3-METOSSIMANDELATO, vedere ACIDO VANILMANDELICO			
IDROSSIBUTIRRATO DEIDROGENASI, vedere HBDH			
IDROSSIINDOLILACETATO, vedere ACIDO 5-IDROSSIINDOLACETICO			
IDROSSIPROGESTERONE, test da stimolo, vedere 17-OH-P (test da stimolo), nel siero [S]			
IDROSSIPROGESTERONE, vedere 17-IDROSSIPROGESTERONE			
IDROSSIPROLINA , nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
IgA, vedere IMMUNOGLOBULINA A			
IgE SPECIFICHE, nel siero [S], vedere RAST			
IgE TOTALI , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
IgG, vedere IMMUNOGLOBULINA G			
IgM, vedere IMMUNOGLOBULINA M			
IMMUNOFISSAZIONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
IMMUNOGLOBULINA A (IgA), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
IMMUNOGLOBULINA G (IgG), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
IMMUNOGLOBULINA M (IgM), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
IMMUNOGLOBULINE E, nel siero [S], vedere IgE			
IMMUNOGLOBULINE, nel siero [S], vedere le singole analisi IMMUNOGLOBULINA A (IgA),			
IMMUNOGLOBULINA G (IgG), e IMMUNOGLOBULINA M (IgM), nel siero [S]			
INSULINA (curva da carico), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	sulla base delle indicazioni mediche
INSULINA , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
INTRADERMOREAZIONE ALLA TUBERCOLINA, vedere INTRADERMOREAZIONE PPD e TEST TINE			
INTRADERMOREAZIONE DI MANTOUX, vedere INTRADERMOREAZIONE PPD			
INTRADERMOREAZIONE PPD	nessuno, trattandosi di un test clinico		nessuna
ISOENZIMI FOSFATASI ALCALINA	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ISOENZIMI LDH	sangue	senza anticoagulante	digiuno
K, vedere POTASSIO			
LANICOR, vedere DIGOSSINA			
LANOXIN, vedere DIGOSSINA			
LAP, vedere LEUCINAMMINOPEPTIDASI			
LATTATO DEIDROGENASI , nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
LDH, vedere LATTATO DEIDROGENASI			
LEUCINAMMINOPEPTIDASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
LEUCOCITI (conteggio), nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
LEUCOCITI (formula), nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
LH (test da stimolo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	sulla base delle indicazioni mediche
LH, vedere anche LUTEOTROPINA			
Li, vedere LITIO			
LIPASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
LIPIDI TOTALI	sangue	senza anticoagulante	digiuno
LIQUIDO SEMINALE, esame colturale	liquido seminale	dopo accurato lavaggio dei genitali esterni, raccogliere il liquido seminale in un contenitore sterile	nessuna
LITATREX, vedere LITIO			
LITIO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
LUE, vedere VDRL, TPHA, FTA-ABS			
LUMINAL, vedere FENOBARBITAL			
LUMINALE, vedere FENOBARBITAL			
LUMINALETTE, vedere FENOBARBITAL			
LUTEOTROPINA (LH), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
MACROGLOBULINA, vedere alfa-2-MACROGLOBULINA			
MAGNESIO TOTALE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
MAGNESIO TOTALE, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
MALARIA, vedere PLASMODI DELLA MALARIA			
MANGANESE, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
MANIALIT, vedere LITIO			
MARCATORI TUMORALI, vedere alfa-FETOPROTEINA, ANTIGENE CA 125, ANTIGENE CA 15.3, ANTIGENE CA 19.9 (GICA), ANTIGENE PSA, ANTIGENE TPA, CEA			
MAU, vedere MICROALBUMINURIA			
MCH, sigla utilizzata per indicare l'Hb CORPUSCOLARE MEDIA (Mean Corpuscolar Hemoglobin), vedere EMOCROMO			
MCHC, sigla utilizzata per indicare l'Hb CONCENTRAZIONE MEDIA (Mean Corpuscolar Hemoglobinic Concentration), vedere EMOCROMO			
MCV, sigla utilizzata per indicare il VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (Mean Corpuscolar Volume), vedere EMOCROMO			
MELITENSE, vedere WRIGHT			
MERCURIO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
METAEMOGLOBINA, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
METAEMOGLOBINA, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
METANOLO, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
METILETILCHETONE, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
Mg, vedere MAGNESIO			
MICOPLASMI UROGENITALI, esame colturale	secreto	tampone localizzato	nessuna
	cervicale, secreto vaginale, secreto uretrale	con terreno di trasporto liquido	
MICROALBUMINURIA, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
MICROGLOBULINA, vedere beta-2-MICROGLOBULINA			
MIOGLOBINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	nessuna
Mn, vedere MANGANESE			
MONOTEST, vedere Ab-ANTI EPSTEIN-BARR (MONOTEST) MUCOPROTEINE, vedere alfa-1-GLICOPROTEINA ACIDA			
MUTAZIONI EMOCROMATOSI, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
MUTAZIONI FIBROSI CISTICA, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
MUTAZIONI GENE UBE3A, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
MYCOBACTERIUM T. DNA, nell'escreato	espettorato	raccogliere l'espettorato evitando la commistione con il materiale salivare	digiuno
Na, vedere SODIO			
Ni, vedere NICKEL			
NICKEL (fine turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine alla fine del turno lavorativo	nessuna
NICKEL (inizio turno), nelle urine [U]	urine	raccogliere le urine all'inizio del turno lavorativo	nessuna
NICKEL, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
NITRODERIVATI, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
NORADRENALINA, vedere CATECOLAMMINE			
NOREPINEFRINA, vedere CATECOLAMMINE			
OCT, vedere ORNITINA-CARBAMILTRANSFERASI			
OMOCISTEINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
ORMONE ADRENOCORTICOTROPO, vedere CORTICOTROPINA e ACTH			
ORMONE DELLA CRESCITA, vedere ORMONE SOMATOTROPO e GH			
ORMONE FOLLICOLO STIMOLANTE, vedere FOLLITROPINA e FSH			
ORMONE LATTOGENO PLACENTARE, vedere SOMATOMAMMOTROPINA			
ORMONE LUTEINIZZANTE, vedere LUTEOTROPINA e LH			
ORMONE LUTEOTROPO, vedere LUTEOTROPINA e LH			

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
ORMONE SOMATOTROPO (GH), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno. Il prelievo deve essere eseguito su paziente a riposo. Lo stress e l'esercizio fisico possono provocare un innalzamento dei livelli dell'ormone
ORMONE TIREOTROPO, vedere TIREOTROPINA e TSH			
ORNITINA-CARBAMILTRANSFERASI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
OROMUCOIDE, vedere alfa-1-GLICOPROTINA ACIDA			
OROSOMUCOIDE, vedere alfa-1-GLICOPROTINA ACIDA			
OSMOLALITÀ, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
OSMOLALITÀ, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
OSSALATI, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
OSTEOCALCINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
P, vedere FOSFATO			
PAP test, vedere CITOLOGICO CERVICO VAGINALE			
PAP, vedere FOSFATASI PROSTATICA			
PARASSITOLOGICO FECI	feci	raccogliere una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide) nell'apposito contenitore sterile munito di coperchio con spatola	nessuna
PARATIFO, vedere WIDAL			
PARATORMONE (PTH), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Pb, vedere PIOMBO			
PCR, vedere PROTEINA C REATTIVA			
PIAS, vedere PIASTRINA			
PIASTRINE, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
PIOMBO, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
PIOMBO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
PLASMODI DELLA MALARIA	sangue	con anticoagulante (EDTA)	il prelievo deve essere effettuato preferibilmente durante

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
			l'attacco febbrile
Plt, vedere PIASTRINE			
PORFIRINE TOTALI, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
POTASSIO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
POTASSIO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
PRA, vedere RENINA			
PRIMIDONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
PRIST, vedere IgE TOTALI			
PRL, vedere PROLATTINA			
PRODOTTI DI DEGRADAZIONE DEL FIBRINOGENO/FIBRINA, vedere FDP/FSP			
PRODOTTI SOLUBILI DEL FIBRINOGENO/FIBRINA, vedere FDP/FSP			
PROGESTERONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
PROLATTINA (PRL), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno. Il prelievo deve essere eseguito su paziente a riposo. Lo stress e l'esercizio fisico possono provocare un innalzamento dei livelli dell'ormone
PROLATTINA (test da stimolo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
PROTEINA C REATTIVA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
PROTEINE DI BENCE-JONES, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
PROTEINE TOTALI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
PROTEINE, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
PROTOPORFIRINA IX, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
PROVE EMOGENICHE	nessuno, trattandosi di prove funzionali eseguite sul paziente		digiuno
PSA, vedere ANTIGENE PSA			
PSCH, vedere COLINESTERASI			
PSCS, vedere COLINESTERASI			
PSEUDO-COLINESTERASI, vedere COLINESTERASI			
PT, vedere TEMPO DI PROTROMBINA			
PTH, vedere PARATORMONE			
PTT, vedere APTT			
QUICK, vedere TEMPO DI PROTROMBINA			
QUILONUM, vedere LITIO			
RAME, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
RAST, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
RA-TEST, vedere FATTORE REUMATOIDE			

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
REAZIONE DI WAALER ROSE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
RENINA (clinostatismo), nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
RENINA (ortostatismo), nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
RESISTENZA OSMOTICA, vedere RESISTENZE GLOBULARI			
RESISTENZE GLOBULARI	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
RETICOLOCITI, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
REUMA-TEST, vedere FATTORE REUMATOIDE			
RGO, vedere RESISTENZE GLOBULARI OSMOTICHE			
RICERCA DELLE EMOGLOBINE ANOMALE, vedere EMOGLOBINE ANOMALE			
RICERCA DELL'EMOGLOBINA F, vedere EMOGLOBINA FETALE			
RICERCA DELL'EMOGLOBINA FETALE, vedere EMOGLOBINA FETALE			
RICERCA SANGUE OCCULTO, vedere SANGUE OCCULTO FECI			
RICERCA UOVA OSSIURI, scotch-test	uova (eventuali)	applicare lo scotch trasparente ad un vetrino microscopico portaoggetti	nessuna
RIST, vedere IgE TOTALI			
ROTAVIRUS NELLE FECI	feci	raccogliere una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide) nell'apposito contenitore sterile munito di coperchio con spatola	nessuna
SANGUE ESAME COLTURALE, vedere EMOCOLTURA			
SANGUE OCCULTO FECI	feci	raccogliere una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide) nell'apposito contenitore sterile munito di coperchio con spatola	nessuna
SCOTCH TEST, vedere RICERCA UOVA OSSIURI, scotch-test			
SCREENING ALLERGOLOGICO	sangue	senza anticoagulante	digiuno
SECRETO CERVICALE, esame batterioscopico	secreto cervicale	striscio su vetrino microscopico portaoggetti	nessuna
SECRETO CERVICALE, esame colturale	secreto cervicale	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
SECRETO NASALE, esame batterioscopico.	secreto nasale	striscio su vetrino microscopico porta-oggetti	nessuna
SECRETO URETRALE, esame batterioscopico	secreto uretrale	striscio su vetrino microscopico porta-oggetti	nessuna
SECRETO URETRALE, esame colturale	secreto uretrale	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna
SECRETO VAGINALE, esame batterioscopico	secreto vaginale	striscio su vetrino microscopico porta-oggetti	nessuna
SECRETO VAGINALE, esame colturale	secreto vaginale	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna
SEROTONINA (determinata come ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO), vedere ACIDO 5-IDROSSI-INDOLACETICO			
SEX HORMON BINDING-GLOBULIN, vedere SHBG			
SGOT, vedere AST			
SGPT, vedere ALT			
SH, vedere ORMONE SOMATOTROPO e μ GH			
SHBG, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
SIDEREMIA, vedere FERRO			
SIEROLOGIA DELLA LUE, vedere VDRL, TPHA, FTA-ABS			
SIFILIDE, vedere VDRL, TPHA, FTA-ABS			
SODIO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
SODIO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
SOMATOMAMMOTROPINA (HPL), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
SOMATOMEDINA (IGF-I), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
SOMOFILLINA, vedere TEOFILLINA			
SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
SPERMIOCOLTURA, vedere LIQUIDO SEMINALE, esame colturale			
STREPTOZYME TEST, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
T3, vedere TRIIODOTIRONINA			
T4, vedere TIROXINA			
TAF, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA			
TAFS, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA			
TAMPONE AURICOLARE, esame colturale	essudato auricolare	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna
TAMPONE FARINGEO, esame colturale	essudato rinofaringeo	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna
TAMPONE NASALE , esame colturale	essudato nasale	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna
TAMPONE OCULARE, esame colturale	essudato oculare	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna
TAMPONE RETTALE, esame colturale	feci	tampone localizzato con terreno di trasporto	nessuna

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
TAOS, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O			
TAS, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O			
TASF, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA			
TASL, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O			
TBG, vedere TIREOGLOBULINA			
TCA, vedere ACIDO TRICLORACETICO			
TE, vedere PROVE EMOGENICHE			
TEFAMIN, vedere TEOFILLINA			
TEGRETOL, vedere CARBAMAZEPINA			
TELOPEPTIDE (NTx), nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
TEMPO DI COAGULAZIONE, vedere PROVE EMOGENICHE			
TEMPO DI EMORRAGIA, vedere PROVE EMOGENICHE			
TEMPO DI PROTROMBINA, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (0,5 mL di citrato trisodico, per un rapporto finale di 9 parti di sangue e 1 parte di soluzione anticoagulante)	digiuno
TEMPO DI QUICK, vedere TEMPO DI PROTROMBINA			
TEMPO DI STILLICIDIO, vedere PROVE EMOGENICHE			
TEMPO DI TROMBOPLASTINA PARZIALE ATTIVATA, vedere APTT			
TEOFILLINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TEONOVA, vedere TEOFILLINA			
TEST DI ADDIS, vedere CONTA DI ADDIS			
TEST DI COOMBS DIRETTO	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
TEST DI COOMBS INDIRETTO	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TEST DI GRAVIDANZA, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
TEST TINE	nessuno, trattandosi di un test clinico		nessuna
TESTOSTERONE LIBERO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TESTOSTERONE, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
Tg, vedere TIREOGLOBULINA			
THEO 24, vedere TEOFILLINA			
THEODUR, vedere TEOFILLINA			
THEOLAIR, vedere TEOFILLINA			
TIFO ADDOMINALE, vedere WIDAL			
TIFO ESANTEMATICO, vedere WEIL-FELIX			
TIFO PETECCHIALE, vedere WEIL-FELIX			
TIOCIANATI, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
TIREO BINDING-GLOBULIN, vedere TIREOGLOBULINA			
TIREOCALCITONINA, vedere CALCITONINA			
TIREOGLOBULINA (Tg), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TIREOTROPINA (TSH), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
TIREOTROPINA, vedere anche TSH			
TIROXINA (T4), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TIROXINA LIBERA (fT4), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TITOLO ANTISTAFILOLISINICO, vedere Ab ANTI-STAFILOLISINA			
TITOLO ANTISTREPTOLISINICO, vedere Ab ANTI-STREPTOLISINA O			
TPHA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TRANSAMINASI GLUTAMMICO-OSSALACETICA, vedere AST			
TRANSAMINASI GLUTAMMICO-PIRUVICA, vedere ALT			
TRANSFERRINA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TREPONEMA PALLIDUM HEMAGGLUTINATION, vedere TPHA			
TRICLOROETANOLO, nelle urine [U]	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
TRIGLICERIDI, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TRIIODOTIRONINA (T3), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TRIIODOTIRONINA LIBERA (fT3), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TROMBOCITI, vedere PIASTRINE			
TROPONINA T, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TSH (test da stimolo), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
TSH, vedere anche TIREOTROPINA			
TUBERCOLINA, vedere INTRADERMOREZIONE PPD e TEST-TINE			
URATO, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
URATO, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
UREA CLEARANCE	urine 24h e	senza anticoagulante,	digiuno
	sangue	il prelievo deve essere effettuato il mattino al termine della raccolta delle urine	
UREA, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
UREA, nelle urine delle 24 ore [dU]	urine 24h	contenitore di plastica	nessuna
URICEMIA, vedere URATO, nel siero			
URICURIA, vedere URATO, nelle urine			
URINE ESAME COMPLETO	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
URINOCOLTURA	urine	contenitore di plastica sterile	nessuna
VALORE EMATOCRITO, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno
VALUTAZIONE DANNO CROMOSOMICO	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	nessuna
VDRL, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
VELOCITÀ DI ERITROSEDIMENTAZIONE, vedere VES			
VELOCITÀ DI SEDIMENTAZIONE DEGLI ERITROCITI, vedere VES			
VENEREAL DISEASE REACTION LABORATORY, vedere VDRL			
VES	sangue	con anticoagulante (1,0 mL di citrato trisodico, per un rapporto finale di 4 parti	digiuno

Analisi	*Materiale*	*Prelievo*	*Preparazione*
		di sangue e 1 parte di soluzione anticoagulante)	
VITAMINA D (1,25-OH), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
VITAMINA D (25-OH), nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
VMA, vedere ACIDO VANILMANDELICO			
WAALER-ROSE, vedere REAZIONE DI WAALER-ROSE			
WASSERMANN, vedere TPHA			
WBC, vedere LEUCOCITI			
WEIL-FELIX, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
WIDAL, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
WIDAL-WRIGHT, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
WRIGHT, nel siero [S]	sangue	senza anticoagulante	digiuno
XILOSIO, nel siero e nelle urine	sangue e urine	nell'adulto sono somministrati 25 grammi di xilosio, viene effettuato il prelievo dopo 120 minuti dalla somministrazione dello xilosio, e vengono raccolte le urine dopo 5 ore dalla somministrazione dello xilosio. Nel bambino (da 0 a 12 anni) sono somministrati 5 grammi di xilosio, viene effettuato il prelievo dopo 60 minuti dalla somministrazione dello xilosio, e vengono raccolte le urine dopo 2 ore dalla somministrazione dello xilosio	digiuno
ZINCO, nel plasma [P]	sangue	con anticoagulante (litio-eparina)	digiuno
ZINCOPROTOPORFIRINA, nel sangue [Sg]	sangue	con anticoagulante (EDTA)	digiuno

Istruzioni per la raccolta dei materiali biologici

Attenersi sempre scrupolosamente alle indicazioni fornite dal laboratorio. Essere sempre consapevoli del fatto che una corretta raccolta e una corretta conservazione dei materiali biologici rappresenta un prerequisito essenziale per assicurare la qualità del dato analitico.

Urine[2]

La raccolta deve essere effettuata utilizzando l'apposito contenitore sterile. Non aprire il contenitore prima dell'uso per evitare contaminazioni.

Per l'analisi ⇨ URINE ESAME COMPLETO è consigliabile raccogliere le prime urine emesse il mattino al risveglio o, in alternativa, quelle emesse 3÷6 ore dopo l'ultima minzione. Per le altre analisi su urine estemporanee raccogliere le urine sulla base delle indicazione mediche.

Le modalità di raccolta sono le seguenti:

- aprire il contenitore sterile (senza toccare con le dita l'interno del contenitore né l'interno del tappo per evitare contaminazioni);
- urinare direttamente nel contenitore, riempiendolo fino a metà;
- richiudere il contenitore, assicurandosi che il tappo sia applicato correttamente e ben serrato, onde evitare stravasi di urina durante il trasporto;
- fare pervenire il contenitore al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarlo in frigorifero (a +2÷8° C): in queste condizioni le urine possono essere conservate fino a 24 ore;
- nei bambini piccoli la raccolta deve essere effettuata negli appositi sacchetti di plastica sterili autoadesivi. Il sacchetto deve essere ritirato entro un'ora dalla minzione. Ai fini del trasporto, è consigliabile travasare le urine in un contenitore rigido sterile. Anche in questo caso fare pervenire il contenitore con il campione di urina al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarlo in frigorifero (a +2÷8° C): in queste condizioni le urine possono essere conservate fino a 24 ore.

---

[2] *Per le urine delle 24 ore vedere ⇨ Urine delle 24 ore.*
Per l'idrossiprolina nelle urine vedere ⇨ Idrossiprolina nelle urine.
Per l'urinocoltura vedere ⇨ Urinocoltura.
Per la raccolta delle urine per esami citoistopatologici (anatomia patologica) vedere ⇨ Esami citologici e istologici.
Per la determinazione della beta-2-microglobulina nelle urine, si consiglia di raccogliere le urine durante le due ore che precedono il prelievo.

Urine delle 24 ore[3]

La raccolta deve essere effettuata utilizzando l'apposito contenitore con tappo a vite (si sconsiglia l'uso di recipienti con tappo a pressione). Non aprire il contenitore prima dell'uso per evitare contaminazioni.

Per raccogliere le urine delle 24 ore attenersi alle seguenti semplici istruzioni:

- ➢ stabilire l'inizio della raccolta a una determinata ora del mattino (per esempio alle ore 7.00);
- ➢ all'ora stabilita vuotare la vescica scartando le urine;
- ➢ a partire da questo momento raccogliere tutte le urine, comprese quelle emesse alla stessa ora del giorno successivo (nel nostro esempio alle 7.00), nell'apposito contenitore;
- ➢ durante la raccolta conservare il contenitore in frigorifero (a +2÷8° C);
- ➢ fare pervenire il contenitore al Laboratorio entro due-tre ore dal termine della raccolta.

Per la determinazione delle clearance è necessario fornire età, peso e altezza del paziente.

Idrossiprolina nelle urine

Nei due giorni precedenti la raccolta, e durante il giorno in cui si raccolgono le urine, devono essere evitati carne di ogni tipo, salumi di ogni tipo, gelatine, gelati confezionati.

La raccolta delle urine deve iniziare il giorno precedente la consegna al laboratorio. Al mattino, appena alzati (ad esempio alle ore 7) urinare svuotando completamente la vescica. Queste urine non devono essere conservate.

Da questo momento in poi, per 24 ore, cioè fino al mattino successivo, tutte le urine vanno conservate, comprese quelle emesse appena alzati il mattino in cui si conclude la raccolta. Tutto il quantitativo di urine raccolto va consegnato al laboratorio.

Le urine vanno conservate in un recipiente di vetro o di plastica, ben pulito, da tenere in luogo fresco, evitando l'esposizione al sole. D'estate si consiglia la conservazione in frigorifero (a + 4÷8 °C). Non è necessario un recipiente speciale sterile.

Poiché è molto importante che tutte le urine prodotte vengano raccolte, se una parte delle urine per qualsiasi motivo non viene conservata, la raccolta deve essere ripetuta dall'inizio in un giorno successivo.

---

[3] *In alcuni casi (acido vanilmandelico, catecolammine) è necessario predisporre la raccolta delle urine nel contenitore fornito dal Laboratorio, che contiene piccole quantità di liquidi o di altre sostanze, che sono necessari per garantire la stabilità del campione durante l'arco di tempo della raccolta. Non sciacquare il contenitore prima della raccolta, per non allontanare i conservanti eventualmente presenti. Evitare di toccare o versare i conservanti, in quanto caustici! Tenere fuori dalla portata dei bambini!*

Urinocoltura[4]

La raccolta deve essere effettuata utilizzando l'apposito contenitore sterile. Non aprire il contenitore prima dell'uso per evitare contaminazioni. È consigliabile raccogliere le prime urine emesse il mattino al risveglio. In alternativa raccogliere le urine 3÷6 ore dopo l'ultima minzione.

Le modalità di raccolta nel caso in cui si debba effettuare solamente l'analisi ⇨ URINOCOLTURA sono le seguenti:

- ➢ lavare accuratamente i genitali esterni con acqua e sapone e risciacquarli a lungo con acqua. In alternativa detergere i genitali con garza o cotone imbevuti di citrosil (soluzione non alcolica);
- ➢ aprire il contenitore sterile (senza toccare con le dita l'interno del contenitore né l'interno del tappo per evitare contaminazioni);
- ➢ iniziare la minzione lasciando defluire il primo getto di urina nella toilette, interrompere la minzione, quindi riprenderla subito urinando direttamente nel contenitore, riempiendolo fino a metà;
- ➢ richiudere il contenitore, assicurandosi che il tappo sia applicato correttamente e ben serrato, onde evitare stravasi di urina durante il trasporto;
- ➢ far pervenire il contenitore al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarlo in frigorifero (a +2÷8° C): in queste condizioni le urine possono essere conservate fino a 24 ore;
- ➢ nei bambini piccoli la raccolta deve essere effettuata negli appositi sacchetti di plastica sterili autoadesivi. Il sacchetto deve essere ritirato entro un'ora dalla minzione. Ai fini del trasporto, è consigliabile travasare le urine in un contenitore rigido sterile. Anche in questo caso fare pervenire il contenitore al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarlo in frigorifero (a +2÷8° C): in queste condizioni le urine possono essere conservate fino a 24 ore.

Le modalità di raccolta nel caso in cui si debba effettuare sia l'analisi ⇨ URINOCOLTURA sia l'analisi ⇨ URINE ESAME COMPLETO sono le seguenti:

- ➢ identificare opportunamente i due contenitori sterili;
- ➢ lavare accuratamente i genitali esterni con acqua e sapone e risciacquarli a lungo con acqua. In alternativa detergere i genitali con garza o cotone imbevuti di citrosil (soluzione non alcolica);

[4] *Si consiglia di non effettuare l'urinocoltura durante terapia antibiotica, in quanto ciò può comportare risultati falsamente negativi.*

- ➢ aprire i due contenitori sterili (senza toccare con le dita l'interno del contenitore né l'interno del tappo per evitare contaminazioni);
- ➢ iniziare la minzione lasciando defluire il primo getto di urina nel contenitore riservato all'analisi ⇨ URINE ESAME COMPLETO, interrompere la minzione, quindi riprenderla subito urinando nel contenitore destinato all'analisi ⇨ URINOCOLTURA, riempiendolo fino a metà;
- ➢ richiudere i contenitori, assicurandosi che il tappo sia applicato correttamente e ben serrato, onde evitare stravasi di urina durante il trasporto;
- ➢ fare pervenire i contenitori al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarli in frigorifero (a +2÷8° C): in queste condizioni le urine possono essere conservate fino a 24 ore;
- ➢ nei bambini piccoli la raccolta deve essere effettuata negli appositi sacchetti di plastica sterili autoadesivi. Il sacchetto deve essere ritirato entro un'ora dalla minzione. Ai fini del trasporto, è consigliabile travasare le urine in un contenitore rigido sterile. Anche in questo caso fare pervenire il contenitore al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarlo in frigorifero (a +2÷8° C): in queste condizioni le urine possono essere conservate fino a 24 ore.

Espettorato[5]

La raccolta deve essere effettuata utilizzando l'apposito contenitore sterile. Non aprire il contenitore prima dell'uso per evitare contaminazioni.

È consigliabile raccogliere la prima espettorazione del mattino con le seguenti modalità:

- ➢ non fare lavare i denti con dentifrici o colluttori;
- ➢ non assumere cibi né bevande;
- ➢ detergere il cavo orale con acqua allontanando il più possibile la saliva;
- ➢ aprire l'apposito contenitore sterile con tappo a vite (si sconsiglia l'uso di recipienti con tappo a pressione). Non toccare con le dita l'interno del contenitore né l'interno del tappo per evitare contaminazioni;
- ➢ espettorare nel contenitore;
- ➢ richiudere il contenitore assicurandosi che il tappo sia stato riavvitato completamente;
- ➢ fare pervenire il contenitore al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarlo in frigorifero (a +2÷8 °C): in queste condizioni il materiale può essere conservato fino a 24 ore.

[5] *Per la raccolta dell'espettorato per l'esecuzione di esami citoistopatologici (anatomia patologica) vedere le specifiche istruzioni ⇨ Esami citologici e istologici.*

Emocoltura

Eseguire il prelievo preferibilmente durante un attacco febbrile, utilizzando esclusivamente il dispositivo a doppio ago provvisto di pinzetta fornito con i flaconi per l'emocoltura:

- ➢ togliere le capsule di plastica colorata al flacone per emocoltura e disinfettare il tappo di gomma con cotone imbevuto di alcool etilico al 70%;
- ➢ disinfettare accuratamente la zona di prelievo, evitando di toccare con le mani la parte già disinfettata;
- ➢ eseguire la puntura della vena tenendo la pinzetta chiusa. Togliere il laccio emostatico, aprire la pinzetta, lasciare scorrere il sangue nel tubo e, quando è giunto al secondo ago, chiudere la pinzetta;
- ➢ inserire il secondo ago nel flacone perforando il tappo di gomma;
- ➢ aprire la pinzetta, e lasciare fluire il sangue nel flacone;
- ➢ quando il flusso di sangue è cessato, chiudere la pinzetta, estrarre l'ago dal tappo, e quindi estrarre l'ago dalla vena.
- ➢ fare pervenire il flacone al Laboratorio immediatamente. In alternativa conservarlo in termostato a +37 °C: in queste condizioni il materiale può essere conservato fino a 24 ore.

Coprocoltura ed esami delle feci

La raccolta deve essere effettuata utilizzando l'apposito contenitore sterile con tappo fornito di spatola, con le seguenti modalità:

- ➢ raccogliere le feci in una padella da letto asciutta;
- ➢ NON urinare sul campione di feci durante la raccolta;
- ➢ NON emettere le feci nel vaso della toilette;
- ➢ NON raccogliere le feci direttamente nel contenitore;
- ➢ NON urinare nel contenitore;
- ➢ aprire il contenitore, raccogliere con la spatola una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide);
- ➢ chiudere il contenitore e lavarsi accuratamente la mani;
- ➢ fare pervenire il contenitore al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarlo in frigorifero (a +2÷8 °C): in questo modo il materiale può essere conservato fino a 24 ore.

Sangue occulto nelle feci[6]

La raccolta deve essere effettuata utilizzando possibilmente l'apposito dispositivo con tappo fornito di asticella per il campionamento delle feci.

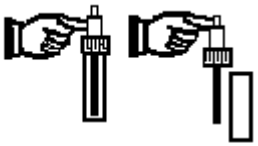
Criteri generali cui attenersi per effettuare la ricerca del sangue occulto nelle feci

➢ NON è necessario seguire una dieta priva di carni;
➢ evitare l'uso dello spazzolino da denti la sera precedente la raccolta;
➢ NON raccogliere le feci mentre è in corso il flusso mestruale;
➢ NON raccogliere le feci in presenza di emorroidi sanguinanti.

Modalità di raccolta delle feci

➢ raccogliere le feci su una superficie asciutta come una padella da letto, un sacchetto di plastica posto in un cestino o un foglio di carta posto sul pavimento;
➢ NON urinare sul campione di feci durante la raccolta;
➢ NON emettere le feci nel vaso della toilette;
➢ NON raccogliere le feci direttamente nel contenitore;
➢ NON urinare nel contenitore.

Utilizzo del dispositivo per il campionamento delle feci



Svitare il tappo azzurro. Estrarre il tappo cui è fissata l'asticella di campionamento, facendo attenzione a non rovesciare il liquido contenuto nel dispositivo.

Immergere l'asticella in punti diversi (almeno sei) delle feci, senza superare il livello massimo indicato, rappresentato dalla fine delle scanalature.

[6] *Si raccomanda di utilizzare questo o gli altri dispositivi messi a disposizione dal Laboratorio, in quanto essi consentono la MASSIMA IGIENE nella raccolta e nel trasporto del materiale, oltre a garantire la MIGLIORE QUALITÀ DEI RISULTATI. Qualora ciò non fosse possibile, raccogliere una quantità di feci delle dimensioni di una noce (o l'equivalente se le feci sono poltacee o liquide) seguendo le modalità descritte sotto ⇨ Coprocoltura ed esami delle feci.*

Rimuovere completamente dall'asticella l'eccesso di feci con un fazzoletto di carta morbido. La minima quantità di materiale che residua nelle scanalature dell'asticella è quella necessaria e sufficiente per l'esame.

Reinserire l'asticella nel flaconcino con cura, evitando di contaminare la superficie esterna del dispositivo e il tappo, quindi riavvitare quest'ultimo.

Inserire il flaconcino nel sacchetto di trasporto e farlo pervenire al Laboratorio entro due-tre ore. In alternativa il dispositivo può essere conservato fino a un massimo di 72 ore (tre giorni) in frigorifero a +2÷8 °C (non congelare!).

Scotch-test

La raccolta deve essere effettuata applicando nelle primissime ore del mattino, quando la femmina generalmente depone le uova, un pezzetto di scotch alla pliche perianali, e facendolo aderire subito dopo ad un vetrino microscopico portaoggetti, con le seguenti modalità e raccomandazioni:

- effettuare l'applicazione dello scotch prima della toeletta quotidiana;
- utilizzare solamente scotch di tipo trasparente;
- il pezzetto di scotch deve essere della lunghezza di tre-quattro centimetri;
- applicare lo scotch alla regione delle pliche perianali facendo attenzione che la superficie adesiva sia quella messa in contatto con la cute;
- distendere lo scotch sul vetrino portaoggetti facendolo aderire uniformemente, onde evitare la formazione di pieghe e/o bolle d'aria;
- applicare solamente un singolo pezzetto di scotch per vetrino;
- ripetere il prelievo tre volte, con altrettanti pezzetti di scotch, applicandoli ad altrettanti vetrini;
- fare pervenire i vetrini al Laboratorio entro due-tre ore dalla raccolta. In alternativa conservarli all'asciutto, a temperatura ambiente: in questo modo il materiale può essere conservato fino a 24 ore.

Micoplasmi urogenitali[7]

Prelievo vaginale e cervicale

- ➢ pulire accuratamente la parte esterna del collo dell'utero onde eliminare il muco cervicale (senza utilizzare antisettici locali);
- ➢ eseguire il prelievo con un tampone sterile (poiché i micoplasmi hanno una forte affinità per le cellule delle mucose sulle quali aderiscono, è essenziale raccogliere una adeguata quantità di cellule);
- ➢ introdurre immediatamente il tampone nel terreno di trasporto liquido;
- ➢ agitare il tampone, muovendolo avanti-indietro una decina di volte, per staccare completamente il materiale raccolto, e trasferirlo nel terreno di trasporto;
- ➢ eliminare il tampone;
- ➢ richiudere accuratamente il flaconcino di terreno con l'apposito tappo a vite;
- ➢ inviare immediatamente in laboratorio.

Prelievo uretrale

- ➢ pulire accuratamente il meato urinario esterno (senza utilizzare antisettici locali);
- ➢ eseguire il prelievo con un tampone sterile (poiché i micoplasmi hanno una forte affinità per le cellule delle mucose sulle quali aderiscono, è essenziale raccogliere una adeguata quantità di cellule);
- ➢ introdurre immediatamente il tampone nel terreno di trasporto liquido;
- ➢ agitare il tampone, muovendolo avanti-indietro una decina di volte, per staccare completamente il materiale raccolto, e trasferirlo nel terreno di trasporto;
- ➢ eliminare il tampone;
- ➢ richiudere accuratamente il flaconcino di terreno con l'apposito tappo a vite;
- ➢ inviare immediatamente in laboratorio.

Esami citologici e istologici[8]

Agoaspirati

- ➢ fissare in formalina tamponata al 10%;

---

[7] *Eseguire il prelievo prima dell'inizio della terapia con antibiotici.*

[8] *Usare un contenitore in plastica con tappo a tenuta, con adeguato fissativo, come specificato più avanti alle voci riguardanti i singoli materiali. Applicare al contenitore un'etichetta contenente le generalità del paziente, e riportare su tale etichetta le eventuali specifiche della sede anatomica del prelievo (per esempio, in caso di biopsia gastrica, "angulus", "fondo", "antro", eccetera). Compilare la richiesta riportando le generalità del paziente (nome e cognome, data di nascita), la sede anatomica del prelievo, la diagnosi o presunzione clinica, le eventuali notizie anamnestiche utili ai fini della diagnosi anatomopatologica, e la data del prelievo.*

➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Biopsie

➢ fissare in formalina tamponata al 10%;
➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Espettorato

È consigliabile raccogliere la prima espettorazione del mattino con le seguenti modalità:

➢ non fare lavare i denti con dentifrici o colluttori;
➢ non assumere cibi né bevande;
➢ detergere il cavo orale con acqua allontanando il più possibile la saliva;
➢ giacere per almeno mezz'ora sul lato opposto a quello del polmone del quale si vuole raccogliere l'espettorato, per facilitare il deflusso delle secrezioni in trachea;
➢ espettorare in un contenitore sterile;
➢ travasare l'escreato nel contenitore contenente il liquido di fissaggio (formalina tamponata al 10%);
➢ richiudere il contenitore assicurandosi che il tappo sia stato riavvitato completamente;
➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Liquidi da versamento

➢ non va utilizzato il fissativo!
➢ aggiungere al liquido di versamento eparina per una concentrazione finale dell'uno per mille (1 mL di eparina ogni litro di liquido). L'aggiunta va effettuata immediatamente, mescolando accuratamente l'eparina al liquido per evitare la formazione di coaguli di fibrina: questa operazione è essenziale in quanto la formazione di coaguli rende il campione inutilizzabile;
➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Liquidi di lavaggio

Per i liquidi di lavaggio (bronchiale, gastrico, duodenale, colico-sigmoido-rettale, eccetera), attenersi alle seguenti modalità:

➢ non va utilizzato il fissativo!
➢ aggiungere al liquido di versamento eparina per una concentrazione finale dell'uno per mille (1 mL di eparina ogni litro di liquido). L'aggiunta va effettuata immediatamente, mescolando accuratamente l'eparina al liquido per evitare la formazione di coaguli di fibrina: questa operazione è essenziale in quanto la formazione di coaguli rende il campione inutilizzabile;

➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Pezzi operatori

➢ fissare in formalina tamponata al 10%;
➢ utilizzare una adeguata quantità di liquido fissativo (almeno 10 parti in volume di fissativo per una parte in volume del pezzo da fissare), che deve essere preparato nel contenitore dei pezzi prima che questi vi vengano deposti;
➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Urine

➢ non va utilizzato il fissativo!
➢ raccogliere almeno 50 mL di urine fresche, emesse con la seconda minzione mattutina.
➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Vetrini strisciati

Per gli strisci (di aspirati o secreti o brushing, e di liquidi vari come liquido salivare, liquido mammario, liquidi da ascessi o fistole, eccetera), attenersi alle seguenti modalità:

➢ allestire gli strisci su più vetrini;
➢ fissare i vetrini preferibilmente con citospray;
➢ se non è disponibile il citospray, immergere immediatamente i vetrini in etanolo a 95° e lasciare fissare per almeno mezz'ora;
➢ fare asciugare gli strisci all'aria;
➢ inviare immediatamente al laboratorio.

Esami di citogenetica e citogenetica molecolare[9]

Sangue periferico e sangue midollare[10]

➢ utilizzare le provette sterili fornite dal laboratorio (contenenti litio-eparina e terreno di coltura). Le provette devono essere conservate in frigorifero (a +2÷8 °C);
➢ riportare le provette a temperatura ambiente prima del prelievo;

[9] *Tutti i campioni prelevati per l'analisi cromosomica devono pervenire nel più breve tempo possibile al laboratorio, e comunque entro 24 ore dal prelievo. Tutti i campioni devono essere conservati e consegnati a temperatura ambiente. La quantità indicata per ogni singolo materiale è quella ottimale. Se la quantità di materiale prelevato risultasse inferiore, i campioni sono in genere accettati e processati, ma non può essere garantito il successo dell'analisi!*

[10] *Non disponendo delle provette fornite dal laboratorio, utilizzare una provetta sterile monouso sottovuoto con anticoagulante (litio-eparina). In tal caso il campione va inviato immediatamente al laboratorio!*

- ➢ prelevare sterilmente 2 mL di sangue;
- ➢ inviare immediatamente al laboratorio. In caso di ritardo nell'invio, conservare al massimo per 24 ore a temperatura ambiente (non mettere in frigorifero!).

Liquido amniotico non commisto a sangue

- ➢ utilizzare le provette sterili fornite dal laboratorio (con tappo a vite e fondo conico);
- ➢ prelevare sterilmente 16÷20 mL di liquido amniotico;
- ➢ inviare immediatamente al laboratorio. In caso di ritardo nell'invio, conservare al massimo per 24 ore a temperatura ambiente (non mettere in frigorifero!).

Liquido amniotico commisto a sangue

- ➢ utilizzare le provette sterili fornite dal laboratorio (con tappo a vite e fondo conico, contenenti litio-eparina). Le provette devono essere conservate in frigorifero (a +2÷8 °C);
- ➢ riportare le provette a temperatura ambiente prima del prelievo;
- ➢ prelevare sterilmente 16÷20 mL di liquido amniotico;
- ➢ inviare immediatamente al laboratorio. In caso di ritardo nell'invio, conservare al massimo per 24 ore a temperatura ambiente (non mettere in frigorifero!).

Villi coriali

- ➢ utilizzare esclusivamente i contenitori sterili forniti dal laboratorio (contenenti terreno di coltura). I contenitori devono essere conservati in frigorifero (a +2÷8 °C);
- ➢ riportare i contenitori a temperatura ambiente prima del prelievo;
- ➢ immettere sterilmente nei contenitori almeno 10 mg di villi coriali;
- ➢ inviare immediatamente al laboratorio. In caso di ritardo nell'invio, conservare al massimo per 24 ore a temperatura ambiente (non mettere in frigorifero!).

Materiale abortivo (villi placentari prelevati sterilmente)[11]

- ➢ utilizzare i contenitori sterili forniti dal laboratorio (contenenti terreno di coltura). I contenitori devono essere conservati in frigorifero (a +2÷8 °C);
- ➢ riportare i contenitori a temperatura ambiente prima del prelievo;
- ➢ immettere sterilmente nei contenitori i villi placentari;
- ➢ inviare immediatamente al laboratorio. In caso di ritardo nell'invio, conservare al massimo per 24 ore a temperatura ambiente (non mettere in frigorifero!).

[11] *Non disponendo dei contenitori forniti dal laboratorio, utilizzare un contenitore sterile contenente soluzione fisiologica anch'essa sterile.*

Materiale abortivo (tessuto fetale o frammento bioptico di tessuto fetale)[12]

- ➢ utilizzare i contenitori sterili forniti dal laboratorio (contenenti terreno di coltura). I contenitori devono essere stoccati in frigorifero (a +2÷8 °C);
- ➢ riportare i contenitori a temperatura ambiente prima del prelievo;
- ➢ immettere sterilmente nei contenitori il tessuto fetale o il frammento bioptico;
- ➢ inviare immediatamente al laboratorio. In caso di ritardo nell'invio, conservare al massimo per 24 ore a temperatura ambiente (non mettere in frigorifero!).

Tessuto (cutaneo o tumorale)[13]

- ➢ utilizzare i contenitori sterili forniti dal laboratorio (contenenti terreno di coltura). I contenitori devono essere stoccati in frigorifero (a +2÷8 °C);
- ➢ riportare i contenitori a temperatura ambiente prima del prelievo;
- ➢ immettere sterilmente nei contenitori il frammento bioptico;
- ➢ inviare immediatamente al laboratorio. In caso di ritardo nell'invio, conservare al massimo per 24 ore a temperatura ambiente (non mettere in frigorifero!).

Esecuzione del tempo di emorragia

Per il tempo di emorragia sono necessari i seguenti materiali:

- ➢ uno sfigmomanometro;
- ➢ un cronometro;
- ➢ dischi di carta da filtro;
- ➢ cotone e alcool denaturato.

Informare il paziente che in seguito all'esecuzione dell'esame esiste il rischio della formazione di lievi cicatrici, e che questo può avvenire con qualsiasi procedura. Inoltre, poiché molti individui presentano un allungamento del tempo di emorragia dopo ingestione di aspirina, è importante appurare se il paziente ha assunto farmaci contenenti aspirina nella settimana precedente l'esame.

Per l'esecuzione procedere come segue:

- ➢ porre il braccio del paziente in posizione supina, con la faccia volare ben esposta. Scegliere per l'esecuzione una zona dell'area muscolare dell'avambraccio distale rispetto alla fossa

[12] *Non disponendo dei contenitori forniti dal laboratorio, utilizzare un contenitore sterile contenente soluzione fisiologica anch'essa sterile.*

[13] *Non disponendo dei contenitori forniti dal laboratorio, utilizzare un contenitore sterile contenente soluzione fisiologica anch'essa sterile.*

antecubitale, evitando vene superficiali, contusioni e formazioni displastiche (nei, cicatrici, verruche, eccetera);
- ➢ pulire la zona prescelta con un tampone imbevuto di alcool, e lasciare asciugare per almeno 30 secondi;
- ➢ applicare il bracciale dello sfigmomanometro all'avambraccio;
- ➢ togliere il dispositivo per l'esecuzione dell'esame dalla confezione a blister e staccare, ruotandola, la sicura bianca a lato del dispositivo. Non premere la levetta e non toccare la fessura attraverso cui passa la lama;
- ➢ gonfiare lo sfigmomanometro fino a raggiungere la pressione di 40 mm di mercurio (40 mm Hg). Il tempo tra il gonfiaggio del bracciale e l'incisione deve essere di 30÷60 secondi. Controllare il mantenimento della pressione prevista durante l'esecuzione del test;
- ➢ applicare fermamente il dispositivo all'avambraccio, senza premere, tenendo presente che le incisioni devono essere fatte parallelamente o perpendicolarmente alla piega del gomito;
- ➢ premere la levetta e contemporaneamente fare scattare il cronometro. Rimuovere il dispositivo circa 1 secondo dopo avere premuto la levetta;
- ➢ dopo 30 secondi asciugare il sangue con carta da filtro, facendo attenzione a non toccare i margini delle ferite, per non asportate il tappo piastrinico in via di formazione;
- ➢ asciugare ogni 30 secondi, continuando sino a quando il sangue non macchia più la carta, quindi fermare il cronometro;
- ➢ togliere il bracciale dello sfigmomanometro, pulire il braccio ed applicare una fasciatura sull'incisione. Informare il paziente che dovrà tenere la fasciatura per 24 ore;
- ➢ registrare il tempo di emorragia arrotondando al mezzo minuto più vicino.

Esecuzione del test-tine[14]

Per l'esecuzione del test-tine con l'apposito dispositivo multipuntura procedere come segue:
- ➢ porre il braccio del paziente in posizione supina, con la faccia volare ben esposta. Scegliere per l'esecuzione una zona dell'area muscolare dell'avambraccio distale rispetto alla fossa antecubitale, evitando vene superficiali, contusioni e formazioni displastiche (nei, cicatrici, verruche, eccetera);

[14] *Avvertire il paziente di non lavare il tratto di cute sul quale è stato effettuato il test fino alla lettura della reazione, che verrà effettuata dopo 72 ore.*

- pulire la zona prescelta con un tampone imbevuto di alcool, e lasciare asciugare per almeno 30 secondi;
- effettuare la puntura, quindi tenere il dispositivo premuto per 15÷20 secondi;
- non detergere la cute dopo la puntura;
- evidenziare la zona di cute sulla quale è stata effettuata la puntura, cerchiandola con una penna biro;
- applicare un cerotto protettivo.

Capitolo 8
Grandezze e unità di misura nel laboratorio clinico

(M. Besozzi)

Il sistema SI 480
Il numero di cifre significative dei risultati 483
Espressione dei risultati nel referto 484
Il sistema 485
Il componente 485
La grandezza 486
Il metodo 488
Il valore numerico del risultato 488
Le unità di misura 488
L'intervallo di riferimento 489
Alcuni segni matematici di largo uso 489

In Medicina di Laboratorio, alla base dell'espressione di risultati vi è "*la misura (dell'entità) di una grandezza fisica*". Questa misura consiste nell'esprimere la grandezza in modo quantitativo, dando ad essa un "*valore numerico*" che è un numero puro, ottenuto per confronto della "*(entità della) grandezza* in esame" con la "(entità di una) grandezza di riferimento ad essa omogenea, definita *unità di misura*", essendo quindi

(entità della) grandezza / unità di misura = valore numerico

da cui si ricava

(entità della) grandezza = valore numerico · unità di misura

Da quest'ultima espressione si deduce che il "*risultato di una misura*" è dato dal prodotto di un "*numero*" per la "*unità di misura*": pertanto l'indicazione di quest'ultima non deve mai essere omessa[1].

[1] *Besozzi M, De Angelis G, Franzini C. Espressione dei risultati nel laboratorio di chimica clinica. Milano:Società Italiana di Biochimica Clinica, 1989:190pp.*

Il sistema SI

Allo scopo di pervenire ad una immediata comprensione, in qualsiasi Paese, della espressione dei risultati di una misura, le organizzazioni internazionali e nazionali a ciò preposte hanno proceduto alla codificazione di un sistema di unità di misura delle varie grandezze, unificato nella definizione, nella nomenclatura e nella simbologia. Il sistema di base, oggi adottato, discende dal sistema metrico decimale (introdotto alla fine del XVIII secolo[2]) ed ha il nome di "Sistema Internazionale di Unità di Misura" (l'abbreviazione è SI); esso è stato sancito dalla Conferenza Generale dei Pesi e Misure (CGPM) nel 1960 e nel 1971, accettato dalla Comunità Economica Europea (CEE) nel 1980 e divenuto legale in Italia nel 1982[3].

Il sistema SI è fondato su sette grandezze e relative unità di base, indipendenti l'una dall'altra:

Grandezza di base	***Simbolo***	***Unità di base***	***Simbolo***
lunghezza	l	metro	m
massa	m	kilogrammo	kg
tempo	t	secondo	s
intensità di corrente elettrica	I	ampere	A
temperatura termodinamica	T	kelvin	K
quantità di sostanza	n	mole	mol
intensità luminosa	I	candela	cd

A questa vanno aggiunte due grandezze supplementari, che fanno pure esse parte integrante del sistema SI:

Grandezza supplementare	***Simbolo***	***Unità supplementare***	***Simbolo***
angolo piano	a,b,g...	radiante	rad
angolo solido	w,O	steradiante	sr

Per indicare multipli e sottomultipli delle unità sono previsti i fattori riportati nella seguente tabella:

---

[2] *"…che ci sia una sola misura e un solo peso in tutto il Regno…e anche una misura uniforme per i vini, almeno nella stessa provincia" si chiedeva insistentemente nei "Cahiers de Doléances" ai tempi della rivoluzione francese.*

[3] *DPR n. 802 del 12 agosto 1982, Attuazione della direttiva (CEE) n. 80/181 relativa alle unità di misura. Suppl Ord Gazz Uff della Repubblica Italiana n. 302 del 3 novembre 1982.*

Fattore	*Nome*	*Simbolo*
10^{3}	kilo	k
10^{6}	mega	M
10^{9}	giga	G
10^{12}	tera	T
10^{15}	peta	P
10^{18}	exa	E
10^{-3}	milli	m
10^{-6}	micro	μ
10^{-0}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f
10^{-18}	atto	a
10^{-21}	zepto	z
10^{-24}	iocto	y

Tra le principali regole adottate dal sistema SI, si rammentano le seguenti:

- ➢ sono raccomandati i fattori che fanno variare l'unità di un fattore 1000 (kilo, mega, milli, micro, eccetera), come riportato nella precedente tabella;
- ➢ è sconsigliato l'uso dei fattori che fanno variare le unità di un fattore 10 o 100 (deca, etto, deci, centi), che pertanto nella precedente tabella non sono stati riportati ;
- ➢ dopo i simboli non si deve mettere il punto (cm e non cm., mol e non mol., eccetera): si tratta appunto di simboli, e non di abbreviazioni;
- ➢ non si devono usare i fattori da soli; il nome o il simbolo dell'unità non deve essere omesso (micrometro o μm, e non micron o μ; kilogrammo e non kilo, eccetera);
- ➢ non si devono usare unità con nomi d'uso tipo il lambda (λ) per il microlitro (μL) e il gamma (γ) per il microgrammo (μg);
- ➢ non devono essere formate unità con più di un prefisso (nanometro e non millimicrometro o, peggio ancora, millimicron, eccetera);
- ➢ i multipli e i sottomultipli dell'unità di massa (kilogrammo), che già contiene un prefisso, si formano anteponendo i prefissi al grammo (quindi μg e non nKg, eccetera).

Dalle grandezze e unità di base e supplementari SI è possibile ricavare grandezze e unità SI "derivate", di cui numerose hanno importanza in campo biomedico:

Grandezza	*Nome unità*	*Simbolo unità*
Frequenza (cicli al secondo)	hertz	Hz
Forza	newton	N
Pressione e tensione	pascal	Pa
Energia, lavoro, quantità di calore	joule	J
Potenza, flusso energetico	watt	W
Quantità di elettricità, carica elettrica	coulomb	C
Tensione elettrica, potenziale elettrico, forza elettromotrice	volt	V
Resistenza elettrica	ohm	Ω
Conduttanza	siemens	S
Capacità elettrica	farad	F
Flusso d'induzione magnetica	weber	Wb
Induzione magnetica	tesla	T
Induttanza	henry	H
Temperatura Celsius	grado Celsius	°C
Flusso luminoso	lumen	lm
Illuminamento	lux	lx
Attività (irraggiamento ionizzante)	becquerel	Bq
Dose assorbita	gray	Gy
Equivalente di dose	sievert	Sv

Della precedente tabella si fa notare in particolare che la temperatura nel sistema SI viene misurata in gradi Celsius (°C) e non in gradi centigradi come comunemente (ed erroneamente) si continua a dire.

Infine si ricordano a parte le seguenti grandezze e unità che, in quanto non SI, continuano ad essere ammesse, sono ammesse per usi particolari o, come accade per molte, non sono più ammesse:

Grandezza	*Nome unità*	*Simbolo unità*	*Osservazioni*
Volume	litro	l o L	ammessa
Massa	tonnellata	t	ammessa
Pressione e tensione	bar	bar	ammessa
Tempo	minuto ora giorno	min h d	ammessa ammessa ammessa
Pressione	millimetro di mercurio	mmHg	ammessa solamente per pressione di sangue e fluidi biologici
Lunghezza	angström	Å	non più ammessa!

Lunghezza	micron	μ	non più ammessa!
Pressione	atmosfera (standard)	atm	non più ammessa!
Quantità di calore	caloria	cal	non più ammessa!
Potenza	cavallo vapore	CV o HP	non più ammessa!
Attività di radionuclidi	curie	Ci	non più ammessa!
Dose assorbita	rad	rad	non più ammessa!
Equivalente di dose	rem	rem	non più ammessa!
Esposizione (raggi x o γ)	röntgen	R	non più ammessa!

Dal confronto di quest'ultima tabella con quella che la precede è facile notare alcuni importanti cambiamenti intervenuti in campo biomedico:

- ➢ scomparsa dell'angström (Å);
- ➢ scomparsa del micron (μ);
- ➢ caloria (cal) sostituita dal joule (J);
- ➢ curie (Ci) sostituito dal becquerel (Bq);
- ➢ rad (rad) sostituito dal gray (Gy);
- ➢ rem (rem) sostituito dal sievert (Sv).

Per una trattazione completa del sistema SI vedere Fazio[4]. Per le applicazioni del sistema SI all'espressione dei risultati delle analisi di laboratorio vedere Besozzi[5].

Il numero di cifre significative dei risultati

Per riportare i risultati con un adeguato numero di cifre significative, si rammenta innanzitutto che gli zeri dopo i numeri diversi da zero fanno parte delle cifre significative stesse mentre, nel caso di valori numerici minori di uno, gli zeri prima dei numeri diversi da zero non fanno parte delle cifre significative. Così per esempio 0,250 ha tre cifre significative, mentre 0,0025 ha due sole cifre significative.

Come regola pratica, nel caso di un numero a precisione infinita o comunque elevata, il numero delle cifre significative dovrebbe essere tale che l'ordine di grandezza del campo di variazione (differenza fra il valore massimo e quello minimo) calcolato ignorando l'eventuale presenza della virgola sia compreso tra 30 e 300. Si supponga che la misura della concentrazione dello ione calcio (Ca^{++}) nel sangue in un campione di 50 soggetti abbia fornito risultati compresi tra 2,06442 (valore minimo) e 3,05620 (valore massimo) mmol/L. La differenza tra il valore massimo e quello minimo (senza tenere conto della virgola) è pari a 99178 (305620 -

[4] *Fazio M. Dizionario e manuale delle unità di misura. Bologna:Zanichelli, 1985:241pp.*
[5] *Besozzi M, De Angelis G, Franzini C. Espressione dei risultati nel laboratorio di chimica clinica. Milano:Società Italiana di Biochimica Clinica, 1989:190pp.*

206422) e quindi il numero delle cifre utilizzate per rappresentare i risultati è eccessivo. Arrotondando i risultati a due cifre decimali il valore minimo diventa 2,06 mmol/L, e il valore massimo diventa 3,06 mmol/L. La differenza (senza tenere conto della virgola) è pari a 100. Pertanto tre cifre significative sono sufficienti per rappresentare i risultati (Braga[6]).

Nel caso di numeri con una precisione finita o comunque ridotta (che sono poi quelli che si incontrano nella pratica), la precisione finale con cui registrare i risultati non può essere maggiore di quanto permesso dal grado di indeterminazione (imprecisione) dal quale sono affetti i risultati.

Il numero di cifre significative si deduce allora dalla deviazione standard della singola misura. Ed è un errore esprimere il valore numerico della misura con un numero di cifre superiore o inferiore a quello delle cifre significative soprattutto se non viene indicata anche la suddetta deviazione standard. Si supponga che la misura del calcio nel siero abbia fornito (media ± deviazione standard) un valore pari a 9,376 ± 0,10835 mg/dL. La deviazione standard indica 2 cifre significative, in quanto l'incertezza compare nel risultato già sulla seconda cifra da sinistra. Il modo corretto di scrivere il risultato è 9,4 ± 0,1 mg/dL.

Discorso analogo deve essere fatto per il numero di cifre significative da usare nel caso di indici statistici (statistiche) come la media e la deviazione standard. Sinteticamente si può dire che la precisione con cui si deve riportare qualsiasi statistica non può essere maggiore dell'errore che si commette nel processo di stima. Quindi, nel caso più semplice, quello della media, non può essere maggiore del suo errore standard. Si supponga che, sempre nel caso precedente della determinazione del calcio nel siero, alla media di 9,376 e alla deviazione standard di 0,10835 corrispondesse un errore standard della media pari 0,0320489 (l'errore standard è uguale alla deviazione standard divisa per la radice quadrata del numero delle osservazioni che compongono il campione). L'errore standard conferma che già la seconda cifra decimale è affetta da errore. Non avrebbe quindi senso riportare la media e la deviazione standard con più di due cifre decimali. La media deve essere scritta come uguale a 9,38 e la deviazione standard deve essere scritta come uguale a 0,11.

Espressione dei risultati nel referto

Attualmente per l'espressione dei risultati è raccomandato l'utilizzo del metodo razionale

[6] *Braga M. Argomenti di biometria. Quante cifre deve avere un numero per essere statisticamente significativo? Aggiornamento del medico 1990;14:XXXI-XXXVI.*

proposto dalla IFCC (International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), che prevede per ciascun analita di riportare: il sistema (materiale) su cui viene effettuata l'analisi, il componente (sostanza analizzata o analita), la grandezza utilizzata per esprimere il risultato, il metodo impiegato, il valore numerico del risultato, le unità di misura impiegate per esprimere il risultato, e gli intervalli di riferimento.

Il sistema

Il sistema è il materiale su cui viene effettuata l'analisi. Nel referto viene abbreviato sotto forma di una sigla, con le principali corrispondenze riportate nella tabella che segue

Sigla	***Sistema (materiale su cui viene eseguita l'analisi)***
A	(sangue) arterioso
Er	eritrocita/i
F	feci
Hb	emoglobina
Lc	leucocita/i
LCR	liquido cefalorachidiano
LS	liquido seminale
P	plasma
Ps	piastrina/e
Pt	paziente (nel caso di test)
S	siero
Sd	sudore
Sg	sangue
U	urine
V	(sangue) venoso

Il componente

La descrizione del componente viene fatta impiegando una terminologia sostanzialmente analoga a quella prima impiegata per descrivere le analisi, con una razionalizzazione tesa a introdurre, laddove possbile, denominazioni sistematiche. Così ad esempio, si parla sempre di CONTA DI ADDIS, mentre per rispettare la denominazione sistematica prevista dall'enzimologia, la parte della biochimica che si occupa degli enzimi, la transaminasi glutammico-ossalacetica (sigla GOT) viene oggi denominata ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI (sigla AST), e la transaminasi glutammico-piruvica (sigla GPT) viene oggi denominata ALANINA AMMINOTRANSFERASI (sigla ALT).

Nella tabella che segue sono riportati alcuni esempi di cambiamenti effettuati in seguito all'adozione, nell'espressione dei risultati, del criterio "sistema-componente" in luogo della tradizionale e ormai da considerare obsoleta "denominazione dell'analisi"

Vecchia denominazione (analisi)	*Nuova denominazione (sistema-componente)*
Acido lattico	S-LATTATO
Acido valproico	S-VALPROATO
Amilasi	S-alfa-AMILASI
Azotemia	S-UREA
Bicarbonati	S-IDROGENOCARBONATO
Bilirubinemia totale	S-BILIRUBINA TOTALE
Calcemia	S-CALCIO
Creatinfosfato-chinasi (CPK)	S-CREATINA CHINASI (CK)
Fosforemia	S-FOSFATO
Glicemia	P-GLUCOSIO (se eseguito su plasma)
	S-GLUCOSIO (se eseguito su siero)
Glicosuria	U-GLUCOSIO
Lattico-deidrogenasi (LDH)	S-LATTATO DEIDROGENASI (LDH)
Ormone luteinizzante (LH)	S-LUTEOTROPINA (LH)
Ormone della crescita (GH)	S-SOMATOTROPINA (STH)
Ormone follicolo stimolante (FSH)	S-FOLLITROPINA (FSH)
Proteinuria	U-PROTEINE TOTALI
Sideremia	S-FERRO
Transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT)	S-ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI (AST)
Transaminasi glutammico-piruvica (GPT)	S-ALANINA AMMINOTRANSFERASI (ALT)
Uricemia, acido urico	S-URATO

La grandezza

La grandezza con cui sono espressi i risultati deve essere ovviamente una delle grandezze previste dal sistema SI. Il cambiamento principale riguarda la transizione, ogniqualvolta sia possibile, cioè ogniqualvolta si conosca la massa della mole (ex peso molecolare) della sostanza in esame, dall'espressione in termini di *massa* (o di *concentrazione di massa*) all'espressione in termini di *quantità di sostanza* (o di *concentrazione di sostanza*). In altre parole la transizione dai milligrammi alle millimoli (ovvero dai milligrammi/litro alle millimoli/litro), dai grammi alle moli (ovvero dai grammi/litro alle moli/litro), e così via. Questo cambiamento ha un razionale molto forte: infatti le relazioni numeriche tra le diverse molecole in soluzione riflettono importanti correlazioni fisiopatologiche.

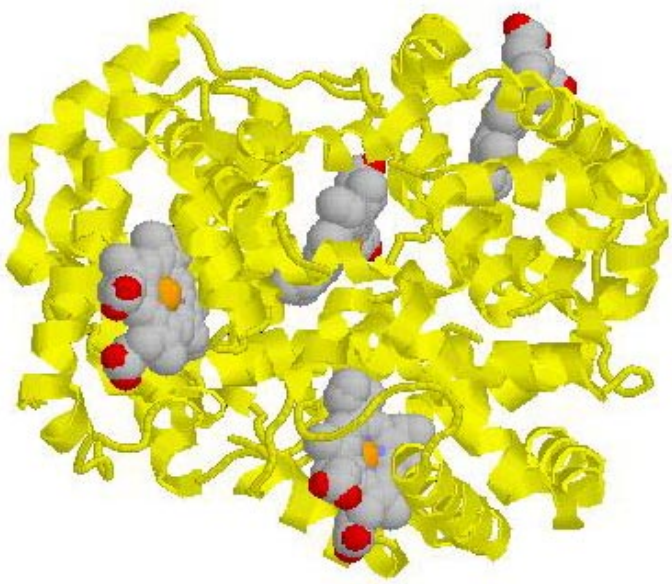
Si rammenta che per definizione il numero di moli (mol) è uguale al rapporto tra la massa in grammi (g) della sostanza in esame e la sua massa della mole (ex peso molecolare), ovvero

moli = grammi / massa della mole

da cui deriva che 1 mole di sostanza è una quantità di sostanza la cui massa in grammi è numericamente uguale alla massa della mole (e ancora 1 millimole di sostanza è una quantità di sostanza la cui massa in milligrammi è numericamente uguale alla massa della mole).

Una mole di qualsiasi sostanza contiene per definizione sempre lo stesso numero di molecole[7].

Si pensi all'espressione "4,0 grammi di albumina sono in grado di legare non più di 34 milligrammi di bilirubina" e all'espressione "580 micromoli (μmol) di albumina sono in grado di legare non più di 580 micromoli di bilirubina". Questa seconda espressione rivela in modo più immediato della prima il fatto che l'albumina, che oltre alla funzione di mantenere la pressione colloidosmotica ha anche una funzione di trasporto, è in grado di legare la bilirubina secondo un rapporto al massimo di 1:1 (una molecola di bilirubina per ogni molecola di albumina).



Si pensi ancora all'espressione "1 grammo di emoglobina trasporta 1,37 millilitri (mL) di ossigeno (O_2), contiene 3,5 milligrammi (mg) di ferro e forma 35,9 milligrammi (mg) di bilirubina". Non risulta evidente da questo il fatto che una molecola di emoglobina, come mostra l'immagine a lato, è un tetramero, formato da quattro catene polipeptidiche contenenti altrettanti gruppi eme, ciascuno dei

[7] *Questo numero è espresso dalla costante N (costante di Avogadro), essendo N uguale a* $6{,}02252 \cdot 10^{23}\ mole^{-1}$.

quali è in grado di legare un atomo di O_2, ciascuno dei quali contiene un atomo di ferro (l'atomo arancione al centro dei gruppi eme), e ciascuno dei quali porta alla formazione, nel catabolismo dell'emoglobina, di una molecola di bilirubina. Il fatto quindi che 1 molecola di emoglobina contenga 4 molecole di eme, leghi 4 molecole di ossigeno e dia luogo a 4 molecole di bilirubina, risulta invece assolutamente evidente nell'espressione "15 micromoli (μmol) di emoglobina trasportano 60 micromoli di ossigeno, contengono 60 micromoli di ferro e formano 60 micromoli di bilirubina".

Detto questo va precisato che, mentre in numerosi paesi (europei e non) la transizione dall'espressione in termini di massa (o di concentrazione di massa) all'espressione in termini di sostanza (o di concentrazione di sostanza) è praticamente completata, in Italia non è ancora avvenuto nulla. A discolpa di coloro che (come lo scrivente) ritengono tale transizione necessaria stante la sua razionalità scientifica, ma hanno finora evitato di introdurla nei propri laboratori, c'è peraltro il fatto che l'operare in modo non contemporaneo sul territorio nazionale avrebbe sicuramente ingenerato grande confusione. Per questo si attende finalmente per il terzo millennio un'iniziativa a livello nazionale.

Il metodo

Rappresenta un'indicazione importante, in quanto ancora oggi metodi diversi possono fornire risultati differenti, che dovranno peraltro essere valutati in relazione agli intervalli di riferimento specifici del metodo utilizzato, che quindi non devono mai mancare.

Il valore numerico del risultato

Deve essere espresso utilizzando un numero adeguato di cifre significative, secondo quanto esposto in precedenza.

Le unità di misura

Anche le unità di misura con cui sono espressi i risultati devono essere ovviamente quelle previste dal sistema SI, con la raccomandazione aggiuntiva di esprimere le concentrazioni riportando al denominatore il litro (L).Questo può essere fatto in molti casi senza determinare alcun cambiamento nel valore numerico del risultato, se si considera il fatto che, ad esempio, i microgrammi/millilitro (μg/mL) sono numericamente identici ai milligrammi/litro (mg/L), che le milliunità/millilitro (mU/mL) sono numericamente identici alle unità/litro (U/L) e così via.

L'intervallo di riferimento

Come detto in precedenza, a causa del fatto che ancor oggi metodi diversi possono portare a risultati differenti, l'*intervallo di riferimento* rappresenta lo strumento fondamentale per giudicare se un risultato è ancora all'interno dei valori tipici dei soggetti sani.

In alternativa rispetto all'intervallo di riferimento, possono comparire nel referto, in funzione dell'analita che viene determinato, il *valore desiderabile*, o l'*intervallo terapeutico* (nel caso dei farmaci).

Va fatto notare che, in linea teorica, due risultati consecutivi possono essere confrontati tra di loro anche quando ottenuti in laboratori che utilizzando metodi differenti, con differenti intervalli di riferimento, rapportandoli al limite superiore dell'intervallo di riferimento (ci si riferisce qui al caso in cui la patologia determina un aumento di concentrazione). Così, ad esempio, un valore di 60 U/L dell'AST dato un intervallo di riferimento "inferiore a 30" risulterà sovrapponibile a un valore dell'AST di 80 U/L dato un intervallo di riferimento "inferiore a 40". Questo approccio, che avrebbe potuto portare all'uniformazione dell'espressione dei risultati, e alla loro semplificazione, non ha peraltro avuto successo quando, in passato, è stato proposto.

Resta quindi il fatto che, in attesa di una definitiva uniformazione dei metodi (un processo "per consenso" delle Società Scientifiche e dell'industria dei diagnostici sempre lento e spesso difficile), per meglio confrontare tra di loro risultati successivi di uno stesso paziente, nel caso di analiti la cui concentrazione sia fortemente metodo-dipendente, è raccomandata la ripetizione dell'analisi nello stesso laboratorio.

Alcuni segni matematici di largo uso

Si riportano qui di seguito alcuni segni matematici di largo uso, che talvolta vengono impiegati in modo improprio:

Segno	*Significato*
÷	intervallo da… a… (estremi inclusi)
=	uguale a
≡	identico a
≠	diverso da
≈	uguale a circa
∝	proporzionale a
∞	infinito

Capitolo 9
Tecniche analitiche

(L. Mascolo)

Metodi spettrofotometrici 491
Metodi immunochimici 493
Metodi con marcatori radioisotopici 494
Metodi con marcatori non-radioisotopici 495
Metodi cromatografici 499
Cromatografia liquida 500
Gascromatografia 501
Fattori che controllano la separazione cromatografica 501
Elettroforesi 502
Isoelettrofocalizzazione 505
Conteggio degli elementi corpuscolati del sangue 505
Citofluorimetria 507
Principi di analisi del DNA 509

Metodi spettrofotometrici

Questi metodi, e i relativi strumenti (spettrofotometri), devono il loro nome al principio utilizzato, che è rappresentato dalla misura dell'interazione fra materia ed energia radiante, sia legata al fenomeno di eccitazione di atomi di elementi (***spettrofotometria di emissione***), sia legata alla energia luminosa emessa da una sorgente radiante e parzialmente assorbita nella sua interazione con la materia allo stato atomico o molecolare (***spettrofotometria di assorbimento***).

A temperatura ambiente gli elettroni di una molecola sono principalmente allo stato fondamentale e quindi gli spettri in questa zona forniscono dati sullo stato fondamentale e sul livello energetico immediatamente superiore. Poiché i due livelli sono quantizzati, un elettrone non può trovarsi in nessun livello energetico intermedio: si trova al livello fondamentale o al livello eccitato. Perciò se si colpisce una molecola con una radiazione di una particolare lunghezza d'onda λ, per cui i fotoni che la costituiscono forniscono agli elettroni una energia uguale al ΔE della transizione tra i due livelli, si avrà l'assorbimento di un fotone da parte della molecola,

e il passaggio dell'elettrone dal livello fondamentale a quello eccitato. La spettrofotometria si basa sul fatto che il potenziale in una cella fotoelettrica è proporzionale all'intensità della radiazione che arriva alla fotocella stessa. La frazione di radiazione che attraversa un mezzo che assorbe in modo uniforme è chiamata trasmittanza (T)

$$T = I/I_0$$

essendo I_0 l'intensità della radiazione incidente e I l'intensità della radiazione trasmessa. La trasmittanza è espressa in percentuale (0-100%), ma non viene utilizzata.

La quantità di radiazione assorbita, definita assorbanza (A), è pari al logaritmo del reciproco della trasmittanza, cioè

$$A = log\ 1/T$$

L'assorbanza risulta essere direttamente proporzionale a tre grandezze fisiche tra loro indipendenti, secondo la legge

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

nella quale sono rispettivamente:

- ε_λ il coefficiente di estinzione molare della sostanza che assorbe la luce a una data lunghezza d'onda λ;
- c la concentrazione molare della soluzione che assorbe la luce;
- d il cammino ottico della radiazione ε nella soluzione (espresso in centimetri).

Ne risulta che, per una data sostanza in grado di assorbire radiazione, per una data lunghezza d'onda e per un dato cammino ottico, essendo

$$\varepsilon_\lambda \cdot d = k$$

sia ha

$$A = k \cdot c$$

Questa relazione, detta legge di Lambert-Beer, descrive la proporzionalità diretta e lineare che esiste tra concentrazione ed assorbanza.

Schematicamente lo spettrofotometro è formato da una sorgente luminosa, da un monocromatore, da una cella di lettura, dalla cella fotoelettrica (fotomoltiplicatore), dall'amplificatore, da un display per la lettura dei risultati della misura e da un registratore.

La sorgente luminosa è di solito una lampada a tungsteno, per le misure di assorbanza nel visibile, e a idrogeno e deuterio per le misure di assorbanza nell'ultravioletto. I monocromatori sono sistemi ottici in grado di fornire, partendo da una sorgente di radiazione policromatica, un fascio di radiazione monocromatica e parallela. Di solito ciò si ottiene mediante la rifrazione della radiazione con un prisma o la diffrazione con un reticolo. Il raggio di luce in uscita da un monocromatore non ha un'unica lunghezza d'onda, ma è composta da un gruppo di lunghezze d'onda chiamate "ampiezza della fenditura spettrale" o "banda spettrale". Il valore assoluto dell'assorbanza osservata dipende dall'ampiezza della fenditura, sia perché questa determina l'ampiezza della banda spettrale, sia per la diversa sensibilità della fotocella al variare della lunghezza d'onda.

Più è stretta l'ampiezza della fenditura, più è accurata la lettura. L'ampiezza della fenditura in un buono spettrofotometro è regolabile fino ad un minimo di circa un nanometro (nm).

La cella di lettura (cuvetta) accoglie la sostanza in esame sciolta in un opportuno solvente.

Le cuvette comunemente usate per misure accurate hanno un cammino ottico di 1 cm, e il volume di campione necessario per una lettura precisa è di 2,5÷3,0 mL. Microcuvette consentono di effettuare letture anche con volumi di campione dell'ordine delle poche decine di microlitri (μL).

Il fotomoltiplicatore converte i quanti della radiazione in energia elettrica, che può essere poi amplificata, rilevata ed eventualmente registrata.

Le applicazioni della colorimetria e della spettrofotometria di assorbimento nel laboratorio sono molto numerose: questo tipo di tecnica copre almeno il 70% dei volumi di attività.

Metodi immmunochimici

I metodi che utilizzano anticorpi per il riconoscimento specifico di una molecola sono denominati ***metodi immunochimici***.

Metodi con marcatori radioisotopici

Le prime applicazioni dei metodi immunochimici sono state quelle che hanno visto l'impiego del trizio. Attualmente sono utilizzati sia *beta*[1] emittenti (fosforo 32 [^{32}P], trizio [^{3}H]) sia *gamma*[2] emittenti (iodio 125 [^{125}I]). L'energia emessa nei processi di decadimento può essere misurata sotto forma di numero di disintegrazioni per minuto.

I metodi immunochimici che fanno uso di un marcatori radioisotopici sono basati su due tecniche:

➢ reazioni per competizione da Ag;

➢ reazioni per competizione da Ab.

I ***metodi radioimmunologici*** (*Radio-Immuno-Assay*, ***RIA***) prevedono la marcatura di un antigene con un atomo radioattivo. È possibile fare reagire un anticorpo specifico per un determinato antigene [Ab], adeso ad un supporto solido, con il materiale (per esempio il siero) nel quale si vuole misurare la concentrazione dell'antigene da esso specificamente riconosciuto [Ag(nel siero)], e con l'antigene marcato [Ag*(marcato)], secondo la seguente reazione

$$2[Ag^{*}(marcato)] + [Ag(nel\ siero)] + 2[Ab] \rightarrow [Ag^{*}(marcato)\text{-}Ab] + [Ag(nel\ siero)\text{-}Ab] + [Ag^{*}(marcato)]$$

Separando successivamente dall'antigene marcato rimasto libero i complessi antigene-anticorpo che si sono formati, la radioattività di questi ultimi risulta essere inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in esame.

Reciprocamente i ***metodi immunoradiometrici*** (*Immuno-RadioMetric-Assay*, ***IRMA***) prevedono la marcatura dell'anticorpo con un atomo radioattivo. Nei metodi IRMA di tipo "sandwich", l'antigene presente nel campione viene catturato da un anticorpo adeso ad un supporto solido, e reagisce successivamente con l'anticorpo radiomarcato aggiunto. Si fa reagire un anticorpo marcato specifico per un determinato antigene [Ab*(marcato)] in una soluzione contenente sia il materiale (per esempio il siero) nel quale si vuole misurare la concentrazione dell'antigene da esso specificamente riconosciuto [Ag], sia un anticorpo non marcato immobilizzato su una fase solida [Ab], secondo la seguente reazione

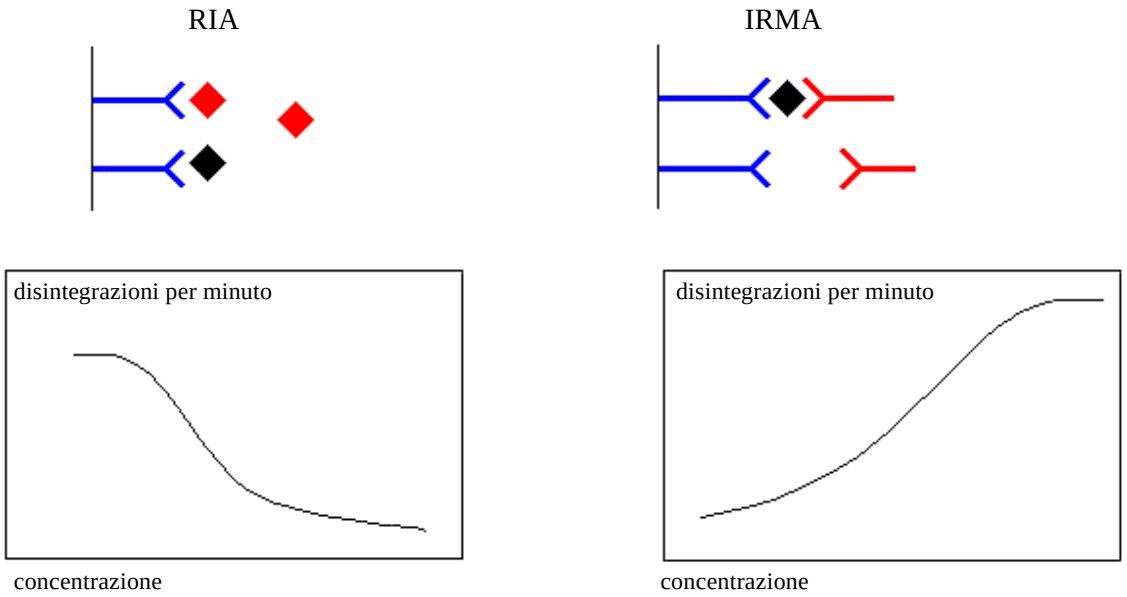
$$2[Ab] + 2[Ab^{*}(marcato)] + [Ag(nel\ siero)] \rightarrow [Ab\text{-}Ag(nel\ siero)\text{-}Ab^{*}marcato)] + [Ab] + [Ab^{*}marcato)]$$

[1] *Nel decadimento beta viene emesso un elettrone.*

[2] *Nel decadimento gamma viene emesso un raggio* γ.

Eliminando mediante lavaggio l'anticorpo marcato rimasto libero, i complessi antigene-anticorpo che si sono formati presenteranno una radioattività direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione. I vantaggi dei metodi IRMA rispetto ai RIA-consistono in una cinetica di reazione più veloce, maggiore semplicità operativa, un più ampio intervallo di concentrazione, una maggiore sensibilità, una maggiore specificità (specialmente con la tecnica a "due siti").

Le reazioni sopra illustrate sono schematicamente qui riassunte:



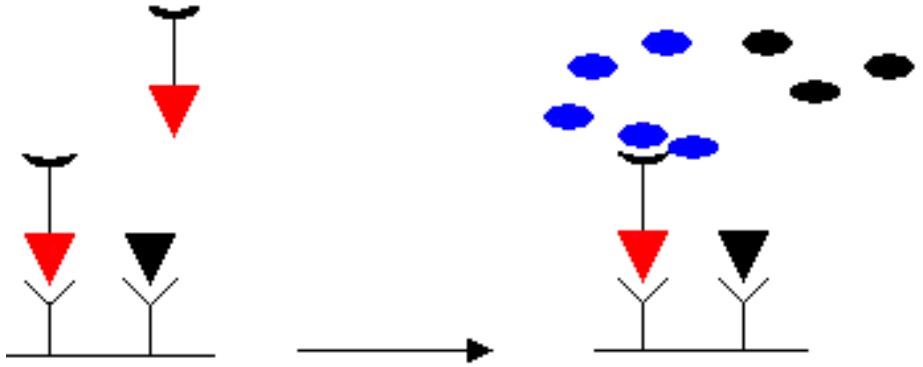
Metodi con marcatori non-radioisotopici

Tra i metodi immunochimici che fanno uso di marcatori non radioisotopici i più diffusi sono i ***metodi immunoenzimatici***, che impiegano come marcatore un enzima. Gli enzimi presentano almeno due vantaggi rispetto ad altri tipi di marcatori, vantaggi che hanno favorito la loro diffusione in immunochimica: sono disponibili in forma pura, e presentano una stabilità superiore rispetto a quella dei radioisotopi. Le principali tecniche sono riassunte nella seguente tabella:

Tecniche senza separazione	*Tecniche con separazione*
EMIT (enziyme multiplied immunoassay technique)	ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay)
IEIA (inhibition enzyme immunoassay)	IEMA (immunoenzymatic assay)
Enzyme channeling EIA	

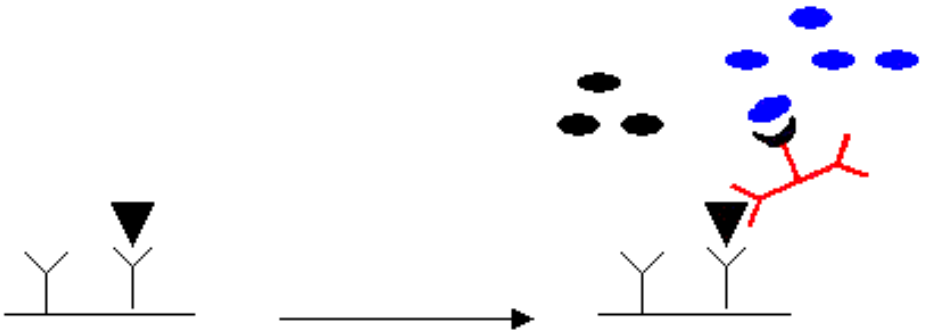
Le ***tecniche ELISA*** sono certamente le più diffuse, e utilizzano anticorpi o antigeni legati a un enzima facilmente dosabile e dotato di una elevata attività. Hanno ormai quasi completamente soppiantato i metodi RIA, essendo meno costosi, e soprattutto non presentando i rischi della radioattività, fatto che ne ha favorito la diffusione anche nei piccoli laboratori sprovvisti di contatore, e l'automazione.

Nelle ***tecniche di tipo competitivo*** per il dosaggio di antigeni si fa reagire con uno specifico anticorpo legato a una fase solida, una quantità nota di antigene marcato con l'enzima (semiluna nera attaccata alla coda dell'anticorpo), e il materiale (per esempio il siero) nel quale si vuole misurare la concentrazione dell'antigene (triangolo nero) specificamente riconosciuto dall'anticorpo utilizzato. Successivamente, dopo avere eliminato l'antigene rimasto libero mediante un semplice lavaggio, si aggiunge il substrato dell'enzima (ovali neri) e si misura l'attività enzimatica. Lo schema, sovrapponibile a quello dei metori RIA, è qui illustrato: in blu le molecole di substrato dell'enzima trasformate. Si può notare che, per ogni molecola di enzima, numerose molecole di substrato possono essere trasformate dall'azione catalitica dell'enzima in molecole colorate (in colore blu): è questo il meccanismo che porta all'amplificazione del segnale, che risulta inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene.



Nelle ***tecniche con doppio anticorpo***, l'antigene, legato mediante un epitopo ad un anticorpo specifico opportunamente immobilizzato su una fase solida, viene fatto reagire con un se-

condo anticorpo, diretto contro un epitopo diverso dello stesso antigene. Questo secondo anticorpo (in colore rosso), marcato con un enzima (semiluna nera), consente di amplificare il segnale, che risulta questa volta direttamente proporzianale alla concentrazione dell'antigene.



Nel settore della *sierologia infettiva*, per determinare la ***concentrazione degli anticorpi nel siero*** (per esempio anticorpi anti-rosolia, anti-toxoplasma, anti-citomegalovirus, eccetera) viene utilizzata la tecnica con doppio anticorpo. In questi casi, l'anticorpo del quale si vuole misurare la concentrazione viene trattato, e si comporta, come un qualsiasi altro antigene.

Le ***tecniche con streptavidina-biotina*** prevedono di marcare l'anticorpo con biotina (vitamina H). La successiva aggiunta di una molecola che ha elevatissima affinità per la biotina, cioè la streptavidina[3], a sua volta marcata con un enzima o con un altro tracciante non radioisotopico, consente di amplificare opportunamente il segnale.

Altre tecniche importanti e molto utilizzate sono le ***tecniche in fluorescenza***, che impiegano i traccianti e i principi qui riassunti:

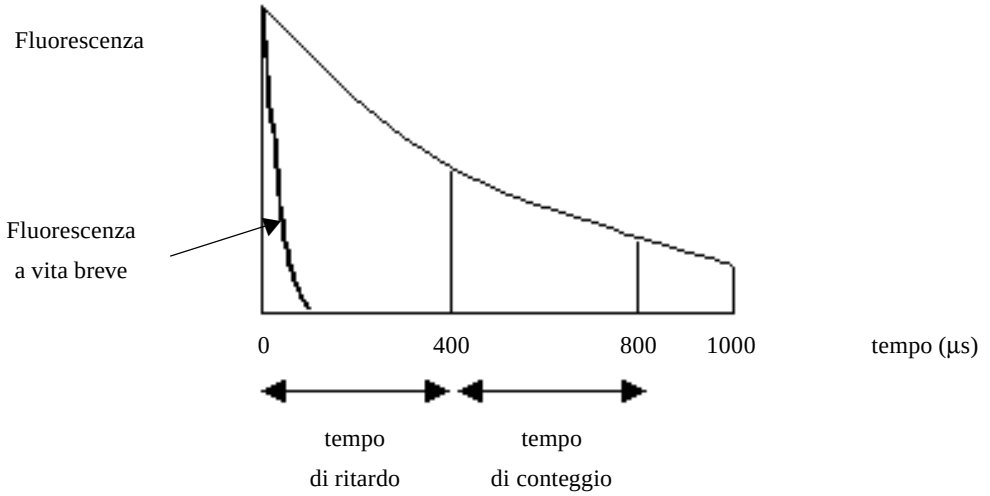
Traccianti	Fluorescina
	Metilumbelliferone
	Chelati di lantanidi
Principio	*Metodi con separazione*: ➢ idrolisi anticorpo-dipendente ➢ polarizzazione della fluorescenza ➢ estinzione della fluorescenza ➢ amplificazione della fluorescenza ➢ substrate linked fluorescent immunoassay (SLFIA)
	Metodi senza separazione: ➢ metodi con reagenti in eccesso (IFMA) ➢ saggi per competizione di anticorpi marcati

[3] *L'avidina è una molecola glicosilata isolata dal bianco dell'uovo. La streptavidina è isolata dallo Streptomyces avidinii. Entrambe le molecole hanno una elevatissima affinità per la biotina.*

Il vantaggio di impiegate un tracciante fluorescente è conseguente al limite di rivelazione (la più bassa quantità di antigene rilevabile) di gran lunga migliore rispetto a quello dei metodi immunoenzimatici: nel caso dell'isotiocianato di fluorescina, il limite di rilevazione arriva al livello delle picomoli per litro (10^{-12}/L).

La ***tecnica FIA*** (*Fluorescent-Immuno-Assay*), si differenzia dalle tecniche immunoenzimatiche solamente per il fatto di utilizzare come tracciante una molecola fluorescente al posto di un enzima.

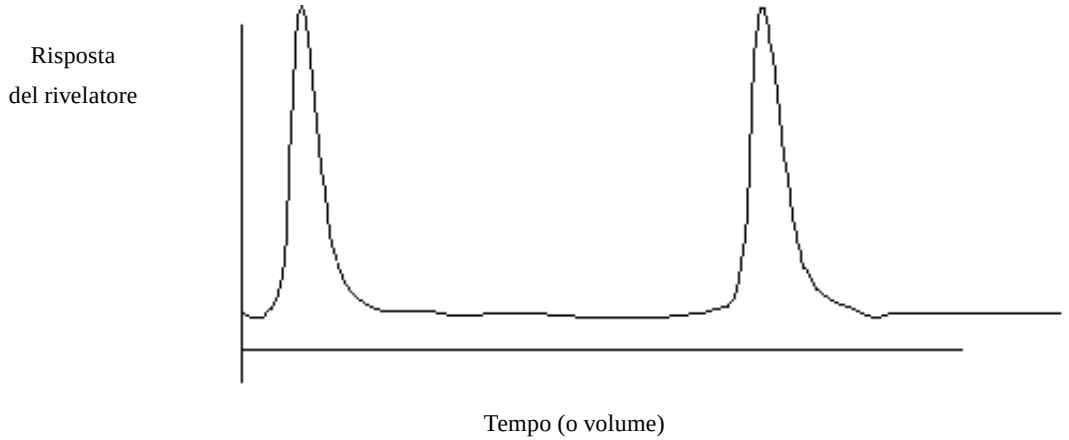
Per la ***tecnica DELFIA*** (*Delayed-Enhanced-Lanthanide-Fluorescent-ImmunoAssay*) di solito si impiega un anticorpo marcato con un chelato dell'*europio*, un metallo della serie dei lantanidi. La debole fluorescenza del chelato contenente europio può essere aumentata fino a 10^6 volte per aggiunta di una soluzione intensificante (*enhancer*) che rilascia l'europio per chelarlo di nuovo in micelle che lo proteggono dagli effetti smorzaanti (*quenching*) delle molecole d'acqua. Dopo eccitamento la fluorescenza dei chelati ai lantanidi diminuisce con un tempo di decadimento molto lungo (da 10 a 1000 μs).



La tecnica è di tipo "sandwich", sostanzialmente analoga a quella ELISA del doppio anticorpo, tranne per il fatto che si utilizza un eccesso del secondo anticorpo marcato con europio al posto del complesso enzima-anticorpo, e un enchancer al posto del substrato enzimatico. La fluorescenza prodotta è direttamente proporzionale alla quantità di antigene specifico presente nel materiale di partenza.

Metodi cromatografici

Nei metodi cromatografici la separazione avviene per una specifica distribuzione di ciascun composto tra due fasi tra loro immiscibili: una fase fissa (fase stazionaria) ed una fase mobile che fluisce attraverso gli interstizi o sulla superficie della fase stazionaria. Ogni composto, a parità di condizioni, interagisce in modo diverso con l'ambiente circostante e ciò determina una migrazione differenziale delle sostanze (eluizione). All'uscita del sistema cromatografico si può porre un sistema rivelatore (ad esempio uno spettrofotometro). Riportando in un grafico il segnale registrato all'uscita della colonna (es. l'assorbanza) in funzione del tempo di eluizione si ottiene un diagramma (chiamato cromatogramma) del tipo di quello riportato in figura.



In tutte le tecniche cromatografiche la separazione dei soluti è dovuta alla combinazione di due effetti:

- distribuzione del soluto fra fase fissa e fase mobile;
- effetto di trascinamento da parte della fase mobile.

La ***classificazione dei metodi cromatografici*** è fatta in base alle caratteristiche della fase stazionaria e della fase mobile. La fase stazionaria può essere disposta in una colonna oppure su strato sottile (Thin Layer Chromatography, TLC). Essa può essere solida o liquida. Se liquida viene distribuita su supporto inerte di adatta granulometria o su carta. La fase mobile, invece, può essere liquida o gassosa. A seconda delle combinazioni fra i vari tipi di fase mobile le diverse tecniche cromatografiche possono essere classificate come qui illustrato.

Cromatografia liquida (LC)	*Gascromatografia (GC)*
Di ripartizione (Liquido-Liquido, LLC): ➢ su carta ➢ su colonna ➢ su strato sottile (TLC) ➢ ad alte prestazioni (HPLC)	Di ripartizione (Gas-Liquido, GLC)
Di assorbimento (Liquido-Solido, LSC): ➢ su colonna ➢ su strato sottile (TLC) ➢ ad alte prestazioni (HPLC)	Di assorbimento (Gas-Solido, GSC)
A scambio ionico (Ion Exchange, IEC)	
Mediante gel filtrazione: ➢ size exclusion (SEC) ➢ gel permeation (GPC)	

Cromatografia liquida

Nella *cromatografia liquida* la fase mobile è un liquido. A seconda della fase stazionaria esistono quattro processi distinti per la separazione dei soluti.

Nella ***cromatografia di ripartizione liquido-liquido*** la fase stazionaria è un liquido (immiscibile con la fase mobile) che impregna un supporto solido inerte. La cromatografia su carta può essere considerata una cromatografia di ripartizione in quanto la cellulosa contiene sempre una certa quantità di acqua. La cellulosa esplica semplicemente il compito di supporto inerte. Le cromatografie di ripartizione possono essere eseguite su colonna o su strato sottile (TLC). Entrambi i tipi di cromatografia sono a loro volta suddivisi in cromatografia a fase diretta o a fase inversa. Si intende fase diretta il caso in cui la fase mobile è di natura apolare e la fase fissa più polare; invece a fase inversa la cromatografia in cui la fase mobile è più polare della fase fissa.

Nella ***cromatografia di assorbimento liquido-solido*** la fase stazionaria è un materiale solido costituito da particelle con grande area superficiale: in questo caso il solido non è semplicemente un supporto inerte, ma è in grado di assorbire superficialmente i soluti. Esiste in questo caso un assorbimento differenziale dei vari soluti. Si utilizzano materiale tipo allumina o silice attivata.

Nella ***cromatografia a scambio ionico*** la fase stazionaria è formata da un supporto organico con gruppi ionici e ionizzabili legati ad essa (ad esempio $-SO_3^-$). I gruppi ionici della resina trattengono per mezzo di interazioni elettrostatiche ioni di carica opposta che possono essere scambiati con gli ioni presenti nella fase mobile. Il meccanismo di separazione è basato sulla diversa affinità che i diversi ioni presentano per i gruppi ionici della resina.

Nella ***cromatografia ad esclusione sterica*** (gel-filtrazione) la fase stazionaria è costituita da materiale poroso avente pori delle dimensioni delle molecole da separare. Le grosse molecole sono escluse, mentre le più piccole possono penetrare nella maggior parte dei pori. Così le grandi molecole si muovono velocemente attraverso la colonna mentre le piccole sono trattenute dalla fase stazionaria. È utilizzata principalmente per separare macromolecole.

Gascromatografia

Nella gascromatografia la fase mobile è un gas e la fase stazionaria può essere un liquido o un solido.

Nella ***cromatografia gas-solido*** la fase stazionaria è un solido attivo capace di adsorbire i soluti presenti nella fase gassosa; il meccanismo di separazione è quindi dovuto all'assorbimento selettivo dei soluti.

Nella ***cromatografia gas-liquido*** la fase stazionaria è liquida e il meccanismo di separazione è dovuto alla ripartizione dei soluti fra la fase gassosa, che funziona semplicemente da fase di diluizione e trascinamento, e la fase liquida stazionaria.

I composti analizzati in GC devono essere volatilizzati, e quindi le temperature di esercizio sono elevate. La fase stazionaria è composta da un liquido altobollente (poco volatile). Attualmente le fasi più utilizzate sono oli o gomme di silicone. Vi sono due tipi di colonne per GLC:

- *colonne impaccate*, nelle quali la fase stazionaria liquida è depositata su un supporto inerte ad adatta granulomentria, che viene poi impaccato all'interno della colonna;
- *colonne capillari*, costituite da un tubo capillare di silice, acciaio, o vetro sulle cui pareti interne viene fatta aderire la fase stazionaria.

Fattori che controllano la separazione cromatografica

Diversi fattori controllano la separazione. Ogni processo cromatografico è caratterizzato principalmente da:

- migrazione differenziale lungo la colonna dei vari componenti contenuti nel campione;
- allargamento della banda del soluto lungo la colonna;
- parametri del picco cromatografico;
- parametri, efficienza e selettività di una colonna.

In un sistema cromatografico la differente velocità di migrazione dei componenti la miscela determina la loro separazione. Questa migrazione è il risultato dell'equilibrio di distribuzione dei diversi componenti fra la fase stazionaria e la fase mobile: tanto più le molecole restano nella fase mobile, tanto più rapidamente sono eluite.

La separazione è legata al concetto di ***selettività*** di una colonna: una colonna è tanto più selettiva nei confronti di due soluti quanto maggiore è la loro migrazione differenziale, ovvero quanto maggiore è la differenza di energia con cui i due soluti vengono trattenuti dalla colonna.

Una seconda caratteristica della separazione cromatografica è la dispersione delle molecole del componente lungo la colonna. Le molecole di soluto sono raccolte in una banda sottile all'inizio della colonna, ma quanto più si muovono al suo interno, tanto più la banda si allarga. Ciò può essere espresso mediante la larghezza del picco alla sua base W cioè la distanza tra i due punti di flesso della curva, o con la larghezza a metà altezza del picco $W_{½}$, cioè la larghezza del picco al 50% dell'altezza totale del picco.

Il ritardo con cui il soluto esce dalla colonna rispetto all'eluente è chiamato ***tempo (o volume) di ritenzione***. Al volume di ritenzione va apportata una correzione, perché l'eluente non è uscito dalla colonna subito dopo l'introduzione della soluzione, ma dopo un certo tempo, detto tempo morto (t_0), evidenziato da un picco, il picco del fronte del solvente. Infatti, prima di uscire, il solvente non trattenuto dall'adsorbente, ha dovuto riempire lo spazio morto tra gli interstizi della fase stazionaria. Tale spazio è denominato volume morto (V_0). Viene indicato con t_r' il tempo di ritenzione relativo, cioè la differenza tra il tempo di ritenzione della sostanza ed il fronte del solvente.

L'*identificazione qualitativa* di un componente viene effettuata misurando il suo tempo di ritenzione, specifico per ogni sostanza, in quanto risulta costante e non varia, né in funzione della concentrazione né in funzione della composizione qualitativa della miscela. Questo metodo di identificazione è abbastanza attendibile anche se non ci dà la sicurezza del riconoscimento della sostanza.

La *determinazione quantitativa* invece è l'applicazione più importante delle tecniche cromatografiche. Si basa sul principio che l'area del picco di eluizione risulta direttamente proporzionale alla sua concentrazione.

Elettroforesi

Con il termine "elettroforesi" si definisce la migrazione attraverso un mezzo fluido, e sotto l'influenza di un campo elettrico, di particelle dotate di cariche elettriche (ioni o polielettroliti macromolecolari).

L'elettroforesi è una tecnica separativa basata sulla diversa densità delle cariche superficiali delle molecole. Le principali molecole separabili con l'elettroforesi sono: aminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, acidi nucleici. Queste molecole possono esistere in soluzione come specie elettricamente cariche, sia come cationi (+) sia come anioni (-).

L'elettroforesi trova la sua principale applicazione nello studio qualitativo e quantitativo di proteine semplici o coniugate. Le proteine sono anfoliti, cioè polielettroliti anfoteri. La ionizzazione del gruppo carbossile dà luogo alla formazione di cariche negative, mentre l'assunzione di protoni sul gruppo amminico determina la presenza di cariche positive. L'intensità della ionizzazione dipende dal pH del mezzo in cui si trova disciolta la proteina.

L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta da un alimentatore e da una cella elettroforetica. L'alimentatore fornisce il flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica: i cationi migrano verso il catodo (-) e gli anioni verso l'anodo (+) ad una velocità che dipende dall'equilibrio tra la forza di spinta del campo elettrico e le forze frenanti.

I principali fattori che influenzano la migrazione delle molecole sono:

- ***il campo elettrico***. Quando tra due elettrodi viene applicata una differenza di potenziale elettrico, si genera una corrente, la cui intensità dipende dalla resistenza del mezzo ed è proporzionale al voltaggio applicato. In soluzione la corrente è condotta tra gli elettrodi principalmente dagli ioni del tampone e, in piccola misura, dagli ioni del campione. Un aumento del voltaggio pertanto provoca un aumento della carica complessiva trasportata sull'elettrodo. L'entità della migrazione degli ioni risulterà proporzionale sia alla corrente sia al tempo. La legge di Ohm stabilisce la relazione $V/I = R$ tra corrente I, voltaggio V e resistenza R. La corrente, e quindi la velocità di migrazione, sono così inversamente proporzionali alla resistenza che, a sua volta, dipende dal mezzo di supporto, dal tipo di tampone e dalla sua concentrazione;
- ***la natura dei campioni***, che influisce sulla loro separazione. La velocità di migrazione aumenta all'aumentare del peso molecolare e questo perché aumentano le forze frizionali ed elettrostatiche rispetto al mezzo circostante;
- ***il tampone***, che determina e stabilizza il pH del mezzo di supporto e influenza anche la velocità di migrazione dei componenti del campione. Normalmente vengono utilizzati tamponi basici con pH vicino a 9 per far sì che tutte le proteine assumano una carica negativa e quindi abbiano migrazione anodica. Quelli di uso comune sono il formiato, l'acetato, il citrato, il tris-glicina salicilato. Il tampone non deve legarsi ai composti da separare, perché ne altererebbe la velocità di migrazione;
- ***il supporto utilizzato***, che può essere costituito da materiale inerte, permeabile alle sostanze da seprare e non deve interferire nelle reazioni di riconoscimento delle sostanze in esame. Tra i supporti più comunemente usati sono da ricordare: l'acetato di cellulosa, i gel di amido, di agarosio o di policrilamide. La struttura porosa del gel fa da setaccio molecolare in modo che il frazionamento delle proteine sia basato non solo sulla differenza di carica elettrica ma anche sulla dimensione molecolare.

Il grado di separazione tra le varie molecole è determinato da tre variabili principali:

- ***la carica elettrica netta*** della molecola (cioè la somma algebrica del numero di cariche positive e del numero di cariche negative della molecola);
- ***il punto isoelettrico*** della molecola (il valore di pH al quale il numero delle cariche positive è uguale al numero delle cariche negative, ossia il valore di pH al quale la molecola risulta elettricamente neutra);
- ***la massa*** della molecola (peso molecolare).

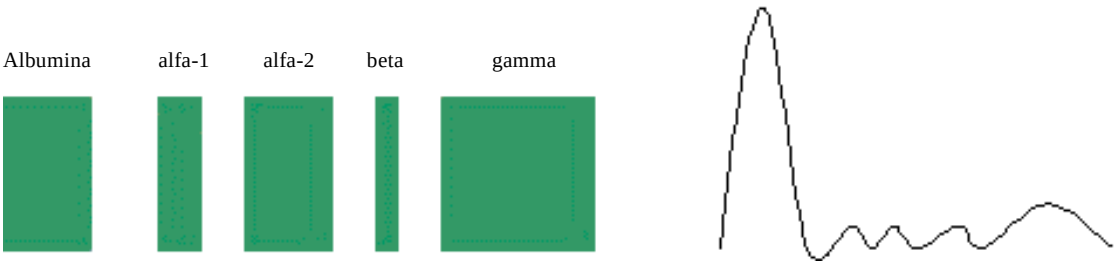
Queste variabili determinano le caratteristiche delle tre principali famiglie di elettroforesi:

- ***elettroforesi zonale***, in cui la separazione avviene principalmente in base alla carica elettrica;
- ***isoelettrofocalizzazione***, in cui il gradiente di potenziale e il gradiente di pH determinano la separazione in base al punto isoelettrico;
- ***elettroforesi in gel di poliacrilammide*** (PAGE) ***con sodio-dodecilsolfato*** (SDS), in cui l'annullamento delle differenze di carica accoppiato ad un gradiente di porosità permette la separazione in base al peso molecolare.

Esistono inoltre delle tecniche miste, come l'elettroforesi bidimensionale in cui si accoppia la SDS-PAGE alla isoelettrofocalizzazione, o le tecniche in cui l'aggiunta di un ligando (anticorpi o lectine) al supporto permette una separazione basata sulla presenza di strutture particolari.

Una volta ottenuta la separazione elettroforetica, le frazioni possono essere evidenziate con opportuni coloranti per le proteine (rosso Ponceau, blu di Coomassie, nigrosina o altro).

Nel caso dell'elettroforesi delle proteine del siero, un'analisi richiesta con grande frequenza, dopo la colorazione viene eseguita una lettura strumentale per mezzo di un densitometro con produzione di un grafico che riflette in realtà prevalentemente l'affinità delle singole proteine per il colorante usato. Le proteine che si possono rilevare visivamente all'ispezione della striscia elettroforetica in laboratorio sono otto (la *prealbumina*, l'*albumina*, l'*alfa-1-antitripsina*, l'*alfa-2-macroglobulina*, l'*aptoglobina*, la *transferrina*, il *complemento* (C3) e le *immunoglobuline*), mentre il tracciato densitometrico risulta risolto solamente in cinque frazioni (*albumina*, *alfa-1-globuline*, *alfa-2-globuline*, *beta-globuline* e *gamma-globuline*).



In passato l'elettroforesi delle sieroproteine era utilizzata come test genericamente informativo dello stato nutrizionale (rapporto albumina/globuline), di situazioni di flogosi (aumento delle alfa-globuline) e di epatopatie (impastamento delle beta-globuline con le gamma-globuline). Come noto queste situazioni possono oggi essere meglio caratterizzate con test specifici, per cui esiste ormai un accordo pressoché unanime sul fatto che l'elettroforesi debba essere utilizzata oggi solamente come test di screening per la rilevazione di componenti monoclonali (da confermare e tipizzare successivamente mediante immunofissazione), e come metodo per la quantificazione in grammi delle componenti monoclonali di significativa entità (da 0,5 g/dL in su).

Isoelettrofocalizzazione

Come detto, composti anfoteri, ad esempio aminoacidi e peptidi, possono essere separati in un campo elettrico lungo il quale vi è un gradiente sia di potenziale sia di pH. La regione anodica è più avida di quella catodica e il gradiente di pH tra i due elettrodi è mantenuto stabile. Gli estremi di pH sono scelti in modo da comprendere il punto isolettrico di tutti i componenti da separare. I composti che, all'inizio della corsa, si trovano in una zona di pH inferiore al proprio punto isoelettrico sono carichi positivamente e migrano verso il catodo. Tuttavia, man mano che si avvicinano al catodo, il pH aumenta, finché non corrisponde esattamente al loro punto isolettrico. In queste condizioni i composti sono sotto forma di ione dipolare, privo di carica netta, e quindi si arrestano. Analogamente succede per i composti che all'inizio si trovano in zone di pH superiori al loro punto isolettrico: essi sono carichi negativamente e migrano verso l'anodo finché non raggiungono una zona a pH corrispondente al loro punto isoelettrico, nella quale si arrestano. Il risultato finale è che i composti anfoteri vengono "focalizzati" in sottili bande stazionarie. Le separazioni sono condotte o su colonna verticale o su lastra orizzontale di gel, utilizzando in entrambi i casi un'apposita apparecchiatura.

Questa tecnica ha un enorme potere risolutivo ed è impegnata in particolare nella separazione di isoenzimi. L'elevata sensibilità fa sì che questa tecnica sia ormai diffusissima, nonostante i costi elevati, e sia ampiamente utilizzata nei laboratori clinici, di genetica umana, di medicina legale e nelle industrie alimentari.

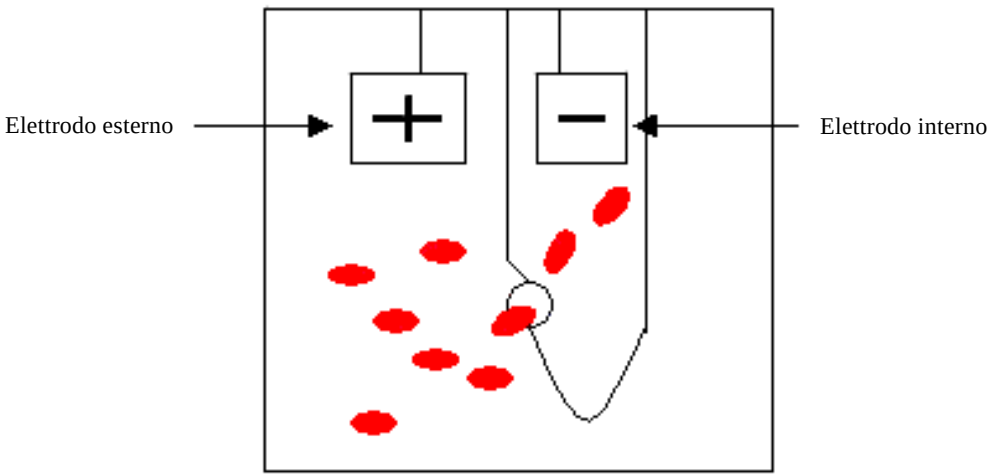
Conteggio degli elementi corpuscolati del sangue

L'esame emocromocitometrico è una delle analisi richieste al laboratorio con maggiore frequenza: un'analisi indispensabile, da effettuare in prima istanza, per verificare un eventuale danno ematologico primitivo o secondario, che comprende:

- la determinazione della concentrazione dell'emoglobina;
- la determinazione del numero degli elementi figurati del sangue (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine);
- l'analisi morfologica degli elementi figurati del sangue.

La determinazione dell'emoglobina è oggi associata al conteggio degli elementi corpuscolati del sangue all'interno di analizzatori dedicati, denominati genericamente "contaglobuli". Tali strumenti constano di un campionatore, che preleva dalle provette la quantità di sangue necessaria per la determinazione, e di una particolare e complessa fluidica, che la distribuisce in aliquote ai diversi moduli dello strumento. In un modulo viene provocata la lisi delle emazie, l'emoglobina viene trasformata nel corrispondente cianoderivato, e viene effettuata la determinazione spettrofotometrica dell'emoglobina. In altri moduli sono effettuati i conteggi degli elementi corpuscolati (eritrociti e leucociti).

I principi su cui si basa il conteggio degli elementi corpuscolati sono differenti (impedenza, diffusione e diffrazione della luce) a seconda dello strumento impiegato. Viene qui illustrato il più diffuso, basato sull'aumento di impedenza elettrica che le cellule ematiche, povere conduttrici di elettricità, generano nel passaggio attraverso una piccola apertura (foro calibrato bagnato di soluzione isotonica) in un campo elettrico. L'ampiezza dell'impulso è proporzionale alle dimensioni (volume) della cellula.



Dalla concentrazione dell'emoglobina e dal volume medio degli eritrociti si ricavano l'ematocrito e gli indici eritrocitari MCV (volume globulare medio), MCH (emoglobina corpuscolare media), e MCHC (concentrazione emoglobinica corpuscolare media).

Negli strumenti moderni il segnale elettrico viene elaborato statisticamente, con generazione di un istogramma di frequenza. Si ottengono in tal modo le curve di distribuzione cellulare per eritrociti, piastrine e leucociti, in rapporto alla loro grandezza.

Per quanto riguarda il conteggio dei leucociti devono essere tenute presenti quelle situazioni, relativamente comuni, in diverse emopatie, in cui compaiono in circolo eritroblasti a diverso stadio maturativo. Queste cellule sono contate dai comuni contaglobuli insieme ai globuli bianchi, in quanto non vengono lisati, come avviene normalmente per i globuli rossi. Questa contaminazione eritroblastica ha poca importanza in caso di modesto numero di eritroblasti circolanti, ma deve essere opportunamente considerata qualora il loro numero sia elevato, al fine di correggere il conteggio dei leucociti.

Per quanto riguarda il conteggio delle piastrine, è possibile che in soggetti normali si ottenga un valore di piastrine nettamente deficitario per la formazione di aggregati a seguito dell'impiego di EDTA come anticoagulante. La possibilità di questa "pseudo-piastrinopenia" deve essere sempre tenuta presente quando il conteggio con un contaglobuli fornisca un numero ridotto di piastrine in un contesto clinico normale.

Infine, sulla base delle curve di distribuzione emoglobinica, è possibile la valutazione automatizzata del grado di anisocromia, ipocromia o ipercromia.

Citofluorimetria

La citofluorimetria a flusso consente la misurazione delle caratteristiche fisiche e chimiche di microrganismi, organuli cellulari, cellule vive o fissate, linee cellulari e aggregati cellulari.

Il principio su cui si fonda l'analisi è quello della focalizzazione idrodinamica di particelle: nella cella di misura di un citometro a flusso, si realizza un flusso laminare concentrico di liquidi in cui il più esterno (liquido di trascinamento) trasporta all'interno una sottile vena fluida di campione. In questo modo le cellule sono forzate ad allinearsi e ad attraversare una per volta un volume piccolissimo attraversato dal fascio di luce del sistema d'eccitazione.

Da questa interazione vengono generati dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche della cellula (diametro, volume, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di superficie) e dalla presenza di molecole fluorescenti (legate ad anticorpi in grado di riconoscere specifici antigeni sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo della cellula). I segnali emessi vengono raccolti da un sistema di lenti, specchi semitrasparenti e filtri ottici ed inviati ai relativi sensori (fotodiodi o fotomoltiplicatori) che ne misurano l'ampiezza. I segnali vengono digitalizzati ed inviati ad un analizzatore-elaboratore che provvede all'analisi dei dati.

Un citofluorimetro è essenzialmente costituito da:

➢ un sistema fluidico per il trasporto del campione e la sua focalizzaione idrodinamica;

- un sistema di eccitazione (lampada o laser);
- un sistema di rilevazione;
- un sistema elettronico per acquisizione, elaborazione e stampa dei dati.

Nel ***sistema fluidico*** la sospensione cellulare viene spinta con gas o con pressione verso il punto di misura, attraverso una camera di flusso nella quale avvengono la diluizione e l'allineamento in singola fila delle cellule (focalizzazione idrodinamca). Nello strumento circola una soluzione salina isotonica che inguaina laminarmente la sospensione cellulare mantenendola allineata al centro della camera di flusso. La pressione di spinta e la progressiva diluizione del campione determinano una velocità di conta più o meno costante che può essere regolata tra 200 e 2000 cellule.

Il ***sistema di eccitazione*** può essere di due tipi:

- *laser* di vario tipo o potenza in grado di fornire luce monocromatica e coerente anche di notevole intensità, specialmente in determinate regione spettrali nel visibile:
- *lampade a vapori di mercurio* o *lampade allo Xeno*, che permettono la selezione di un gran numero di lunghezze d'onda (da 354 nm all'infrarosso).

Filtri ottici consentono di selezionare, convogliare, distribuire le lunghezze d'onda desiderate ed eliminare quelle indesiderate. L'interazione del fascio di luce con la cellula dà luogo a tre fenomeni:

- *light scattering* (comprende i fenomeni di riflessione, rifrazione e diffrazione della luce). Se si osserva una cellula in controluce, si misura un segnale legato soprattutto alla diffrazione (scatter) che è funzione del diametro cellulare (forward scatter o a piccolo angolo). Se ci si pone ortogonalmente al fascio, si misura un segnale invece legato per lo più alla riflessione ed alla rifrazione che sono funzioni della granularità del rapporto nucleo/citoplasma e della rugosità delle superfici (side scatter o ad ampio angolo);
- *assorbimento* (non è strettamente quantitativo, essendo il fascio di luce incidente sulla cellula più grande di questa. Si ricava un valore di assorbimento approssimato, misurando la diminuzione di intensità del raggio dopo che questo ha attraversato la cellula);
- *fluorescenza*[4] (le cellule sono trattate con procedimenti citochimici allo scopo di marcare con opportuni fluorocromi[5] i componenti cellulari da determinare quantitativamente). Quando nel punto di misura la cellula interseca il raggio di eccitazione, il fluorocromo viene eccitato e riemette luce di lunghezza d'onda e di frequenza caratteristiche.

---

[4] *È il fenomeno per cui una molecola colpita da una radiazione luminosa ad una data lunghezza d'onda ne emette un'altra a lunghezza d'onda superiore. La fluorescenza è un fenomeno rapido.*

[5] *Fluorocromi: molecole che emettono una fluorescenza quantificabile se opportunatamente eccitati. Essi sono legati alla superficie, al citoplasma o al nucleo cellulare. Principali fluorocromi adatti per applicazioni in CFM: fluorescina (488 nm), ficoeritrina (488 nm), duo-chrome (488 nm), rodamina (514 nm).*

Il ***sistema di rivelazione*** è costituito dai fotomoltiplicatori che hanno la funzione di trasformare l'intensità ottica (ad esempio della fluorescenza) in intensità di corrente elettrica, oltre che amplificare questo segnale.

Il sistema elettronico provvede a trasformare i segnali provenienti dai sensori (impulsi analogici), che sono inviati ad un convertitore analogico digitale che converte l'altezza del picco in un segnale digitale elaborabile mediante un computer.

Principi di analisi del DNA

Lo sviluppo di tecniche di analisi e di manipolazione del DNA dotate di elevata sensibilità ha aperto nuove prospettive in medicina.

Analisi del DNA mediante sequenziamento diretto

Sono stati messi a punto metodi diversi per la determinazione della sequenza nucleotidica del DNA, rispettivamente da A. Maxam e W. Gilbert e da F. Sanger (premi Nobel nel 1980 per questo contributo). Il metodo di sequenziamento del DNA maggiormente in uso è quello di Sanger, che si basa sull'uso di didesossinucleotidi. Questi didesossinucleotidi, sono privi di un gruppo OH in posizione 3', indispensabile per la formazione del legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. L'incorporazione di un didesossinucleotide durante la sintesi di DNA, al posto di un normale desossinucleotide, determina pertanto la terminazione della sintesi della catena di DNA, da cui il nome di determinazione della sequenza nucleotidica tramite terminazione della catena, dato a questo metodo. La sequenza nucleotidica può essere determinata a partire da un frammento di DNA clonato in un vettore plasmidico[6] o amplificato mediante PCR da qualunque fonte di DNA. Vengono allestite 4 miscele di reazione, ciascuna contenente, ol-

[6] *Un vettore di clonaggio è una molecola di DNA nella quale si può inserire in una posizione nota un gene o un frammento di DNA esogeno, in grado di replicarsi autonomamente in una cellula ospite. Per clonare frammenti di DNA vengono usati diversi tipi di vettori. La scelta dipende dalle dimensione dei frammenti di DNA da clonare. I principali vettori di clonaggio sono:*

- plasmidi, *molecole circolari di DNA che contengono un'origine della replicazione che consente la loro autonoma replicazione nella cellula batterica ospite, dei siti unici di restrizione in corrispondenza dei quali viene inserito il DNA esogeno e un marcatore per distinguerlo dalle cellule che non lo contengono. I plasmidi vengono introdotti nella cellula batterica mediante trasformazione;*
- batteriofagi*: il batteriofago λ presenta un DNA lineare alle cui estremità si trovano brevi sequenza a singolo filamento, dette* cos, *tra loro complementari. Il DNA dei batteriofagi viene iniettato nella cellula batterica a seguito dell'infezione virale;*
- cosmidi*: sono plasmidi nei quali sono state inserite le sequenze cos del batteriofago λ. L'introduzione del DNA cosmidico nella cellula batterica avviene tramite infezione virale, più efficiente della trasformazione. Il cosmide dopo penetrazione si comporta come se fosse un plasmide;*
- YAC (Yeast Artificial Chromosome), *microcromosomi artificiali di lievito che contengono tutti i segnali per una loro corretta replicazione e ripartizione fra le cellule figlie. Il sito di clonaggio è localizzato all'interno di un gene. Vengono inseriti nelle cellule mediante trasformazione.*

tre al frammento di DNA da sequenziare e all'oligonucleotide marcato che fa da primer, i quattro desossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), e uno dei quattro didesossinucleotidi. Così se nella miscela di reazione è presente il ddCTP[7], quando l'enzima deve incorporare un nucleotide che porta la C (citosina come base azotata), può incorporare il dCTP oppure il ddCTP. Se incorpora il ddCTP, la sintesi termina e si ottiene un filamento tronco marcato che termina con la C.

Quindi usando quattro diversi analoghi didesossi, le nuove eliche si fermeranno a tutte le possbili posizioni, permettendo perciò la determinazione dell'intera sequenza.

Analisi del DNA mediante enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione, detti anche endonucleasi di restrizione, sono enzimi di origine batterica in grado di tagliare una molecola di DNA a doppia elica in corrispondenza di specifiche sequenze di basi. Sono prodotti da diverse specie batteriche per difendersi dall'invasione di DNA estraneo come ad esempio quello dei batteriofagi. Il DNA batterico è protetto dall'enzima di restrizione in quanto viene metilato da un altro enzima prodotto dallo stesso batterio. Il sistema è detto "restrizione e modificazione". Commercialmente sono disponibili qualche centinaio di enzimi di restrizione. Questi enzimi riconoscono il sito di restrizione che in genere è formato da sequenze palindromiche specifiche per ciascun enzima. I siti di restrizione sono casualmente distribuiti nel genoma di tutti gli organismi viventi. La frequenza lungo il DNA dipende dal numero di coppie di basi che costituiscono il sito stesso.

Il termine generale di polimorfismo, il cui significato etimologico è "esistenza di forme diverse", ha assunto per i genetisti significati diversi a seconda del livello di analisi. Esistono infatti polimorfismi cromosomici, genetici e a livello di proteine. Importanti sono i polimorfismi a livello del DNA.

L'analisi molecolare del DNA ha rivelato che il DNA di due individui differisce circa per un nucleotide ogni 200-500.

Questo elevato livello di polimorfismo fa sì che non tutti gli individui abbiano la stessa distribuzione di siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione.

L'uso degli enzimi di restrizione permette di caratterizzare a livello molecolare un frammento di DNA, un gene o l'intero genoma di un organismo determinandone la *mappa di restrizione*[8].

[7] *ddATP, ddCTP, ddCTP, ddTTP: sono denominati didesossinuclotidi in quanto privi del gruppo OH in posizione 3'.*

[8] *Per mappa di restrizione si intende la localizzazione lungo la molecola dei siti di restrizione corrispondenti agli enzimi analizzati.*

Southern blotting (tecnica separativa per molecole di DNA)

La tecnica di Southern blotting consente di determinare la presenza e il peso molecolare di uno specifico frammento di DNA contenente il gene o la porzione del genoma d'interesse in mezzo a moltissimi altri frammenti di DNA. Questa tecnica prende il nome dal suo ideatore E. Southern. In questa procedura il DNA genomico isolato da qualunque tipo di cellula nucleata (globuli bianchi, fibroblasti, bulbi piliferi, cellule dei villi coriali) viene digerito con enzimi di restrizione. I frammenti risultanti vengono separati in base alla loro dimensione mediante elettroforesi e dopo denaturazione a singolo filamento vengono trasferiti per capillarità su un foglio (detto anche filtro) di nitrocellulosa o di nylon. Alla fine del trasferimento (blotting), l'identificazione avviene mediante ibridazione molecolare con una sonda marcata che contiene la sequenza che si è interessati a evidenziare. Alla fine il tutto è visualizzato mediante un opportuno sistema di rivelazione (autoradiografia).

Northern blotting (tecnica separativa per molecole di RNA)

La controparte del Southern blotting per l'analisi di molecole di RNA è detta Northern blotting. Gli RNA messaggeri presenti nella cellula sono di lunghezza diversa e pertanto possono essere separati elettroforeticamente in base al loro peso molecolare. Le molecole di RNA, a differenza di quelle del DNA, non possono essere tagliate da un enzima di restrizione. Ciò non risulta essere un problema in quanto esse hanno dimensioni minori rispetto a quelle del DNA genomico. La procedura è analoga a quella del Southern.

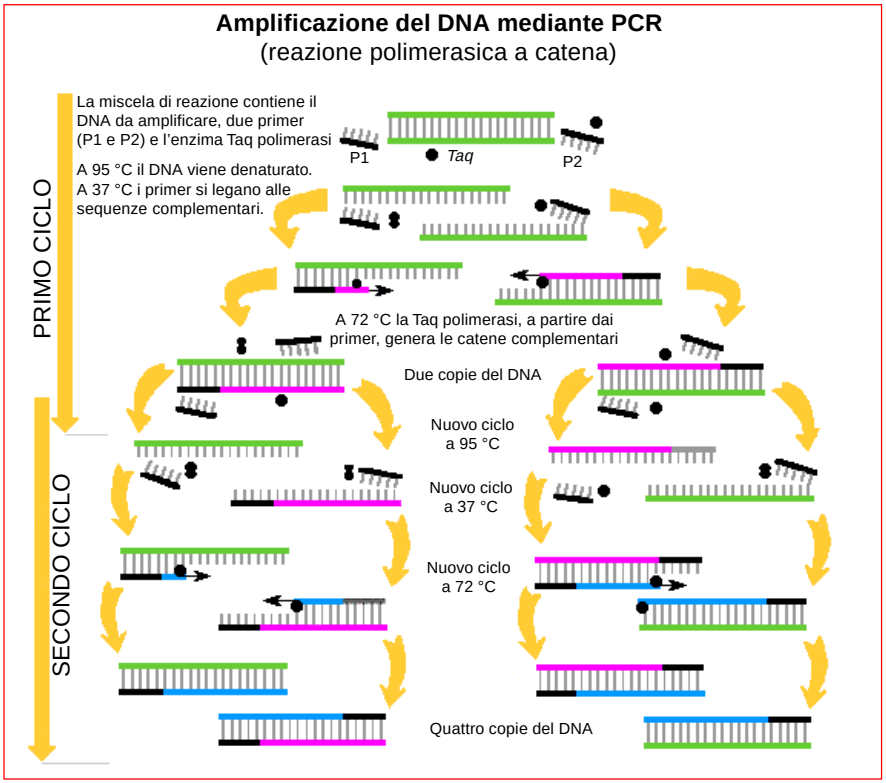
Western blotting (tecnica di identificazione delle proteine)

Questa procedura è stata messa a punto per la identificazione delle proteine. L'evidenziazione della proteina d'interesse viene effettuata utilizzando come sonda degli anticorpi (anticorpi primari), in genere monoclonali. Il riconoscimento avviene mediante anticorpo secondario (anti-anticorpo) marcato con un tracciante, diretto contro l'anticorpo primario

Analisi del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR (reazione a catena della DNA polimerasi) è stata introdotta nel 1985 come una procedura concettualmente e sperimentalmente molto semplice, che ha avuto un impatto notevole nell'analisi del DNA. Questa tecnica amplifica di 10^8 volte in modo specifico e selettivo una

piccola regione del genoma. Lo schema del processo di amplificazione è riportato nella figura seguente.



Per amplificare una regione di DNA si usano due primer (inneschi), vale a dire due oligonucleotidi complementari alle due estremità opposte alla sequenza da amplificare. Dopo denaturazione al calore della molecola di DNA a doppia elica che contiene la regione da amplificare, i primer vengono fatti appaiare alle corrispondenti sequenze complementari presenti sui due singoli filamenti di DNA; viene quindi sintetizzato a opera dell'enzima DNA polimerasi un filamento di DNA complementare a ognuno dei due filamenti originari, che fungono da stampo. Ripetuti cicli di denaturazione (a 95°C) e appaiamento dei primer e polimerizzazione del DNA consentono un'amplificazione esponenziale della sequenza originaria. La sensibilità della metodica è tale da permettere l'amplificazione della regione bersaglio a partire da piccolissime quantità di DNA. La PCR si può effettuare anche su RNA, dopo la sintesi del primo filamento di cDNA mediante l'enzima trascrittasi inversa. La polimerasi presente nella miscela di reazione è una DNA polimerasi termostabile, denominata Taq polimerasi, estratta dal batterio termofilo Thermus acquaticus. Essa ha permesso l'automatizzazione del processo.

Capitolo 10
Controllo dei processi nel laboratorio clinico

(E. Sala)

Certificazione di conformità secondo le norme ISO 9000 **513**
Politica della Qualità, coinvolgimenti e responsabilità 514
Il sistema documentale 515
Dalla certificazione di conformità alla certificazione di efficacia 518
Programmazione e pianificazione delle attività 519
Indicatori di sistema 520
Azioni correttive e azioni preventive 522

Con l'introduzione del Sistema Qualità nel laboratorio di chimica clinica si completa il processo di ottimizzazione delle risorse umane, tecnologiche ed economiche che da sempre ha caratterizzato l'attività laboratoristica a garanzia della ***qualità del servizio fornito***.

Di fatto esso ne rappresenta la naturale evoluzione rispetto a standard tecnici già esistenti quali l'utilizzo di strumentazione automatizzata, l'adozione di metodiche scritte, l'attitudine ad operare per processi standardizzati, l'orientamento alla cultura del Controllo di Qualità (VEQ, CQI), tali da portare ad un prodotto facilmente quantificabile e con caratteristiche di qualità misurabili.

Certificazione di conformità secondo le norme ISO 9000

Benché dal punto di vista teorico la ***Certificazione secondo le Norme ISO 9000*** consista fondamentalmente nel dimostrare che una struttura è in grado di soddisfare i requisiti riportati nei 20 punti descritti nella Norma, essa di fatto rappresenta il passaggio dalla garanzia della qualità alla gestione della qualità ed in particolare, nel caso del Laboratorio di Analisi, alla gestione di un sistema che certifica la qualità di un servizio. La ISO 9000 definisce infatti un modello di ***Sistema Qualità*** come strumento di carattere organizzativo/gestionale, focalizzato sul monitoraggio e controllo dei processi che hanno una diretta influenza sulla qualità del servizio erogato, definendo per ogni attività aziendale i criteri da individuare, pianificare e te-

nere sotto controllo, per la gestione e la valutazione delle proprie attività e delle necessità interne ed esterne. Questo si traduce nella individuazione di adeguate risorse e di un sistema di misurazione basato su indicatori organizzativi, clinici e di processo chiari e misurabili.

Politica della Qualità, coinvolgimenti e responsabilità

La Certificazione di un Sistema Qualità pone le sue basi nella adozione di una ***Politica della Qualità*** al più alto livello aziendale, che tiene conto di esigenze specifiche: competitività sul mercato, aggiornamento tecnologico e professionale, capacità di soddisfare le esigenze implicite ed esplicite dei clienti (medici/pazienti), per la realizzazione della quale è previsto perlomeno un investimento di tipo economico (la Certificazione costa, anche se alla lunga fa risparmiare), e di risorse umane (la Certificazione richiede molto lavoro).

Ideale a questo riguardo appare la scelta di un ***Responsabile dell'Assicurazione della Qualità***, (RAQ) che si dedichi a tempo pieno specie nella fase di avvio del progetto e fino all'ottenimento della Certificazione e che sia in grado poi, attraverso una adeguata rete di collaboratori, di garantire la cosiddetta "manutenzione" del Sistema Qualità e l'evoluzione verso la fase di miglioramento continuo che ne rappresenta il vero traguardo.

Il processo di certificazione non può dunque prescindere dal *coinvolgimento delle persone a tutti i livelli*: non solo per un contributo fattivo in termini di formalizzazione di procedure, ma soprattutto per facilitare l'adozione globale di logiche semplici ma dalle enormi potenzialità, specie se finalizzate all'ottimizzazione dei processi, alla comunicazione tra Unità Organizzative, al monitoraggio delle attività e al confronto tra procedure preesistenti e future. Questo senza mai perdere di vista, avendo anzi sempre come obiettivo finale la soddisfazione del cliente, cliente che non deve essere cosiderato come una fonte di problemi ma come un prezioso alleato in grado di giudicare l'adeguatezza dell'organizzazione alla quale accede rispetto alle sue aspettative.

La capacità di coinvolgere le persone, rappresenta un aspetto strategico fondamentale a garanzia della diffusione ed adozione delle logiche del Sistema Qualità.

Questa fase, certamente tra le più delicate dell'intero processo di Certificazione, appare tanto più complessa in quanto va affrontata all'avvio del progetto e quindi non può prescindere da una accettazione per così di dire "sulla fiducia" non sempre facile da raggiungere. Strutturare questa fase attraverso l'invito a ***lavorare per obiettivi*** anche semplici, aiuta non solo a non disperdere energie, risorse, tempo e denaro, ma anche a reclutare persone e a creare un cli-

ma di fiducia in grado di alimentare aspettative sempre più "ambiziose" ma non per questo meno raggiungibili.

Utile in questo senso risulta essere l'utilizzo di un semplice artificio grafico come il Diagramma di Gantt che associa a ciascuna attività individuata per il raggiungimento di un obiettivo, responsabilità e tempi per il completamento: uno strumento semplice quindi, che pone le basi per acquisire facilmente un metodo di lavoro che risulterà utilissimo via via che il Sistema andrà a maturazione.

L'assegnazione di responsabilità riveste un ulteriore vantaggio all'interno delle varie fasi del processo (produttivo o progettuale che sia) in quanto consente di individuare per ciascuna fase critica, in maniera univoca ed inequivocabile, una figura dedicata ben precisa.

Ben lungi quindi dall'assumere una valenza accusatoria o di "ricerca del colpevole" riduce innanzitutto il rischio di creare zone d'ombra pericolose (quando la responsabilità è di tutti, di fatto non è di nessuno o viene assunta, magari a sproposito, dal più autoritario), definisce chiaramente i ruoli, delimita le aree di pertinenza, contribuisce a chiarire i rapporti tra le varie figure professionali.

A questo proposito appare tuttavia inutile quando non addirittura controproducente individuare a tutti i costi responsabilità specifiche per attività non critiche: questo accanimento sarebbe vissuto come imposizione, accettata si ma solo "per forza"; affidarsi in questo senso alla buona volontà e alla collaborazione delle persone più sensibili e disponibili, consente di ottenere gli stessi risultati evitando di creare un clima teso ed un sistema troppo rigido.

Il sistema documentale

Da sfatare in questo senso è la credenza che il Sistema Qualità irrigidisca i comportamenti senza portare alcun valore aggiunto in un ambiente come quello di laboratorio dove già per scelta strategico-organizzativa (GLP[1]), per cultura (dovere morale nei confronti dei pazienti) e per legge (VEQ[2]), le logiche della qualità appaiono già calate. Pensiamo piuttosto ai vantaggi derivanti dalla applicazione del primo dei 3 principi non scritti che sottendono all'adozione di un Sistema qualità secondo le Norme ISO 9000: "***scrivi quello che fai***".

Il dotarsi di un sistema documentale robusto e strutturato ha perlomeno il vantaggio di:

- contribuire a *fare ordine*; in laboratorio non è infrequente trovare manuali delle metodiche e degli strumenti; più difficile è trovare applicato un metodo di gestione della documenta-

[1] *Good Laboratory Practice, ovvero "buona pratica di laboratorio".*

[2] *Valutazione Esterna delle Qualità, cioè effettuazione di analisi "in cieco" su materiali come sieri, vetrini microscopici o altro, sulla base di programmi attualmente gestiti dalle Regioni. Attualmente tali programmi sono obbligatori solamente in un numero limitato di Regioni, che includono il Piemonte, la Lombardia, il Veneto, l'Emilia-Romagna, la Liguria, la Toscana.*

zione che consenta per esempio di facilitarne l'archiviazione e l'accessibilità, e garantirne l'aggiornamento, la distribuzione, l'eliminazione delle copie obsolete;

- *fotografare una situazione esistente e consentire un giudizio obiettivo* relativo alla sua adeguatezza rispetto ad obiettivi specifici (saturazione degli strumenti, ottimizzazione delle risorse, riduzione dei tempi di produzione);
- *ripensare al proprio processo*, individuare gli aspetti critici ed affrontarli in maniera analitica (assegnazione di compiti precisi) ed univoca (assegnazione di responsabilità per ciascuna delle attività individuate): è solo quando si decide di "mettere nero su bianco" che si impara a "non dare niente per scontato" e a diventare più prudenti e meno superficiali nella analisi delle proprie attività, della propria organizzazione e del proprio processo; questo aspetto oltretutto, se non già adeguatamente affrontato in fase di certificazione secondo le Norme ISO 9000, rappresenta un requisito fondamentale all'interno delle Vision 2000 che ne rappresentano l'evoluzione;
- *favorire l'introduzione di strumenti di prevenzione* in corrispondenza degli aspetti critici individuati, che impediscano errori e difettosità nello sviluppo dei processi e nei rapporti con i clienti*;* più a valle introduci questi strumenti nel tuo processo, meno possibilità hai di mantenerlo sotto controllo;
- poter contare su uno strumento per la *formazione del personale* di nuovo inserimento e su un valido supporto per gli operatori in assenza dell'esperto. Utile a questo proposito è l'individuazione di responsabilità vicarie in grado di subentrare alla figura titolare senza per questo perdere in competenza e qualità.

L'utilizzo di diagrammi a blocchi o di flusso in questa fase di descrizione dei processi, consente di individuare eventuali ridondanze, sovrapposizioni di responsabilità, ed in generale inefficienze del sistema.

Una volta fotografata la situazione esistente, prende avvio la fase successiva, l'applicazione del secondo principio: "***fai quello che hai scritto***".

Il vantaggio principale in questa fase è dato dalla garanzia che l'applicazione di questo principio consente una uniformità di comportamenti (non certo di stampo militare) che riduce se non addirittura annulla malintesi e disguidi tipici di quando si opera in assenza di responsabilità, garantendo per contro un elevato standard di qualità.

Il terzo principio, "***documenta quello che accade***", rappresenta un ottimo sistema per collaudare quanto formalizzato nel sistema documentale. Utili in questo senso sono i moduli di registrazione degli eventi e delle attività, che consentono, dopo opportune valutazioni periodiche, di giudicare se quanto formalizzato risulta adeguato e funzionale al raggiungimento degli obiettivi ed in caso contrario di ridefinirlo.

Come è facilmente intuibile l'allestimento del sistema documentale rappresenta se non proprio la fase più delicata, certamente quella più impegnativa e onerosa in quanto non coinvolge solo il personale tecnico per la formalizzazione delle attività più strettamente legate alla produzione, ma anche altre figure non necessariamente inserite nel processo produttivo, se non addirittura esterne all'Unità Organizzativa. A garanzia che esso risulti adeguato e conforme a quanto richiesto dalla Norma ISO 9000, e funzionale agli obiettivi di qualità della struttura, a ciascuna figura strategica, non necessariamente operante all'interno dell'Unità Organizzativa, è richiesto un contributo a vari livelli, finalizzato allo svolgimento delle seguenti quattro attività:

- *redazione* del documento (descrizione delle attività);
- *controllo* (valutazione della completezza e correttezza del documento e della validità e correttezza dell'attività descritta);
- *verifica* (valutazione della conformità alla Norma);
- *approvazione* (valutazione della validità e quindi della applicabilità del documento).

Attraverso una oculata ed omogenea assegnazione di queste responsabilità, tanto più facile quanto più si è stati in grado di responsabilizzare, valorizzare e coinvolgere le varie figure professionali, deriva l'intero sistema documentale che comprende le seguenti categorie di documenti:

- manuale della qualità[3] (MdQ);
- procedure generali[4] e di settore[5] (PG e PS);
- istruzioni operative[6] (IO);
- moduli di registrazione.

Esso viene tipicamente rappresentato come una *piramide* che porta al vertice il Manuale della Qualità ed a seguire PG/PS, IO e registrazioni che ne costituiscono l'integrazione, in modo tale da poter rispondere per ciascun punto da presidiare (politica della qualità, addestramento, rapporti con i fornitori, controllo del processo, assistenza, eccetera), il ***chi*** (*risorse umane*) il ***cosa*** (*attività da svolgere*) e il ***come*** (*modalità d'azione*) e di poter verificare, attraverso un opportuno *sistema di registrazione*, non solo che quanto previsto sia stato fatto, ma che è efficace.

[3] *contiene la politica della qualità.*
[4] *come ad esempio igiene e sicurezza, qualificazione dei fornitori, eccetera.*
[5] *contengono aspetti specifici dei vari settori del laboratorio.*
[6] *contengono le istruzioni specifiche per l'esecuzione dell'accettazione dei pazienti, per l'esecuzione delle analisi, per l'utilizzo della strumentazione, eccetera.*

Mentre risulta superfluo enfatizzare ulteriormente l'utilità di quei documenti (PG ed IO) che descrivono responsabilità ed attività (non a caso sono documenti che, chiamati magari in modi diversi - manuali, protocolli - sono normalmente presenti anche nei laboratori in cui la Norma non è applicata), vale la pena di soffermarsi su MdQ e moduli di registrazione (strumento per documentare quello che accade) che rappresentano la vera novità (a livello documentale) rispetto ai laboratori non certificati.

Dalla certificazione di conformità alla certificazione di efficacia

Il Manuale della Qualità rappresenta di fatto la dichiarazione, approvata dall'alta Direzione, di come l'Unità Organizzativa oggetto di Certificazione si è strutturata ed organizzata al fine di dare evidenza di aver adottato un Sistema conforme alla Norma assumendosi la responsabilità che la politica e gli obiettivi per la qualità vengano compresi, attuati, condivisi e sostenuti a tutti i livelli della sua organizzazione. Questa Politica Aziendale viene espressa sotto forma di indicatori non numerici che tengono conto di esigenze specifiche: competitività sul mercato, aggiornamento tecnologico e professionale, capacità di soddisfare le esigenze implicite ed esplicite dei clienti (medici/pazienti). Che rappresenti "il documento" per definizione del SQ è dimostrato dal fatto che, tra tutti quelli predisposti, questo è l'unico richiesto dall'Ente contestualmente alla presentazione della Domanda di certificazione e ne condiziona l'accettabilità. È altrettanto vero tuttavia che all'interno della Norma ISO 9000, la sua struttura non consente di avere una visione d'insieme del processo: i 20 capitoli nei quali si articola, tanti quanti sono i 20 punti della Norma, se da un alto facilitano la redazione (nessun aspetto viene tralasciato), d'altro canto risultano slegati tra loro e non mandatari tra loro.

Da questo punto di vista il modello adottato dalle ***Vision 2000***, (la naturale evoluzione delle norme ISO 9000) consente di considerare i tradizionali 20 elementi specificati dalle ISO 9000 non più a sé stanti ma inseriti nella gestione dell'intero processo.

I quattro processi focali della nuova norma diventano infatti:

- la responsabilità della direzione;
- la gestione delle risorse materiali, informative, umane e finanziarie;
- la gestione dei processi;
- le misurazioni, l'analisi e il miglioramento continuativo.

Le norme Vision 2000 promuovono il passaggio dalla certificazione di conformità a quella di efficacia.

L'attenzione si sposta quindi dalla verifica dell'applicazione del singolo requisito formale e della sua conformità alla Norma, alla verifica se l'applicazione dei requisiti consente di raggiungere effettivamente i target attesi, di migliorarli continuativamente e di darne evidenza oggettiva, utilizzando il cliente come punto di avvio e di arrivo di un ipotetico ciclo orizzontale che a fronte di specifiche richieste gli consenta di valutare, alla chiusura del ciclo, la soddisfazione delle sue aspettative.

Programmazione e pianificazione delle attività

Una volta esaurita la fase di formalizzazione, ed una volta raggiunto un buon livello di confidenza con il sistema documentale prodotto, può maturare la fase più creativa del Sistema Qualità costituita dalla programmazione e pianificazione della attività. La pianificazione delle attività è già presente e caratterizza inevitabilmente l'inizio del processo di certificazione e serve per definire a grandi linee le attività minime finalizzate alla certificabilità del proprio Sistema Qualità, ma lascia poco margine ad altre attività collaterali in quanto è fortemente condizionata e penalizzata dal molto tempo richiesto per l'allestimento del sistema documentale. Essa comprende:

- la definizione di un ***Piano di Miglioramento*** coerente con le strategie aziendali dichiarate nella Politica della qualità; esso deve essere strutturato in modo da individuare indicatori che rendano definibili i fenomeni in termini quantitativi (riduzione dei tempi morti tra prelievo e disponibilità dei campioni in Laboratorio, riduzione delle Non Conformità sui campioni prelevati e consegnati, riduzione dei tempi e dei rischi in fase di identificazione dei campioni [bar-code], riduzione dei tempi di esecuzione delle analisi senza perdere in qualità, VEQ, riduzione dei reclami). A questi, si aggiungono quelli derivanti da esigenze della Direzione, quelli derivanti da esigenze di mercato (concorrenza) o legislative (accreditamento);
- la definizione di ***obiettivi specifici*** che rappresentino la concretizzazione delle direttive aziendali (introduzione di nuove metodiche, ottimizzazione delle risorse umane e delle performance strumentali, riduzione dei tempi di refertazione);
- la definizione di ***esigenze formative e piani di formazione*** finalizzati alla creazione di figure professionali preparate, autonome, competenti (valorizzazione delle risorse).

Gli obiettivi possono riguardare diverse aree tematiche quali il personale (al fine di garantirne il coinvolgimento e favorirne la motivazione), l'organizzazione in genere (al fine di garantirne la trasparenza), lo sviluppo di nuovi prodotti (al fine di garantirne affidabilità e sicurezza), i processi (al fine di giungerne alla standardizzazione e quindi alla riduzione di scarti e sprechi), i clienti (a garanzia della qualità del servizio fornito, attraverso il monitoraggio del grado di soddisfazione rispetto alle attese).

Uno strumento utile soprattutto per la definizione delle attività da intraprendere per il raggiungimento di obiettivi specifici sono i ***Piani della Qualità***, documenti che descrivono in dettaglio, per ciascuna delle attività previste, i programmi, le responsabilità, i costi, i vantaggi (organizzativi ed economici).

Indicatori di sistema

Man mano che il Sistema si articola ed evolve verso il suo assetto definitivo (ma quale sia è difficile perfino immaginarlo), assumono una valenza fondamentale i ***momenti di verifica*** che consentano di valutare innanzitutto il livello di conoscenza ed applicazione del Sistema Qualità, la praticabilità degli obiettivi, l'adeguatezza delle risorse messe a disposizione.

Essi si compongono di attività (***Verifiche Ispettive Interne*** periodiche, ***Riunioni di Riesame*** semestrali) e strumenti (***Rapporti alla Direzione*** mensili) gestiti da personale interno alla struttura (normalmente il RAQ), ed attività a carico della cosiddetta terza parte (Ispettori dell'Ente di Certificazione), tutti comunque finalizzati alla verifica che il Sistema Qualità applicato all'interno dell'Unità Organizzativa risulti conforme alla Norma e quindi certificabile. La certificabilità da parte di un ente terzo indipendente rappresenta di fatto un ottimo strumento di confronto e visibilità.

Un ulteriore strumento di verifica, seppur indiretto, è rappresentato dall'analisi dei cosiddetti indicatori di Sistema, in grado di misurare la capacità della struttura, di definire, far conoscere e far rispettare il proprio standard di qualità.

Gli indicatori di Sistema più adatti in questo senso sono rappresentati dalla ***Non Conformità*** e dai ***reclami/richieste di assistenza***. La Non Conformità (NC) è per definizione il non soddisfacimento di un requisito definito; il reclamo è per definizione una dichiarazione di insoddisfazione da parte del cliente. In entrambi i casi, la capacità di discriminare ciò che è conforme da ciò che non è conforme, è data dalla definizione chiara di requisiti (fornitore-laboratorio) ed aspettative (cliente-paziente), tanto più indispensabile quanto più è critico l'oggetto o l'aspetto organizzativo di interesse. In realtà spesso nella ipotetica catena cliente-fornitore le figure del fornitore per eccellenza (laboratorio) e del cliente per eccellenza (paziente-medico), si alternano al punto che il laboratorio è di volta in volta cliente, nei confronti dell'Ente di certificazione o delle ditte fornitrici, e fornitore nei confronti del paziente-medico. D'altra parte il paziente ed il medico sono a loro volta fornitori, di campioni biologici, impegnative, e clienti nel momento in cui accedono al servizio.

La definizione dei requisiti avviene formalmente nel momento in cui cliente e fornitore stipulano il contratto anche se di fatto sono predefiniti dal fornitore stesso. Per esempio, per quanto riguarda la conformità del Sistema documentale, i requisiti sono ampiamente definiti nella Norma ISO 9000. Per quanto riguarda invece la conformità dei campioni e delle forniture, è il laboratorio a fissarli, farli conoscere e farli rispettare da tutti gli utilizzatori del SQ e dai potenziali fornitori, a garanzia che siano in grado di fornire un prodotto/servizio conforme ed adeguato.

Tali requisiti vengono riportati in documenti quali Guida alle analisi di laboratorio, depliant informativi, istruzioni per la corretta raccolta dei campioni, a disposizione del paziente, e nei contratti stipulati con i fornitori. Questi strumenti contribuiscono certamente a definire e far conoscere le proprie esigenze, ma spesso si limitano a ridurre ma non certo ad eliminare le Non Conformità dovute in parte a negligenza degli operatori, ma anche a insufficiente addestramento, a carenze organizzative e a problemi di comunicazione.

Il reclamo che ne consegue può riguardare:

- informazioni pre-vendita (errate indicazioni relative alla modalità di accesso al servizio, alla eseguibilità delle analisi);
- tempi di attesa (ritenuti troppo lunghi);
- referto (non disponibile nei tempi e nei luoghi concordati);
- risultati (ritenuti inattendibili per discordanza con dati storici, o per incoerenza con quadro clinico);
- interpretazione dei dati (necessità di richieste di assistenza post-vendita riguardo alla chiarezza del referto, o alla presenza di note esplicative poco chiare).

I reclami non devono essere vissuti con un senso di fastidio o di imbarazzo ma come pretesti per rimettere in discussione la propria organizzazione: può darsi che dall'analisi emerga che essa sia adeguata, e che quindi la segnalazione risulti essere inopportuna, come può essere che essa sia effettivamente carente ed in tal caso può essere migliorata. Costituiscono peraltro sempre l'occasione per verificare l'adeguatezza delle proprie procedure, attività che difficilmente viene fatta spontaneamente e di sicuro non quando tutto pare andare per il meglio.

L'illusione che il proprio sistema sia sotto controllo impedisce di valutare con obiettività la propria organizzazione e di evidenziarne le carenze o le potenziali cause di NC. La visibilità sull'adeguatezza e funzionalità della propria organizzazione è data da una robusta attività di monitoraggio e di reporting che consente di misurare i fenomeni impedendo che il giudizio su di essi (bello o brutto che sia) venga affidato alla sensazione del singolo.

Azioni correttive e azioni preventive

Dall'analisi di questi indicatori e delle cause che li hanno generati scaturiscono le ***Azioni Correttive***, che non solo consentono di riportare il proprio processo sotto controllo, ma rimuovendo le cause che li hanno generati ne impediscono il ripresentarsi.

Una volta che la struttura ha preso confidenza con il Sistema Qualità, in seguito all'analisi delle rilevazioni periodiche (andamenti numerici: stiamo peggiorando) si può pensare di ragionare in termini preventivi, utilizzando la ***Richiesta di Azione Preventiva***, cioè intervenire su un processo prima che questo vada fuori controllo.

Tutte queste attività non possono prescindere dalla conoscenza della propria organizzazione, dalla capacità di agire secondo standard di qualità definiti, dalla capacità di cambiare nel momento in cui questi standard si rivelano inadeguati o comunque migliorabili. La *conoscenza* è un punto fermo che permette di controllare le cose in modo razionale, l'*esperienza* permette di avere lo stesso tipo di controllo ma con più fantasia. La *componente di immaginazione e fantasia* permette di andare oltre la necessità più immediata (e cioè quella di rendere il proprio Sistema Qualità conforme alla Norma e quindi certificabile) e di cominciare a ragionare in termini di prevenzione ed innescare quel circolo virtuoso della qualità che sta alla base del miglioramento continuo.

La componente di immaginazione e fantasia risulterà in definitiva il vero valore aggiunto, in grado di determinare, a parità di certificabilità, la differenza tra un buon laboratorio ed un laboratorio eccellente, come avviene tra un buon sarto e Giorgio Armani.

Capitolo 11
Controllo di qualità nel laboratorio clinico

(M. Besozzi)

Premessa 524
Le basi statistiche del controllo di qualità 525
Errori e sbagli 525
Assunti distribuzionali 526
Precisione e imprecisione 526
Accuratezza e inaccuratezza 526
Le misure di controllo 527
Le regole di controllo 527
Le informazioni di controllo 527
Modellizzazione dell'errore analitico 528
Assunti del CQ in chimica clinica 530
Le basi analitiche del controllo di qualità 530
Il sistema metrologico 530
I materiali di controllo 531
Il ruolo delle aziende e della professione 533
Gli obiettivi del controllo di qualità 533
Obiettivi per l'imprecisione analitica 534
Obiettivi per l'inaccuratezza analitica 535
Obiettivi per l'errore totale analitico 536
Specifiche operative del processo di controllo 537
Il disegno del controllo di qualità 538
Controllo di sistema 538
Controllo di calibrazione 538
Controllo di calibrazione del sistema analitico 539
Controllo dell'allineamento di più sistemi 539
Controllo con il metodo di riferimento 540
Controllo di validità 540
Controllo di qualità interno (CQI) 540
CQI con materiale di controllo 540
CQI con i dati dei pazienti 541
Controllo interparametrico dei dati 541
Delta-check e differenze critiche 542
Media dei pazienti e media dei normali 542
Controllo di qualità interno allargato (CQA) 542
Valutazione esterna della qualità (VEQ) 543
Conclusione 544
Bibliografia 550
Glossario 556

Il controllo dei processi nel laboratorio clinico include l'esecuzione dei controlli di qualità necessari a garantire che il prodotto (analisi di laboratorio) sia affidabile, ovvero che il procedimento di misura adottato abbia adeguate caratteristiche di precisione e accuratezza.

Per questo aspetto il laboratorio clinico è stato, nell'ambito della sanità, un antesignano, in quanto ha introdotto per primo, mutuandoli dal controllo di qualità dell'industria, e adattandoli alle esigenze specifiche del laboratorio clinico, i procedimenti e le tecniche matematico-statistiche necessari.

Per illustrarli, viene riportato qui di seguito il contenuto del documento redatto dalla "Sottocommissione 01.1 Controllo di Qualità" della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)[1]. Si fa notare che, anche se il documento fa riferimento a situazioni specifiche del settore di biochimica clinica, i principi e le tecniche presentati sono applicabili a qualsiasi altro risultato quantitativo, ottenuto in settori diversi, quando sia esprimibile sotto forma di risultato in una scala numerica continua o discreta (come i conteggi di particelle del sangue).

Premessa

Il paziente, attraverso la mediazione del medico curante (*vedere nota 2*), richiede dal laboratorio clinico un messaggio di contenuto tecnico affidabile, semplice e chiaro, tempestivo, e a costi accettabili: in altri termini richiede la *qualità*.

L'analisi di laboratorio è un prodotto complesso. Per assicurarne la rispondenza alle esigenze cliniche (*garanzia di qualità*) è necessario un *sistema qualità* [1] che consenta di controllarne tutti gli aspetti, da quello tecnico (processo analitico [2,3], e aspetti extra-analitici ad esso collegati [4,5,6,7]), a quello dei processi di comunicazione (messaggi semplici e chiari, tempestività [8] e cortesia), a quello dei processi economici (costi accettabili [3,9,10]). Mentre questi ultimi sono governati dal mercato, la qualità dell'aspetto tecnico e quella dei processi di comunicazione dovranno essere gestiti dalla professione, alla luce delle norme di gestione per la qualità e di assicurazione della qualità esistenti [11] (*vedere nota 3*).

Il *controllo di qualità* (CQ) è l'insieme delle procedure che consentono di presidiare (*vedere nota 4*) l'aspetto tecnico del prodotto "analisi di laboratorio", e cioè il *processo analitico* [2,3]. In questo documento il CQ viene trattato con riferimento ai problemi tipici della chimica clinica.

---

[1] *M. Besozzi, G. Bolelli, M. Borsotti, L. Leone, G. Messeri, R. Motta, L. Prencipe, M. Tocchini. Il Controllo di Qualità in Chimica Clinica: le basi, gli obiettivi, il disegno. Biochimica Clinica 1995;19:372-400. Il contenuto del documento è riprodotto per concessione del Direttore e dell'Editore di* Biochimica Clinica, *la rivista ufficiale della Società Italiana di Biochimica Clinica e di Biologia Molecolare Clinica* .

Le basi statistiche del controllo di qualità

Scopo della chimica clinica è di *misurare*, nei liquidi e nei tessuti dei pazienti, la concentrazione di molecole che hanno rilevanza ai fini della comprensione, della prevenzione, della diagnosi e della terapia delle malattie [12].

A causa dei limiti inerenti ai sistemi (*strumenti di misura*) impiegati per rilevare i segnali provenienti dalle grandezze fisiche, ogni *misura sperimentale* è inevitabilmente accompagnata da un qualche grado di *incertezza* [13]. D'altra parte si può assumere che esista, ogniqualvolta viene effettuata una misura sperimentale, un valore teorico, detto *valore vero*: quello che si otterrebbe se la misura non fossa affetta da alcuna incertezza. Per effetto della incertezza che la caratterizza, la misura sperimentale rappresenta una *stima* [14] più o meno approssimata del valore vero: la differenza tra una singola misura sperimentale e il suo valore vero rappresenta l'*errore* (*vedere nota 5*).

Errori e sbagli

Ripetendo più volte una misura, è possibile pervenire ad una migliore caratterizzazione dell'errore. In un insieme di misure ripetute, si definisce come *errore casuale* l'errore per cui le singole misure differiscono (casualmente, cioè senza nessuna regola apparente al succedersi delle misure stesse) tra di loro, e come *errore sistematico* l'errore per cui l'insieme (preso globalmente) delle misure ripetute si discosta dal valore vero. L'errore, l'errore casuale e l'errore sistematico sono legati all'incertezza intrinseca alle nostre conoscenze scientifiche [15].

Gli errori devono essere mantenuti distinti dallo *sbaglio* (*errore grossolano*), che è un accidente tecnico, e che come tale si manifesta nel corso dell'applicazione delle conoscenze [15] (*vedere nota 6*). Gli sbagli sono legati prevalentemente all'organizzazione e quindi ai processi di comunicazione (esempi di sbagli in chimica clinica possono essere l'errata trascrizione di un dato numerico, l'utilizzo di un reagente scaduto, lo sbaglio nell'identificazione del campione, lo sbaglio nell'interpretazione del risultato di un test di gravidanza acquistato in farmacia ed eseguito a casa propria dalla paziente, che ha frainteso i criteri per l'interpretazione dei risultati del test [16]). Contrariamente a quanto avviene per gli errori, gli sbagli si possono evitare operando con cura, e migliorando il sistema organizzativo. Contrariamente a quanto avviene per gli errori, non è possibile fissare un livello di tolleranza per gli sbagli, cioè definire una percentuale ammissibile di sbagli: semplicemente, gli sbagli per definizione non si devono verificare (*vedere nota 7*).

Assunti distribuzionali

Un insieme di misure ripetute dello stesso fenomeno può essere riassunto sotto forma di una *distribuzione di frequenze* [14]. Nel caso degli errori di misura si assume generalmente che la distribuzione di frequenze segua un *modello gaussiano* [13]. Tale modello rappresenta la base delle *statistiche parametriche* impiegate nel CQ, ed è quello raccomandato dall'IFCC [12] e in questo documento.

Nonostante la teoria e la pratica attuali del CQ siano basate sull'assunto che l'errore segue una distribuzione gaussiana, si ritiene che non debbano essere posti vincoli di alcun genere all'impiego nel CQ di metodi statistici che non fanno uso di assunti distribuzionali (*metodi non-parametrici* [17], *bootstrap* [18]).

In una *distribuzione gaussiana* la *media aritmetica* è la *misura di posizione* della distribuzione, mentre la *deviazione standard* è la *misura di dispersione* dei dati attorno alla media [14].

Precisione e imprecisione

La *precisione* è il grado di concordanza di una serie di misure ripetute. Convenzionalmente in chimica clinica la precisione viene misurata in termini di una quantità (*imprecisione*) il cui valore diminuisce all'aumentare dell'attendibilità delle misure [12,19]. L'imprecisione è la *misura di dispersione* utilizzata nel CQ. Calcolata come *deviazione standard* (*s*), può essere espressa sia come tale (e quindi nelle unità originali) che come percentuale della media (*deviazione standard relativa*, meglio nota come *coefficiente di variazione*, *CV*). L'imprecisione rappresenta una *stima* dell'errore casuale. Tale stima è tanto più attendibile quanto più numerose sono le misure utilizzate per effettuarla (numerosità campionaria).

Accuratezza e inaccuratezza

L'*accuratezza* è il grado di concordanza tra la media di una serie di misure ripetute e il valore vero. Convenzionalmente in chimica clinica l'accuratezza viene misurata in termini di una quantità (*inaccuratezza*) il cui valore diminuisce all'aumentare dell'attendibilità delle misure [12,19]. L'inaccuratezza è la *misura di posizione relativa* utilizzata nel CQ (*vedere nota 8*). Calcolata come differenza tra la media campionaria e il valore vero, può essere espressa sia come tale (e quindi nelle unità originali) che come percentuale del valore vero. L'inaccuratezza rappresenta una *stima* dell'errore sistematico. Tale stima è tanto più attendibile quanto più numerose sono le misure utilizzate per effettuarla (numerosità campionaria).

Le misure di controllo

Le *misure di controllo* sono i dati utilizzati al fine di verificare se il processo analitico si sta svolgendo con le caratteristiche di qualità richieste. Dal punto di vista teorico non vi sono motivi per porre vincoli di alcun genere né al tipo di misure di controllo, né alla frequenza, né alla fase del processo analitico durante la quale esse sono ottenute. Comunque le misure effettuate ripetutamente durante il processo analitico su un materiale di controllo, con stabilità prolungata nel tempo, a più livelli di concentrazione, e analizzato con i campioni dei pazienti (*CQ con materiale di controllo*), costituiscono per tutti gli analiti la base quotidiana del CQ in chimica clinica.

Le regole di controllo

Le *regole di controllo* sono i criteri utilizzati al fine di verificare se il processo analitico si sta svolgendo con le caratteristiche di qualità richieste. Le regole di controllo sono oggettive ma probabilistiche [20]. La probabilità p (con $0 \leq p \leq 1$) che una data regola di controllo fornisca un segnale che indica il deterioramento delle caratteristiche del processo analitico (*vedere nota 9*) in presenza di un effettivo deterioramento delle caratteristiche del processo analitico, deve essere mantenuta sufficientemente alta (per esempio $p = 0{,}95$). Per converso la probabilità che una regola di controllo fornisca un segnale che indica il deterioramento delle caratteristiche del processo analitico in assenza di un effettivo deterioramento delle caratteristiche del processo analitico [20], deve essere la più bassa possibile, in quanto le false segnalazioni comportano inutili costi aggiuntivi, e possono a lungo andare indurre gli operatori a sottovalutare l'importanza delle segnalazioni stesse.

L'utilizzo nel CQ di una regola di controllo si basa sulla conoscenza delle capacità della regola di rivelare gli errori (casuali e/o sistematici) [20,21]. Ciò può essere realizzato mediante lo studio delle funzioni di potenza di ciascuna specifica regola di controllo [20,21,22,23, 24,25,26], studio effettuabile mediante simulazioni al calcolatore [27,28].

Le informazioni di controllo

Le *informazioni di controllo* sono le informazioni necessarie per giudicare se il processo analitico si sta svolgendo con le caratteristiche di qualità richieste: esse consentono di effettuare gli interventi correttivi che riportino il processo entro le specifiche operative previste. Le informazioni di controllo utilizzate nel CQ sono derivate dalla applicazione delle regole di con-

trollo (*vedere nota 10*) di volta in volta appropriate a:

- misure (di controllo) effettuate a livello dei processi interni alla strumentazione analitica;
- misure (di controllo) effettuate su materiali specifici (materiali di controllo), inseriti nel processo analitico;
- misure (di controllo) effettuate sui materiali dei pazienti;
- misure effettuate a scopo diagnostico sui materiali dei pazienti.

Modellizzazione dell'errore analitico

L'errore totale analitico (ET_a, espresso come differenza, nelle unità originali, tra il risultato di una singola misura e il suo valore vero) è dovuto al sommarsi di una componente sistematica e di una componente casuale [figura 1], rappresentate nel modello matematico gaussiano [29,30,31]

$$ET_a = bias + dES \cdot s + z \cdot dEC \cdot s \quad (I)$$

ove sono rispettivamente:

bias = l'inaccuratezza (errore sistematico) del metodo analitico, misurata in condizioni di stabilità del processo analitico. Il bias viene espresso nelle unità originali;

s = l'imprecisione (errore casuale) del metodo analitico, misurata in condizioni di stabilità del processo analitico. Viene espressa come deviazione standard, nelle unità originali;

dES = la variazione dell'errore sistematico (variazione di inaccuratezza) che si può manifestare durante il processo analitico (per instabilità del processo). Viene espressa in termini di multiplo della imprecisione analitica (*s*);

dEC = la variazione dell'errore casuale (variazione di imprecisione) che si può manifestare durante il processo analitico (per instabilità del processo). Viene espressa in termini di multiplo della imprecisione analitica (*s*);

z = il fattore (deviata normale standardizzata) che posto uguale a 1,65 garantisce la possibilità di rivelare il 95% delle situazioni di errore.

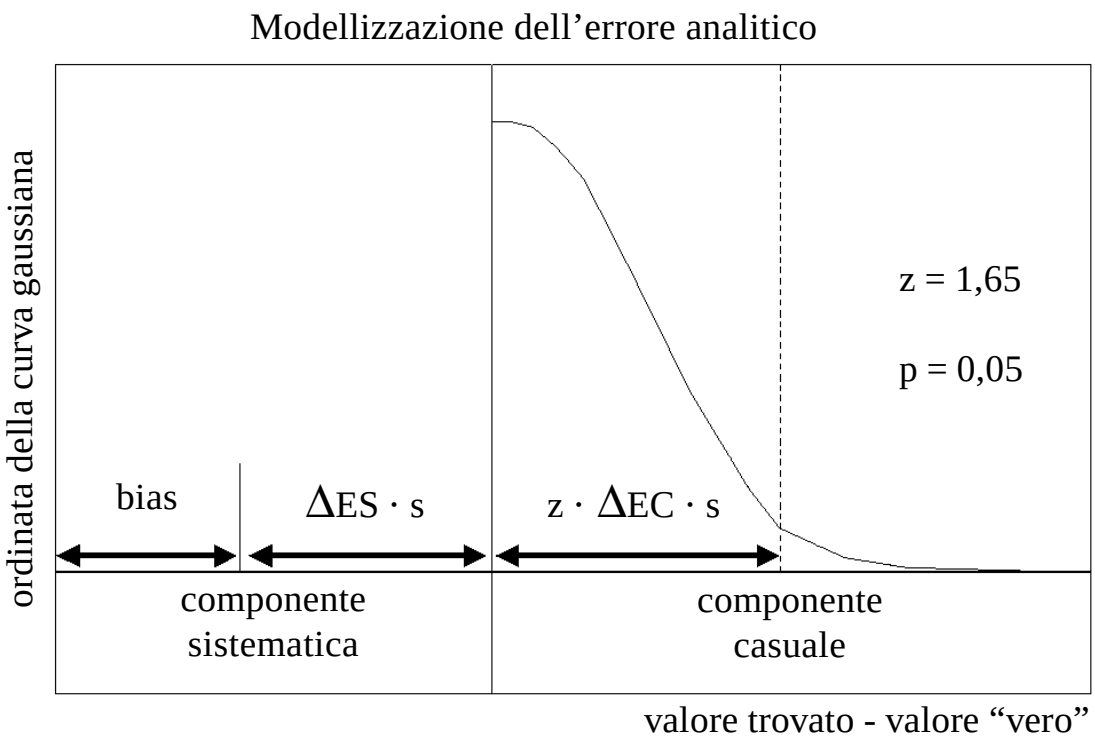


Figura 1. Modellizzazione dell'errore analitico

Nella *(I)* compaiono quindi sia la inaccuratezza (*bias*) e la imprecisione (*s*) caratteristiche del metodo analitico, sia le variazioni di inaccuratezza (*dES*) e di imprecisione (*dEC*) che devono essere rivelate dal processo di controllo (di qualità) al fine di garantire un errore totale analitico contenuto entro i limiti prefissati, che assicurano l'utilità clinica del risultato analitico. In un processo analitico perfettamente stabile, ove sono assunti per definizione costanti nel tempo sia la inaccuratezza (e quindi *dES* = 0) che la imprecisione (e quindi *dEC* = 1), cioè in un processo analitico che non richiede alcun processo di controllo (di qualità), la *(I)* si semplifica diventando

$$ET_a = bias + z \cdot s \quad (II)$$

Questo modello [32] rappresenta il razionale sul quale sono fondati gli obiettivi di qualità del processo analitico raccomandati in questo documento (*vedere nota 11*).

Assunti del CQ in chimica clinica

Gli assunti del CQ in chimica clinica derivano da quanto detto in precedenza, e sono così riassumibili:

- le grandezze (come la concentrazione di massa, la concentrazione di sostanza, la concentrazione di attività catalitica, e così via) impiegate in chimica clinica hanno, nei campioni analizzati (sieri dei pazienti, materiali di controllo), un valore vero;
- il valore vero può essere stimato;
- la singola stima del valore vero comporta per definizione un errore (errore totale analitico);
- attraverso l'utilizzo di opportuni disegni sperimentali, basati sull'esecuzione di misure replicate, l'errore totale analitico può essere scomposto in due componenti, imprecisione e inaccuratezza;
- scopo del CQ è di garantire, attraverso il controllo della imprecisione e della inaccuratezza, che l'errore totale analitico (dovuto all'inestricabile commistione, all'interno di ciascuna singola misura, di imprecisione e inaccuratezza) sia contenuto entro livelli predeterminati, che assicurano la significatività del risultato ai fini dell'utilizzo clinico.

Le basi analitiche del controllo di qualità

Alla base delle misure controllate con il CQ vi sono:

- il *sistema analitico*, rappresentato dall'insieme di strumentazione, metodo analitico, materiale/i di calibrazione e materiale/i di controllo [33,34];
- l'idea di un *sistema metrologico* in grado di garantire la possibilità di riprodurre ubiquitariamente una data misura (un dato *risultato analitico*) sui *sieri freschi* dei pazienti [35].

Il sistema metrologico

Il sistema metrologico rappresenta l'aspetto più complesso del problema. Esso si deve basare su una gerarchia di materiali e metodi [35,36,37] che consentono il trasferimento dell'accuratezza dai metodi di livello metrologico superiore (*metodi definitivi*), assunti in grado di fornire il *valore vero convenzionale* (*vedere nota 12*), attraverso l'impiego di metodi di livello metrologico intermedio (*metodi di riferimento*), ai metodi di livello metrologico inferiore (*metodi di routine*), il cui utilizzo si impone in termini di maggiore *praticabilità* [figura 2].

Perchè ciò possa avvenire è necessaria una rete di *laboratori di riferimento*, in grado di eseguire su base continuativa i metodi di livello metrologico superiore e di assegnare, mediante

questi, il valore vero ai sieri freschi dei pazienti: questo rappresenta la *base per la accuratezza*.

Analizzando quindi con un dato sistema analitico un adeguato numero di sieri freschi di cui sia noto il valore vero, è possibile, impiegando le tecniche matematico-statistiche appropriate, calibrare il sistema analitico in modo che esso fornisca statisticamente "in media" [38], sui sieri dei pazienti, una stima accettabilmente approssimata del valore vero (fase di *trasferimento della accuratezza*) (*vedere nota 13*).

Se, con il sistema analitico così predisposto, si assegnano i valori ai materiali di calibrazione che i laboratori dovranno utilizzare nella routine, nell'ambito esclusivo di quel sistema analitico, è possibile garantire *a priori* l'accuratezza del sistema analitico stesso [39] (*vedere nota 14*).

I materiali di controllo

Il monitoraggio nel tempo dell'accuratezza del sistema analitico deve essere successivamente effettuato attraverso un opportuno programma di controllo di qualità interno con materiale di controllo [figura 2].

L'approccio metrologico descritto consente di superare anche le difficoltà derivanti dai problemi di commutabilità dei materiali di controllo [40,41,42,43,44,45,46,47], se questi sono preventivamente analizzati con il sistema analitico e con il metodo di riferimento (che fornisce il valore vero). Il rapporto tra il valore vero e il valore fornito dal sistema analitico è pari a 1 (uno) per i materiali commutabili, e diverso da 1 per i materiali non commutabili. La certificazione di questo rapporto (e dei suoi limiti di confidenza [14]) per ogni determinato materiale e sistema analitico consente di convertire i valori ottenuti nel valore vero, garantendo così la confrontabilità dei risultati ottenuti, per un dato materiale di controllo, su sistemi analitici differenti [48]. In tal modo è possibile superare, nei programmi di controllo di qualità interno allargato e di valutazione esterna della qualità, gli attuali limiti, legati all'elaborazione dei risultati per metodo, limiti che inducono a critiche sempre più pressanti [49]. E ottenere una misura attendibile della capacità dei laboratori di riprodurre ubiquitariamente una determinata misura.

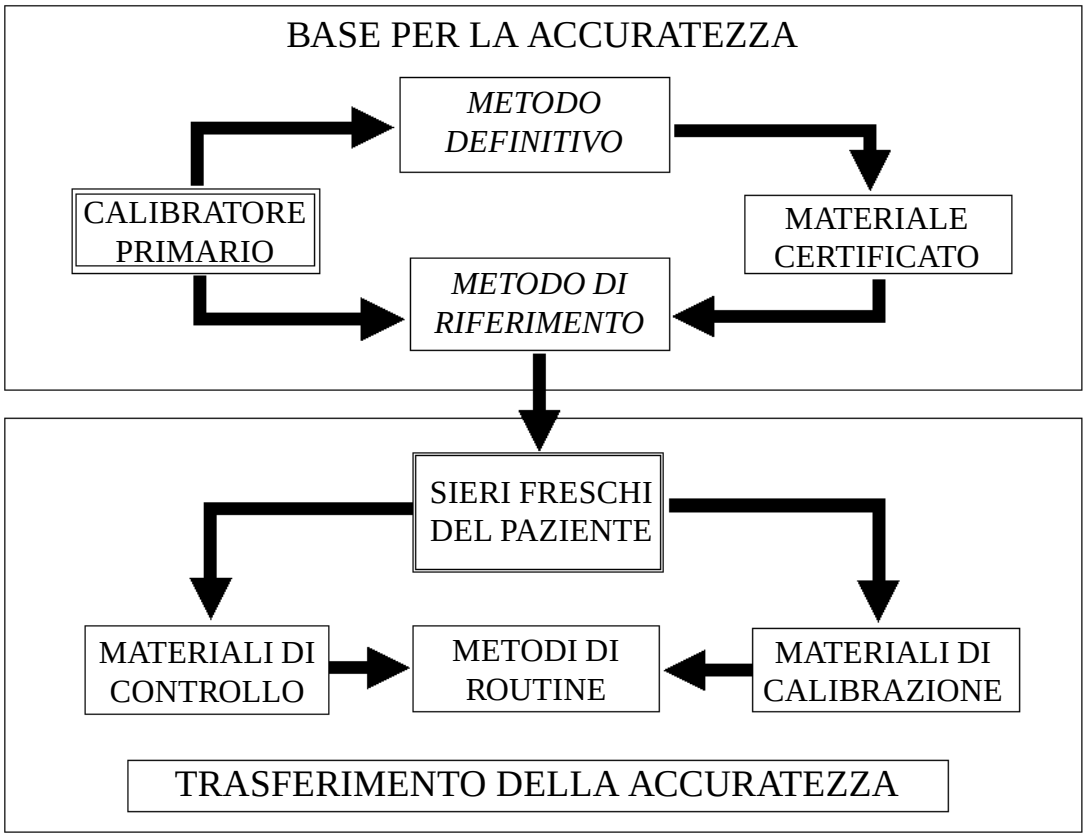


Figura 2. Schema del sistema metrologico in grado di garantire la possibilità di riprodurre ubiquitariamente una data misura (un dato risultato analitico) sui sieri freschi dei pazienti. Il metodo definitivo e il metodo di riferimento, con i rispettivi materiali certificati e calibratori, forniscono la base per la accuratezza. Il trasferimento della accuratezza ai metodi di routine viene garantito mediante sieri freschi (per cortesia del Prof. Carlo Franzini).

Il ruolo delle aziende e della professione

Il raggiungimento di livelli qualitativi più adeguati riguardo l'accuratezza, esige da parte delle aziende produttrici di diagnostici un impegno maggiore di quanto non sia stato richiesto in passato.

L'evoluzione del mercato è contraddistinta da una continua tendenza ad una sempre più accentuata semplificazione metodologica, che si sta rapidamente concretizzando nello sviluppo di sistemi analitici completamente automatici anche in settori di indagini biochimiche cui sembrava non fossero applicabili (quale ad esempio l'immunochimica). Questo comporta, in termini strettamente operativi, che il laboratorio non ha alcuna possibilità di agire sulla struttura del saggio. La preclusione ad ogni intervento esterno demanda al produttore una grande responsabilità sulla qualità delle prestazioni che si andranno ad ottenere.

A fronte di questi elementi di rigidità, lo stato dell'arte in generale evidenzia la necessità di ulteriori miglioramenti, in quanto si osservano ancora sensibili differenze sistematiche tra i kit/sistemi anche a livelli di concentrazione clinicamente importanti. Viceversa è sempre più pressante l'esigenza di una maggior confrontabilità e soprattutto l'inderogabile impegno di rapportarsi a termini di confronto di comprovata affidabilità.

Questo approccio è sicuramente percorribile; metodi di riferimento e definitivi sono già materia di una ricca letteratura, e la loro disponibilità è una sempre più consistente prerogativa di numerosi centri. L'utilizzo di questi metodi a fini comparativi deve rappresentare un impegno prioritario a cui nessuna azienda di diagnostici si deve più sottrarre.

In questa ottica la professione dovrà avere un ruolo di primaria importanza quale elemento di pressione affinché al problema della accuratezza sia data finalmente una risposta non più basata su paragoni empirici, ma su criteri rigorosamente scientifici.

Gli obiettivi del controllo di qualità

Come detto in precedenza, scopo del CQ è quello di garantire che l'errore totale analitico sia contenuto entro livelli predeterminati, che assicurano la significatività del risultato ai fini dell'utilizzo clinico [50]. Per la definizione degli obiettivi per l'errore analitico (imprecisione e/o inaccuratezza) sono stati suggeriti sei approcci differenti, basati rispettivamente su:

- intervalli di riferimento [51];
- opinione dei clinici [52,53];
- stato dell'arte [54];
- punto di vista di esperti (individui e gruppi) [55];

- dati di variabilità biologica [32,56,57,58,59,60,61];
- analisi degli effetti dell'errore analitico sulla interpretazione del test in specifiche situazioni cliniche [62] ovvero efficacia clinica del test [63].

In attesa che in prospettiva si possa pensare di arrivare ad armonizzare i diversi punti di vista [64], l'approccio che attualmente appare più consistente con la definizione di obiettivi da raggiungere a medio termine è quello basato sui dati di variabilità biologica [32,56,57,58, 59,60,61], che viene adottato in questo documento.

Obiettivi per l'imprecisione analitica

L'imprecisione analitica (CV_a) è più importante nel monitoraggio, cioè quando debbano essere confrontati tra di loro dati di uno stesso paziente, ottenuti in tempi successivi [60,65]. In questo caso anche un metodo inaccurato, se stabile nel tempo, può fornire risultati utili, purché sufficientemente preciso (*vedere nota 15*). Gli obiettivi per l'imprecisione analitica possono allora essere fissati sulla base della variabilità biologica intra-individuale ($CV_{b(intra)}$), in modo che al termine del procedimento analitico la variabilità totale (data dalla somma della variabilità analitica e della variabilità biologica) sia di poco superiore a quella derivante dalla sola variabilità biologica.

Si raccomanda come obbiettivo una imprecisione analitica inferiore alla metà della variabilità biologica intra-individuale, cioè

$$CV_a < 0{,}5 \cdot CV_{b(intra)}$$

(ove sia CV_a che $CV_{b(intra)}$ sono espressi come coefficiente di variazione percentuale) [32, 60,61]. Questo fa sì che, al termine del procedimento analitico, la variabilità totale del risultato analitico sia solamente l'11,8% in più di quella derivante dalla sola variabilità biologica.

Gli obiettivi di imprecisione analitica così definiti rappresentano un primo importante traguardo cui tendere per il controllo della imprecisione analitica, e sono riportati nella Tabella I.

L'avvicinamento e/o il raggiungimento e il mantenimento degli obiettivi di imprecisione analitica devono essere monitorati mediante il coefficiente di variazione (*CV*) calcolato sui risultati di almeno sei mesi di un programma di controllo di qualità interno, che impieghi un materiale di controllo su più livelli, e lotti di materiale della durata non inferiore ad un anno (*vedere nota 17*).

Obiettivi per l'inaccuratezza analitica

La inaccuratezza analitica (*bias*) è più importante nella diagnosi, cioè quando i dati di pazienti diversi devono essere confrontati con gli intervalli di riferimento [60].

Componente	CV_a%	*bias*%	ET_a%
Alanina amminotransferasi	13,6	10,7	33,2
Albumina	1,4	1,1	3,4
Amilasi	3,7	6,5	12,6
Aspartato amminotransferasi	7,2	6,2	18,1
Bicarbonato	2,3	1,6	5,4
Bilirubina totale	11,3	9,8	28,4
Calcio totale	0,9	0,7	2,2
Cloruro	0,7	0,5	1,6
Colesterolo totale	2,7	4,1	8,6
Creatina chinasi	16,7	11,8	39,2
Creatinina	2,2	2,8	6,4
Digossina	3,8	3,9	10,2
Ferro	15,9	8,9	35,1
Fosfatasi acida	4,5	2,3	9,7
Fosfatasi alcalina	3,4	6,4	12,0
Fosfato	4,0	3,1	9,7
Glucosio	2,2	1,9	5,5
gamma-Glutammiltransferasi	7,4	9,1	21,3
IgA	2,2	8,4	12,0
IgG	1,9	5,0	8,1
IgM	2,3	8,4	12,2
Lattato deidrogenasi	3,9	4,1	10,5
Litio	3,6	4,2	10,1
Magnesio	1,1	1,6	3,4
Potassio	2,4	1,6	5,6
Proteine totali	1,4	1,5	3,8
Sodio	0,3	0,2	0,7
Tireotropina	8,1	8,9	22,3
Tiroxina	3,4	4,1	9,7
Transferrina	2,4	2,3	6,2
Trigliceridi	11,5	10,1	29,1
Triiodotironina	4,0	5,5	12,1
Urato	4,2	4,0	10,9
Urea	6,3	5,3	15,7

Tabella I (vedere nota 16). Obiettivi analitici per l'imprecisione (CV_a), per l'inaccuratezza (bias) e per l'errore totale analitico (ET_a) secondo le raccomandazioni adottate nel presente documento. L'imprecisione è espressa come coefficiente di variazione percentuale, l'inaccuratezza e l'errore totale analitico sono espressi come differenza tra il valore trovato e il valore vero, in percentuale del valore vero.

In particolare per adottare (come appare ormai altamente desiderabile in termini di messaggi semplici e chiari, cioè di qualità dei processi di comunicazione) intervalli di riferimento uguali in una certa area geografia (per esempio l'Italia, la Germania, ma anche l'Europa) è necessario che l'inaccuratezza non superi un quarto del valore della variabilità biologica totale della popolazione (data dalla somma della variabilità biologica intra-individuale, $CV_{b(intra)}$, e della variabilità biologica inter-individuale $CV_{b(inter)}$) [32,60,61].

Si raccomanda come obbiettivo una inaccuratezza inferiore ad un quarto della variabilità biologica totale della popolazione, cioè

$$bias < 0{,}25 \cdot (CV_{b\,(intra)}^{\,2} + CV_{b\,(inter)}^{\,2})^{1/2}$$

(ove il *bias* è espresso in valore assoluto (senza il segno), come percentuale del valore vero, mentre $CV_{b(intra)}$ e $CV_{b(inter)}$ sono espresse come coefficiente di variazione precentuale) .

Gli obiettivi di inaccuratezza analitica così definiti rappresentano un primo importante traguardo cui tendere per il controllo della inaccuratezza analitica (*vedere nota 18*), e sono riportati nella Tabella I.

L'avvicinamento e/o il raggiungimento e il mantenimento degli obiettivi di inaccuratezza analitica devono essere monitorati mediante la differenza (*bias*) tra il valore vero e la media calcolata sui risultati di almeno sei mesi di un programma di controllo di qualità interno, che impieghi un materiale di controllo su più livelli, e lotti di materiale della durata non inferiore ad un anno (*vedere nota 19*).

Obiettivi per l'errore totale analitico

Per ogni singola determinazione, la differenza tra il valore ottenuto e il valore vero risulta essere una inestricabile commistione di imprecisione e di inaccuratezza e viene pertanto percepita come errore totale analitico (ET_a). Questo vale ovviamente per qualsiasi risultato, sia per quelli ottenuti sui materiali di controllo che per quelli ottenuti sui sieri dei pazienti.

Nelle legislazioni sulla valutazione esterna della qualità di Germania e Stati Uniti, l'errore totale analitico viene definito in modo sostanzialmente empirico [66,67]. In realtà, dal modello dell'errore analitico riportato in precedenza che prevede, in condizioni di processo analitico stabile, che

$$ET_a = bias + z \cdot s \quad (II)$$

deriva come conseguenza immediata che gli obiettivi per l'errore totale analitico possono essere definiti semplicemente combinando gli obiettivi per la imprecisione con gli obiettivi per la inaccuratezza [32].

Si raccomanda come obbiettivo un errore totale analitico inferiore alla somma della inaccuratezza e della imprecisione massime consentite, e cioè

$$ET_a < 0{,}25 \cdot (CV_{b\,(intra)}^{\,2} + CV_{b\,(inter)}^{\,2})^{1/2} + z \cdot 0{,}5 \cdot CV_{b(intra)}$$

ove *z* è il fattore (deviata normale standardizzata) che, posto uguale a 1,65, garantisce la possibilità di rivelare il 95% delle situazioni di errore.

Gli obiettivi per l'errore totale analitico così definiti rappresentano il traguardo fondamentale cui tendere per il controllo dell'errore totale analitico, e quindi per garantire la possibilità di riprodurre ubiquitariamente una data misura sui sieri dei pazienti, e sono riportati nella Tabella I.

L'avvicinamento e/o il raggiungimento e il mantenimento degli obiettivi di errore totale analitico devono essere monitorati mediante l'esecuzione su base continuativa, per tutti gli analiti, di un programma di controllo di qualità interno che impieghi un materiale di controllo su più livelli, con lotti di materiale della durata non inferiore ad un anno, e mediante la partecipazione volontaria a programmi di controllo di qualità interno allargato e a programmi di valutazione esterna della qualità.

Specifiche operative del processo di controllo

La modellizzazione dell'errore analitico e gli obiettivi adottati in questo documento consentono, a partire dall'errore totale analitico, di definire le caratteristiche (specifiche operative) che il processo di controllo deve avere, secondo due alternative:

- considerando una situazione di processo analitico stabile. In questo caso le specifiche operative sono rappresentate semplicemente dal fatto che l'errore totale analitico (ET_a) non può mai superare i limiti corrispondenti agli obiettivi adottati (tabella I);
- considerando una situazione di processo analitico instabile. In questo caso è possibile impiegare metodologie specifiche per definire le caratteristiche (regole di controllo, numero dei campioni di controllo, imprecisione e inaccuratezza massime consentite nel corso del processo analitico) necessarie per assicurare, con un livello di probabilità prestabilito (per esempio $p = 0{,}90$), che un errore che eccede l'ET_a venga rivelato dal processo di controllo [68,69,29,30,70,71].

Il disegno del controllo di qualità

Per garantire l'efficacia del CQ deve essere mantenuta attiva la sequenza obiettivi → risultati → interventi correttivi [12]. Quindi, una volta stabiliti gli obiettivi, è necessario definire il disegno sperimentale da adottare per il CQ onde ottenere le informazioni di controllo sulla base delle quali attivare i meccanismi tesi a garantire che la inaccuratezza, l'imprecisione e, conseguentemente, l'errore totale del processo analitico siano quelli necessari per soddisfare le esigenze cliniche.

È possibile riconoscere nel CQ diversi disegni, in relazione alle *strategie di controllo* utilizzate: *controllo a priori* (effettuato prima dell'avvio del processo analitico), *controllo interattivo* (effettuato durante il processo analitico) e *controllo a posteriori* (più o meno separato, nel tempo, dal processo analitico). Le strategie di controllo sono complementari tra di loro. Quindi, per definizione, nessuna di esse può essere utilizzata in sostituzione di un'altra: e tutte devono essere impiegate, al fine di fornire la garanzia di qualità del processo analitico.

Controllo di sistema

Il *controllo di sistema* tende a fornire una garanzia a priori (prima dell'avvio della serie analitica) della qualità analitica, derivando le informazioni di controllo da misure effettuate a livello dei processi interni alla strumentazione analitica.

Il controllo di calibrazione può essere realizzato con dispositivi meccanici, ottici e/o elettronici, mediante i quali sono testate le funzioni meccaniche, ottiche e/o elettroniche del sistema analitico, e non comporta l'utilizzo né di sieri di controllo né dei sieri dei pazienti. Nel caso delle funzioni elettroniche, tipiche di tutta la moderna strumentazione analitica, il controllo di sistema è in gran parte, se non del tutto, *cablato* nel sistema analitico. Un esempio di controllo di sistema *non cablato* nel sistema analitico può essere il controllo delle lunghezze d'onda di uno spettrofotometro mediante filtro di olmio.

Si raccomanda che i risultati ottenuti con il controllo di sistema siano archiviati al fine di documentare l'efficienza del sistema analitico, sia per una possibile analisi retrospettiva in seguito alla comparsa di problemi (principio della "scatola nera"), sia come base di conoscenza per esprimere giudizi oggettivi sulle prestazioni della strumentazione analitica in uso.

Controllo di calibrazione

Il *controllo di calibrazione* tende a fornire anch'esso una garanzia a priori (prima dell'avvio della serie analitica) della qualità analitica. Il controllo di calibrazione deriva le informa-

zioni di controllo da misure effettuate su materiali di controllo, e/o da misure effettuate a scopo non diagnostico sui materiali dei pazienti. Nel controllo di calibrazione si presentano tipicamente tre situazioni.

Controllo di calibrazione del sistema analitico

Consiste nell'analizzare, all'avvio del sistema analitico e prima dell'inizio dell'attività vera e propria, il/i materiale/i di controllo appositamente fornito/i con il sistema analitico stesso. È una situazione caratteristica dei sistemi analitici che prevedono che un'unica calibrazione rimanga valida per periodi di tempo prolungati (è comune arrivare fino ai quattro-sei mesi). In caso di controllo al di fuori dei limiti consentiti, i risultati del controllo di calibrazione non devono essere utilizzati per ricalibrare il sistema analitico, ma è necessario procedere ad una nuova calibrazione impiegando i materiali di calibrazione e le procedure di calibrazione previsti per lo specifico sistema analitico. In base al principio della complementarietà delle strategie di controllo, il controllo di calibrazione non è sostitutivo del controllo di qualità interno.

Controllo dell'allineamento di più sistemi

Lo sviluppo della strumentazione nella chimica clinica ha condotto in questi ultimi anni con sempre maggior frequenza, soprattutto nei laboratori medio-grandi, alla compresenza di sistemi analitici differenti per l'esecuzione delle stesse analisi. E può accadere che, per motivi organizzativi, campioni successivi di uno stesso paziente siano analizzati su più di un sistema analitico. Per garantire, all'interno di un singolo laboratorio, la confrontabilità dei risultati ottenuti su differenti sistemi, è pratica comune, e corretta, che essi vengano allineati mediante i risultati ottenuti dall'analisi di sieri freschi di pazienti, tramite una tecnica di approssimazione in media [38] (tipicamente la regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati [14]).

Il controllo di calibrazione può essere utilizzato per verificare il mantenimento nel tempo dell'allineamento tra due sistemi analitici, uno dei quali sia preso come riferimento. In questo caso è necessario analizzare su entrambi (per esempio) un pool di sieri freschi preparato da quelli della routine giornaliera (utilizzando sieri provenienti da almeno 10 soggetti diversi, è possibile minimizzare gli effetti di *non-commutabilità* possibili anche sui sieri freschi [72,73,74]). I valori ottenuti sul pool con i due sistemi analitici possono quindi essere confrontati con i limiti di confidenza della regressione [14] calcolata nel corso dell'allineamento preliminare dei due sistemi, al fine di valutare se l'allineamento continua ad essere accettabile. Il procedimento può essere ovviamente esteso a più sistemi analitici.

Controllo con il metodo di riferimento

L'accuratezza di un sistema analitico deve essere garantita a priori dalla azienda che lo fornisce. Per questo motivo un controllo di calibrazione effettuato direttamente tra il sistema analitico e il metodo che fornisce il valore vero (metodo definitivo o metodo di riferimento) non rappresenta una procedura routinaria. Può peraltro essere effettuato occasionalmente, sulla base di esigenze documentate, analizzando, con il proprio sistema analitico, opportunamente calibrato e controllato, una serie di sieri freschi cui (prima o dopo l'analisi con il proprio sistema analitico) sia stato assegnato il valore vero da parte di un laboratorio di riferimento.

Controllo di validità

Diversamente dal controllo di sistema e dal controllo di calibrazione, che tendono a fornire una garanzia a priori, il controllo di validità fornisce la garanzia della qualità analitica agendo in modo interattivo. Il controllo di validità deriva le informazioni di controllo da misure effettuate su materiali specifici inseriti nel processo analitico.

Il controllo di validità viene assicurato da un controllo della procedura analitica *cablato* in ogni singolo test. Da questo punto di vista, il controllo di validità è una procedura di CQ che assume che la serie analitica sia rappresentata da un singolo test. Un esempio tipico di controllo di validità è rappresentato dal controllo positivo e/o negativo presente nei test immunoenzimatici su striscia.

Il controllo di validità è utile nelle situazioni in cui esiste un'elevata probabilità di sbagli, legata tipicamente ad una esecuzione delle analisi occasionale, al di fuori del laboratorio, da parte di personale non specializzato [75]. Il razionale del controllo di validità risiede nel fatto di porre al centro dell'attenzione l'operatore, come una fonte importante di sbagli.

Controllo di qualità interno (CQI)

Il controllo di qualità interno (CQI) agisce in modo interattivo, e deriva le informazioni di controllo sia dalle misure effettuate su materiali specifici (materiali di controllo), trattati in modo identico ai campioni dei pazienti [76], sia dalle misure effettuate a scopo diagnostico sui materiali dei pazienti [2].

CQI con materiale di controllo

Il CQI con materiale di controllo deve essere eseguito quotidianamente per tutti gli analiti. Gli obiettivi primari del CQI con materiale di controllo sono rivolti all'errore analitico, al fine di:

- ➢ fornire un segnale di allarme in tempo reale quando si verifica, nella serie analitica, un errore che eccede i limiti prestabiliti;
- ➢ controllare il raggiungimento e/o il mantenimento degli obiettivi di imprecisione analitica;
- ➢ controllare il raggiungimento e/o il mantenimento degli obiettivi di inaccuratezza analitica.

Si sottolinea in particolare come il terzo punto, essenziale ai fini della garanzia di qualità che il laboratorio clinico deve fornire, diventi praticabile solamente nell'ambito di un sistema di garanzia a priori dell'accuratezza, al di fuori del quale il CQI può consentire solamente un controllo della (in)accuratezza relativa (mantenimento nel tempo dei livelli di inaccuratezza iniziali).

Il controllo di qualità con materiale di controllo, regole di controllo, e con visualizzazione grafica dei risultatati sotto forma di carte di controllo (carte di tipo Shewhart, altrimenti dette di Levey-Jennings, eventualmente con l'ausilio delle carte di Youden), è lo strumento centrale del CQ in chimica clinica [76,77,78,79,80].

In base alle specifiche operative adottate per il processo di controllo, i limiti di controllo possono essere definiti in termini di errore totale analitico (ET_a) ovvero, in alternativa, di limiti statistici (media ± 1*s*, media ± 2*s*, media ± 3*s*). In quest'ultimo caso, una sola regola di controllo è sufficiente a garantire un processo di controllo adeguato per la maggior parte degli analiti [69,81]. Qualora si renda necessario e/o si reputi opportuno ricorrere a sistemi a regole multiple [82], l'utilizzo contemporaneo di due sole regole, di cui una sensibile all'errore sistematico e l'altra sensibile all'errore casuale, sembra poter garantire un adeguato controllo del processo analitico [69,81].

CQI con i dati dei pazienti

Il CQI con i dati dei pazienti consente di ampliare il processo di controllo, estendendolo ad aspetti che non è possibile controllare mediante i materiali di controllo. Tuttavia, per il fatto di non consentire né il controllo dell'imprecisione né il controllo dell'inaccuratezza, né tantomeno quello dell'errore totale analitico, non può che essere complementare al CQI con materiale di controllo. Il CQI con i dati dei pazienti è fondamentalmente orientato a rivelare gli sbagli.

Il ***controllo interparametrico dei dati*** può essere effettuato sugli indici eritrocitari, per i quali si sa che valori dell'emoglobina corpuscolare media (MCH) e/o della concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC) che si scostano di molto dalla media possono essere causati da sbagli nel conteggio dei globuli rossi, nella determinazione dell'emoglobina e/o nella misura del volume globulare medio (MCV) [2]; può essere effettuato sulla differenza

tra la concentrazione degli ioni positivi e quella degli ioni negativi nel siero (anion-gap), essendo noto che una differenza molto diversa dalla media di 11-12 mmol/L può essere indice di errore nella determinazione della concentrazione di uno degli ioni [83]; può essere effettuato mediante la differenza tra la concentrazione di CO_2 misurata e quella calcolata mediante l'equazione di Henderson-Hasselbalch [2].

Delta-check e differenze critiche prevedono entrambi che il risultato ottenuto per un paziente sia confrontato con quello ottenuto precedentemente, per verificare, sulla base di regole prestabilite, se ci si trovi in presenza di una differenza plausibile. Le regole per giudicare se la differenza tra due successive misure sia significativa, inizialmente empiriche (delta-check), possono ora essere agganciate alla variabilità biologica impiegando il modello delle differenze critiche [58,84,85,86]. In quest'ultimo caso una differenza eccede i livelli di allarme quando, in un soggetto supposto in una condizione stabile, supera il valore (differenza critica) plausibile in base alla variabilità biologica e alla variabilità analitica osservate. Un caso particolare di questo tipo di controllo è il controllo di congruità, applicabile alla misura delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci, e che consiste nel confrontare i risultati ottenuti per un singolo paziente con la dose di farmaco assunta, e con i precedenti valori di dose e di concentrazione [87].

Media dei pazienti e media dei normali comprendono tutti i metodi basati sulla valutazione della media dei dati relativi a un certo analita. Possono essere inclusi nel calcolo della media tutti i valori, o solamente quelli che risultano all'interno dell'intervallo di riferimento [2,88,89,90,91]. La deriva della media può essere posta sotto controllo mediante una tecnica di analisi della tendenza [2,92]. La media può essere la media aritmetica, la media geometrica o una media in qualche modo smussata, come quella di Bull [93,94]. In questo caso la media viene ricalcolata ogni 20-30 determinazioni (il valore esatto può essere definito caso per caso mediante lo studio della funzione di potenza). A un singolo valore viene dato un peso tanto minore quanto più esso si allontana dalla media precedentemente calcolata: questo fatto limita l'effetto derivante dall'inclusione di un singolo o di pochi dati patologici, e tende a stabilizzare la media. La media di Bull si presta ad essere utilizzata per il controllo degli analizzatori di ematologia, in particolare per l'MCV, l'MCH e l'MCHC, ma, come tutti i metodi basati sui dati dei pazienti, sempre a fianco di un metodo con materiale di controllo [95].

Controllo di qualità interno allargato (CQA)

Con il *controllo di qualità interno allargato* (CQA) si entra nell'ambito della valutazione *a posteriori* dell'attendibilità analitica. Il CQA deriva l'informazione di controllo dai materiali

di controllo utilizzati per il CQI, e consiste nella elaborazione in comune dei risultati del CQI di laboratori che utilizzano tutti lo stesso materiale di controllo.

Il CQA è tipicamente svolto su base volontaristica, supportato dalle aziende che producono materiali di controllo, che con questo intendono offrire un servizio aggiuntivo al CQI. Tuttavia in almeno un caso il CQA rappresenta il sistema di CQ adottato a livello nazionale [96].

Il razionale cui è improntato il CQA, è che le informazioni necessarie per effettuare una valutazione comparativa dei propri risultati nei confronti di quelli degli altri laboratori sono già contenute tutte nei dati del CQI. Questo è sicuramente vero. Non solo: ma la numerosità dei risultati che ciascun laboratorio mette a disposizione offre una base statisticamente più attendibile di quella che si ha nei tradizionali programmi di valutazione esterna della qualità. L'unico limite del CQA, l'incapacità di fornire stime dell'inaccuratezza dei laboratori a causa del fatto che questi utilizzano, e devono poter continuare ad utilizzare, differenti materiali per il proprio CQI, viene superato se si applicano le logiche della garanzia a priori dell'accuratezza dei sistemi analitici e della certificazione dei fattori di commutabilità dei materiali di controllo raccomandate in questo documento.

Valutazione esterna della qualità (VEQ)

Analogamente al CQA, la valutazione esterna della qualità (VEQ) fornisce una valutazione a posteriori dell'attendibilità analitica, e deriva l'informazione di controllo dai materiali di controllo.

La VEQ, attraverso la misura della capacità dei laboratori di fornire, su uno stesso materiale di controllo, uguali risultati, consente di verificare fino a che punto è stato raggiunto l'obbiettivo primario della chimica clinica: ottenere, per un dato paziente, lo stesso risultato in tutti i laboratori [97].

Per questo il disegno sperimentale della VEQ deve prevedere:

- la definizione degli obiettivi di qualità in termini di errore totale analitico;
- l'impiego di materiali (sieri freschi, sangue intero fresco [98] o materiali di controllo su cui siano stati determinati i fattori di commutabilità per i vari sistemi analitici), per i quali sia noto il valore vero di concentrazione dei diversi analiti;
- il confronto dei risultati ottenuti nei singoli laboratori con il valore vero;
- la valutazione del raggiungimento degli obiettivi in termini di numero di laboratori che non eccedono l'errore totale analitico raccomandato.

Due sono sostanzialmente i limiti destinati a permanere nei programmi di VEQ:

- numero dei campioni di controllo analizzati insufficiente per trarre conclusioni affidabili, sul piano statistico, riguardo le prestazioni dei singoli laboratori;

- disegno sperimentale che non consente di scomporre l'errore osservato nelle sue componenti (errore casuale e sistematico), che corrispondono a problemi analitici differenti, e che richiedono interventi correttivi differenti da parte dei laboratori.

Per queste ragioni la VEQ deve mantenere e rafforzare il suo unico e insostituibile ruolo: quello di strumento di analisi epicritica, di *indicatore di efficacia* dell'insieme delle procedure di CQ adottate nel laboratorio clinico.

Conclusione

Non è ancora perfettamente chiaro quali debbano essere, in termini di imprecisione, di inaccuratezza e di errore totale analitico, le caratteristiche "ideali", dal punto di vista clinico, di uno specifico test di laboratorio. È invece chiaro che tali caratteristiche "ideali" potranno essere definite e raggiunte solamente mediante una serie di approssimazioni successive. Per questo è necessario raccogliere un primo, preliminare consenso attorno a caratteristiche provvisoriamente assunte come quelle "ideali": questo fatto ha rappresentato, e rappresenta, lo scopo di questo documento.

Sulla strada del complesso cammino che ci separa dal raggiungimento, per ciascuno specifico test di laboratorio, delle caratteristiche "ideali" dal punto di vista clinico, l'accuratezza rappresenta indiscutibilmente la sfida principale [99,100]. Gli esempi forniti dalla standardizzazione della misura delle apolipoproteine A-I e B [101,102,103,104], e dalla standardizzazione della misura delle principali proteine del siero [105] dimostrano che, quando si interviene con la necessaria determinazione, l'obbiettivo "accuratezza" può essere perseguito con successo anche in settori particolarmente complessi e delicati come quello delle misure immunochimiche.

Per quanto concerne infine il CQ, la modellizzazione dell'errore analitico, unita ad un sistema metrologico coerente e alla definizione di obiettivi separati per i differenti aspetti dell'errore analitico (errore analitico totale, imprecisione, inaccuratezza), permette di definire gli interventi correttivi necessari per garantire l'efficacia del [processo di] controllo del processo analitico.

Gli interventi correttivi devono essere basati su informazioni di controllo adeguate, che consentano:

- di evidenziare gli sbagli, con conseguente ripetizione della/e analisi;
- di riconoscere un errore totale analitico che eccede il limite massimo predefinito, con conseguente ripetizione della/e analisi;
- di determinare, quando l'errore totale analitico eccede il limite massimo predefinito, la

componente di imprecisione dell'errore, adottando i provvedimenti opportuni sugli aspetti del processo analitico che contribuiscono alla imprecisione;

- di determinare, quando l'errore totale analitico eccede il limite massimo predefinito, la componente di inaccuratezza dell'errore, adottando i provvedimenti opportuni sugli aspetti del processo analitico che contribuiscono alla inaccuratezza;
- di effettuare un'analisi epicritica oggettiva dei risultati raggiunti in termini di rispondenza del processo analitico agli obiettivi di qualità predefiniti.

È possibile in tal modo raggiungere l'obbiettivo finale della chimica clinica: garantire l'utilità clinica del dato analitico, attraverso un sistema che consente di riprodurre ubiquitariamente una data misura in un dato paziente.

(*nota 1*)
Hanno inviato commenti alla versione 1.1 di questo documento, commenti di cui si è tenuto conto nella redazione della presente versione: P. Bonvicini, F. Ceriotti, R. Falcone, C. Franzini, F. Moia, G. Palleschi, G. Vanzetti. Li ringraziamo.

(*nota 2*)
Si assume che il paziente sia il cliente finale, il punto di arrivo della catena clienti-fornitori che attraversa il processo di produzione dei servizi sanitari.

(*nota 3*)
Appare opportuno ricordare che le *norme UNI EN ISO* della serie *9000* forniscono *la metodologia* necessaria alla realizzazione di un *sistema qualità* aziendale, una metodologia svincolata dalla tipologia dell'organizzazione, e quindi una metodologia applicabile universalmente. Alla professione spetta il compito di decodificare le norme in relazione alle specificità che caratterizzano il laboratorio clinico.

(*nota 4*)
Il verbo presidiare, sul cui utilizzo in questa sede si sono rilevati alcuni dissensi, vuole esprimere lo stato di allerta, quindi *l'attitudine alla prevenzione* degli errori e degli sbagli, in contrapposizione con *l'attitudine alla correzione*, che vede errori e sbagli come qualcosa da correggere necessariamente *dopo* che si sono verificati. La logica del *sistema qualità* descritto nelle *norme UNI EN ISO* della serie *9000* valorizza grandemente l'attitudine alla prevenzione.

(*nota 5*)
Nel "*Vocabolario illustrato della lingua italiana*" di G. Devoto e G. C. Oli l'errore viene definito come "...in metrologia, *e. di osservazione* (o *di misura* o *sperimentale*), la differenza fra il valore vero della grandezza e quello misurato...". Analogamente si esprime "Lo Zingarelli 1995" di N. Zingarelli, che definisce l'errore come "...nella misurazione di una grandezza fisica, differenza fra il valore esatto e quello dedotto dall'osservazione...".

(*nota 6*)
Nel "*Vocabolario illustrato della lingua italiana*" di G. Devoto e G. C. Oli si trova che "[sbaglio]...condivide con errore...tutte le determinazioni, ma gnrl. differisce nel senso di un'attenuazione dell'importanza e della gravità...". A fronte di questo impiego del termine nel linguaggio comune, sta il fatto che lo sbaglio viene dallo stesso vocabolario ulteriormente definito come "..mancanza nei confronti di un ordine corretto o di una regola...": questa definizione si avvicina molto a quella qui data di sbaglio come accidente tecnico. Più concisamente ne "Lo Zingarelli 1995" di N. Zingarelli lo sbaglio viene definito come "...equivoco, disattenzione, svista...", in un senso che va ancora più chiaramente nella direzione del significato adottato in questo documento.

(*nota 7*)
L'esigenza di una valorizzazione della attitudine alla prevenzione di cui alla *nota 4*, risulta intuitiva se si pensa agli interventi che ciascuno mette in atto, nel proprio laboratorio, al fine di prevenire gli sbagli.

(*nota 8*)
La misura di posizione *assoluta* di un'insieme di dati campionari è la media.

(*nota 9*)
L'espressione "deterioramento delle caratteristiche del processo analitico" in questo contesto viene utilizzata per evitare di ricorrere al termine "errore", che sarebbe quanto mai incoerente con il significato attribuito a tale parola nelle altre parti di questo documento.

(*nota 10*)
All'espressione "regole di controllo" è bene attribuire un significato generico di "criterio decisionale", intendendo qualcosa che può andare (e va) ben al di là delle classiche regole statistiche impiegate nel CQ e alle quali si è abituati a pensare (per esempio la regola 1,3s, che segnala il deterioramento delle caratteristiche del processo quando un dato si allontana dalla media di oltre 3 volte la deviazione standard). In questo senso una regola di controllo può essere per esempio rappresentata dal *non accettare* i risultati di un esame emocromocitometrico se la concentrazione emoglobinica corpuscolare media è superiore al 50%.

(*nota 11*)
In effetti l'espressione

$$ET_a = bias + z \cdot s$$

ben rappresenta i due punti di vista in merito al problema dell'errore analitico. Quello del laboratorio che ha l'esigenza di scomporre l'errore totale analitico in due componenti, l'errore sistematico (*bias*) e l'errore casuale (*s*), cui corrisponde la necessità di indagare su aspetti differenti del processo analitico, e l'attivazione di differenti interventi correttivi (parte destra dell'equazione). E quello del clinico, che vede in definitiva nel singolo dato una inestricabile commistione di imprecisione e di inaccuratezza, che quindi vede l'errore totale analitico (ET_a), e che chiede in sostanza che la differenza tra il valore fornito e il valore vero sia contenuta entro limiti che assicurino la significatività del risultato ai fini del suo utilizzo clinico (parte sinistra dell'equazione).

(*nota 12*)
Da considerare come la migliore stima disponibile del valore vero.

(*nota 13*)
Gli obiettivi di qualità consentono di definire in modo oggettivo, per ciascun analita, che cosa si intende per "*stima accettabilmente approssimata del valore vero*".

(*nota 14*)
È possibile cioè da parte dei produttori fornire un sistema analitico garantendo che con esso, impiegato in conformità con le procedure descritte, il laboratorio sarà in grado di ottenere sui sieri dei pazienti il *valore vero convenzionale*. Vedere anche il punto 5.2.3.

(*nota 15*)
(e purché il paziente effettui le analisi in laboratori aventi la stessa inaccuratezza). Affermare che "un metodo inaccurato, se stabile nel tempo, può fornire risultati utili, purché sufficientemente preciso" non può ovviamente in alcun modo essere considerato come una giustificazione all'utilizzo di metodi inaccurati.

(*nota 16*)
Gli obiettivi di imprecisione e di inaccuratezza della letteratura più estesamente riportati ed accettati [32,58,59,60,61] sono i seguenti (ove $CV_{b(intra)}$ rappresenta la variabilità biologica intra-individuale, e $CVb_{(inter)}$ rappresenta la variabilità biologica inter-individuale):

Componente	$CV_{b(intra)}$	$CVb_{(inter)}$
Alanina amminotransferasi	27,2	47,1
Albumina	2,8	3,4
Amilasi	7,4	24,9
Aspartato amminotransferasi	14,4	20,2
Bicarbonato	4,6	4,4
Bilirubina totale	22,6	32,0
Calcio totale	1,8	2,1
Cloruro	1,4	1,4
Colesterolo totale	5,4	15,5
Creatina chinasi	41,4	67,5
Creatinina	4,4	10,3
Digossina	7,6	13,6
Ferro	31,8	16,0
Fosfatasi acida	9,0	0,0
Fosfatasi alcalina	6,8	24,7
Fosfato	8,0	9,5
Glucosio	4,4	6,2
gamma-Glutammiltransferasi	14,8	85,9
IgA	4,4	49,8
IgG	3,8	19,6
IgM	4,6	50,6
Lattato deidrogenasi	7,8	14,4
Litio	7,2	15,2
Magnesio	2,2	6,0
Potassio	4,8	4,2
Proteine totali	2,8	5,3
Sodio	0,6	0,5
Tireotropina	16,2	31,7
Tiroxina	6,8	14,9
Transferrina	4,8	7,8
Trigliceridi	23,0	58,0
Triiodotironina	8,0	20,5
Urato	8,4	13,6
Urea	12,6	17,0

Gli obiettivi di imprecisione e di inaccuratezza proposti in questo documento sono basati sui dati di variabilità riportati nella precedente tabella con la sola eccezione dei casi in cui la variabilità biologica intra-individuale o inter-individuale risultava superiore al 33.3%. Non essendo ovviamente possibile una deviazione standard relativa superiore al 33.3% (si tratta semplicemente di distribuzioni non gaussiane), nei casi in cui essa supera tale valore si è assunta *provvisoriamente* una deviazione standard relativa uguale al 33.3%. Per la variabilità biologica intra-individuale ciò è avvenuto in un solo caso, e precisamente per la creatina chinasi ($CV_{b(intra)}$ riportato dalla letteratura pari al 41,4%). Per la variabilità biologica inter-individuale ciò è avvenuto in sei casi: alanina amminotransferasi ($CV_{b(inter)}$ riportato dalla letteratura pari al 47,1%), creatina chinasi (67,5%), gamma-glutammiltransferasi (85,9%), IgA (49,8%), IgM (50,6%) e trigliceridi (58,0%).

Per quanto riguarda la fosfatasi acida, una variabilità biologica inter-individuale pari a 0 (zero) si evince dai riferimenti [32] e [60]. Anche in questo caso i valori di $CV_{b(intra)}$ e di $CV_{b(inter)}$ sono stati assunti provvisoriamente.

Ovviamente via via che nuovi studi consentiranno di migliorare le stime della variabilità biologica intra-individuale e inter-individuale disponibili si provvederà ad aggiornare i valori degli obiettivi di imprecisione e di inaccuratezza proposti in questo documento, e a ricalcolare conseguentemente quelli dell'errore totale analitico.

(*nota 17*)
I risultati di almeno sei mesi di un programma di controllo di qualità interno, con l'effettuazione di una o più misure giornaliere sul medesimo materiale di controllo, sono necessari a garantire una stima adeguata dell'imprecisione analitica (cioè una *deviazione standard s* misurata in condizioni di stabilità del processo analitico).

(*nota 18*)
Si tratta di obiettivi realistici: il traguardo ideale teoricamente perseguibile, cioè l'assenza di inaccuratezza nei metodi analitici, appare per ora difficile da proporre.

(*nota 19*)
I risultati di almeno sei mesi di un programma di controllo di qualità interno, con l'effettuazione di una o più misure giornaliere sul medesimo materiale di controllo, sono necessari a garantire una stima adeguata dell'inaccuratezza analitica (cioè un *bias* misurato in condizioni di stabilità del processo analitico).

Bibliografia

1. Westgard JO, Burnett RW, Bowers GN. Quality management science in clinical chemistry: a dynamic framework for continuous improvement of quality. Clin Chem 1990;36:1712-6.
2. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press, 1989:264pp.
3. Westgard JO, Barry PL. Cost-effective quality control: managing the quality and productivity of analytical processes. Washington: AACC Press, 1986:229pp.
4. Ascari E, Prandini BD, Spandrio L. Raccolta e conservazione dei materiali biologici. Milano: Raffaello Cortina Editore, 1986:134pp.
5. Fody EP. Principi generali relativi alla preparazione del paziente e al trattamento dei campioni. In: Howanitz PJ, Howanitz JH, eds. La sicurezza di qualità. Roma: Il Pensiero Scientifico Editore, 1990:63-91.
6. Steindel SJ. Aspetti generali della sicurezza di qualità in laboratorio. In: Howanitz PJ, Howanitz JH, eds. La sicurezza di qualità. Roma: Il Pensiero Scientifico Editore, 1990:93-117.
7. Uldall A. Quality assurance in clinical chemistry. Scand J Clin Lab Invest 1987;47(Suppl 187):195pp.
8. Chou D, Connelly DP, Fine JS. Sicurezza di qualità e flussi di informazione nel laboratorio. In: Howanitz PJ, Howanitz JH, eds. La sicurezza di qualità. Roma: Il Pensiero Scientifico Editore, 1990:413-43.
9. Westgard JO, Burnett RW. Precision requirements for cost-effective operation of analytical processes. Clin Chem 1990;36:1629-32.
10. Westgard JO, Oryall JJ, Koch DD. Predicting effects of quality-control practices on the cost-effective operation of a stable, multitest analytical system. Clin Chem 1990;36:1760-4.
11. Norma UNI EN ISO 9000-1. Norme di gestione per la qualità e di assicurazione della qualità. Guida per la scelta e l'utilizzazione. Milano: UNI, 1994:26pp.
12. Buttner J, Borth R, Boutwell JH, Broughton PMG, Bowyer RC. Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology. J Clin Chem Clin Biochem 1980;18:69-77.
13. Taylor JR. Introduzione all'analisi degli errori. Bologna: Zanichelli, 1986:223 pp.
14. Snedecor GW, Cochran WG, Statistical methods, 7th ed. Ames: The Iowa State University Press, 1980:507pp.
15. Baldini M. L'errore nella scienza. Biochim Clin 1991;15:28-38.
16. Hicks JM. Home testing: to do or not to do? [Editorial]. Clin Chem 1993;39:7-8.
17. Maritz JS. Distribution-free statistical methods. London: Chapman and Hall, 1981:264pp.
18. Efron B, Tibshirani R. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other mesures of statistical accuracy. Stat Sci 1986;1:54-77.
19. Vanzetti G, Franzini C. Il controllo di qualità in chimica clinica: principi ed esperienze. Milano: Società Italiana di Biochimica Clinica, 1981:152pp.
20. Westgard JO, Groth T, Aronsson T. Performance characteristics of rules for internal quality control: probabilities for false rejection and error detection. Clin Chem 1977;23:1857-67.
21. Westgard JO, Groth T. Power functions for statistical control rules. Clin Chem 1979;25:863-9.
22. Ehrmeyer SS, Laessig RH. Alternative statistical approach to evaluating interlaboratory performance. Clin Chem 1985;31:106-8.
23. Blum AS. Computer evaluation of statistical procedures, and a new quality-control statistical procedure. Clin Chem 1985;31:206-12.

24. Parvin CA. Estimating the performance characteristics of quality-control procedures when error persists until detection. Clin Chem 1991;37:1720-4.
25. Parvin CA. Comparing the power of quality-control rules to detect persistent systematic error. Clin Chem 1992;38:358-63.
26. Parvin CA. Comparing the power of quality-control rules to detect persistent increases in random error. Clin Chem 1992;38:364-9.
27. Westgard JO. Simulation and modelling for optimizing quality control and improving analytical quality assurance [Editorial]. Clin Chem 1992;38:175-8.
28. Hatjimihail AT. A tool for the design and evaluation of alternative quality-control precedures. Clin Chem 1992;38:204-10.
29. Westgard JO, Hyltoft Petersen P, Wiebe DA. Laboratory process specifications for assuring quality in the US national cholesterol education program. Clin Chem 1991;37:656-61.
30. Westgard JO, Wiebe DA. Cholesterol operational process specifications for assuring the quality required by CLIA proficiency testing. Clin Chem 1991;37:1938-44.
31. De Verdier CH, Groth T, Hyltoft Petersen P. Medical need for quality specifications - a NORDKEM project for selecting the appropriate quality in clinical laboratories. Scand J Clin Lab Invest 1993;53(Suppl 215):29-37.
32. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Quality goals in external quality assessment are best based on biology. Scan J Clin Lab Invest 1993;53(Supplement 212):8-9.
33. Buttner J, Borth R, Boutwell JH, Broughton PMG, Bowyer RC. Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 2. Assessment of analytical methods for routine use. J Clin Chem Clin Biochem 1980;18:78-88.
34. Buttner J, Borth R, Boutwell JH, Broughton PMG, Bowyer RC. Approved recommendation (1979) on quality control in clinical chemistry. Part 3. Calibration and control materials. J Clin Chem Clin Biochem 1980;18:855-60.
35. Bowers GN Jr. Clinical chemistry analyte reference systems based on true value [Editorial]. Clin Chem 1991;37:1665-6.
36. Tietz NW. A model for a comprehensive mesurement system in clinical chemistry. Clin Chem 1979;25:833-9.
37. Franzini C. The reference method value. Ann Ist Sup Sanità 1991;27:359-63.
38. Cugiani M, Liverani A. Introduzione all'analisi computazionale. Torino: UTET Libreria, 1991:143pp.
39. Lasky FD. Proficiency testing linked to the national reference system for the clinical laboratory: a proposal for achieving accuracy. Clin Chem 1992;38:1260-7.
40. Van Helden WCH, Visser RWJ, Van den Bergh FAJTM, Souverijn JHM. Comparison of intermethod analytical variability of patient sera and commercially quality control sera. Clin Chim Acta 1979;93:335-47.
41. Bretaudiere JP, Dumont G, Rej R, Bailly M. Suitability of control materials. General principles and methods of investigation. Clin Chem 1981;27:798-805.
42. Solberg HE, Skrede S. Specimen-dependent effects on the apparent analytical quality in surveys of Nordic clinical chemistry laboratories. Scand J Clin Lab Invest 1984;44(Suppl 172):159-62.
43. Uldall A. Apparent interlaboratory variation using different type of reference sera. Scand J Clin Lab Invest 1984;44(Suppl 172):163-71.
44. Burlina A, Bonvicini P, Secchiero S, Bertorelle R, Zaninotto M. Valutazione della commutabilità nei dosaggi degli enzimi su campioni di pazienti e materiali di controllo. Progr Med Lab 1988;6:459-64.

45. Franzini C. Commutability of reference materials in clinical chemistry. JIFCC 1993;5:186-93.
46. Moss DW. Enzyme reference materials. Their place in diagnostic enzymology. JIFCC 1994;6:6-9.
47. Rei R. Proficiency testing, matrix effects, and method evaluation [Editorial]. Clin Chem 1994;40:345-6.
48. Besozzi M, Borsotti M, Motta R, Tocchini M. Il controllo di qualità nel laboratorio clinico: verso una strategia globale. Milano: SIBIoC Commissione Controllo di Qualità, 1993:73pp.
49. Tietz NW, Rodgerson DO, Laessig RH. Are clinical laboratory proficiency test as good as they can be? Clin Chem 1992;38:473-5.
50. Buttner J, Borth R, Boutwell JH, Broughton PMG, Bowyer RC. Approved recommendation (1979) on quality control in clinical chemistry. Part 6. Quality requirements from the point of view of health care. J Clin Chem Clin Biochem 1980;18:861-6.
51. Tonks DB. A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 Canadian laboratories. Clin Chem 1963;9:217-33.
52. Barnett RN. Medical significance of laboratory results. Am J Clin Pathol 1968;50:671-6.
53. Skendzel LP, Barnett RN, Platt R. Medically useful criteria for analytical performance of laboratory tests. Am J Clin Pathol 1985;83:200-5.
54. Ross JW, Fraser MD. Clinical laboratory precision. The state of the art and medical usefulness based internal quality control. Am J Clin Pathol 1982;78(Suppl):578-86.
55. Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. Clin Chem 1988;34:193-201.
56. Cotlove E, Harris EK, Williams GZ. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum costituents in normal subjects. III. Physiological and medical implications. Clin Chem 1970;16:1028-32.
57. Harris EK. Statistical principles underlying analitical goal-setting in clinical chemistry. Am J Clin Pathol 1979;374-82.
58. Costongs GMPJ, Janson PCW, Bas BM. Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of clinical chemical laboratory parameters. J Clin Chem Clin Biochem 1985;23:7-16.
59. Fraser CG. The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing. Arc Pathol Lab Med 1988;112:404-15.
60. Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Ricos C, Haeckel R. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992;30:311-7.
61. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Desiderable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. Clin Chem 1993;39:1447-55.
62. Hyltoft Petersen P, Horder M. Influence of analytical quality on test results. Scan J Clin Lab Invest 1992;52(Suppl 208):65-87.
63. Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL. Allowable imprecision for laboratory tests based on clinical and analytical test outcome criteria. Clin Chem 1994;40:1909-14.
64. Hiltoft Petersen P, Fraser CG. Setting quality standards in clinical chemistry: can competing models based on analytical, biological, and clinical outcomes be harmonized? Clin Chem 1994;40:1865-8.
65. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. The importance of imprecision. Ann Clin Biochem 1991;28:207-11.
66. Stamm D. New guidelines of the Federal Medical Association. Biochim Clin 1991;15:1029-53.

67. U.S. Dept. of Health and Human Services. Medicare, Medicaid, and CLIA programs: regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA). Final rule. Fed Regist 1992;57:7002-186.
68. Linnet K. Choosing quality-control systems to detect maximum allowable analytical errors. Clin Chem 1989;35:284-8.
69. Koch DD, Oryall JJ, Quam EF, Feldbruegge DH, Dowd DE, Barry PL, Westgard JO. Selection of medically useful quality-control procedures for individual tests done in a multitest analytical system. Clin Chem 1990;36:230-3.
70. Westgard JO. Charts of operational process specifications ("OPSpecs charts") for assessing the precision, accuracy, and quality control needed to satisfy proficiency testing performance criteria. Clin Chem 1992;38:1226-33.
71. Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL. European specifications for imprecision and inaccuracy compared with operating specifications that assure the quality required by US CLIA proficiency-testing criteria. Clin Chem 1994;40:1228-32.
72. Kropf J, Marx AM, Hildebrandt J, Gressner AM. Pratical implications of coexistent different technologies in clinical chemical laboratories. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991;29:675-83.
73. Biondi ML, Turrini D, Cicchitti D, Brenna S, Guagnellini E. Influenza della differente composizione isoenzimatica nella determinazione della lattato deidrogenasi. Biochim Clin 1993;17: 903-4.
74. Re G, Ceriotti F, Besozzi M. Tecnologie analitiche a confronto: commutabilità su sieri freschi. Biochim Clin 1994;18:93-106.
75. Baer DM, Belsey RE. Limitations of quality control in physicians' offices and other decentralized testing situations: the challenge to develop new methods of test validation. Clin Chem 1993;39:9-12.
76. Buttner J, Borth R, Boutwell JH, Broughton PMG, Bowyer RC. Approved recommendation (1983) on quality control in clinical chemistry. Part 4. Internal quality control. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:877-84.
77. Reed AH, Henry RJ. Accuracy, precision, quality control and miscellaneous statistics. In: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, eds. Clinical chemistry. Principles and technics, 2nd ed. Hagerstown: Harper & Row, 1974:287-341.
78. Manuale del controllo di qualità nel laboratorio di patologia clinica. A cura del Comitato Regionale per l'Ordinamento dei Servizi di Patologia. Milano: Giunta Regionale della Lombardia, Assessorato alla Sanità, 1978:109pp.
79. De Verdier CH, Aronsson T, Nyberg A eds. Quality control in clinical chemistry. Efforts to find an efficient strategy. Scand J Clin Lab Invest 1984;44(Suppl 172):241pp.
80. Copeland BE. Quality control. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. Clinical chemistry. Theory, analysis, and correlation, 2nd ed. St. Louis: C. V. Mosby Company, 1989:270-289.
81. Westgard JO. Selecting appropriate quality-control rules [Letter]. Clin Chem 1994;40:499-500.
82. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A Multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem 1981;27:493-501.
83. Cembrowski GS, Westgard JO, Kurtycz DFI. Use of anion gap for the quality control of electrolyte analyzers. Am J Clin Path 1983;79:688-96.
84. Fraser CG. Analytical goals are applicable to all. JIFCC 1990;2:84-6.
85. Franzini C. Le differenze critiche in funzione della variabilità biologica ed analitica: una tabella ed un nomogramma. Biochim Clin 1990;14:1155-7.

86. Franzini C. La variabilità biologica costituisce una utile guida per la definizione dei traguardi analitici, e per una migliore valutazione dei risultati espressi in forma numerica. Biochim Clin 1992;16:747-54.
87. Leone L. Organizzazione di un laboratorio di farmacocinetica clinica. In: Furlanut M, Segre G, eds. Monitoraggio dei livelli ematici dei farmaci. Vicenza: ISIS, 1981:293-303.
88. Hoffmann RG, Waid ME. The "average of normals" method of quality control. Am J Clin Pathol 1965;43:134-41.
89. Amador E, Hsi BP, Massod MF. An evaluation of the "average of normals" and related methods of quality control. Am J Clin Pathol 1968;50:369-78.
90. Begtrup H, Leroy S, Thyregod P, Walloe-Hansen P. "Average of normals" used as control of accuracy, and a comparison with other controls. Scand J Clin Lab Invest 1971;27:247-53.
91. Cembrowski GS, Chandler EP, Westgard JO. Assessment of "average of normals" quality control procedures and guidelines for implementation. Am J Clin Path 1984;81:492-9.
92. Cembrowsky GS, Westgard JO, Eggert AA, Toren EC Jr. Trend detection in control data: optimization and interpretation of Trigg's technique for trend analysis. Clin Chem 1975;21:1396-405.
93. Bull BS, Elashoff RM, Heilbron DC, Couperus J. A study of various estimators for the derivation of quality control procedures from patient erythrocyte indices. Am J Clin Pathol 1974;61:473-81.
94. Lunetzky ES, Cembrowsky GS. Performance characteristics of Bull's multirule algorithm for the quality control of multichannel hematology analyzers. Am J Clin Path 1987;88:634-8.
95. Tramacere P, Marocchi A, Gerthoux P, Beretta C, Brivio R, Mocarelli P. Inefficacy of moving average algorithm as principal quality control procedure in Technicon System H6000. Am J Clin Pathol 1991;95:218-21.
96. Jansen AP, van Kampen EJ, Leijnse B, Meijers CAM, van Munster PJJ. Experience in The Netherlands with an external quality control and scoring system for clinical chemistry laboratories. Clin Chim Acta 1977;74:191-203.
97. Buttner J, Borth R, Boutwell JH, Broughton PMG, Bowyer RC. Approved recommendation (1983) on quality control in clinical chemistry. Part 5. External quality control. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:885-92.
98. Raabo E, Odum L. External quality assessment in primary health care by using fresh whole blood. Clin Chem 1994;40:2223-6.
99. Stockl D. Desiderable performance criteria for quantitative measurements in medical laboratories based on biological analyte variation - hindrances to reaching some and reasons to surpass some [Letter]. Clin Chem 1993;39:1993-4.
100. Tietz NW. Accuracy in clinical chemistry - does anybody care? Clin Chem 1994;40:859-61.
101. Marcovina SM, Albers JJ, Dati F, Ledue TB, Ritchie RF. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. Clin Chem 1991;37:1676-82.
102. Albers JJ, Marcovina SM, Kennedy H. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. II. Evaluation and selection of candidate reference materials. Clin Chem 1992;38:658-62.
103. Marcovina SM, Albers JJ, Henderson LO, Hannon WH. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. III. Comparability of apolipoprotein A-I values by use of international reference material. Clin Chem 1993;39:773-81.
104. Marcovina SM, Albers JJ, Kennedy H, Mei JV, Henderson LO, Hannon WH. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B.

IV. Comparability of apolipoprotein B values by use of international reference material. Clin Chem 1994;40:586-92.
105. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM, Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlstrom A, Dati F, Ward MA, Svendsen JP. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). Clin Chem 1994;40:934-8.

Glossario

ACCURATEZZA
Grado di concordanza tra la misura di posizione di un insieme di misure ripetute (la media nel caso di una distribuzione gaussiana) e il → *valore vero*. Non ha valore numerico. Vedere → *inaccuratezza*.

ALIQUOTA
Porzione misurata di un intero, avente composizione omogenea e uguale a quella dell'intero da cui è tratta. Termine generale, che si riferisce a qualsiasi soluzione, campione, miscela, eccetera.

ANALITA
Vedere → *componente*.

ATTENDIBILITÀ
Concetto d'insieme che comprende tutte le proprietà di un metodo (come ad esempio la → *precisione*, la → *accuratezza*, la → *sensibilità* e la → *specificità*) che contribuiscono alla utilità clinica dei risultati ottenuti. Tanto maggiore è la attendibilità di un metodo, tanto più esso sarà utile dal punto di vista clinico.

AFFIDABILITÀ STRUMENTALE
Espressione utilizzata di norma con riferimento alla frequenza dei guasti strumentali.

CALIBRATORE
Vedere → *materiale di calibrazione*.

CALIBRAZIONE
Procedimento mediante il quale si mette in rapporto il valore letto sullo strumento (la → *lettura strumentale*) con la grandezza che si intende misurare.

CAMPIONE ANALITICO
La → *aliquota* del → *campione in esame* ricevuto dal laboratorio che è utilizzata per la analisi. È opportuno aggiungere al termine "campione" l'attributo "analitico" onde evitare confusione con il termine statistico "campione", che indica un sottoinsieme estratto da una popolazione.

CAMPIONE DI CONTROLLO
Campione che è analizzato esclusivamente a scopo di controllo di qualità, e non per calibrazione.

CAMPIONE IN ESAME
Il tipo di materiale disponibile per la analisi. Esempi: campione di sangue, campione di siero, campione di urine, campione di liquido cerebrospinale, eccetera.

CAMPO ANALITICO
Vedere → *intervallo analitico*.

COEFFICIENTE DI VARIAZIONE
Vedere → *deviazione standard relativa*.

COMPONENTE
Qualsiasi costituente del → *campione in esame* misurato a scopo diagnostico. Può essere un elemento, uno ione, un composto, una sostanza, un fattore, un agente di infezione, una cellula, un organello; o una attività enzimatica, ormonale o immunologica; o una sostanza o proprietà di cui si debbano misurare la concentrazione, l'attività, l'intensità o altre caratteristiche.

CONTROLLO
Vedere → *materiale di controllo*.

CONTROLLO DI CALIBRAZIONE
L'insieme delle procedure di → *controllo di qualità* che consentono di verificare la corretta → *calibrazione* di un sistema analitico prima dell'avvio del processo analitico.

CONTROLLO DI QUALITÀ
L'insieme di tutte le procedure che consentono di garantire la qualità dell'aspetto tecnico del prodotto "analisi di laboratorio", cioè la qualità del processo analitico.

CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO
Espressione sconsigliata. Vedere l'espressione consigliata → *valutazione esterna della qualità*.

CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO
L'insieme delle procedure di → *controllo di qualità* eseguite quotidianamente, per tutti gli analiti, a più livelli di concentrazione per ciascun analita, al fine di ottenere un segnale di allarme in tempo reale al verificarsi di un → *errore* nella serie analitica, e di monitorare la → *imprecisione* e la → *inaccuratezza* del metodo analitico.

CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO ALLARGATO
Precedura di → *controllo di qualità* consistente nella elaborazione complessiva dei risultati del → *controllo di qualità interno* provenienti da laboratori che utilizzano tutti lo/gli stesso/i materiale/i di controllo.

CONTROLLO DI SISTEMA
Procedura di → *controllo di qualità* che prevede il controllo, prima dell'avvio del processo analitico, delle funzioni meccaniche, ottiche e/o elettroniche del sistema analitico. Non comporta l'utilizzo di materiali di controllo. Un esempio di controllo di sistema è il controllo delle lunghezze d'onda di uno spettrofotometro mediante filtro di olmio.

CONTROLLO DI VALIDITÀ
Procedura di → *controllo di qualità* che consente di verificare la corretta esecuzione di ogni singolo test mediante un controllo cablato nel test stesso (esempio: controllo positivo e/o negativo incluso nei test immunoenzimatici su striscia). Il controllo di validità è prevalentemente orientato alla rilevazione degli → *sbagli*.

CQ
Sigla utilizzata per indicare il → *controllo di qualità*.

CQA
Sigla utilizzata per indicare il → *controllo di qualità interno allargato*.

CQI
Sigla utilizzata per indicare il → *controllo di qualità interno*.

CV
Sigla utilizzata per indicare il → *coefficiente di variazione*.

DATO ABERRANTE
Vedere → *risultato aberrante*.

DEVIAZIONE STANDARD
La misura di dispersione di una distribuzione gaussiana.

DEVIAZIONE STANDARD RELATIVA
Rapporto tra la → *deviazione standard* e la → *media* di una distribuzione gaussiana. La deviazione standard relativa consente di rendere confrontabili tra di loro le deviazioni standard corrispondenti a medie diverse. Moltiplicato per 100, il rapporto tra la deviazione standard e la media viene denominato → *coefficiente di variazione*.

ERRORE
Differenza tra una singola misura di una grandezza e il suo → *valore vero*. Questa differenza o deviazione (positiva o negativa) può essere espressa sia nelle unità in cui è misurata la grandezza, sia come percentuale del valore vero. Se il valore vero non è conosciuto, la differenza può essere espressa come deviazione da un → *valore assegnato*. Ripetendo più volte una misura, è possibile pervenire ad una migliore caratterizzazione dell'errore: vedere → *errore casuale* ed → *errore sistematico*.

ERRORE CASUALE
L'errore per cui, nel caso di misure replicate della stessa grandezza, le singole misure differiscono casualmente, cioè senza nessuna regola apparente al succedersi delle misure stesse, tra di loro. L'errore casuale viene stimato dalla → *imprecisione*.

ERRORE GROSSOLANO
Vedere → *sbaglio*

ERRORE SISTEMATICO
L'errore per cui un insieme di misure ripetute della stessa grandezza, preso come un tutt'uno, si discosta dal → *valore vero*. L'errore sistematico viene stimato dalla → *inaccuratezza*.

IMPRECISIONE
Misura di dispersione di un insieme di misure ripetute. Nel caso di una distribuzione gaussiana come misura di dispersione viene utilizzata la → *deviazione standard*. È necessario indicare il valore medio

e il numero delle repliche, e descrivere il piano sperimentale in modo che altri operatori lo possano ripetere. Ciò è particolarmente importante qualora si utilizzi un termine specifico per indicare un particolare tipo di imprecisione: ad esempio tra laboratori, nel giorno, tra giorni.

INACCURATEZZA
Differenza numerica tra la misura di posizione di un insieme di misure ripetute (la media nel caso di una distribuzione gaussiana) e il → *valore vero*. La differenza, positiva o negativa, può essere espressa sia nelle unità in cui la grandezza è misurata, sia come percentuale del valore vero.

INTERFERENZA
Effetto indesiderato di un componente sulla → *accuratezza* della misura di un altro componente.

INTERVALLO ANALITICO
Intervallo di concentrazione, o altra grandezza del campione, nel cui ambito il metodo è applicabile senza alcuna modifica.

LETTURA STRUMENTALE
Valore (espresso in una qualsiasi scala numerica) del segnale fornito da uno strumento o dispositivo analitico.

LIMITE DI RIVELAZIONE
Il più piccolo valore di concentrazione di un analita che, con un livello di probabilità prestabilito, può essere differenziato dalla concentrazione zero (assenza di analita). Il limite di rivelazione definisce la concentrazione a partire dalla quale ha significato esprimere i risultati in termini quantitativi.

MATERIALE CERTIFICATO
Materiale le cui caratteristiche sono certificate da un organismo ufficiale.

MATERIALE DI CALIBRAZIONE
Materiale impiegato per la → *calibrazione* di un sistema analitico. Un materiale di calibrazione non può essere utilizzato a scopo di controllo.

MATERIALE DI CALIBRAZIONE PRIMARIO
Materiale impiegato per la → *calibrazione* di un sistema analitico, e la cui concentrazione è determinata esclusivamente sciogliendo una quantità pesata di un → *materiale standard primario* in un volume o peso prestabilito di un solvente appropriato.

MATERIALE DI CALIBRAZIONE SECONDARIO
Materiale impiegato per la → *calibrazione* di un sistema analitico, e la cui concentrazione è stata determinata mediante analisi con un metodo analitico avente → *inaccuratezza* nota.

MATERIALE DI CONTROLLO
Materiale usato per effettuare il → *controllo di qualità*. Un materiale di controllo non può essere utilizzato a scopo di calibrazione.

MATERIALE STANDARD PRIMARIO
Sostanza di composizione chimica nota, e di purezza sufficiente per consentirne l'impiego nella preparazione di un → *materiale di calibrazione primario*.

MEDIA
La misura di posizione di una distribuzione gaussiana.

METODO ANALITICO
L'insieme delle procedure che consentono di ottenere, su un determinato campione, il risultato analitico. Il metodo analitico viene codificato mediante istruzioni scritte, che descrivono i materiali, il procedimento e la strumentazione necessari per ottenere un risultato.

METODO DEFINITIVO
Un metodo che, per convenzione, viene assunto in grado di fornire il → *valore vero*. Nel caso di specie molecolari definite, il metodo definitivo è quello che, dopo esauriente ricerca, e per accordo generale, viene considerato ideale sia in termini di → *inaccuratezza* che in termini di → *imprecisione*.

METODO DI INACCURATEZZA IGNOTA
Un metodo analitico la cui → *inaccuratezza* è ignota.

METODO DI INACCURATEZZA NOTA
Un metodo analitico per il quale è stata determinata la direzione e l'entità della → *inaccuratezza* (questa può essere addirittura uguale a zero).

METODO DI RIFERIMENTO
Un → *metodo di inaccuratezza nota* rispetto al → *metodo definitivo* e che, per le sue caratteristiche di maggior praticabilità, viene utilizzato per il trasferimento della → *accuratezza* dal metodo definitivo al → *metodo di routine*.

METODO DI ROUTINE
Metodo analitico di uso corrente. L'accuratezza del metodo di routine viene garantita, a partire dal → *metodo definitivo* e dal → *metodo di riferimento*, attraverso l'utilizzo di appropriati materiali di calibrazione e di controllo. Il metodo di routine deve fornire il → *valore vero* con un → *errore* contenuto entro limiti prestabiliti.

PRECISIONE
Grado di concordanza tra misure ripetute. Non ha valore numerico. Vedere → *imprecisione*.

RISULTATO
Valore finale ottenuto per una grandezza misurata con un metodo analitico; comprende anche le valutazioni del laboratorio.

RISULTATO ABERRANTE
Risultato che, in un insieme di risultati, si discosta dagli altri in misura tale da rendere assai improbabile la sua appartenenza all'insieme stesso.

RIVELABILITÀ
Capacità di un metodo analitico di evidenziare piccole quantità di un componente. Non ha valore numerico. Vedere → *limite di rivelazione*.

SBAGLIO
Accidente tecnico. Gli sbagli sono legati prevalentemente all'organizzazione (esempi di sbagli in chimica clinica possono essere l'errata trascrizione di un dato numerico, l'utilizzo di un reagente scaduto, lo sbaglio nell'identificazione del campione). Contrariamente a quanto avviene per gli errori, gli sbagli si possono evitare operando con cura, e migliorando il sistema organizzativo. Contrariamente a quanto avviene per gli errori, non è possibile fissare un livello di tolleranza per gli sbagli, cioè definire una percentuale ammissibile di sbagli: semplicemente, gli sbagli, per definizione, non si devono verificare.

SENSIBILITÀ
Riferita a un metodo analitico, la sensibilità è il rapporto tra la variazione del segnale strumentale e la variazione della concentrazione dell'analita. In pratica la sensibilità misura la pendenza della curva di calibrazione. Riferita a un test diagnostico per una data malattia, la sensibilità è la percentuale di soggetti malati in cui il test è positivo. Un test ideale ha una sensibilità del 100% (è positivo in tutti i malati).

SERIE ANALITICA
Insieme di test eseguiti consecutivamente, senza interruzione, i cui risultati vengono calcolati sulla base della medesima procedura di → *calibrazione*, e validati sulla base della medesima procedura di → *controllo di qualità interno.*

SISTEMA ANALITICO
L'insieme della strumentazione, dei materiali di calibrazione e dei materiali di controllo con i quali è possibile produrre e riprodurre un determinato risultato analitico.

SOLUZIONE DI CONTROLLO
Vedere → *materiale di controllo*.

SOLUZIONE STANDARD PRIMARIA
Vedere → *materiale di calibrazione primario*.

SOLUZIONE STANDARD SECONDARIA
Vedere → *materiale di calibrazione secondario*.

SPECIFICITÀ
Riferita a un metodo analitico, la specificità è la capacità del metodo di determinare esclusivamente il componente o i componenti che si debbono misurare. Non ha valore numerico. È valutata in base alle informazioni disponibili sui componenti che contribuiscono al risultato, e al grado con cui essi vi contribuiscono. Riferita a un test diagnostico per una data malattia, la specificità è la percentuale di soggetti sani in cui il test è negativo. Un test ideale ha una specificità del 100% (è negativo in tutti i sani).

STANDARD
Vedere → *materiale di calibrazione*.

STANDARD INTERNO
Una sostanza normalmente assente nel campione in esame e chiaramente distinguibile dalla sostanza da analizzare, che è aggiunta in quantità nota al campione o anche allo standard di calibrazione, allo scopo di correggere i risultati, e di ottenere una migliore → *accuratezza* del risultato.

STANDARD PRIMARIO
Vedere → *materiale standard primario* e → *materiale di calibrazione primario*.

STANDARD SECONDARIO
Vedere → *materiale di calibrazione secondario*.

TARATURA
Vedere → *calibrazione*.

TRASCINAMENTO
Influenza di un campione sul successivo (nella letteratura inglese "carry-over"). In italiano è possibile utilizzare anche l'espressione "interazione tra campioni".

VALORE
(di concentrazione o altri tipi di grandezza, nei materiali di calibrazione, nei campioni di controllo, eccetera). Occorre dichiarare sempre il metodo con il quale è stato ottenuto il valore. Il termine è impiegato in numerose espressioni, come ad esempio → *valore aberrante*, → *valore assegnato*, → *valore certificato*, → *valore definitivo*, → *valore del metodo di riferimento*, → *valore dichiarato*, → *valore vero*.

VALORE ABERRANTE
Vedere → *risultato aberrante*.

VALORE ASSEGNATO
Valore assegnato o arbitrariamente (ad esempio per convenzione), o in base a una serie di misure aventi accuratezza nota o ignota (ad esempio in assenza di un metodo di riferimento riconosciuto).

VALORE CERTIFICATO
Valore certificato da un organismo ufficiale, secondo i criteri stabiliti dall'organismo stesso.

VALORE DEFINITIVO
Valore assegnato a un materiale mediante un → *metodo definitivo*: rappresenta la migliore stima disponibile del → *valore vero*.

VALORE DEL METODO DI RIFERIMENTO
Valore assegnato a un materiale mediante un → *metodo di riferimento*: rappresenta una stima del → *valore vero* di qualità lievemente inferiore a quella fornita dal → *metodo di definitivo*.

VALORE DICHIARATO
Valore senza certificazione ufficiale.

VALORE MISURATO
Sinonimo di → *valore sperimentale*.

VALORE DI RIFERIMENTO
Valore che fa parte di un insieme di dati utilizzati per calcolare gli intervalli di riferimento. Non va confuso con il → *valore del metodo di riferimento*.

VALORE SPERIMENTALE
Valore numerico ottenuto mediante un procedimento di misura.

VALORE TROVATO
Sinonimo → *valore sperimentale*.

VALORE VERO
Valore che si otterrebbe nel corso di una misura, se il procedimento di misura non fosse affetto da incertezza.

VALORE VERO CONVENZIONALE
È, per convenzione, la migliore stima disponibile del valore vero, fornita dai valori del → *metodo definitivo*; un'approssimazione di qualità lievemente inferiore è fornita dai valori del → *metodo di riferimento*.

VALUTAZIONE ESTERNA DELLA QUALITÀ
Procedura che utilizza, ai fini del → *controllo di qualità*, i risultati di laboratori che, in un'area geografica più o meno estesa, analizzano materiali di controllo appositamente distribuiti. La valutazione esterna della qualità consente di ottenere una misura della efficacia delle procedure di controllo di qualità adottate.

VEQ
Sigla utilizzata per indicare la → *valutazione esterna della qualità*.

Capitolo 12
Cronologia medica

(M. Besozzi)

Questa breve cronologia medica illustra in modo conciso alcune tappe fondamentali della storia della medicina. Tra queste sarà possibile notare i contributi con i quali il laboratorio, inteso nel senso profondo di disciplina sperimentale, che per prima ha saputo introdurre una forte connotazione scientifica negli studi medici, ha contributo allo sviluppo della medicina moderna. Quando non è disponibile l'anno esatto cui si riferiscono l'opera, o la scoperta, o il merito attribuito al personaggio, sono riportati anno di nascita e anno di morte.

La cronologia è integrata da tutti i *premi Nobel per la medicina* assegnati tra il 1901 (anno di inizio del premio) e il 2001 (mancano alcuni anni attorno ai due conflitti mondiali, nei quali i premi non sono stati assegnati). Sono stati infine aggiunti alla cronologia i *premi Nobel per la chimica*, limitatamente a quelli (che alcuni lettori troveranno peraltro inaspettatamente numerosi) assegnati per scoperte che hanno consentito di chiarire fondamentali meccanismi molecolari in campo biochimico.

Sul sito ufficiale della Fondazione Nobel

http://www.nobel.se/

sono presenti tutte le informazioni sulle motivazioni dei premi e le note biografiche dei personaggi vincitori dei premi.

Altre biografie e link a siti con biografie di scienziati si possono trovare alla *Purdue University*

http://www.ipfw.edu/ipfwhist/indiana/biogmedi.htm

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
15000 A.C.			Disegno di “stregone/guaritore” nelle grotte del periodo aurignaziano
5000 A.C.			Crani con segni di perforazione e di guarigione (callo osseo) in varie culture tra loro indipendenti (pre-incaica, egizia)
3400 A.C.			Segni di spondilite tubercolare in mummie egiziane
3000 A.C.			Sigillo di un medico sumero
3000 A.C.	*Imhotep*	*3000 A.C.*	Egiziano, è forse il primo medico di cui si abbia notizia
3000 A.C.	*Sekhet’enanach*	*3000 A.C.*	Medico egiziano che, come si legge in un papiro, “...guarì le narici del re...”
3000 A.C.	*Shen Nung*	*3000 A.C.*	Scrive il “Pen Tsao”, il grande libro delle piante medicinali
2650 A.C.	*Huang Ti*	*2650 A.C.*	Autore del “Nei Ching”, nel quale sembra vi siano cenni che fanno intendere che i cinesi scoprirono la circolazione del sangue quasi tremila anni prima di Harvey
2000 A.C.			Dalla Bibbia si sa che esistevano le levatrici e si usavano le seggiole da parto. Si parla della peste. Si parla della lebbra. Abbondano i precetti di igiene personale. L’unico intervento chirurgico citato è la circoncisione
1900 A.C.			Nel codice di Hammurabi si legge “se il medico, aprendo un ascesso con un coltello di bronzo, uccide il paziente o distrugge la vista dell’occhio, gli saranno tagliate le mani...[se il paziente è uno schiavo] rimpiazzerà lo schiavo al padrone con un altro schiavo”
1500 A.C.			Dal più antico libro sanscrito, il “Rig-Veda” si sa che le malattie erano combattute con magie e incantesimi
1250 A.C.	*Esculapio*		Opera a Delfi, abbondano le descrizioni di guarigioni miracolose a lui attribuite
500 A.C.	*Alcmeone*		Fa parte della scuola pitagorica, descrive il nervo ottico e la tromba di Eustachio
400 A.C.	*Ippocrate*		Scrive oltre cento volumi di medicina: buonsenso e acutezza di previsione sono ancor oggi attuali

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
300 A.C.	*Erofilo*		Della scuola di Alessandria, disegna il il duodeno, conta le pulsazioni, e forse per primo esegue in pubblico la diisezione del corpo umano
30	*Celso*		Nell'opera "De medicina" descrive i quattro segni della flogosi: calor, rubor, tumor e dolor
115÷205	*Hua Tu*	*115÷205*	Chirurgo cinese, scopritore dell'anestesia, prima di operare dava ai pazienti una bevanda narcotica (Cannabis?)
131÷200	*Galeno*	*131÷200*	Riconosce l'importanza dell'anatomia, effettua studi sperimentali di sezione del midollo spinale sugli animali, dimostra che il taglio del nervo ricorrente causa la perdita della voce. I suoi insegnamenti dominano la medicina per i successivi 1200 anni
200÷300 circa	*Sant'Antonio*	*200÷300 circa*	Da lui prende il nome il "fuoco di Sant'Antonio", attribuito oggi ad epidemie di ergotismo causate dalla consumazione di pane preparato con grano contaminato dalla Claviceps purpurea o segale conuta
250÷350 circa	*San Vito*	*250÷350 circa*	Da lui prende il nome la malattia che, inizialmente attribuita al morso della tarantola, va identificata con la corea
600÷700 circa	*San Gallo*	*600÷700 circa*	Pratica la cura con erbe
800÷900 circa	*Hunàin ibn Ishaq*	*800÷900 circa*	Scrive "Dieci trattazioni sull'occhio", il primo trattato di oftalmologia. A Baghdad viene costruito l'ospedale
980÷1037	*Avicenna*	*980÷1037*	Scrive "Il canone della medicina"
936÷1013	*Albucasis*	*936÷1013*	Chirurgo, descrive la litotomia e il trattamento di fratture e lussazioni
1200÷1300 circa			Opera la scuola medica Salernitana, che lascia i famosi consigli d'igiene
1300÷1400 circa			Opera la scuola medica di Montpellier. Si operano i calcoli salivari, le emorroidi e le fistole anali
1316	*Mondino de' Luzzi*	*1275÷1326*	Scrive "Anathomia", il primo trattato sull'argomento

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1500÷1570	*Pierre Franco*	*1500÷1570*	Esegue la litotomia per via sovrapubica, descrive l'ernia strozzata
1510÷1580	*Ingrassia*	*1510÷1580*	Medico napoletano, distingue il morbillo dalla scarlattina
1510÷1590	*Ambroise Parè*	*1510÷1590*	Le guerre forniscono materiale abbondante al più grande chirurgo del rinascimento
1523÷1562	*Gabriele Falloppio*	*1523÷1562*	Scopre le trombe che portano il suo nome
1530	*Hieronimus Fracastorius*	*1483÷1553*	Descrive la sifilide nel libro "Syphilis, sive morbus Gallicus"
1540÷1599	*Gaspare Tagliacozzi*	*1540÷1599*	Trapianta lembi di pelle dal braccio al naso per ricostruirlo
1543	*Andrea Vesalio*	*1514÷1564*	Pubblica "De humani corporis fabrica", che apre la storia della medicina moderna. Emblematicamente lo stesso anno viene pubblicato "De rivolutionibus orbium coelestium" di Niccolò Copernico.
1545	*Thomas Phayre*	*1510÷1560*	Scrive "Boke of children", la prima opera di pediatria in inglese
1546	*Hieronimus Fracastorius*	*1483÷1553*	Publica "De contagione", parla di "seminaria" per indicare le entità che causano contagio, precedendo di tre secoli la dimostrazione dei batteri
1550			Il primo libro di medicina stampato in Inghilterra riguarda la peste "A passing gode lityll boke necessarye and behovefull against the pestilence"
1557			Nasce a Londra il "Royal College of Physicians"
1559	*Realdo Colombo*	*1519÷1599*	Nel "De re anatomica" descrive la circolazione polmonare del sangue
1560÷1631	*Peter Chamberlen*	*1560÷1631*	Inventa il forcipe: il segreto viene tramandato di padre in figlio per 125 anni
1561÷1636	*Sanctorius Sanctorius*	*1561÷1636*	Realizza il primo termometro clinico, un trequarti con cannula per la tracheotomia, e il "pulsilogium", orologio per la misura del polso
1593÷1674	*Nicolas Tulp*	*1593÷1674*	Descrive il beri-beri
1614÷1700	*Franciscus Sylvius*	*1614÷1700*	Dimostra che la fermentazione con produzione di gas è soltanto un processo chimico che svolge nell'organismo

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1618	*Sir Theodore Turquet*	*1573÷1655*	Pubblica la prima farmacopea, introduce l'uso del calomelano e della lozione mercuriale
1622÷1676	*Richard Wiseman*	*1622÷1676*	Descrive la scrofula, la tubercolosi dei gangli linfatici, dai tempi di Clodoacro (500 circa) detta "male del re" in quanto si riteneva che potesse guarire se toccata da un re. Luigi XIV avrebbe "toccato" migliaia di persone. La pratica terminò solamente alla fine del 1700
1624÷1689	*Thomas Sydenham*	*1624÷1689*	Descrive in modo magistrale gotta e morbillo, somministra ferro agli anemici, introduce l'uso della scorza di china nel trattamento della febbre malarica
1627	*Gaspare Aselli*	*1581÷1622*	Scopre i vasi chiliferi
1627÷1691	*Robert Boyle*	*1627÷1691*	Dimostra che nel vuoto le candele non ardono e gli animali non possono vivere
1628	*William Harvey*	*1578÷1657*	Scopre la circolazione del sangue, pubblicata nella "Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus"
1631÷1691	*Richard Lower*	*1631÷1691*	Pratica le prime trasfusioni
1632÷1723	*Antony Van Leewenhoek*	*1632÷1723*	Descrive i capillari nella coda del girino, i globuli rossi, la striatura delle fibre muscolari, i batteri e i protozoi
1641÷1673	*Regnier De Graaf*	*1641÷1673*	Scopre il follicolo "di Graaf" nell'ovaio
1647	*Jan Pecquet*		Dimostra che i vasi chiliferi si collegano con la corrente sanguigna
1654	*Francis Glisson*	*1597÷1677*	Pubblica "Anatomia hepatis", nel quale descrive per la prima volta la capsula epatica
1664	*Thomas Willis*	*1621÷1675*	Pubblica "Cerebri anatome", una delle prime descrizioni del cervello
1674÷1750	*Jean Louis Petit*	*1674÷1750*	Esegue per primo con successo un intervento su un ascesso della mastoide
1684	*Francesco Redi*	*1626÷1698*	Dimostra che le larve di mosca non si generano spontaneamente dalla carne putrescente
1700	*Bernardino Ramazzini*	*1633÷1714*	Pubblica "De morbis artificium diatriba", la prima opera di medicina del lavoro
1716÷1794	*James Lind*	*1716÷1794*	Scrive "A tretise of the scurvy", trattato sullo scorbuto

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1722÷1802	*Sir John Baker*	*1722÷1802*	Dimostra che la colica del Devonshire è una forma di saturnismo causata dai tubi di piombo delle presse per il mosto
1726	*William Giffard*	*1690÷1759*	Usa per primo il forcipe inventato da Chamberlen
1729÷1799	*Lazzaro Spallanzani*	*1729÷1799*	Dimostra che i microrganismi non si sviluppano in recipienti che siano stati portati ad una temperatura elevata e quindi sigillati
1734÷1794	*Antoine Laurent Lavoisier*	*1734÷1794*	Scopre l'ossigeno e dimostra che l'aria inspirata contiene ossigeno mentre quella espirata contiene anidride carbonica
1739	*Sir Richard Manningham*		Istituisce cliniche per il ricovero delle partorienti
1739÷1794	*William Hewson*	*1739÷1794*	Dimostra l'esistenza dei vasi linfatici e ne spiega la funzione. Dimostra che la coagulazione del sangue è dovuta a una "linfa coagulabile" (l'attuale fibrinogeno). Descrive eritrociti e leucociti del sangue.
1741÷1779	*William Withering*	*1741÷1779*	Dimostra che l'idropisia conseguente a scompenso cardiaco può essere curata somministrando un estratto di digitale, da sospendere non appena si manifesta la nausea
1744	*John Fothergill*	*1712÷1780*	Con le sue "Observations on recovering a man dead in appearance, by distending the lungs with air" anticipa la respirazione artificiale
1750	*Sir John Pringle*	*1707÷1802*	Tra il 1750 e il 1752, in una serie di lezioni tenute alla Royal Society, parla per la prima volta di "sostanze antisettiche"
1752÷1832	*Antonio Scarpa*	*1752÷1832*	Celebre chirurgo ("triangolo dello Scarpa")
1755÷1843	*Samuel Haneman*	*1755÷1843*	Fonda l'omeopatia
1761	*Leopold Auenbrugger*	*1722÷1809*	Applica la percussione alla diagnosi delle malattie del petto
1771÷1830	*Ephraim McDowell*	*1771÷1830*	Esegue per primo con successo un'ovariectomia (senza anestesia e senza antisepsi)
1774÷1842	*Sir Charles Bell*	*1774÷1842*	Dimostra la differenza tra nervi sensitivi e nervi motori

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1778÷1872	*Pierre Bretonneau*	*1778÷1872*	Descrive la difterite, e utilizza per primo la tracheotomia nella laringite difterica
1785÷1853	*William Beaumont*	*1785÷1853*	Segue un paziente da lui curato per una ferita da arma da fuoco, cui era residuata una fistola gastrica, e getta le basi per la comprensione della fisiologia della digestione
1792÷1876	*Ernst von Ber*	*1792÷1876*	Fonda l'embriologia
1793÷1860	*Richard Addison*	*1793÷1860*	Distingue l'anemia attualmente nota come anemia perniciosa dall'anemia legata a diabete bronzino (attuale morbo di Addison)
1796	*Edward Jenner*	*1749÷1823*	Il 14 maggio vaccina James Phipps, un ragazzino di otto anni. Otto settimane più tardi inocula il vaiolo al ragazzo, senza che si manifesti la malattia.
1796÷1853	*Robert Graves*	*1796÷1853*	Descrive il gozzo tossico con esoftalmo
1799	*Sir Humphry Davy*		Osserva l'effetto inebriante del protossido d'azoto
1805÷1881	*Joseph Skoda*	*1805÷1881*	Getta le basi della semeiotica fisica moderna
1806÷1875	*Guillaume Benjamin Amand Duchenne*	*1806÷1875*	Getta le basi della moderna neurologia, identificando innumerevoli malattie fino ad allora misconosciute
1808	*Robert Willan*	*1757÷1812*	Pubblica "On cutaneous diseases", il primo tentativo di basare la dermatologia su basi scientifiche
1809÷1895	*Jacob Henle*	*1809÷1895*	Scopre i tubuli renali e descrive l'anatomia microscopica dell'occhio, è convinto che le malattie contagiose siano dovute a esseri viventi
1813÷1878	*Claude Bernard*	*1813÷1878*	Scopre il glicogeno, dimostra che il fegato produce zucchero, scrive "Introduction à l'ètude del la mèdicine expèrimentale"
1819	*Renè Thèophile Hyacinthe Laennec*	*1781÷1826*	Inventa lo stetoscopio
1821÷1894	*Hermann von Helmholtz*	*1821÷1894*	Determina la velocità di trasmissione degli impulsi nervosi, inventa l'oftalmoscopio, inizia lo studio della fisiologia dell'udito

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1822÷1895	*Luis Pasteur*	*1822÷1895*	Dimostra che la fermentazione è dovuta a microrganismi. Prepara il vaccino contro il carbonchio animale
1824÷1880	*Paul Broca*	*1824÷1880*	Scopre il centro motore del linguaggio
1825÷1901	*Pierre Carl Potain*	*1825÷1901*	Fa entrare la registrazione della pressione sanguigna mediante sfigmomanometro nella pratica quotidiana
1827	*Richard Bright*	*1789÷1858*	Dimostra che l'idropisia accompagnata da albuminuria è dovuta a nefrite
1827÷1861	*Henry Gray*	*1827÷1861*	La sua "Gray's anatomy" resta ancora oggi un'opera moderna
1827÷1912	*Joseph Lister*	*1827÷1912*	Scopre l'antisepsi. Usa acido fenico per disinfettare le ferite. Usa per primo il catgut per le suture.
1829÷1894	*Theodor Billroth*	*1829÷1894*	Fonda la chirurgia addominale. Per primo opera il cancro allo stomaco ed effettua la laringectomia.
1832÷1910	*Erns von Leyden*	*1832÷1910*	Preconizza il ricovero in sanatorio dei tubercolotici
1835	*Berzelius*	*1779÷1848*	Propone il termine "catalisi" per indicare l'azione che alcune sostanze esercitano su altre senza venir modificate
1841÷1912	*Armauer Hansen*	*1841÷1912*	Identifica l'agente eziologico della lebbra, all'epoca diffusissima in Norvegia
1843÷1913	*Reginald Heber Fitz*	*1843÷1913*	Definisce l'appendicite come entità morbosa
1844	*Horace Wells*	*1815÷1848*	Si fa estrarre un dente dopo inalazione di protossido d'azoto
1844÷1924	*Edoardo Bassini*	*1844÷1924*	Mette a punto la tecnica di intervento sull'ernia inguinale che porta ancora il suo nome
1846÷1901	*Giulio Bizzozero*	*1846÷1901*	Dimostra il legame tra sangue circolante e midollo emopoietico
1847	*James Young Simpson*	*1811÷1870*	Il 15 novembre utilizza per la prima volta il cloroformio per asportare parte del radio ad un ragazzo affetto da osteomielite
1847	*Philip Semmelweiss*	*1818÷1865*	Prescrive agli studenti che, dopo avere frequentato la sala settoria, si lavino le mani prima di visitare le puerpere: la febbre puerperale nel suo reparto cade dal 18% all'1%!

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1848÷1916	*Albert Fraenkel*	*1848÷1916*	Scopre lo pneumococco
1849	*Crawford Long*	*1815÷1878*	Pubblica il risultato di interventi di piccola chirurgia eseguiti dopo avere fatto inalare etere ai pazienti
1852÷1915	*Friederich Loeffler*	*1852÷1915*	Identifica il bacillo della difterite
1853÷1933	*Emile Roux*	*1853÷1933*	Perfeziona il siero antidifterico di Behring
1855	*Manuel Garcìa*	*1805÷1906*	Inventa il laringoscopio
1855÷1916	*Albert Neisser*	*1855÷1916*	Identifica il gonococco
1858			Con il “Medical Act” in Gran Bertagna il diritto di esercitare la professione sanitaria viene limitato agli iscritti all’albo dei medici
1858	*Rudolf Virchow*	*1821÷1902*	Con il libro “Patologia cellulare” spazza d’un colpo la vecchia “patologia umorale”. Enuncia il concetto per cui la patologia ha le basi nella cellula e getta le basi della diagnostica istologica
1859÷1923	*Sir Rickman Godlee*	*1859÷1923*	Asporta per primo un tumore cerebrale
1860	*Florence Nightingale*		Fonda la prima scuola per infermiere
1863÷1934	*Wilhelm His*	*1863÷1934*	Scopre l’origine degli stimoli che determinano la contrazione del cuore
1868	*Johan Ludwig Wilhwlm Thudichum*	*1829÷1901*	Scopre il pigmento giallo del corpo luteo e lo denomina “luteina”
1869			Viene introdotto il protossido d’azoto come anestetico
1871¸1910	*Howard Taylor Ricketts*	*1871¸1910*	Dimostra che il tifo petecchiale è causato da un microrganismo che non appartiene né ai batteri né ai protozoi
1877	*Max Nitze*	*1848÷1906*	Inventa il cistoscopio
1878	*Kühne*	*1837÷1900*	Introduce la denominazione di “enzimi”
1878	*Johan Ludwig Wilhelm Thudichum*	*1829÷1901*	Identifica lecitina e sfingomielinia
1880	*Marie Xavier Bichat*	*1771÷1802*	Fonda l’istologia
1881			Un trentesimo di tutta la letteratura mondiale riguarda argomenti di medicina
1882	*Robert Koch*	*1843÷1910*	Annuncia la scoperta del bacillo tubercolare
1882	*Sir Alexander Ogston*	*1844÷1929*	Identifica lo stafilococco e lo distingue dallo streptococco
1884	*Robert Koch*	*1843÷1910*	Scopre il vibrione colerico e dimostra che l’infezione è trasmessa con l’acqua potabile inquinata da feci

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1885	*Luis Pasteur*	*1822÷1895*	Il 6 luglio attua con successo il trattamento antirabico profilattico a Joseph Meister, un ragazzo alsaziano morso da un cane rabido
1890	*Robert Koch*	*1843÷1910*	Prepara la tubercolina
1890	*Emil Behring*	*1854÷1917*	Scopre il principio della sieroterapia e prepara il siero antidifterico, che porta ad una riduzione spettacolare della mortalità per questa malattia
1892	*William Henry Welch*	*1850÷1934*	Identifica l'agente eziologico della gangrena gassosa
1892	*Dimitri Ivanowsky*	*1851÷1920*	Dimostra per primo l'esistenza di un virus filtrabile, patogeno per le piante (il virus del mosaico del tabacco)
1893	*Felice Wesener*		Pubblica "Manuale di analisi chimica per la diagnosi delle malattie interne"
1894	*Alexandre Yersin*		Identifica il bacillo della peste indipendentemente da Kitasato
1894	*Shibasaburo Kitasato*	*1852÷1931*	Identifica il bacillo della peste. Con Behring prepara il siero antitetanico
1895	*Wilhelm Conrad Roentgen*	*1845÷1923*	Scopre i raggi X
1896	*Fernand Widal*		Mette a punto la prova sierologica per la diagnosi del tifo
1897	*Sir Ronald Ross*	*1857÷1922*	Dimostra la presenza dei parassiti malarico nello stomaco della zanzara anofele
1898	*Bernhard Naunyn*	*1839÷1925*	Pubblica la prima monografia sul diabete e descrive l'acidosi del diabete scompensato
1898	*Giovanni Grassi*	*1854÷1925*	Dimostra che l'anofele è la sola zanzara in grado di trasmettere la malaria
1900	*Sir Patrick Manson*	*1844÷1922*	Dimostra che la malaria viene trasmessa dal morso della zanzara esponendo il figlio al morso di una zanzara infetta
1900	*James Carrol*	*1854÷1907*	Si fa pungere con un collega da una stregomia (Aedes aegyptii) infetta, si ammala di febbre gialla, e guarisce (il suo collega Lazear muore). Dimostrate le modalità di trasmissione, la profilassi della malattia porta in pochi anni a successi notevoli.
1900	*Walter Reed*		Dimostra per primo l'esistenza di un virus patogeno per l'uomo (virus della febbre gialla)

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1901	*Emil Adolf von Behring*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del principio della sieroterapia, e la sua applicazione nella terapia della difterite
1902	*Sir Ronald Ross*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la malaria
1902	*Herman Emil Fischer*		Riceve il premio Nobel per la chimica per i suoi lavori sulla sintesi degli zuccheri e delle purine
1903	*Niels Ryberg Finsen*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la terapia di alcune malattie, e in particolare del lupus vulgaris con radiazione luminosa concentrata
1903	*Sir David Bruce*	*1855÷1931*	Dimostra che la malattia del sonno è dovuta ad un protozoo, ed è trasmessa dalla mosca tsè-tsè
1904	*Ivan Petrovich Pavlov*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la fisiologia della digestione
1905	*Robert Koch*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la tubercolosi
1905	*Fritz Richard Schaudinn*	*1871÷1906*	Scopre l'agente eziologico della sifilide (Treponema pallidum)
1906	*Camillo Golgi* *Santiago Ramón Y Cajal*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la struttura del sistema nervoso
1906	*August von Wassermann*	*1866÷1925*	Mette a punto la prova sierologica per la diagnosi della lue che porta il suo nome
1907	*Charles Louis* *Alphonse Laveran*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il ruolo dei protozoi come agenti causali di malattie infettive
1907	*Eduard Buchner*		Riceve il premio Nobel per la chimica per la scoperta della fermentazione in assenza di cellule
1908	*Ilya Ilyich Mechnikov* *Paul Ehrlich*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti l'immunità
1908	*Archibald Garrod*	*1857÷1936*	Pubblica "Inborn errors of metabolism", nel quale sviluppa il concetto di malattie determinate dalla carenza congenita di un enzima

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1908	*Wholghemuth*		Mette a punto un test per la determinazione della diastasi (attuale amilasi) nel siero e nelle urine
1909	*Emil Theodor Kocher*		Riceve il premio Nobel per la medicina per il lavoro su fisiologia, patologia e chirurgia della tiroide
1909	*Paul Ehrlich*	*1854÷1915*	Produce contro la sifilide un farmaco, il salvarsan, sostituito nel 1912 dal neosalvarsan, meno tossico, aprendo l'era della chemioterapia
1910	*Albrecht Kossel*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la chimica cellulare e le proteine, incluse le sostanze nucleiche
1911	*Allvar Gullstrand*		Riceve il premio Nobel per la medicina per il lavoro sulle diottrie dell'occhio
1912	*Alexis Carrel*		Riceve il premio Nobel per la medicina per il lavoro sulla sutura vascolare e il trapianto di vasi sanguigni e di organi
1913	*Charles Robert Richet*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti l'anafilassi
1914	*Robert Bárány*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la fisiologia e la patologia dell'apparato vestibolare
1919	*Jules Bordet*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti l'immunità
1920	*Schack August Steenberg Krogh*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del meccanismo di regolazione della circolazione capillare
1922	*Archibald Vivian Hill*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la produzione di calore nel muscolo
1922	*Otto Fritz Meyerhof*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta della relazione fissa tra consumo di ossigeno e metabolismo dell'acido lattico nel muscolo
1923	*Frederick Grant Banting John James Richard Macleod*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta dell'insulina
1924	*Willem Einthoven*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del meccanismo dell'elettrocardiogramma

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1926	*Johannes Andreas Grib Fibiger*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del carcinoma indotto dalla Spiroptera
1927	*Julius Wagner-Jauregg*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del valore terapeutico dell'inoculazione della malaria nel trattamento della demenza paralitica
1927	*Heinrich Otto Wieland*		Riceve il premio Nobel per la chimica per le sue ricerche sugli acidi biliari
1928	*Charles Jules Henri Nicolle*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il tifo
1928	*Adolf Otto Reinhold Windaus*		Riceve il premio Nobel per la chimica per le sue ricerche sugli steroli e il loro collegamento con le vitamine
1929	*Christiaan Eijkman*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta della vitamina antineuritica
1929	*Sir Frederick Gowland Hopkins*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta delle vitamine stimolanti la crescita
1929	*Sir Arthur Harden* *Hans Karl August Simon von Euler*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per le loro ricerche sulla fermentazione degli zuccheri e sugli enzimi della fermentazione
1930	*Karl Landsteiner*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta dei gruppi sanguigni
1930	*Karl Fisher*		Riceve il premio Nobel per la chimica per le sue ricerche sulla struttura dell'eme e della clorofilla e per la sintesi dell'eme
1931	*Otto Heinrich Warburg*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta della natura e dei meccanismi d'azione degli enzimi respiratori
1932	*Sir Charles Scott Sherrington* *Edgar Douglas Adrian*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti le funzioni dei neuroni
1933	*Thomas Hunt Morgan*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il ruolo dei cromosomi nell'ereditarietà
1934	*George Hoyt Whipple* *George Richards Minot* *William Parry Murphy*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la terapia con estratti epatici in alcune anemie

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1935	*Hans Spemann*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta dell'organizzazione dello sviluppo embrionale
1936	*Sir Henry Hallett Dale* *Otto Loewi*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti la trasmissione chimica degli impulsi nervosi
1937	*Albert von Szent-Györgyi Nagyrapolt*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le sue scoperte riguardanti i processi di combustione biologica, della vitamina C e della catalisi dell'acido fumarico
1937	*Sir Walter Norman Haworth*		Riceve il premio Nobel per la chimica per le sue ricerche sui carboidrati e sulla vitamina C
1937	*Paul Karrer*		Riceve il premio Nobel per la chimica per le sue ricerche sui carotenoidi, sulla flavine, sulla vitamina A e sulla vitamina B_2
1938	*Corneille Jean François Heymans*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del ruolo del meccanismo sinusale e aortico nella regolazione della respirazione
1938	*Richard Kuhn*		Riceve il premio Nobel per la chimica per i suoi lavori sui carotenoidi e sulle vitamine
1939	*Gerhard Domagk*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta dell'attività antibatterica del prontosil
1939	*Adolf Friederich Johann Butenandt*		Riceve il premio Nobel per la chimica per i suoi lavori sugli ormoni steroidei del sesso
1943	*Henrik Carl Peter Dam*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta della vitamina K
1943	*Edward Adelbert Doisy*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta della natura chimica della vitamina K
1944	*Joseph Erlanger* *Herbert Spencer Gasser*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti le funzioni delle fibre nervose
1945	*Sir Alexander Fleming* *Ernst Boris Chain* *Sir Howard Walter Florey*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta della penicillina e del suo valore terapeutico

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1946	*Hermann Joseph Muller*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta delle mutazioni indotte dai raggi X
1946	*James Batcheller Sumner*		Riceve il premio Nobel per la chimica per la scoperta che gli enzimi possono essere cristallizzati
1946	*John Howard Northrop* *Wendell Meredith Stanley*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per la preparazione di proteine enzimatiche e virali in forma purificata
1947	*Carl Ferdinand Cori* *Gerty Theresa Cori* *Renée Radnitz*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta delle vie metaboliche del glicogeno
1947	*Bernardo Alberto Houssay*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del ruolo degli ormoni dell'ipofisi anteriore nel metabolismo del glucosio
1948	*Paul Hermann Müller*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta dell'efficacia del DDT nella lotta contro artropodi e insetti vettori di malattie
1948	*Arne Wilhelm Kaurin Tiselius*		Riceve il premio Nobel per la chimica per le sue ricerche sull'elettroforesi e la scoperta della natura complessa delle proteine del siero
1949	*Walter Rudolf Hess*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il mesencefalo e le sue funzioni di coordinamento degli organi interni
1949	*Antonio Caetano De Abreu Freire Egas Moniz*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il valore terapeutico della lobotomia in certe psicosi
1950	*Edward Calvin Kendall* *Tadeus Reichstein* *Philip Showalter Hench*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti gli ormoni della corteccia surrenale, la loro struttura e la loro azione biologica
1951	*Max Theiler*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la febbre gialla e il modo di combatterla
1952	*Selman Abraham Waksman*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta della streptomicina, il primo antibiotico attivo nei confronti del bacillo tubercolare

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1953	*Hans Adolf Krebs*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del ciclo dell'acido citrico
1953	*Fritz Albert Lipmann*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del coenzima-A e della sua importanza nel metabolismo intermedio
1953	*Francis Harry Compton Crick* *James Dewey Watson*		Pubblicano su Nature la struttura del DNA
1954	*John Franklin Enders* *Thomas Huckle Weller* *Frederick Chapman Robbins*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta che il virus della poliomielite può crescere in colture di tessuti
1955	*Axel Hugo Theodor Theorell*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti natura e meccanismo d'azione degli enzimi ossidanti
1955	*Vincent du Vignaud*		Riceve il premio Nobel per la chimica per i suoi studi sui composti organici contenenti zolfo e per la sintesi, per la prima volta, di un ormone polipeptidico
1956	*André Frédéric Cournand* *Werner Forssmann* *Dickinson W. Richards*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la cateterizzazione cardiaca e gli studi di emodinamica
1956	*Joe Hin Tjio* *Albert Levan*		Dimostrano che il corredo cromosomico umano è costituito da 46 cromosomi
1957	*Daniel Bovet*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le sue scoperte in campo farmacologico
1957	*Lord Alexander R. Todd*		Riceve il premio Nobel per la chimica per gli studi sui nucletidi e sui coenzimi nucleotidici
1958	*George Wells Beadle* *Edward Lawrie Tatum*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta che i geni agiscono regolando eventi chimici definiti
1958	*Joshua Lederberg*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti l'organizzazione del materiale genetico nei batteri e la ricombinazione genica
1958	*Frederick Sanger*		Riceve il premio Nobel per la chimica per i suoi studi sulla struttura delle proteine, e in particolare dell'insulina

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1959	*Jerome Lejeune*		Dimostra che la sindrome di Down è causata dalla presenza di tre cromosomi 21 (in luogo dei due del corredo cromosomico normale)
1959	*C. E. Ford*		Dimostra che la sindrome di Turner è causata dalla assenza di un cromosoma del sesso (cariotipo 45,X in luogo del cariotipo 46,XX della femmina normale e del cariotipo 46,XY del maschio normale)
1959	*P. A. Jacobs* *J.A. Strong*		Dimostrano che la sindrome di Klinefelter è causata dalla presenza di un cromosoma X sovrannumerario (cariotipo 47,XXY in luogo del cariotipo 46,XX della femmina normale e del cariotipo 46,XY del maschio normale)
1959	*Severo Ochoa* *Arthur Kornberg*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti i meccanismi di sintesi del DNA e dell'RNA
1960	*P. C. Nowell* *D. A. Hungerford*		Descrivono la presenza del cromosoma Philadelphia nella leucemia mieloide cronica, dimostrando per la prima volta l'associazione tra cromosomi e cancro
1960	*Sir Frank Macfarlane Burnet* *Peter Brian Medawar*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta della tolleranza immunologica acquisita
1961	*Georg von Békésy*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti i meccanismi fisici di stimolazione all'interno della coclea
1962	*Francis Harry Compton Crick* *James Dewey Watson* *Maurice Hugh* *Frederick Wilkins*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la struttura molecolare degli acidi nucleici e il suo significato per il trasferimento dell'informazione nelle cellule
1962	*Max Ferdinand Perutz* *Sir John Cowdery Kendrew*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per i loro studi sulla struttura tridimensionale delle proteine
1963	*Sir John Carew Eccles* *Alan Lloyd Hodgkin* *Andrew Fielding Huxley*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti i meccanismi ionici coinvolti nei fenomeni di eccitazione e di inibizione della membrana cellulare delle cellule nervose

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1964	*Konrad Bloch* *Feodor Lynen*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il metabolismo del colesterolo e degli acidi grassi
1965	*François Jacob* *André Lwoff* *Jacques Monod*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il controllo genetico della produzione di enzimi e di virus
1966	*Peyton Rous*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta dei virus oncogeni
1966	*M. W. Steele W. R. Bragg*		Dimostrano che le cellule del liquido amniotico possono essere coltivate e utilizzate per lo studio del cariotipo fetale (diagnosi prenatale)
1966	*Charles Brenton Huggins*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperte riguardanti il trattamento ormonale del carcinoma della prostata
1967	*Ragnar Granit Haldan* *Keffer Hartline* *George Wald*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la fisiologia e la biochimica della visione
1968	*Robert W. Holley* *Har Gobind Khorana* *Marshall W. Nirenberg*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la funzione del codice genetico nella sintesi proteica
1969	*Max Delbrück* *Alfred D. Hershey* *Salvador E. Luria*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti i meccanismi di replicazione e la struttura genetica dei virus
1970	*Sir Bernard Katz* *Ulf von Euler* *Julius Axelrod*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti i neurotrasmettitori
1971	*Earl W. Sutherland, Jr.*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti il meccanismo d'azione degli ormoni
1972	*Gerald M. Edelman* *Rodney R. Porter*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la struttura chimica degli anticorpi
1972	*Christian B. Afinsen*		Riceve il premio Nobel per la chimica per gli studi sulla ribonucleasi, e in particolare sulla relazione tra sequenza di amminoacidi e conformazione biologicamente attiva

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1972	*Stanford Moore* *William H. Stein*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per i loro contributi alla comprensione della relazione tra struttura chimica e attività catalitica del sito attivo della ribonucleasi
1973	*Karl von Frisch* *Konrad Lorenz* *Nikolaas Tinbergen*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti l'etologia
1973	*S. M. Feinstone* *A. Z. Kapikian* *L. H. Purcell*		Dimostrano la presenza del virus dell'epatite A nelle feci durante la fase acuta della malattia
1974	*Albert Claude Christian de Duve* *George E. Palade*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti l'organizzazione strutturale e funzionale della cellula
1975	*David Baltimore* *Renato Dulbecco* *Howard Martin Temin*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti l'interazione tra virus tumorali e genoma
1976	*Baruch S. Blumberg* *D. Carleton Gajdusek*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti nuovi meccanismi per l'origine e la diffusione delle malattie infettive
1976			La prima diagnosi prenatale mediante tecnica di biologia molecolare viene messa a punto per l'α^0-talassemia
1977	*Roger Guillemin* *Andrew V. Schally*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la produzione di ormoni peptidici nel cervello
1977	*Rosalyn Yalow*		Riceve il premio Nobel per la medicina per lo sviluppo dei test radioimunologici degli ormoni peptidici
1978	*Werner Arber* *Daniel Nathans* *Hamilton O. Smith*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta degli enzimi di restrizione e la loro applicazione a problemi di genetica molecolare
1979	*Allan M. Cormack* *Godfrey N. Hounsfield*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per lo sviluppo della tomografia assiale computerizzata (TAC)
1980	*Baruj Benacerraf* *Jean Dausset* *George D. Snell*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti le strutture geneticamente determinate alla superficie delle cellule che regolano le reazioni immunitarie

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1980	*Paul Berg*		Riceve il premio Nobel per la chimica per i suoi studi sulla biochimica degli acidi nucleici
1980	*Walter Gilbert* *Frederick Sanger*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per i loro contributi alla determinazione della sequenza della basi negli acidi nucleici
1981	*Roger W. Sperry*		Riceve il premio Nobel per la medicina per le scoperte riguardanti la specializzazione funzionale degli emisferi cerebrali
1981	*David Hubel* *Torsten N. Wiesel*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti il processo delle informazioni nel sistema visivo
1982	*Sune K. Bergström* *Bengt I. Samuelsson* *John R. Vane*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti le prostaglandine e le sostanze biologicamente attive ad esse correlate
1982	*Sir Aaron Klug*		Riceve il premio Nobel per la chimica per lo sviluppo della microscopia elettronica cristallografica e per la scoperta della struttura dei complessi acido nucleico-proteine
1983	*Barbara McClintock*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta degli elementi genetici mobili
1984	*Niels K. Jerne* *Georges J.F. Köhler* *César Milstein*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti la specificità dello sviluppo e del controllo del sistema immunitario e per la scoperta del principio di produzione degli anticorpi monoclonali
1985	*Michael S. Brown* *Joseph L. Goldstein*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti la regolazione del metabolismo del colesterolo
1985	*R. K. Saiki* *S. Scharf* *F. Faloona* *K. B. Mullis* *G. T. Horn* *H. A. Erlich* *N. Arnheim*		Mettono a punto la reazione polimerasi ca a catena (PCR), che rivoluziona la biologia molecolare e la diagnostica

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1986	*Stanley Cohen* *Rita Levi-Montalcini*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta dei fattori di crescita
1986			Viene reso disponibile su larga scala un vaccino anti-epatite B prodotto mediante la tecnica del DNA ricombinante
1987	*Susumu Tonegawa*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta del principio genetico alla base della diversificazione degli anticorpi
1988	*Sir James W. Black* *Gertrude B. Elion* *George H. Hitchings*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la loro scoperta di importanti principi attivi per il trattamento farmacologico
1988	*Johann Deisenhofer* *Robert Huber* *Hartmut Michel*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per la determinazione della struttura tridimensionale di un centro di reazione fotosintetico
1989	*J. Michael Bishop* *Harold E. Varmus*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la loro scoperta dell'origine cellulare degli oncogeni retrovirali
1989	*Sidney Altman* *Thomas R. Cech*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per la scoperta della proprietà catalitiche dell'RNA
1990	*Joseph E. Murray* *E. Donnall Thomas*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti il trapianto di organi e di cellule nel trattamento delle malattie
1991	*Erwin Neher* *Bert Sakmann*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti la funzione dei canali ionici nelle cellule
1991	*Richard R. Ernst*		Riceve il premio Nobel per la chimica per lo sviluppo della spettroscopia a risonanza magnetica (NMR) ad alta risoluzione
1992	*Edmond H. Fischer* *Edwin G. Krebs*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti la fosforilazione reversibile delle proteine come meccanismo di regolazione
1993	*Richard J. Roberts* *Phillip A. Sharp*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per lo loro scoperta dei geni splittati
1993	*Kary B. Mullis*		Riceve il premio Nobel per la chimica per l'invenzione della reazione polimerasica a catena (PCR)

Quando	*Chi*	*Vissuto...*	*Cosa…*
1993	*Michael Smith*		Riceve il premio Nobel per la chimica per i suoi studi sulla mutagenesi
1994	*Alfred G. Gilman* *Martin Rodbell*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta delle proteine-G e del ruolo che hanno nella trasduzione del segnale nelle cellule
1995	*Edward B. Lewis* *Christiane Nüsslein-Volhard* *Eric F. Wieschaus*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti il controllo genetico delle fasi precoci dello sviluppo embrionale
1996	*Peter C. Doherty* *Rolf M. Zinkernagel*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte riguardanti la specificità dell'immunità cellulo-mediata
1997	*Stanley B. Prusiner*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta dei prioni
1997	*Paul D. Boyer* *John F. Walker*		Ricevono il premio Nobel per la chimica per avere chiarito il meccanismo enzimatico soggiacente alla sintesi dall'ATP
1997	*Jens J. Skou*		Riceve il premio Nobel per la chimica per la prima scoperta di un enzima trasportatore di ioni, la Na^+/K^+ ATPasi.
1998	*Robert F. Furchgott* *Louis J. Ignarro* *Ferid Murad*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per la scoperta che l'ossido di azoto (NO) è una messaggero nel sistema cardiovascolare
1999	*Günter Blobel*		Riceve il premio Nobel per la medicina per la scoperta che le proteine possiedono segnali intrinseci che ne governano il trasporto e la localizzazione nella cellula
2000	*Arvid Carlsson* *Paul Greengard* *Eric R. Kandel*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte sulla trasduzione dei segnali nel sistema nervoso
2001	*Leland H. Hartwell* *R. Timothy Hunt* *Sir Paul M. Nurse*		Ricevono il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte sui regolatori del ciclo cellulare

Appendice
Istruzioni per l'utilizzo del CD-ROM

Requisiti di sistema 587
Installazione del software necessario per consultare il CD-ROM 588
Installazione di Explorer® 5.5 588
Installazione di Chime® 2.03 589
Installazione di Acrobat Reader® 4.0 (versione 4.05b) 590
Installazione di Excel Viewer® 8.0 590
Installazione di Access Snapshot Viewer® 9.0 591
Installazione del software accessorio disponibile sul CD-ROM 591
Installazione di ISIS Draw® 2.2.1 592
Installazione di Word Viewer® 97 592
Esecuzione del software che non richiede installazione disponibile sul CD-ROM 593
Esecuzione di RasMol® 2.5 593
Avvio e utilizzo del CD-ROM 594

Requisiti di sistema

Per utilizzare il CD-ROM allegato è richiesto un PC con le seguenti caratteristiche:

- processore Pentium a 200 mHz o superiore;
- 32 Mb di RAM (vivamente consigliati 64 Mb);
- 400 Mb di spazio libero su disco se si dispone già di un browser dell'ultima generazione, con supporto degli script Java (Explorer 5.5 o Netscape 4.x);
- 600 Mb di spazio libero su disco se è necessario installare il browser;
- monitor a colori, e scheda grafica che supporta il formato 800x600 pixel a 65536 colori (selezionare *Risorse del computer*, selezionare *Pannello di controllo*, selezionare *Schermo*, selezionare *Impostazioni*, e controllare che nella *Tavolozza dei colori* sia impostato il valore *65536*, e nell'*Area del desktop* sia impostato *800x600 pixel*);
- scheda audio;
- lettore CD-ROM (consigliato almeno 32x);
- sistema operativo a 32 bit Windows 95®, Windows 98®, Windows NT® 4.0, Windows 2000®, Windows XP®

➢ modem (raccomandato modem a 56 kb/secondo);
➢ collegamento con un provider Internet.

Installazione del software necessario per consultare il CD-ROM

Nei punti seguenti viene illustrato come installare il software presente sul CD-ROM nella cartella *Programmi*, e necessario per consultare il CD-ROM stesso.

Prima di utilizzare il CD-ROM è necessario installare i programmi e i plug-in necessari per la corretta visualizzazione delle pagine, seguendo le procedure descritte qui di seguito.

ATTENZIONE: si consiglia vivamente di riavviare il sistema al termine dell'installazione di qualsiasi nuovo programma, anche se questo non è previsto dalla installazione guidata del programma stesso!

Per installare il software è necessario accedere al CD-ROM, seguendo attentamente questa semplice ma fondamentale procedura:
➢ chiudere tutti i programmi in esecuzione;
➢ inserire il CD-ROM nel drive;
➢ attendere qualche istante (il tempo esatto dipende dal PC in uso), finché il CD-ROM, che parte automaticamente dopo il suo inserimento nel drive, non avrà aperto la pagina iniziale;
➢ chiudere il browser, facendo click sul pulsante contrassegnato dalla X che si trova nell'angolo superiore destro;
➢ selezionare dal desktop *Risorse del computer*;
➢ con il tasto destro del mouse fare click sul nome del drive (*D:* oppure *E:*) nel quale si trova il CD-ROM;
➢ selezionare *Esplora*, e procedere all'installazione dei plug-in e dei programmi come indicato ai punti successivi.

Installazione di Explorer® 5.5

Se NON si dispone di un browser dell'ultima generazione che supporta gli script Java…

installare il programma ***Explorer® 5.5*** con la seguente procedura:
➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *IE55*;
➢ fare doppio click sul file *ie5setup.exe*;
➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ dal menù *Start* (o *Avvio*) selezionare *Chiudi sessione…*;
➢ selezionare *Riavvia il sistema*;
➢ fare click sul pulsante *Si* per confermare;
➢ attendere lo spegnimento e il successivo riavvio del PC.

Explorer® è il browser, e consente sia di sfogliare il CD-ROM sia di connettersi via Internet a siti medici di grandissimo interesse, cui è possibile accedere semplicemente facendo click sugli indirizzi riportati nel CD-ROM stesso.

Installazione di Chime® 2.03

Se NON si dispone di Chime®… installare il programma ***Chime® 2.03*** con la seguente procedura:
➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *Chime*;
➢ fare doppio click sul file *ch203w32.exe*;
➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ dal menù *Start* (o *Avvio*) selezionare *Chiudi sessione…*;
➢ selezionare *Riavvia il sistema*;
➢ fare click sul pulsante *Si* per confermare;
➢ attendere lo spegnimento e il successivo riavvio del PC.

Chime® è un plug-in del browser, ed è necessario per visualizzare le immagini tridimensionali in movimento di macromolecole biologiche, sia quelle presenti sul CD-ROM sia quelle ottenibili via Internet. Quando si accede alle molecole mediante il browser, dopo avere installato Chime®, facendo click con il tasto destro del mouse su una macromolecola appare il menu di Chime® che consente di manipolare la molecola, cambiandone le modalità di rappresentazione, ruotandola, eccetera.

Installazione di AcrobatReader® 4.0 (versione 4.05b)

Se NON si dispone di Acrobat Reader®… installare il programma ***Acrobat Reader® 4.0*** (versione 4.05b) con la seguente procedura:

➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *Viewers*;
➢ accedere alla cartella *Acrobat*;
➢ fare doppio click sul file *ar405ita.exe*;
➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ dal menù *Start* (o *Avvio*) selezionare *Chiudi sessione…*;
➢ selezionare *Riavvia il sistema*;
➢ fare click sul pulsante *Si* per confermare;
➢ attendere lo spegnimento e il successivo riavvio del PC.

AcrobatReader® è il programma che consente di leggere file di testo in formato *pdf*, come i file del testo del libro riportato sul CD-ROM, e i file di documentazione (per esempio le *Linee Guida per i Test Genetici* dell'Istituto Superiore di Sanità incluse anch'esse nel CD-ROM).

Installazione di Excel Viewer® 8.0

Se NON si dispone di Excel® nella versione per Office '97 (o successive)… installare il programma ***Excel Viewer® 8.0*** con la seguente procedura:

➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *Viewers*;
➢ accedere alla cartella *Excel*;
➢ fare doppio click sul file *xlViewer.exe*;
➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ dal menù *Start* (o *Avvio*) selezionare *Chiudi sessione…*;
➢ selezionare *Riavvia il sistema*;
➢ fare click sul pulsante *Si* per confermare;
➢ attendere lo spegnimento e il successivo riavvio del PC.

Excel Viewer® è il programma che consente di leggere file *xls*, come per esempio il *Nomenclatore tariffario delle prestazioni ambulatoriali* incluso nel CD-ROM.

Installazione di Access Snapshot Viewer® 9.0

Se NON si dispone di Access® nella versione per Office '97 (o successive)… installare il programma ***Access Snapshot Viewer® 9.0*** con la seguente procedura:

➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *Viewers*;
➢ accedere alla cartella *Access*;
➢ fare doppio click sul file *Snpvw90.exe*;
➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ dal menù *Start* (o *Avvio*) selezionare *Chiudi sessione…*;
➢ selezionare *Riavvia il sistema*;
➢ fare click sul pulsante *Si* per confermare;
➢ attendere lo spegnimento e il successivo riavvio del PC.

Access Snapshot Viewer® è il programma che consente di leggere file *mdb*, come per esempio i file che contengono gli effetti di circa 5.000 farmaci sulle analisi di laboratorio, inclusi nel CD-ROM.

Installazione del software accessorio disponibile sul CD-ROM

Oltre ai programmi riportati nella sezione precedente, che sono indispensabili per potere consultare il CD-ROM, nella cartella Programmi potrete trovare tre altri programmi che possono essere installati a piacimento.

Installazione di ISIS Draw® 2.2.1

Per installare il programma ISIS Draw® 2.2.1…

➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *ISIS Draw*;
➢ fare doppio click sul file *draw221.exe* (che contiene il programma);
➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *ISIS Draw*;
➢ fare doppio click sul file *help221.exe* (che contiene il manuale on-line del programma);
➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ dal menù *Start* (o *Avvio*) selezionare *Chiudi sessione…*;
➢ selezionare *Riavvia il sistema*;
➢ fare click sul pulsante *Si* per confermare;
➢ attendere lo spegnimento e il successivo riavvio del PC.

ISIS Draw® 2.1.1 è un programma che consente di disegnare molecole organiche, incluse sequenze di amminoacidi e di nucleotidi, e di rappresentarle sia in piano sia in modo tridimensionale. Dispone di una libreria di molecole già disegnate. Le prestazioni del programma sono veramente notevoli, anche se richiede un poco di pazienza per l'apprendimento soprattutto delle funzioni più avanzate, apprendimento peraltro facilitato dalla disponibilità on-line del manuale. Le immagini realizzate con ISIS Draw® possono essere copiate e incollate direttamente nel testo di un wordprocessor (come ad esempio Word® per Windows®.

Installazione di Word Viewer® 97

Per installare il programma Word Viewer® 97…

➢ accedere alla cartella *Programmi*;
➢ accedere alla cartella *Viewers*;
➢ accedere alla cartella *Word*;
➢ fare doppio click sul file *wd97wvr32.exe*;

➢ seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal programma di installazione guidata;
➢ uscire dal programma di installazione guidata;
➢ dal menù *Start* (o *Avvio*) selezionare *Chiudi sessione…*;
➢ selezionare *Riavvia il sistema*;
➢ fare click sul pulsante *Si* per confermare;
➢ attendere lo spegnimento e il successivo riavvio del PC.

Chi non disponesse di Word® per Windows® può installare Word Viewer® 97, che consente di leggere i file *doc* del noto wordprocessor di Microsoft®.

Esecuzione del software che non richiede installazione disponibile sul CD-ROM

Esecuzione di RasMol® 2.5

Per utilizzare il programma RasMol® 2.5… che può essere eseguito direttamente da CD-ROM, in quanto non richiede installazione:
➢ accedere alla cartella *Programmi;*
➢ accedere alla cartella *RasMol;*
➢ fare doppio click sul file *rw32b2a.exe*.

RasMol® 2.5 consente di ottenere rappresentazioni tridimensionali delle macromolecole biologiche, e di manipolarle direttamente sullo schermo, tramite un particolare linguaggio. La struttura della molecola che si vuole rappresentare deve essere contenuta in un file *pdb*, un particolare formato ASCII. I file *pdb* sono ottenibili su Internet, all'indirizzo riportato nel CD-ROM nella sezione riservata ai siti. L'immagini può essere esportata da RasMol® in formato *bmp* o in formato *gif*, quindi ulteriormente manipolata mediante uno dei numerosi programmi per il trattamento delle immagini disponibili in commercio per essere inclusa in un testo.

Avvio e utilizzo del CD-ROM

Per consultare il CD-ROM è necessario disporre di un browser, ovvero di un programma che consente la navigazione ipertestuale all'interno di pagine Web.

Se non si dispone sul proprio PC di un browser (come Explorer® o Netscape®), o se è probabile che il browser installato sia obsoleto, e non supporti gli script Java, tornare alla sezione **Installazione del software necessario per consultare il CD-ROM** all'inizio di questa appendice, e seguire le procedure ivi descritte per installare il browser Explorer 5.5 incluso nel CD-ROM.

Prima di utilizzare il CD-ROM accertarsi di avere installato, oltre al browser, i programmi e i plug-in necessari per la corretta visualizzazione delle pagine, seguendo le procedure descritte sempre nella sezione **Installazione del software necessario per consultare il CD-ROM** all'inizio di questa appendice.

Se sul PC è installato un browser, il CD-ROM si avvia automaticamente al suo inserimento nel drive (attendere qualche secondo perché ciò possa avvenire). Qualora l'opzione di avvio automatico fosse disabilitata, riabilitarla da Windows® ovvero, in alternativa, accedere al drive che contiene il CD-ROM e fare doppio click sul file *Index.htm*.

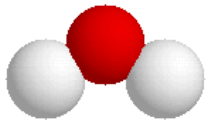
All'avvio il CD-ROM si apre sulla pagina iniziale. In una finestra di testo scorrevole viene ricordata ancora una volta la necessità, prima di procedere, di installare i programmi e i plug-in necessari per la corretta visualizzazione delle pagine.

ATTENZIONE: per gli utenti di Windows 2000, è necessario installare la versione di Chime® che si trova nella cartella *Programmi\Aggiornamenti\Chime*, il file si chiama file *Chime26SP3.exe*. Gli altri aggiornamenti presenti nella cartella *Programmi/Aggiornamenti* possono essere utilizzati al bisogno. Consigliabile l'installazione di Explorer® 6 (che peraltro NON è possibile per gli utenti di Windows 95®), che comunque può essere effettuata in qualsiasi momento, anche dopo l'installazione di Explorer 5.5.

Marco Besozzi

LE BASI DELLA MEDICINA DI LABORATORIO PER LA PRATICA MEDICA

© 2002 PMS Pubblicazioni Medico Scientifiche



Oltre al testo completo del volume, potete consultare utili tabelle, visualizzare immagini (ad esempio delle immunoglobuline e del DNA), e ancora collegarvi a siti nei quali potete trovare informazioni nel settore della medicina di laboratorio sotto forma di documenti, di letteratura, di gallerie di immagini e filmati didattici e di programmi.

Prima di utilizzare il CD-ROM accertarsi di avere installato i programmi e i plug-in necessari per la corretta visualizzazione delle pagine seguendo le procedure descritte nell'appendice del libro.

Sopra, molecola di acqua in rotazione. A sinistra, dal DNA all'uomo, riprodotta per concessione di DOE Human Genome Program, che potete visitare al sito http://www.ornl.gov/hgmis.

Come si vede il contenuto è strutturato in quattro sezioni:

➢ la sezione testo contiene il testo completo del volume, in formato Acrobat®, che potrà essere direttamente sfogliato a video ovvero essere stampato[1], qualora si desideri disporre della copia di alcuni capitoli, ad esempio per esigenze didattiche (previa autorizzazione scritta dell'Editore[2]);

[1] Richiede l'installazione di Acrobat Reader®. Seguire le istruzioni specifiche per effettuare l'installazione del programma.

[2] Si rammenta che tutto il materiale è protetto da copyright e che pertanto non può essere riprodotto e/o distribuito in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta da parte dell'Editore. Tale autorizzazione può essere richiesta all'Editore preferenzialmente via posta (PMS Casella postale 207, 33100 Udine Centro UD) o via fax (0432487000); in alternativa può essere richiesta via e-mail info@pmsudine.it. Si rammenta che ogni violazione sarà perseguita a termini di legge.

- la sezione tabelle contiene le modalità di raccolta dei materiali biologici (che possono essere stampate ad esempio per fornire direttamente ai pazienti le istruzioni per la raccolta delle urine delle 24 ore, le istruzioni per la raccolta delle urine per l'urinocoltura, eccetera), le modalità di esecuzione del prelievo venoso, i valori decisionali (intervalli di riferimento, differenze critiche, eccetera), una raccolta di circa 5000 effetti possibili di farmaci sulle analisi di laboratorio[2,3], le tabelle che illustrano la dinamica di numerosi marcatori di infezione (dagli anticorpi anti-Salmonella a quelli diretti contro il virus di Epstein-Barr, dall'HBsAg all'RNA dell'epatite virale di tipo C), e molte altre utili tabelle, incluso il nomenclatore tariffario nazionale delle prestazioni ambulatoriali[2,4];
- la sezione immagini contiene alcune gallerie di immagini, come una completa raccolta delle tavole metaboliche che illustrano tutti i processi del metabolismo intermedio, una raccolta di immagini tridimensionali in rotazione di macromolecole biologiche[2,5], immagini di cariotipi e di FISH, immagini di alcuni comuni parassiti (protozoi e uova di elminti), e altro ancora;
- la sezione siti consente di collegarsi a siti Web che contengono corsi (sulla coagulazione, di biologia molecolare, di microbiologia, di virologia, di biostatistica), immagini (come ad esempio un atlante di anatomia patologica, un atlante di parassitologia, un atlante di virologia, eccetera), collegamenti con Enti e Istituzioni che forniscono quantità incredibili di informazioni sempre aggiornate nel settore della Medicina di Laboratorio.

Per accedere alle diverse sezioni, e iniziare la navigazione nel CD-ROM, collegandosi ove previsto con i siti Web riportati (per questo è necessario ovviamente disporre di un modem e dell'accesso a Internet), è sufficiente fare click sui collegamenti ipertestuali, che sono evidenziati dal carattere di colore blu sottolineato.

[3] Richiede l'installazione di Access Snapshot Viewer®. Seguire le istruzioni specifiche per effettuare l'installazione del programma.
[4] Richiede l'installazione di Excel Viewer®. Seguire le istruzioni specifiche per effettuare l'installazione del programma.
[5] Richiede l'installazione di Chime®. Seguire le istruzioni specifiche per effettuare l'installazione del programma.