

Sezione V: Appendice pratica

24. Determinazioni di laboratorio

Romolo Dorizzi

Bibliografia per intervalli di riferimento

Kratz A, Ferraro M, Sluss PM, Lewandrowski KB. Laboratory reference values. *N Engl J Med* 2004, 351: 1548-63.

Thomas L. *Clinical laboratory diagnostics*. TH-Books; Frankfurt 1998.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier's Saunders; St Louis 2006.

<http://www.aruplab.com/> (consultato: 20.09.2009)

Reference Intervals - MGH Clinical Laboratories. <http://mghlabtest.partners.org> (consultato: 20.09.2009)

24.a. Estradiolo

(per fisiologia, cfr cap 2a)

Determinazione

I metodi immunometrici indiretti (che richiedono una fase di estrazione) sono stati sostituiti in pratica da **metodi diretti** (che non richiedono estrazione). Nei metodi diretti, senza estrazione e fase cromatografica, lo steroide deve essere spiazzato dalle sue proteine leganti da agenti, che in passato erano di solito l'8-anilo-1-naftalene acido sulfonico, ed oggi sono, spesso, proprietari e quindi non noti. Alcuni metodi diretti presentano interferenze da parte della SHBG, che porta a sovrastima dell'estradiolo a concentrazioni basse di SHBG e sottostima a concentrazioni elevate.

Tutti i principali analizzatori automatici per immunometria sono in grado di misurare l'estradiolo mediante metodi eterogenei che non richiedono estrazione.

I risultati prodotti da metodi diversi sono poco confrontabili e la precisione dei metodi immunometrici nella misurazione delle basse concentrazioni è insoddisfacente.

Negli ultimi anni alcuni laboratori di riferimento impiegano metodi in HPLC-Spettrometria di Massa per misurare l'estradiolo nei bambini e nel maschio.

Tabella 24a.1
Estradiolo

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, RIA, IRMA.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 ore, a 2-8°C per 48 ore, a - 20°C per 6 mesi.		
Intervallo di riferimento	Età/fase	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza) * spettrometria di massa	Adulto	10-42 pg/mL*	-
	Prepubere	< 11 pg/mL*	< 36 pg/mL*
	Pubere	< 36 pg/mL*	10-249 pg/mL*
	Follicolare	-	30-100 pg/mL
	Picco	-	100-400 pg/mL
	Luteale	-	50-150 pg/mL
	Menopausa	-	12-199 pg/mL 2-21 pg/mL*
Massachusetts General Hospital	Adulto	< 50 pg/mL	-
	Follicolare	-	< 145 pg/mL
	Picco	-	112-443 pg/mL
	Luteale	-	< 241 pg/mL
	Menopausa	-	< 59 pg/mL

Thomas L	Adulto	1-7 pg/mL	-
	Prepubere	-	< 15 pg/mL
	Follicolare	-	30-300 pg/mL
	Picco	-	100-600 pg/mL
	Luteale	-	100-300 pg/mL
	Menopausa	-	< 10 pg/mL
Tietz	Adulto	10-50 pg/mL	-
	Prepubere	5-10 pg/mL	50-300 pg/mL
	Pubere	5-30 pg/mL	25-410 pg/mL
	Follicolare	-	20-150 pg/mL
	Picco	-	150-750 pg/mL
	Luteale	-	30-450 pg/mL
	Menopausa	-	< 20 pg/mL

Bibliografia

- Tai SS, Welch MJ. Development and evaluation of a reference measurement procedure for the determination of estradiol-17beta in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2005, 77: 6359-63.
- Dighe AS, Sluss PM. Improved detection of serum estradiol after sample extraction procedure. *Clin Chem* 2004, 50: 764-6.
- Cao Z, Swift TA, West CA, Rosano TG, Rej R. Immunoassay of estradiol: unanticipated suppression by unconjugated estradiol. *Clin Chem* 2004, 50: 160-5.
- Nelson RE, Grebe SK, OKane DJ, Singh RJ. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of estradiol and estrone in human plasma. *Clin Chem* 2004, 50: 373-84.
- Reinsberg J, Bätz O, Bertsch T, Bewarder N, Deschner W, Drescher V, et al. Precision and long-term stability of different estradiol immunoassays assessed in a multi-center quality control study. *Clin Lab* 2009, 55: 201-6.
- Sluss PM, Hayes FJ, Adams JM, Barnes W, Williams G, Frost S, et al. Mass spectrometric and physiological validation of a sensitive, automated, direct immunoassay for serum estradiol using the Architect. *Clin Chim Acta* 2008, 388: 99-105.

24.b. Progesterone

(per fisiologia, cfr cap 2b)

Determinazione

Oggi il metodo di riferimento è la GasCromatografia-Spettrometria di Massa, anche se nella pratica clinica sono impiegati dei **metodi immunometrici** che usano anticorpi specifici per il progesterone, preceduti o meno da una fase estrattiva con solventi organici per rimuovere le proteine vettrici (CBG ed albumina). I metodi isotopici usano anticorpi generati contro il progesterone 11α -emisuccinato coniugato con l'albumina bovina o contro altri steroidi in cui il legame con le proteine è stabilito in corrispondenza ad altri C (C3, C6, C7 e C20). Nei casi in cui si verificano *cross*-reazioni con altri corticosteroidi C21, si rende necessaria un'estrazione che consente un'efficace separazione dagli steroidi che sono molto più polari del progesterone. Il trizio, impiegato in passato per la determinazione del progesterone, è oggi sostituito dallo iodio. Alcuni metodi hanno mostrato una scarsa sensibilità, poiché la loro analogia strutturale tra immunogeno e tracciante ha causato un'affinità molto maggiore del progesterone "marcato" rispetto al progesterone presente nel campione biologico. Dal punto di vista tecnico sono state proposte numerose soluzioni per ottenere dei metodi rapidi, precisi ed accurati. La maggior parte di questi metodi impiegano acido anilino-naftalene-sulfonico o danazolo per separare il progesterone dalle proteine vettrici. Le provette rivestite di anticorpo e la fase solida magnetica consentono la separazione più semplice ed efficace.

I metodi più impiegati oggi sono, comunque, quelli **immunoenzimatici**, che non prevedono una fase di estrazione e usano come tracciante enzimi, come fosfatasi alcalina o perossidasi di rafano, e, per la rivelazione, substrati fluorescenti, fotometrici o luminescenti. Questi ultimi sono quelli usati soprattutto sulle piattaforme automatizzate con particelle paramagnetiche rivestite da traccianti come fluoresceina ed acridinio.

Tabella 24b.1
Progesterone

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, RIA, IRMA.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 ore, a 2-8°C per 48 ore, a -20°C per 6 mesi.		
Intervallo di riferimento	Età/fase	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	Adulto	0.3-1 ng/mL	-
	Prepubere	-	< 1 ng/mL
	Follicolare	-	0.2-0.8 ng/mL
	Luteale	-	4.1-23.7 ng/mL
	Menopausa	-	0.1-0.6 ng/mL

Massachusetts General Hospital	Adulto	<0.2-1.4 ng/mL	
	Follicolare	-	< 0.2 ng/mL
	Luteale	-	3-20 ng/mL
	Menopausa	-	<0.2-1.4 ng/mL
Thomas L	Prepubere	-	< 0.6 ng/mL
	Follicolare	-	< 1 ng/mL
	Luteale	-	> 8 ng/mL
	Menopausa	-	< 1 ng/mL
Tietz	Prepubere	-	7-52 ng/dL
	Follicolare	-	15-70 ng/dL
	Luteale	-	20-2500 ng/dL

Bibliografia

- Ratcliffe WA, Corrie JE, Dalziel AH, Macpherson JS. Direct ^{125}I -radioligand assays for serum progesterone compared with assays involving extraction of serum. *Clin Chem* 1982, 28: 1314-8.
- Lévesque A, Letellier M, Dillon PW, Grant A. Analytical performance of Bayer Immuno 1™ estradiol and progesterone assays. *Clin Chem* 1997, 43: 1601-9.
- Pesce MA, Bodourian SH, Sheehan M, Henkel CF. An automated biotin-streptavidin procedure for progesterone evaluation. *Clin Biochem* 1992, 25: 451-5.
- Anckaert E, Mees M, Schiettecatte J, Smitz J. Clinical validation of a fully automated $^{17}\beta$ -estradiol and progesterone assay (VIDAS) for use in monitoring assisted reproduction treatment. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40: 824-31.
- Stricker R, Eberhart R, Chevailler MC, Quinn FA, Bischof P, Stricker R. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. *Clin Chem Lab Med* 2006, 44: 883-7.

24.c. 17-OH-Progesterone e 17-OH-Pregnenolone

(per fisiologia, cfr cap 2c)

Determinazione

La determinazione diretta del **17OHP** senza una procedura di estrazione richiede l'impiego di un anticorpo molto specifico per minimizzare le *cross*-reazioni; vanno eliminate anche le interferenze con le proteine vettrici, poichè la CBG non è stata rimossa. Questo può essere ottenuto aggiungendo agenti bloccanti, come sodio salicilato, acido anilino-naftalene-sulfonico e danazolo, o abbassando il pH della reazione. Sono stati proposti metodi che impiegano anticorpi immobilizzati sulla provetta che sono diventati quelli più diffusi. Sono disponibili anche metodi immunoenzimatici, in cui il 17OHP presente nel campione compete con l'antigene marcato con perossidasi nei confronti dell'anticorpo anti-17OHP adsorbito su micro-piastra. La separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida e l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato ed il Cromogeno, sviluppa una colorazione che può essere rivelata. I metodi in gascromatografia-spettrometria di massa, nonostante le segnalazioni e le proposte, presentano ancora tali problematiche analitiche e necessità di competenza professionale da non essere alla portata dei laboratori clinici. Tuttavia, i progressi sono rapidi in questo ambito ed è possibile che presto tale tecnologia possa essere disponibile almeno nei centri più importanti.

Per il **17-OH-pregnenolone** non vi sono alternative accreditate alla HPLC-MS.

Tabella 24c.1
17-OH-Progesterone

Metodologia adottata	Immuno-enzimatica, RIA.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 ore, a 2-8°C per 48 ore, a -20°C per 6 mesi.		
Intervallo di riferimento	Età/fase	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	Neonato	7-77 ng/dL	
	4-30 giorni	7-106 ng/dL	
	1-11 mesi	3-90 ng/dL	13-106 ng/dL
	1-6 anni	4-115 ng/dL	
	7-9 anni	< 63 ng/dL	< 71 ng/dL
	10-12 anni	< 79 ng/dL	< 129 ng/dL
	13-15 anni	9-208 ng/dL	9-140 ng/dL
	16-17 anni	24-192 ng/dL	< 178 ng/dL
	> 18 anni	< 139 ng/dL	< 207 ng/dL
	Follicolare	-	15-70 ng/dL
	Luteale	-	35-290 ng/dL

Massachusetts General Hospital	Adulto	5-250 ng/dL	-
	Follicolare	-	20-100 ng/dL
	Picco	-	100-250 ng/dL
	Luteale	-	100-500 ng/dL
	Menopausa	-	< 70 ng/dL
Thomas L	Prepubere	-	< 1.5 ng/mL
	Follicolare	-	< 1 ng/mL
	Luteale	-	< 3.5 ng/mL
Tietz	Neonato	7-77 ng/dL	
	Adulto	27-199 ng/dL	-
	Follicolare	-	15-70 ng/dL
	Luteale	-	35-290 ng/dL

Tabella 24c.2
17-OH-PREGNENOLONE

Metodologia adottata	Spettrometria di massa Tandem		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL		
Volume minimo	500 µL		
Stabilità del campione	Il siero non è stabile a temperatura ambiente: il campione deve essere congelato immediatamente.		
Intervallo di riferimento	Età/fase	Maschio	Femmina
ARUP (Spettrometria di massa Tandem)	1-5 mesi	52-828 ng/dL	
	6-11 mesi	14-647 ng/dL	
	1-5 anni	10-100 ng/dL	
	6-12 anni	11-190 ng/dL	
	Pubertà	20-187 ng/dL	48-320 ng/dL
	Adulto	32-297 ng/dL	55-542 ng/dL
Tietz	Adulto	41-183 ng/dL	-
	Follicolare	-	45-1185 ng/dL
	Luteale	-	42-450 ng/dL
	Menopausa	-	18-48 ng/dL

Bibliografia

- Wallace MA. Analytical support for the detection and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Ann Clin Biochem* 1995 32: 9-27.
- Shindo N, Yamauchi N, Murayama K, Fairbrother A, Korlik S. Identification of 17-hydroxyprogesterone and other steroid hormones in saliva from a normal child and patients with congenital adrenal hyperplasia by plasmaspray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 1990, 4: 171-4.
- Wudy S, Hartmann M, Svoboda M. Determination of 17-hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchtop liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Horm Res* 2000, 53: 68-71.

- Lai CC, Tsai CH, Wu JY, Lin WD, Lee CC. Rapid screening assay of congenital adrenal hyperplasia by measuring 17-hydroxyprogesterone with high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. *J Clin Lab Anal* 2002, 16: 20-5.
- Tripathi V, Nara S, Chaube SK, Rangari K, Saroha A, Kariya KP, et al. Development of rapid and sensitive one-step direct enzyme linked immunosorbent assay for 17-alpha-OH-progesterone in serum. *J Immunoassay Immunochem* 2008, 29: 117-27.
- Khatun S, Nara S, Tripathi V, Rangari K, Chaube SK, Kariya KP, et al. Development of ELISA for measurement of progesterone employing 17-alpha-OH-P-HRP as enzyme label. *J Immunoassay Immunochem* 2009, 30: 186-96.
- Fiet J, Giton F, Boudi A, Boudou P, Soliman H, Villette JM, et al. Plasma 17-OH pregnenolone: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a new tracer 17-OH pregnenolone-3-oxycetyl-biotine with a radioimmunoassay using ¹²⁵I 17-OH pregnenolone-3-hemisuccinate-histamine. *Steroids* 2001, 66: 81-6.

24.d. Androgeni

(per fisiologia, cfr cap 2d)

Determinazione

Negli ultimi anni i metodi **immuno-enzimatici** hanno sostituito nel laboratorio clinico i metodi cromatografici per la determinazione del testosterone totale circolante (somma della quota libera e di quella legata alle proteine vettrici). Il metodo di riferimento rimane quello in gas-cromatografia accoppiato alla spettrometria di massa, mentre i singoli metodi immunometrici differiscono nel tipo di campione che richiedono, nel tipo di anticorpo e nella natura dello steroide, coniugato a proteine, usato per generare l'anticorpo. I metodi attualmente più diffusi sono quelli **diretti** (che non richiedono estrazione): lo steroide è spiazzato dalle proteine vettrici (albumina e SHBG) mediante salicilati, surfattanti, alterazioni di pH o di temperatura. Anche in questo caso la diffusione dei metodi diretti è legata ai loro vantaggi: velocità, necessità di volume ridotto di campione, eliminazione di reagenti isotopici. Alcuni di questi metodi hanno una sufficiente precisione ed una buona correlazione con i metodi GC-MS nei campioni provenienti da maschi adulti, ma spesso **non hanno sensibilità sufficiente per i campioni provenienti dalle femmine e dai soggetti prepuberi** ed hanno un'accuratezza non soddisfacente. Tutti gli immuno-dosaggi per la determinazione del testosterone hanno una **reazione crociata per il DHT** (fino al 5%), ma reazioni crociate trascurabili per gli altri androgeni. La massima specificità analitica è assicurata da anticorpi rivolti contro la posizione C19, con l'unica eccezione di alcuni 19-nor-steroidi che sono contenuti in alcuni anticoncezionali. Nella maggior parte delle situazioni cliniche è possibile stimare la concentrazione del testosterone anche se la sua misurazione non è preceduta dalla separazione del DHT, poiché la concentrazione di questo non supera il 10-20% della concentrazione di testosterone.

Il metodo di riferimento per la determinazione del **testosterone libero** è quello della dialisi ad equilibrio, di difficile esecuzione e quindi raramente impiegato. Gli altri metodi utilizzati, come la precipitazione del testosterone legato, il calcolo degli indici androgenici e, soprattutto, quello diretto dell'analogo, non sono affidabili, come concluso recentemente dall'*Expert Panel* istituito *ad hoc*.

L'*Endocrine Society* ha recentemente preparato uno *Statement* che conclude:

- i risultati relativi al testosterone possono essere interpretati solo conoscendo il metodo utilizzato, e l'intervallo di riferimento deve essere specifico per quel metodo;
- i referti devono essere pertanto corredati dalle informazioni relative al metodo utilizzato;
- i metodi diretti NON devono essere usati nella donna, nei bambini e nei pazienti ipogonadici;
- la comparabilità dei metodi NON è la stessa in tutti i campioni;
- la fase follicolare è il momento del ciclo più adatto per studiare un sospetto iperandrogenismo.

Queste conclusioni influenzeranno in futuro le modalità con cui il testosterone totale e il testosterone libero sono misurati dal laboratorista e sono interpretati dall'endocrinologo. È importante che entrambi siano consapevoli dei limiti di questi dosaggi, che i risultati ottenuti con i diversi metodi siano interpretati con cautela e che il laboratorio impieghi i metodi più accurati, anche se più impegnativi nell'esecuzione. Nel caso la concentrazione di testosterone totale non sia chiaramente dirimente per la diagnosi di ipogonadismo centrale (*zona grigia*), potrà essere eventualmente integrata con il calcolo della frazione libera, impiegando formule che utilizzano i dosaggi di testostero-

ne totale, albumina e SHBG (come quella utilizzabile presso <http://www.issam.ch/freetesto.htm>). Negli anni recenti è aumentato l'interesse nel **testosterone salivare**: poiché il testosterone salivare è separato completamente dalle proteine, la sua determinazione riflette la vera concentrazione dell'ormone attivo.

I metodi isotopici o comunque immunometrici hanno sostituito negli anni scorsi i metodi in Gas-Cromatografia o in Cromatografia Liquida che rimangono comunque i metodi di riferimento anche per gli altri steroidi. I metodi immunometrici consentono tempi rapidi, buona sensibilità, elevata specificità per il **DHEA-S** con scarse interferenze (comprese quelle del DEA). La determinazione del DHEA-S è eseguita *routinariamente* con metodi immunometrici diretti senza estrazione o cromatografia. In genere, i campioni sono analizzati con anticorpi generati contro il DHEA-3-emisuccinato accoppiato con albumina che reagisce completamente con DHEA non coniugato, ma solo minimamente con androstenedione (la concentrazione del DHEA-S è elevata e può essere quindi misurata direttamente nel plasma superando il problema delle interferenze diluendo il campione). Sono comunque oggi disponibili dei metodi non isotopici in fase omogenea (sia in Fluorescenza Polarizzata che Immuno-enzimatica) che possono essere automatizzati. Di converso, poiché la concentrazione del DHEA ha un ordine di grandezza 1000 volte inferiore a quella del DHEA-S, può essere misurata solo dopo una procedura di estrazione (con diclorometano ed etil acetato) o di separazione cromatografica.

L'**Androstenedione** è stato inizialmente misurato con metodi immunometrici triziati, dopo una preliminare fase di estrazione. Sono stati successivamente proposti metodi che impiegano isotopi iodati diretti o previa estrazione e successivamente metodi che si basano su analizzatori automatici in chemiluminescenza che sono oggi i più utilizzati.

Per il **Diidrotestosterone** (DHT), anche se sono stati messi a punto metodi in HPLC-MS, i metodi oggi più impiegati sono immunometrici diretti o previa estrazione.

Tabella 24d.1
Testosterone

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, IRMA, RIA, HPLC/MS (preferibile nelle femmine e nei bambini).		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 giorni, a 2-8°C per una settimana, a -20°C per 6 mesi.		
Intervallo di riferimento	Età	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza) *HPLC + Spettrometria di massa	Neonato	75-400 ng/dL*	20-64 ng/dL*
	7-9 anni	< 9 ng/dL*	< 15 ng/dL*
	10-11 anni	2-57 ng/dL*	2-42 ng/dL*
	12-13 anni	7-747 ng/dL*	6-64 ng/dL*
	14-15 anni	33-585 ng/dL*	9-49 ng/dL*
	16-17 anni	185-886 ng/dL*	8-83 ng/dL*
	vedi a lato	18-39 anni: 400-1080 ng/dL	18-30 anni: 8-54 ng/dL* 31-40 anni: 11-56 ng/dL
	vedi a lato	40-59 anni: 350-890 ng/dL	41-51 anni: 9-55 ng/dL
	vedi a lato	> 60 anni: 350-720 ng/dL	> 51 anni: 6-25 ng/dL
Massachusetts General Hospital		270-1070 ng/dL	6-86 ng/dL
Thomas L	Prepubere	1-4 nmol/L	< 2 nmol/L
	Adulto	12-30 nmol/L	0.2-1.3 nmol/L
Tietz	Prepubere	3-30 ng/dL	2-20 ng/dL
	Adulto	260-1000 ng/dL	15-70 ng/dL

Tabella 24d.2
DHEA-S

Metodologia adottata	Immuno-enzimatica, RIA.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 giorni, a 2-8°C per 48 ore, a - 20°C per 6 mesi.		
Intervallo di riferimento	Età	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	Neonato	108-607 µg/dL	
	4-30 giorni	32-431 µg/dL	
	1-11 mesi	3-124 µg/dL	
	1-4 anni	< 19 µg/dL	
	5-9 anni	4-116 µg/dL	6-93 µg/dL
	10-14 anni	22-332 µg/dL	22-255 µg/dL
	15-19 anni	88-483 µg/dL	63-373 µg/dL
	20-29 anni	280-640 µg/dL	65-380 µg/dL
	30-39 anni	120-520 µg/dL	45-270 µg/dL
	40-49 anni	95-530 µg/dL	32-240 µg/dL
	50-69 anni	42-310 µg/dL	15-200 µg/dL
> 70 anni	28-175 µg/dL	10-90 µg/dL	
Massachusetts General Hospital	Adulto	10-619 µg/dL	-
	Fertile	-	12-535 µg/dL
	Menopausa	-	30-260 µg/dL
Thomas L	Fertile	-	< 3000 µg/L
	Menopausa	-	< 1200 µg/L
Tietz	Neonato	12-254 µg/dL	10-248 µg/dL
	1 mese-5 anni	1-41 µg/dL	5-55 µg/dL
	6-9 anni	2.5-145 µg/dL	2.5-140 µg/dL
	10-11 anni	15-115 µg/dL	15-260 µg/dL
	12-17 anni	20-555 µg/dL	20-535 µg/dL
	18-30 anni	125-619 µg/dL	29-781 µg/dL
	31-50 anni	59-452 µg/dL	12-379 µg/dL
	>50 anni	20-413 µg/dL	30-260 µg/dL

Bibliografia

- Diver MJ. *Clinical Science Reviews Committee of the Association for Clinical Biochemistry. Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men. Ann Clin Biochem* 2006, 43: 3-12.
- Christ-Crain M, Meier C, Huber P, Zimmerli L, Trummler M, Muller B. *Comparison of different methods for the measurement of serum testosterone in the aging male. Swiss Med Wkly* 2004, 134: 193-7.
- Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. *Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. Clin Chem* 2003, 49: 1381-95.
- Herold DA, Fitzgerald RL. *Immunoassays for testosterone in women: better than a guess? Clin Chem* 2003, 49: 1250-1.
- Dhar TK, Muller C, Schoneshofer M. *Determination of dehydroepiandrosterone sulfate in plasma by a one-step enzyme immunoassay with a microtitre plate. Clin Chem* 1985, 31: 1876-9.
- Hsing AW, Stanczyk FZ, Bélanger A, Schroeder P, Chang L, Falk RT, et al. *Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16: 1004-8.
- Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, Aronson Friedman L, Patterson BH, Greenhut SF. *Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. Steroids* 2002, 67: 151-8.
- Owen WE, Roberts WL. *Performance characteristics of the IMMULITE 2000 androstenedione assay. Clin Chim Acta* 2007, 383: 168-71.
- Choi MH, Kim JN, Chung BC. *Rapid HPLC-electrospray tandem mass spectrometric assay for urinary testosterone and dihydrotestosterone glucuronides from patients with benign prostate hyperplasia. Clin Chem* 2003, 49: 322-5.
- Salerno R, Moneti G, Forti G, Magini A, Natali A, Saltutti C, Di Cello V, et al. *Simultaneous determination of testosterone, dihydrotestosterone and 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol by isotope dilution mass spectrometry in plasma and prostatic tissue of patients affected by benign prostatic hyperplasia. J Androl* 1988, 9: 234-40.
- Tang PW, Crone DL. *A new method for hydrolyzing sulfate and glucuronyl conjugates of steroids. Anal Biochem* 1989, 182: 289-94.
- Choi MH, Kim KR, Chung BC. *Simultaneous determination of urinary androgen glucuronides by high temperature gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. Steroids* 2000, 65: 54-9.

24.e. Gonadotropine

(per fisiologia, cfr cap 2e)

Determinazione

In ambito clinico sono impiegati solo metodi **immunometrici**, che in pochi anni sono passati da metodi radio-immunologici ed immunometrici, che richiedevano lunghe incubazioni, a metodi automatici, rapidi, precisi, specifici e di elevata sensibilità. Può considerarsi superato il problema della reattività crociata tra FSH e LH e delle due molecole con altre glico-proteine strutturalmente simili, come TSH ed hCG: questa è passata, infatti, da valori tra il 10 ed il 25% a valori < 1%. I metodi implementati sulla strumentazione automatica sono di norma quelli a “sandwich”, in cui un anticorpo è immobilizzato su provette, biglie di plastica, fibre di vetro od altro supporto, mentre il secondo anticorpo è legato ad un tracciante che può essere di natura diversa (enzimatico, fluorescente, chemiluminescente).

Anche per le gonadotropine la **calibrazione** è complessa, perché non è praticamente possibile produrre dei calibratori che rispecchino l'eterogeneità delle molecole di FSH e LH presenti in circolo nel singolo soggetto. I primi preparati sono stati ricavati dalle urine di donne in menopausa, mentre successivamente si è passati a materiale derivato dall'ipofisi con un grado di purificazione sempre maggiore. L'adozione di calibratori prodotti con tecnica ricombinante dovrebbe portare ad una maggiore confrontabilità dei diversi metodi, se non ad una maggiore validità dal punto di vista fisio-patologico. È importante tenere presente che **metodi diversi possono dare**, anche oggi, **valori diversi** di oltre il 50% anche quando calibrati con lo stesso materiale di riferimento. Complicazione ulteriore alla determinazione delle gonadotropine è data dalla variazione della composizione delle isoforme, non solo nel corso della vita, ma anche nel corso del ciclo mestruale, che influenza la loro riconoscibilità da parte dei diversi anticorpi.

La determinazione di **gonadotropine nelle urine** con metodi immunometrici non ha avuto grande diffusione, in quanto l'escrezione urinaria è fortemente influenzata dalla funzione renale; inoltre, il metodo di misura risente di variazioni di pH, concentrazione di sali ed interferenti. Notevole diffusione hanno invece avuto negli ultimi venti anni dispositivi immunometrici con rivelazione colorimetrica ad uso domestico, che consentono la rivelazione del picco dell'LH che nel ciclo “normale” si verifica 24-36 ore prima dell'ovulazione. I metodi commerciali, ampiamente impiegati nei centri in cui si praticano procedure come l'inseminazione artificiale e la raccolta di ovociti, presentano una difficoltà di esecuzione variabile e sono in grado di confermare l'ovulazione in una percentuale compresa tra il 50 ed il 100% dei casi.

Tabella 24e.1
Ormone Follicolo-Stimolante (FSH)

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, IRMA, RIA.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 8 ore, a 2-8°C per una settimana, a -20°C per 3 mesi.		
Intervallo di riferimento	Età/fase	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	Prepubere	< 2.6 U/L	< 4.4 U/L
	Pubere	1-7.4 U/L	1-9.1 U/L
	Adulto	1.5-12.4 U/L	-
	Follicolare	-	3.5-12.5 U/L
	Picco	-	4.7-21.5 U/L
	Luteale	-	1.7-7.7 U/L
	Menopausa	-	25.8-134.8 U/L
Massachusetts General Hospital	Adulto	1-12 U/L	-
	Follicolare	-	3-20 U/L
	Picco	-	9-26 U/L
	Luteale	-	1-12 U/L
	Menopausa	-	18-153 U/L
Thomas L	Prepubere	0.4-5 U/L	
	Pubere	-	1.4-9.2 U/L
	Adulto	1-7 U/L	-
	Follicolare	-	2-10 U/L
	Picco	-	8-20 U/L
	Luteale	-	2-8 U/L
	Menopausa	-	> 20 U/L
Tietz	Adulto	1.4-15.4 U/L	-
	Follicolare	-	1.4-9.9 U/L
	Picco	-	0.2-17.2 U/L
	Luteale	-	1.1-9.2 U/L
	Menopausa	-	19.3-100.6 U/L

Tabella 24e.2
ORMONE LUTEINIZZANTE (LH)

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, IRMA, RIA.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 8 ore, a 2-8°C per una settimana, a - 20°C per 3 mesi.		
Intervallo di riferimento	Età/fase	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	Prepubere	< 0.7 U/L	
	Pubere	0.3-5.6 U/L	0.3-23 U/L
	Adulto	1.7-8.6 U/L	-
	Follicolare	-	2.4-12.6 U/L
	Picco	-	14-95.5 U/L
	Luteale	-	1-11.4 U/L
	Menopausa	-	7.7-58.5 U/L
Massachusetts General Hospital	Adulto	2-12 U/L	-
	Follicolare	-	2-15 U/L
	Picco	-	22-105 U/L
	Luteale	-	0.6-19 U/L
	Menopausa	-	16-64 U/L
Thomas L	Prepubere	< 0.4 U/L	
	Pubere	-	< 5.4 U/L
	Adulto	1-7 U/L	-
	Follicolare	-	3-15 U/L
	Picco	-	20-200 U/L
	Luteale	-	5-10 U/L
	Menopausa	-	> 20 U/L
Tietz	Adulto	1.2-7.8 U/L	-
	Follicolare	-	1.7-15.0 U/L
	Picco	-	21.9-56.6 U/L
	Luteale	-	0.6-16.3 U/L
	Menopausa	-	14.2-52.3 U/L

Bibliografia

- Pandian MR, Odell WD, Carlton E, Fisher DA. Development of third-generation immunochemiluminometric assays of follitropin and lutropin and clinical application in determining pediatric reference ranges. *Clin Chem* 1993, 39: 1815-9.
- Wheeler MJ. Assays for LH, FSH, and prolactin. *Methods Mol Biol* 2006, 324: 109-24.
- Iwasa T, Matsuzaki T, Tanaka N, Minakuchi M, Shimizu F, Ogata R, et al. Comparison and problems of measured values of LH, FSH, and PRL among measurement systems. *Endocr J* 2006, 53: 101-9.
- Sikaris K, McLachlan RI, Kazlauskas R, de Kretser D, Holden CA, Handelsman DJ. Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90: 5928-36.
- Scott MG, Ladenson JH, Green ED, Gast MJ. Hormonal evaluation of female infertility and reproductive disorders. *Clin Chem* 1989, 35: 620-9.
- Ghazeeri GS, Vongprachanh P, Kutteh WH. The predictive value of five different urinary LH kits in detecting the LH surge in regularly menstruating women. *Int J Fertil Womens Med* 2000, 45: 321-6.
- Chiu TT, Tam PP, Mao KR. Evaluation of a semiquantitative urinary LH assay for ovulation detection. *Int J Fertil* 1990, 35: 120-4.

24.f. Prolattina (PRL)

(per fisiologia, cfr cap 2f)

Determinazione

Gli attuali metodi per la determinazione della PRL sono immunometrici a “sandwich” e si basano su due anticorpi diretti verso parti diverse della molecola di PRL: uno degli anticorpi è legato ad una fase solida e l'altro ad un tracciante, che può essere isotopico, enzimatico, fluorescente o chemiluminescente. I metodi oggi maggiormente utilizzati sono quelli adattati a strumentazione automatica: raggiungono un limite di rivelabilità più basso (0.2-1.0 µg/L), una maggiore precisione (con un coefficiente di variazione, CV, inferiore al 10%) ed una maggiore specificità (con una reazione crociata con il GH < 0.05%).

La principale forma di PRL circolante (PRL monomerica) è costituita da una catena singola di 199 aminoacidi di PM 23 kDa, anche se esistono delle varianti della PRL, la maggioranza delle quali è rappresentata da isoforme ad alto PM. Queste molecole sono state classificate, mediante filtrazione su gel, in *Big*-PRL (PM = ~50 kDa) e *Big-Big*-PRL (PM >150 kDa). La *Big*-PRL sembra possa derivare da dimerizzazione della PRL monomerica o da legame della PRL monomerica con altre componenti sieriche quali una *PRL-binding protein*, analoga alla componente extracellulare del recettore della PRL, analogamente a quanto riportato per la proteina plasmatica legante il GH. Vi sono due principali sottogruppi della *Big-Big*-PRL: quella costituita da un complesso PRL monomerica - IgG anti-PRL e quella non contenente immuno-globuline. **L'eterogeneità molecolare delle diverse isoforme di PRL presenti in circolo (monomerica, *Big*-PRL e *Big-Big*-PRL) è la base dei risultati considerevolmente diversi dei metodi disponibili:** tutte le isoforme identificate possiedono, infatti, una certa immunoreattività, anche se in misura minore (monomerica: >75%, *Big*-PRL: < 20%; *Big-Big*-PRL: < 5%), mentre l'attività biologica è assente o molto ridotta. Il problema di maggiore rilevanza per quanto riguarda la determinazione della PRL, è quello della cosiddetta “**macroprolattinemia**”, che si intende come presenza di *Big-Big*-PRL in circolo. *Big*-PRL e *Big-Big*-PRL si accumulano in circolo e sono riconosciute, anche se in misura molto diversa, dalle comuni metodiche immunometriche di misura, determinando valori di PRL elevati. La presenza di *Big*-PRL e *Big-Big*-PRL rappresenta la principale causa di variabilità fra i metodi di determinazione della PRL, data la marcata differenza di sensibilità di ogni singolo sistema immunometrico verso queste molecole (tab 24f.1). Il rilievo in circolo di concentrazioni aumentate di PRL dovute a prevalente presenza di *Big-Big*-PRL (macroprolattina) è un fenomeno frequente utilizzando alcuni *kit* in commercio, riscontrabile nel 10-26% di tutti i campioni con iperprolattinemia. **La ricerca/dosaggio della macroprolattina è di estrema utilità, in quanto, essendo priva di attività biologica, il suo riscontro evita l'esecuzione di ulteriori esami diagnostici e/o terapie inutili.** La presenza di isoforme macro-molecolari della PRL è stata identificata originariamente con la cromatografia su gel, una metodica costosa e che richiede lunghi tempi di analisi. La metodica più comunemente usata nella pratica dalla maggior parte dei laboratori clinici, in quanto economica e rapida, è la precipitazione con PEG: si aggiunge PEG 6000 diluito al 25% al siero del campione in un rapporto 1:1 e la miscela viene quindi centrifugata. Il PEG diluito al 12.5% (come nella miscela finale) precipita le proteine sieriche con PM > 100 kDa. La PRL monomerica viene quindi misurata sul sovranatante, libero da *Big-Big*-PRL, ma non da *Big*-PRL, e la concentrazione moltiplicata per 2, per compensare

l'iniziale diluizione 1:1 del siero con il PEG. Si calcola quindi il recupero di PRL monomerica dopo precipitazione con PEG [(PRL monomerica nel supernatante/ PRL monomerica nel siero non trattato) * 100]:

- un valore <40% indica una presenza prevalente di macroprolattina;
- recuperi fra 40 e 60% indicano presenza variabile di macroprolattina;
- un valore >60% indica la prevalente presenza di PRL monomerica.

Alla luce di queste considerazioni, la ricerca di macroprolattina è obbligatoria in tutti quei campioni con iperprolattinemia, in cui il contesto clinico non è indicativo della presenza di iperprolattinemia e in cui la determinazione è eseguita con un metodo (tab 24f.1) che risente molto della presenza di macroprolattina.

Tabella 24f.1
METODI IMMUNOMETRICI AUTOMATICI DELLA PRL

Ordinati in modo decrescente dall'alto in basso secondo la sensibilità alla Big-Big-PRL (da quello con la maggiore possibilità di interferenza a quello con la minore).

- 1) Elecsys (Roche, Basilea, Svizzera)*
- 2) Auto Delfia (Wallach, Finlandia)
- 3) Immuno 1 (Siemens, Tarrytown, NY, USA)**
- 4) IMx (Abbott, Abbott Park, IL, USA)
- 5) AxSYM (Abbott, Abbott Park, IL, USA)
- 6) Architect (Abbott, Abbott Park, IL, USA)
- 7) Amerlite (Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA)
- 8) Enzymun (Roche, Basilea, Svizzera)**
- 9) Immulite (Siemens, Los Angeles, CA, USA)
- 10) Liaison (DiaSorin, Saluggia, Italia)
- 11) ACS:180 (Siemens, Tarrytown, NY, USA)
- 12) Centaur (Siemens, Tarrytown, NY, USA)
- 13) Elecsys II (Roche, Basilea, Svizzera)*
- 14) Access (Beckman, Brea, CA, USA)

*La nuova formulazione del metodo è molto meno sensibile alla Big-Big-PRL

** Analizzatore non più in commercio

È inoltre sicuramente importante che il clinico ed il laboratorista abbiano ben presente che la determinazione della PRL presenta ancora la possibilità di essere influenzata dall'**effetto gancio** (“hook” nella letteratura anglo-sassone): questo fenomeno si verifica quando grandi quantità di antigene sono cimentate con l'anticorpo impiegato come reagente. In alcuni casi la presenza di un “eccesso” di antigene satura tutti i siti di legame su entrambi gli anticorpi (uno di cattura e l'altro rivelatore, specifici per epitopi diversi della molecola di PRL), impedendo quindi la formazione del “sandwich” (in questo tipo di metodo l'antigene si viene a trovare in mezzo ai due anticorpi), con una lettura falsamente bassa delle concentrazioni di PRL. I metodi attuali sono molto meno sensibili a tale effetto rispetto al passato, ma l'adenoma PRL-secernente, in cui possono essere presenti nel campione concentrazioni estremamente elevate di PRL, rappresenta una delle cause più frequenti di tale artefatto. L'unico rimedio a tale problema è la tempestiva segnalazione da parte del clinico del sospetto e l'immediata attuazione da parte del laboratorista di diluizioni adeguate del campione che consentono di confermare o escludere tale possibilità.

Tabella 24f.2
Prolattina

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, RIA.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 1 giorno, a 2-8°C per una settimana, a -20°C per 1 mese.		
Intervallo di riferimento	età	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	1-9 anni	2.1-17.7 µg/L	
	> 10 anni	2.1-17.7 µg/L	2.8-26 µg/L
Massachusetts General Hospital		< 15 µg/L	< 20 µg/L
Thomas L	14-18 anni	2.8-16.1 µg/L	4.2-39 µg/L
	> 19 anni	3-14.7 µg/L	3.8-23.2 µg/L
Tietz		3-14.7 µg/L	3.8-23 µg/L

Bibliografia

- Marcolla A, Dilberis C, Dal Bosco F, Amadori P. *Impatto clinico e laboratoristico delle isoforme macromolecolari della prolattina. RIMeL/IJLaM 2005, 2: 123-9.*
- Kavanagh L, McKenna TJ, Fabie-Wilson MN, Gibney J, Smith TP. *Specificity and clinical utility of methods for the detection of macroprolactin. Clin Chem 2006, 52: 1366-72.*
- Fabie-Wilson MN, John R, Ellis AR. *Macroprolactin: high molecular mass forms of circulating prolactin. Ann Clin Biochem 2005, 42: 175-92.*
- Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. *The impact on clinical practice of routine screening for macroprolactin. J Clin Endocrinol Metab 2005, 90: 3927-32.*
- Dorizzi RM, Castello R, Moghetti P. *Sorting the wheat from the chaff in macroprolactinaemia assessment. Ann Clin Biochem 2006, 43: 89.*
- Fabie-Wilson M, Bieglmayer C, Kratzsch J, Nusbaumer C, Roth HJ, Zaninotto M, et al. *Roche Elecsys Prolactin II assay: reactivity with macroprolactin compared with eight commercial assays for prolactin and determination of monomeric prolactin. Clin Lab 2007, 53: 301-7.*
- Beltran L, Fabie-Wilson MN, McKenna TJ, Kavanagh L, Smith TP. *Serum total prolactin and monomeric prolactin reference intervals determined by precipitation with polyethylene glycol: evaluation and validation on common immunoassay platforms. Clin Chem 2008, 54: 1673-81.*

24.g. Ormoni “emergenti”: Inibine, Ossitocina, Relaxina, Ormone anti-mulleriano (Anti-Mullerian Hormone, AMH)

(per fisiologia, cfr cap 2g)

INIBINE

In ambito di ricerca sono ancora impiegati metodi immunometrici che impiegano tracciante triziato. Nei laboratori clinici sono impiegati metodi immunoenzimatici per la determinazione di Inibina A ed Inibina B, mentre sono commercializzati metodi automatici in chemiluminescenza per l'Inibina A.

OSSITOCINA

Sono stati descritti numerosi metodi di dosaggio, che richiedono fasi estrattive per rimuovere interferenti e concentrare il campione. Il loro impiego in *routine* è ostacolato dalla scarsa sensibilità e specificità.

RELAXINA

Sono presenti in commercio per uso umano solo metodi immunoenzimatici che trovano impiego solo in ambito di ricerca.

ORMONE ANTI-MULLERIANO

Sono presenti in commercio per uso umano solo metodi immunoenzimatici che trovano impiego solo in ambito di ricerca, anche se comincia a manifestarsi un interesse anche in ambito clinico.

Bibliografia

- Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem* 2004, 50: 33-50.
- Clerico A, Del Ry S, Giannessi D. Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods. *Clin Chem* 2000, 46: 1529-34.
- Vale WW, Hseuh A, Rivier C, Yu J. The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In: Sporn MA and Robest AB, eds. *Peptide growth factors and their receptors: handbook of experimental physiology*. Vol 95, Berlin, Springer-Verlag, 1990, 211-48.
- Robertson DM, Sullivan J, Watson M, Cahir N. Inhibin forms in human plasma *J Endocrinol* 1995, 144: 261-9.
- Luisi S, Lazzeri L, Gabbanini MR, Florio P, Petraglia F. Applicazioni cliniche delle determinazioni di inibina, attivina e molecole correlate. *Ligand Assay* 2004, 9: 317-23.

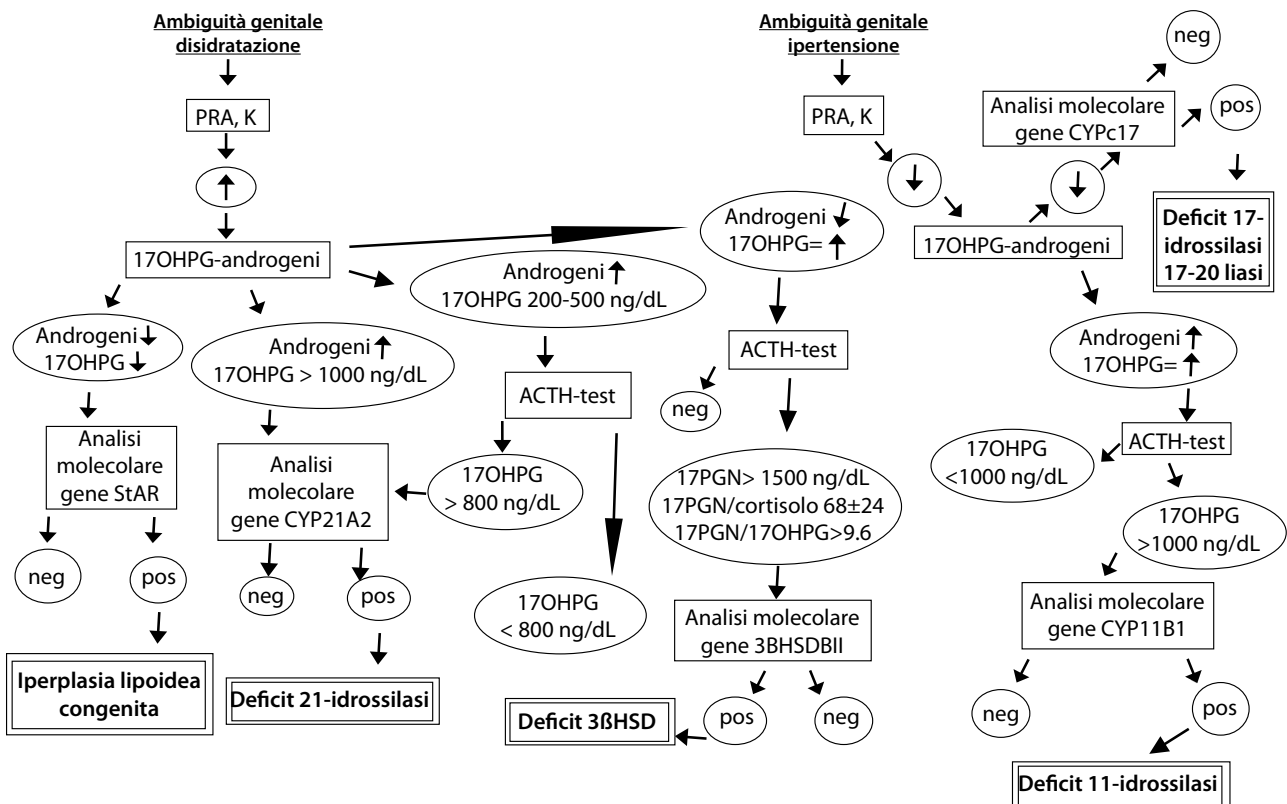
- Vogel I, Thorsen P, Curry A, Sandager P, Ulbjerg N. Biomarkers for the prediction of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005, 84: 516-25.
- Jackson M, Dudley DJ. Endocrine assays to predict preterm delivery. *Clin Perinatol* 1998, 25: 837-57.
- Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D. Measurement of serum anti-Müllerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: comparison and relevance in assisted reproduction technology (ART). *Clin Chim Acta* 2007, 375:162-4.
- Al-Qahtani A, Muttukrishna S, Appasamy M, Johns J, Cranfield M, Visser JA, et al. Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Müllerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005, 63: 267-73.
- Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 941-5.
- La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006, 64: 603-10.

25. *Flow-chart* diagnostiche

25.a. Flow-chart per sindrome adreno-genitale

Antonio Stigliano

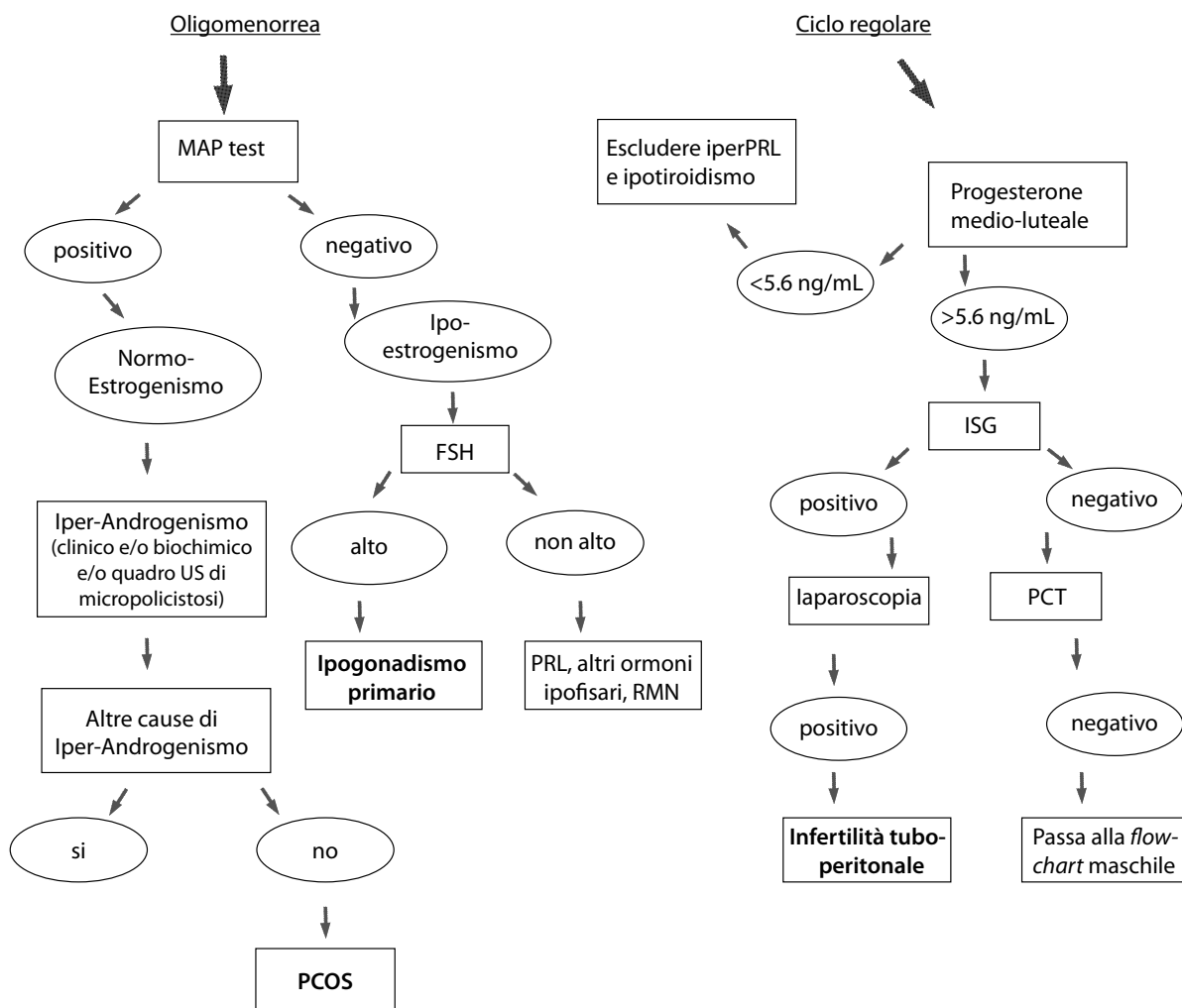
25.a.1. Flow-chart diagnostica per l'età neonatale



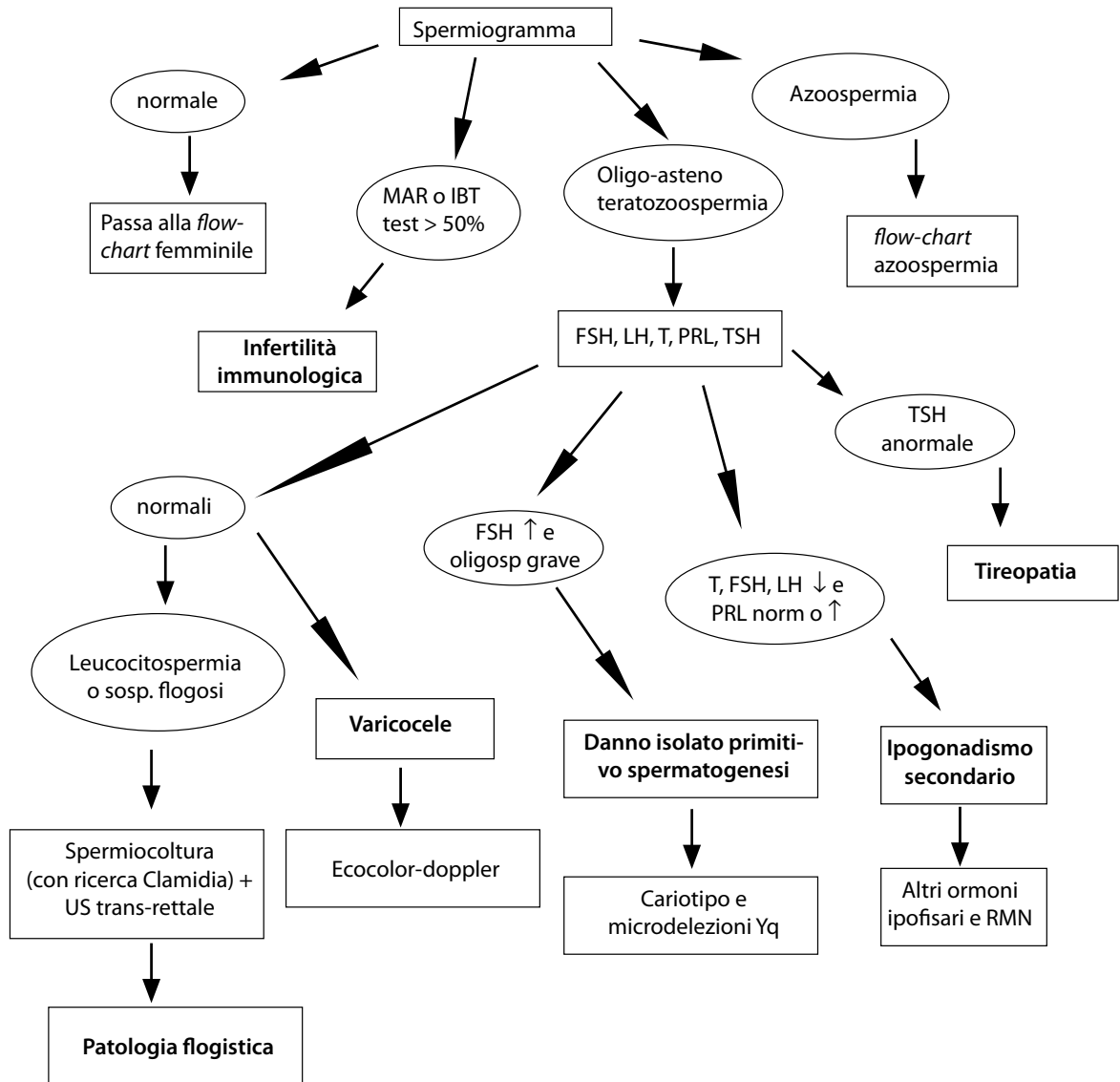
25.b. Flow-chart per infertilità

Felice Francavilla & Arcangelo Barbonetti

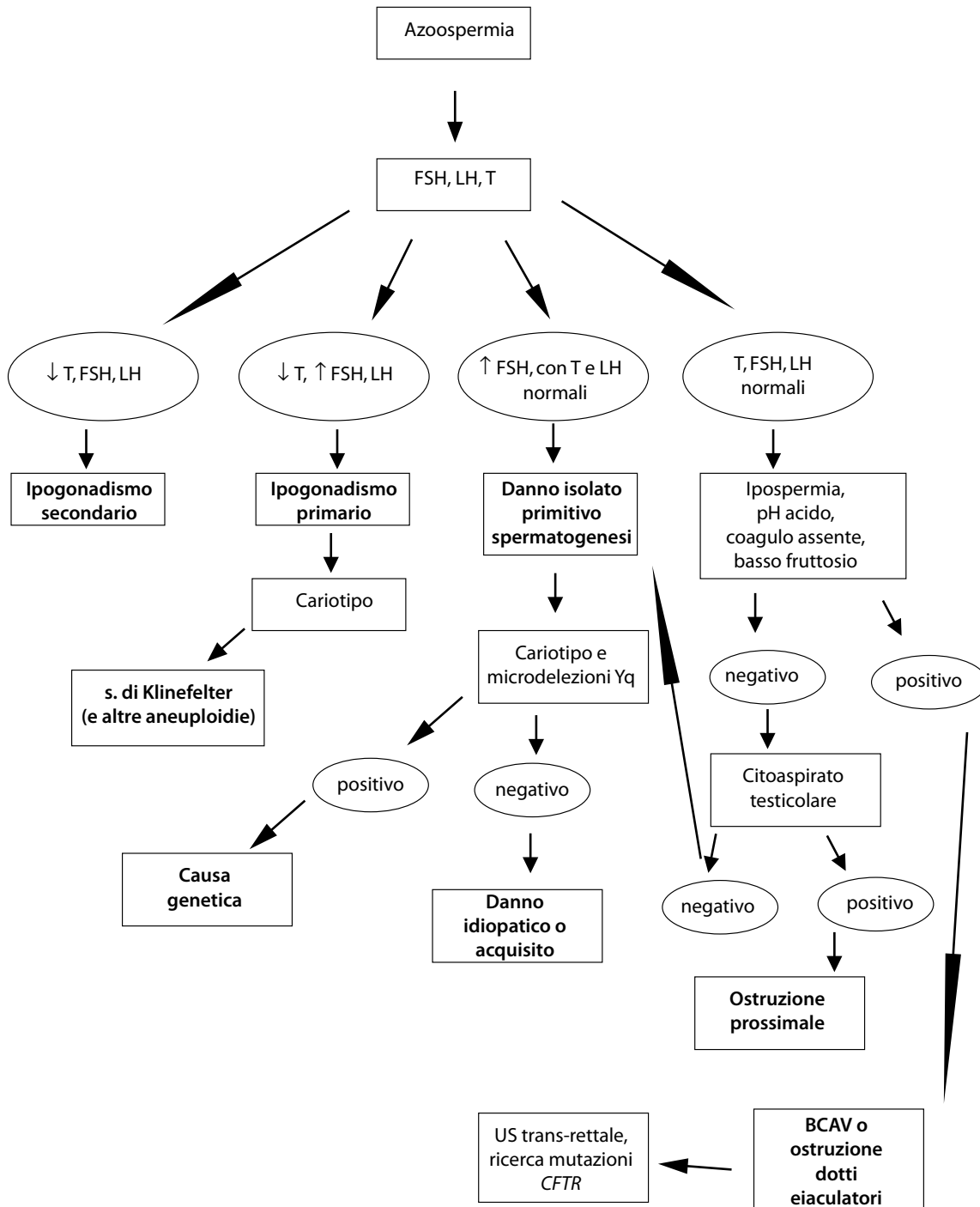
25.b.1. Flow-chart diagnostica per l'infertilità nella donna



25.b.2. Flow-chart diagnostica per l'infertilità nell'uomo



25.b.3. Flow-chart diagnostica per l'azoospermia



26. Formule di uso frequente

Legenda generale

- * indica il segno di moltiplicazione
- ^ indica l'elevazione a potenza
- / indica il segno di divisione
- 1 mL = 20 gocce

BMI (Body Mass Index)

Cos'è	L'indice di massa corporea sintetizza in un solo numero peso e altezza.
A cosa serve	Migliore correlazione (superiore al peso) con morbilità e mortalità.
Parametri necessari per il calcolo	Peso (espresso in kg) Altezza (espressa in metri: esempio 1.80)
Come calcolarlo	$\text{Peso}/(\text{altezza} \times \text{altezza})$
Come calcolarlo con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi il peso nella casella A1 2. Scrivi l'altezza nella casella B1 3. scrivi in C1: $=A1/(B1^2)$ e, dopo aver schiacciato il tasto enter, il risultato comparirà automaticamente 4. (se l'altezza è espressa in cm, scrivi in C1 $=A1/((B1/100)^2)$) Esempio: kg 77, m 1.81, BMI = 23.5 kg/m²
Parametri di riferimento	Normale: 18.5 ÷ 25. Sovrappeso: 25 ÷ 30 Obeso: 30 ÷ 35 Gravemente obeso: > 35 Sottopeso: 17 ÷ 18.5 Gravemente sottopeso: < 17

Formula di Vermeulen

A cosa serve	Per stimare testosterone libero
Parametri necessari per il calcolo	Testosterone totale in ng/dL SHBG in nM/L
Come calcolarla	$FT = \frac{([Testosterone] - (N \times [Testosterone]))}{(Kt\{SHBG - [Testosterone] + N[Testosterone]}}$ Kt è la costante di associazione dell'SHBG per il Testosterone N è una costante pari a 23.4
Come calcolarla on line	all'indirizzo www.issam.ch/freetesto.htm

Superficie corporea (formule di Dubois)

Cos'è	Sintetizza in un solo numero peso e altezza.
A cosa serve	È utilizzata per calcolare la dose da somministrare di alcuni farmaci.
Parametri necessari per il calcolo	Peso (espresso in kg) Altezza (espressa in cm)
Come calcolarla	$0.007184 * \text{altezza}^{0.725} * \text{peso}^{0.425}$
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi il peso nella casella A1 2. Scrivi l'altezza nella casella B1 3. Scrivi in C1 $= (0.007184 * (B1^{0.725}) * (A1^{0.425}))$ e, dopo aver schiacciato il tasto enter, il risultato comparirà automaticamente <p>Esempio: kg 77, m 1.81, superficie corporea = 1.97 m²</p>

27. Farmaci e modalità di approvvigionamento

ACTH (Synachten)	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	Novartis S.p.A., Stein – Svizzera
Composizione	Una fiala contiene tetracosactide acetato 0.27 mg
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio da 1 fiala da 0.25 mg/1 mL
Speciali precauzioni per la conservazione	Il prodotto deve essere conservato tra 2 e 8° C al riparo della luce
Periodo di validità	Indicato sulla confezione
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera

ALPROSTADIL (Caverject)	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	Pfizer Italia S.r.l., SS 156, km 150, 04010 Borgo San Michele (LT)
Composizione	Una fiala contiene alprostadil 5, 10 o 20 µg
Forma farmaceutica	Polvere e solvente per soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio da 2 siringhe a doppia camera con 10 o 20 µg di alprostadil Astuccio con 1 fl da 20 µg di alprostadil, 1 fiala da 1 mL di solvente, 1 siringa e 2 aghi Astuccio con 5 fl da 5 o 10 µg di alprostadil, 5 fiale da 1 mL di solvente
Speciali precauzioni per la conservazione	Conservare a temperatura non > 25°C, utilizzare la soluzione ricostituita immediatamente dopo l'uso
Periodo di validità	Indicato sulla confezione
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera

BUSERELIN (Suprefact)	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	Aventis Pharma S.p.A., P.le Türr, 5 – 20149 Milano
Composizione	Buserelin acetato 1 mg/mL: 1 mL di soluzione contiene 1.05 mg corrispondente a Buserelin 1 mg
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Flacone di vetro colorato da 5.5 mL con tappo in gomma
Speciali precauzioni per la conservazione	Conservare a temperatura non superiore a 25°C ed al riparo dalla luce
Periodo di validità	3 anni
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera

CLOMIFENE	
Composizione	Clomifene 50 mg
Forma farmaceutica	Compresse
Natura e contenuto della confezione	Clomid 10 cpr. Prolifen 10 cps. Serofene 30 cpr.

CLORPROMAZINA (Largactil)	
Ditta fornitrice (titolare dell'auto-rizzazione all'immissione in commercio)	Teofarma S.r.l., via Fratelli Cervi 8, 27010 Valle Salimbene (PV)
Composizione	Clorpromazina cloridrato fl 50 mg in 2 mL di soluzione
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio contenente 5 fiale
Speciali precauzioni per la conservazione	Conservare al riparo dalla luce
Periodo di validità	3 anni
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera

FENTOLAMINA (Regitine)	
Ditta fornitrice (titolare dell'auto-rizzazione all'immissione in commercio)	Novartis S.p.A., Stein – Svizzera
Composizione	Fentolamina mesilato 10 mg in fl da 1 mL
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio contenente 5 fiale
Speciali precauzioni per la conservazione	Conservare in frigorifero a 2-8°C, non congelare, proteggere dalla luce
Periodo di validità	12 mesi
Modalità di richiesta	Il farmaco non è più commercializzato in Italia, ma è reperibile in Svizzera o Città del Vaticano

GnRH (Lutrelif)	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	Ferring S.p.A., Via Senigallia 18/2, 20161 Milano
Composizione	LHRH 100 µg/fl
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio con 1 fl di 100 µg LHRH liofilizzato + 1 fl di solvente
Speciali precauzioni per la conservazione	Il prodotto deve essere conservato a 2-8°C al riparo dalla luce
Periodo di validità	Indicato sulla confezione
Modalità di richiesta	Moduli interni, da richiedere alla farmacia ospedaliera

hCG (Gonasi HP o Pregnyl)	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	A.M.S.A. Srl, Via Del Vantaggio 46, 00186 Roma V.N. Organon, Kloosterstraat 6 5349, AB Oss Olanda
Composizione	Gonasi = fiale da 250 UI, 1000 UI, 2000 UI e 5000 UI Pregnyl = fiale da 1500 e 5000 UI
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Gonasi: astuccio da 1 fl da 5000 UI + 1 fl solvente da 1 mL; astuccio da 3 fl da 250, 1000 e 2000 UI + 3 fl solvente da 1 mL Pregnyl: astuccio da 3 fl da 1500 UI o 5000 UI + 3 fl solvente da 1 mL
Speciali precauzioni per la conservazione	Temperatura 2-15°C al riparo dalla luce
Periodo di validità	Indicato sulla confezione
Modalità di richiesta	Moduli interni, da richiedere alla farmacia ospedaliera

PAPAVERINA	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	Generico
Composizione	Papaverina cloridrato 30 mg
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio contenente 5 fiale da 2 mL contenenti 30 mg di farmaco
Speciali precauzioni per la conservazione	No
Periodo di validità	3 anni
Modalità di richiesta	Solo per uso ospedaliero

PROGESTINICI	
Derivati del pregnene	<ul style="list-style-type: none"> • Progesterone: <ul style="list-style-type: none"> o Crinone gel vaginale; o Esolut, 12 ovuli vaginali, 200 mg; o Progeffik, os vag, 30 cps 100 mg; 15 cps 200 mg; o Prometrium, os vag, 30 cps 100 mg; 15 cps 200 mg; o Prontogest, im, fl 100 mg 1 mL (confezione da 3 o 7 fl); • Medrossiprogesterone: <ul style="list-style-type: none"> o Farlutal, 12 cpr 10 mg; 10 cpr 20 mg; 30 cpr 500 mg; o Provera G, 12 cpr 5 mg; 10 cpr 10 mg; o Provera, 30 cpr 250 mg; 10 buste 500 mg; 10 buste 1 g; • Idrossiprogesterone: <ul style="list-style-type: none"> o Lentogest, im 1 fl 170 mg/mL 2 mL; o Proluton, im 1 fl 250 mg 1 mL.
Derivati del pregadiene	<ul style="list-style-type: none"> • Didrogesterone: Dufaston, 14 cpr 10 mg; • Nomegestrolo: Lutenyl, 30 cpr 5 mg.
Derivati dell'estrene	<ul style="list-style-type: none"> • Noretisterone: Primolut Nor, 30 cpr 10 mg.

28. Fattori di conversione delle unità di misura convenzionali in Unità Internazionali (SI)

Roberto Attanasio & Romolo Dorizzi

La base delle unità di misura convenzionali è l'unità di massa, il chilogrammo, mentre l'unità di quantità di materia è la mole, che contiene tante entità elementari quanti sono gli atomi in 0.012 chilogrammi di carbonio 12. Mentre la concentrazione di massa si esprime per decilitro, per litro o per millilitro (con confusione e differenze), la quantità di materia si esprime sempre, in maniera univoca, per litro.

Tutti i principali organismi di standardizzazione (tra gli altri, l'Organizzazione Mondiale della Sanità, l'*International Federation of Clinical Chemistry*, la *World Association of Pathology Societies and Laboratory Medicine* e l'*International Committee for Standardization in Hematology*) hanno raccomandato l'impiego delle Unità SI (da Sistema Internazionale) e non di quelle convenzionali in Medicina di Laboratorio per numerose ragioni, tra cui le principali vengono di seguito elencate.

- I processi metabolici che avvengono nelle cellule seguono leggi chimiche che si svolgono in termini di atomi, ioni e molecole (e non di massa): le cellule e i loro recettori non rispondono a modificazioni di massa, ma a modificazioni del numero di molecole.
- La concentrazione di un calibrante è definita senza ambiguità, indipendentemente dalla forma chimica del materiale usato: 10 millimoli contengono la stessa quantità di glucosio, sia che il calibrante sia glucosio anidro o monoidrato (lo stesso non può dirsi per 180 mg/dL).
- L'uso delle Unità SI è appropriato per la maggior parte delle tecniche di misurazione di laboratorio (spettrometria, fluorimetria, immunometria, ...).

A partire dagli anni '70, il sistema SI è stato adottato per le analisi di laboratorio da molti paesi, mentre altri, come l'Italia e gli Stati Uniti, non lo hanno ancora adottato.

Non è difficile passare dalle Unità tradizionali a quelle SI e sarebbe preferibile passare direttamente alle nuove unità di misura, dopo un'adeguata preparazione degli interessati, in maniera omogenea a livello provinciale o regionale, senza periodi intermedi di doppia refertazione.

Per esempio per calcolare a quante mmol/L corrispondono 100 mg/dL di glucosio si procede come segue:

- si passa dalla concentrazione di massa per decilitro, alla concentrazione di massa per litro: $100 \text{ mg/dL} * 10 = 1000 \text{ mg/L}$;
- si passa dalla concentrazione di massa per litro alla quantità di materia per litro, dividendo per il peso molecolare (in questo caso 180): $1000/180 = 5.5 \text{ mmol/L}$.

Nella tabella 28.1 sono indicati i fattori di conversione di alcuni dei principali esami.

Tabella 28.1

ANALITA	UNITÀ CONVENZIONALE	FATTORE DI CONVERSIONE*	UNITÀ SI
delta-4-androstenedione	ng/mL = µg/L	3.49	nmol/L
DHEA	ng/mL = µg/L	0.00347	pmol/L
DHEA-S	ng/mL = µg/L	0.002714	nmol/L
di-idro-testosterone	pg/mL = ng/L	0.0034	pmol/L
estradiolo	pg/mL = ng/L	3.671	pmol/L
estriolo	µg/24h	3.468	nmol/d
estrone	pg/mL = ng/L	3.699	pmol/L
HPL	mg/L = µg/mL	46.3	nmol/L
17-idrossi-progesterone	ng/mL = µg/L	3.026	nmol/L
progesterone	ng/mL = µg/L	3.18	pmol/L
prolattina	ng/mL = µg/L	43.478	pmol/L
	ng/mL = µg/L	21.2 (Bayer, Centaur)	mU/L
SHBG	µg/mL = mg/L	8.696	nmol/L
testosterone	ng/dL	0.0347	nmol/L
	ng/mL = µg/L	3.47	nmol/L

* moltiplica per passare da sinistra a destra (da unità convenzionali a unità SI) e dividi per passare da destra a sinistra (da unità SI a unità convenzionali)