

# **Sezione V: Appendice pratica**



## 21. Determinazioni di laboratorio

Marco Caputo, Roberto Castello & Romolo Dorizzi

### **Bibliografia per intervalli di riferimento**

- 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: 28.06.2011)
- Reference Intervals - MGH Clinical Laboratories. <http://mghlabtest.partners.org> (consultato: 28.06.2011)



## 21a. TSH

(per fisiologia cfr cap 3a, per utilizzo clinico cfr cap 12a)

### Metodo di determinazione

I metodi attuali impiegano una procedura a “sandwich”, che si basa su due anticorpi, di solito uno diretto verso la subunità  $\alpha$  e l'altro verso la subunità  $\beta$  della molecola glicoproteica eterodimerica del TSH. Il tracciante è sempre più frequentemente chemiluminescente o enzimatico. Questo tipo di tecnologia presenta il vantaggio di poter essere automatizzato, consentendo maggiore velocità e precisione, maggiore sensibilità ed ampiezza dell'intervallo di misura (la stima della concentrazione è direttamente proporzionale all'intensità del segnale).

La sensibilità dei metodi per la misurazione del TSH è aumentata di 100 volte negli ultimi 30 anni ed è passata da 1-2 mU/L, tipica dei metodi radio-immunologici degli anni '80, ad almeno 0.02 mU/L, tipica dei metodi immunometrici a “sandwich” impiegati oggi. In genere i metodi di dosaggio sono classificati secondo la loro sensibilità analitica e sensibilità funzionale.

La **sensibilità analitica** è la stima della più bassa concentrazione discriminabile dallo zero; quella **funzionale** è la stima della precisione del metodo a basse concentrazioni (in genere è indicata dalla concentrazione più bassa in cui il coefficiente di variazione è  $< 20\%$ ). Questa percentuale, arbitraria, comprende le variazioni analitica e biologica ed è sempre più alta di quella analitica. Termini come metodo “sensibile” ed “ultra-sensibile” vanno abbandonati, mentre sono ormai entrate nell'uso comune espressioni come “di prima, seconda, terza generazione”, intendendo un aumento di sensibilità funzionale di 10 volte ad ogni passaggio di generazione. Per il TSH si definisce di “**terza generazione**” un metodo che ha una sensibilità funzionale  $< 0.02$  mU/L. Un modo empirico, ma efficace, con cui il clinico può valutare la qualità di un metodo per la determinazione del TSH è quello di verificare se la concentrazione di TSH nei pazienti affetti da malattia di Basedow è  $< 0.02$  mU/L.

La specificità di un dosaggio per il TSH può essere limitata dal fatto che la struttura del TSH circolante nel sangue non è identica a quella contenuta nell'ipofisi o negli estratti ipofisari usati per la messa a punto del metodo. Gli anticorpi monoclonali impiegati per “catturare” il TSH possono, quindi, avere specificità diversa per gli epitopi delle isoforme di TSH nel siero rispetto a quelle ipofisarie.

Un problema importante nella determinazione del TSH è quello dell'interferenza da **anticorpi eterofili**, che possono comparire dopo la somministrazione di anticorpi di topo per esami immuno-scintigrafici (questi hanno indotto una reazione immune e conseguente produzione di anticorpi, ma possono essere presenti anche in soggetti che non sono stati sottoposti a trattamenti di questo tipo). Questi anticorpi, chiamati *Human Anti-Mouse Monoclonal Antibodies*, interferiscono con i metodi di dosaggio basati su anticorpi monoclonali (nella maggior parte dei metodi aumentando la concentrazione del TSH) e possono essere rivelati mediante un loro dosaggio diretto o cimentando il campione con anticorpi particolari che li “bloccano”.

I metodi attualmente disponibili per il TSH hanno per lo meno una sensibilità di 0.1-0.05 mU/L e consentono una buona discriminazione tra soggetti eutiroidei e soggetti **ipertiroidi**, che raramente (in una percentuale compresa tra l'1% ed il 5%) hanno una concentrazione  $> 0.1$  mU/L.

È possibile collocare nelle linee guida del 2002 dell'NACB l'inizio della rivisitazione del

problema dell'intervallo di riferimento per il TSH. Quel documento sostiene, infatti, che il limite superiore tradizionale, compreso tra 4 e 5 mU/L, non consente di discriminare tra soggetti eutiroidei e soggetti con **ipotiroidismo** lieve. L'indagine condotta nella contea inglese di Whickham, prima intorno al 1970 e successivamente vent'anni dopo, aveva dimostrato che concentrazioni di TSH > 2.0 mU/L erano associate ad un maggiore rischio di sviluppare ipotiroidismo. Va rilevato che nella misurazione del TSH i metodi disponibili nel 1975 non erano affatto comparabili con quelli usati venti o trenta anni dopo. Anche citatissimi studi come il *Colorado Thyroid Disease Prevalence* e il *National Health and Nutrition Examination Survey NHANES III*, condotto tra il 1988 ed il 1994, non sono oramai più ripetibili, dato che impiegavano metodi non più disponibili commercialmente o poco utili in Italia, dato che impiegano metodi molto poco diffusi. I problemi relativi alla determinazione del TSH sono stati sintetizzati recentemente da Beckett e Mackenzie, che hanno analizzato i risultati di Valutazione Esterna di Qualità del TSH. Le aziende di diagnostici propongono (ed i laboratori impiegano) limiti di riferimento più alti per analizzatori che hanno un *bias* negativo e viceversa, con rischi di classificazione erronea dei soggetti e dei pazienti. Questo conferma la scarsa attenzione e la scarsa cura che le aziende di diagnostici e i laboratoristi rivolgono al calcolo o, almeno, alla verifica degli intervalli di riferimento. Studi diversi hanno dimostrato che, anche se la gran parte dei laboratori impiega gli intervalli raccomandati dal produttore o "adattati", in realtà impiegano degli intervalli con differenze tra di loro anche del 100%, facendo dubitare che seguano procedure corrette.

**Tabella 21a.1**  
**TSH**

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza, immuno-enzimatica, ECLIA, IRMA, RIA	
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel Provetta da plasma (tappo lavanda) con EDTA	
<b>Volume minimo</b>	500 µL	
<b>Stabilità del campione</b>	Siero e plasma sono stabili a temperatura ambiente per 24 ore dopo centrifugazione, a 2-8°C per 48 ore, a -20°C per 6 mesi	
<b>Intervallo di riferimento</b>		
<b>ARUP (ECLIA)</b>	Cordone ombelicale	2-40 mU/L
	0-3 giorni	5.17-14.6 mU/L
	4-30 giorni	0.43-14.6 mU/L
	1-24 mesi	0.62-8.05 mU/L
	2-6 anni	0.54-4.53 mU/L
	7-11 anni	0.66-4.14 mU/L
	12-19 anni	0.53-3.59 mU/L
	> 19 anni	0.3-4 mU/L
<b>Massachusetts General Hospital</b>	0.5-4.7 mU/L	
<b>Thomas L</b>	Neonato	< 20 mU/L
	Bambini-adulti	0.4-4 mU/L
<b>Tietz</b>	Cordone ombelicale	2.3-13.2 mU/L
	1-4 giorni	1-39 mU/L
	2-20 settimane	1.7-9.1 mU/L
	21 settimane - 20 anni	0.7-6.4 mU/L
	21-54 anni	0.4-4.2 mU/L
	55-87 anni	0.5-8.9 mU/L

## Bibliografia

- Rawlins ML, Roberts WL. Performance characteristics of six third-generation assays for thyroid-stimulating hormone. *Clin Chem* 2004, 50: 2338-44.
- Fatourechi V. Upper limit of normal serum Thyroid-Stimulating Hormone: a moving and now an aging target? *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92: 4560-2.
- Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003, 13: 3-126.
- Turnbridge WMG, Evered DC, Hall R, et al. The spectrum of thyroid disease in the community: the Whickham Survey. *Clin Endocrinol* 1977, 7: 481-93.
- Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol* 1995, 43: 55-68.
- Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, et al. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000, 160: 526-34.
- Jensen E, Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, et al. Establishment of a serum thyroid stimulating hormone (TSH) reference interval in healthy adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42: 824-32.
- Beckett G, MacKenzie F. Thyroid guidelines - are thyroid-stimulating hormone assays fit for purpose? *Ann Clin Biochem* 2007, 44: 203-8.
- Klee GG, Hay ID. Assessment of sensitive thyrotropin assays for an expanded role in thyroid function testing: proposed criteria for analytic performance and clinical utility. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 64: 461-71.

## 21b. FT<sub>3</sub> & FT<sub>4</sub>

(per fisiologia cfr cap 3b, per utilizzo clinico cfr cap 12b)

### Determinazione

Tra i molti metodi disponibili per la determinazione di FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> quello di riferimento è la **dialisi ad equilibrio**, in cui la frazione libera del T<sub>4</sub> è dapprima separata dalla frazione legata mediante una membrana di dialisi e poi quantificata con una metodica immunometrica tradizionale. Questa tecnica consente una misurazione molto accurata degli ormoni, ma è complessa e di applicazione praticamente impossibile nel laboratorio clinico. Va tenuto presente che anche la dialisi ad equilibrio subisce numerose interferenze, come inibitori di legame, variazioni di pH e temperatura (è fondamentale che la determinazione sia eseguita a 37°C), fenomeni di adsorbimento. I primi metodi per misurare la frazione libera di T<sub>4</sub> usavano T<sub>4</sub> con tracciante di <sup>131</sup>I e <sup>125</sup>I; successivamente, la dialisi simmetrica, in cui il siero è dializzato senza diluizione o impiego di condizioni para-fisiologiche per superare gli effetti della diluizione. Recentemente si sta proponendo come metodo di riferimento per la misurazione della concentrazione di FT<sub>4</sub> la cromatografia liquida a diluizione isotopica/tandem spettrometria di massa (ID-LC/Tandem MS).

I metodi impiegati nei laboratori clinici sono basati sul **principio dell'“analogo”**. L'FT<sub>4</sub> legato a tracciante, che nelle metodiche immunometriche convenzionali compete con l'ormone presente nel siero del soggetto, è sostituito da una molecola “analogica” alla tiroxina, legata ad un tracciante sufficientemente simile all'ormone endogeno da consentirgli di competere con l'antigene, ma sufficientemente diverso da non legarsi con le proteine vettrici presenti nel siero. La metodica è stata automatizzata, consentendo risultati più rapidi e precisi e favorendone la rapida diffusione nei laboratori clinici. Le prime metodiche sviluppate presentavano dei limiti causati dal fatto che una percentuale elevata dell'“analogo” (in alcuni metodi pari a circa il 90%) si legava all'albumina. Questi metodi producevano risultati poco attendibili nei soggetti con gravi alterazioni della concentrazione di albumina, ma con le metodiche attuali si stima che il legame con l'albumina sia molto più basso. L'accuratezza dei metodi “analoghi” commercializzati negli ultimi anni è migliorata e risulta confrontabile a quella della dialisi ad equilibrio anche in condizioni di disalbuminemia. È opportuno tuttavia ricordare che, a rigor di termini, la determinazione dell'FT<sub>4</sub> mediante il metodo dell'analogo consente non la misura dell'FT<sub>4</sub> ma la sua “stima”.

La tecnica di misurazione di T<sub>3</sub> libera e totale ha subito un'evoluzione parallela a quella della tiroxina ed oggi la FT<sub>3</sub> può essere determinata impiegando gli analizzatori automatici per immunometria.

I dosaggi per gli ormoni tiroidei liberi possono risentire delle interferenze di auto-anticorpi, anticorpi eterofili e fattori reumatoidi. Il clinico deve segnalare tale sospetto ogni volta che si presenta ed il laboratorio deve mettere in atto tutti i rimedi opportuni (trattamento con anticorpi bloccanti, analisi con altro metodo o analizzatore).

**Tabella 21b.1**  
**FT<sub>4</sub>**

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza, immuno-enzimatica, ECLIA, ICMA, IRMA	
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel Provetta da plasma (tappo lavanda) con EDTA; (tappo verde) con litio-eparina	
<b>Volume minimo</b>	500 µL	
<b>Stabilità del campione</b>	Siero e plasma sono stabili a temperatura ambiente per 24 ore dopo centrifugazione, a 2-8°C per una settimana, a -20°C per 1 mese	
<b>Intervallo di riferimento</b>		
<b>ARUP (ECLIA)</b>	0-30 giorni	0.7-3.1 ng/dL
	1-23 mesi	0.5-2.3 ng/dL
	2-6 anni	0.9-1.8 ng/dL
	7-11 anni	0.9-1.7 ng/dL
	12-19 anni	0.9-1.6 ng/dL
	> 19 anni	0.8-1.7 ng/dL
<b>Massachusetts General Hospital</b>	0.8-2.7 ng/dL	
<b>Thomas L</b>	1-2 giorni	21-49 pmol/L
	3-30 giorni	19-39 pmol/L
	1 mese - 18 anni	12-23 pmol/L
	> 18 anni	10-23 pmol/L
<b>Tietz</b>	Neonato	2.2-5.3 ng/dL
	Adulto	0.8-2.7 ng/dL

**Tabella 21b.2**  
**FT<sub>3</sub>**

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza, immuno-enzimatica, ECLIA, ICMA, IRMA	
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel Provetta da plasma (tappo lavanda) con EDTA	
<b>Volume minimo</b>	500 µL	
<b>Stabilità del campione</b>	Siero e plasma sono stabili a temperatura ambiente per 24 ore dopo centrifugazione, a 2-8°C per una settimana, a -20°C per 1 mese	
<b>Intervallo di riferimento</b>		
<b>ARUP (ECLIA)</b>	0-3 giorni	2-7.9 pg/mL
	4-30 giorni	2-5.2 pg/mL
	1-24 mesi	1.6-6.4 pg/mL
	2-6 anni	2-6 pg/mL
	6-17 anni	2.9-5.1 pg/mL
	> 17 anni	2.4-4.2 pg/mL
<b>Massachusetts General Hospital</b>	1.4-4.4 pg/mL	
<b>Thomas L</b>	0-6 anni	3.4-6.6 pg/mL
	6-17 anni	4-6.2 pg/mL
	> 17 anni	3.5-5.7 pg/mL
<b>Tietz</b>	< 12 anni	3.5-7.2 pmol/L
	> 12 anni	3.5-5.7 pmol/L

## Bibliografia

- Kabrac-Janjic N, Soldin SJ, Soldin OP, et al. Tandem mass spectrometry improves the accuracy of free thyroxine measurements during pregnancy. *Thyroid* 2007, 17: 303-11.
- Dufour DR. Laboratory tests of thyroid function: uses and limitations. *Endocr Metab Clin North Am* 2007, 36: 155-69.
- Nelson JC, Wilcox RB. Analytical performance of free and total thyroxine assays. *Clin Chem* 1996, 42: 146-54.
- Zucchelli GC, Pilo A, Chiesa MR, Piro MA. Progress report on a national quality-control survey of triiodothyronine and thyroxine assay. *Clin Chem* 1984, 30: 395-8.
- Holm SS, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Reference methods for the measurement of free thyroid hormones in blood: evaluation of potential reference methods for free thyroxine. *Clin Biochem* 2004, 37: 85-93.
- Van Uytvanghe K, Stockl D, Ross HA, et al. Use of frozen sera for FT4 standardization: investigation by Equilibrium Dialysis combined with Isotope Dilution-Mass Spectrometry and Immunoassay. *Clin Chem* 2006, 52: 1817-21.
- Midgley JE. Direct and indirect free thyroxine assay methods: theory and practice. *Clin Chem* 2001, 47: 1353-63.
- Piketety ML, d'Herbomez M, Le Guillouzic D, et al. Clinical comparison of three labeled-antibody immunoassays of free triiodothyronine. *Clin Chem* 1996, 42: 933-41.
- Despres N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998, 44: 440-54.
- Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, et al. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 489-99.
- Jonklaas J, Kabrac-Janjic N, Soldin OP, et al. Correlations of free thyroid hormones measured by tandem mass spectrometry and immunoassay with thyroid-stimulating hormone across 4 patient populations. *Clin Chem* 2009, 55: 1380-8.
- Stockigt JR. Free thyroid hormone measurement. A critical appraisal. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001, 30: 265-89.
- Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Beastall G, et al. Report of the IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests; part 2: free thyroxine and free triiodothyronine. *Clin Chem* 2010, 56: 912-20.

## 21c. Tireoglobulina

(per fisiologia cfr cap 3d, per utilizzo clinico cfr cap 12e)

### Determinazione

La concentrazione di Tg è tipicamente misurata mediante **immunodosaggi**.

Come in moltissimi altri casi in Medicina di Laboratorio, la frequenza di falsi risultati dovuti ad **errori** nella **fase pre-analitica** è almeno dieci volte superiore a quella della fase analitica.

Per quanto riguarda l'**errore analitico**, nell'impiego clinico dei dosaggi di Tg bisogna tenere conto dei limiti di **sensibilità analitica** e **funzionale**: più bassa la sensibilità funzionale di un metodo, più affidabile il suo impiego, soprattutto nei dosaggi senza stimolazione. Per metodi con sensibilità funzionale dichiarata di 1-2 ng/mL sono riportati tassi di falsi negativi del 5-20%, intendendo come tali i casi di pazienti con Tg non dosabile nel campione basale (perchè al di sotto della soglia definita dalla sensibilità funzionale di quel metodo), che dopo stimolazione ottengono valori di Tg > 2 ng/mL e in cui viene poi confermata la presenza di malattia metastatica. È evidente che il numero dei falsi negativi si riduce in maniera statisticamente significativa utilizzando metodi con sensibilità funzionale più bassa, ma questo avviene inevitabilmente a spese della specificità diagnostica del test. Diventa quindi essenziale, non solo per il laboratorista ma anche per il clinico, conoscere esattamente l'imprecisione del metodo utilizzato per i propri pazienti, in particolare alle basse e bassissime concentrazioni di Tg ( $\leq 2$  ng/mL). In base ai dati ottenuti dai profili di imprecisione, è possibile calcolare quando la differenza tra due dosaggi di Tg diventa clinicamente significativa (differenza critica) e non è semplice frutto di variabilità analitica. Con coefficienti di variazione analitica intorno al 10%, tale differenza può superare il notevole valore del 27%, a cui andrebbe sommata anche la variabilità inter-lotto. Quest'ultima può essere minimizzata, avendo l'accortezza di ripetere il dosaggio del campione assieme al nuovo dosaggio nel corso del *follow-up*, ma si tratta di un approccio un po' indaginoso.

Altre possibili cause di errore analitico sono dovute all'instabilità dei reagenti, a *bias* di calibrazione, alla standardizzazione del metodo o a eventuali contaminazioni.

Le linee guida internazionali sono concordi nell'indicare alcune precauzioni da adottare per limitare i possibili impatti negativi di un dosaggio di Tg:

- impiegare metodi con sufficiente sensibilità analitica (< 1 ng/mL);
- calibrare i metodi contro lo *standard* internazionale CRM-457;
- utilizzare nel monitoraggio sempre lo stesso metodo (se possibile nello stesso laboratorio);
- misurare la concentrazione di TgAb nello stesso campione della Tg, preferibilmente con metodi diretti e non con test di recupero della Tg, per identificare i possibili falsi negativi da interferenza da TgAb.

Negli ultimi tempi si sono registrate forti pressioni per fare **standardizzare** tutti i metodi del mercato contro il CRM-457. Nonostante questo abbia contribuito a ridurre la variabilità inter-saggio, sussistono ancora significative differenze nel misurare la concentrazione di Tg nello stesso campione con metodi differenti; pertanto, resta pienamente valido il consiglio di impiegare sempre lo stesso metodo nel *follow-up* del DTC.

A questo limite si aggiunge la **variabilità** tra lotti dello stesso reagente. Sono documentati *bias* sistematici tra lotti successivi che arrivano a  $\pm 10\%$ , le cui possibili conseguenze negative per il *follow-up* di un paziente sono evidenti.

**Tabella 21c.1**  
**TIREOGLOBULINA**

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza, ECLIA, immunoenzimatica, ICMA, IRMA
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel
<b>Volume minimo</b>	500 µL
<b>Stabilità del campione</b>	Il siero è stabile a 2-8°C per 24 ore; a -20°C per 3 mesi. La molecola è fragile e si deteriora in caso di cicli ripetuti di scongelamento e congelamento.
<b>Intervallo di riferimento</b>	Post -tiroidectomia
<b>ARUP</b>	< 0.1 ng/mL
<b>Massachusetts General Hospital</b>	Non dichiarato
<b>Thomas L</b>	< 1 ng/mL
<b>Tietz</b>	< 5 ng/mL

### Bibliografia

- Giovanella L, Ceriani L, Ghelfo A. Redefining functional sensitivity of thyroglobulin assay on Immulite platform: implications in thyroid cancer management. *Clin Chem Lab Med* 2007, 45: 1523-24.
- Clark PM, Beckett G. Can we measure serum thyroglobulin? *Ann Clin Biochem* 2002, 39: 196-202.
- Dorizzi RM, Castello R, Giovanella L. Follow-up del cancro della tiroide: i quesiti del clinico, le risposte del laboratorio. *RIMeL/IJLaM* 2008, 4 (Suppl): 72-81.
- Locsei Z, Toldy E, Szabolcs I, et al. The effect of sample storage on the reliability of thyroglobulin and thyroglobulin-antibody measurements. *Clin Biochem* 2009, 42: 225-8.

## 21d. Anticorpi anti-perossidasi e anti-tireoglobulina

(per utilizzo clinico cfr cap 13d)

### Generalità sui metodi di dosaggio auto-anticorpale

I metodi immunologici convenzionali hanno rappresentato il presidio principale per la diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni per almeno 40 anni. Anche se i primissimi esami per la rilevazione di auto-anticorpi (fattore reumatoide e test LE) datano al 1948, solo un decennio dopo si è potuto parlare di veri e propri metodi di dosaggio di auto-anticorpi. Da allora si è andato formando e accumulando un arsenale diagnostico all'interno del quale si possono distinguere due grandi categorie di metodi:

- immunochimici, tra cui l'immunofluorescenza indiretta, la fissazione del complemento, l'agglutinazione passiva, l'immunodiffusione, l'immunoprecipitazione, l'immunoblotting;
- immunometrici, tra cui la radioimmunologia e le sue varianti, l'immunoenzimatica e le sue varianti, gli immunodosaggi in fluorescenza e in chemiluminescenza.

Il merito dei metodi immunochimici consiste nell'aver consentito la ricerca qualitativa (presenza/assenza) degli auto-anticorpi nel siero dei pazienti, ma soltanto i metodi immunometrici hanno permesso la misurazione quantitativa delle concentrazioni anticorpali. Quando, nel corso dell'ultimo decennio del secolo scorso, si è perfezionata l'applicazione di questi metodi su sistemi di automazione sempre più evoluti ed affidabili, si è verificata l'esplosiva diffusione di questa diagnostica, che ha portato ad un impressionante incremento dei carichi di lavoro per le sezioni del laboratorio clinico dedicate all'autoimmunologia. È ormai vasta la gamma di strumenti analitici validati, a diverso livello di complessità e produttività.

Dato che la produzione di auto-anticorpi specifici ad alta affinità rappresenta un marcatore caratteristico della malattie autoimmuni, l'impiego dei metodi per la loro rilevazione si è progressivamente imposto nella pratica clinica come strumento per la diagnosi di queste patologie, al punto che uno o più test di laboratorio ne costituiscono criteri classificativo-diagnostici, come nel caso degli anti-TPO per la tiroidite di Hashimoto e dei TRAb per la m. di Graves.

**Tabella 21d.1**  
**Ab anti-TPO**

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza
<b>Campione richiesto</b>	Siero con separatore, plasma (Li-eparina)
<b>Volume minimo</b>	0.3 mL
<b>Stabilità del campione</b>	8 h a temperatura ambiente; 1 settimana a 4°C; 6 mesi a -20°C
<b>Intervallo di riferimento</b>	
<b>ARUP</b>	< 9.0 UI/mL

**Tabella 21d.2**  
**Ab anti-Tg**

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza
<b>Campione richiesto</b>	Siero con separatore, plasma (Li-eparina)
<b>Volume minimo</b>	0.3 mL
<b>Stabilità del campione</b>	8 h a temperatura ambiente; 1 settimana a 4°C; 6 mesi a -20°C
<b>Intervallo di riferimento</b>	
<b>ARUP</b>	< 20 UI/mL

## Bibliografia

- Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, et al. Serum thyrotropin, thyroxine and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): NHANES III. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 489-99.
- National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. Published Guidelines. [Accesso: 28 Apr 2011]
- Brown RS. Autoimmune thyroid disease: unlocking a complex puzzle. *Curr Opin Pediatr* 2009, 21: 523-8.
- de Vries L, Bulvik S, Phillip M. Chronic autoimmune thyroiditis in children and adolescents: at presentation and during long-term follow-up. *Arch Dis Child* 2009, 94: 33-7.
- Tozzoli R. L'evoluzione della tecnologia e le ricadute sui percorsi diagnostici delle malattie autoimmuni. *RIMEL/IJLaM* 2006, 2: 141-50.

## 21e. Anticorpi anti-recettore TSH

(per utilizzo clinico cfr cap 13e)

### Determinazione

Come per tutti i dosaggi di anticorpi rivolti verso la tiroide, anche nel caso dei TRAb è necessario comprendere e tener presente che:

- i risultati sono strettamente metodo-dipendenti;
- i metodi riconoscono epitopi differenti all'interno dell'eterogenea popolazione di anticorpi presenti nel siero del paziente;
- le differenze nei metodi sono dovute a:
  - variazioni nella preparazione di recettori o cellule utilizzati;
  - contaminazione del reagente antigenico con altri auto-antigeni;
  - architettura del dosaggio (competitivo/non competitivo);
  - *standard* secondari diversi.

Si sa da molto tempo che gli auto-anticorpi si dirigono contro un numero di epitopi inferiore a quello individuato da anticorpi eterologhi. I metodi attuali differiscono notevolmente nella capacità di riconoscimento degli epitopi. Le differenze di specificità possono originare dalla difficoltà a riconoscere un epitopo, con conseguente *bias* per la popolazione auto-anticorpale misurata. Questa è l'origine della grande diversità di intervalli di riferimento, anche quando si è fatto ricorso allo stesso materiale nella scelta dello *standard*. Indipendentemente dall'auto-antigene, gli auto-anticorpi tiroidei non sono mai un'entità molecolare unica, ma sempre una miscela di immunoglobuline che ha in comune soltanto la capacità di interagire con il suo bersaglio, nel nostro caso il recettore del TSH. Pertanto, i metodi differiranno sia in sensibilità (principio del dosaggio, natura del tracciante) che in specificità (contaminazione della preparazione antigenica).

Esistono diverse categorie di metodi per la misura dei TRAb:

- i TBII misurano la capacità di un siero o di una immunoglobulina di bloccare il legame tra il TSH marcato con <sup>125</sup>I e la preparazione in vitro del recettore dell'ormone, disponibile in forma umana ricombinante. Questi metodi non sono in grado di distinguere TRAb stimolanti da TRAb bloccanti. La recente disponibilità di uno *standard* WHO (MRC 90/672) non sembra avere sostanzialmente aumentato specificità e sensibilità di questi test nel predire la risposta alla terapia farmacologica.
- i *bioassay* impiegano preparazioni cellulari per misurare gli effetti biologici dei TRAb:
  - alcuni utilizzano come antigene la porzione N-terminale del dominio extra-cellulare, in grado di mimare l'azione ormonale (anticorpi "stimolanti");
  - altri utilizzano come antigene la porzione C-terminale che evidenzia gli anticorpi "bloccanti".

La maggior parte dei *bioassay* oggi impiegati si basa sulla produzione di secondo messaggero a seguito di attivazione del recettore del TSH presente su una preparazione cellulare (FRTL-5/CHO TSH-R) esposta ad un siero o a immunoglobuline. In Europa, data la limitazione alla manipolazione genetica, non sono presenti le linee cellulari transfettate diffuse in USA e Asia. In ogni caso, la correlazione tra i risultati di questi test e la clinica è modesta: la sensibilità per m. di Graves dei *bioassay* varia dal 62.5 all'81%. La possibile futura proposta di test basati su chimere potrebbe migliorare le attuali prestazioni.

**Tabella 21e.1**  
**Anticorpi anti-recettore TSH**

<b>Metodologia adottata</b>	Elettrochemiluminescenza
<b>Campione richiesto</b>	Siero
<b>Volume minimo</b>	0.3 mL
<b>Stabilità del campione</b>	24 h a temperatura ambiente; 3 giorni a 4°C; 1 mese a -20°C
<b>Intervallo di riferimento</b>	
<b>ARUP</b>	< 1.75 UI/L

## Bibliografia

- Gupta MK. Thyrotropin-receptor antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical application. *Clin Chem Acta* 2000, 293: 1-29.
- Kamijo K, Nagata A, Sato Y. Clinical significance of a sensitive assay for thyroid-stimulating antibodies in Graves' disease using polyethylene glycol at high concentration and porcine thyroid cells. *Endocrinol J* 1999, 46: 397-403.
- Burek CL, Rose NR. Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmun Rev* 2008, 7: 530-7.
- Eckstein A, Esser J, Mann K, Schott M. Clinical value of TSH receptor antibodies measurement in patients with Graves' orbitopathy. *Pediatr Endocrinol Rev* 2010, 7 Suppl 2: 198-203.
- Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2009, 9: 113-6.
- Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid* 2007, 17: 911-22.
- Galofre JC, Davies TF. Autoimmune thyroid disease in pregnancy: a review. *J Women Health* 2009, 18: 1847-56.

## 21f. Calcitonina

(per fisiologia cfr cap 3e, per utilizzo clinico cfr cap 12f)

### Metodo di determinazione

Fino al 1988 i metodi per il dosaggio della CT erano fondamentalmente dei RIA, che impiegavano anticorpi policlonali in grado di riconoscere il monomero maturo e altre forme circolanti (precursori e prodotti di degradazione). Tali metodi mancavano di specificità e di sensibilità.

Con l'introduzione di metodi immunoradiometrici basati sull'utilizzo di anticorpi monoclonali (uno dei quali riconosceva la regione N-terminale e l'altro la C-terminale), si sono registrati consistenti progressi, che oggi, con i metodi immunometrici a 2 siti, rilevano CT nel plasma dell'83% dei maschi sani e nel 46% delle femmine sane, a digiuno.

Sussiste un serio problema di standardizzazione, dato che metodi diversi possono dare risultati molto differenti, provocando confusioni interpretative. È essenziale che il clinico sappia che esistono differenze inter-metodo che possono impattare sulla diagnosi e la gestione dei pazienti con MTC e, pertanto, è importante che la risposta del laboratorio includa la descrizione del metodo utilizzato. I metodi in chemiluminescenza (ICMA) sono in grado di minimizzare le *cross*-reattività e le interferenze maggiori, dovute a pro-calcitonina, iperparatiroidismo, gravidanza o allattamento, fenomeni flogistici, sepsi, bilirubina, emolisi, iperlipemia.

Attualmente gli ICMA a 2 siti, specifici per la CT matura, sono in grado di dosare affidabilmente valori < 10 ng/L, nei controlli sani e nel 90% di pazienti con altra patologia tiroidea.

**Tabella 21f.1**  
**Calcitonina**

<b>Metodologia adottata</b>	Immunochemiluminescenza quantitativa		
<b>Campione richiesto</b>	Siero		
<b>Volume minimo</b>	1 mL		
<b>Stabilità del campione</b>	Non refrigerare. 2h a temperatura ambiente, 3 mesi a -20°C.		
<b>Intervallo di riferimento</b>	<b>Età</b>	<b>Maschio</b>	<b>Femmina</b>
<b>ARUP</b>	> 3 anni	< 7.5 pg/mL	< 5.1 pg/mL
<b>Jacobs DS</b>	> 10 anni	< 19 pg/mL	
<b>Tietz</b>	Adulti	< 100 pg/mL	< 30 pg/mL

### Bibliografia

- Kratzsch J, Petzold A, Raue F, et al. Basal and stimulated calcitonin and procalcitonin by various assays in patients with and without medullary thyroid cancer. *Clin Chem* 2011, 57: 467-74.
- d'Herbomez M, Caron P, Bauters C, et al. Reference range of serum calcitonin levels in humans: influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol* 2007, 157: 749-55.
- Karanikas G, Moameni A, Poetzi C, et al. Frequency and relevance of elevated calcitonin levels in patients with neoplastic and nonneoplastic thyroid disease and in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 515-9.

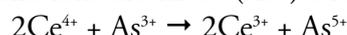
## 21g. Ioduria

(per fisiologia cfr cap 1, per utilizzo clinico cfr cap 12g)

### Metodiche di determinazione

La maggior parte delle metodiche per la determinazione della concentrazione urinaria dello iodio prevede la conversione di composti iodati organici in iodio inorganico e la rimozione degli interferenti che possono interferire con la misurazione colorimetrica dello iodio inorganico.

La procedura prevede una digestione iniziale, seguita dalla misurazione colorimetrica dello iodio attraverso la reazione di Sandell-Kolthoff. Infatti, lo iodio catalizza una reazione di ossido-riduzione in cui uno ione cerico ( $Ce^{4+}$ ), giallo, è ridotto a ione ceroso ( $Ce^{3+}$ ), incolore, parallelamente all'ossidazione dello ione arsenioso ( $As^{3+}$ ) a ione arsenico ( $As^{5+}$ ).



La determinazione dello iodio urinario mediante la reazione di Sandell-Kolthoff è molto sensibile, ma presenta interferenze (nitrati, tiocianati e ioni ferrosi); i campioni devono essere pertanto pre-trattati, per esempio mediante l'incenerimento umido ad alte temperature in presenza di un acido forte quale l'acido clorico. Si tratta di una fase delicata che richiede grande cautela per l'impiego di sostanze tossiche.

Negli ultimi anni sono stati messi a punto numerosi metodi automatizzati, che prevedono l'utilizzo dell'HPLC e in particolare dell'*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP/MS), che si sono dimostrati molto affidabili e hanno soppiantato in molte sedi i metodi colorimetrici manuali: le tecniche basate sulla reazione di Sandell-Kolthoff hanno una sensibilità tra 10 e 40  $\mu g/L$ , mentre la ICP-MS arriva a 2  $\mu g/L$ .

Per completare la panoramica strumentale, lo storico metodo tecnico *Autoanalyser* non è più disponibile, mentre sono stati proposti e sono impiegati sistemi semplificati di digestione e metodi in spettrometria di massa e immunoenzimatici.

### Bibliografia

- The Public Health Committee of the American Thyroid Association. Iodine supplementation for Pregnancy and Lactation - United States and Canada: Recommendations of the American Thyroid Association. Thyroid 2006, 16: 949-51.*
- Als C, Keller A, Minder C, et al. Age- and gender-dependent urinary iodine concentrations in an area-covering population sample from the Bernese region in Switzerland. Eur J Endocrinol 2000, 143: 629-37.*
- Gunton JE, Hams GH, Fiegert M, et al. Iodine deficiency in ambulatory participants at a Sydney teaching hospital: is Australia truly iodine replete? Med J Aust 1999, 171: 467-70.*
- Triboli P, Marchioni E. Le malattie da deficit dell'apporto iodico e le metodiche di determinazione della ioduria. RIMeL/IJLaM 2009, 5: 184-8.*
- Giovanella L, Imperiali M. Ioduria: indicatore di carenza iodica nel paziente o nella popolazione? RIMeL/IJLaM 2009, 5: 189-90.*
- Schramel P, Hasse S. Iodine determination in biological materials by ICP-MS. Microchimica Acta 2005, 116: 205-9.*
- Rendl J, Seybold S, Borner W. Urinary iodide determined by paired-ion reversed-phase HPLC with electrochemical detection. Clin Chem 1994, 40: 908-13.*
- Soldin OP. Controversies in urinary iodine determinations. Clin Biochem 2002, 35: 575-9.*
- Haldimann M, Zimmerli B, Als C, et al. Direct determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry using isotope dilution with iodine-129. Clin Chem 1998, 44: 817-24.*
- Andersen S, Karmisholt J, Pedersen, et al. Reliability of studies of iodine intake and recommendations for number of samples in groups and in individuals. Br J Nutr 2008, 99: 813-8.*

## 21h. Esami genetici

(per utilizzo clinico cfr cap 18a)

### Introduzione

I test genetici clinici rappresentano la nuova frontiera delle tecnologie applicate allo studio delle malattie geneticamente determinate. Si basano sull'esame diretto della molecola di DNA e di RNA, ma possono includere anche valutazioni sui prodotti genici, come enzimi e altre proteine, e l'osservazione dei cromosomi in microscopia (in fluorescenza o con altre colorazioni).

È importante comprendere la differenza tra gli esami genetici e gli altri esami di laboratorio.

I test genetici sono assolutamente peculiari, in quanto possono:

- fornire la prova diagnostica definitiva di una malattia già manifesta, oppure predirne l'insorgenza con una confidenza statisticamente significativa (caso tipico lo *screening* genetico per la MEN 2a con la ricerca di mutazioni del proto-oncogene *RET*);
- definire lo stato di portatore e il relativo rischio di trasmettere alla prole il gene mutato e la possibile suscettibilità al trattamento.

A fronte di questi vantaggi, esistono però diversi e complessi problemi potenziali che vanno conosciuti e soprattutto spiegati chiaramente ai pazienti. In particolare, alcuni temi etici, come la confidenzialità e la non-discriminazione, richiedono un approccio attento e multidisciplinare, ancora lontano da un'affidabile definizione.

Le principali **applicazioni** dei test genetici riguardano:

- lo *screening* dei portatori, cioè l'identificazione di soggetti non affetti da malattia, ma portatori di una copia di un gene responsabile della malattia, che, per essere espressa fenotipicamente, richiede la presenza di una seconda copia del gene;
- la diagnostica prenatale;
- lo *screening* neonatale;
- la diagnostica presintomatica di malattie a manifestazione nell'età adulta (es. corea di Huntington);
- la diagnostica presintomatica per stimare il rischio di ammalarsi di malattie a insorgenza nell'età adulta (es. alcune neoplasie o il morbo di Alzheimer);
- la diagnostica di conferma per soggetti sintomatici;
- la medicina forense.

Nei test genetici, un campione di DNA ottenuto da qualsiasi tessuto viene analizzato al fine di trovare sequenze geniche mutate. In alcuni casi vengono identificati piccoli segmenti, denominati **sonde**, le cui sequenze risultano complementari alle sequenze mutate. Queste sonde andranno a cercare il loro esatto complemento tra i miliardi di paia di basi che compongono un genoma umano. Se tale sequenza è effettivamente presente nel genoma testato, la sonda vi si legherà, segnalando così la presenza della mutazione.

Un altro tipo di test genetico prevede il confronto della sequenza di basi della molecola del paziente con un gene "normale".

Si tratta di metodi generalmente ancora molto costosi, con un costo proporzionale all'estensione delle mutazioni testate, ma i progressi dell'automazione promettono una sostanziale riduzione del costo anche in questo campo.

Il Servizio Nazionale inglese offre consulenza sui test disponibili e i laboratori di riferimento cui indirizzarsi (*UK Genetic Testing Network*). Chi è interessato può consultarne agevolmente

la *Directory* aggiornata, disponibile in Internet (<http://www.ukgtn.nhs.uk/gtn/Information/Services/Genetic+Testing+Directory>). Al 1/4/2011 erano elencati 622 geni riferiti a 458 malattie (non solo endocrine ovviamente).

È facilmente ipotizzabile che in un prossimo futuro questi esami possano entrare a far parte dell'arsenale diagnostico del laboratorio clinico anche non specializzato.

## Raccolta campioni e materiale per l'analisi molecolare di alterazioni somatiche

L'analisi di mutazioni o di riarrangiamenti genici, come tutte le alterazioni sopradescritte, può essere effettuata mediante sequenziamento di molecole di DNA o di RNA (dopo retro-trascrizione in cDNA). Il materiale di partenza può essere tessuto a fresco (in questo caso l'estrazione deve essere eseguita rapidamente, a meno che il materiale non venga congelato a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ ), fissato in alcool (i fissativi normalmente utilizzati in citologia sono su base alcolica) o in formalina tamponata (il fissativo normalmente utilizzato per l'analisi istopatologica). L'analisi FISH è una tecnica di elezione per la ricerca di riarrangiamenti (es. *RET/PTC*, *PAX8/PPAR $\gamma$* ), effettuata *in situ* su preparati istologici e citologici.

### Campioni citologici

**Analisi di sequenza** (es. mutazioni *BRAF*) può essere eseguita con campioni ricavati in diversi modi:

- passaggio dedicato di ago-aspirato con lavaggio dell'ago in alcool 95% o fissativo di trasporto su base alcolica;
- materiale ricavato da un preparato citologico già strisciato mediante *scraping* (grattamento) delle cellule dal vetrino;
- materiale cellulare residuo dopo allestimento di preparati citologici in strato sottile.

**Analisi FISH** (es. *PAX8/PPAR $\gamma$* ) può essere eseguita con campioni ricavati da:

- ordinario striscio citologico fissato in alcool o fissativi su base alcolica;
- sezioni in paraffina ottenute da cito-incluso (*cell block*).

### Campioni istologici

**Analisi di sequenza** (es. mutazioni *BRAF*) può essere eseguita con campioni ricavati in diversi modi:

- sezioni (8-10  $\mu\text{m}$  di spessore) di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina; per il controllo istologico del materiale analizzato, la valutazione della percentuale di cellule neoplastiche, la selezione dell'area da cui raccogliere il materiale mediante dissezione sotto guida microscopica è essenziale una sezione di riferimento colorata con Ematossilina/Eosina. Il numero delle sezioni dipende dalle dimensioni del tessuto lesionale a disposizione e dal numero di test da eseguire. In generale, se il tessuto lesionale nel blocchetto di paraffina misura circa un centimetro di diametro sono sufficienti 4-6 sezioni;
- sezioni criostatiche di tessuto congelato (8-10  $\mu\text{m}$  di spessore), in cui è essenziale la sezione di riferimento colorata con Ematossilina/Eosina.

**Analisi FISH** (es. *PAX8/PPAR $\gamma$* ) può essere eseguita su sezioni di 4  $\mu\text{m}$  di spessore di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina su vetrini polarizzati (come quelli utilizzati per l'analisi immunoistochimica), con una sezione di riferimento colorata con Ematossilina/Eosina.

## Bibliografia

- Hudson K, Javitt G. *Regulating laboratory-developed tests. Nature Biotechnol* 2009, 27: 419-20.
- Kaufman D, Geller G, LeRoy L, et al. *Ethical implications of including children in a large biobank for genetic-epidemiologic research: a qualitative study of public opinion. Am J Med Genet Part C: Semin Med Genet* 2008, 148C: 31-9.
- Javitt G. *In search of a coherent framework: options for FDA oversight of genetic tests. Food and Drug Law J* 2007, 62: 617-52.
- Hudson K. *Genetic testing oversight. Science* 2006, 313: 1853.



## **22. *Flow-chart* diagnostiche**

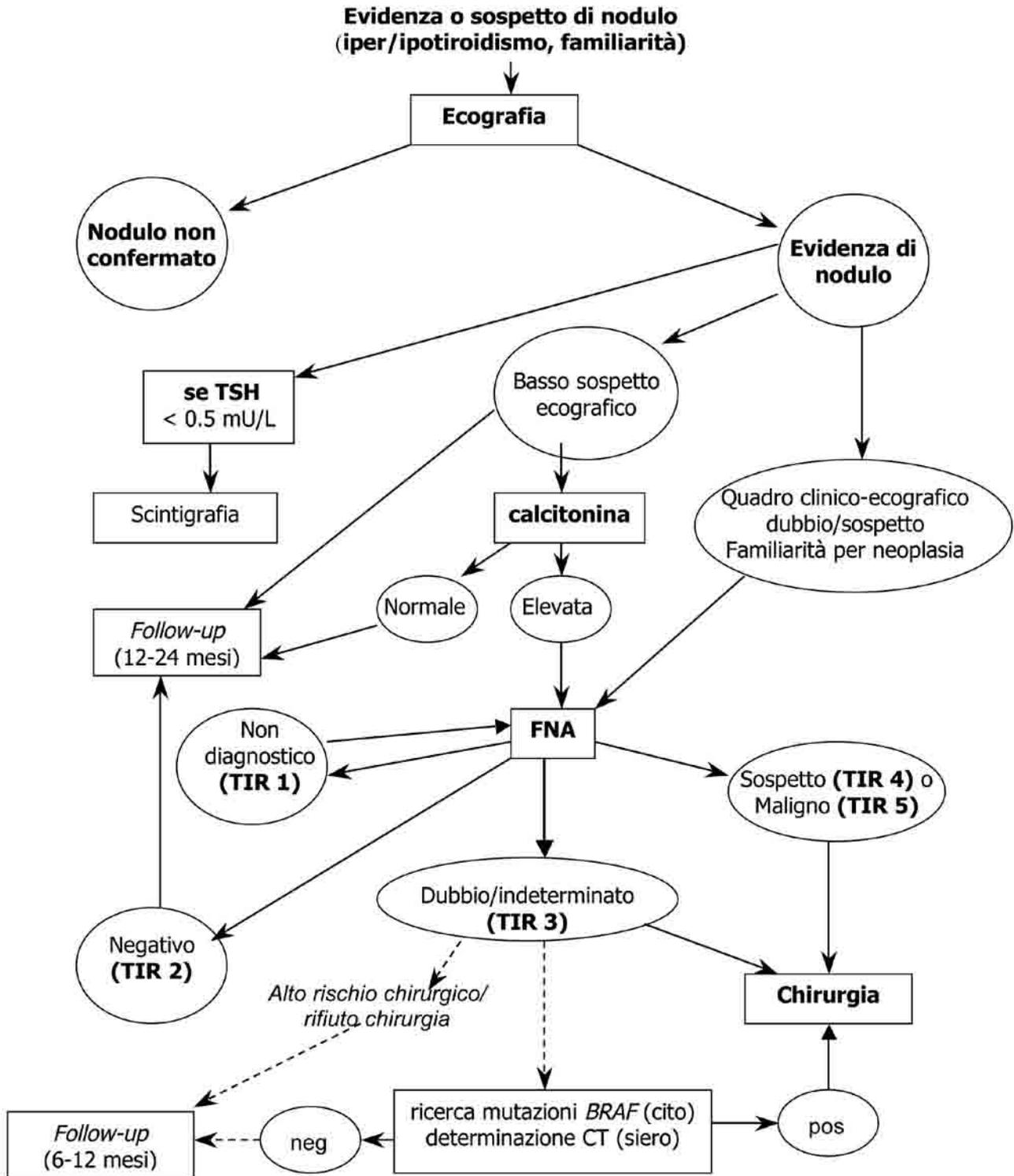
**Andrea Frasoldati & Vincenzo Giammarco**

---



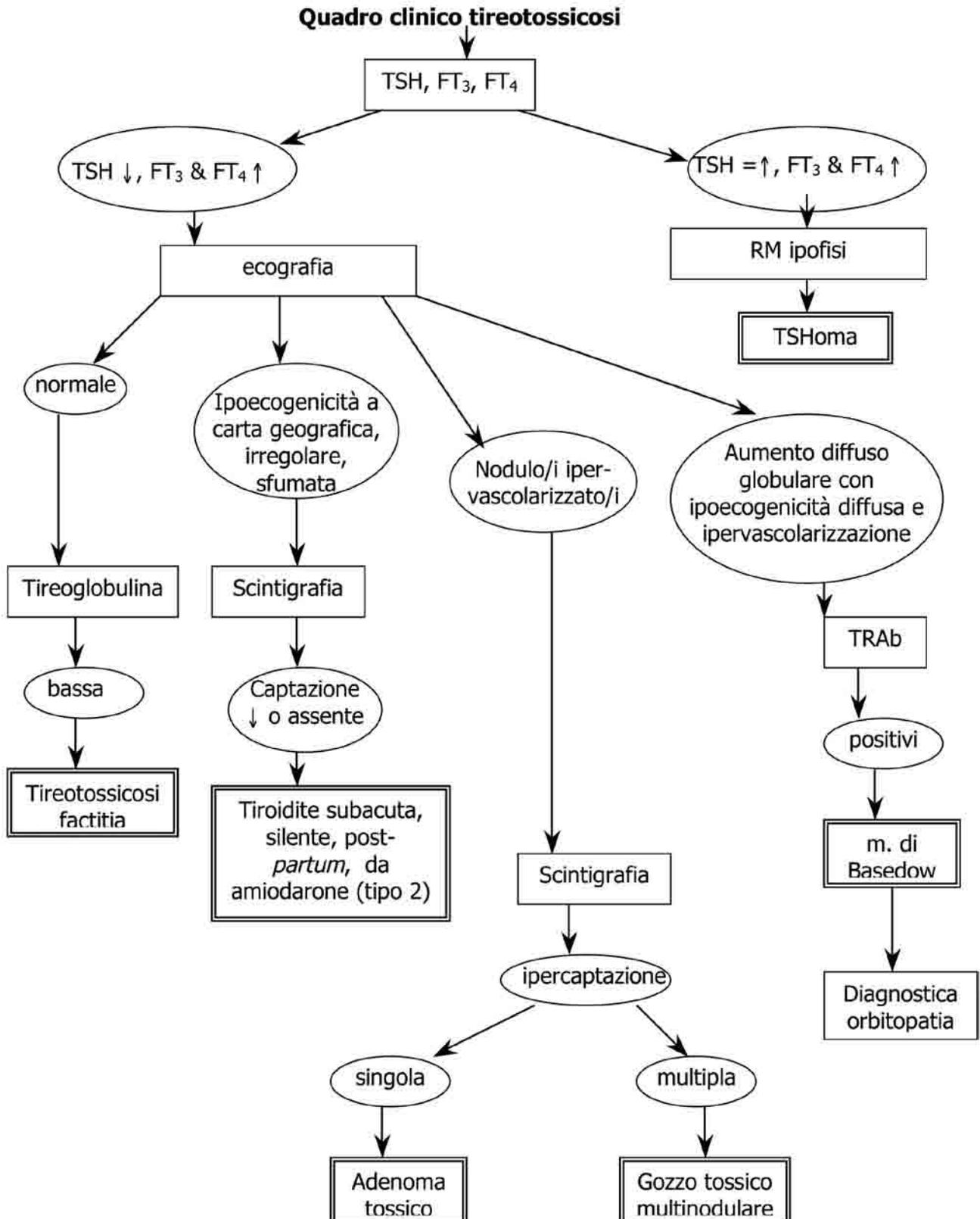
## 22a. Nodulo tiroideo

(cfr cap 5)



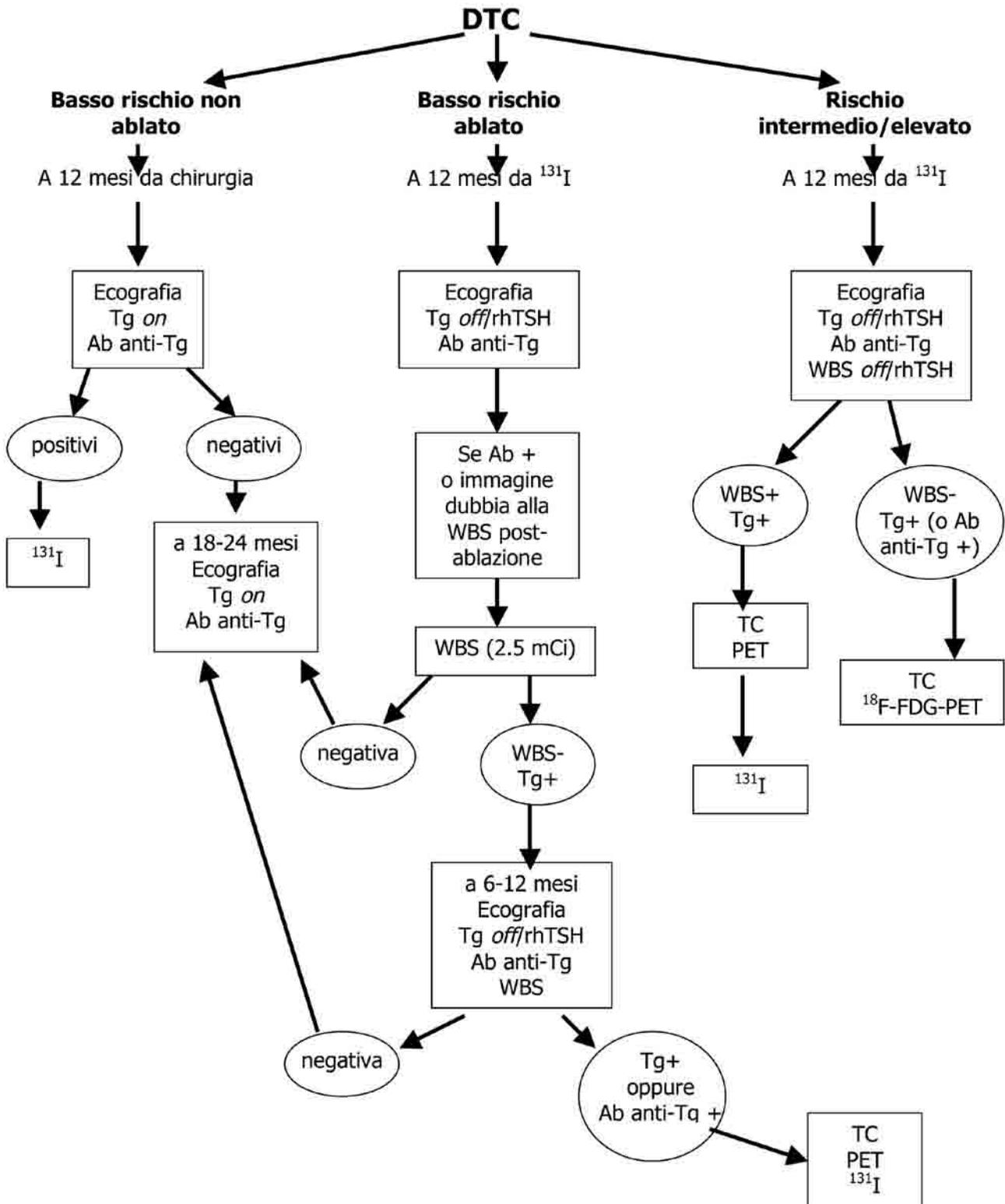
## 22b. Iperertiroidismo

(cfr cap 9)



## 22c. Follow-up tumore tiroideo

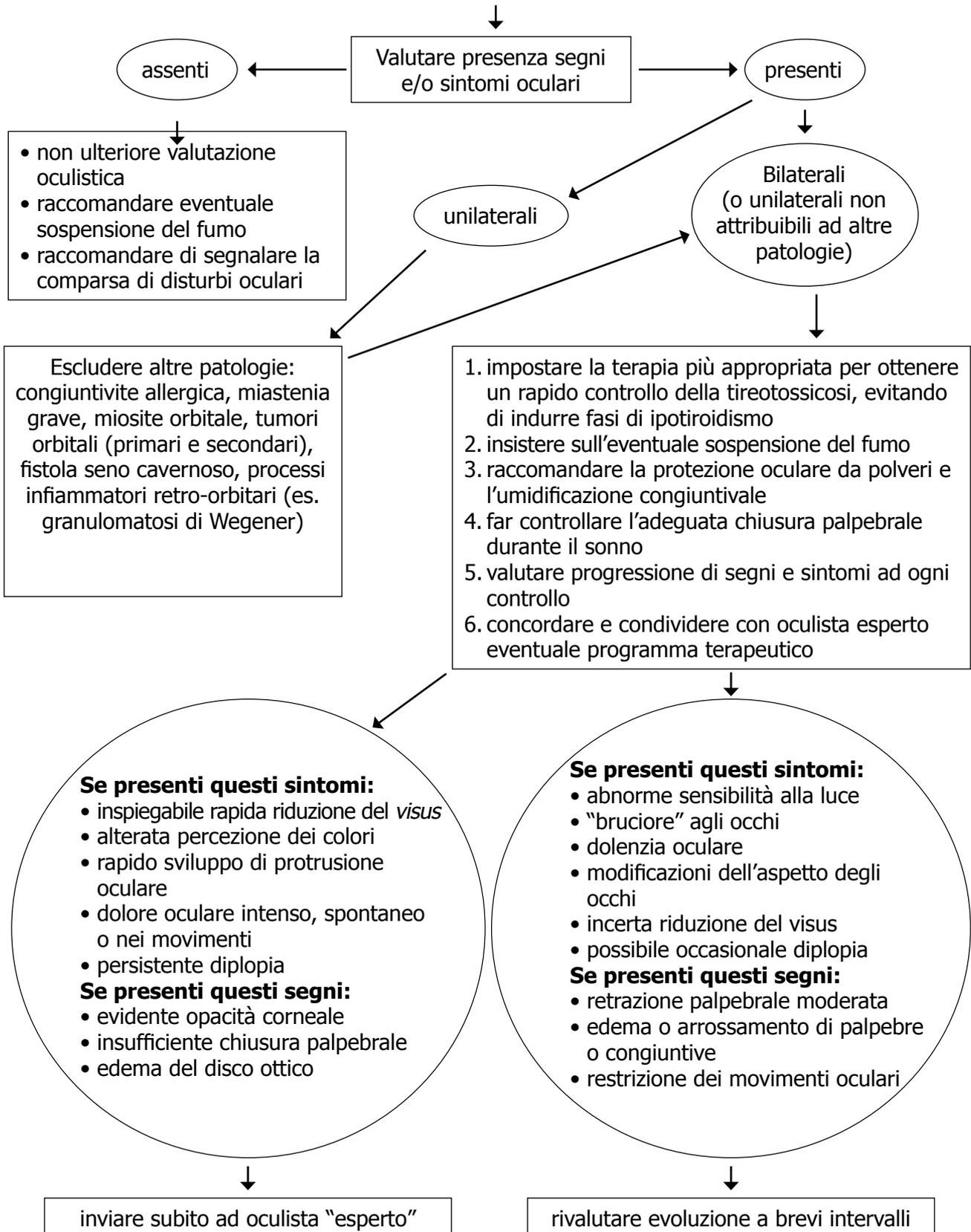
(cfr cap 6)



## 22d. Orbitopatia Basedowiana

(cfr cap 10)

### Paziente con ipertiroidismo da malattia autoimmune (m. di Basedow)



## 23. Formule di uso frequente

Gregorio Reda & Pierpaolo Trimboli

---



## Legenda generale

\* indica il segno di moltiplicazione

^ indica l'elevazione a potenza

/ indica il segno di divisione

### BMI (Body Mass Index)

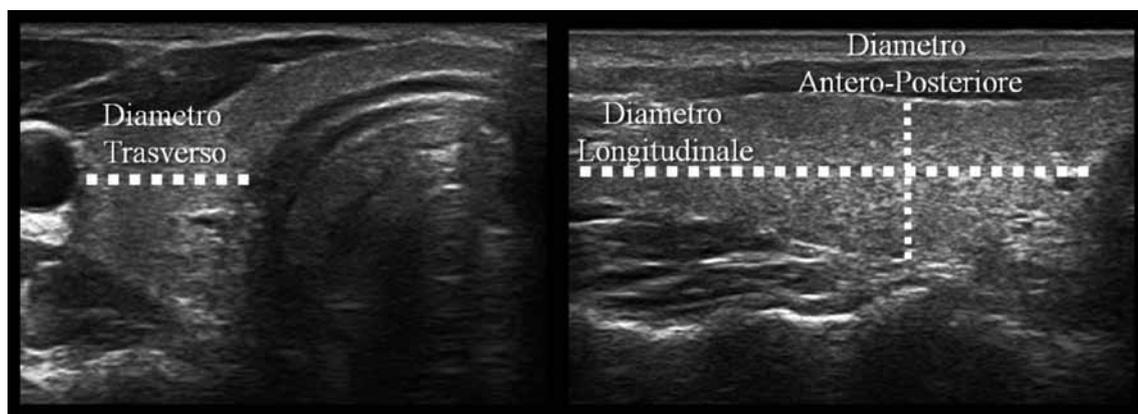
<b>Cos'è</b>	L'indice di massa corporea sintetizza in un solo numero peso e altezza.
<b>A cosa serve</b>	Migliore correlazione (superiore al peso) con morbilità e mortalità.
<b>Parametri necessari per il calcolo</b>	Peso (espresso in kg) Altezza (espressa in metri: esempio 1.80)
<b>Come calcolarlo</b>	$\text{Peso}/(\text{altezza}*\text{altezza})$
<b>Come calcolarlo con Excel</b>	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 <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente 4. (se l'altezza è espressa in cm, scrivi in C1 $=A1/((B1/100)^2)$ ) <b>Esempio:</b> kg 77, m 1.81, BMI = 23.5 kg/m <sup>2</sup>
<b>Parametri di riferimento</b>	Normale: 18.5 ÷ 25. Sovrappeso: 25 ÷ 30 Obeso: 30 ÷ 35 Gravemente obeso: > 35 Sottopeso: 17 ÷ 18.5 Gravemente sottopeso: < 17

### SUPERFICIE CORPOREA (formula di Dubois)

<b>Cos'è</b>	Sintetizza in un solo numero peso e altezza.
<b>A cosa serve</b>	È utilizzata per calcolare la dose da somministrare di alcuni farmaci.
<b>Parametri necessari per il calcolo</b>	Peso (espresso in kg) Altezza (espressa in cm)
<b>Come calcolarla</b>	$0.007184*\text{altezza}^{0.725} * \text{peso}^{0.425}$
<b>Come calcolarla con Excel</b>	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 <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente <b>Esempio:</b> kg 77, m 1.81, superficie corporea = 1.97 m <sup>2</sup>

## STIMA DEL VOLUME GHIANDOLARE TIROIDEO

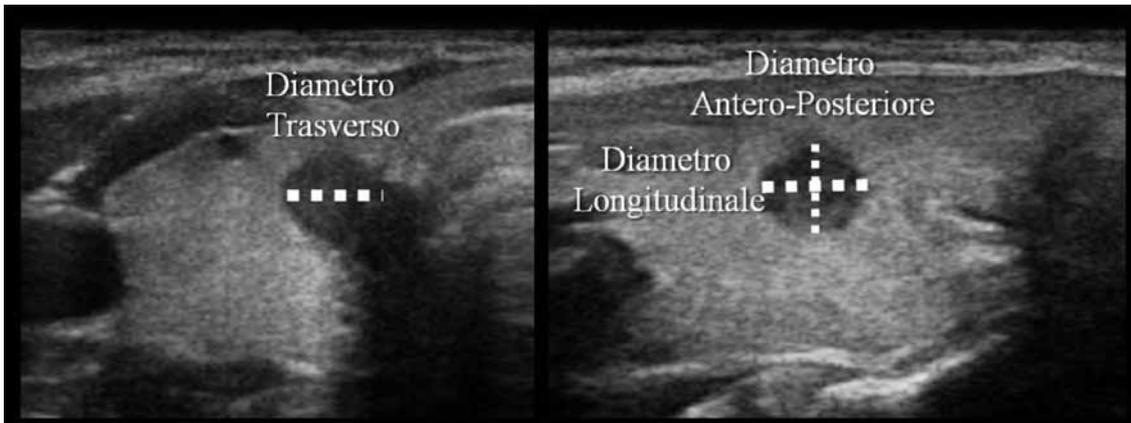
<b>A cosa serve</b>	Partendo dai dati ecografici stima il volume tiroideo.
<b>Parametri necessari per il calcolo</b>	Diametri (espressi in cm): antero-posteriore (AP), trasverso (T), longitudinale (L). La figura 23.1 mostra la corretta valutazione ecografica dei diametri di un lobo ghiandolare.
<b>Come calcolarlo</b>	Si applica la formula del volume dell'ellissoide a ciascuno dei due lobi, mentre non viene preso in considerazione l'istmo $\text{Volume lobare} = AP * T * L * 0.52$
<b>Come calcolarlo con Excel</b>	Per il lobo sinistro: 1. scrivi il diametro AP nella casella A1 2. scrivi il diametro T nella casella B1 3. scrivi il diametro L nella casella C1 Per il lobo destro: 4. scrivi il diametro AP nella casella D1 5. scrivi il diametro T nella casella E1 6. scrivi il diametro L nella casella F1 7. scrivi in G1: $=(A1*B1*C1*0.52)+(D1*E1*F1*0.52)$ e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente <b>Esempio:</b> lobo sinistro AP 1.1 cm, T 1.5 cm, L 2.3 cm; lobo destro AP 1.2 cm, T 1.3 cm, L 2.6 cm; $V = 4.08 \text{ mL o cm}^3$
<b>Parametri di riferimento</b>	Normale: < 20 mL nell'adulto.



**Figura 23.1**  
**Modo corretto di calcolare i diametri tiroidei a partire dalla scansione ecografica**  
(a sinistra trasversale, a destra longitudinale)

**STIMA DEL VOLUME DEL NODULO TIROIDEO**

<b>A cosa serve</b>	Partendo dai dati ecografici stima il volume nodulare. Tale formula dovrebbe essere utilizzata nel corso del <i>follow-up</i> della patologia nodulare, perchè permette di valutare le sue dimensioni in maniera molto più accurata rispetto al suo diametro massimo.
<b>Parametri necessari per il calcolo</b>	Diametri (espressi in cm): antero-posteriore (AP), trasverso (T), longitudinale (L). La figura 23.2 mostra la corretta valutazione ecografica dei diametri di un nodulo.
<b>Come calcolarlo</b>	Si applica la formula del volume dell'ellissoide $\text{Volume} = \text{AP} * \text{T} * \text{L} * 0.52$
<b>Come calcolarlo con Excel</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Scrivi il diametro AP nella casella A1</li> <li>2. scrivi il diametro T nella casella B1</li> <li>3. scrivi il diametro L nella casella C1</li> <li>4. scrivi in D1: <code>=A1*B1*C1*0.52</code> e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente</li> </ol> <p><b>Esempio:</b> AP 3.2 cm, T 1.9 cm, L 2.1 cm; V = 6.64 mL o cm<sup>3</sup></p>



**Figura 23.2**

**Modo corretto di calcolare i diametri nodulari a partire dalla scansione ecografia**  
 (a sinistra trasversale, a destra longitudinale)



## **24. Farmaci e Reattivi: caratteristiche e approvvigionamento**

**Chiara Pascucci & Maurizio Poggi**



### CALCIO

<b>Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)</b>	Industria Farmaceutica Galenica Senese. Via Cassia Nord, 351 - 53014 Monteroni d'Arbia (Siena). Data della prima autorizzazione: Dicembre 1993. Data del rinnovo dell'autorizzazione: Dicembre 2003.
<b>Composizione</b>	Una fl da 10 mL contiene calcio gluconato 950 mg, calcio saccharato 36 mg, acqua per preparazioni iniettabili q.b. Il pH è tra 6 e 8.2. Contiene 446 mEq/L di calcio <sup>++</sup> .
<b>Forma farmaceutica</b>	Soluzione iniettabile per uso endovenoso, sterile ed apirogena, ipertonica. Essendo ipertonica, va somministrata con iniezione lenta, o diluita 1:10, per arrivare a una concentrazione di 10 mg/mL, con sodio cloruro 0.9% p/v oppure glucosio 5% p/v.
<b>Natura e contenuto della confezione</b>	Fiale in vetro da 10 mL.
<b>Speciali precauzioni per la conservazione</b>	Deve essere utilizzato subito dopo l'apertura della fiala e per una sola ed ininterrotta somministrazione.
<b>Periodo di validità</b>	36 mesi dalla data di preparazione.
<b>Modalità di richiesta</b>	Moduli per uso interno per farmacia ospedaliera.

### THYROGEN

<b>Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)</b>	Genzyme Europe BV, Gooimeer 10, 1411 DD Naarden, Paesi Bassi. Data della prima autorizzazione valida in tutta l'Unione europea: 9 marzo 2000. Data dell'ultimo rinnovo: 9 marzo 2010.
<b>Composizione</b>	Un flacone contiene 0.9 mg del principio attivo tireotropina alfa, prodotto tramite la tecnologia del DNA ricombinante. Thyrogen contiene i seguenti eccipienti: mannitolo, fosfato di sodio monobasico, monoidrato, fosfato di sodio dibasico, eptaidrato, cloruro di sodio.
<b>Forma farmaceutica</b>	Polvere confezionata in flaconcini.
<b>Natura e contenuto della confezione</b>	Flaconcini di vetro incolore da 5 mL. La chiusura è costituita da un tappo di butile siliconato, con capsula a tenuta con aletta. Ogni flaconcino contiene 1.1 mg di tireotropina alfa. Per avere un volume sufficiente da permettere una somministrazione accurata, ogni flaconcino di Thyrogen è formulato per contenere un'eccedenza di 0.2 mL. Ogni confezione contiene uno o due flaconcini di Thyrogen per scatola.
<b>Speciali precauzioni per la conservazione</b>	Dopo la ricostituzione, la soluzione va iniettata im entro tre ore.
<b>Periodo di validità</b>	Il medicinale ricostituito può essere conservato per 24 ore ad una temperatura di 2-8°C, al riparo dalla luce, evitando contaminazioni batteriche.
<b>Modalità di richiesta</b>	Moduli per uso interno per farmacia ospedaliera.

**TITRE**

<b>Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)</b>	Teofarma S.r.l. Sede: via F.lli Cervi 8, 27010 Valle Salimbene (PV); stabilimento: v.le Certosa 8/A, 27100 Pavia. Data della prima autorizzazione: Giugno 1958. Data del rinnovo dell'autorizzazione: Giugno 2000.
<b>Composizione</b>	Una cp contiene 20 µg di tri-iodotironina.
<b>Forma farmaceutica</b>	Compresse.
<b>Natura e contenuto della confezione</b>	Scatola contenente 50 compresse da 20 µg, in <i>blister</i> .
<b>Speciali precauzioni per la conservazione</b>	Nessuna.
<b>Periodo di validità</b>	A confezionamento integro: 36 mesi.
<b>Modalità di richiesta</b>	Può essere acquistato nelle farmacie presenti sul territorio.

**TRH**

<b>Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)</b>	S.A. UCB N.V. Bruxelles, Allée de la Recherche 60, 1070 – Bruxelles, Belgio
<b>Composizione</b>	Principio attivo: Protirelin 0.2 mg. Solvente: acqua per preparazioni iniettabili 1 mL.
<b>Forma farmaceutica</b>	Soluzione iniettabile
<b>Natura e contenuto della confezione</b>	Astuccio da 5 fiale da 0.2 mg/mL
<b>Speciali precauzioni per la conservazione</b>	Il prodotto deve essere conservato a temperatura ambiente (15–25°C) e al riparo della luce
<b>Periodo di validità</b>	Indicato sulla confezione.
<b>Modalità di richiesta</b>	Moduli per farmaci <b>non in commercio in Italia</b>

## **25. Stadiazione TNM dei tumori tiroidei**

**Anna Crescenzi, Enrico Papini & Silvia Taccogna**

---

*(cfr anche cap 6)*



La stadiazione dei tumori testa-collo è basata interamente sull'estensione anatomica della malattia. Questo criterio non può essere applicato ai tumori della tiroide, nei quali età del paziente ed istotipo incidono fortemente su andamento e prognosi della malattia e sono pertanto inclusi nel sistema di stadiazione.

Gli **elementi principali nella stadiazione** patologica sono:

- a) l'istotipo (papillare, follicolare, midollare, ecc);
- b) le dimensioni del tumore;
- c) la uni o multifocalità;
- d) l'invasività locale (capsulare e/o vascolare);
- e) la presenza di metastasi nei linfonodi loco-regionali;
- f) la presenza di metastasi a distanza;
- g) l'età del paziente.

Su queste caratteristiche si basa il sistema di classificazione estesamente utilizzato per la stratificazione per stadi di rischio, proposto dalla UICC e dalla AJCC. Tale classificazione, denominata TNM (*Tumor, Node, Metastasis*), analizza i singoli parametri e li combina tra loro per la definizione degli stadi di rischio. Il sistema di valutazione è stato più volte rivisto sulla scorta delle meta-analisi pubblicate sul rischio di mortalità per carcinoma tiroideo e pertanto il suo potere predittivo si è affinato nelle varie edizioni. La stadiazione attualmente in uso è quella della 7° Edizione AJCC del gennaio 2010 (tabelle 25.1,2,3).

**Tabella 25.1**  
**Classificazione delle dimensioni tumorali**

<b>TX</b>	Tumore primitivo non valutabile	
<b>T0</b>	Nessuna evidenza del tumore primitivo	
<b>T1</b>	Diametro massimo ≤ 2 cm, limitato alla tiroide	
	<b>T1a</b>	Diametro massimo ≤ 1 cm
	<b>T1b</b>	diametro massimo > 1 cm (ma comunque ≤ 2 cm)
<b>T2</b>	Diametro massimo > 2 cm ma ≤ 4 cm, limitato alla tiroide	
<b>T3</b>	Diametro > 4 cm limitato alla tiroide o di qualsiasi dimensione con minima estensione extra-tiroidea (es. muscolo sterno-cleido-mastoideo o tessuti molli peri-tiroidei)	
<b>T4</b>	<b>T4a</b> (malattia moderatamente avanzata)	Qualsiasi dimensione, con estensione oltre la capsula tiroidea, con invasione di tessuti molli sottocutanei, laringe, trachea, esofago o nervo laringeo ricorrente
	<b>T4b</b> (malattia molto avanzata)	Tumore che invade la fascia pre-vertebrale o ingloba l'arteria carotide o i vasi mediastinici

Per ogni stadio di dimensione tumorale specificare la uni o multifocalità:

- (s) solitario;
- (m) multifocale.

In caso di multifocalità, la classe T si basa sulle caratteristiche del tumore più aggressivo.

Tutti i carcinomi anaplastici sono considerati T4.

Rispetto alla precedente (6° edizione 2002), l'attuale classificazione della stadiazione ha introdotto i sottogruppi T1a e T1b, la specificazione dell'eventuale multifocalità e ha cambiato la denominazione dei sottogruppi T4a e T4b (in precedenza, rispettivamente, tumore resecabile e non resecabile).

**Tabella 25.2**  
**Classificazione delle metastasi linfonodali**

<b>NX</b>	Non valutabili	
<b>N0</b>	Assenti	
<b>N1</b>	Presenti nei linfonodi regionali (compartimento centrale, latero-cervicali e mediastino superiore)	
	<b>N1a</b>	del VI livello (pre-tracheali, para-tracheali e pre-laringei/delfiani)
	<b>N1b</b>	dei livelli I-V (latero-cervicali omolaterali, bilaterali o controlaterali), o VII (retro-faringei o mediastinici superiori)

**Tabella 25.3**  
**Classificazione delle metastasi a distanza**

<b>MX</b>	Non valutabili
<b>M0</b>	Assenti
<b>M1</b>	Presenti

Nella 7° edizione del TNM viene richiesto anche il grado di differenziazione della neoplasia (tabella 25.4).

**Tabella 25.4**  
**Grado di differenziazione della neoplasia tiroidea**

<b>G1</b>	Ben differenziata
<b>G2</b>	Moderatamente differenziata
<b>G3</b>	Scarsamente differenziata
<b>G4</b>	Indifferenziata

Le informazioni ottenute con i parametri T, N ed M combinate con gli altri fattori di rischio, determinano lo stadio anatomico e i gruppi prognostici (tabella 25.5).

**Tabella 25.5**  
**Stadiazione dei tumori tiroidei**

Tumore	Stadio	< 45 anni	≥ 45 anni
<b>Carcinoma differenziato (papillare o follicolare)</b>	<b>I</b>	ogni T, ogni N, M0	T1, N0, M0
	<b>II</b>	ogni T, ogni N, M1	T2, N0, M0
	<b>III</b>	-	T3, N0, M0 T1, N1a, M0 T2, N1a, M0 T3, N1a, M0
	<b>IVa</b>	-	T4a, N0, M0 T4a, N1a, M0 T1, N1b, M0 T2, N1b, M0 T3, N1b, M0 T4a, N1b, M0
	<b>IVb</b>	-	T4b, ogni N, M0
	<b>IVc</b>	-	ogni T, ogni N, M1
<b>Carcinoma midollare</b>	<b>I</b>	T1, N0, M0	
	<b>II</b>	T2, N0, M0 T3, N0, M0	
	<b>III</b>	T1, N1a, M0 T2, N1a, M0 T3, N1a, M0	
	<b>IVa</b>	T4a, N0, M0 T4a, N1a, M0 T1, N1b, M0 T2, N1b, M0 T3, N1b, M0 T4a, N1b, M0	
	<b>IVb</b>	T4b, ogni N, M0	
	<b>IVc</b>	ogni T, ogni N, M1	
<b>Carcinoma anaplastico</b>	<b>IVa</b>	T4a, ogni N, M0	
	<b>IVb</b>	T4b, ogni N, M0	
	<b>IVc</b>	ogni T, ogni N, M1	

La stadiazione TNM rappresenta attualmente la base per la scelta delle opzioni terapeutiche ed il *follow-up* del paziente.

Il **limite del sistema TNM** consiste principalmente nel fatto che stratifica i pazienti per rischio di morte e non offre informazioni dirette sulla probabilità di recidiva della malattia. L'introduzione nell'ultima edizione del *grading* del tumore, della uni o multifocalità della lesione e della suddivisione del T1 in a e b mira ad aumentare la capacità prognostica del sistema. Inoltre, poiché la stadiazione viene eseguita essenzialmente su parametri istologici, questa è fatta a posteriori dell'intervento chirurgico e pertanto non può guidare la scelta del tipo di approccio iniziale.

## Bibliografia

*AJCC Cancer Staging Manual, 7° Ed. Springer-Verlag, New York, 2010.*

*Krämer JA, Schmid KW, Dralle H, et al. MSDS study group. Primary tumour size is a prognostic parameter in patients suffering from differentiated thyroid carcinoma with extrathyroidal growth: results of the MSDS trial. Eur J Endocrinol 2010, 163: 637-44.*

*Onitilo AA, Engel JM, Lundgren CI, et al. Simplifying the TNM system for clinical use in differentiated thyroid cancer. J Clin Oncol 2009, 27: 1872-8.*

*Baloch ZW, LiVolsi VA. Prognostic factors in well-differentiated follicular-derived carcinoma and medullary thyroid carcinoma. Thyroid 2001, 11: 637-45.*

## **26. Fattori di conversione delle unità di misura convenzionali in Unità Internazionali (SI)**

**Marco Caputo & 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 in Medicina di Laboratorio delle Unità SI (da Sistema Internazionale) e non di quelle convenzionali per numerose ragioni, tra cui le principali vengono elencate di seguito.

- 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:

1. si passa dalla concentrazione di massa per decilitro, alla concentrazione di massa per litro:  $100 \text{ mg/dL} * 10 = 1000 \text{ mg/L}$ ;
2. 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 26.1 sono indicati i fattori di conversione di alcuni dei principali esami.

**Tabella 26.1**

Analita	Unità Convenzionale	Fattore di Conversione*	Unità SI
<b>Calcitonina</b>	pg/mL (ng/L)	0.292	pM/L
<b>FT<sub>3</sub></b>	pg/dL	0.0154	pM/L
<b>FT<sub>4</sub></b>	ng/dL	12.87	pM/L
<b>Iodio</b>	µg/L	7.88	nM/L
<b>Tireoglobulina</b>	ng/mL (µg/L)	1.493	pM/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)