

## **5. Appendice pratica**

---



## 5.a. Note di Metodologia Epidemiologica e Statistica

Nessuno dei metodi a disposizione del laboratorio clinico possiede le caratteristiche proprie del dosaggio “ideale” (riflettere l’attività biologica dell’ormone, possedere una sensibilità sufficiente, essere accurato e riproducibile, consentire l’analisi di un numero elevato di campioni).

Autorevoli organizzazioni hanno indicato per alcuni ormoni e test dei limiti decisionali che hanno validità solo nel contesto clinico e laboratoristico specificato e che possono essere tradotti nelle diverse realtà cliniche solo seguendo raccomandazioni e linee guida aggiornate, attraverso uno stretto collegamento tra l’endocrinologo, il laboratorio analisi e il personale infermieristico ed amministrativo che ha la responsabilità delle fasi pre- e post-analitiche.

È fondamentale, comunque, avere presente che non è possibile trasferire direttamente i valori di *cut-off* decisionali dagli articoli scientifici o dai trattati consultati ai risultati prodotti dal laboratorio che noi utilizziamo, se non sono verificati il metodo e l’analizzatore impiegati, l’unità di misura e lo standard a cui è collegata.

### 5.a.1 Le variazioni nei risultati degli esami

Il medico di laboratorio ha cura di scegliere la strumentazione e i metodi più validi, fa in modo che le fasi preanalitiche (di preparazione del paziente e raccolta e gestione del campione) e di refertazione siano adeguate, e ottimizza l’accuratezza e la precisione dei risultati.

Un metodo si definisce ‘*accurato*’ quando il risultato è prossimo al cosiddetto “valore vero”, ‘*preciso*’ quando esso produce risultati riproducibili.

I risultati analitici sono tuttavia soggetti ad errore, indipendentemente dalla qualità del laboratorio e dall’abilità di chi vi lavora. Gli aspetti quantitativi della mancanza di precisione meritano di essere chiariti. Ad esempio, se misuriamo molte volte la concentrazione di ACTH in un campione di plasma con due metodi diversi, uno molto preciso ed uno poco preciso, l’istogramma della distribuzione dei risultati avrà in entrambi i casi un aspetto (normale) gaussiano, ma nel caso del metodo preciso i risultati saranno più concentrati intorno alla concentrazione media. La deviazione standard (DS) è la misura di questa distribuzione intorno al valore medio: la DS è grande se la distribuzione è ampia ed è piccola se la distribuzione è stretta. Per i dati che hanno distribuzione gaussiana, come avviene nel caso degli errori analitici, l’aspetto della curva è completamente definito dalla media e dalla DS. In particolare, si verifica che:

- circa il 67% dei risultati è compreso nell’ambito definito da  $\text{media} \pm 1 \text{ DS}$
- circa il 95% dei risultati è compreso nell’ambito definito da  $\text{media} \pm 2 \text{ DS}$
- circa il 99% dei risultati è compreso nell’ambito definito da  $\text{media} \pm 3 \text{ DS}$ .

La figura 2 mostra (in alto a sinistra) un esame accurato, che si avvicina cioè al valore vero, ma è scarsamente riproducibile (i risultati cioè si disper-

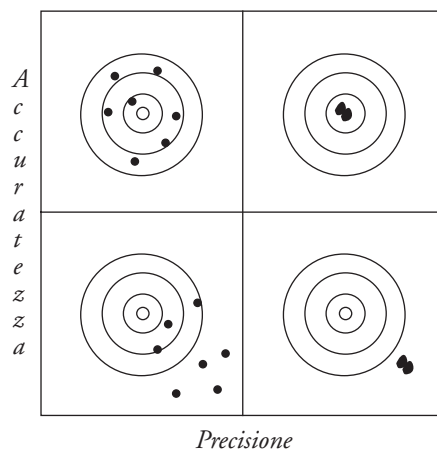


Fig. 2  
Esempio di un esame accurato ed impreciso (in alto a sinistra) e di un esame preciso ed inaccurato (in basso a destra). L’esame ideale è quello in alto a destra, contemporaneamente accurato e preciso.

dono intorno al risultato vero), e (in basso a destra) un esame preciso. In questo caso i punti si disperdono in un'area molto stretta, ma molto distante dal valore vero (l'esame è poco accurato).

Poiché spesso gli esami ormonali non possiedono entrambe le caratteristiche ideali di accuratezza e precisione, è opportuno impiegare **esami accurati per la diagnosi** ed **esami precisi per il monitoraggio** (un esempio potrebbe essere rappresentato dal dosaggio del paratormone nella diagnosi di iperparatiroidismo primario e dalla determinazione della calcemia nel follow-up del paziente dopo paratiroidectomia).

È importante che il medico di laboratorio comunichi ai clinici i dati relativi all'imprecisione analitica dei diversi esami che sono a loro disposizione. Infatti, la tecnologia e l'elettronica hanno consentito progressi nell'automazione, rapidità e riproducibilità degli esami di laboratorio (soprattutto per gli esami immunometrici) ma non sempre nella loro accuratezza.

Mentre le fasi analitiche sono automatizzate, facilmente controllabili e riproducibili (la quota degli errori analitici si aggira consistentemente intorno al 10% di tutti gli errori), le fasi a carico dell'operatore umano sono suscettibili di molte possibilità di errore ed è in questa direzione che devono indirizzarsi gli sforzi per il miglioramento della qualità degli esami endocrinologici.

## 5.a.2 Cause biologiche di variazione dei risultati

Sempre maggiore importanza viene data alle cause biologiche di variazione dei risultati. Infatti la concentrazione di ogni analita, indipendentemente dalla variabilità analitica, non rimane assolutamente costante nel tempo, nello stato di salute e di malattia, ma oscilla intorno ad un punto omeostatico che è specifico del soggetto o generale. Non tutte le cause di questa variabilità sono note ed in alcuni casi tale variabilità può essere molto rilevante.

Tra le cause di variabilità intra-individuale possono essere ricordate:

- **L'età**, che può influenzare la concentrazione di un costituente del sangue nei primi giorni di vita, durante l'adolescenza e nell'età avanzata.
- La **dieta**, che influenza molti esami (tra i più classici la curva da carico di glucosio, l'escrezione urinaria di idrossiprolina e di calcio). Vi sono alimenti comuni che hanno effetti particolari e rilevanti. La caffeina, per esempio, aumenta la concentrazione di glucosio ed altera la tolleranza al carico di glucosio, riduce il ritmo circadiano del cortisolo, aumenta la concentrazione di sodio, potassio, calcio e magnesio nelle urine.
- Le caratteristiche secretorie specifiche dei diversi ormoni, quali il **ritmo circadiano** che determina concentrazioni diverse nel corso della giornata particolarmente rilevanti per ACTH e cortisolo e i picchi secretori per il GH.
- La **postura**: passare dalla posizione supina a quella eretta porta ad una riduzione del volume di sangue del 10%, con conseguente aumento della concentrazione di proteine, enzimi ed ormoni proteici, poiché solo il fluido privo di proteine passa nei tessuti.
- Il **fumo**, attraverso l'azione della nicotina, può influenzare molti esami di laboratorio in modo proporzionato al numero di sigarette fumate. La concentrazione di glucosio plasmatico può aumentare di 10 mg/dL (0.56 mmol/L) entro 10 minuti dal momento in cui si è fumato; tale effetto può protrarsi per un'ora. I fumatori tendono avere una concentrazione di glucosio più alta rispetto ai non fumatori con un'alterata tolleranza glicemica. Il GH, inoltre, può aumentare anche 10 volte nella mezz'ora successiva al momento in cui si è fumata una sigaretta.

### 5.a.3 L'Intervallo di Riferimento

Quando consideriamo un risultato, dobbiamo confrontarlo con un gruppo di risultati ottenuti in una popolazione cosiddetta di riferimento.

L'intervallo di riferimento è ottenuto misurando un particolare analita in un campione di individui estratto da una popolazione di riferimento. Gli individui di riferimento non sono necessariamente sani, ma semplicemente individui selezionati utilizzando criteri ben definiti. La valutazione della variabile nel campione di riferimento fornisce valori numerici denominati limiti di riferimento. Dal punto di vista pratico si devono selezionare in modo casuale gli individui dalla popolazione generale utilizzando dei criteri predefiniti che possono tenere conto, a seconda dei casi, di sesso, età, assunzione o meno di farmaci ed, eventualmente, dei risultati di accertamenti diagnostici di tipo generale.

Una volta che i criteri di riferimento siano esplicitati non vi sono restrizioni particolari nella selezione degli individui di riferimento.

È importante sottolineare che *questi limiti non hanno valore decisionale ma solo descrittivo*.

Quando i risultati ottenuti nel gruppo di riferimento sono analizzati, essi si distribuiscono intorno ad un valore centrale con una **distribuzione** che può essere **simmetrica** (spesso gaussiana) o più frequentemente **asimmetrica** (con coda a destra). Il metodo più utilizzato per scegliere l'intervallo di riferimento da questi risultati è quello di calcolare il 95% centrale della distribuzione. L'intervallo comprende cioè la popolazione compresa tra il percentile 2.5 e 97.5. Per le variabili in cui si ha un eccesso di asimmetria con una coda importante a destra, la definizione dell'intervallo di riferimento prevede la trasformazione logaritmica dei risultati al fine di rendere più simmetrica (gaussiana) la distribuzione dei valori. L'intervallo andrebbe accompagnato sempre da un indice della variabilità campionaria della stima, il cosiddetto **intervallo di confidenza**, espresso di solito al 90% (vengono indicati i due valori entro cui vi è una probabilità del 90% che vi sia il limite di riferimento superiore ed inferiore).

Di fronte ad un intervallo di riferimento dobbiamo sempre avere chiaro il concetto che esso caratterizza una determinata popolazione, ma non consente di estrapolare in modo assoluto conclusioni circa la presenza o meno di malattia in un soggetto.

Le caratteristiche analitiche di accuratezza e di precisione che abbiamo prima considerato influenzano l'intervallo di riferimento. Se viene usato un metodo non accurato, l'intervallo di riferimento rifletterà lo scostamento del metodo, mentre se un metodo non è preciso, l'intervallo di riferimento risulterà allargato (aumenterà la DS della distribuzione dei risultati).

I **livelli decisionali** (limiti o soglie decisionali, *cut-off*) non hanno quasi nulla in comune con gli intervalli di riferimento. Hanno finalità pratiche: a seconda che la concentrazione dell'analita misurata nel paziente sia sopra o sotto questi livelli, il clinico prende decisioni cliniche importanti (iniziare o sospendere una terapia, fare altre indagini diagnostiche, disporre il ricovero, programmare un intervento, dimettere il paziente).

### 5.a.4 La Valutazione degli Esami Diagnostici

*Gli esami di laboratorio pertanto non dovrebbero esistere isolati dal contesto clinico*. Infatti, nel momento in cui essi sono richiesti, il clinico ha già fatto una ipotesi provvisoria o ha approntato una lista di ipotesi diagnostiche basate sui sintomi e sui segni di ogni paziente.

Per valutare ed interpretare un esame diagnostico è necessario conoscere come si comporta nel "malato" e nel "sano". L'esame ideale dovrebbe essere anomalo nel 100% dei malati e

non essere anomalo nel 100% dei soggetti sani. Questo ideale è raggiunto molto di rado; generalmente si verifica una sovrapposizione tra i due gruppi di soggetti. È pertanto utile ricordare alcune definizioni di carattere epidemiologico che sono utili nel definire le capacità diagnostiche di un test.

- **Sensibilità** (*percentuale dei risultati veri positivi*) è la percentuale di risultati positivi di un esame nei pazienti affetti da una malattia. Un esame che è sempre anomalo (o positivo) nei pazienti malati ha una sensibilità del 100%.
- **Specificità** (*percentuale dei risultati veri negativi*) è la percentuale dei risultati negativi di un esame nei pazienti non affetti da malattia. Un esame che è sempre negativo nei soggetti sani ha una specificità del 100%.
- Percentuale di **falsi negativi** è la percentuale di risultati negativi nei pazienti affetti da malattia.
- Percentuale di **falsi positivi** è la percentuale di risultati positivi di un esame nei pazienti non affetti da una particolare malattia.

### 5.a.5 Il Problema delle Unità di Misura: i risvolti nella pratica clinica e di laboratorio

Ogni misurazione, per avere un significato, deve essere espressa da un'unità di misura e da un numero. L'unità di misura indica la dimensione (massa, volume o concentrazione), mentre il numero indica quante unità sono presenti nel campione. Nel corso dell'evoluzione della medicina di laboratorio sono entrate in uso nei diversi paesi modalità diverse per l'espressione della concentrazione dei costituenti di interesse medico. L'applicazione delle unità SI nel laboratorio clinico, introdotta per ovviare a questo problema, è risultata particolarmente complessa, poiché realizza il punto d'incontro di ambiti di conoscenza diversi come chimica, biochimica, fisica, tecnologia e medicina. Nel laboratorio clinico sono di solito misurate le concentrazioni di un costituente in un fluido biologico e tradizionalmente queste erano riportate in termini di massa per unità di volume. Poiché non vi erano regole o una logica precise, veniva usata una grande varietà di unità per refertare i valori di concentrazione, impiegando di solito le concentrazioni per 100 mL (o decilitro). A partire dagli anni '60 si è cominciato a proporre che le determinazioni fossero espresse in termini molecolari per litro invece che in termini di massa per 100 mL (o decilitro).

Le principali motivazioni erano:

- i processi metabolici che avvengono nel nostro organismo seguono leggi chimiche che si svolgono in termini di reazione di un determinato numero di atomi, molecole o ioni (e non di peso);
- la mole è appropriata per molte delle tecniche analitiche classiche (spettrofotometria, fluorimetria, ecc.);
- la concentrazione dei calibratori è definita senza ambiguità, indipendentemente dalla forma chimica del materiale usato. Per esempio il glucosio può essere anidro o monoidrato: mentre 10 mmol/L di glucosio contengono la stessa quantità di glucosio nelle due forme, 180 mg/dL contengono quantità diverse;
- l'adozione delle unità SI nei paesi scandinavi e nei paesi anglosassoni (con la rilevante eccezione degli Stati Uniti) è andata avanti piuttosto rapidamente, mentre in altri paesi i referti continuano a contenere le unità convenzionali o le due unità (la scelta più frequente ma meno corretta).

## 5.a.6 Prevalenza della Malattia

Prima di considerare l'effetto della prevalenza della malattia sui processi decisionali diagnostici è necessario considerare il valore predittivo di un risultato positivo e di un risultato negativo. In pratica si esprime in tal modo la probabilità che un risultato anomalo sia interpretato dal clinico come proprio di un soggetto malato.

- **Valore predittivo positivo di un test (VPP)** esprime la probabilità che un soggetto con risultato positivo al test sia realmente affetto da malattia. Esso dipende dalla specificità e dalla prevalenza della malattia nella popolazione a cui viene applicato un test. Tanto più alta è la prevalenza e la specificità e tanto maggiore sarà il valore predittivo positivo di un test.
- **Valore predittivo negativo di un test (VPN)** esprime la probabilità che un soggetto con risultato negativo al test sia realmente sano. Esso dipende dalla sensibilità e dalla prevalenza della malattia nella popolazione a cui viene applicato un test. Tanto più alta è la sensibilità e tanto minore è la prevalenza e tanto maggiore sarà il valore predittivo negativo di un test.

Statisticamente la probabilità di essere affetto da malattia o di non esserlo, a seconda che il test sia risultato positivo o negativo, è espressa dal **teorema di Bayes**. Tale teorema, pur non essendo particolarmente complicato da un punto di vista matematico, può essere applicato in modo intuitivo. Si consideri un test destinato a rivelare la presenza nel siero di anticorpi anti-HIV. Si assuma che questo test abbia una sensibilità del 100% (il test è quindi positivo nel 100% dei malati). Si assuma che il test abbia una specificità del 99.7% (il test, quindi, è negativo nel 99.7% dei soggetti sani). Si sa che la prevalenza della positività agli anticorpi anti-HIV è del 3 per mille nella popolazione generale. Qualora noi applichiamo il test a 1000 soggetti presi a caso, si avranno i seguenti risultati: 3 soggetti con positività del test, perché la prevalenza dei soggetti positivi è del 3 su mille (veri positivi), e 3 soggetti falsamente positivi, poiché, essendo la specificità del 99.7%, ci dovremo aspettare 3 positivi nei 997 soggetti sani del campione scelto a caso. In totale i soggetti positivi saranno 6, di cui solo 3 veramente positivi, con un VPP del 50%, nonostante i valori di sensibilità e di specificità siano particolarmente elevati. Per cercare di esplicitare l'influenza determinante della prevalenza della malattia nel campione di soggetti analizzato, immaginiamo ora le categorie a rischio per positività degli Ab anti-HIV. Tra gli omosessuali con partners occasionali la prevalenza di positività agli Ab anti-HIV è di circa il 10% (*Sethi G, Holden BM, Gaffney J, Greene L, Ghani A, Ward H, Sex Transm Infect 2006 Aug 17*). Questo significa che testando 1000 soggetti omosessuali promiscui avremo circa 103 pazienti con positività al test (100 dovuti alla prevalenza del 10% e 3 dovuti alla specificità del 99.7%) con un valore predittivo positivo del 97%. L'esempio consente di sottolineare come anche test considerati affidabili, per fornire un risultato significativo, devono essere effettuati dopo un attento ragionamento clinico.

## 5.a.7 Appropriatelyzza degli esami di laboratorio

Si sta estendendo anche alla Medicina di Laboratorio la classica definizione della Evidence Based Medicine (EBM) "l'esplicito e prudente impiego delle migliori prove di efficacia nel prendere decisioni circa la cura di un singolo paziente" tenendo conto delle problematiche particolari legate alle intrinseche peculiarità di questa disciplina. L'EBM può insegnarci a tenere conto dei limiti che possono influenzare i risultati, ma l'applicabilità dei principi dell'EBM

nella diagnostica di laboratorio è ostacolata da aspetti come la frequente mancanza di un “gold standard” assoluto con cui confrontare i nuovi esami e la grande diversità tra i valori numerici forniti da metodi diversi per la misurazione di uno stesso analita (basti pensare al GH).

### Come valutare la letteratura relativa agli esami diagnostici di laboratorio

Secondo Sackett l'EBM deve aiutare a rispondere a 3 domande:

- le prove di accuratezza di un esame diagnostico sono valide?
- questo esame è in grado di distinguere in modo accurato i pazienti con una determinata malattia da quelli che non la presentano?
- posso usare questo esame nel particolare paziente che ho di fronte in questo momento?

### Come valutare la capacità di un esame di diagnosticare una malattia: Sensibilità, Specificità e Quoziente di probabilità

La EBM si concentra sui classici concetti di sensibilità e specificità come mezzo per calcolare il **Quoziente di Probabilità (Likelihood Ratio: LR)**, lo strumento che consente di calcolare come la probabilità di una diagnosi sia modificata dal risultato di un esame (ovvero, come si calcola la probabilità post-test a partire dalla probabilità pre-test). Concettualmente l'LR positivo e negativo indicano il rapporto (quoziente) tra la probabilità di trovare un particolare risultato (rispettivamente positivo e negativo) in un paziente affetto da una malattia rispetto a quello di trovare lo stesso risultato in un soggetto che non è affetto dalla stessa malattia. Questo è importante dal punto di vista pratico, perché consente di valutare se un esame diagnostico può essere utile alla diagnosi e quale esame è da preferire quando ve ne siano numerosi disponibili.

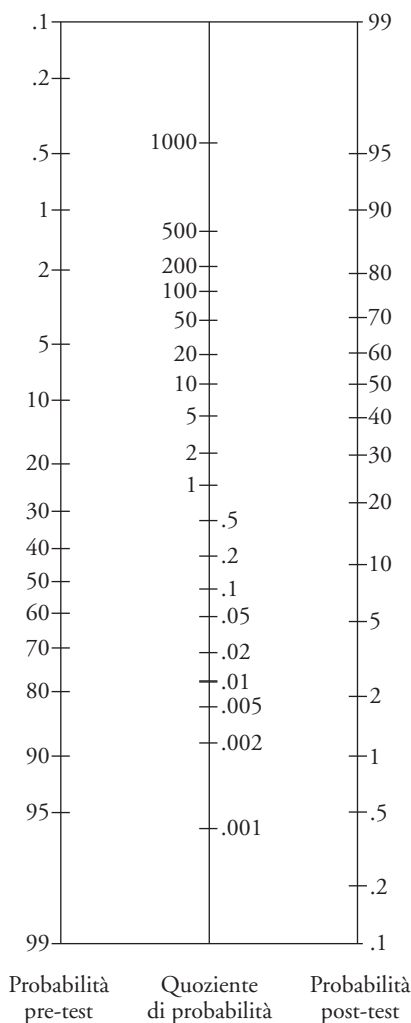
L'LR consente anche di tenere conto di come la concentrazione più o meno alta del risultato dal punto di vista statistico possa influenzare la probabilità di un risultato. Mentre impiegando i concetti di sensibilità e specificità il risultato può essere solo positivo o negativo, l'LR ci consente di attribuire un diverso peso a seconda del risultato numerico ottenuto. Purtroppo fino ad oggi sono stati calcolati gli LR a concentrazioni diverse solo per pochi esami diagnostici e per pochi contesti clinici. Sono stati proposti dei criteri per classificare l'utilità degli esami diagnostici in relazione al loro LR che, anche se grossolani, possono risultare molto utili nella pratica:

- LR positivi  $> 10$  e negativi  $< 0.1$  modificano in modo spesso conclusivo la probabilità di malattia;
- LR positivi  $5 \div 10$  e negativi  $0.1 \div 0.2$  modificano in modo discreto la probabilità di malattia;
- LR positivi  $2 \div 5$  e negativi  $0.2 \div 0.5$  modificano in modo limitato (solo raramente importante) la probabilità di malattia;
- LR positivi  $1 \div 2$  e negativi  $0.5 \div 1$  modificano scarsamente la probabilità di malattia e solo di rado sono importanti.

Uno strumento ulteriore per valutare un esame diagnostico è l'**NND** (Number Needed to Diagnose = numero di test necessari per ottenere una diagnosi positiva), che si calcola conoscendo la sensibilità e specificità di un esame. L'NND è il meno conosciuto ed usato strumento dell'EBM, probabilmente a causa della non immediatezza del suo calcolo [ $NND = (1/\text{sensibilità}) - (1/\text{specificità})$ ]. L'NND potrebbe tuttavia risultare utile nella pratica per confrontare il rapporto costo/beneficio degli esami di laboratorio, soprattutto nei casi in cui in un determinato contesto clinico possono essere impiegati più esami.

Uno degli aspetti più rilevanti della EBM è l'approccio pratico che introduce nell'impiego dei risultati di laboratorio per la gestione del singolo paziente. Due esempi sono gli acronimi SnNout e SpPin ed il Nomogramma di Fagan. I due acronimi rendono più facile ricordare qual'è l'impiego ottimale di un esame diagnostico molto sensibile o molto specifico.





**Fig. 3**  
*Il nomogramma di Fagan, lo strumento fondamentale della Evidence Based Medicine nella diagnostica di laboratorio*

**SnNout** è un acronimo inglese che deriva da ‘When a test has a very high Sensitivity, a Negative result rules out the diagnosis’ (quando un esame ha una sensibilità molto elevata, un risultato negativo esclude virtualmente la diagnosi). **SpPin** deriva invece da ‘When a test has a very high Specificity, a Positive result rules in the diagnosis’ (quando un esame ha una specificità molto elevata, un risultato positivo virtualmente conferma la diagnosi). In questa maniera è possibile assegnare in modo “automatico” un significato clinico concreto ad un esame molto sensibile o molto specifico.

Il **Nomogramma di Fagan** consente di semplificare la conversione della probabilità pre-test in quella post-test. Il nomogramma si usa (Fig. 3) ancorando una linea retta in corrispondenza della probabilità pre-test indicata sull’asse di sinistra e ruotandola finché raggiunge l’LR relativo all’esame che si sta considerando, indicato nell’asse al centro. È sufficiente proseguire la retta e si troverà sull’asse di destra la probabilità post-test. Il nomogramma può essere tenuto nella tasca del clinico e del laboratorista per un impiego immediato.

I vantaggi dell’impiego dei LR e del nomogramma di Fagan sono quindi numerosi:

- sono più comprensibili e più facili da usare rispetto a sensibilità e specificità;
- possono essere calcolati a livelli diversi di risultato;
- possono essere usati in modo sequenziale, in modo che la probabilità post-test che si ottiene da un esame costituisca la probabilità pre-test per il successivo;
- consentono di embricare laboratorio e clinica in modo efficace;
- forniscono gli strumenti per gli audit clinici, perché consentono di valutare l’efficacia diagnostica degli esami richiesti dal clinico ed eseguiti dal laboratorio.

Il clinico, di fronte ad un esame, deve quindi chiedersi se questo sarà in grado di aiutarlo a risolvere un problema diagnostico, clinico o terapeutico e, per fare questo, dovrà considerare sia l’esame stesso sia il contesto clinico in cui esso sarà usato. Il clinico, per esempio, dovrebbe conoscere:

- se l’esame è disponibile, accurato, riproducibile ed accessibile nel contesto in cui opera;
- qual’è la probabilità pre-test;
- se la probabilità post-test che si ottiene è in grado di modificare la gestione del paziente;
- se le conseguenze mediche di un particolare esame sono accettabili per il paziente;
- se il consumo di risorse sanitarie ad esso connesse ed il rapporto costo-benefici sono accettabili.



## 5.b. Determinazione basale degli ormoni

### 5.b.1. GH

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 39)

#### Metodo di determinazione

Nella pratica dei laboratori clinici il GH è misurato con metodi **immunometrici**: radioimmunologici, immunoradiometrici, immunoenzimatici e in chemiluminescenza.

I metodi radioimmunologici classici (RIA) sono basati su una molecola di GH a cui è legato un tracciante radioattivo, su un anticorpo in concentrazione limitata e su un secondo anticorpo diretto verso il primo anticorpo che porta alla produzione di un precipitato. Gli anticorpi anti-GH possono essere policlonali, che danno risultati comparabili tra di loro, e monoclonali, che forniscono risultati più bassi, meno comparabili tra i diversi kit e con la capacità di rilevare concentrazioni basse in modo più affidabile. I metodi immunoradiometrici (IRMA), in cui il tracciante è legato all'anticorpo, sono oggi poco usati se non in qualche variante immuno-enzimatica. Attualmente sono più utilizzati i metodi a doppio anticorpo monoclonale a sandwich, che impiegano traccianti enzimatici, fluorescenti e chemiluminescenti, e possono arrivare a **sensibilità** (cioè alla minima concentrazione distinguibile da zero) di 0.0001 µg/L.

Le **differenze dei risultati ottenuti con i diversi metodi** dipendono da fattori diversi.

- **Proteine leganti**: i diversi metodi valutano quantitativamente in misura diversa il GH libero, il GH legato alla GH-binding protein ed il GH totale.
- **Isoforme**: in circolo sono presenti numerose isoforme, che comprendono monomeri ed oligomeri come il "big" GH ed il "big-big" GH, che cross-reagiscono in modo molto diverso con i vari metodi. In genere il 75% del GH in circolo è costituito da una proteina monomerica di 22 kDa, il 10% da una proteina di 20 kDa (a cui manca il segmento di proteina compresa tra gli aminoacidi 32 e 46). È stato dimostrato che il grado con cui il metodo riconosce l'isoforma 20 K è correlato con l'inaccuratezza ed è **stato suggerito che tutti i metodi debbano misurare esclusivamente l'isoforma 22 K**.
- **Problemi di standardizzazione**: i metodi di determinazione per il GH sono calibrati con materiali di **riferimento** che sono aggiornati periodicamente. Dal 2001 è disponibile il Secondo Standard Internazionale (IS) 98/574, allestito con tecnologia ricombinante, con un grado di purezza superiore al 95% che ha sostituito gli standard estrattivi, come l'IS 80/505 usato dal 1982 che conteneva una miscela di GH 20 K e 22 K, dimeri ed oligomeri di GH. L'adozione dello standard 2nd IS 98/574 consente di adottare un fattore di conversione fisso (3 IU/mg) tra unità e microgrammi.

Il Groupe de travail su "Evaluation des dosages des paramètres de l'axe somatotrope" della Société Française de Biologie Clinique (uno dei più attivi a livello internazionale) ha recentemente raccomandato l'adozione del siero come campione da utilizzare, dello standard 98/574, del calibratore 22 K, delle mIU/L come unità di misura.

Il **singolo valore di concentrazione di GH fornisce scarse informazioni** per quanto riguarda la valutazione degli stati patologici di alterata secrezione di questo ormone, in quanto l'ipofisi produce il GH in modo pulsatile e le concentrazioni dell'ormone sono praticamente indosabili per la maggior parte della giornata, e intervallate da picchi secretori nelle 24 ore. Per valutare la presenza di secrezione anomala di GH si deve pertanto ricorrere a valutazioni dinamiche, diverse negli stati di iper o iposecrezione (cfr. a pag. 13, pag. 23 e pag. 34).

<b>Metodologia adottata</b>	RIA, IRMA, Chemiluminescenza		
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL		
<b>Volume minimo</b>	500 µL		
<b>Stabilità del campione</b>	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 3 giorni, a 2-8 °C per una settimana, a -20 °C per 2 mesi		
<b>Intervallo di riferimento*</b>	<b>ARUP (Chemiluminescenza)</b>		
	<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>
	0-6 anni	0.1-8.8 µg/L	0.1-8.8 µg/L
	7-17 anni	0.06-23.8 µg/L	0.03-14.9 µg/L
	> 18 anni	0.03-10 µg/L	0.01-1 µg/L
	<b>Massachusetts General Hospital</b>		
	0.5-17 µg/L		
	<b>Thomas L</b>		
	< 4 µg/L		
	<b>Tietz</b>		
	< 2.5 µg/L		
	<b>Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Immulate 2000)</b>		
	<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>
< 15 anni	< 21 mU/L	< 21 mU/L	
> 15 anni	< 24 mU/L	< 2.4 mU/L	

\* Perchè questi riferimenti? È già stato ricordato come non esistono, purtroppo, degli intervalli di riferimento costanti nei diversi laboratori, nei diversi centri, per i differenti metodi. Dopo attenta ed accesa discussione gli estensori di questo volume hanno adottato la linea di selezionare alcuni riferimenti "conosciuti" per motivi diversi. Sono quindi riportati gli intervalli di riferimento adottati da:

- ARUP (Associated Regional and University Pathologists), uno dei più importanti ed attivi Laboratori di Riferimento degli Stati Uniti, con sede a Salt Lake City ma che riceve campioni biologici letteralmente da tutto il mondo;
- Massachusetts General Hospital di Boston e periodicamente pubblicati dal New England Journal of Medicine;
- il più importante trattato di Medicina di Laboratorio in lingua tedesca curato da Lothar Thomas;
- il più importante trattato di Medicina di Laboratorio in lingua inglese fondato da Norbert Tietz;
- il Laboratorio dell'Ospedale Civile Maggiore dell'Azienda Ospedaliera di Verona, predisposti, selezionati e sottoposti a manutenzione da uno degli autori del presente volume.

Per quanto riguarda il dosaggio del GH, il trovare **un valore che cade all'interno degli intervalli di riferimento** riportati nelle precedenti tabelle **non esclude la possibilità di uno stato patologico di ipersecrezione**, che deve essere valutato con i test appropriati (*cf. a pag. 13*).

Bayle M, Chevenne D, Doussel B, Lahlou N, Le Bouc Y, Massart C, et al. *Recommandations pour l'harmonisation des techniques de dosage sérique d'hormone de croissance. Ann Biol Clin* 2004, 62: 155-63.

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/guides/ugtests> (consultato: 03.08.2006)

Metodo	Rivelazione	Ab cattura/ rivelazione	Standard	Limiti linearità (mU/L)		Fattore di conversione (µg/L -> mU/L)	Specificità GH 20K	CV dichiarato
				Inferiore (o sensibilità)	Superiore			
Access	LM	MC/PC	GH ?	0.008	130	2.6	< 3,7	2.3
Brahms	<sup>125</sup> I	MC/MC	?	0.2	98	2	?	1.5
Cis Bio	<sup>125</sup> I	MC/MC	GH purificato	0.02	52.4	1.2	5	4
Diasorin	<sup>125</sup> I	MC/MC	?	0.4	100	2	100	2.8
DPC	CLM	MC/PC	GH estratto	0.08	104	2.6	63%	3.5
Tosoh	FL	MC/MC	?	0.26	156	2.6	< 5	?
Immunotech	<sup>125</sup> I	MC/MC	?	0.1	100	2	< 5	1.3
Nichols	LM	MC/PC	?	0.02	125	2.5	47	2.0
Delfia	FL	MC/MC	rhGH	0.03	100	2.6	< 0.001	1.1
Tutti questi metodi misurano il GH su campione di siero con riferimento allo standard internazionale 80/505								
<sup>125</sup> I Iodio 125; CLM chemiluminescenza; FL Fluorimetria; LM luminescenza; MC monoclonale; PC policlonale; ? non dichiarato								

Questa tabella fornisce qualche spunto per orientarsi nella matassa della determinazione del GH. Anche se verosimilmente il metodo Delfia consente la misura più accurata del GH, Immulite 2000 (DPC) sembra rappresentare un compromesso attraente per quanto riguarda livello di automazione, costo complessivo, sensibilità e diffusione dell'analizzatore. Non si insisterà mai abbastanza sull'importanza che il laboratorio indichi nel referto il metodo di misura impiegato.

## 5.b.2. IGF-I

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 40)

### Metodo di determinazione

L'IGF-I è legato a sei proteine leganti (IGF-BP) di elevata affinità. Più del 75% dell'IGF-I circola come complesso ternario con IGFBP-3 ed una subunità acido labile (ALS). Una percentuale minore è legata ad altre proteine leganti e **meno dell'1% è libera**. Poiché le IGFBP mascherano gli epitopi dell'IGF-I o competono con questi, **i dosaggi immunometrici devono essere preceduti dalla rimozione delle IGFBP**. Il metodo di riferimento è quello che si basa sulla denaturazione dell'ALS e separazione cromatografica dell'IGF-I. Anche se i metodi che prevedono fasi estrattive prevengono problemi complessi associati alla presenza di proteine vettrici e proteasi sieriche, i metodi più usati sono quelli RIA e quelli basati su traccianti chemiluminescenti che assicurano una reazione crociata minima con l'IGF-II (dallo 0% al 3%).

**I valori di riferimento sono dipendenti dalla fascia di età e dal sesso.**

Metodologia adottata	RIA, IRMA, Chemiluminescenza		
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 3 giorni, a 2-8 °C per una settimana, a -20 °C per 2 mesi		
Intervallo di riferimento	ARUP (Chemiluminescenza)		
	Età	Femmina	Maschio
	2 mesi-5 anni	25-248 µg/L	25-248 µg/L
	6-8 anni	66-351 µg/L	50-249 µg/L
	9-11 anni	81-611 µg/L	55-339 µg/L
	12-15 anni	187-676 µg/L	108-558 µg/L
	16-17 anni	143-603 µg/L	182-532 µg/L
	18-24 anni	128-488 µg/L	158-497 µg/L
	25-29 anni	89-397 µg/L	112-402 µg/L
	30-34 anni	71-352 µg/L	89-350 µg/L
	35-39 anni	63-330 µg/L	77-323 µg/L
	40-44 anni	58-318 µg/L	70-307 µg/L
	45-49 anni	54-307 µg/L	66-296 µg/L
	50-54 anni	49-292 µg/L	61-285 µg/L
	55-59 anni	42-272 µg/L	56-271 µg/L
	60-64 anni	35-248 µg/L	50-255 µg/L
	65-69 anni	27-223 µg/L	44-238 µg/L
	70-74 anni	22-204 µg/L	38-223 µg/L
	75-79 anni	21-199 µg/L	35-213 µg/L
	Massachusetts General Hospital		
Età	Femmina e maschio		
16-24 anni	182-780 µg/L		
25-39 anni	114-492 µg/L		
40-54 anni	90-360 µg/L		
> 54 anni	71-290 µg/L		
Thomas L			
Età	Femmina e maschio		
6-8 anni	50-250 µg/L		
11-16 anni	180-800 µg/L		
21-30 anni	165-434 µg/L		
31-40 anni	155-329 µg/L		
41-50 anni	115-286 µg/L		
51-60 anni	100-285 µg/L		
61-72 anni	69-262 µg/L		

Intervallo di riferimento	Tietz		
	Età	Femmina	Maschio
	1-2 anni	31-160 µg/L	11-206 µg/L
3-6 anni	16-288 µg/L	70-316 µg/L	
7-10 anni	136-385 µg/L	123-396 µg/L	
11-12 anni	136-440 µg/L	191-462 µg/L	
13-14 anni	165-616 µg/L	286-660 µg/L	
15-18 anni	134-836 µg/L	152-660 µg/L	
19-25 anni	202-433 µg/L	231-550 µg/L	
26-85 anni	135-449 µg/L	135-449 µg/L	
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Immulite 2000)			
	Età	Femmina e maschio	
	1-5 anni	6-40 nmol/L	
	6-9 anni	7-50 nmol/L	
	10-11 anni	12-60 nmol/L	
	17-19 anni	20-130 nmol/L	
	20-40 anni	20-60 nmol/L	
	41-65 anni	10-30 nmol/L	
	> 65 anni	8-24 nmol/L	

Massart C, Poirier JY. Serum insulin-like growth factor-I measurement in the follow-up of treated acromegaly: comparison of four immunoassays. *Clin Chim Acta* 2006 May 24 [Epub ahead of print].

Teale JD, Marks V. The measurement of insulin-like growth factor I: clinical applications and significance. *Ann Clin Biochem* 1986, 23: 413-24.

Peacey SR, Shalet SM. Insulin-like growth factor 1 measurement in diagnosis and management of acromegaly. *Ann Clin Biochem* 2001, 38: 297-303.

### 5.b.3. PRL/Macroprolattina

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 41)

#### Metodo di 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 che sono stati adattati a strumentazione automatica; questi metodi raggiungono un limite di rivelabilità più basso (0.2-1.0 µg/L), una maggiore precisione (coefficiente di variazione - CV - inferiore al 10%) ed una maggiore specificità (con una reazione crociata con il GH inferiore allo 0.05%).

*Metodi diversi danno risultati considerevolmente diversi*, anche per l'eterogeneità molecolare delle diverse isoforme di PRL presenti in circolo (monomerica, con peso molecolare di 23 kDa, dimerica o big-PRL, con peso molecolare tra 48 e 56 kDa, e polimerica o big-big-PRL, con peso molecolare > 100 kDa). Tutte le isoforme identificate posseggono infatti immunoreattività, anche se in misura minore (monomerica: >75%, big PRL: < 20%; big-big-PRL: < 5%).

- Il problema di *maggior* 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 dalle comuni metodiche immunometriche di misura, determinando elevati valori di PRL.*

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.

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 macromolecolari della PRL è stata identificata originariamente con la cromatografia su gel, metodica costosa e che richiede tempi di analisi lunghi. Nella pratica della maggior parte dei laboratori clinici la metodica più comune, economica e rapida, è la **precipitazione con PEG**: si addiziona 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 seriche con PM > 100 kDa. La PRL monomerica viene quindi misurata sul sovrantante, 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.

È stato recentemente raccomandato di ricercare la macroprolattina in tutti i campioni con iperprolattinemia, particolarmente in quei casi in cui il contesto clinico non è indicativo della presenza di iperprolattinemia patologica.

Si può concludere che, mentre trattare con PEG il 20% dei campioni con richiesta di determinazione di PRL può rappresentare un carico di lavoro rilevante per un laboratorio clinico, risulta di semplice gestione e di costo modesto riservare questo trattamento a quel numero di campioni in cui la PRL, misurata con un metodo poco sensibile alla macroprolattina, risulta elevata anche dopo che il prelievo è stato eseguito in corso di infusione di soluzione fisiologica.



Tabella	
Metodi immunometrici automatici della PRL ordinati in modo decrescente dall'alto in basso e da sinistra a destra secondo la sensibilità alla big-big-PRL (da quello con la maggiore possibilità di interferenza a quello con la minore).	
1) Elecsys (Roche – Indianapolis, IN, USA)*	8) Roche Enzymun (Roche – Indianapolis, IN, USA)
2) Auto Delfia (Wallach – Finlandia)	9) Immulite (DPC - Los Angeles, CA, USA)
3) Immuno 1 (Bayer – Pittsburg, PA, USA)	10) Liaison (DiaSorin – Saluggia, Italia)
4) Imx (Abbott - Abbott Park, IL, USA)	11) ACS:180 (Bayer – Pittsburg, PA, USA)
5) AxSYM (Abbott – Abbott Park, IL, USA)	12) Centaur (Bayer – Pittsburg, PA, USA)
6) Abbott Architect (Abbott Park, IL, USA)	13) Access (Beckman – Brea, CA, USA)
7) J&J (Amerlite – UK)	
*La nuova formulazione del metodo è riferita essere molto meno sensibile alla big-big-PRL.	

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 uncino ("hook" nella letteratura anglosassone). Si tratta di un fenomeno che 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, rivolti verso epitopi diversi della molecola di PRL), impedendo quindi la formazione del "sandwich" (con l'antigene in mezzo ai 2 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 consentano di confermare o escludere la possibilità.

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, 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	ARUP (Chemiluminescenza)		
	Età	Femmina	Maschio
	1-9 anni	2.1-17.7 µg/L	2.1-17.7 µg/L
	> 10 anni	2.8-26 µg/L	2.1-17.7 µg/L
	Massachusetts General Hospital		
	Femmina	Maschio	
	< 20 µg/L	< 15 µg/L	
	Thomas L		
	Età	Femmina	Maschio
	14-18 anni	4.2-39 µg/L	2.8-16.1 µg/L
	> 19 anni	3.8-23.2 µg/L	3-14.7 µg/L
	Tietz		
	Femmina	Maschio	
3.8-23 µg/L	3-14.7 µg/L		
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)			
Femmina	Maschio		
80-635 mU/L	65-425 mU/L		

- 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.*

### 5.b.4. Cortisolemia/Cortisolo Libero Urinario

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 42)

#### Metodo di determinazione

I metodi immunometrici diretti (senza estrazione) hanno oggi sostanzialmente sostituito i metodi con estrazione immunometrici e cromatografici, con l'eccezione dei metodi per l'urina e la saliva. Sono stati messi a punto numerosi metodi cromatografici (gas-cromatografia, HPLC e GC-HPLC/MS) e di elettroforesi capillare. Tutti questi metodi posseggono un'eccellente specificità rispetto agli altri steroidi e ai metaboliti di questi, ma sono gravati da limiti importanti per i laboratori clinici. I limiti principali sono la scarsa produttività e la necessità di personale esperto che vi si dedichi con impegno. La gran parte di queste metodiche richiede infatti fasi pre-analitiche di estrazione in fase solida ed in fase liquida.

I metodi immunometrici sono oggi disponibili su numerosi analizzatori automatici. La maggior parte dei metodi **immunometrici** sono "diretti" e non richiedono una fase di estrazione degli steroidi dal campione, in quanto il cortisolo è spiazzato dalle proteine vettrici (quali la CBG) da mezzi quali l'8-anilo-1-naftelene-acido sulfonico, il salicilato, il pH acido ed il calore. L'elevata specificità degli anticorpi, l'elevata sensibilità consentita dai traccianti chemiluminescenti e la maggiore precisione rispetto ai metodi "estrattivi" consentono un'affidabile determinazione del cortisolo totale nel sangue.

I metodi per la determinazione del cortisolo libero nel sangue risultano invece assai impegnativi dal punto di vista tecnico e non sono utilizzati nella pratica clinica. Maggiore diffusione hanno invece i metodi per la determinazione della concentrazione del cortisolo libero urinario.

La maggior parte dei metodi per la determinazione del cortisolo sierico totale possono essere utilizzati per misurare il **cortisolo libero urinario dopo estrazione**. L'estrazione è di solito necessaria, perché le urine contengono numerosi metaboliti e coniugati del cortisolo, che danno reazioni crociate con l'anticorpo impiegato nel dosaggio. La procedura di estrazione richiede mani esperte e la sua efficienza e precisione vanno attentamente monitorate. I metodi immunometrici diretti per il cortisolo libero urinario richiedono degli anticorpi molto specifici e danno in genere valori più alti rispetto a quelli estrattivi. Anche se gli anticorpi impiegati dai metodi immunometrici hanno una bassa reattività crociata con gli steroidi endogeni, questa è rilevante (20-30%) verso steroidi sintetici come il prednisolone ed il 6-metil-prednisolone.

La determinazione del CLU fornisce una misura integrata della secrezione di cortisolo, anche se ha lo svantaggio di richiedere una raccolta accurata (a tale proposito si può ricorrere alla raccolta delle urine per tre giorni o riportare la concentrazione di cortisolo a quella della creatinina, la cui escrezione rimane invece costante, quando il filtrato glomerulare è superiore a 30 mL/min).

Inoltre, mentre la determinazione delle concentrazioni elevate risente di limiti di specificità dei metodi, le basse concentrazioni risentono dei problemi di bassa sensibilità.

Cortisolo sierico	
Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, 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 settimana, a 2-8 °C per una settimana, a -20 °C per 3 mesi
Intervallo di riferimento	ARUP (Chemiluminescenza)
	Ora
	8.00 20.00

Intervallo di riferimento	Massachusetts General Hospital	
	Ora	
	8.00-12.00	5-25 µg/dL
	12.00-20.00	5-15 µg/dL
	20.00-8.00	< 10 µg/dL
	Thomas L	
	Ora	
	8.00	5-25 µg/dL
	24.00	< 5 µg/dL
	Tietz	
	Ora	
	8.00	5-23 µg/dL
	16.00	3-16 µg/dL
20.00	Concentrazione < 50% di quella delle ore 8.00	
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)		
Ora		
mattino	120-620 nmol/L	
sera	85-460 nmol/L	

Un valore normale di cortisolemia alle h 8 non esclude uno stato di ipercortisolismo patologico, condizione clinica nella quale valori elevati di CLU rappresentano il gold standard diagnostico. I valori di cortisolemia nel corso della giornata vanno valutati nell'ambito del contesto clinico e non esistono più cut-off sicuri per la diagnosi di iper o ipocortisolismo. Il valore di cortisolemia delle h 24 va valutato nell'ambito del contesto clinico. Nei casi sospetti per ipercortisolismo, i valori dubbi di cortisolemia alle h 24 vanno integrati con altri metodi (*cf. a pag. 17*), mentre nei casi sospetti per ipocortisolismo non rivestono **nessun valore diagnostico**.

Cortisolo urinario		
Metodologia adottata	HPLC, Spettrometria di massa, Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, RIA	
Campione richiesto	Raccolta delle urine delle 24 ore; non aggiungere acido o conservanti; è possibile raccogliere un'aliquota di 10 mL dopo avere mescolato le urine accuratamente ed avere misurato accuratamente il volume	
Volume minimo	1 mL	
Stabilità del campione	Le urine sono stabili a temperatura ambiente per 2 giorni, a 2-8 °C per 1 settimana, a - 20 °C per 1 mese	
Intervallo di riferimento	ARUP (Chemiluminescenza)	
	Età	
	3-8 anni	< 18 µg/die
	9-12 anni	< 37 µg/die
	13-17 anni	< 56 µg/die
	> 18 anni (F)	< 45 µg/die
	> 18 anni (M)	< 60 µg/die
	Massachusetts General Hospital	
	20-70 µg/die	
	Thomas L	
Età	Metodo immunometrico con estrazione	
1-10 anni	2-27 µg/die	
11-20 anni	5-55 µg/die	
> 20 anni	20-90 µg/die	

Intervallo di riferimento	Tietz	
	Età	
	1-10 anni	2-27 µg/die (Met. imm. con estrazione)
	11-20 anni	5-55 µg/die (Met. imm. con estrazione)
	> 20 anni	20-90 µg/die (Met. imm. con estrazione)
	2-11 anni	1-21 µg/die (HPLC)
	12-16 anni	2-38 µg/die (HPLC)
	> 16 anni	75-270 µg/die (Met. imm. senza estrazione)
<b>Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)</b>		
150-1100 nmol/die (Met. imm. senza estrazione)		

Taylor RL, Grebe SK, Singh RJ. Quantitative, highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for detection of synthetic corticosteroids. *Clin Chem* 2004, 50: 2345-52.

McCann SJ, Gillingwater S, Keevil BG. Measurement of urinary free cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with the urine adapted ACS:180 serum cortisol chemiluminescent immunoassay and development of a new reference range. *Ann Clin Biochem* 2005, 42: 112-8.

Gray G, Shakerdi L, Wallace AM. Poor specificity and recovery of urinary free cortisol as determined by the Bayer AD-VIA Centaur extraction method. *Ann Clin Biochem* 2003, 40: 563-5.

### 5.b.5. ACTH

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 43)

#### Metodo di determinazione

L'introduzione dei metodi immunometrici ha consentito di misurare le concentrazioni di ACTH con buona sensibilità senza andare a discapito della specificità. I metodi **immunoradiometrici "sandwich"** hanno ulteriormente aumentato la specificità, eliminando la necessità di estrarre grandi volumi di plasma. Un problema presentato da questo tipo di metodi è addirittura una specificità "eccessiva" per la molecola intatta di ACTH, che non consente di riconoscere precursori e frammenti biologicamente attivi e clinicamente rilevanti. Tali metodi usano due anticorpi monoclonali diretti verso due siti diversi della molecola (per esempio l'estremità C-terminale e quella N-terminale).

Oggi la determinazione dell'ACTH è eseguita nei laboratori clinici usando metodi automatici non-isotopici. Tali metodi consentono un coefficiente di precisione buono (inferiore al 10%) in tutto l'ambito di concentrazione. È da sottolineare che **metodi diversi per la misurazione di ACTH forniscono dei valori numerici difficili da confrontare** a causa di differenze nella calibrazione.

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, IRMA	
Campione richiesto	Provetta di vetro siliconato o di plastica da plasma K2 EDTA (tappo viola) 6 mL	
Volume minimo	500 µL	
Stabilità del campione	La provetta deve essere collocata in ghiaccio subito dopo il prelievo e deve essere centrifugata a 4 °C. Il plasma è stabile a temperatura ambiente per 2 ore, a - 20 °C per 3 mesi	
Intervallo di riferimento	ARUP (Chemiluminescenza)	
	Età	
	< 9 anni	5-46 pg/mL
	10-18 anni	6-55 pg/mL
	> 19 anni (F)	6-58 pg/mL
	> 19 anni (M)	7-69 pg/mL
	Massachusetts General Hospital	
	7-69 pg/mL	
	Thomas L	
	Ora	
	8.00	5-60 ng/L
	24.00	< 10 ng/L
	Tietz	
	Ora	
8.00	8-25 ng/L	
24.00	< 10 ng/L	
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Immulate 2000)		
Ora		
8.00	8-25 ng/L	
24.00	< 10 ng/L	

Talbot JA, Kane JW, White A. Analytical and clinical aspects of adrenocorticotrophin determination. *Ann Clin Biochem* 2003, 40: 453-71.

Crosby SR, Stewart MF, Ratcliffe JG, White A. Direct measurement of the precursors of adrenocorticotropin in human plasma by two-site immunoradiometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 67: 1272-7.

Guiban D, Massias JF, Dugue MA, Coste J, Bertagna X, Raffin-Sanson ML. A new generation IRMA for ACTH with improved specificity: validation in various physiological and pathological conditions. *Eur J Endocrinol* 2001, 144: 369-77.

### 5.b.6. FT<sub>3</sub> FT<sub>4</sub>

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 44)

#### Metodo di determinazione

Sono disponibili molti metodi per la determinazione di FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub>.

Il metodo di riferimento per la determinazione è quello della **dialisi ad equilibrio**. 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 risulta di difficile applicazione nel laboratorio clinico.

Oggi, sono impiegati universalmente metodi 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 “analogo” 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 più 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 ben al di sotto del 5%. L'accuratezza dei metodi “analoghi” commercializzati negli ultimi anni è nettamente migliorata e risulta sicuramente confrontabile a quella della dialisi ad equilibrio anche in condizioni di disalbuminemia grave. 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 misura di T<sub>3</sub> libera e totale ha subito un'evoluzione parallela a quella della tiroxina ed oggi la T<sub>3</sub> libera può essere determinata impiegando gli analizzatori automatici per immunometria. Le basse concentrazioni di FT<sub>3</sub> in circolo rendono questa analisi particolarmente impegnativa e delicata.

I dosaggi per gli ormoni tiroidei liberi possono essere interessati alle interferenze di autoanticorpi, anticorpi eterofili e fattori reumatoidi. Il clinico deve segnalare tale sospetto ogni volta che lo ritiene opportuno ed il laboratorio deve mettere in atto tutti i rimedi opportuni (trattamento con anticorpi bloccanti, analisi con altro metodo o analizzatore).

FT <sub>4</sub>		
Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, 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	ARUP (Chemiluminescenza)	
	Età	
	0-30 giorni	0.8-2.2 ng/dL
	1-6 mesi	0.8-1.8 ng/dL
	7 mesi - 17 anni	0.9-1.5 ng/dL
> 18 anni	0.9-1.5 ng/dL	
	Massachusetts General Hospital	
	0.8-2.7 ng/dL	

Intervallo di riferimento	Thomas L	
	Età	
	1-2 giorni	21-49 pmol/L
	3-30 giorni	19-39 pmol/L
	1-18 anni	12-23 pmol/L
	> 18 anni	10-23 pmol/L
	Tietz	
	Età	
	neonato	2.2-5.3 ng/dL
	adulto	0.8-2.7 ng/dL
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)		
10-23 pmol/L		

FT <sub>3</sub>		
Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, 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	ARUP (Chemiluminescenza)	
	Età	
	0-6 anni	2.4-4.2 pg/mL
	7-17 anni	2.9-5.1 pg/mL
	> 18 anni	2.4-4.2 pg/mL
	Massachusetts General Hospital	
	1.4-4.4 pg/mL	
	Thomas L	
	Età	
	0-6 anni	3.4-6.6 pg/mL
	7-17 anni	4-6.2 pg/mL
	> 18 anni	3.5-5.7 pg/mL
	Tietz	
	210-440 pg/dL	
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)		
Età		
< 12 anni	3.5-7.2 pmol/L	
> 12 anni	3.5-5.7 pmol/L	

Van Uytendange K, Stockl D, Ross HA, Thienpont LM. Use of frozen sera for FT<sub>4</sub> standardization: investigation by Equilibrium Dialysis combined with Isotope Dilution-Mass Spectrometry and Immunoassay. *Clin Chem* 2006 Jul 13 [Epub ahead of print]

Midgley JE. Direct and indirect free thyroxine assay methods: theory and practice. *Clin Chem* 2001, 47: 1353-63.

Piketty ML, d'Herbomez M, Le Guillouzic D, Lebtahi R, Cosson E, Dumont A, 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.



## 5.b.7. TSH

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 45)

### Metodo di determinazione

I metodi attuali impiegano una **procedura a sandwich** che si basa su due anticorpi, di solito uno diretto verso la subunità alfa ed uno verso la subunità beta della molecola glicoproteica eterodimerica del TSH. Il tracciante è sempre più frequentemente enzimatico o chemiluminescente. Questo tipo di dosaggi 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 20 anni ed è passata da 1-2 mU/L, tipica dei metodi radioimmunologici dei primi anni '70, a 0.01-0.02 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 inferiore al 20%). Questa percentuale, arbitraria, comprende le variazioni analitica e biologica ed è sempre più alta di quella analitica. Termini come metodo "sensibile" ed "ultrasensibile" vanno abbandonati, mentre espressioni come "di prima generazione", "di seconda generazione", "di terza generazione" (intendendo un aumento di sensibilità funzionale di 10 volte ad ogni passaggio di generazione) sono oramai entrati nell'uso comune. Un metodo di "terza generazione" per il TSH è un metodo che ha una sensibilità funzionale inferiore a 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 inferiore a 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 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 immunoscintigrafici (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 superiore a 0.1 mU/L.

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, RIA, IRMA	
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL	
<b>Volume minimo</b>	500 µL	
<b>Stabilità del campione</b>	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 1 giorno, a 2-8 °C per una settimana, a -20 °C per 1 mese	
<b>Intervallo di riferimento</b>	<b>ARUP (Chemiluminescenza)</b>	
	<b>Età</b>	
	cordone ombelicale	2-4 mU/L
	1-7 giorni	4-15 mU/L
	8-30 giorni	4-10 mU/L
	> 1 mese	0.3-5 mU/L
	<b>Massachusetts General Hospital</b>	
	0.5-4.7 mU/L	
	<b>Thomas L</b>	
	<b>Età</b>	
	Neonato	<20 mU/L
	bambini-adulti	0.4-4 mU/L
	<b>Tietz</b>	
<b>Età</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	
<b>Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)</b>		
0.35-4.3 mU/L nell'intervallo 3.7-4.3 mU/L (area grigia): utile monitoraggio		

Rawlins ML, Roberts WL. Performance characteristics of six third-generation assays for thyroid-stimulating hormone.

*Clin Chem* 2004, 50: 2338-44.

Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays.

*Clin Chem* 1996, 42: 140-5.

## 5.b.8. Gonadotropine

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 46)

### Metodo di determinazione

In ambito clinico sono impiegati solo metodi **immunometrici**, che in pochi anni sono passati da metodi radioimmunologici 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 ed LH e delle due molecole con altre glicoproteine strutturalmente simili come TSH ed hCG: questa è passata, infatti, da valori tra il 10 ed il 25% a valori inferiori all'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 ed LH presenti in circolo. 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. Si spera che l'adozione di calibratori prodotti con tecnica ricombinante possa almeno ovviare il problema della maggiore confrontabilità di metodi diversi se non quello della validità dal punto di vista fisiopatologico. 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.*

FSH			
Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, 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 1 settimana, a -20 °C per 3 mesi		
Intervallo di riferimento	ARUP (Chemiluminescenza)		
	Età	Femmina	Maschio
	Prepubere	< 5 U/L	< 5 U/L
	Pubere	0.3-10 U/L	0.3-10 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	
	Adulto		1.5-12.4 U/L
	Massachusetts General Hospital		
	Età	Femmina	Maschio
	Follicolare	3-20 U/L	
Picco	9-26 U/L		
Luteale	1-12 U/L		
Menopausa	18-153 U/L		
Adulto		1-12 U/L	
Thomas L			
Età	Femmina	Maschio	
Prepubere	0.4-5 U/L	0.4-5 U/L	
Pubere	1.4-9.2 U/L		
Follicolare	2-10 U/L		
Picco	8-20 U/L		
Luteale	2-8 U/L		
Menopausa	> 20 U/L		
Adulto		1-7 U/L	

Intervallo di riferimento	Tietz		
	Età	Femmina	Maschio
	Follicolare Picco Luteale Menopausa Adulto	1.4-9.9 U/L 0.2-17.2 U/L 1.1-9.2 U/L 19.3-100.6 U/L	
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)			
Età	Femmina	Maschio	
Prepubere Follicolare Picco Luteale Menopausa Adulto	1-14 U/L 1.5-11 U/L 3.5-33 U/L 1-8 U/L 33-140 U/L		1-14 U/L    1-14 U/L

LH			
Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, 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 1 settimana, a -20 °C per 3 mesi		
Intervallo di riferimento	ARUP (Chemiluminescenza)		
	Età	Femmina	Maschio
	Prepubere Pubere Follicolare Picco Luteale Menopausa Adulto	< 1 U/L 0.4-10 U/L 2.4-12.6 U/L 14-95.6 U/L 1-11.4 U/L 7.7-58.5 U/L	< 1 U/L 0.4-7 U/L    1.7-8.6 U/L
Massachusetts General Hospital			
Età	Femmina	Maschio	
Follicolare Picco Luteale Menopausa Adulto	2-15 U/L 22-105 U/L 0.6-19 U/L 16-64 U/L		2-12 U/L
Thomas L			
Età	Femmina	Maschio	
Prepubere Pubere Follicolare Picco Luteale Menopausa Adulto	<0.4 U/L < 5.4 U/L 3-15 U/L 20-200 U/L 5-10 U/L >20 U/L	<0.4 U/L	1-7 U/L
Tietz			
Età	Femmina	Maschio	
Follicolare Picco Luteale Menopausa Adulto	1.7-15.0 U/L 21.9-56.6 U/L 0.6-16.3 U/L 14.2-52.3 U/L		1.2-7.8 U/L

Intervallo di riferimento	Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)		
	Età	Femmina	Maschio
	Prepubere	2-10 U/L	2-10 U/L
Follicolare	1-25 U/L		
Picco	25-125 U/L		
Luteale	1-30 U/L		
Menopausa	20-100 U/L		
Adulto		2-10 U/L	

*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.*

## 5.b.9. Testosterone

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 47)

### Metodo di determinazione

Negli ultimi anni i metodi **immunoenzimatici** hanno sostituito nel laboratorio clinico i metodi cromatografici per la determinazione del testosterone circolante (libero e legato 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. Questi metodi hanno una buona precisione e recupero ed una buona correlazione con i metodi GC-MS nei campioni provenienti da maschi adulti, mentre spesso non hanno sensibilità sufficiente per i campioni provenienti dalle femmine e nei soggetti prepuberi ed hanno un'accuratezza non soddisfacente. Tutti gli immunodosaggi 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 C-19, 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. Gli altri metodi come la precipitazione del testosterone legato, il calcolo degli indici androgenici, l'impiego di formule matematiche e, soprattutto, quello diretto dell'analogo non sono adeguati.

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, IRMA, RIA, HPLC/MS (preferibile nelle femmine e nei bambini)		
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL		
<b>Volume minimo</b>	500 µL		
<b>Stabilità del campione</b>	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 giorni, a 2-8 °C per 1 settimana, a -20 °C per 6 mesi		
<b>Intervallo di riferimento</b>	<b>ARUP (Chemiluminescenza)</b>		
	<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>
	10-11 anni	2-35 ng/dL	1-48 ng/dL
	12-13 anni	5-53 ng/dL	5-619 ng/dL
	14-15 anni	8-41 ng/dL	100-320 ng/dL
	16-19 anni	8-53 ng/dL	200-970 ng/dL
	adulto	8-54 ng/dL	400-1080 ng/dL
	<b>Massachusetts General Hospital</b>		
		<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>
		6-86 ng/dL	270-1070 ng/dL
<b>Thomas L</b>			
<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>	
Prepubere	< 2 nmol/L	1-4 nmol/L	
Adulto	0.2-1.3 nmol/L	12-30 nmol/L	

Intervallo di riferimento	Tietz		
	Età	Femmina	Maschio
	Prepubere	2-20 ng/dL	3-30 ng/dL
	Adulto	15-70 ng/dL	260-1000 ng/dL
	Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)		
	Età	Femmina	Maschio
Prepubere	0.2-1.3 nmol/L	0.2-1.3 nmol/L	
Adulto	1-3 nmol/L	9-29 nmol/L	

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.

## 5.b.10. Estradiolo

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 48)

### Metodo di determinazione

I metodi immunometrici indiretti (che richiedono una fase di estrazione) sono stati in pratica sostituiti 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 dalla 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.

<b>Metodologia adottata</b>	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, IRMA, RIA		
<b>Campione richiesto</b>	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL		
<b>Volume minimo</b>	500 µL		
<b>Stabilità del campione</b>	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 ore, a 2-8 °C per 48 ore, a - 20 °C per 6 mesi		
<b>Intervallo di riferimento</b>	<b>ARUP (Chemiluminescenza)</b>		
	<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>
	Prepubere	7-38 pg/mL	7-22 pg/mL
	Pubere	10-91 pg/mL	7-24 pg/mL
	Follicolare	30-100 pg/mL	
	Picco	100-400 pg/mL	
	Luteale	50-150 pg/mL	
	Menopausa	< 18 pg/mL	
	Adulto		18-67 pg/mL
	<b>Massachusetts General Hospital</b>		
	<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>
	Follicolare	< 145 pg/mL	
	Picco	112-443 pg/mL	
Luteale	< 241 pg/mL		
Menopausa	< 59 pg/mL		
Adulto		< 20 pg/mL	
<b>Thomas L</b>			
<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>	
Prepubere	< 15 pg/mL		
Follicolare	30-300 pg/mL		
Picco	100-600 pg/mL		
Luteale	100-300 pg/mL		
Menopausa	< 10 pg/mL		
Adulto		1-7 pg/mL	
<b>Tietz</b>			
<b>Età</b>	<b>Femmina</b>	<b>Maschio</b>	
Prepubere	5-300 pg/mL	5-10 pg/mL	
Pubere	25-410 pg/mL	5-30 pg/mL	
Follicolare	20-150 pg/mL		
Picco	150-750 pg/mL		
Luteale	30-450 pg/mL		
Menopausa	< 20 pg/mL		
Adulto		10-50 pg/mL	



Intervallo di riferimento	Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Centaur)		
	Età	Femmina	Maschio
	Prepubere	< 55 pmol/L	< 80 pmol/L
Follicolare	65-900 pmol/L		
Picco	130-2100 pmol/L		
Luteale	100-1000 pmol/L		
Menopausa	< 150 pmol/L		
Adulto		< 200 pmol/L	

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 estriol. *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.

### 5.b.11. Osmolarità

(Per informazioni sulla fisiopatologia, cfr. a pag. 49)

#### Metodo di determinazione

I metodi di dosaggio sfruttano le proprietà colligative (aumentata pressione osmotica, diminuita pressione di vapore, aumentato punto di ebollizione e diminuito punto di congelamento) che sono collegate direttamente al numero totale di particelle di soluto per massa di solvente. Per esempio, una soluzione 1 molale in acqua congela ad una temperatura  $< 1.858^{\circ}\text{C}$  rispetto all'acqua pura.

Teoricamente tutte le proprietà colligative potrebbero essere usate per misurare l'osmolarità, ma la diminuzione del punto di congelamento è attualmente quella di gran lunga più utilizzata per la sua semplicità e la sua rapidità. Oggi quasi il 100% dei laboratori clinici usano osmometri di questo tipo, completamente automatici e molto affidabili.

Metodologia adottata	Punto di congelamento, pressione di vapore
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL o da plasma tappo verde
Volume minimo	500 $\mu\text{L}$
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 24 ore, a 2-8 $^{\circ}\text{C}$ per 1 settimana, a -20 $^{\circ}\text{C}$ per 6 mesi
Intervallo di riferimento	ARUP
	280-303 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O
	Massachusetts General Hospital
	285-295 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O
	Thomas L
	280-300 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O
	Tietz
	275-300 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O
	Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Osmo Station)
275-295 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O	

*Bohnen N, Terwel D, Markerink M, Ten Haaf JA, Jolles J. Pitfalls in the measurement of plasma osmolality pertinent to research in vasopressin and water metabolism. Clin Chem 1992, 38: 2278-80.*

*Seifarth CC, Miertschischk J, Hahn EG, Hensen J. Measurement of serum and plasma osmolality in healthy young humans—influence of time and storage conditions. Clin Chem Lab Med 2004, 42: 927-32.*

## 5.b.12. SHBG

### Metodo di determinazione

La Sex hormone binding globulin (SHBG), conosciuta anche come Testosterone-estradiol binding globulin e sex steroid binding protein è oggi misurata in un numero molto ridotto di laboratori con metodi RIA, IRMA e chemi/elettrochemiluminescenti. I metodi IRMA si basano su due anticorpi (di cui uno legato ad un tracciante isotopico), che, in presenza della molecola di SHBG, formano un "sandwich". L'architettura del metodo è, pertanto, del tutto sovrapponibile a tutti quelli di questo tipo impiegati per ormoni misurati in numero molto più numeroso. Una quota sempre maggiore dei laboratori che assicurano questa analisi si sono dotati di strumentazioni automatiche ad elevata produttività in chemiluminescenza ed elettrochemiluminescenza che assicurano prestazioni soddisfacenti.

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immunoenzimatico, 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 24 ore, a 2-8 °C per 1 settimana, a -20 °C per 2 mesi		
Intervallo di riferimento	ARUP (Chemiluminescenza)		
	Età	Femmina	Maschio
	Prepubere	35-170 nmol/L	28-190 nmol/L
	Adulto	30-135 nmol/L	11-80 nmol/L
	Massachusetts General Hospital		
		Femmina	Maschio
		18-114 nmol/L	13-71 nmol/L
	Thomas L		
		Femmina	Maschio
	Non riferito	11-71 nmol/L	

Metzger J, Schreiegg A, Denk B, Gleixner A, Hauptmann H, Lippa PB. Immunoassay for sex hormone-binding globulin in undiluted serum is influenced by high-molecular-mass aggregates. *Clin Chem* 2005, 51: 401-7.

Reynders M, Anckaert E, Schiettecatte J, Smitz J. Evaluation of a new automated electrochemiluminescent sex hormone-binding globulin (SHBG) immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2005, 43: 86-9.

Niemi S, Maentausta O, Bolton NJ, Hammond GL. Time-resolved immunofluorometric assay of sex-hormone binding globulin. *Clin Chem* 1988, 34: 63-6.

Gershagen S, Fernlund P. Immunoradiometric assay of sex-hormone binding globulin with use of two different monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1986, 32: 130-6.

Deleo DT, Lee IR, Wetherall JD, Newman DJ, Medcalf EA, Price CP. Particle-enhanced turbidimetric immunoassay of sex-hormone-binding globulin in serum. *Clin Chem* 1991, 37: 527-31.

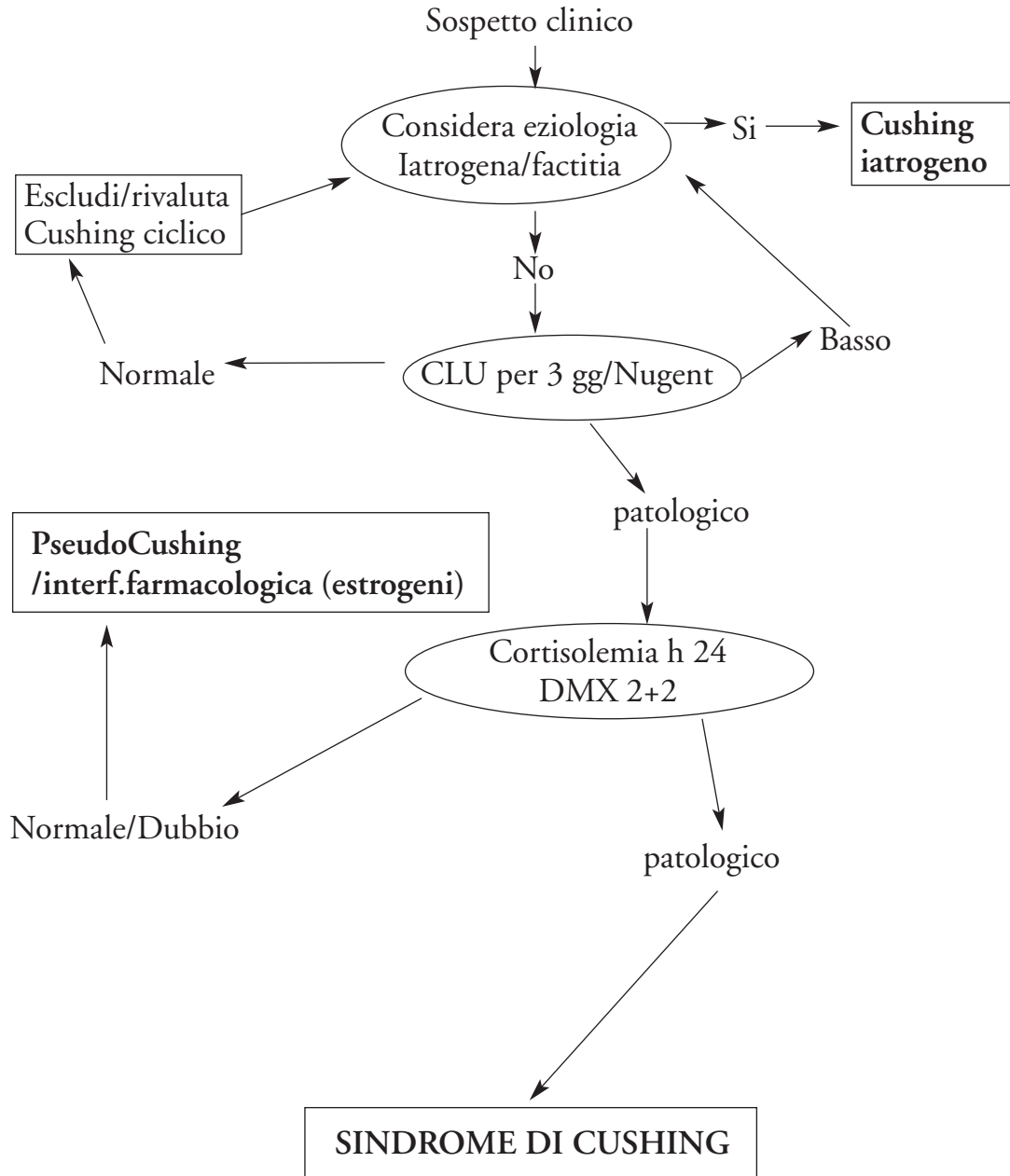


## 5.c. Flow-charts diagnostiche

### 5.c.1. Iperprolattinemia

1. Anamnesi -> **Forme fisiologiche**: gravidanza e allattamento
- 2a. Anamnesi -> **Forme iatrogene** (estrogeni, anestesia, antidopaminergici: gastroenterici (metoclopramide, sulpiride, domperidone), antipsicotici (fenotiazine, butirrofenoni), anti-ipertensivi (reserpina, metildopa); oppioidi, anfetamine, allucinogeni, interferenti con la serotonina (antidepressivi), verapamil; risperidone; anti-H<sub>2</sub> (cimetidina))
- 2b. Anamnesi ed esame obiettivo -> **Forme secondarie** (ipotiroidismo, insufficienza renale, insufficienza epatica, tumori (polmone, rene), stimoli riflessi (lesioni della parete toracica, stimolo del capezzolo, herpes zoster))
3. Dosaggio PRL in corso di infusione fisiologica -> **stress**
4. Dosaggio macroprolattina -> **macroprolattinemia** (se positivo e assenza del contesto clinico (ipogonadismo e galattorrea) fine del work-up diagnostico)
5. Valutazione anticorpi eterofili (se assenza di contesto clinico)
6. RMN -> **lesione ipotalamo-ipofisaria**:
  - **Lesione ipotalamica**: craniofaringioma, altre lesioni espansive cerebrali, lesioni infiltrative e/o metastatiche; trauma cranico; pregressa radioterapia ipofisaria.
  - **Lesione ipofisaria**: adenoma (considera **Acromegalia**), cisti della tasca di Rathke.
    - Caratteristiche e dimensioni:
      - ➔ **Microadenoma (< 10 mm): microprolattinoma**
      - ➔ **Macroadenoma (> 10 mm)** (☞ attenzione alle unità di misura del dosaggio)
        - Dosaggio PRL con diluizioni (negli espansi voluminosi)
          - < 100 µg/L: **adenoma ipofisario non funzionante**
          - > 200 µg/L: **macroprolattinoma**
          - 100-200 µg/L: *zona grigia*: trial con DA
  - RMN negativa: **iperprolattinemia idiopatica**

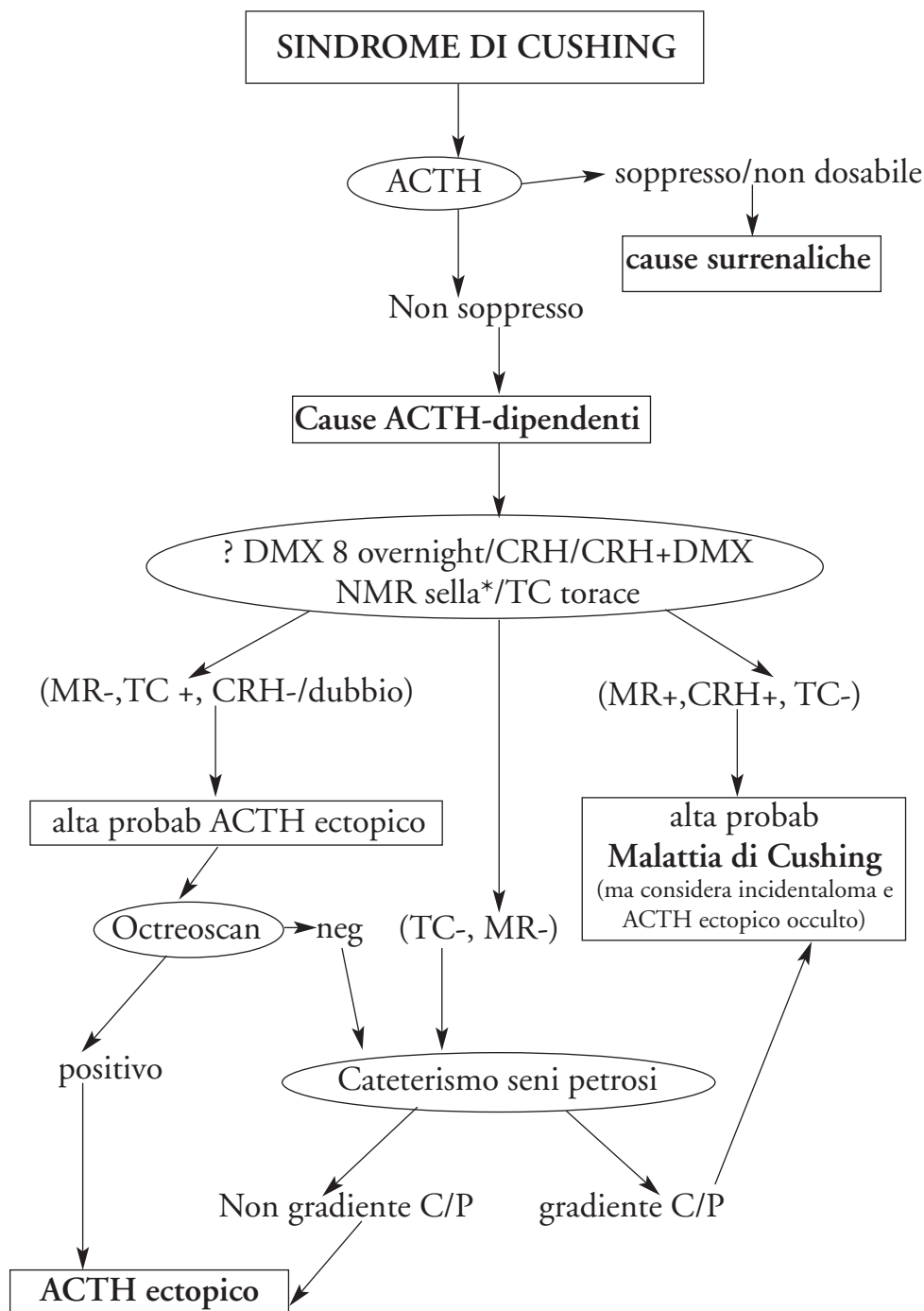
### 5.c.2. Flow-chart diagnostica per ipercortisolismo



*Note:*

DMX = desametasone

\*Gadolinio



**Pitfalls diagnostici**

Mancata inibizione con DMX 8 mg: suggestiva per ACTH ectopico

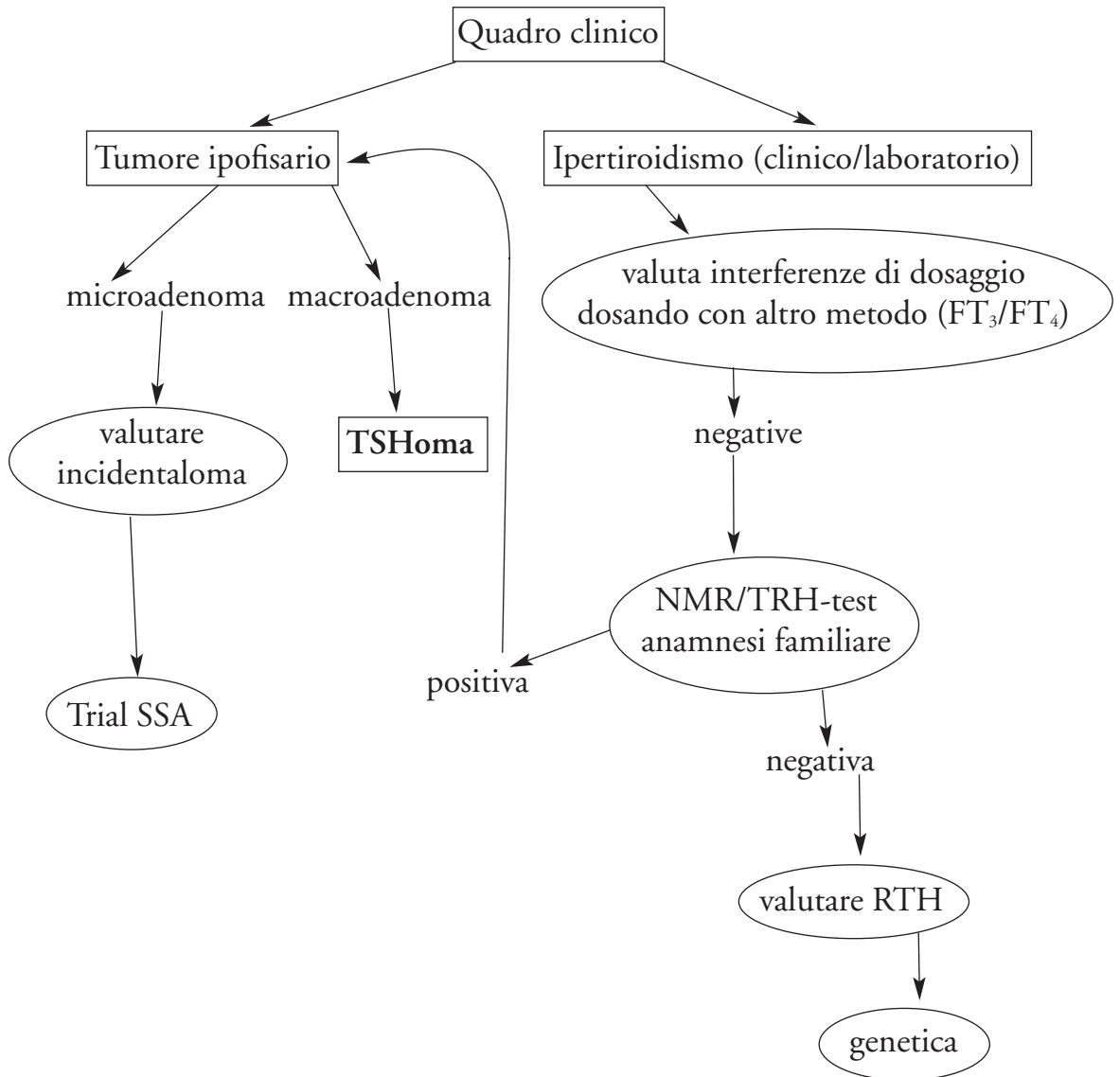
Inibizione con DMX 8 mg: presente anche nelle forme ectopiche

CRH + (risposta presente al CRH): presente anche nella s. da ACTH ectopico

CRH - (risposta assente al CRH): nel 7-14% di malattia di Cushing

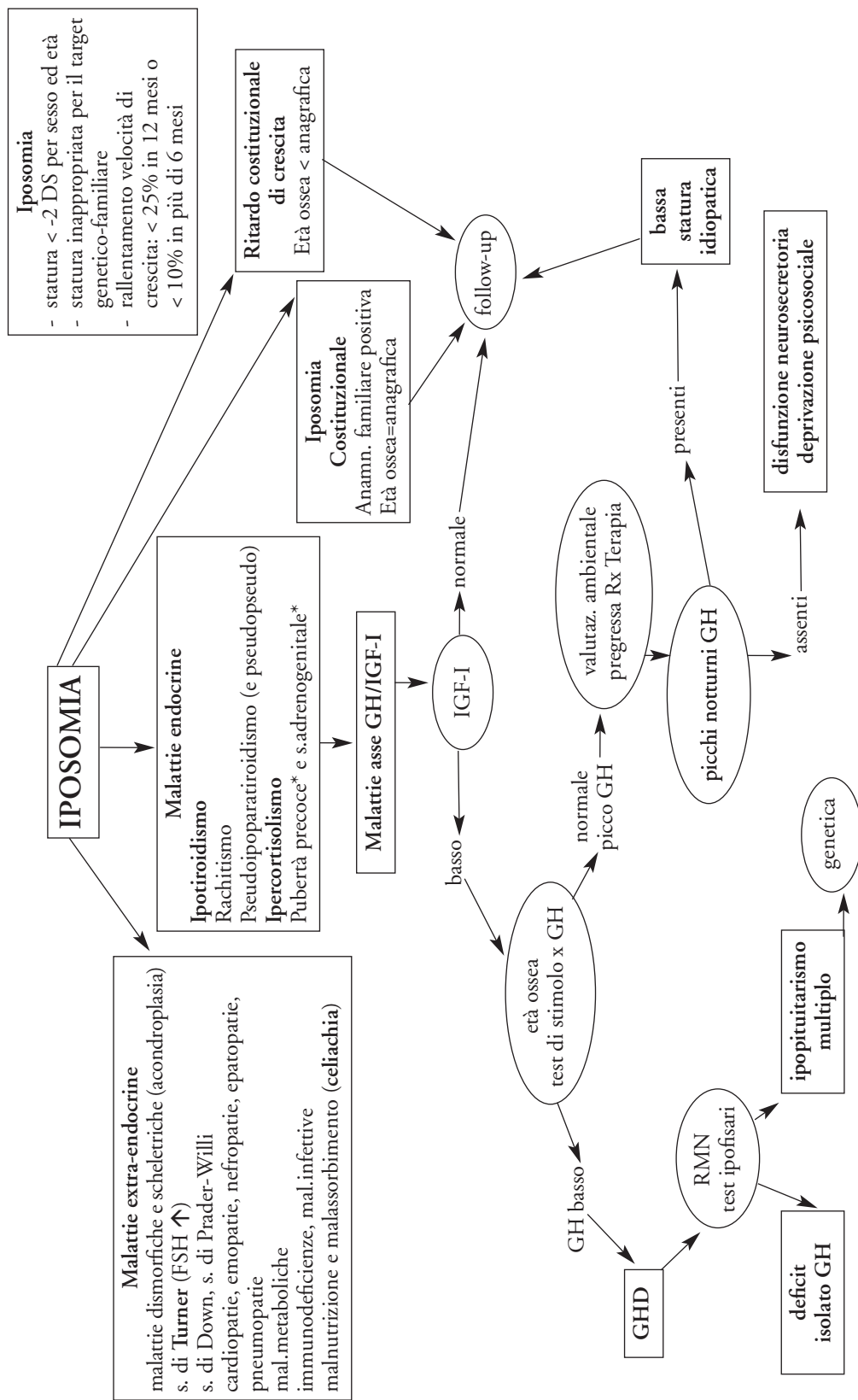
Cateterismo dei seni petrosi: non gradiente C/P (centro/periferia) nel 5-10% di m. di Cushing

### 5.c.3. Flow-chart diagnostica per TSHoma





### 5.c.4. Flow-chart diagnostica per Iposomia



\* sono associate a velocità di crescita aumentata e precoce saldatura delle epifisi (età ossea > anagrafica) con statura definitiva bassa

## 5.d. 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	$\text{Peso}/(\text{altezza}^2)$
Come calcolarlo con Excel	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 $=A1/((B1/100)^2)$ ) <b>Esempio:</b> kg 77, m 1.81, BMI = 23.5
Parametri di riferimento	Normale: 19 ÷ 25. Sovrappeso: 25 ÷ 30 Obeso: 30 ÷ 35 Gravemente obeso: > 35 Sottopeso: 17 ÷ 19 Gravemente sottopeso: < 17

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

### VELOCITÀ DI INFUSIONE SOLUZIONI

<b>Parametri necessari per il calcolo</b>	Volume da infondere (in cc oppure ml) Tempo di infusione (in ore o in minuti)
<b>Come calcolarla</b>	<p>La velocità di infusione delle soluzioni si esprime come rapporto tra volume della soluzione da infondere e il tempo in cui va infusa.</p> <p>Si può esprimere come ml/h oppure come gocce/min</p> <p>Per infondere una quantità stabilita di una soluzione si può utilizzare il microgocciolatore, se disponibile (verificandone comunque ogni volta la precisione), una pompa da infusione, oppure contare il numero di gocce infuse per unità di tempo (un minuto), tenendo presente che 1 ml = 20 gocce.</p> <p><b>Esempi:</b>                      500 ml infusi in 5 ore = 100 ml/h = 2000 gtt/60 min = 33 gtt/min                      500 ml infusi in 24 ore = 500/24h = 20.8 ml/h = 416 gtt/60 min = 7 gtt/min (arrotondando)</p>
<b>Come calcolarla con Excel</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Scrivi il volume da infondere in A1</li> <li>2. Scrivi il tempo di infusione in B1</li> <li>3. Scrivi in C1: =A1/B1 e, dopo aver schiacciato il tasto enter, il risultato comparirà automaticamente in ml/h</li> <li>4. Scrivi in D1 =C1/3 e, dopo aver schiacciato il tasto enter, il risultato comparirà automaticamente in gocce/min (oppure puoi farlo comparire direttamente in gocce/min scrivendo in C1: =(A1*20)/(B1*60) )</li> </ol> <p><b>Esempio:</b> volume 1500 ml, tempo 18 h, velocità di infusione <b>83.3 ml/h (27.8 gtt/min)</b></p>

SE CONOSCO			POSSO RICAVERE
Volume da infondere (ml)	Velocità di infusione (espressa sia come ml/h che come gtt/min)		Durata
	(ml/h)	(gtt/min)	
100	300	100	20 min
100	200	70	30 min
250	250	82	60 min
500	500	167	60 min
500	250	82	120 min
500	50	17	10 h
500	20	7	24 h

SE CONOSCO		POSSO RICAVERE	
Volume da infondere (ml)	Durata richiesta infusione	Velocità di infusione	
		(ml/h)	(gtt/min)
100	20 min	300	100
100	30 min	200	70
250	60 min	250	82
500	60 min	500	167
500	120 min	250	82
500	3 h	167	58
500	4 h	125	42
500	6 h	83	27
500	12 h	40	14
500	24 h	20	7

<b>FORMULA PER CALCOLARE MICROINFUSIONI</b> <b>(p.e. dopamina, nitroderivati)</b>	
<b>Parametri necessari per il calcolo</b>	Contenuto della singola fiala di farmaco (espresso in mg) Peso del paziente (espresso in kg) Volume della soluzione di diluizione (espresso in ml) Quantità richiesta di farmaco da infondere (espressa in µg/kg/min)
<b>Come fare il calcolo</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. stabilisci il contenuto di farmaco in 1 ml della soluzione diluita (p.e. dopamina 1 fl da 200 mg diluita in 250 ml: 1 ml della soluzione contiene 200 mg/250 ml = 0.8 mg di farmaco, cioè 800 µg/ml)</li> <li>2. stabilisci la quantità di farmaco da infondere in un minuto (p.e. se voglio infondere 3 µg/kg/min in un paziente di 70 kg: 3 µg * 70 kg = 210 µg/min)</li> <li>3. calcola la quantità di soluzione da infondere nell'unità di tempo (1 minuto): 210 µg/min / 800 µg/ml = 0.26 ml/min)</li> <li>4. moltiplica per 60 (i minuti di un'ora) per ottenere la velocità di infusione in ml/h (p.e. 0.26 ml/min * 60 = 15.8 ml/h)</li> <li>5. moltiplica per 20 (le gocce contenute in 1 ml) per ottenere la velocità di infusione in gtt/min (p.e. 0.26 ml/min * 20 = 5.25 gtt/min)</li> </ol>
<b>Come fare il calcolo con Excel</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Scrivi in A1 il contenuto in mg della fiala di farmaco;</li> <li>2. Scrivi in B1 il peso del paziente (in kg)</li> <li>3. Scrivi in C1 la quantità richiesta di farmaco da infondere (espressa in µg/kg/min)</li> <li>4. Scrivi in D1 il volume di diluizione prescelto (in ml)</li> <li>5. Scrivi in E1: <math>= (A1 * 1000) / D1</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il contenuto di farmaco contenuto in 1 ml della soluzione (in µg/ml)</li> <li>6. Scrivi in F1: <math>= B1 * C1</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il contenuto di farmaco da iniettare nel paziente di quel peso in un minuto (in µg/min)</li> <li>7. Scrivi in G1: <math>= F1 * E1</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il volume di soluzione da iniettare in un minuto (in ml/min)</li> <li>8. Scrivi in H1: <math>= G1 * 60</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in ml/h)</li> <li>9. Scrivi in I1: <math>= G1 * 20</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in gtt/min)</li> </ol> <p>Oppure tieni buoni i passaggi precedenti fino al 4 e prosegui così (però non controlli i passaggi uno per uno)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. Scrivi in E1: <math>= (((B1 * C1) / ((A1 * 1000) / D1))) * 60</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in ml/h)</li> <li>6. Scrivi in F1: <math>= (((B1 * C1) / ((A1 * 1000) / D1))) * 20</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in gtt/min)</li> </ol> <p><b>Esempio:</b> mg/fl 200, peso 70 kg, quantità richiesta farmaco 3 µg/kg/min, volume diluizione 250 ml, velocità infusione = <b>15.75 ml/h (5.25 gtt/min)</b></p>

**FORMULA PER CALCOLARE INFUSIONI PARZIALI  
(p.e. arginina)**

<b>Parametri necessari per il calcolo</b>	<p>Contenuto della singola confezione di farmaco (espresso in g)                  Peso del paziente (espresso in kg)                  Volume della soluzione di diluizione (espresso in ml)                  Quantità richiesta di farmaco da somministrare (espressa in g/kg)                  Tempo in cui infondere la soluzione (espresso in minuti)</p>
<b>Come fare il calcolo</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. stabilisci la quantità di farmaco da somministrare (p.e. arginina se voglio infondere 0.5 g/kg in un paziente di 10 kg: <math>0.5 \text{ g} * 10 \text{ kg} = 5 \text{ g}</math>)</li> <li>2. stabilisci il contenuto di farmaco in 1 ml della soluzione diluita (p.e. 1 conf da 30 g diluita in 100 ml: 1 ml della soluzione contiene <math>30 \text{ g} / 100 \text{ ml} = 0.3 \text{ g}</math> di farmaco)</li> <li>3. calcola la quantità di soluzione da infondere nel tempo stabilito (p.e. <math>5 \text{ g} / 0.3 \text{ g/ml} = 16.7 \text{ ml}</math>)</li> <li>4. calcola la quantità di soluzione da infondere nell'unità di tempo (un minuto) (p.e. <math>16.7 \text{ ml} / 30 \text{ min} = 0.55 \text{ ml/min}</math>)</li> <li>5. moltiplica per 60 (i minuti di un'ora) per ottenere la velocità di infusione in ml/h (p.e. <math>0.55 \text{ ml/min} * 60 \text{ min} = 33.3 \text{ ml/h}</math>)</li> <li>6. moltiplica per 20 (le gocce contenute in 1 ml) per ottenere la velocità di infusione in gtt/min (p.e. <math>0.55 \text{ ml/min} * 20 \text{ gtt} = 11.1 \text{ gtt/min}</math>)</li> </ol>
<b>Come fare il calcolo con Excel</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Scrivi in A1 il contenuto in g della confezione di farmaco;</li> <li>2. Scrivi in B1 il peso del paziente (in kg)</li> <li>3. Scrivi in C1 la quantità richiesta di farmaco da somministrare (espressa in g/kg)</li> <li>4. Scrivi in D1 il volume di diluizione prescelto (in ml)</li> <li>5. Scrivi in E1 il tempo di infusione previsto dal test (in minuti)</li> <li>6. Scrivi in F1: <math>=A1/D1</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il contenuto di farmaco contenuto in 1 ml della soluzione (in g/ml)</li> <li>7. Scrivi in G1: <math>=B1*C1</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il contenuto di farmaco da iniettare nel paziente di quel peso (in g)</li> <li>8. Scrivi in H1: <math>=G1/F1</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il volume di soluzione da iniettare (in ml)</li> <li>9. Scrivi in I1: <math>=H1/E1</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il volume di soluzione da iniettare nell'unità di tempo (in ml/min)</li> <li>10. Scrivi in J1: <math>=I1*60</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in ml/h)</li> <li>11. Scrivi in K1: <math>=J1*20</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in gtt/min)</li> </ol> <p>Oppure tieni buoni i passaggi precedenti fino al 5 e prosegui così (però non controlli i passaggi uno per uno)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. Scrivi in F1: <math>=(B1*C1)/(A1/D1)</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il volume di soluzione da iniettare (in ml)</li> <li>7. Scrivi in G1: <math>(((B1*C1)/(A1/D1))/E1)*60</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in ml/h)</li> <li>8. Scrivi in H1: <math>(((B1*C1)/(A1/D1))/E1)*20</math> e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente la velocità di infusione (in gtt/min)</li> </ol> <p><b>Esempio:</b> quantità di farmaco/confezione 30 g, peso 10 kg, quantità di farmaco da somministrare 0.5 g/kg, volume diluizione 100 ml, tempo infusione 30 min, volume da infondere = <b>16.7 ml</b>, velocità infusione = <b>33.3 ml/h</b> (11.1 <b>gtt/min</b>)</p>

SDS (STANDARD DEVIATION SCORE)	
Cos'è	È un metodo per descrivere lo scostamento di un parametro osservato in un paziente rispetto alle misurazioni medie di quel parametro in un gruppo di soggetti normali di uguale età e sesso.
A cosa serve	Lo si usa soprattutto (ma non solo) per monitorare l'altezza dei bambini di bassa statura nel corso del tempo o durante un trattamento.
Parametri necessari per il calcolo	Misurazione attuale del parametro di interesse. Valore medio del parametro di interesse nella popolazione normale di riferimento di pari età e sesso. Deviazione standard del parametro di interesse nella popolazione normale di riferimento di pari età e sesso.
Come calcolarlo (esempi con altezza)	$(\text{Altezza attuale del soggetto} - \text{Altezza media dei soggetti normali della stessa età e sesso}) / (\text{deviazione standard dell'altezza nei soggetti normali della stessa età e sesso})$
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi l'altezza del soggetto nella casella A1 2. Scrivi l'altezza media dei soggetti normali della stessa età e sesso nella casella B1 3. Scrivi la deviazione standard dell'altezza nei soggetti normali della stessa età e sesso nella casella C1 4. Scrivi in D1: $=(A1-B1)/C1$ e, dopo aver schiacciato il tasto enter, il risultato comparirà automaticamente <b>Esempio:</b> altezza soggetto cm 125, altezza media 153, deviazione standard 10, SDS = -2.8
Parametri di riferimento	Normale: $-2 \div +2$ . Iposomico: $< -2$ Altezza eccessiva: $> +2$

BERSAGLIO GENETICO PER ALTEZZA	
Cos'è	È un metodo per calcolare l'altezza prevista di un bambino, in relazione a quella dei genitori.
A cosa serve	Lo si usa per prevedere il potenziale genetico di crescita di un bambino.
Parametri necessari per il calcolo	Altezza dei genitori (meglio se misurata piuttosto che riferita).
Come calcolarlo (esempi con altezza)	$((\text{Altezza del padre} + \text{Altezza della madre})/2) \pm 6.5$
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi l'altezza del padre nella casella A1 2. Scrivi l'altezza della madre nella casella B1 3. Scrivi in C1 $=(A1+B1)/2+6.5$ e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il risultato per un maschio 4. Scrivi in D1 $=(A1+B1)/2-6.5$ e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il risultato per una femmina <b>Esempio:</b> altezza padre cm 188, altezza madre 158, altezza prevista figlio maschio = 179.5, altezza prevista figlia femmina = 166.5

FORMULA PER CALCOLARE OSMOLARITÀ	
Cos'è	È un metodo per calcolare l'osmolarità senza misurarla direttamente, partendo da parametri facilmente disponibili.
Parametri necessari per il calcolo	Sodiemia (in mM/L = mEq/L) Azotemia (in mM/L o mg/dl) Glicemia (in mM/L o mg/dl)
Come calcolarlo	$(\text{Sodiemia} \times 1.86) + \text{glicemia} + \text{azotemia} + 9$
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi la sodiemia nella casella A1 2. Scrivi l'azotemia nella casella B1 3. Scrivi la glicemia nella casella C1 4. Scrivi in D1 $=(1.86 \times A1) + B1 + C1 + 9$ e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il risultato 5. Se azotemia e glicemia sono in mg/dl, scrivi in D1 $=(1.86 \times A1) + (B1/2.8) + (C1/18) + 9$ e, dopo aver schiacciato il tasto enter, comparirà automaticamente il risultato <b>Esempio:</b> sodiemia 140 mEq/L, azotemia 30 mg/dl, glicemia 92 mg/dl, osmolarità calcolata = 285 mOsm/kg

## 5.e. Il carrello delle emergenze

In ospedale dovrebbe essere sempre presente un carrello per le emergenze, facilmente accessibile sia dalle sale di degenza che dai locali di day-hospital (e non dovrebbe essere troppo lontano nemmeno dagli ambulatori). La sua composizione deve ovviamente adattarsi alla tipologia di pazienti che affinisce alle diverse strutture, tenendo presente però che sempre più spesso le strutture endocrinologiche sono frequentate anche da pazienti anziani e portatori di pluripatologia.

È fondamentale identificare una o più figure professionali che si occupano della sua manutenzione e rifornimento, facendo riferimento ad una check-list e controllando le scadenze dei farmaci. È altrettanto fondamentale che dopo ogni emergenza, il personale che l'ha usato lo pulisca, lo riordini, integri i materiali consumati e prenda nota delle eventuali carenze riscontrate, sia di fornitura (come tipologia e numero di pezzi) che di organizzazione (ordine e disposizione dei materiali), in maniera da porvi rimedio.

PRESIDIO	NUMERO
Arcella	1
Cestino rifiuti	1
Safe box per materiali appuntiti	1
Forbici grosse	1
Laccio emostatico	2
Seghette per fiale	4
Aghi 16G (gialli)	5
Aghi 20G (rosa)	5
Aghi 21G (neri)	5
Butterfly 21G (verdi)	5
Deflussori	5
Deflussori schermati	3
Coperture schermate per infusioni fotosensibili	1
Raccordi a 3 vie per infusioni	5
Set per catetere venoso centrale	2
Siringhe 2 ml	5
Siringhe 5 ml	5
Siringhe 10 ml	5
Siringhe 20 ml	3
Siringhe insulina	3
Siringhe per emogas	3
Venflon 18G (verde)	5
Venflon 20G (rosa)	5
Venflon 24G (azzurro)	5
Catetere vescicale Foley n 14	1
Catetere vescicale Foley n 16	1
Catetere vescicale Foley n 18	1
Pomata Luan	1
Schizzettoni 100 ml	3
Sondino naso-gastrico K10 o CH16	3
AMBU con pallone	1

PRESIDIO	NUMERO
Cannule oro-tracheali n 4	3
Cannule oro-tracheali n 5	3
Maschera per ventilazione misura 4	1
Maschera per ventilazione misura 5	1
Mascherine con reservoir per ossigeno	2
“Occhialini” per ossigeno	2
Sondini nasali per ossigeno	2
Silicone spray	1
Sondini per broncoaspirazione	5
Bombola portatile ossigeno con tubi di connessione e valvole (se non disponibile accesso a sistema di erogazione centralizzato)	1
Rotoli cerotto seta 1 cm	2
Rotolo Mefix	1
Citrosyl disinfettante flacone	1
Iodoten 10 flacone	1
Pungidito	10
Strisce reattive per glucometer	10
Garze sterili	100
scatola Guanti misura large	1
scatola Guanti misura medium	1
scatola Guanti misura small	1
sfigmomanometro	1
fonendoscopio	1
Placche autoadesive per monitor ECG	20
Pasta conduttrice	1
Riduttori (se non disponibili prese universali a doppio passo)	2
Prolunga elettrica	1
“Ciabatta” elettrica	1

**Apparecchiature a disposizione** (a ragionevole distanza e facilmente trasportabili, con accessori, cavi, adattatori e spine compatibili):

- Monitor ECG con defibrillatore semiautomatico
- Broncoaspiratore
- Saturimetro



FARMACO	COMMERCIALE	DOSE	N.FIALE	NOTE
Adrenalina	Adrenalina	1 mg	30	in frigorifero
Amiodarone	Cordarone	150 mg	20	
Atropina	Atropina	0.5 mg	10	
Clonidina	Catapresan	0.150 mg	5	
Digossina	Lanoxin	0.5 mg	5	
Dopamina	Revivan	200 mg	10	
Eparina	Liquemin	25000 UI	5	in frigorifero
Etacrinico acido	Reomax	50 mg	3	
Flecainide	Almarytm	150 mg	10	
Furosemide	Lasix	20 mg	50	
Labetalolo	Trandate	100 mg	3	
Lidocaina	Xylocaina	200 mg	20	
Morfina	Morfina	10 mg	10	in cassaforte
Nitroprussiato	Nitroprussiato	100 mg	5	defluss.schermato
Propafenone	Rytmonorm	70 mg	20	
Propranololo	Inderal	5 mg	5	
Verapamil	Isoptin	5 mg	30	
Desametasone	Decadron	4 mg	5	
Idrocortisone	Flebocortid	1 g	5	
Metilprednisolone	Urbason	40 mg	5	
Salbutamolo	Ventolin	200 µg	10	
Teofillina	Tefamin	240 mg	5	
Diazepam	Valium	10 mg	10	
Flumazenil	Anexate	1 mg	5	
Naloxone	Narcan	0.4 mg	5	
Calcio Cloruro 10%	CaCl <sub>2</sub>	10 ml	10	
Magnesio solfato 10%	MgSO <sub>4</sub>	10 ml	10	
Plasma expander	Emagel	500 ml	2	
Sodio bicarbonato 7.5%	NaHCO <sub>3</sub>	100 ml	3	
Sodio bicarbonato 8.4%	NaHCO <sub>3</sub>	10 ml	10	
Sol.Fisiologica	Fisiologica	10 ml	10	
Sol.Fisiologica	Fisiologica	100 ml	3	
Sol.Fisiologica	Fisiologica	250 ml	2	
Sol.Fisiologica	Fisiologica	500 ml	2	
Sol.Glucosata 33%	Gluc 33%	10 ml	5	
Sol.Glucosata 5%	Gluc 5%	250 ml	2	

## 5.f. Farmaci e modalità di approvvigionamento

ACTH ( <i>Synachten</i> )	
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

BIOARGININA	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	FARMACEUTICI DAMOR S.p.A., Via E. Scaglione 27 – 80145 Napoli
Composizione	L-arginina cloridrato 20 g in flacone da 500 ml di fisiologica
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	1 flacone da 20 g in 500 ml per infusione endovenosa con deflussore sterile pronto per l'uso
Speciali precauzioni per la conservazione	Il prodotto può essere conservato alle normali condizioni di temperatura, umidità e luce
Periodo di validità	36 mesi
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera

BUSERELIN ( <i>Suprefact</i> )	
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

CRH	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	FERRING S.p.A., Wien, Austria
Composizione	Principio attivo: Corticorelin-trifluoroacetato umano 110-121 µg; Solvente: per preparazioni iniettabili 1 ml.
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio da 5 fiale di prodotto + 5 fiale di solvente o astuccio da 1 fiala di prodotto + 1 fiala di solvente
Speciali precauzioni per la conservazione	Non conservare al di sopra dei 25° C. Tenere il contenitore ben chiuso al riparo dalla luce.
Periodo di validità	Indicato sulla confezione
Modalità di richiesta	Moduli per farmaci <b>non in commercio in Italia</b>

DDAVP o DESMOPRESSINA ( <i>Minirin</i> )	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	FERRING S.p.A. Via Senigallia 18/2 – 20161 Milano
Composizione	Una fiala contiene il principio attivo desmopressina acetato idrato 4 µg
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Astuccio da 10 fiale, ogni fiala da 4 µg /mL
Speciali precauzioni per la conservazione	Non conservare al di sopra dei 25° C. Tenere il contenitore ben chiuso al riparo dalla luce
Periodo di validità	2 anni (il periodo di validità indicato si riferisce al prodotto in confezionamento integro, correttamente conservato)
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera

GHRH	
Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	FERRING S.p.A. Via Senigallia 18/2 – 20161 Milano
Composizione	Principio attivo: Somatorelina 50 µg; Solvente: acqua per preparazioni iniettabili 1 mL.
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile
Natura e contenuto della confezione	Fiale di vetro trasparente. La confezione include 1 fiala di prodotto e 1 fiala di solvente
Speciali precauzioni per la conservazione	Il prodotto in confezionamento integro va conservato alle normali condizioni ambientali
Periodo di validità	33 mesi (il periodo di validità indicato si riferisce al prodotto in confezionamento integro, correttamente conservato). Il prodotto dovrebbe essere usato immediatamente dopo l'apertura della fiala e la ricostituzione della soluzione iniettabile.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera

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

## 5.g. Fattori di conversione delle unità di misura convenzionali in Unità Internazionali (SI)

La base delle unità convenzionali è l'unità di massa, il chilogrammo (pari alla massa del prototipo internazionale del chilogrammo), mentre l'unità di quantità di materia (sostanza) 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. Le ragioni sono numerose; tra le altre:

- I processi metabolici che avvengono nelle nostre cellule seguono leggi chimiche che si svolgono non in termini di massa, ma in termini di atomi, ioni e molecole: le cellule e i loro recettori non rispondono a modificazioni di massa, ma a modificazioni del numero di molecole.
- Il loro uso è appropriato per la maggior parte delle tecniche di misura (spettrometria, fluorimetria, immunometria,...).
- La concentrazione di un calibrante è definita senza ambiguità, indipendentemente dalla forma chimica del materiale usato. Dieci 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).

A partire dagli anni '70, il sistema SI è stato adottato ampiamente: dai Paesi Bassi nel 1970, da Danimarca e Finlandia nel 1971, dall'Australia nel 1974, dal Regno Unito nel 1975, da Nuova Zelanda, Sud Africa e Svezia nel 1976, dalla Norvegia nel 1977; successivamente dal Canada e dalla Svizzera. Altri paesi, come l'Italia e gli Stati Uniti, non lo hanno adottato per le analisi di laboratorio.

Non è difficile passare dalle Unità tradizionali a quelle SI e sarebbe preferibile passare 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 allegata sono indicati i fattori di conversione di alcuni dei principali esami.

ANALITA	UNITÀ CONVENZIONALE	FATTORE DI CONVERSIONE*	UNITÀ SI
GH	ng/mL = µg/L	45200	pmol/L
	ng/mL = µg/L	2.6 (Beckman Access)	mU/L
	ng/mL = µg/L	2 (Brahams IRMA)	mU/L
	ng/mL = µg/L	2.6 (Tosoh, AIA; Delfia)	mU/L
	ng/mL = µg/L	2.4 (Immulite 2000)	mU/L
ACTH	pg/mL = ng/L	0.22	pmol/L
Cortisolo	ng/mL = µg/L	2.759	nmol/L
	µg/dL	27.59	nmol/L
Estradiolo	pg/mL = ng/L	3.671	pmol/L
Prolattina	ng/mL = µg/L	43.478	pmol/L
	ng/mL = µg/L	21.2 (Bayer, Centaur)	mU/L
IGF-I	ng/mL = µg/L	0.131	nmol/L
Testosterone	ng/dL	0.0347	nmol/L
	ng/mL = µg/L	3.47	nmol/L
FT <sub>4</sub>	ng/dL	12.87	pmol/L
FT <sub>3</sub>	pg/dL	0.0154	pmol/L
	pg/mL = ng/L	1.54	pmol/L
SHBG	µg/mL = mg/L	8.696	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)