

Sezione V: Appendice pratica

17. Determinazioni di laboratorio

Romolo Dorizzi

Bibliografia per intervalli di riferimento

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

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

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

<http://www.aruplab.com/> (consultato: 01.07.2008)

17.a. Corticotropina (ACTH)

(per fisiologia, cfr cap 2b)

Determinazione

In passato, laboratori di riferimento misuravano la corticotropina (ACTH) con *bio-assay* che erano basati sugli effetti dell'ACTH su cellule della corticale del surrene. Tali metodi erano costosi e complessi e l'introduzione dei metodi immunometrici, con un coefficiente di precisione inferiore al 10% in tutto l'ambito di concentrazione, ha consentito di misurare l'ACTH con buona sensibilità e soddisfacente specificità. I metodi immuno-radiometrici "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 (di solito 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 spesso dei valori numerici difficili da confrontare**, a causa di differenze nella calibrazione. I metodi commercializzati sono in genere calibrati contro preparazioni di ACTH purificato, come l'ACTH 1-39 fornito dal *National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC*, ovvero quello sintetico fornito dall'*United States National Hormone and Pituitary Program*. Quando si vogliono confrontare dei metodi o si vuole valutare l'applicabilità di valori di *cut-off*, è sempre opportuno tener conto dei calibratori impiegati.

Un aspetto pre-analitico di particolare importanza è rappresentato dalle **precauzioni che devono essere prese per evitare la degradazione della molecola di ACTH**, una volta raccolto il campione: è necessario che il campione di plasma sia raccolto in provette di poli-propilene contenenti EDTA e che la provetta sia immediatamente refrigerata, centrifugata in una centrifuga refrigerata e rimanga congelata fino al momento dell'esecuzione del dosaggio.

Tabella 17a.1
Corticotropina (ACTH)

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, 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 per 2 ore, a - 20°C per 3 mesi

Intervallo di riferimento		
ARUP (Chemiluminescenza)	< 9 anni	5-46 pg/mL
	10-18 anni	6-55 pg/mL
	> 19 anni	F 6-58 pg/mL; M 7-69 pg/mL
Massachusetts General Hospital	7-69 pg/mL	
Thomas L	h 8.00	5-60 ng/L
	h 24.00	< 10 ng/L
Tietz	h 8.00	8-25 ng/L
	h 24.00	< 10 ng/L

Bibliografia

- 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.

17.b. Cortisolemia/Cortisoluria/Cortisolo salivare

(per fisiologia, cfr cap 2a)

Metodi 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: 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.

Metodiche immunometriche sono oggi disponibili su numerosi analizzatori automatici. La maggior parte dei metodi **immunometrici** è "**diretta**" e non richiede 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 aspecificità dei metodi, le basse concentrazioni risentono dei problemi di bassa sensibilità. Il **cortisolo** può essere misurato **nella saliva**, come la maggior parte degli steroidi di interesse clinico. È stato suggerito che la determinazione del cortisolo salivare rifletta la frazione libera nel sangue (non legata alle proteine, probabilmente a causa dell'assenza di quantità sostanziali di CBG o albumina nella saliva) e che possa fornire informazioni simili a quelle fornite dalla determinazione del CLU. Altri vantaggi sono la possibilità di raccogliere frequentemente

campioni anche al di fuori dell'ambulatorio e l'assenza di *stress* correlata alla raccolta del campione (importante per esempio nei bambini). La determinazione del cortisolo nella saliva non richiede estrazione, poiché la saliva non contiene virtualmente proteine leganti il cortisolo o altri metaboliti. Molti metodi radio-immunologici ed un numero limitato di metodi automatici (ad esempio Roche) sono dotati di una sensibilità sufficiente per la determinazione del cortisolo salivare. È molto utile congelare il campione appena raccolto (usando dispositivi dedicati molto semplici); sarà poi sufficiente scongelare i campioni e centrifugarli, per ottenere la precipitazione delle glico-proteine ed avere un campione fluido e limpido.

Tabella 17b.1
Cortisolo sierico e salivare

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, RIA		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL		
Volume minimo	500 µL		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 1 giorno, a 2-8°C per una settimana, a -20°C per 1 mese La saliva è stabile per una settimana a 4°C e per 4 mesi a -20°C		
Intervallo di riferimento	orario	Plasmatico	Salivare
ARUP (chemiluminescenza)	h 8.00	6-23 µg/dL	
	h 20.00	< 9 µg/dL	
Massachusetts General Hospital	h 8.00-12.00	5-25 µg/dL	
	h 12.00-20.00	5-15 µg/dL	
	h 20.00-8.00	< 10 µg/dL	
Thomas L	h 8.00	5-25 µg/dL	4-10 µg/L
	h 24.00	< 5 µg/dL	0.8-1.3 µg/L
Tietz	h 8.00	5-23 µg/dL	1.4-10.1 ng/mL
	h 16.00	3-16 µg/dL	
	h 20.00	< 50% di quello delle h 8.00	0.7-2.2 ng/mL

Tabella 17b.2
Cortisolo urinario

Metodologia adottata	HPLC, Spettrometria di massa, Chemiluminescenza, Immunoenzimatica, 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	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 (metodo immunometrico con estrazione)	1-10 anni	2-27 µg/die
	11-20 anni	5-55 µg/die
	> 20 anni	20-90 µg/die
Tietz	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)

Un valore normale di cortisolemia alle ore 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 (*cf. cap 4*) o ipocortisolismo (*cf. cap 3*). 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, mentre nei casi sospetti per ipocortisolismo non rivestono **nessun valore diagnostico**.

Bibliografia

- 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 ADVIA Centaur extraction method. *Ann Clin Biochem* 2003, 40: 563-5.

17.c. Renina e Attività Reninica

(per fisiologia, cfr cap 2c)

Determinazione

Fino alla metà degli anni '80 la determinazione diretta della molecola della renina poteva essere eseguita solamente tramite la misurazione dell'attività enzimatica (**PRA**). Il sistema consiste nella trasformazione enzimatica del substrato della renina, l'angiotensinogeno, in angiotensina I. Pur essendo considerata la metodica di riferimento, richiede da parte del laboratorio un'elevata manualità: vengono allestite due serie di provette contenenti il campione di plasma, un inibitore del successivo passaggio enzimatico ad angiotensina II ed un tampone a pH acido; una provetta è posta a 37°C per un tempo definito (generalmente 1 ora) in modo da facilitare la reazione enzimatica *in vitro*, l'altra provetta è posta a 4°C, per lo stesso tempo, in modo di bloccare la stessa reazione enzimatica. Successivamente è effettuato il dosaggio immunometrico dell'angiotensina I prodotta nelle due provette: la differenza tra la quantità prodotta nella provetta a 37°C e quella prodotta a 4°C dà la misura dell'attività reninica plasmatica espressa in ng/mL/h.

Negli anni '80 sono stati sviluppati metodi per il dosaggio della renina diretta (*Plasma Renin Concentration*, **PRC**) con tecniche RIA, che consentono la determinazione della molecola della renina mediante anticorpi monoclonali o policlonali diretti verso gli epitopi che sono coperti dal prosegmento attivatore della pro-renina a renina. Questi metodi, sono stati inizialmente criticati per la scarsa sensibilità a bassi livelli di analita. Agli stessi livelli di concentrazione tale sensibilità è invece raggiunta dai metodi di dosaggio della PRA aumentando i tempi di incubazione della reazione enzimatica. Gli stessi metodi per il dosaggio della PRA dimostrano, tuttavia, una marcata dipendenza dal livello di substrato (angiotensinogeno) disponibile per la reazione enzimatica, non sono standardizzabili e dimostrano una scarsa riproducibilità intra ed inter-laboratorio. Inoltre, l'attivazione della molecola della renina dalla pro-renina avviene fisiologicamente anche *in vitro* per crioattivazione in un campione di plasma mantenuto alla temperatura di 2-8°C. A causa della preponderanza molecolare della pro-renina (il rapporto di concentrazione tra le due molecole è di 9:1 in favore della pro-renina), anche una crioattivazione parziale può causare *in vitro* una sovrastima della reale concentrazione di renina. Questo deve essere tenuto presente sia nei metodi di dosaggio della PRA (il campione va tenuto a 4°C, per bloccare la reazione enzimatica da angiotensinogeno ad angiotensina II) che nei metodi di dosaggio della renina diretta (il campione non deve essere refrigerato).

Nel corso degli anni la sensibilità dei metodi immunometrici, alcuni in completa automazione con segnale luminescente, è aumentata. Tali metodi (che utilizzano anticorpi monoclonali e si riferiscono come calibratore alla preparazione internazionale WHO IRP NIBSC 68/356) sono semplici da eseguire e riproducibili. Questo ha permesso di definire un **rapporto tra risultato della PRA e della PRC** (1 ng/mL/h PRA è equivalente a 8 µU/mL di PRC e, in particolare, PRC < 5 µIU/mL = PRA < 0.65 ng/mL/h). Si raggiunge, quindi, l'elevata sensibilità nei metodi di dosaggio della PRC richiesta per la diagnosi corretta di iperaldosteronismo primario.

Tabella 17c.1
Renina

Metodologia adottata	RIA	
Campione richiesto	Provetta da plasma K2 EDTA (tappo viola) 6 mL	
Volume minimo	500 µL	
Stabilità del campione	Stabile a - 20°C per 12 mesi	
Intervallo di riferimento		
Renina diretta	Supino	2.8-39.9 µU/L
	Eretto	4.4-46.1 µU/L
ARUP (RIA)	Neonato	2-35 ng/mL/h
	1-12 mesi	24-37 ng/mL/h
	13-36 mesi	1.7-11.2 ng/mL/h
	4-5 anni	1-6.5 ng/mL/h
	6-10 anni	0.5-5.9 ng/mL/h
	11-15 anni	0.5-3.3 ng/mL/h
	> 15 anni	supino 0.2-1.6 ng/mL/h; eretto 0.5-4 ng/mL/h
Thomas L	supino	0.5-1.6 ng/mL/h
	eretto	1-3.2 ng/mL/h
Tietz	0.7-3.3 ng/mL/h	

Bibliografia

- Persson PB. *Renin: origin, secretion and synthesis*. *J Physiol* 2003, 552: 667-71.
- Sealey JE, Trenkwalder P, Gahnem F, Catanzaro D, Laragh J. *Plasma renin methodology: inadequate sensitivity and accuracy of direct renin assay for clinical applications compared with the traditional enzymatic plasma renin activity assay*. *J Hypertens* 1995, 13: 27-30.
- Cavalier E, Delanaye P, Krzesinski JM, Chapelle JP. *Analytical variation in plasma renin activity: implications for the screening of primary aldosteronism*. *Clin Chem* 2007, 53: 803-4.
- Hartman D, Sagnella GA, Chesters CA, MacGregor GA. *Direct renin assay and plasma renin activity assay compared*. *Clin Chem* 2004, 50: 2159-61.
- de Bruin R, Bouhuizen A, Diederich S, Perschel FH, Boomsma F, Deinum J. *Validation of a new automated renin assay*. *Clin Chem* 2004, 50: 2111-6.

17.d. Aldosterone sierico e urinario, DOC

(per fisiologia, cfr cap 2d)

Determinazione

Sono stati proposti dei *bioassay* per la determinazione dell'aldosterone, ma questi metodi sono complessi ed impegnativi e non possono essere impiegati nella pratica clinica, nella quale sono impiegati **metodi radioimmunologici**, molto più semplici. La maggior parte dei metodi radioimmunologici usano anticorpi generati contro un coniugato tra aldosterone-3-mono-ossido bovino ed albumina bovina (BSA) e un ligando legato ad un tracciante ^{125}I e 1,8-anilinaftalene-8-sulfonato.

Sono disponibili in commercio numerosi metodi per la determinazione di aldosterone nel plasma e nelle urine, che differiscono nella specificità degli anticorpi usati e nel tipo di separazione tra aldosterone legato e libero (anticorpo in fase solida, secondo anticorpo, *charcoal*-destrano, precipitante polietilene-glicole).

Il metodo per la determinazione dell'**aldosterone nelle urine** è simile, con la particolarità che le urine sono idrolizzate in acido prima della determinazione.

La *cross*-reazione con gli altri steroidi degli anticorpi commerciali diretti contro l'aldosterone (in genere anticorpi policlonali di coniglio) è in genere bassa (< 0.01%), ma in alcuni casi la concentrazione di questi steroidi interferenti è molto elevata e richiederebbe procedure di estrazione prima della determinazione. Anche se la maggior parte dei dosaggi non prevede cromatografia o estrazioni, queste **fasi estrattive** sono **necessarie** soprattutto **nei soggetti con malattia surrenalica, nei bambini e nelle donne in gravidanza**.

Sono oggi disponibili **metodi immunoenzimatici** non isotopici per la determinazione di aldosterone che si basano su anticorpi policlonali e monoclonali e su antigeni o anticorpi immobilizzati. L'inadeguata standardizzazione, la scarsa riproducibilità tra laboratori, e la limitata comparabilità tra i diversi metodi rendono difficile definire dei valori di *cut-off* per l'iperaldosteronismo.

Tabella 17d.1
Aldosterone sierico

Metodologia adottata	RIA, Chemiluminescenza, Immunoenzimatica	
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL	
Volume minimo	500 µL	
Stabilità del campione	Il plasma è stabile a temperatura ambiente per 8 ore, a -20°C per 12 mesi	
Intervallo di riferimento		
ARUP (Chemiluminescenza)	0-6 giorni	5-102 ng/dL
	1-3 settimane	6-179 ng/dL
	1-11 mesi	7-99 ng/dL
	1-2 anni	7-93 ng/dL
	3-10 anni	4-44 ng/dL
	11-15 anni	4-31 ng/dL
	> 15 anni	supino <16 ng/dL; eretto 4-31 ng/dL

Massachussets General Hospital	supino	2-9 ng/dL
	eretto	4-18 ng/dL
Thomas L	1 giorno	343-1253 ng/L
	2-5 giorni	200-900 ng/L
	6-30 giorni	69-812 ng/L
	1-12 mesi	69-552 ng/L
	1-6 anni	40-271 ng/L
	6-15 anni	29-145 ng/L
	> 15 anni	supino 29-145 ng/L; eretto 65-285 ng/L
Tietz	1 giorno	7-184 ng/dL
	1-7 giorni	5-175 ng/dL
	1-12 mesi	5-90 ng/dL
	1-2 anni	7-54 ng/dL
	2-10 anni	3-35 ng/dL
	10-15 anni	2-22 ng/dL
	> 15 anni	supino 3-16 ng/dL; eretto 7-30 ng/dL

Tabella 17d.2
Aldosterone urinario

Metodologia adottata	RIA, Chemiluminescenza, Immunoenzimatica
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	6-25 µg/die
Tietz	6-25 µg/die

11 Deossicorticosterone (DOC)

I metodi per la determinazione del DOC (RIA, HPLC, ovvero HPLC accoppiato a metodi RIA e cromatografia su carta accoppiato a RIA) hanno solo finalità di ricerca e non sono applicabili al laboratorio clinico.

Bibliografia

- Cartledge S, Lawson N. Aldosterone and renin measurements. *Ann Clin Biochem* 2000, 37: 262-78.
- Gordon RD. The challenge of more robust and reproducible methodology in screening for primary aldosteronism. *J Hypertens* 2004, 22: 251-5.
- Nadar S, Lip GY, Beevers DG. Primary hyperaldosteronism. *Ann Clin Biochem* 2003, 40: 439-52.

- Schwartz GL, Turner ST. Screening for primary aldosteronism in essential hypertension: diagnostic accuracy of the ratio of plasma aldosterone concentration to plasma renin activity. *Clin Chem* 2005, 51: 386-94.
- Schirpenbach C, Seiler L, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Reincke M, Bidlingmaier M. Automated chemiluminescence-immunoassay for aldosterone during dynamic testing: comparison to radioimmunoassays with and without extraction steps. *Clin Chem* 2006, 52: 1749-55.
- Ghulam A, Kouach M, Racadot A, Boersma A, Vantuyghem MC, Briand G. Quantitative analysis of human serum corticosterone by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1999, 727: 227-33.
- Hill M, Lapčík, Hampl R, Stárka L, Putz Z. Radioimmunoassay of three deoxycorticoids in human plasma following HPLC separation. *Steroids* 1995, 60: 615-20.
- Ueshiba H, Segawa M, Hayashi T, Miyachi Y, Irie M. Serum profiles of steroid hormones in patients with Cushing's syndrome determined by a new HPLC/RIA Method. *Clin Chem* 1991, 37: 1329-33.
- Wie JQ, Zhou XT, Wei JI Simultaneous measurement of eight corticosteroids by liquid chromatography, and application of the procedure to diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem* 1987, 33: 1354-7.

17.e Atriopeptine

(per fisiologia, cfr cap 2h)

Sono stati proposti inizialmente metodi immunometrici competitivi RIA ed EIA (influenzati da numerose interferenze specifiche ed aspecifiche, richiedono fasi preliminari di estrazione) e successivamente metodi non competitivi (in genere metodi *sandwich* basati su due anticorpi monoclonali).

Non sono al momento commercializzati metodi automatici per la determinazione dell'ANP: questo spiega la loro diffusione molto minore rispetto ai metodi per la determinazione di BNP per i quali esistono numerosi metodi automatici in chemiluminescenza.

Bibliografia

Clerico A, Emdin M. *Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. Clin Chem 2004, 50: 33-50.*

Clerico A, Del Ry S, Giannessi D. *Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods. Clin Chem 2000, 46: 1529-34.*

17.f. Catecolamine e Metanefrine

(per fisiologia, cfr cap 2e)

Determinazione

Sono stati proposti molti metodi per la determinazione delle **catecolamine** e dei loro metaboliti: fluorimetrici, spettrofotometrici, cromatografici (in fase liquida e gassosa), radioenzimatici ed immunometrici. Non vi sono dubbi circa il fatto che la tecnica maggiormente usata nei laboratori clinici, in quanto in grado di assicurare il miglior compromesso tra praticabilità ed efficienza dei risultati, è l'**HPLC** (*High Performance Liquid Chromatography*). In genere i metodi HPLC richiedono una **fase preliminare di estrazione/concentrazione** per ottenere la necessaria sensibilità: le tecniche più comuni di pre-trattamento sono l'estrazione con alluminio con o senza una fase a scambio ionico; le colonne più usate sono quelle a fase inversa, a coppia ionica e a scambio cationico; la rivelazione che si è dimostrata più efficace è quella elettrochimica (amperometrica o coulombmetrica), mentre l'unica tecnica di rivelazione proposta in alternativa, la fluorimetrica, richiede una fase preliminare di derivatizzazione.

I metodi fluorimetrici, radioenzimatici ed immunometrici hanno una diffusione oramai molto limitata e non sono consigliabili perché poco sensibili, poco specifici e poco sperimentati fino ad oggi.

Le **metanefrine** sono escrete nelle urine come amine libere e come coniugati glucuronidi e solfati. Il dosaggio richiede fasi iniziali di purificazione, basate su resine a scambio cationico. I metodi fotometrici e radioenzimatici hanno un significato storico, quelli immunometrici proposti recentemente sono poco accurati, quelli gascromatografici trovano impiego in ambito di ricerca, mentre maggiormente impiegati in ambito clinico sono quelli HPLC. La separazione si avvale di fase stazionaria in fase inversa, a coppia ionica ed a scambio cationico. Anche se possono essere usate la rivelazione in fluorescenza ed in assorbimento UV, la rivelazione più usata è quella elettrochimica che assicura analisi in pochi minuti.

Analoghe considerazioni si possono fare riguardo alla determinazione dell'**acido vanilmandelico** (VMA), anche se la rivelazione fluorimetrica trova maggiore applicazione. In molti laboratori lo stesso metodo consente di determinare insieme VMA, acido omovanillico e metanefrine.

Tabella 17f.1
Catecolamine

Metodologia adottata	HPLC, Spettrometria di massa, Immunoenzimatica, RIA
Campione richiesto	Plasma EDTA (tappo viola) Raccolta delle urine delle 24 ore acidificate a pH 4 con acido cloridrico; è possibile raccogliere un'aliquota di 10 mL dopo avere mescolato le urine ed avere misurato accuratamente il volume
Volume minimo	1 mL

Stabilità del campione	Il plasma deve essere conservato a 2-8°C fino al momento del congelamento a - 80°C (a questa temperatura conservazione a lungo termine). Le urine si conservano a lungo a - 80°C		
Intervallo di riferimento	Plasma		
	Epinefrina	Norepinefrina	
	Supino (30 min): 110-410 ng/L Seduto (15 min): 120-680 ng/L	Supino (30 min): < 50 ng/L Seduto (15 min): < 60 ng/L	
	Urine		
	Epinefrina	Norepinefrina	Dopamina
ARUP (chemiluminescenza)	< 20 µg/die	< 80 µg/die	< 400 µg/die
Massachusetts General Hospital	< 20 µg/die	< 80 µg/die	< 400 µg/die
Thomas L	< 27 µg/die	< 97 µg/die	< 500 µg/die
Tietz (HPLC)	< 20 µg/die	15-80 µg/die	65-400 µg/die

Bibliografia

- Gerlo EAM, Stevens C. Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in the diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chem* 1994, 40: 250-6.
- Graham PE, Smythe GA, Edwards GA, Lazarus L. Laboratory diagnosis of pheochromocytoma: which analyte should we measure? *Ann Clin Biochem* 1993, 30: 129-34.
- Rosano TG, Swift TA, Hayes LW. Advances in catecholamine and metabolite measurement in the diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chem* 1991, 37: 1854-67.
- Wu AHB, Gornet TG. Preparation of urine samples for liquid chromatographic determination of catecholamines: bonded-phase phenylboronic acid, cation exchange resin and alumina adsorbants compared. *Clin Chem* 1985, 31: 298-302.
- Murphy JF, Davies DH, Smith CJ. The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenaline and noradrenaline. *J Immunol Methods* 1992, 154: 89-98.
- Oishi S, Sanaki M, Ohno M, Sato T. Urinary normetanephrine and metanephrine measured by radioimmunoassay for the diagnosis of pheochromocytoma: utility of 24-hour and random 1-hour determinations. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 67: 614-8.
- Wassell J, Reed P, Kane J, Weinkove C. Freedom from drug interference in new immunoassays for urinary catecholamines and metanephrines. *Clin Chem* 1999, 45: 2216-23.

17.g. Androgeni

(per fisiologia, cfr cap 2g)

Determinazione

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

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

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

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

Queste conclusioni influenzeranno in futuro le modalità con cui il testosterone totale e il testosterone libero sono misurati dal laboratorista e sono interpretati dall'endocrinologo. È importante che si diffonda sin d'ora la consapevolezza dei limiti di questi dosaggi, che i risultati ottenuti con i diversi metodi siano interpretati con cautela e che il laboratorio impieghi i metodi più accurati, anche se più impegnativi nell'esecuzione. Nel caso i livelli di testosterone

totale non siano chiaramente dirimenti per la diagnosi di ipogonadismo (*zona grigia*), potranno essere eventualmente integrati con il calcolo della frazione libera, impiegando formule che utilizzano i dosaggi di testosterone totale, albumina e SHBG (come quella utilizzabile presso <http://www.issam.ch/freetesto.htm>).

Negli anni recenti è aumentato l'interesse nel **testosterone salivare**: poiché il testosterone salivare è separato completamente dalle proteine, la sua determinazione riflette la vera concentrazione dell'ormone attivo.

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

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

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

Tabella 17g.1
Testosterone

Metodologia adottata	Chemiluminescenza, Immuno-enzimatica, IRMA, RIA, HPLC/MS (preferibile nelle femmine e nei bambini)		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL		
Volume minimo	500 µL		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 giorni, a 2-8 °C per una settimana, a - 20 °C per 6 mesi		
Intervallo di riferimento	Età	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	10-11 anni	1-48 ng/dL	2-35 ng/dL
	12-13 anni	5-619 ng/dL	5-53 ng/dL
	14-15 anni	100-320 ng/dL	8-41 ng/dL
	16-19 anni	200-970 ng/dL	8-53 ng/dL
	adulto	400-1080 ng/dL	8-54 ng/dL
Massachusetts General Hospital		270-1070 ng/dL	6-86 ng/dL
Thomas L	Prepubere	1-4 nmol/L	< 2 nmol/L
	Adulto	12-30 nmol/L	0.2-1.3 nmol/L
Tietz	Prepubere	3-30 ng/dL	2-20 ng/dL
	Adulto	260-1000 ng/dL	15-70 ng/dL

Tabella 17g.2
DHEA-S

Metodologia adottata	Immuno-enzimatica, RIA		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL		
Volume minimo	500 µL		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 2 giorni, a 2-8 °C per 48 ore, a - 20 °C per 6 mesi		
Intervallo di riferimento	Età	Maschio	Femmina
ARUP (Chemiluminescenza)	Neonato	108-607 µg/dL	
	4-30 giorni	32-431 µg/dL	
	1-11 mesi	3-124 µg/dL	
	1-4 anni	< 19 µg/dL	
	5-9 anni	4-116 µg/dL	6-93 µg/dL
	10-14 anni	22-232 µg/dL	22-255 µg/dL
	15-19 anni	88-483 µg/dL	63-373 µg/dL
	20-29 anni	280-640 µg/dL	65-380 µg/dL
	30-49 anni	120-520 µg/dL	35-270 µg/dL
	50-69 anni	70-310 µg/dL	26-200 µg/dL
> 70 anni	28-175 µg/dL	10-90 µg/dL	
Massachusetts General Hospital	Adulto	10-619 µg/dL	-
	Fertile	-	12-535 µg/dL
	Menopausa	-	30-260 µg/dL
Thomas L	Fertile	-	< 3000 µg/L
	Menopausa	-	< 1200 µg/L
Tietz	Neonato	12-254 µg/dL	10-248 µg/dL
	1 mese-5 anni	1-41 µg/dL	5-55 µg/dL
	6-9 anni	2.5-145 µg/dL	2.5-140 µg/dL
	10-11 anni	15-115 µg/dL	15-260 µg/dL
	12-17 anni	20-555 µg/dL	20-535 µg/dL
	18-30 anni	125-619 µg/dL	45-380 µg/dL
	31-50 anni	5-532 µg/dL	12-379 µg/dL
	>50 anni	20-413 µg/dL	30-260 µg/dL

Bibliografia

- Diver MJ. *Clinical Science Reviews Committee of the Association for Clinical Biochemistry. Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men. Ann Clin Biochem* 2006, 43: 3-12.
- Christ-Crain M, Meier C, Huber P, Zimmerli L, Trummler M, Muller B. *Comparison of different methods for the measurement of serum testosterone in the aging male. Swiss Med Wkly* 2004, 134: 193-7.
- Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. *Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. Clin Chem* 2003, 49: 1381-95.
- Herold DA, Fitzgerald RL. *Immunoassays for testosterone in women: better than a guess? Clin Chem* 2003, 49: 1250-1.

- Dhar TK, Muller C, Schoneshofer M. Determination of dehydroepiandrosterone sulfate in plasma by a one-step enzyme immunoassay with a microtitre plate. Clin Chem 1985, 31: 1876-9.*
- Moncayo R, Schwarz S. Concentrations of dehydroepiandrosterone sulfate in the plasma of normal and abnormal women. Clin Chem 1983, 29: 1992-3.*
- Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of the IMMULITE 2000 androstenedione assay. Clin Chim Acta 2007, 383: 168-71.*
- Choi MH, Kim, JN, Chung BC. Rapid HPLC-electrospray tandem mass spectrometric assay for urinary testosterone and dihydrotestosterone glucuronides from patients with benign prostate hyperplasia. Clin Chem 2003, 49: 322-5.*
- Salerno R, Moneti G, Forti G, Magini A, Natali A, Saltutti C, Di Cello V, et al. Simultaneous determination of testosterone, dihydrotestosterone and 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol by isotope dilution mass spectrometry in plasma and prostatic tissue of patients affected by benign prostatic hyperplasia. J Androl 1988, 9: 234-40.*
- Tang PW, Crone DL. A new method for hydrolyzing sulfate and glucuronyl conjugates of steroids. Anal Biochem 1989, 182: 289-94.*
- Choi MH, Kim KR, Chung BC. Simultaneous determination of urinary androgen glucuronides by high temperature gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. Steroids 2000, 65: 54-9.*

17.h. 17-Idrossi-Progesterone e 17-OH-Pregnenolone

(per fisiologia, cfr cap 2f)

Determinazione

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

Per il **17-OH-pregnenolone** la tecnica più accreditata è quella in HPLC-MS.

Tabella 17h.1
17-OH-progesterone

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

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

Bibliografia

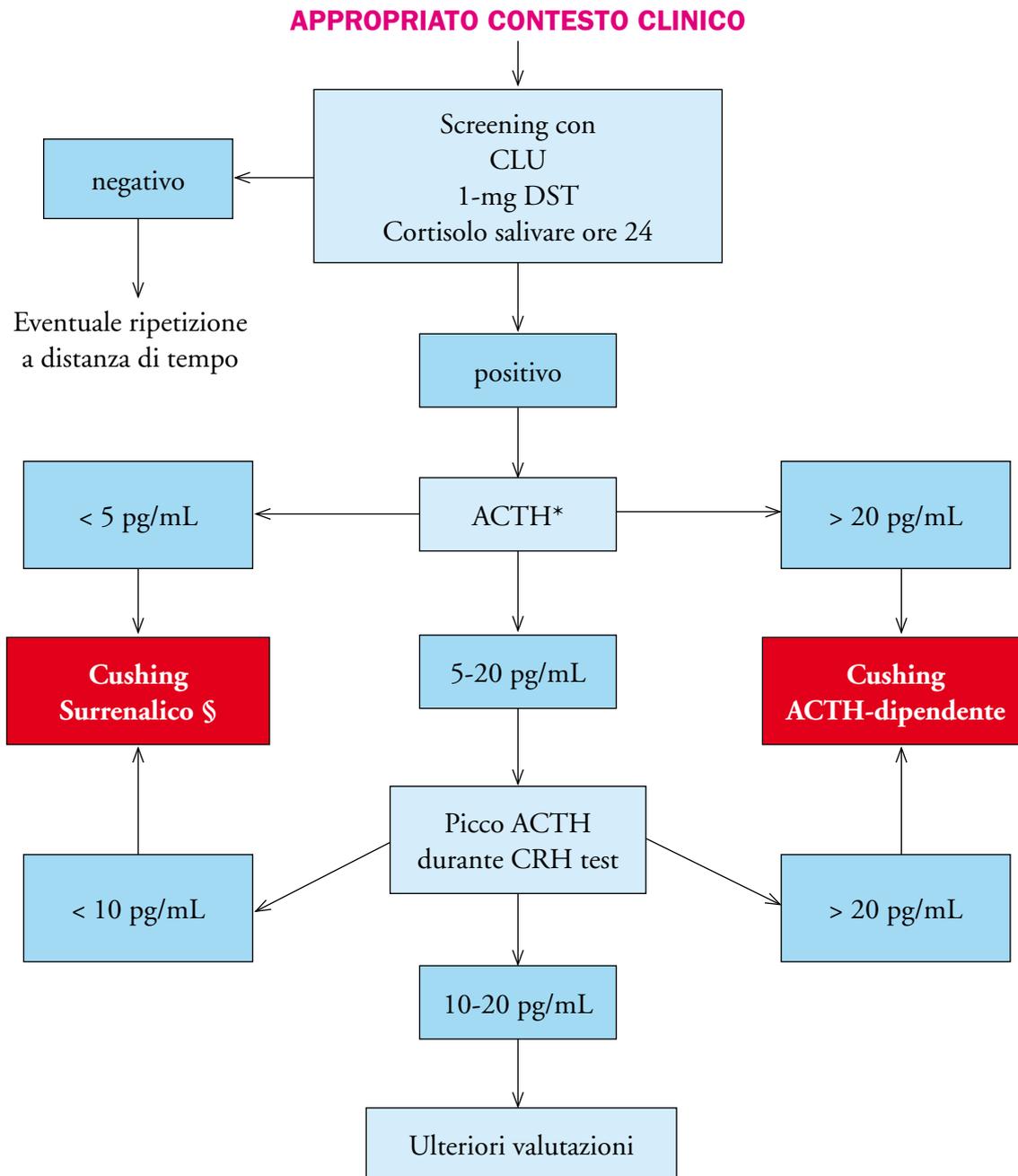
- Wallace MA. Analytical support for the detection and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Ann Clin Biochem* 1995 32: 9-27.
- Shindo N, Yamauchi N, Murayama K, Fairbrother A, Korlik S. Identification of 17-hydroxyprogesterone and other steroid hormones in saliva from a normal child and patients with congenital adrenal hyperplasia by plasmaspray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 1990, 4: 171-4.
- Wudy S, Hartmann M, Svoboda M. Determination of 17-hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchtop liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Horm Res* 2000, 53: 68-71.
- Lai CC, Tsai CH, Wu JY, Lin WD, Lee CC. Rapid screening assay of congenital adrenal hyperplasia by measuring 17-hydroxyprogesterone with high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. *J Clin Lab Anal* 2002, 16: 20-5.
- Kabra PM. Clinical analysis of individual steroids by column liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988, 29: 155-76.
- Makela SK, Ellis E. Nonspecificity of a direct 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay kit when used with samples from neonates. *Clin Chem* 1988, 34: 2070-5.
- Fiet J, Giton F, Boudi A, Boudou P, Soliman H, Villette JM, et al. Plasma 17-OH pregnenolone: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a new tracer 17-OH pregnenolone-3-oxyacetyl-biotine with a radioimmunoassay using 125I 17-OH pregnenolone-3-hemisuccinate-histamine. *Steroids* 2001, 66: 81-6.

18. *Flow-charts* diagnostiche

Giuseppe Reimondo & Massimo Terzolo

18.a. Flow-chart per sindrome di Cushing

(cfr cap 4)



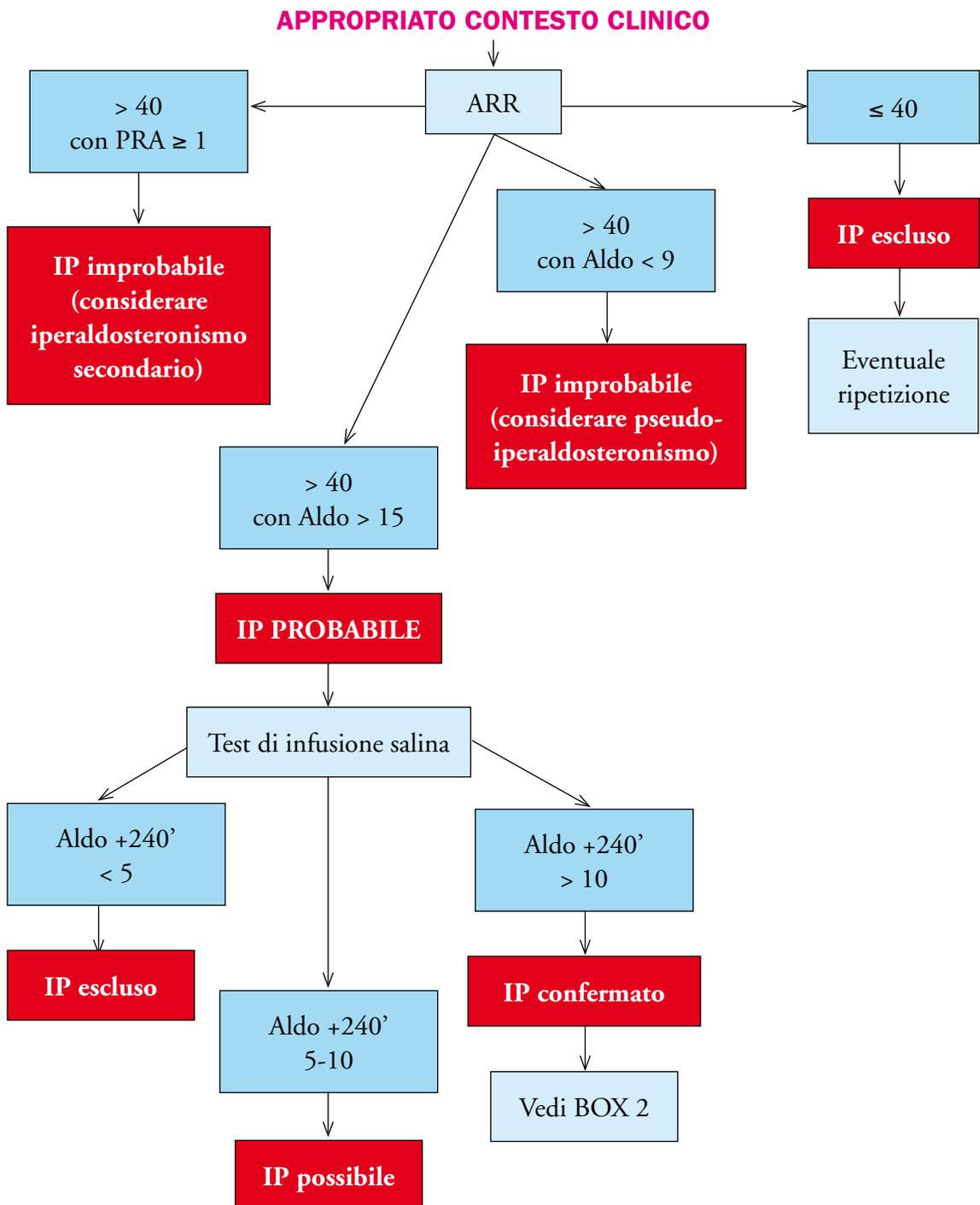
§ Una volta giunti alla diagnosi di Cushing surrenalico va effettuata una TC addome per differenziare le diverse forme

* I livelli suggeriti sono indicativi e dipendono dalla sensibilità funzionale e precisione del metodo di dosaggio impiegato

DST = *dexamethasone suppression test*

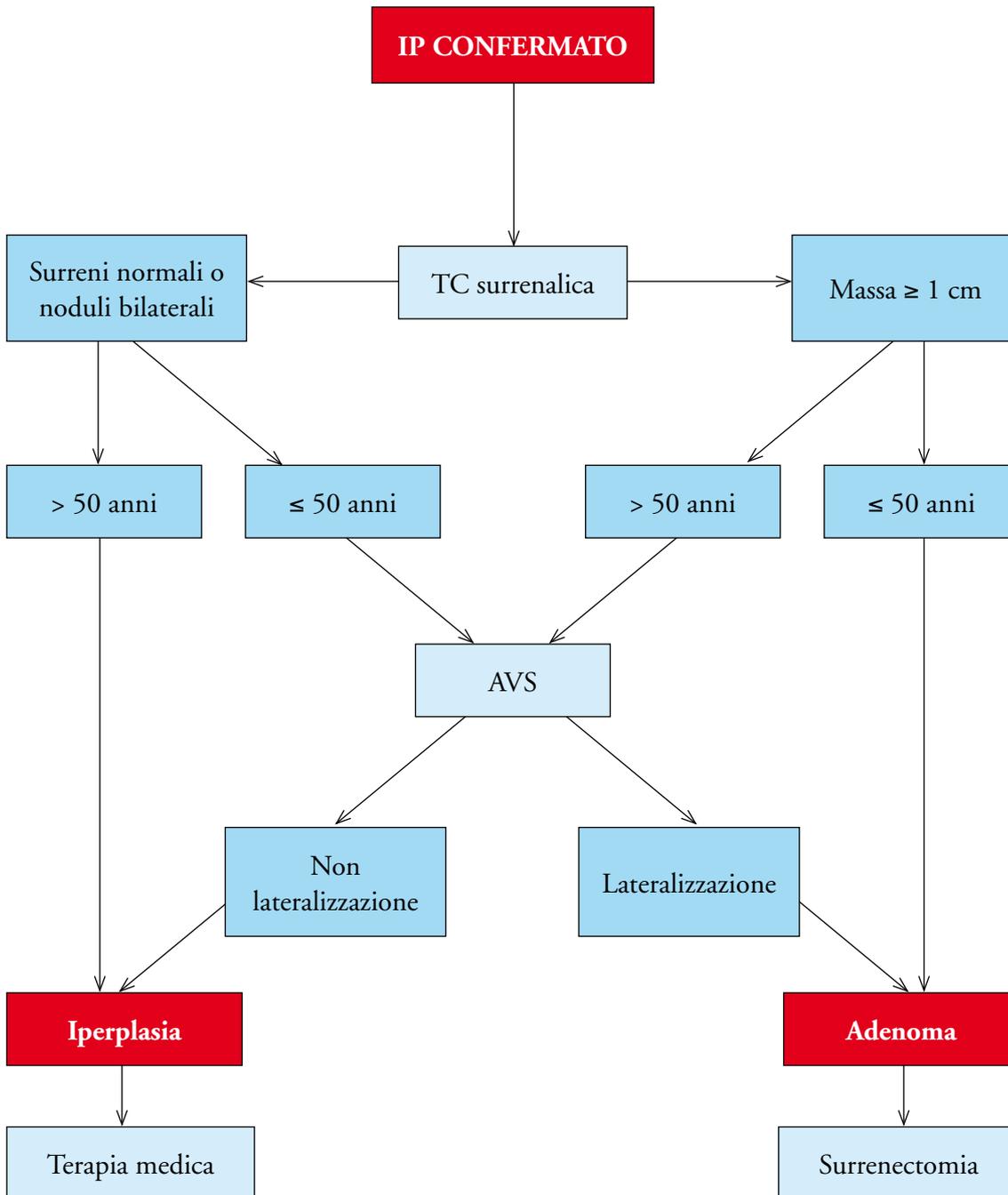
18.b. Flow-chart per iperaldosteronismo primario

(cfr cap 5)



ARR (*Aldosterone to Renin Ratio*) calcolata con PRA espressa in ng/mL/h e aldosterone in ng/dL

I livelli suggeriti sono indicativi e vanno confermati localmente.

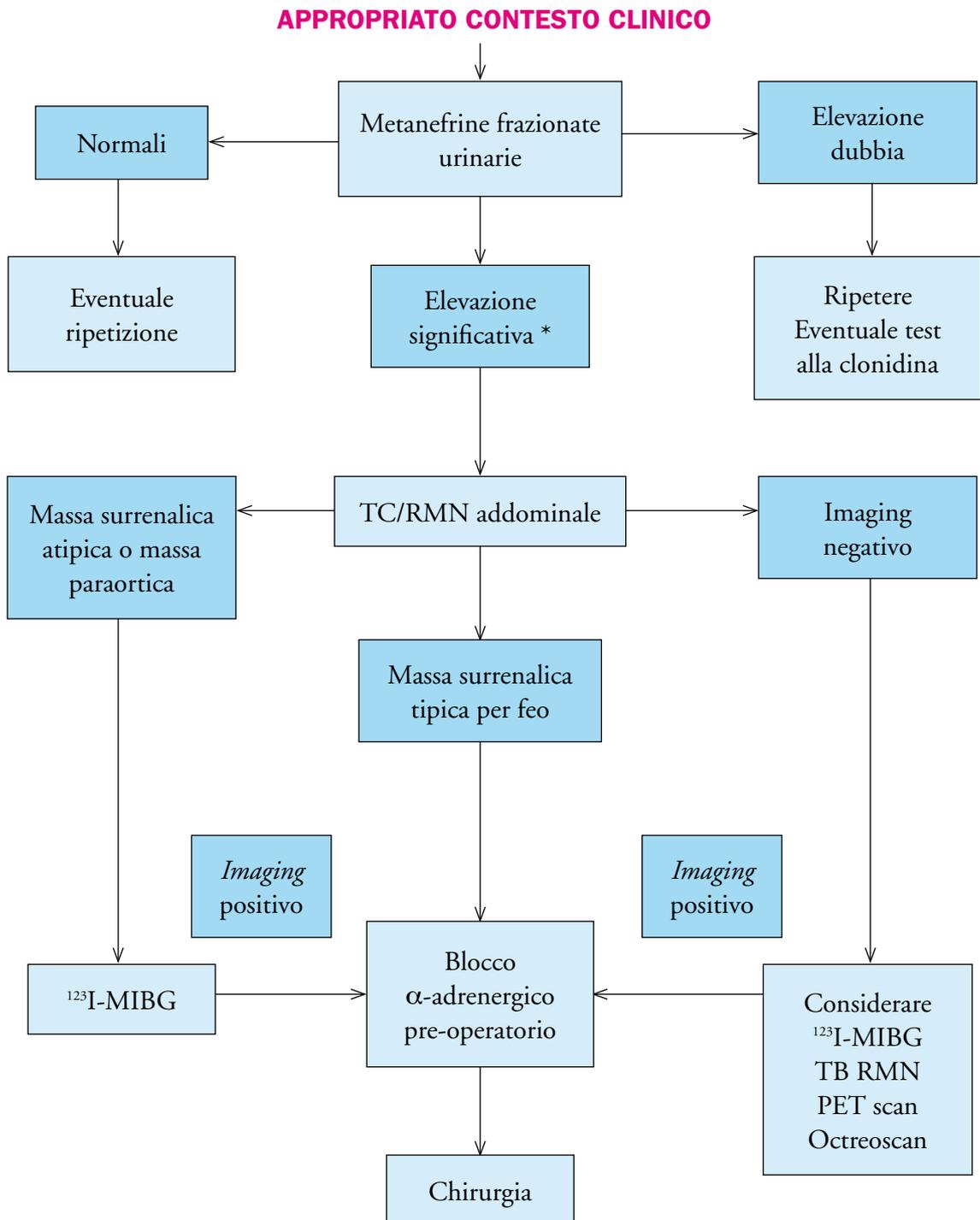


Oltre al criterio dell'età (limite indicativo), può essere utile valutare i criteri che rendono più probabile un adenoma aldosterone secernente: ipopotassiemia, ipertensione severa, marcata elevazione dell'aldosterone.

AVS = *adrenal vein sampling*

18.c. Flow-chart per feocromocitoma

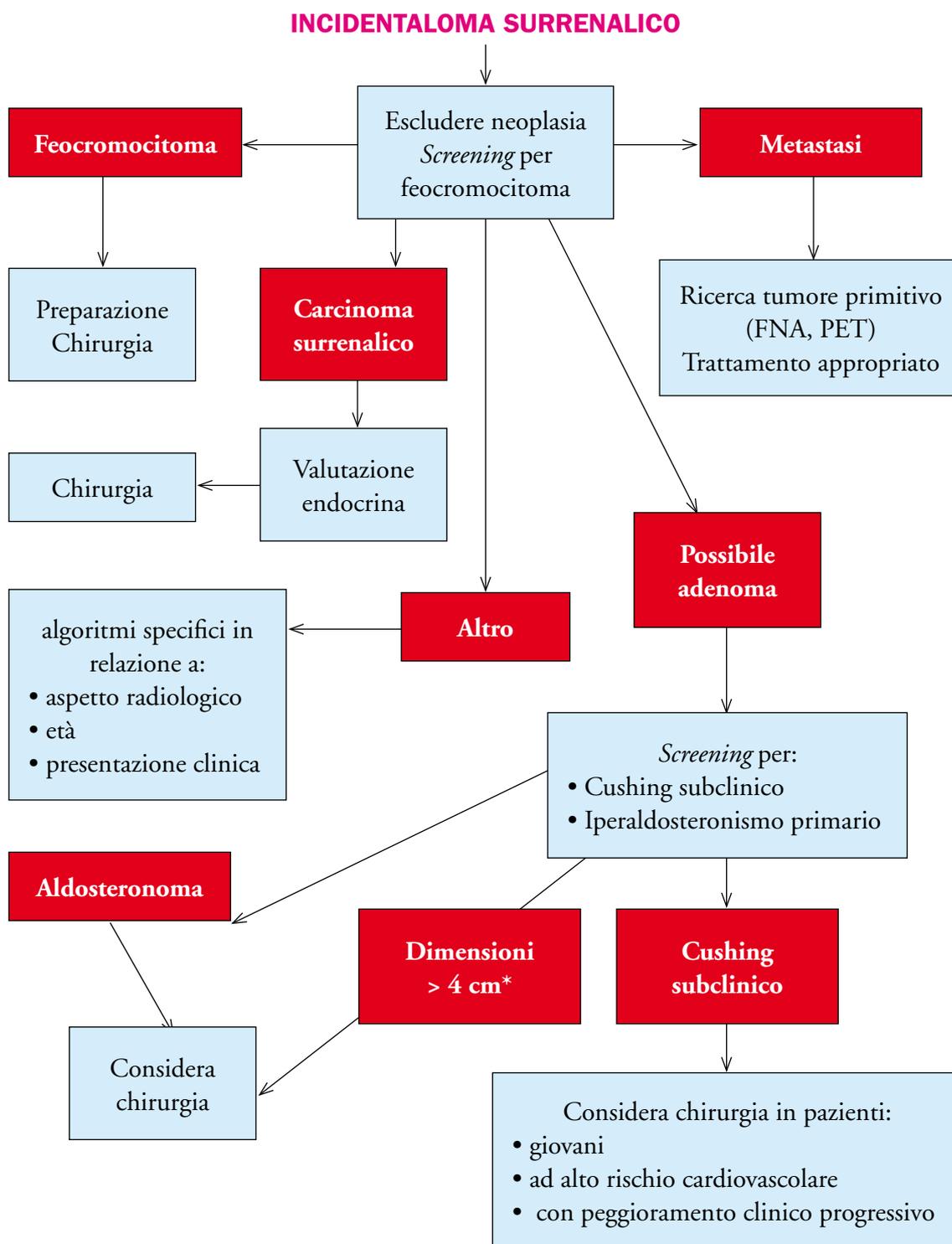
(cfr cap 7)



* Non esistono *cut-off* precisi (circa 2-4 volte)

18.d. Flow-chart per incidentaloma

(cfr cap 8)



* indipendentemente dalla secrezione

19. 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

Tabella 19.1.
ARR (rapporto renina-aldosterone)

Cos'è	Un utile indice di screening per gli iperaldosteronismi primari (<i>cf. cap 5</i>).
A cosa serve	Amplifica il comportamento divergente dei due ormoni.
Parametri necessari per il calcolo	Renina (espressa in ng/mL/h) Aldosterone (espresso in ng/dL)
Come calcolarlo	Aldosterone / Renina
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi il valore di aldosterone nella casella A1 2. Scrivi il valore di renina nella casella B1 3. scrivi in C1: =A1/B1 e, dopo aver schiacciato il tasto enter, il risultato comparirà automaticamente Esempio: aldosterone 15 ng/dL, PRA 0.2 ng/mL/h, ARR = 75
Parametri di riferimento	Normale: < 30. Suggestivo per iperaldosteronismo primario: > 50

Tabella 19.2.
BMI (Body Mass Index)

Cos'è	L'indice di massa corporea sintetizza in un solo numero peso e altezza.
A cosa serve	Migliore correlazione (superiore al peso) con morbilità e mortalità.
Parametri necessari per il calcolo	Peso (espresso in kg) Altezza (espressa in metri: esempio 1.80)
Come calcolarlo	$\text{Peso}/(\text{altezza} \times \text{altezza})$.
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi il peso nella casella A1 2. Scrivi l'altezza nella casella B1 3. scrivi in C1: =A1/(B1^2) e, dopo aver schiacciato il tasto enter, il risultato comparirà automaticamente 4. (se l'altezza è espressa in cm, scrivi in C1 =A1/((B1/100)^2)) Esempio: kg 77, m 1.81, BMI = 23.5 kg/m²
Parametri di riferimento	Normale: 18.5 ÷ 25. Sovrappeso: 25 ÷ 30 Obeso: 30 ÷ 35 Gravemente obeso: > 35 Sottopeso: 17 ÷ 18.5 Gravemente sottopeso: < 17

Tabella 19.3.
Formula di Vermeulen

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

Tabella 19.4.
Superficie corporea (formula di Dubois)

Cos'è	Sintetizza in un solo numero peso e altezza.
A cosa serve	È utilizzata per calcolare la dose da somministrare di alcuni farmaci.
Parametri necessari per il calcolo	Peso (espresso in kg) Altezza (espressa in cm)
Come 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 Esempio: kg 77, m 1.81, superficie corporea = 1.97 m²

20. Farmaci e modalità di approvvigionamento

Tabella 20.1. ACTH (Synachten)

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

Tabella 20.2. CRH umano (quello ovino non è attualmente più importato in Italia)

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	FERRING S.p.A., Wien, Austria
Composizione	Principio attivo: Corticorelin-trifluoracetato 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 non in commercio in Italia

Tabella 20.3. Fludrocortisone (Florinef)

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	E. R. Squibb & Sons Limited, Uxbridge, England.
Composizione	Le compresse contengono 0.1 mg di fludrocortisone acetato.
Forma farmaceutica	Compresse
Natura e contenuto della confezione	Le compresse sono dispensate in flaconi contenenti 56 compresse.
Speciali precauzioni per la conservazione	Nessuna
Periodo di validità	Indicato sulla confezione.
Modalità di richiesta	Moduli per farmaci non in commercio in Italia. Copia del modulo è disponibile on-line per i soci AME all'indirizzo http://www.associazionemediciendocrinologi.it/pdf/sezionenormative-gislativa_pdf_134.pdf

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

Roberto Attanasio, Romolo Dorizzi

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

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

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

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

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

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

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

Nella tabella 21.1 sono indicati i fattori di conversione di alcuni dei principali esami.

Tabella 21.1.

Analita	Unità convenzionale	Fattore di conversione*	Unità Si
ACTH	pg/mL = ng/L	0.22	pM/L
adrenalina	pg/mL = ng/L	5.458	pM/L
adrenalina urinaria	µg/24h	5.458	nM/24h
aldosterone	ng/dL	27.74	pM/L
aldosterone urinario	µg/24h	2.774	nM/d
catecolamine	µg/24h	5.911	nM/24h
CLU	µg/24h	2.759	nM/24h
cortisolo	ng/mL = µg/L	2.759	nM/L
	µg/dL	27.59	nM/L
delta-4-androstenedione	ng/mL = µg/L	3.49	nM/L
DHEA	ng/mL = µg/L	0.00347	pM/L
DHEA-S	ng/mL = µg/L	0.002714	nM/L
11DOC	µg/dL	28.86	nM/L
di-idro-testosterone	pg/mL = ng/L	0.0034	pM/L
dopamina	pg/mL = ng/L	6.528	pM/L
17-idrossi-progesterone	ng/mL = µg/L	3.026	nM/L
metanefrine	mg/24h	5.458	µM/24h
noradrenalina	pg/mL = ng/L	0.005911	nM/L
noradrenalina urinaria	µg/24h	5.911	nM/24h
SHBG	µg/mL = mg/L	8.696	nmol/L
testosterone	ng/dL	0.0347	nmol/L
	ng/mL = µg/L	3.47	nmol/L
vanilmandelico	mg/24h	5.046	µM/24h

* 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).