

## BIOCHIMICA CLINICA DOLCI

La **CHIMICA** è la scienza che studia la composizione, le proprietà e le interazioni tra gli elementi e i composti. È considerata la "scienza centrale" poiché è interconnessa con tutte le altre discipline scientifiche, come la biologia, la fisica e la medicina.

La **BIOCHIMICA** è il ramo della chimica che si occupa delle sostanze chimiche e delle reazioni che avvengono negli organismi viventi.

La **BIOCHIMICA CLINICA** studia le variazioni dei parametri biochimici in relazione a malattie o condizioni patologiche particolari, fornendo importanti informazioni diagnostiche.

### BIOCHIMICA DELLE PROTEINE

#### Amminoacidi

Gli amminoacidi sono i mattoni fondamentali delle proteine. Un amminoacido ha una struttura centrale con un atomo di carbonio legato covalentemente a quattro gruppi:

- 1) Un atomo di idrogeno (H).
- 2) Un gruppo amminico (NH<sub>2</sub>).
- 3) Un gruppo carbossilico (COOH).
- 4) Un gruppo laterale R, che varia tra i diversi amminoacidi, determinandone le proprietà chimiche.

Esistono 20 amminoacidi protidogenici, di cui 9 sono essenziali, cioè non possono essere sintetizzati dall'organismo e devono essere assunti tramite la dieta.

#### Legame peptidico

Due amminoacidi possono unirsi attraverso una reazione di condensazione, che elimina una molecola d'acqua, formando un legame peptidico tra il gruppo amminico di un amminoacido e il gruppo carbossilico dell'altro. L'unione di più amminoacidi forma catene più lunghe:

- **Dipeptidi:** due amminoacidi.
- **Tripeptidi:** tre amminoacidi (esempio: glutazione, composto da glutamina, cisteina e glicina).
- **Oligopeptidi:** catene con meno di 10 amminoacidi.
- **Poliipeptidi:** catene da 10 a 50 amminoacidi.

La funzione di un peptide o di una proteina non dipende necessariamente dalle sue dimensioni. Il **glutazione**, per esempio, è un tripeptide che svolge un'importante funzione antiossidante, passando dalla forma ridotta a quella ossidata, proteggendo le cellule dai radicali liberi, specialmente nei mitocondri.

#### Esempi di peptidi e proteine

L'**OSSITOCINA** è un ormone peptidico composto da 9 amminoacidi. Prodotto dall'ipotalamo, stimola la contrazione della muscolatura liscia dell'utero durante il parto e ha applicazioni terapeutiche per indurre il parto.

Le **IMMUNOGLOBULINE** (anticorpi) sono proteine complesse formate da due catene leggere (214 aa) e due catene pesanti (450 aa), per un totale di circa 1328 amminoacidi. Esistono cinque classi principali di immunoglobuline:

- **IgM:** pentameri (5 monomeri) con un peso totale di 1328 × 5 amminoacidi.
- **IgA:** dimeri (2 monomeri). Queste proteine presentano una porzione variabile che si adatta a specifiche funzioni, come il riconoscimento di antigeni.

#### SOSTANZE ANFOTERE

Le proteine sono sostanze **anfotere**, il che significa che possono comportarsi sia come acidi che come basi, modificando la loro carica netta in base al **pH** della soluzione in cui si trovano:

- Se il pH è **superiore** al loro **punto isoelettrico** (il pH al quale la proteina ha carica netta pari a zero), cedono protoni diventando **anioni** (carica negativa).
- Se il pH è **inferiore** al punto isoelettrico, acquisiscono protoni diventando **cationi** (carica positiva).

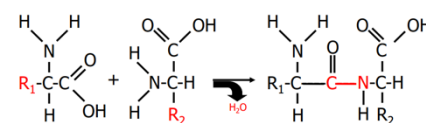
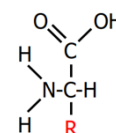
Questo comportamento è cruciale per molte funzioni cellulari e per la stabilità delle proteine nel loro ambiente biologico.

\*pH = logaritmo decimale della concentrazione idrogenionica (H<sup>+</sup>)

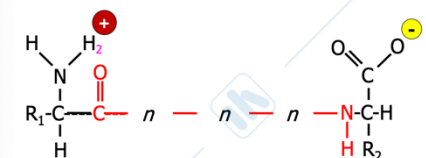
#### GENOMA UMANO

Il genoma umano contiene più di 20.000 geni che codificano per proteine. Tuttavia, il numero di proteine prodotte è notevolmente superiore (almeno 10 volte maggiore), grazie a diversi meccanismi che amplificano la diversità proteica:

- **Splicing alternativo del mRNA:** un singolo gene può produrre varianti proteiche (isoforme) leggermente diverse, grazie a una diversa combinazione degli esoni.
- **Ricombinazione somatica:** processo tipico del sistema immunitario che genera una grande varietà di anticorpi.



amminoacido amminoacido dipeptide  
legame peptidico

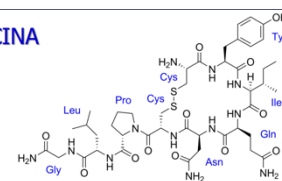


pH del solvente  
< PI della proteina

pH del solvente  
> PI della proteina

PI: Punto Isoelettrico  
Valore di pH al quale una proteina ha una carica netta di 0

#### OSSITOCINA



- **Riarrangiamento genico:** permette la creazione di nuove combinazioni genetiche, aumentando la diversità proteica.

**Modificazioni post-traduzionali:** Dopo che la proteina è stata sintetizzata attraverso i processi di **trascrizione** (dal DNA all'mRNA) e **traduzione** (dall'mRNA alla catena polipeptidica), essa può subire modificazioni post-traduzionali, ossia cambiamenti chimici che ne influenzano la struttura e la funzione all'interno della cellula.

- alterazioni chimiche che avvengono dopo la sintesi proteica e che possono modificare la funzione della proteina.

### Modificazioni Post-Traduzionali e Sintesi delle Proteine

#### GLICAZIONE

La glicazione è una modificazione post-traduzionale che comporta l'aggiunta di residui glucidici a una proteina in punti specifici della sua struttura, in corrispondenza di determinati amminoacidi. Questa modifica è cruciale per la corretta funzione biologica della proteina. Se la glicazione non avviene correttamente, possono verificarsi alterazioni nei processi biochimici che portano a patologie.

La maggioranza delle plasmaproteine sono glicoconjugati in cui una o più catene di carboidrati o glicani sono legati covalentemente da legami glicosidici a catene laterali di amminoacidi presenti nel polipeptide

- Esistono N-glicani in cui il legame avviene tramite l'atomo di azoto di una asparagina.
- Esistono O-glicani in cui il legame avviene di solito con un atomo di ossigeno di una serina o treonina

La presenza di una ben definita catena di carboidrati è essenziale per le funzioni biologiche della proteina stessa.

#### TRANSFERRINA

- La **transferrina** è una proteina che trasporta il ferro nel sangue, rendendolo solubile.
- È costituita da 679 amminoacidi e può legare fino a 7 residui di acido sialico. Questi residui glucidici sono legati solo a due specifici amminoacidi della transferrina.
- L'acido sialico, situato alla fine della catena glucidica, ha una carica negativa. Esiste anche una forma priva di acido sialico chiamata **a-sialotransferrina**.
- La transferrina presenta fino a 8 isoforme diverse, ognuna con una quantità variabile di residui di acido sialico.

#### Elettroforesi delle Sieroproteine

L'**elettroforesi** è una tecnica di laboratorio che separa le proteine in base alla loro carica elettrica e al loro rapporto massa/carica. Le proteine, essendo sostanze anfotere, possono acquisire una carica positiva o negativa a seconda del pH della soluzione tampone in cui si trovano. Questo metodo permette di analizzare diverse proteine sieriche, offrendo dati utili per la diagnosi clinica.

#### Funzionamento

In un ambiente con pH controllato, le proteine migrano attraverso un campo elettrico. Quelle con una carica maggiore migrano più velocemente. Le immunoglobuline, a causa delle loro dimensioni e della loro carica, retro-migrano rispetto al punto di deposito. L'elettroforesi può rivelare anomalie come la **gammopatia monoclonale**, un disordine caratterizzato dalla presenza di cloni di linfociti che producono una quantità anomala di anticorpi, come nei casi di mieloma multiplo.

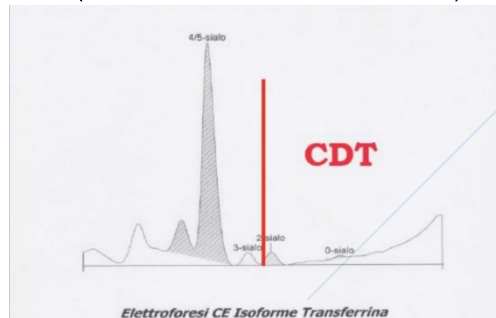
#### Elettroforesi della Transferrina

Un'analisi più sofisticata dell'elettroforesi può separare le diverse isoforme della transferrina. Ad esempio, l'**analisi CDT** (transferrina carboidrato carente) permette di individuare isoforme con meno residui di acido sialico, utile per la diagnosi di condizioni come alcolismo, galattosemia e altre patologie epatiche.

#### Modificazioni Post-Traduzionali: Transferrina

Le modificazioni post-traduzionali della transferrina aggiungono da 0 a 7 residui di acido sialico alla molecola. Questi residui influenzano la carica negativa della proteina, con effetti clinici rilevabili attraverso tecniche come l'elettroforesi.

#### CDT (Transferrina Carboidrato-Carente)



Il test **CDT** è utilizzato per monitorare l'abuso cronico di alcol. Una CDT elevata indica una maggiore presenza di isoforme a basso contenuto di carboidrati, come la a-sialotransferrina, il che può essere indicativo di condizioni patologiche, tra cui epatopatie e alcolismo.

La CDT è la somma delle isoforme a 1, 2 e 3 acido sialico.

#### Matrici Biologiche per l'Analisi Proteica

Le proteine possono essere analizzate in diverse **matrici biologiche**:

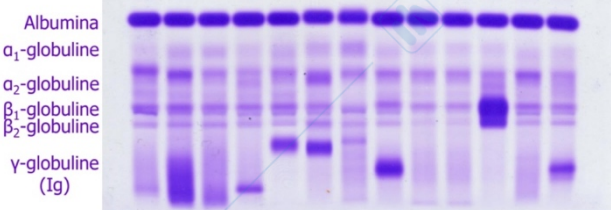
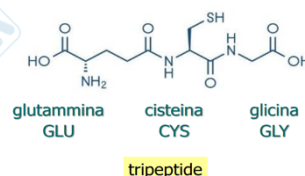
- **Proteine plasmatiche:** presenti nel plasma sanguigno.
- **Proteine urinarie:** presenti nelle urine.
- **Proteine liquorali:** nel liquido cerebrospinale. Il passaggio delle proteine dal sangue al liquor segue le leggi della diffusione ed è funzione

del peso molecolare

- **Proteine fecali:** derivanti da processi intestinali.

L'analisi proteica in queste matrici fornisce informazioni diagnostiche utili per la comprensione di molte patologie.

GLUTATIONE



### Isoelettrofocalizzazione della Transferrina

La **isoelettrofocalizzazione** è una tecnica che permette di identificare tutte le 8 isoforme della transferrina. Questa tecnica è particolarmente utile in contesti clinici come la neurochirurgia. In caso di fuoriuscita di liquidi post-operatoria, è possibile distinguere tra muco, sudore o liquido cerebrospinale analizzando la presenza di a-sialotransferrina, un indicatore del liquido cefalorachidiano.

### Proprietà Immunogeniche delle Proteine

Le proteine possiedono una **capacità immunogenica**, ossia la capacità di stimolare il sistema immunitario di un organismo estraneo. Quando una proteina viene iniettata in un altro organismo, quest'ultimo produce anticorpi per neutralizzarla. Questo principio viene sfruttato nella produzione di saggi di laboratorio per rilevare **marcatori tumorali**.

L'**EPITOPO** è la porzione di una proteina che viene riconosciuta dal sistema immunitario. È una sequenza di 3-5 amminoacidi che stimola la produzione di anticorpi specifici.

### METODI IMMUNOMETRICI - Come nasce un saggio di laboratorio immunoassistito?

I saggi immunometrici, anche noti come saggi immunoassorbenti, sono tecniche che sfruttano la specificità degli anticorpi per rilevare e quantificare molecole come proteine, ormoni e antigeni in un campione biologico. La loro caratteristica principale è l'uso di **due anticorpi** che riconoscono epitopi distinti della stessa proteina.

- **Anticorpo di cattura (fase solida):** viene immobilizzato su una superficie solida (es. micropiastre o sfere magnetiche) e ha il compito di legarsi alla proteina bersaglio. Questa proteina può essere presente in concentrazioni molto basse nel campione; quindi, l'anticorpo agisce come una sorta di "trappola" che isola la proteina di interesse dal resto del campione biologico.
- **Anticorpo di rivelazione (fase mobile):** è un secondo anticorpo che riconosce un epitopo differente della stessa proteina. Questo anticorpo è legato a un marcatore rilevabile (ad esempio, una sostanza luminescente, un enzima che genera un segnale colorimetrico, fluorescente o radioattivo). La quantità di luce, fluorescenza o radioattività emessa è proporzionale alla quantità di proteina catturata e legata. Questo metodo forma un "sandwich" di anticorpi con la proteina target al centro, e il segnale emesso dall'anticorpo di rivelazione permette la **quantificazione** della proteina.

L'importanza dei saggi immunometrici risiede nella loro **alta specificità e sensibilità**. Sono ampiamente utilizzati per rilevare biomarcatori clinici in concentrazioni molto basse, impossibili da misurare con altre tecniche chimiche o biochimiche.

### DEFINIZIONE DI ANALISI CHIMICO-CLINICA

Un'**analisi chimico-clinica** è un'indagine eseguita su materiali biologici (es. sangue, urine, tessuti) per ottenere informazioni utili alla diagnosi, monitoraggio o prognosi di una malattia. Questi test sono fondamentali per la medicina moderna, poiché permettono di raccogliere dati oggettivi per supportare le diagnosi cliniche.

- **Sintomo:** è un fenomeno soggettivo riferito dal paziente, come dolore o malessere, che indica un'alterazione o uno stato patologico.
- **Segno:** un dato oggettivo che può essere misurato direttamente, come la pressione sanguigna, la febbre o la presenza di un gonfiore. Può essere rilevato dal medico o da strumenti tecnologici.
- **Segni biochimici:** sono parametri misurabili tramite analisi di laboratorio, ottenuti dai campioni biologici. Possono includere il dosaggio di proteine, enzimi, elettroliti, ormoni, marker tumorali e così via. Questi segni forniscono informazioni critiche sullo stato di salute del paziente e possono essere misurati con tecniche avanzate come spettrometria di massa, elettroforesi, saggi immunoenzimatici, e cromatografia.

### PROCESSO DI UN'ANALISI DI LABORATORIO

Il processo di un'analisi chimico-clinica si articola in diverse fasi, ciascuna delle quali è critica per l'accuratezza e l'affidabilità del risultato finale. Il flusso di lavoro segue una logica che inizia con la richiesta clinica e termina con il risultato fornito al medico:

1. **Fase preanalitica:** è la fase iniziale e comprende tutte le operazioni che precedono l'analisi vera e propria. Inizia con la formulazione della domanda clinica, la preparazione del paziente e il prelievo del campione. È la fase più vulnerabile, dove si verificano la maggior parte degli errori (circa il 68,7% degli errori totali di laboratorio).
2. **Fase analitica:** è il momento dell'analisi vera e propria, in cui viene eseguito il test di laboratorio per ottenere il risultato. Questo comprende l'uso di saggi, strumentazione e tecniche diagnostiche descritte in precedenza.
3. **Fase postanalitica:** comprende l'interpretazione del risultato da parte del medico, la comunicazione dell'esito e l'eventuale azione terapeutica.

### LA FASE PREANALITICA

La fase preanalitica rappresenta una delle aree critiche in cui è possibile commettere errori. Sebbene l'uso di automazioni e miglioramenti tecnologici abbia ridotto la percentuale di errori nel corso degli anni, rimane la fase più suscettibile.

#### 1 APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA:

La richiesta di un esame deve essere giustificata dalla condizione clinica del paziente. Eseguire test inutili può portare a sprechi di risorse, mentre la mancata esecuzione di test appropriati può ritardare una diagnosi critica.

Ad esempio, nel *National Cholesterol Educational Program* si raccomanda di eseguire un esame del profilo lipidico (colesterolo totale, HDL, LDL) in pazienti sopra i 20 anni a digiuno, per evitare risultati falsamente elevati di trigliceridi.

## 2 PREPARAZIONE DEL PAZIENTE:

Molti test richiedono che il paziente si presenti in condizioni precise. Il digiuno, ad esempio, è richiesto per evitare interferenze alimentari sui livelli di glucosio e lipidi. Le alterazioni circadiane, il jet-lag, e l'esercizio fisico possono anch'essi influenzare vari parametri biochimici come il cortisolo, enzimi epatici e creatinina.

- **Dieta e idratazione:** differenza percentuale della concentrazione di differenti analiti 2 ore dopo un pasto standard
- **Ritmo circadiano:** la concentrazione di molti ormoni e metaboliti varia con l'età, stagionalmente durante la giornata e in differenti epoche vitali. Ad esempio, il livello di cortisolo è più alto al risveglio (acrofase) e diminuisce nel corso della giornata.
- **Esercizio fisico:** può causare ematuria e proteinuria microscopica o macroscopica nelle urine, e un'intensa attività fisica può aumentare temporaneamente i livelli di alcuni enzimi, come la creatinofosfochinasi (CPK), alterando i risultati di laboratorio.
- **Altitudine:** la permanenza a elevate altitudini aumenta i livelli di emoglobina e influisce sui criteri diagnostici per l'anemia. È quindi importante considerare dove vive il paziente o se ha recentemente soggiornato ad altitudini elevate.
- **Jet lag:** dopo la permanenza in una zona geografica con un fuso orario molto differente (inversione ritmo sonno-veglia) sono necessari almeno 5 giorni per riprendere il ritmo fisiologico.
- **Condizioni fisiologiche:** ad esempio, la gravidanza aumenta i livelli di alcuni marcatori (AFP, hCG), mentre il ciclo mestruale può alterare i livelli di CA125. L'attività sessuale può temporaneamente innalzare i livelli di PSA.
- **Fattori iatrogeni:** le terapie mediche, come la chemioterapia, possono indurre la lisi delle cellule tumorali, liberando nel sangue marcatori tumorali che potrebbero fuorviare l'interpretazione dei risultati.

## MONITORAGGIO DELLE TERAPIE FARMACOLOGICHE

Il monitoraggio terapeutico dei farmaci richiede il prelievo di campioni in momenti specifici, per valutare quando il farmaco raggiunge lo **steady state** (stato di equilibrio tra assorbimento ed eliminazione). Questo momento si calcola moltiplicando il tempo di emivita del farmaco per 5.

- **Esempio pratico:** Se un farmaco ha un'emivita di 8 ore, il prelievo per il monitoraggio terapeutico dovrebbe essere effettuato circa 40 ore dopo la somministrazione iniziale, per garantire che i livelli del farmaco siano stabili e rappresentativi.

## 3 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE BIOLOGICO (Sampling)

La raccolta dei campioni biologici deve avvenire in condizioni tali da preservare l'integrità del campione, affinché l'analisi rappresenti il più fedelmente possibile le condizioni **in vivo** del paziente.

### Tipi di campioni:

- **Sangue intero venoso, arterioso, capillare e da funicolo:** il sangue venoso è il campione più comunemente utilizzato, mentre il sangue arterioso viene utilizzato principalmente per l'analisi dei gas ematici. Il sangue capillare è usato per test rapidi, come il glucosio o l'emocromo.

\***INTERO**= campione in cui le proprietà dei costituenti cellulari ed extracellulari rimangono inalterate rispetto al loro stato nativo (in vivo). L'anticoagulante stabilizza in vitro i costituenti del sangue intero per un certo periodo di tempo.

- **Urine:** la raccolta delle urine può essere "spot" (singolo campione) o temporizzata (24 ore). La modalità di raccolta deve essere scelta in base al tipo di esame richiesto, come l'urinocoltura o l'esame di proteine specifiche.
  - First morning spot: urine, ALB
  - Second morning spot: urine, BJP
  - Campione random: HCG, BJP
  - Campione temporizzato: quantitativi (2h, 12h, 24h)
  - Mitto intermedio: urinocoltura es. sedimento

\***RACCOLTA URINE DI 24h** Svuotare la vescica la mattina prima di cominciare la raccolta, da lì in poi raccogliere tutte le urine in un contenitore dedicato, che deve essere conservato a 4 °C durante la raccolta. Completare la raccolta la mattina successiva con le prime urine del mattino.

Nota: non è permesso rimuovere alcuna aliquota di urine dal contenitore, perché l'escrezione della maggior parte delle sostanze endogene segue un ritmo circadiano.

\*Per la determinazione quantitativa delle frazioni di escrezione urinaria, le "quantità/24 ore" sono preferibili alle concentrazioni, perché eliminano le variazioni imputabili al grado di idratazione e di escrezione dell'acqua.

- **Liquidi biologici:** il liquido cerebrospinale (liquor), liquido amniotico, e altri fluidi
- **Plasma:** sovratanante, privo di cellule ottenuto per centrifugazione di sangue anticoagulato, utilizzato in pronto soccorso per velocità: non bisogna aspettare che coaguli.

- **Siero:** parte extracellulare del sangue surnatante di un campione coagulato in seguito a centrifugazione

## BIOCHIMICA CLINICA

24/10/2024

### ANTICOAGULANTI: APPROFONDIMENTO

Gli **anticoagulanti** sono sostanze additive utilizzate per inibire la coagulazione del sangue **in vitro** (ovvero dopo il prelievo), replicando parzialmente i processi fisiologici naturali. L'inibizione della coagulazione si rende necessaria per diverse analisi di laboratorio, in cui è fondamentale mantenere il sangue in uno stato non coagulato per garantire risultati affidabili.

#### MECCANISMO D'AZIONE

Gli anticoagulanti agiscono in diverse fasi della **cascata della coagulazione**, un processo complesso in cui intervengono 12 fattori proteici, ad eccezione del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

La coagulazione può essere inibita attraverso due principali meccanismi:

1. **Chelazione del calcio ioni:** Gli ioni calcio sono fondamentali per vari passaggi della coagulazione. Alcuni anticoagulanti, come l'**EDTA** (acido etilendiamminotetraacetico) e il **citrato**, formano complessi con il calcio (chelazione), rendendolo non disponibile per la coagulazione.
2. **Inibizione dell'attività trombinica:** La trombina è un enzima chiave nel processo coagulativo. L'**eparina**, ad esempio, inibisce direttamente la trombina, impedendo la formazione del coagulo.

### ANTICOAGULANTI SELETTIVI PER ESAMI SPECIFICI (OMS)

L'**Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)** ha standardizzato l'uso di anticoagulanti specifici per diversi esami ematici, associando anche un colore del tappo della provetta per garantire una corretta identificazione dei campioni in ambito clinico. Questo processo, noto come **standardizzazione**, facilita il lavoro del personale sanitario, assicurando la corretta gestione e interpretazione dei risultati.

#### 1. Esame emocromocitometrico (emocromo) - EDTA (k3EDTA)

Per l'analisi dell'emocromo, che valuta i componenti cellulari del sangue (globuli rossi, globuli bianchi, piastrine), viene utilizzato l'anticoagulante **EDTA**, nella sua forma **tripotassica (k3EDTA)**. Questo anticoagulante agisce chelando il calcio, impedendo la coagulazione. La provetta dedicata all'emocromo ha un **tappo di colore viola**.

#### 2. Eritrosedimentazione (VES/ESR) - Sodio citrato

L'indice di **eritrosedimentazione (VES)** è un parametro che misura la velocità di sedimentazione dei globuli rossi, utilizzato come indicatore di attivazione del sistema infiammatorio. Per garantire che i risultati siano confrontabili a livello mondiale, il campione viene trattato con **sodio citrato** come anticoagulante. Il tappo della provetta è di colore **nero**.

#### 3. Esami di coagulazione - Sodio citrato

Negli esami che valutano la **coagulazione** del plasma, come il **tempo di protrombina (PT)** o il **tempo di tromboplastina parziale (PTT)**, si utilizza il **sodio citrato** come anticoagulante. Durante l'analisi, gli ioni calcio vengono reintrodotti nel campione per poter osservare e misurare la velocità di coagulazione. La provetta ha un **tappo azzurro**.

#### 4. Esami di chimica clinica - Litio-eparina

Per determinati esami di **chimica clinica** che richiedono l'uso di plasma, si utilizza la **litio-eparina**, una forma di eparina complessata con litio. L'eparina agisce inibendo l'azione della trombina e di altri fattori coagulativi, permettendo così l'analisi del plasma. La provetta ha un **tappo verde**.

#### Importanza della standardizzazione

L'OMS ha definito una **codifica universale per i tappi delle provette** utilizzate nei diversi esami ematici, il che permette di:

- Facilitare l'identificazione del tipo di esame e dell'anticoagulante utilizzato.
- Ridurre al minimo gli errori umani durante la gestione e il trasporto dei campioni.
- Garantire un'elevata sicurezza e affidabilità nei risultati analitici, sia per i pazienti che per i laboratori.

La standardizzazione è essenziale per assicurare che le procedure di laboratorio siano omogenee a livello globale, riducendo così la variabilità nei risultati.

### GESTIONE DEL CAMPIONE DI SANGUE: APPROFONDIMENTO

- La gestione del campione di sangue è un aspetto cruciale nella diagnostica clinica. Un errore durante le fasi preanalitiche può compromettere i risultati, rendendo necessario ripetere il prelievo e causando disagio per il paziente e ritardi nella diagnosi.
- Il plasma e il siero devono essere separati dalla parte corpuscolata del sangue il più presto possibile e comunque entro 2 ore.
- La prematura separazione del siero, tuttavia, può determinare la formazione di fibrina nel campione separato.
- La coagulazione di regola si completa entro 20-30' nelle provette di vetro, ma è più lunga nelle provette di plastica.
- Nelle provette con gel-separatore, il siero dopo centrifugazione è stabile 6 ore a 15-25°C e almeno 24 ore a 4°C.
- È imperativo che le caratteristiche (qualitative e quantitative) di ciascun analita presenti in-vivo in qualsiasi liquido biologico rimangano invariate dopo il prelievo per ottenere risultati di laboratorio clinicamente validi.

## STABILITÀ DEL CAMPIONE

Dopo un corretto prelievo, è necessario adottare misure che garantiscano la stabilità del campione. Le sostanze disciolte nella componente extracellulare devono rimanere stabili per un'analisi accurata.

### 1. Conservazione a temperatura adeguata

Non esporre i campioni a temperature estreme. La maggior parte dei campioni può essere conservata a una temperatura ambiente controllata tra **10 e 15°C**.

### 2. Trasporto a temperature specifiche

Alcune sostanze richiedono un trasporto a temperature particolari:

- **Ammonio (NH<sub>3</sub>)** deve essere trasportato su ghiaccio.
- **Crioglobuline** devono essere mantenute a **37°C**.

È importante evitare il contatto diretto con il ghiaccio, che può causare **emolisi**.

### 3. Additivi stabilizzanti

Alcuni analiti, come il glucosio, richiedono l'uso di **additivi stabilizzanti** per prevenire alterazioni della concentrazione. Il **glucosio**, se raccolto in una provetta di siero o plasma senza additivi, tende a diminuire di concentrazione mentre il **lattato** aumenta. Questo accade perché le cellule del sangue sono ancora vive e continuano a metabolizzare il glucosio in assenza di ossigeno.

Per evitare ciò, si utilizza l'anticoagulante **sodio fluoruro**, che inibisce la glicolisi agendo sui primi enzimi del processo. Il **tampone citrato** porta il pH della miscela a 5,5, valore a cui gli enzimi della glicolisi vengono inibiti.

### Pompa sodio-potassio

La **pompa sodio-potassio** è un meccanismo cellulare che regola il gradiente ionico tra l'interno e l'esterno della cellula, fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio osmotico e per la trasmissione di segnali elettrici nelle cellule nervose e muscolari.

## PROCESSO DI SAMPLING

### 1. Agitazione del campione con anticoagulante

Dopo il prelievo di un campione contenente anticoagulante, è essenziale agitare **delicatamente** la provetta per favorire un'adeguata miscelazione del sangue con l'anticoagulante. Un'agitazione troppo vigorosa può rompere i globuli rossi (emolisi), creando un errore preanalitico da evitare.

### 2. Agitazione immediata dell'eparina

Le provette contenenti **eparina** devono essere agitate immediatamente dopo il prelievo, per prevenire l'attivazione della coagulazione nel campione. È importante notare che le provette dei vari colori contengono già l'anticoagulante necessario per l'esame.

### 3. Non interscambiabilità delle provette

Le provette con diversi anticoagulanti non sono interscambiabili. L'uso improprio di una provetta può alterare i risultati dell'analisi.

### 4. Impossibilità di travasi tra provette

Nel caso di prelievi difficoltosi, se si è già raccolta una quantità sufficiente di sangue per l'emocromo, ma non si riesce a riempire la provetta da siero, **non è consentito travasare** il sangue da una provetta all'altra. Ad esempio, se si utilizza una provetta contenente **k3EDTA** e si tenta di trasferirlo in una provetta contenente potassio, si otterrebbe un risultato falsato con livelli di potassio eccessivi, richiedendo un nuovo prelievo.

### 5. Volume del campione

Il rapporto tra anticoagulante e sangue deve essere rigoroso. Ogni provetta ha una **tacca nera** che indica il volume ideale di riempimento. Il vuoto presente nella provetta è proporzionale alla quantità di sangue necessaria per l'esame. Se il campione prelevato è **inferiore al 20%** rispetto allo standard, il campione viene considerato non idoneo. Anche un riempimento eccessivo può compromettere l'analisi.

### 6. Separazione di plasma e siero

Per gli esami che richiedono **plasma** o **siero**, è necessario separare queste componenti dalla parte corpuscolata del sangue entro **2 ore** dal prelievo tramite centrifugazione. Se il campione rimane a lungo senza centrifugazione, si possono verificare reazioni biochimiche che alterano la concentrazione degli analiti, influenzando negativamente i risultati.

### 7. Verifica della coagulazione

Nel caso in cui non sia stato utilizzato un anticoagulante, è importante verificare che il processo di coagulazione sia avvenuto correttamente. **In vitro**, la coagulazione richiede generalmente **20-30 minuti**, ma il tempo può allungarsi in provette di plastica.

### 8. Attivatori della coagulazione

Le provette utilizzate per ottenere siero contengono **scaglie di silice nebulizzato** (o altro materiale vetroso) che agisce come attivatore della coagulazione, facilitando la formazione del coagulo. Questo materiale è indicato come "attivatore della coagulazione" sulla provetta.

### 9. Gel separatore

Alcune provette contengono un **gel separatore inerte** con un peso specifico intermedio tra quello delle cellule e quello del plasma o siero. Durante la centrifugazione, il gel si posiziona tra le due componenti, impedendo il loro contatto e mantenendo la stabilità del campione per l'analisi.

## GLICEMIA: ASPETTI DI LABORATORIO

Il monitoraggio della **glicemia plasmatica a digiuno (Fasting Plasma Glucose, FPG)** è uno degli esami più utilizzati per la diagnosi del diabete. L'analita di interesse è il **glucosio** plasmatico, e le procedure preanalitiche rivestono un ruolo cruciale per la precisione del risultato.

### PREANALITICA DEL CAMPIONE PER GLICEMIA

Per garantire che il campione di sangue per la misurazione della glicemia plasmatica non subisca variazioni durante il processo analitico, occorre seguire alcune regole fondamentali:

- **Conservazione immediata a 4°C:** Dopo il prelievo, la provetta deve essere subito posta a 4°C per rallentare il metabolismo cellulare e prevenire la glicolisi.
- **Centrifugazione immediata:** È importante separare il plasma dalle cellule sanguigne quanto prima per evitare che queste ultime continuino a consumare il glucosio presente nel campione, alterandone la concentrazione.

### CARATTERISTICHE DEL CAMPIONE ADEGUATO ALLE ANALISI CHIMICO-CLINICHE

Il campione deve essere **limpido** e **privo di interferenti** noti, cioè sostanze in grado di alterare i risultati degli analiti esaminati. Gli interferenti noti sono gestibili ma devono essere riconosciuti per garantire l'affidabilità dei risultati.

#### INTERFERENTI NOTI GESTIBILI

1. **Emoglobina libera da emolisi** L'emolisi, ovvero la rottura dei globuli rossi, rilascia emoglobina nel siero o nel plasma, cambiando il colore del campione (visibile come rossastro). Questo fenomeno altera la concentrazione degli analiti, in particolare degli **elettroliti**. Anche un'emolisi non visibile a occhio nudo può causare un'interferenza superiore al 10%, rendendo il campione non refertabile. In laboratorio, l'indice emolitico viene misurato con strumenti appositi.
2. **Torbidità o lipemia del campione** Un campione torbido indica un'elevata concentrazione di **lipidi** o **proteine**. Questa condizione può alterare la misurazione di analiti come gli elettroliti, in particolare il **sodio**. Quando il campione è torbido, la quantità di acqua plasmatica disponibile per diluire gli elettroliti si riduce. Il **sodio** viene misurato in funzione dell'acqua plasmatica, ma se questa è ridotta, i livelli di sodio risultano falsamente bassi. Il siero normalmente contiene circa **93% di acqua libera** e **7% di soluti**, ma una torbidità eccessiva modifica questo rapporto, compromettendo le misurazioni.
3. **Campione itterico** L'ittero, caratterizzato dall'elevata concentrazione di **bilirubina**, può alterare i risultati di alcuni esami, non è affidabile il suo riconoscimento visivo, bisogna ricorrere a fotometrica. La **bilirubina** è il prodotto finale del catabolismo dell'emoglobina, ed è trasportata al fegato per essere coniugata ed eliminata. Questo pigmento interferisce chimicamente in esami come la **creatinina** e il **tempo di protrombina**, alterando i risultati in funzione della metodologia utilizzata. L'interferenza è metodo-dipendente e deve essere monitorata attentamente in laboratorio. Un esame interferito significativamente ( $\pm 10\%$  rispetto al valore vero) dall'ittero **NON** si deve refertare.

#### Conclusioni

La presenza di interferenti noti come emoglobina libera, lipidi o bilirubina compromette la qualità del campione, rendendo i risultati inaffidabili. Questi interferenti sono rilevabili in laboratorio tramite indici specifici, come l'indice emolitico, lipemico e itterico, e quando i livelli di interferenza superano una certa soglia, il campione può risultare irrealizzabile per alcuni esami. In alcuni casi, è possibile ipercentrifugare il campione per ridurre l'interferenza, filtrando così parte delle sostanze che compromettono i risultati analitici.

## VARIABILITÀ BIOLOGICA (ANALITICA E TOTALE) E OMEOSTASI

L'**omeostasi** è la capacità dell'organismo di mantenere costante l'ambiente interno nonostante le variazioni esterne, grazie all'integrazione delle vie metaboliche che regolano il delicato equilibrio tra produzione e consumo delle sostanze biochimiche, come il glucosio nel sangue.

Questo equilibrio dinamico è essenziale per mantenere la concentrazione degli **analiti** (le sostanze che vengono misurate) entro intervalli fisiologici ristretti. I meccanismi regolatori responsabili di questo processo assicurano che i parametri biochimici e fisiologici si mantengano in uno **stato stazionario dinamico**, compensando eventuali cambiamenti esterni. Il valore ideale intorno al quale vengono mantenuti tali parametri è chiamato **punto omeostatico**.

#### Punto Omeostatico e Stato Stazionario Dinamico

Quando si misura un analita, come la glicemia plasmatica a digiuno, questa tende a **variare leggermente attorno a un punto omeostatico specifico** per ciascun soggetto e analita. Questo punto viene mantenuto da meccanismi biochimici che regolano la produzione e il consumo dell'analita, creando uno **stato stazionario dinamico**. Questo stato rappresenta una continua fluttuazione fisiologica che permette di mantenere l'equilibrio metabolico.

Le variazioni fisiologiche attorno al punto omeostatico sono il risultato di una competizione tra reazioni **anaboliche** (che producono molecole) e **cataboliche** (che le consumano).

Queste fluttuazioni sono parte della **variabilità biologica**, un concetto che descrive la normale oscillazione degli analiti attorno ai loro valori omeostatici.

**VARIABILITÀ BIOLOGICA:** Per variabilità biologica si intendono tutte le modificazioni di concentrazione, di qualsiasi sostanza dosabile nel sangue, che intercorrono naturalmente (biologicamente) nel tempo, senza che alcun processo fisiopatologico si attivi.

## Teoria della Variabilità Biologica

Negli anni '80, un gruppo di ricerca scozzese ha sviluppato la **teoria della variabilità biologica**, con l'obiettivo di quantificare il grado di fluttuazione attorno al punto omeostatico per ogni analita. La variabilità biologica è una caratteristica intrinseca degli analiti e viene utilizzata per stabilire limiti entro cui le variazioni sono considerate fisiologiche. Quando una variazione supera questi limiti, potrebbe indicare un'alterazione patologica o parafisiologica.

### FLUTTUAZIONI RITMICHE PREVEDIBILI

Oltre alla variabilità biologica, alcuni analiti mostrano fluttuazioni prevedibili legate a specifiche fasi della vita, che comportano modificazioni biologiche come:

- Età neonatale
- Età pediatrica
- Adolescenza
- Menopausa
- Invecchiamento
- Gravidanza

Queste fluttuazioni sono prevedibili e si verificano in risposta a cicli biologici come il ritmo circadiano, senza violare necessariamente la teoria della variabilità biologica.

Le concentrazioni di molti analiti invece fluttuano in relazione a cicli giornalieri, mensili o stagionali e i campioni per questi dosaggi devono essere raccolti in momenti cruciali per i quesiti clinici richiesti. (cronobiologia). L'assenza di un ciclo biologico atteso fornisce di per sé un'informazione clinica importante.

### MODELLIZZAZIONE DELLA VARIABILITÀ BIOLOGICA

In ogni momento, la concentrazione dei componenti del sangue (es. colesterolo) nel singolo individuo è il risultato di un equilibrio dinamico. Tale equilibrio fisiologico è dovuto a meccanismi che tendono a mantenere la concentrazione ad un valore del punto omeostatico.

La **variabilità biologica** viene suddivisa in due componenti principali:

1. **Variabilità biologica intraindividuale (VI) di un analita** : rappresenta l'oscillazione inevitabile attorno al punto omeostatico di un singolo individuo per un determinato analita. La variazione rilevata può essere influenzata da fattori preanalitici, analitici e biologici (variabilità biologica intra-individuale). Anche quando le condizioni preanalitiche sono controllate, la concentrazione dell'analita può mostrare leggere variazioni a causa della normale variabilità biologica.
2. **Variabilità interindividuale (VG) di un analita**: descrive la variabilità del punto omeostatico di un medesimo analita tra individui diversi all'interno di una popolazione sana di riferimento. Ogni individuo ha un punto omeostatico specifico per ciascun analita, che può differire da quello di altri.
  - VI e VG variano da analita ad analita
  - VI varia inoltre da individuo ad individuo. Di norma, si considera la media dei valori di VI ottenuti in più individui.

**Variabilità analitica**: si riferisce all'accuratezza e riproducibilità del sistema di misura utilizzato in laboratorio. Misurare ripetutamente lo stesso campione con lo stesso strumento può portare a leggere differenze, dovute a fattori tecnici, che vanno stimate per evitare che queste interferenze influenzino i risultati.

**Variabilità preanalitica**: deve essere eliminata il più possibile per garantire l'affidabilità dei risultati. Questa riguarda fattori come la manipolazione dei campioni, il tempo tra il prelievo e l'analisi, e altre condizioni ambientali che possono alterare i risultati.

### STIMA DELLA VARIABILITÀ BIOLOGICA INTRAINDIVIDUALE E INTERINDIVIDUALE

VI e VG sono misurate con opportuni protocolli sperimentali e sono espresse come coefficiente di variazione (CV %)

Per stimare la **variabilità intraindividuale** e **interindividuale** di un analita, viene applicato un protocollo rigoroso:

- Si arruolano soggetti sani e vengono eseguiti prelievi multipli in condizioni biologiche costanti. I campioni, gestiti con le precauzioni preanalitiche del caso, vengono congelati e successivamente analizzati nello stesso momento per ridurre la **variabilità analitica**.
- Ogni campione si esamina in doppio
- Calcolo la media tra i due risultati e la assumo come valore della variabilità intraindividuale VI
- La variabilità interindividuale si calcola facendo la media delle doppiette di tutti i soggetti, valutando la deviazione standard.
- Calcolo la media dei 7 risultati
- Calcolo la deviazione standard ( DS ) (concetto statistico che esprime la distorsione dei valori ) dei risultati: media complessiva delle differenze tra due variabili analitiche nei campioni misurati in doppio  

$$DS \text{ (di un singolo individuo)}$$
- $$CVI\% = \frac{DS}{MEDIA} \times 100$$
  
 MEDIA (di un singolo individuo)
- Ripeto il calcolo per tutti i soggetti arruolati nello studio e ottengo il CVI% di tutti.
- Calcolo la MEDIA dei CVI% di tutti i soggetti arruolati nello studio per ottenere il CVI% di quello specifico analita.
- Impiegando tutti i risultati di tutti i soggetti esaminati ottengo la CVG  

$$DS \text{ (di tutti i risultati)}$$

- $CVG\% = \frac{\text{CVI}}{\text{MEDIA}} \times 100$

MEDIA (di tutti i risultati)

Traguardo analitico per l'imprecisione =  $\frac{1}{2}$  CVI, poiché l'obiettivo di imprecisione analitica clinicamente applicabile dipende dalla variabilità biologica intraindividuale

### VARIABILITÀ TOTALE

La **variabilità totale (VT)** è data dalla somma della **variabilità intraindividuale (VI)** e della **variabilità analitica (VA)** secondo la seguente formula:

$$VT = (VI^2 + VA^2)^{1/2}$$

La variabilità analitica deve essere inferiore alla metà della variabilità biologica intraindividuale affinché l'analisi sia affidabile.

Il contesto clinico richiede la minima variabilità totale (VT) del risultato biochimico.

Il contributo di VI a VT è "incomprimibile"

Il contributo della variabilità analitica (VA) alla VT deve essere pertanto minimizzato

Se le condizioni analitiche soddisfano la relazione  $VA = \frac{1}{2} VI$ , si può calcolare che la variabilità totale (VT) della misura risulta essere  $VT = 1,12 VI$ , cioè solo il 12% maggiore della variabilità biologica intraindividuale.

In altre parole, se scegliamo un metodo analitico che abbia un'imprecisione (VA) pari o inferiore alla metà della variabilità biologica intraindividuale (VI) dell'analita, la variabilità complessiva della misurazione sarà solo leggermente superiore (del 12%) rispetto alla variabilità biologica del soggetto.

Questo garantisce che l'imprecisione introdotta dal sistema di misura non abbia un impatto significativo sulla valutazione dell'analita e che le variazioni osservate nei risultati siano principalmente dovute alla fisiologia del paziente, piuttosto che agli errori del processo analitico.

### DIFFERENZA CRITICA %

La **differenza critica** è la differenza percentuale necessaria affinché due determinazioni consecutive nello stesso individuo possano essere considerate significativamente diverse fra loro

$$DC = 2,77 \times (CV^2 + CA^2)^{1/2}$$

Come detto, ogni ANALITA ha una CVI e una CVG caratteristiche e valide universalmente. Per quanto riguarda la differenza critica di un analita, ogni laboratorio deve calcolare la propria

### INDICE DI INDIVIDUABILITÀ

L'indice di individualità (II), calcolato come il rapporto tra la variabilità biologica intraindividuale (CVI) e quella interindividuale (CVG).

$$II = CVI / CVG$$

Rappresenta un parametro fondamentale per valutare l'utilità degli intervalli di riferimento degli analiti in ambito clinico.

Questo indice indica quanto sia appropriato utilizzare gli intervalli di riferimento standard per interpretare le variazioni di un analita in un singolo individuo.

- **II > 1,4:** gli intervalli di riferimento sono considerati utili, poiché le differenze intraindividuali sono sufficientemente grandi da giustificare un uso valido degli intervalli di popolazione.
- **II = 1:** gli intervalli di riferimento diventano inutili perché la variabilità intraindividuale è simile alla variabilità interindividuale, rendendo l'applicazione dei valori di riferimento generici poco significativa.
- **II < 0,6:** gli intervalli di riferimento sono fuorvianti, poiché la variabilità intraindividuale è molto piccola rispetto a quella interindividuale, rendendo difficile cogliere differenze clinicamente rilevanti.

### Variabilità Biologica e Creatinina

Un esempio pratico di questo concetto è fornito dall'andamento della creatinina sierica (**S-Creatinina**). Nonostante i valori di creatinina di un paziente possano rimanere entro l'intervallo di riferimento, una variazione significativa del 12% può già segnalare un cambiamento nella velocità di filtrazione glomerulare (VFG), evidenziando quindi una potenziale disfunzione renale anche prima che i risultati escano dai limiti di riferimento.

In questo contesto, è fondamentale considerare che la **variabilità biologica intraindividuale** è generalmente molto inferiore rispetto alla **variabilità interindividuale**. Per esempio, se consideriamo i valori medi della creatinina in due individui differenti, possiamo osservare variazioni intraindividuali relativamente piccole (ad esempio, CVI per creatinina è inferiore rispetto a CVG). Questo giustifica l'importanza di analizzare le variazioni individuali rispetto alla popolazione generale.

### Efficacia della Stratificazione per Genere

I dati dimostrano che la stratificazione per genere è spesso necessaria quando si utilizzano gli intervalli di riferimento per certi analiti. Nel caso della creatinina, per esempio, gli uomini e le donne hanno variazioni biologiche intraindividuali (CVI) e interindividuali (CVG) significativamente differenti. Gli uomini mostrano un II di 1,83, suggerendo che l'uso degli intervalli di riferimento è appropriato per valutare la creatinina in questo gruppo. Al contrario, nelle donne l'II è 1,42, indicando comunque l'utilità degli intervalli di riferimento, ma con un impatto minore rispetto agli uomini.

### Misura dei Marcatori Urinari: L'Albumina Urinaria

Per i marcatori urinari, come l'albumina urinaria, la variabilità biologica intraindividuale varia in base al tipo di campione raccolto. Ad esempio:

- **Urine delle 24 ore:** presentano una CVI del 70%, suggerendo una significativa variabilità tra i campioni raccolti in un giorno intero.
- **"First morning spot"** (il campione di urina raccolto la mattina al risveglio): ha una CVI inferiore del 31%, indicando una maggiore stabilità e rendendolo un campione ottimale per valutazioni ripetute.

- **Campione urinario casuale:** ha una **CVI** dell'86%, rendendolo meno affidabile rispetto al campione della mattina. Il rapporto albumina/creatinina può essere un indicatore utile per monitorare la funzione renale, ma varia significativamente tra gli individui. Pertanto, la scelta del campione ottimale (come l'urina del mattino) è cruciale per ottenere misure accurate e ridurre la variabilità intraindividuale.

#### Definizione del Numero Ottimale di Campioni

Per stimare con precisione il punto omeostatico di un analita, è necessario considerare la variabilità biologica e analitica. Ad esempio, per misurare correttamente il colesterolo totale con una **CVI** del 3,6% e una **CVA** (variabilità analitica) dell'1,8%, si può determinare il numero di campioni necessari attraverso un'equazione statistica:

$$n = \lceil 1,96 \cdot (CVA^2 + CVI^2)^{1/2} / D \rceil^2$$

Dove **D** rappresenta la percentuale di approssimazione al punto omeostatico (generalmente fissata tra il 5% e il 10%). Per esempio, utilizzando un valore di **D** del 5%, si calcola che sono necessari circa **2,5 campioni** per ottenere una stima accurata del colesterolo totale, riducendo così l'influenza della variabilità analitica e biologica sulla misurazione.

In conclusione, la comprensione della variabilità biologica e dell'indice di individualità è essenziale per interpretare correttamente i risultati di laboratorio e per definire il numero di campioni necessari per ottenere misurazioni accurate

L'**indice di individuabilità (II)** si calcola dividendo la **variabilità intraindividuale (CVI)** per la **variabilità interindividuale (CVG)**. Questo indice determina l'utilità degli **intervalli di riferimento** per un analita e se essi devono essere stratificati per età, sesso o altre variabili.

Un valore di **II > 1,4** indica che gli intervalli di riferimento sono utili, mentre valori inferiori a **0,6** suggeriscono che gli intervalli potrebbero essere fuorvianti.

28/10/2024

## VARIABILITÀ ANALITICA

### Scopo del Laboratorio Clinico

Il principale obiettivo di un laboratorio clinico è quello di produrre risultati accurati e il più possibile vicini alla realtà, in modo che possano essere utilizzati per ottenere informazioni diagnostiche e prognostiche. Questi dati sono essenziali per una gestione clinica ottimale del paziente, consentendo una diagnosi precisa e un monitoraggio efficace della progressione o della remissione di eventuali patologie.

### Introduzione Metrologica

Nella metrologia applicata alle analisi cliniche, vengono definiti concetti chiave per comprendere e migliorare la qualità dei risultati. Tra questi, il "valore vero", la "stima", e l'"errore" sono fondamentali per descrivere la qualità delle misurazioni.

- **Valore Vero:** è il valore esatto che una data proprietà misurabile assume in un sistema specifico. Questo valore rappresenta una misura teorica di riferimento, il cui ottenimento diretto è impossibile, per cui si tende a raggiungerlo attraverso la "stima".
- **Stima:** è il valore ottenuto in pratica mediante una misurazione. Poiché il valore vero non è raggiungibile in modo assoluto, la stima rappresenta il migliore approssimazione di esso. Tuttavia, questa risulta sempre diversa dal valore vero, a causa di variabili intrinseche nei metodi di misurazione.
- **Errore:** definito come la differenza tra la stima e il valore vero, l'errore riflette l'inevitabile imprecisione delle misurazioni. Anche se piccolo, l'errore è sempre presente e rappresenta un limite fisico e metodologico della misurazione stessa.

### Errore Totale (ET)

L'**Errore Totale (ET)** di una misurazione è la differenza tra la stima ottenuta e il valore vero e rappresenta un indicatore della variabilità analitica del metodo utilizzato. L'ET non rappresenta uno "sbaglio", ma deriva dalle proprietà e dai limiti del metodo, determinando la **qualità analitica** dei risultati.

L'Errore Totale (ET) si calcola con la seguente formula: **ET = [ stima ] - [ valore vero ]**

L'ET comprende due componenti principali che derivano da caratteristiche fondamentali del metodo analitico:

1. **Errore Casuale:** rappresenta la variabilità casuale del metodo di misurazione. Si esprime in termini di deviazione standard (DS) o come coefficiente di variazione percentuale (CV%). È una misura dell'imprecisione del metodo.
2. **Errore Sistemático:** rappresenta la discrepanza stabile tra il valore medio di misure replicate e il valore vero. Questo errore esprime l'inesattezza del metodo e si quantifica come *bias*, sia in valore assoluto che in percentuale.

### Caratteristiche di un Metodo Analitico

Ogni metodo analitico è caratterizzato da due parametri principali:

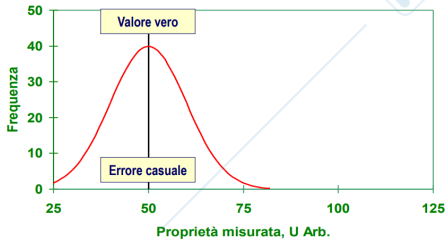
- **Inesattezza (Errore Sistemático):** rappresenta il grado di deviazione sistematica del metodo rispetto al valore vero. Questo tipo di errore è costante e si esprime come bias, misurando l'affidabilità della media delle misure rispetto al valore atteso.
- **Imprecisione (Errore Casuale):** rappresenta il grado di variabilità tra misure replicate di uno stesso campione. L'imprecisione indica quanto un metodo produca risultati ripetibili e si esprime tramite la deviazione standard (DS) o come coefficiente di variazione percentuale (CV%).

Questi due errori si combinano per determinare la **precisione analitica complessiva** del metodo.

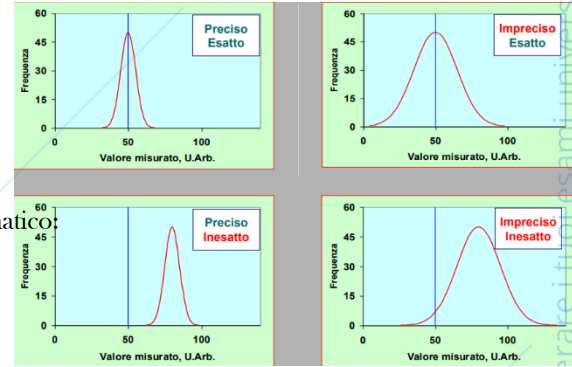
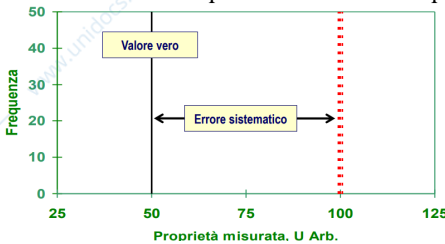
## Definizioni Chiave

1. **Precisione:** è la capacità di un metodo di fornire risultati simili tra misure replicate di uno stesso campione. Si esprime numericamente come **imprecisione** e viene quantificata tramite il CV% o la DS.
2. **Esattezza:** rappresenta il grado di concordanza tra la media di più misurazioni replicate e il valore vero. L'esattezza è un'indicazione dell'inesattezza del metodo e si esprime numericamente tramite il bias, in valore assoluto o in percentuale.

Distribuzione di frequenza di n misure replicate in presenza di solo errore casuale (imprecisione):



distribuzione di frequenza di n misure replicate in presenza di solo errore sistematico:



## LA FASE POSTANALITICA: INTERPRETAZIONE DEI DATI DI LABORATORIO

### Dalla Misurazione al Valore Clinico

Il processo di interpretazione di un dato di laboratorio mira a trasformare una semplice misurazione in un'informazione clinicamente utile. I dati di laboratorio possono essere qualitativi o quantitativi e rilevano un **segno di laboratorio** che può contribuire alla diagnosi, al monitoraggio o alla prognosi di una condizione patologica.

### Sintesi del processo di interpretazione clinica dei dati

La trasformazione di un dato numerico in un'informazione clinica significativa passa attraverso:

- 1) **Confronto con gli intervalli di riferimento:** per identificare eventuali anomalie rispetto ai valori tipici di una popolazione sana.
- 2) **Valutazione longitudinale:** per rilevare variazioni significative e monitorare le condizioni del paziente nel tempo.
- 3) **Utilizzo di livelli decisionali:** per guidare scelte cliniche sulla base di soglie che indicano la necessità di ulteriori diagnosi o interventi.

Questi passaggi consentono di utilizzare i dati di laboratorio non solo come numeri isolati, ma come strumenti di supporto nelle decisioni cliniche e terapeutiche personalizzate.

### 1. CONFRONTO CON GLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Un dato di laboratorio acquisisce significato clinico quando viene confrontato con gli **intervalli di riferimento**. Gli intervalli di riferimento rappresentano un range di valori considerati normali, derivati da misurazioni di un'analita in una **popolazione di riferimento** composta da individui sani. La costruzione di questi intervalli richiede il reclutamento di soggetti sani, dai quali si estraggono campioni e si misura l'analita di interesse.

#### Determinazione dell'intervallo di riferimento

- Viene definito un **limite inferiore** e un **limite superiore** tramite criteri statistici e biologici.
- L'intervallo di riferimento include il 95% dei risultati centrati attorno alla media, escludendo il 2,5% di valori più alti e il 2,5% di valori più bassi.
- **Criteri di esclusione:** individui in condizioni che potrebbero alterare i risultati (gravidanza, allattamento, esercizio fisico recente, malattie croniche o recenti, obesità, ipertensione, fattori genetici, assunzione di farmaci, alcol, fumo).

#### Eccezione: Multiplo della Mediana (MoM) per la Gravidanza

Nell'ambito del monitoraggio della gravidanza, l'intervallo di riferimento varia con le settimane gestazionali. Per monitorare gli analiti in gravidanza si utilizza il concetto di **Multiplo della Mediana (MoM)**:

- Si calcola la mediana settimanale per l'analita su una base di dati aggiornata con i valori della popolazione di riferimento per ogni settimana gestazionale.

- Il risultato del test viene espresso come rapporto rispetto alla mediana della settimana specifica (MoM), consentendo di tenere conto della variabilità naturale dell'analita durante la gravidanza.

*Esempio: Screening prenatale per la trisomia 21.*

## 2. VALUTAZIONE LONGITUDINALE

Quando l'**indice di individualità** è inferiore a 0,6, gli intervalli di riferimento standard possono essere fuorvianti. In questi casi, si preferisce una valutazione longitudinale dei dati del paziente, ossia un monitoraggio delle variazioni nel tempo per determinare se una variazione osservata è significativa.

Per valutare se un cambiamento tra due misurazioni consecutive è clinicamente rilevante, si calcola la **DIFFERENZA CRITICA**:

- La differenza critica rappresenta una soglia che, una volta superata, suggerisce che la variazione non è dovuta solo alla **variabilità biologica** o **analitica**, ma potrebbe indicare una condizione patologica.

*Esempio: Monitoraggio dell'antigene CEA per il carcinoma del colon-retto.*

## 3. IMPIEGO DEI LIVELLI DECISIONALI (VALORE NOSOLOGICO)

Il **livello decisionale** è un valore soglia che consente di prendere decisioni cliniche dicotomiche: se il risultato è sopra o sotto questa soglia, si può procedere con ulteriori diagnosi, trattamenti o aggiustamenti della terapia.

### Definizione dei livelli decisionali

Per stabilire un livello decisionale:

- Si esegue uno studio su una popolazione con caratteristiche omogenee rispetto alla malattia da diagnosticare.
- La popolazione viene divisa in **sani** e **malati** utilizzando un metodo di riferimento detto **Gold Standard** per garantire la correttezza della diagnosi.

### RISULTATI DELL'ANALISI

L'analisi statistica dei risultati sui livelli decisionali permette di classificare la popolazione in quattro categorie:

- **Veri Positivi:** malati con esame positivo, al di sopra del livello decisionale.
- **Falsi Positivi:** sani con esame positivo, al di sopra del livello decisionale.
- **Veri Negativi:** sani con esame negativo, al di sotto del livello decisionale.
- **Falsi Negativi:** malati con esame negativo, al di sotto del livello decisionale.

Questa classificazione aiuta a valutare l'accuratezza e l'affidabilità dei test diagnostici e a definire le soglie ottimali per le decisioni cliniche.

Per valutare l'efficacia di un test diagnostico, vengono utilizzate diverse metriche, tra cui **sensibilità**, **specificità**, **efficacia diagnostica** e **valore predittivo**. Questi parametri forniscono informazioni critiche sulla capacità di un test di distinguere tra individui sani e malati.

**SENSIBILITÀ DIAGNOSTICA:** capacità del test di identificare correttamente i malati, calcolando la proporzione di **veri positivi (VP)** rispetto a tutti i pazienti con la malattia.

$$\text{Sensibilità} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

**VP** = Veri Positivi, ovvero pazienti malati che risultano positivi al test.

**FN** = Falsi Negativi, ovvero pazienti malati che risultano negativi al test.

**SPECIFICITÀ:** capacità del test di identificare correttamente i soggetti sani, calcolando la proporzione di **veri negativi (VN)** tra tutti i soggetti senza la malattia.

$$\text{Specificità} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

**VN** = Veri Negativi, ossia individui sani che risultano negativi al test.

**FP** = Falsi Positivi, ossia individui sani che risultano positivi al test.

### Migliore livello decisionale e curva ROC

Per determinare il livello decisionale ottimale, si utilizza la **curva ROC (Receiver Operating Characteristic)**, che traccia la sensibilità (sull'asse y) rispetto al complementare della specificità (1-specificità) (sull'asse x) per ogni possibile livello decisionale. Ogni punto della curva rappresenta un livello decisionale specifico associato a un preciso valore di sensibilità e specificità. Un livello decisionale che si avvicina al punto in alto a sinistra (sensibilità massima e specificità massima) è considerato ottimale.

**L'EFFICACIA DIAGNOSTICA** rappresenta la proporzione dei risultati corretti (veri positivi e veri negativi) ottenuti dal test rispetto al totale dei soggetti testati.

$$\text{Efficacia Diagnostica} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}} \times 100$$

**IL VALORE PREDITTIVO** indica la probabilità che il soggetto sottoposto al test abbia effettivamente la malattia in caso di esito positivo (valore predittivo positivo, VPP) o che sia sano in caso di esito negativo (valore predittivo negativo, VPN).

**Valore Predittivo Positivo (VPP)**

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \times 100$$

**Valore Predittivo Negativo (VPN)**

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100 \quad \text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

dove:

**Calcolo del Valore Predittivo e Prevalenza della Malattia**

Il valore predittivo dipende dalla **sensibilità**, dalla **specificità** e dalla **prevalenza della malattia** nella popolazione.

**Prevalenza della Malattia**

La **prevalenza** rappresenta la percentuale di individui affetti dalla malattia all'interno della popolazione di riferimento e si calcola come:

$$\text{Prevalenza} = \frac{\text{Numero Totale di Malati}}{\text{Numero di Individui nella Popolazione}} \times 100$$

Conoscere la prevalenza è fondamentale per l'interpretazione del valore predittivo, poiché influisce sulla probabilità che un esito positivo indichi effettivamente la presenza della malattia.

## BIOMARCATORI DI FUNZIONE D'ORGANO:

**Biomarcatori di funzione e disfunzione/lesione d'organo**

I biomarcatori di funzione e disfunzione/lesione d'organo sono molecole misurabili nel sangue o in altri fluidi corporei, utilizzate per valutare la condizione funzionale di un organo, la gravità di una patologia o il rischio di progressione. Possono essere utili per:

- rilevare il rischio di malattia
- formulare una diagnosi precisa di malattia acuta o cronica
- stabilire la gravità di una malattia diagnosticata
- stratificare il rischio di peggioramento clinico, permettendo di calibrare l'intensità dell'intervento (prognosi)
- scegliere un trattamento terapeutico o monitorarne l'efficacia di

**Tipi di Biomarcatori di Funzione**

Si distinguono diversi biomarcatori in base all'organo o alla funzione specifica che monitorano:

- 1) **biomarcatori di funzione epatica**
- 2) **biomarcatori di funzione del diabete (di disfunzione endocrina)**
- 3) **biomarcatori di funzione renale**

### 1. BIOMARCATORI DI FUNZIONE EPATICA

Il fegato ha un ruolo fondamentale nella modificazione e secrezione di sostanze tossiche e nella sintesi proteica. Anche con danni significativi, la funzione epatica può rimanere apparentemente normale, rendendo necessari esami di laboratorio per identificare eventuali patologie.

**a) funzione di escrezione - bilirubina**

L'epatocita, cellula epatica principale, possiede due poli:

- **Polo vascolare:** riceve sostanze da trasformare.
- **Polo biliare:** elimina le sostanze trasformate nella bile, che viene successivamente accumulata nella colecisti e rilasciata nell'intestino.

**Bilirubina:** principale biomarcatore di escrezione epatica. La bilirubina, prodotto finale del catabolismo dell'eme, è insolubile in acqua e circola legata all'albumina fino all'ingresso negli epatociti tramite un meccanismo attivo. Qui viene coniugata con l'acido glucuronico, trasformandosi in **bilirubina coniugata (o diretta)**, quindi escreta nella bile e eliminata con le feci.

**La bilirubina coniugata può** esclusivamente aumentare per **aumentato Ingresso per:**

Tutte le situazioni che interferiscono con la normale escrezione biliare da parte degli epatociti possono causare un aumento dei livelli. Questo può verificarsi per:

- **Ostruzioni intraepatiche** come nel caso di colangiolite.
- **Ostruzioni extraepatiche** a differenti livelli lungo il sistema biliare, generando un reflusso aumentato.

Alcune sindromi genetiche come la **sindrome di Rotor** e la **sindrome di Dubin-Johnson** comportano difetti nel sistema di escrezione biliare, determinando un aumento dei livelli a causa di un reflusso biliare compromesso.

Non esistono condizioni fisiologiche o patologiche documentate che causino una diminuzione dei livelli.

**Bilirubina non coniugata (o indiretta):** presente in caso di eccessiva emolisi intravascolare o ridotta capacità epatica di metabolizzazione, come nel caso di eccesso di globuli rossi danneggiati. Nei neonati, è principalmente di tipo non coniugato. La bilirubina non coniugata può essere:

1. **Aumentata per aumento dell'ingresso** (ittero pre-epatico): **iperemolisi:** condizioni come le anemie emolitiche o l'iperemolisi neonatale possono aumentare il rilascio di bilirubina a causa della rapida distruzione dei globuli rossi.
2. **Aumentata per diminuita rimozione** (ittero epatico): **difetti congeniti:** alcuni difetti genetici nei meccanismi di captazione, trasporto intraepatocitario o glicuronidazione, come nella sindrome di crigler-najjar e nella sindrome di gilbert, o nei neonati, possono compromettere la corretta rimozione della bilirubina.
1. **Diminuita per diminuito ingresso: ridotta emocateresi:** in alcune anemie, come quelle causate da carenza di ferro, si osserva una ridotta sintesi di emoglobina che porta a una minor distruzione dei globuli rossi e, quindi, a una produzione inferiore di bilirubina.

## ACIDI BILIARI: DIAGNOSI DI COLESTASI INTRAEPATICA DELLA GRAVIDANZA (ICP)

**Scopo:** Valutare i livelli di acidi biliari nelle donne in gravidanza che non presentavano segni di colestasi prima della gestazione per identificare o escludere la **colestasi intraepatica della gravidanza (ICP)**.

**Prelievo:** Non è necessario il digiuno, si utilizza un campione di siero.

### Valori di Riferimento per Diagnosi

- **< 19 µmol/L:** Esclusione di ICP. Livelli di acidi biliari inferiori a 19 µmol/L indicano che è improbabile la presenza di colestasi intraepatica della gravidanza.
- **≥ 19 µmol/L:** Diagnosi di ICP. Livelli uguali o superiori a 19 µmol/L supportano la diagnosi di colestasi intraepatica della gravidanza.

### b) funzione di sintesi

Il fegato sintetizza la maggior parte delle proteine plasmatiche. I biomarcatori di sintesi epatica includono:

- **Albumina:** principale proteina sierica.
- **Transtiretina:** proteina di trasporto.
- **Colinesterasi:** enzima la cui attività diminuisce con una ridotta capacità sintetica epatica.
- **Tempo di protrombina:** indica la capacità coagulativa; in caso di disfunzione epatica, il tempo di protrombina aumenta.

## 2. BIOMARCATORI PER IL DIABETE

I livelli decisionali per il diabete si basano su specifici biomarcatori indicativi di disfunzione endocrina:

- **fasting plasma glucose:** glicemia a digiuno  $\geq 126$  mg/dl, indicativa di alterazioni microvascolari e neuropatie.
- **2-h plasma glucose:** glicemia dopo 2 ore  $\geq 200$  mg/dl.
- **hba1c** (emoglobina glicata): livello  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol), rappresenta la glicazione dell'emoglobina con il glucosio. questo parametro ha una fase preanalitica semplice e fornisce una misura a lungo termine.
- **random plasma glucose:** glicemia casuale  $\geq 200$  mg/dl in pazienti con sintomi di diabete.

### Criteri Diagnostici per il Diabete Mellito

Per diagnosticare il diabete, sono utilizzati i seguenti valori di glucosio plasmatico o di emoglobina glicata (HbA1C). Un paziente è considerato diabetico se uno dei seguenti parametri è soddisfatto:

1. **Glicemia a Digiuno (Fasting Plasma Glucose):**
  - Valore  $\geq 126$  mg/dL (7,0 mmol/L).
  - Questo test misura il glucosio nel sangue dopo almeno 8 ore di digiuno.
2. **Glicemia dopo 2 Ore da un Test di Tolleranza al Glucosio Orale (OGTT):**
  - Valore  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L).
  - L'OGTT prevede l'assunzione di una soluzione di glucosio e la misurazione del glucosio plasmatico due ore dopo.
3. **Emoglobina Glicata (HbA1C):**
  - Valore  $\geq 48$  mmol/mol (6,5%).
  - L'HbA1C riflette la media dei livelli di glucosio degli ultimi 2-3 mesi.
4. **Glicemia Plasmatica Random (Random Plasma Glucose):**
  - Valore  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) **in presenza di sintomi tipici di iperglicemia** come poliuria (aumento della minzione) e polidipsia (aumento della sete).

In assenza di dati clinici inequivocabili, come un episodio evidente di iperglicemia, è raccomandato confermare i risultati ripetendo uno dei test sopra elencati (criteri 1, 2 o 3) per una diagnosi definitiva.

## Determinazione della Glicemia nella Diagnosi del Diabete - Fase Preanalitica

### Condizioni Pre-Analitiche:

- **Digiuno Overnight:** Il paziente deve osservare un digiuno notturno di almeno 8 ore e non oltre le 12 ore per garantire l'accuratezza della misurazione.
- **Prelievo e Campione di Plasma con Antiglicolitico:** È preferibile raccogliere il campione in provette con antiglicolitici, come il fluoro-sodio, per evitare la degradazione del glucosio. Evitare l'uso di siero o sangue intero capillare, che non garantiscono la stessa stabilità dei livelli di glucosio.
  - **Separazione Immediata del Plasma:** Se non si utilizzano inibitori della glicolisi, il campione di plasma deve essere separato immediatamente poiché il glucosio tende a diminuire rapidamente, fino a 7 mg/dL all'ora.
  - **Differenze tra Matrici:** I livelli di glicemia possono variare in modo significativo tra plasma, sangue intero e sangue capillare, con concentrazioni di glucosio generalmente superiori nel plasma (di circa il 10%).

## Emoglobina Glicata (HbA1c) - Fisiologia della Glicazione

### Glicazione e HbA1c:

- **Processo di Glicazione:** In un ambiente biologico, il glucosio si lega in modo irreversibile alle proteine, formando molecole "glicate" (ad esempio, HbA1c).
  - L'entità di questa glicazione è proporzionale al prodotto tra la concentrazione di glucosio e il tempo di contatto.
  - **Velocità della Glicazione:** La glicazione avviene lentamente e risulta limitata dalla durata di vita della proteina in questione.
- **Meccanismo di Glicazione della HbA1c:** Si verifica una reazione non enzimatica tra il gruppo aldeidico del glucosio e il gruppo amminico terminale (NH<sub>2</sub>) della valina della catena β dell'emoglobina A (Hb-A0).
  - **Durata della Vita degli Eritrociti:** Poiché la glicazione avviene per tutto il ciclo vitale degli eritrociti (circa 120 giorni), la concentrazione di HbA1c riflette i livelli medi di glicemia delle 6-12 settimane precedenti.

### Significato Diagnostico dell'HbA1c:

- La percentuale di HbA1c è proporzionale alla glicemia media dell'ultimo trimestre, offrendo un indicatore a lungo termine del controllo glicemico e supportando la diagnosi e il monitoraggio del diabete.

## 3. BIOMARCATORI DI FUNZIONE RENALE

### Funzione renale: produzione di Urina (1-2 L/die)

La produzione di urina è un processo fisiologico essenziale per il mantenimento dell'equilibrio idrico ed elettrolitico dell'organismo. Questo processo avviene principalmente a livello dei reni e si compone di due fasi principali: **filtrazione** e **riassorbimento**.

#### 1. Filtrazione

La filtrazione è il primo passo nella formazione dell'urina. Avviene nei glomeruli renali, dove il sangue viene filtrato attraverso una barriera semipermeabile. Durante questo processo, vengono eliminati dal sangue:

- **Prodotti finali del metabolismo:** Questi includono sostanze tossiche come l'urea, la creatinina e l'acido urico, che devono essere escrete per mantenere la salute dell'organismo.
- **Sostanze esogene:** Farmaci e altre sostanze chimiche presenti nell'organismo, che possono derivare da esposizioni ambientali o da trattamenti farmacologici, vengono anch'essi eliminati.

#### 2. Riassorbimento

Dopo la filtrazione, il filtrato passa attraverso i tubuli renali, dove ha luogo il riassorbimento. Questa fase è fondamentale per garantire che sostanze utili, come acqua, elettroliti (es. sodio e potassio) e nutrienti (es. glucosio), vengano recuperate e riassorbite nel sangue. Il riassorbimento avviene attraverso:

- **Trasporto attivo e passivo:** Utilizzo di proteine di trasporto e canali ionici che permettono il movimento selettivo delle sostanze attraverso le membrane cellulari.
- **Regolazione ormonale:** Ormoni come l'aldosterone e l'ormone antidiuretico (ADH) modulano il riassorbimento di acqua ed elettroliti, influenzando così la concentrazione finale dell'urina.

La **velocità di filtrazione glomerulare (GFR)** è la misura di funzionalità renale più utilizzata e si basa sulla **clearance renale**, definita come il volume di plasma depurato da una sostanza per unità di tempo (ml/min) per effetto della filtrazione glomerulare.

Per utilizzare una sostanza come indicatore della GFR, essa deve:

- essere liberamente filtrabile dai glomeruli.
- avere una concentrazione plasmatica stabile.
- essere filtrata e non essere riassorbita o secreta nei tubuli renali.

### Creatinina

La creatinina è un prodotto del catabolismo della creatina, un composto presente a livello muscolare. Essa non è una proteina e circola nel plasma come molecola con diffusione libera. La creatinina è completamente filtrata dal glomerulo renale, ma presenta una certa secrezione tubulare (circa 19%), che costituisce un difetto nelle stime della velocità di

filtrazione glomerulare (VFG). La quantità di creatinina prodotta è direttamente correlata alla massa muscolare dell'individuo; per questo motivo, gli intervalli di riferimento per la creatinina devono essere stratificati per età e genere, date le significative differenze di massa muscolare che incidono sulla produzione.

**Clearance della Creatinina** Per misurare la clearance della creatinina si esegue una raccolta temporizzata delle urine su un periodo di 24 ore (U-24h) e si preleva un campione di sangue al termine di questo periodo. Tuttavia, tale procedura presenta diverse limitazioni:

1. Difficoltà nella raccolta delle U-24h.
2. La secrezione tubulare della creatinina causa una sovrastima della VFG di circa il 19%.
3. La raccolta delle U-24h è impraticabile per un monitoraggio clinico esteso, come nello screening per malattia renale cronica (CKD).

### Equazioni per la Stima della VFG

L'uso di equazioni basate sulla creatinina plasmatica consente di stimare la VFG con maggiore semplicità rispetto al metodo di clearance delle urine su 24 ore, poiché richiede solo la determinazione della creatinina sierica e misure antropometriche dell'individuo. Tra le equazioni più utilizzate:

- **Adulti:**
  - **CKD-EPI:** Raccomandata dalla Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO).
  - **MDRD Study:** Raccomandata dal National Kidney Disease Education Program (NKDEP).
  - **Cockcroft-Gault:** Correlata alla clearance della creatinina.
- **Bambini:**
  - **Equazione di Schwartz** (versione basata sulla creatinina).
  - **Equazione di Schwartz basata sulla cistatina C** (non richiede l'altezza del bambino).

### Cistatina C: il Marcatore Ideale della VFG?

La cistatina C è considerata un potenziale marcatore ideale della VFG per diverse ragioni:

- È un inibitore delle cistein-proteasi con un peso molecolare di 13 kDa, prodotto a tasso costante da tutte le cellule nucleate.
- È una molecola piccola e dotata di un punto isoelettrico elevato, che la rende liberamente filtrabile al glomerulo.
- Non subisce secrezione tubulare renale né altre vie di escrezione extrarenale conosciute.
- Non è influenzata da variabili come massa muscolare, dieta o genere, ed è indipendente dall'età per bambini oltre un anno e adulti.
- Tuttavia, presenta alcuni fattori confondenti, come disfunzioni tiroidee e trattamenti cortisonici, che possono alterare i suoi livelli.
- Il costo di un test della cistatina C è circa tre volte superiore a quello per la creatinina, limitandone l'uso esteso nella pratica clinica.

### Urea

L'urea è il principale catabolita azotato prodotto dal catabolismo proteico e amminoacidico, permettendo l'escrezione di azoto dall'organismo. Viene prodotta nel fegato e rimossa prevalentemente attraverso le urine. Sebbene sia filtrata liberamente dal glomerulo, una porzione significativa (tra il 40 e il 70%) viene riassorbita a livello tubulare, ritornando così nel plasma. Un aumento della concentrazione di urea nel plasma può indicare una ridotta funzionalità urinaria per cause pre-renali, anche in presenza di una VFG ancora conservata. Altri fattori extrarenali che ne aumentano i livelli includono diete ricche di proteine, un aumento del catabolismo proteico, l'uso di corticosteroidi e il sanguinamento gastrointestinale.

### Azotemia

L'azotemia è la concentrazione plasmatica dell'azoto non proteico, cioè delle sostanze che non precipitano con deproteinizzanti, tra cui spiccano l'urea e, in misura minore, la creatinina.

### Il Rene e le Proteine Plasmatiche

Le proteine plasmatiche vengono filtrate selettivamente dal rene in base al peso molecolare:

- **Molecole di grandi dimensioni ( $\geq 66,5$  kDa)** non attraversano il filtro glomerulare; la loro presenza nelle urine indica una lesione glomerulare.
- **Molecole proteiche più piccole ( $< 66,5$  kDa)** possono attraversare il filtro glomerulare ma vengono riassorbite nel tubulo; la loro presenza nelle urine segnala una lesione tubulare.

### Proteinuria e Albuminuria

La proteinuria e l'albuminuria rappresentano indicatori di lesioni renali, e diversi fattori extra-renali influenzano la loro rilevazione:

- **Fattori preanalitici:**
  - Esercizio fisico intenso.
  - Febbre (si consiglia di attendere 3 giorni prima di effettuare la misurazione).
  - Postura: l'albuminuria può essere influenzata dalla posizione eretta (proteinuria ortostatica).
- **Fattori analitici:**
  - Utilizzo del campione del "1st morning sample", che presenta minore variabilità biologica intraindividuale ed esclude la proteinuria ortostatica.

- Espressione dei risultati nel rapporto albumina/creatinina (ACR) per una maggiore precisione.
- Analisi di almeno due campioni (preferibilmente tre) per una conferma diagnostica.
- Conservazione del campione in frigorifero (non congelare).

### Biomarcatori della Proteinuria

- **eGFR:** Fornisce una stima quantitativa del numero di nefroni funzionanti.
- **Albuminuria:** È un indicatore della qualità della filtrazione glomerulare, essendo l'albumina la principale proteina presente in questa condizione.

### BIOMARCATORI DI LESIONE CELLULARE:

Quando un organo, costituito da tessuto e cellule specializzate, subisce una lesione, la funzione biologica delle sue componenti può essere compromessa. La riduzione dell'efficacia funzionale può manifestarsi in forme diverse, a seconda della gravità del danno e della capacità di recupero dell'organo stesso. In situazioni in cui le cellule sono irrimediabilmente compromesse, può subentrare la morte cellulare, che si verifica quando le cellule subiscono danni irreversibili.

Il danno che si verifica a livello cellulare può interessare diverse strutture e compartimenti, compromettendo l'integrità della membrana, il citoplasma e, infine, le strutture nucleari. La rottura dell'equilibrio funzionale della cellula rappresenta un passaggio verso processi degenerativi più gravi, come la necrosi, quando il danno diviene irreversibile.

#### Marcatori biochimici di lesione cellulare

I marcatori biochimici della lesione cellulare sono molecole, generalmente di natura proteica, che possono svolgere attività enzimatica e fungono da indicatori dello stato di integrità cellulare.

Queste molecole, normalmente presenti all'interno delle cellule, vengono rilasciate nel circolo sanguigno a seguito di un danno cellulare di qualsiasi natura. I livelli di questi marcatori sono misurabili mediante diversi metodi analitici, tra cui tecniche immunogeniche (ad esempio, immunoassay), che identificano e quantificano specifici enzimi. L'aumento di concentrazione di tali molecole nel sangue rappresenta un segnale diagnostico importante per la valutazione del danno tissutale.

#### CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE E MOLECOLARI DEI BIOMARCATORI DI LESIONE CELLULARE

Per valutare l'efficacia e l'affidabilità di un biomarcatore, sono considerate diverse caratteristiche:

- **Peso molecolare:** Il peso molecolare è una delle proprietà determinanti l'efficacia di un biomarcatore. Più una proteina è piccola, più facilmente può attraversare la membrana cellulare in caso di lesione. Quando una cellula subisce un danno iniziale, la perdita dell'integrità della membrana è uno dei primi segnali di compromissione: la membrana non riesce più a regolare adeguatamente gli scambi tra interno ed esterno della cellula. In uno stadio avanzato, quando il danno diventa irreversibile e progredisce fino alla necrosi, si favorisce il rilascio nel circolo sanguigno di molecole a basso peso molecolare, come le proteine citoplasmatiche, che fungono da marcatori precoci del danno. Le proteine con peso molecolare elevato, spesso legate a funzioni strutturali, sono invece rilasciate più tardi e solo in caso di lesioni cellulari gravi.
- **Compartimentazione intracellulare:** La localizzazione della proteina all'interno della cellula (citoplasma, membrana, nucleo, organelli) influisce sul suo potenziale come marcatore precoce o tardivo di lesione. Le proteine citoplasmatiche, per esempio, sono generalmente liberate prima rispetto a quelle più interne o strutturali.
- **Clearance plasmatica:** La clearance, o velocità di eliminazione dal circolo sanguigno, è un altro parametro critico. Le proteine di dimensioni ridotte vengono generalmente eliminate più rapidamente dai reni, e ciò può influire sulla durata della loro rilevanza nel plasma. Di conseguenza, i marcatori a basso peso molecolare sono utili per rilevare lesioni acute, mentre quelli a peso molecolare maggiore possono persistere più a lungo in circolo e segnalare danni più protratti.
- **Immunogenicità:** La capacità di una proteina di stimolare una risposta immunitaria dipende dal riconoscimento di tali proteine come estranee (non-self). Questo può rappresentare un vantaggio diagnostico, poiché le proteine con forte immunogenicità possono essere rilevate con alta precisione mediante test immunologici.
- **Eterogeneità e instabilità molecolare:** La presenza di isoforme multiple di una proteina (varianti prodotte da splicing alternativo, modificazioni post-traduzionali, ecc.) può complicare la rilevazione di un biomarcatore specifico. Quando una proteina intracellulare è rilasciata nel circolo sanguigno, può subire ulteriori modifiche per l'azione di enzimi proteolitici, che ne alterano la struttura originaria producendo isoforme variabili. Questa instabilità può ostacolare la rilevazione accurata, soprattutto se gli anticorpi utilizzati nei test non riconoscono tutte le isoforme.

#### CARATTERISTICHE FISIOPATOLOGICHE DEI BIOMARCATORI DI LESIONE

Le caratteristiche fisiopatologiche di un biomarcatore determinano la sua idoneità a segnalare danni cellulari specifici. Alcuni criteri fondamentali, quali sensibilità, specificità e precocità, sono essenziali per determinare l'utilità di un biomarcatore.

- **Sensibilità fisiopatologica:** La sensibilità di un biomarcatore è data dalla sua concentrazione intracellulare rispetto alla sua concentrazione in circolo in condizioni normali. Se un biomarcatore è molto concentrato all'interno di una cellula e generalmente assente nel sangue, una minima lesione è sufficiente a rilasciarlo in quantità rilevabili in circolo. Questo permette di riconoscere anche danni cellulari di lieve entità, rendendolo sensibile come indicatore precoce di lesione.

- **Specificità fisiopatologica:**

La specificità rappresenta l'affidabilità del biomarcatore nel riflettere una lesione a carico di un tessuto specifico. Un biomarcatore ideale dovrebbe essere esclusivamente presente nelle cellule di un tessuto specifico, non in altri tessuti o in circolo in condizioni fisiologiche. La sua rilevazione in circolo, quindi, indicherebbe con chiarezza un danno proprio di quel tessuto. Ad esempio, per una lesione epatica, la presenza di un biomarcatore esclusivo del fegato (come l'alanina aminotransferasi, ALT) in circolo suggerisce inequivocabilmente un danno epatico.

- **Precocità fisiopatologica:**

La capacità di un biomarcatore di segnalare una lesione in tempi rapidi è cruciale per una diagnosi tempestiva. La precocità dipende dalla **cinetica di dismissione** e dalla **finestra diagnostica**.

- **Cinetica di dismissione:**

La cinetica di dismissione descrive l'andamento temporale della concentrazione di un biomarcatore dopo il danno cellulare.

È influenzata dal peso molecolare e dalla compartimentazione intracellulare: molecole più piccole e citoplasmatiche tendono a essere rilasciate più rapidamente. La concentrazione di un biomarcatore aumenta in circolo in modo proporzionale all'entità del danno, raggiungendo un picco massimo; se resta elevata, consente la diagnosi anche a distanza di ore o giorni. Idealmente, un biomarcatore dovrebbe raggiungere il picco in tempi brevi e mantenere livelli rilevabili per un periodo sufficiente per favorire diagnosi a breve e lungo termine. Se la concentrazione cala e poi risale, ciò può indicare una recidiva della patologia. Ad esempio, un biomarcatore muscolare che continua a essere elevato in circolo, invece di diminuire, può segnalare che la lesione non sta guarendo come previsto, suggerendo una mancata efficacia degli interventi terapeutici.

- **Finestra diagnostica:**

La finestra diagnostica rappresenta il periodo durante il quale il biomarcatore rimane rilevabile in circolo. Un biomarcatore ideale dovrebbe essere visibile poco dopo la lesione, mantenere livelli rilevabili per un periodo sufficientemente lungo, e scendere lentamente al di sotto del livello decisionale una volta che il tessuto si è rigenerato.

### **Principale Caratteristica Diagnostica: Specificità**

La specificità di un biomarcatore è il criterio diagnostico principale, e può essere aumentata stabilendo un livello decisionale (o cutoff) preciso per la concentrazione minima rilevabile dal metodo analitico. Questo rende possibile riconoscere anche lesioni minime con elevata accuratezza e permette una rilevazione precoce del danno.

### **ESEMPI DI BIOMARCATORI SPECIFICI PER LA DIAGNOSI DI LESIONE D'ORGANO**

I biomarcatori di lesione d'organo sono utilizzati per rilevare e monitorare danni specifici in vari tessuti. Ogni biomarcatore presenta caratteristiche uniche di sensibilità e specificità per l'organo di origine, rendendolo uno strumento diagnostico prezioso in medicina clinica.

#### **Troponine: Biomarcatori Cardiospecifici**

Le troponine, in particolare le isoforme **I** e **T**, sono considerate i marcatori ideali per rilevare lesioni miocardiche grazie alla loro specificità assoluta per il tessuto cardiaco. Queste isoforme sono presenti esclusivamente nei miocardiociti e non sono rilevabili nel circolo sanguigno in assenza di danno cardiaco. A differenza della troponina C, che è comune anche al muscolo scheletrico, le troponine I e T possiedono una isoforma cardiospecifica.

Quando si verifica una lesione miocardica, anche un rilascio minimo di troponina nel circolo è sufficiente per suggerire un danno al miocardio. La troponina T e la troponina I vengono rilasciate rapidamente dalle cellule danneggiate, raggiungendo il picco entro 24 ore e persistere nel sangue per alcuni giorni. Grazie a test di laboratorio altamente sensibili (che rilevano livelli in nanogrammi per litro), anche concentrazioni minime di queste troponine possono essere rilevate, consentendo diagnosi precoci e precise. Questo ha portato alla definizione universale dell'infarto miocardico, che si basa sull'aumento delle troponine in combinazione con sintomi ischemici, alterazioni all'ECG o evidenze di ischemia all'imaging. Un valore di troponina al di sopra del 99° percentile della popolazione di riferimento è considerato decisivo per la diagnosi di infarto miocardico.

#### **Creatinchinasi (CK): Biomarcatore per Danni Muscolari**

La **creatinchinasi (CK)** è un enzima specifico del muscolo scheletrico e viene utilizzato principalmente per identificare lesioni o danni muscolari. La sua rilevazione è particolarmente utile in condizioni come la rabdomiolisi o in caso di traumi muscolari significativi. La creatinchinasi, infatti, catalizza la fosforilazione della creatina, un processo energetico essenziale nei tessuti muscolari, e il suo aumento nel sangue è indicativo di un danno muscolare.

#### **Alanina-Aminotransferasi (ALT): Biomarcatore Epato-specifico**

L'**alanina-aminotransferasi (ALT)** è un enzima che svolge un ruolo cruciale nel metabolismo degli aminoacidi ed è quasi esclusivamente presente nel fegato. In condizioni normali, l'ALT è scarsamente rilevabile in circolo, ma in caso di lesioni epatiche, come epatiti o danni al parenchima epatico, i livelli sierici di ALT aumentano significativamente. L'ALT è più

epatospecifica rispetto ad altri enzimi, come l'aspartato-aminotransferasi (AST), e i suoi valori rimangono elevati più a lungo, permettendo una diagnosi precisa e monitoraggio prolungato delle epatopatie.

#### **Lipasi: Biomarcatore Pancreatico**

La **lipasi** è un enzima altamente specifico per il pancreas, con concentrazioni nel tessuto pancreatico notevolmente più alte rispetto ad altri organi. Questo enzima è essenziale nella digestione dei grassi e la sua presenza in circolo, a livelli superiori alla norma, è indicativa di condizioni patologiche come la pancreatite acuta. In caso di pancreatite, i livelli di lipasi, insieme a quelli dell'amilasi, aumentano significativamente nei primi giorni dall'insorgenza della lesione, offrendo una finestra diagnostica efficace per questa condizione.

#### **Applicazioni Cliniche dei Biomarcatori di Lesione**

1. **Infarto Miocardico:** La misurazione delle troponine cardiache è essenziale per la diagnosi di infarto. La rilevazione di un aumento delle troponine cardiache al di sopra del 99° percentile, associato a sintomi di ischemia e/o alterazioni all'ECG, conferma la diagnosi di infarto miocardico. La capacità di rilevare concentrazioni minime di troponina grazie a test ipersensibili permette diagnosi rapide, anche per eventi ischemici lievi.
2. **Pancreatite Acuta:** I livelli sierici di lipasi e amilasi aumentano in modo significativo nei primi giorni dall'insorgenza della pancreatite, consentendo una diagnosi tempestiva. La lipasi, in particolare, presenta una maggiore specificità per il pancreas e rimane elevata più a lungo rispetto all'amilasi, offrendo un marker di lesione più affidabile nel tempo.
3. **Epatopatie:** In caso di danno epatico, i livelli sierici di ALT aumentano parallelamente a quelli di AST, ma l'ALT offre una maggiore specificità per il fegato, essendo quasi esclusivamente presente nel tessuto epatico. Incrementi di ALT sono tipici delle epatiti e di altre lesioni epatiche e persistono più a lungo rispetto ad altri enzimi, permettendo un monitoraggio efficace.

## **BIOCHIMICA CLINICA DELLA GRAVIDANZA FISIOLÓGICA**

L'**hcg** è un'analita fondamentale nel **monitoraggio della gravidanza fisiologica**, utilizzato come principale indicatore per verificare l'inizio di una gravidanza. La sua rilevazione permette di stabilire se una donna è in stato di gravidanza o meno tramite il cosiddetto **test di gravidanza**.

L'hcg è un ormone secreto dalle cellule sincizio trofoblastiche della placenta. La sua funzione principale è stimolare il corpo luteo a produrre progesterone, essenziale per sostenere l'inizio e la continuazione della gravidanza bloccando le mestruazioni.

La ricerca dell'hcg viene eseguita su due diverse **matrici biologiche**:

- **Urine:** qui il test è qualitativo, ovvero fornisce un risultato binario di tipo positivo/negativo che indica semplicemente la presenza o assenza dell'hcg.
- **Sangue:** in questa matrice si effettua una misura quantitativa, cioè si rileva la concentrazione esatta di hcg, permettendo una stima più precisa del livello dell'ormone.

#### **CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE DELL'HCG**

Per essere efficace come biomarcatore, l'hcg presenta alcune specifiche caratteristiche biochimiche:

- **Struttura:** l'hcg è una glicoproteina eterodimerica, composta da due catene peptidiche distinte: la **catena alfa** e la **catena beta**, codificate da geni diversi e situate su cromosomi distinti. La struttura complessiva dell'hcg è tenuta insieme da un ponte disolfuro, formando una struttura stabile ma allo stesso tempo misurabile.
- **Peso molecolare:** con un peso molecolare di circa 38.000 dalton, l'hcg è eliminata tramite il rene, il che consente la sua rilevazione nelle urine.

La presenza di residui glucidici sulla molecola, benché tipica delle glicoproteine, non ha un impatto diagnostico rilevante ma rappresenta una caratteristica post-traduzionale comune.

#### **METODI DI MISURAZIONE DELL'HCG**

Esistono diversi saggi di laboratorio per misurare l'hcg, ognuno con un significato diagnostico specifico, mirato alla rilevazione di molecole diverse non intercambiabili.

1. **Hcg intatta:** questa forma, utilizzata come test di gravidanza, misura l'eterodimero completo (catene alfa e beta combinate). La presenza dell'hcg intatta nel sangue e nelle urine indica lo stato di gravidanza.
2. **Beta-hcg libera (free beta-hcg):** solo la catena beta dell'hcg viene misurata singolarmente in alcuni casi particolari. Ad esempio, tra la 15<sup>a</sup> e la 18<sup>a</sup> settimana di gravidanza, la beta-hcg libera può essere utilizzata come indicatore nel **test di screening per la trisomia 21** (sindrome di down) nella prole.
3. **Hcg totale:** utilizzato come **marcatore tumorale** per specifici tipi di tumori (come quelli dei testicoli), il saggio di hcg totale deve poter rilevare sia l'hcg intatta che la beta-hcg libera. Questo è particolarmente importante nei tumori che producono entrambe le forme di hcg.

#### **MECCANISMO DI PRODUZIONE DELL'HCG**

1. **Fecondazione e impianto:** dopo la fecondazione, l'ovulo fertilizzato inizia a dividersi e passa attraverso diverse fasi (morula, blastocisti). Dopo circa una settimana, si impianta nell'endometrio uterino.

2. **Produzione di hcg:** successivamente all'impianto, si formano le cellule sinciziotrofoblastiche, che iniziano a produrre l'hcg. Questo intervallo temporale è fondamentale per calcolare il momento in cui il test di gravidanza diventa positivo, poiché l'hcg inizia a essere prodotto solo alcuni giorni dopo l'impianto.

### TEST DI GRAVIDANZA SU URINE: METODOLOGIA IMMUNOCROMATOGRAFICA

Il test di gravidanza nelle urine sfrutta un metodo **immunocromatografico**, con le seguenti caratteristiche:

- **Anticorpi anti-hcg:** sono presenti due tipi di anticorpi: un anticorpo di cattura, legato alla fase solida, e un anticorpo di rilevazione che sviluppa un colore visibile tramite un cromogeno.
- **Funzionamento:** gli anticorpi vengono liofilizzati e attivati dal contatto con l'urina, idratandosi e diventando capaci di legare l'hcg presente nel campione.
- **Risultato visivo:** una singola barra indica che il sistema di controllo funziona correttamente, mentre la comparsa di due barre segnala la presenza dell'hcg e, quindi, una gravidanza.

Questi test sono progettati per il **self-testing**, consentendo a chiunque di eseguire autonomamente la rilevazione della gravidanza. Tuttavia, è importante che il test venga eseguito in tempi appropriati, preferibilmente dal giorno previsto per l'inizio delle mestruazioni.

L'automisurazione dell'hcg rappresenta un progresso importante nella medicina di laboratorio, migliorando l'accessibilità e la tempestività nella diagnosi precoce di gravidanza e nell'individuazione di specifiche condizioni ostetriche e oncologiche.

### GONADOTROPINA CORIONICA UMANA (HCG): FATTORI DIAGNOSTICI E MONITORAGGIO DELLA GRAVIDANZA

L'hcg, ormone prodotto dalle cellule sinciziotrofoblastiche della placenta, è un indicatore chiave nel test di gravidanza e nel monitoraggio del primo trimestre. Tuttavia, i risultati diagnostici possono essere influenzati da vari fattori che provocano falsi negativi o falsi positivi.

#### Possibili falsi negativi nel test di gravidanza hcg

**Test effettuato troppo precocemente:** se il test è eseguito prima di 7 giorni dall'impianto, la concentrazione di hcg può essere troppo bassa per essere rilevata (solitamente tra 74 e 105 u/l). Un test effettuato prematuramente potrebbe non rilevare la gravidanza, anche se in corso.

**Test effettuato troppo tardivamente per eccesso di antigeni:** in alcuni casi, un'elevata concentrazione di hcg può sovraccaricare il sistema diagnostico, riducendo la capacità dell'anticorpo di legarsi all'antigene in eccesso. In questo caso, la saturazione del reagente può impedire il rilevamento corretto del segnale.

**Urine diluite:** le urine troppo diluite possono contenere una concentrazione di hcg inferiore alla soglia di rilevamento del test. Per questo motivo, è consigliato utilizzare le **prime urine del mattino**, quando l'hcg è più concentrata, o evitare di forzare la diuresi prima del test.

#### Possibili falsi positivi nel test di gravidanza hcg

1. **Aborto precoce:** un test positivo seguito da una concentrazione molto bassa di hcg nel sangue può indicare un aborto precoce, caratterizzato da un'interruzione della gravidanza in una fase iniziale.
2. **Assunzione di farmaci contenenti hcg:** alcuni farmaci utilizzati per trattamenti di fertilità contengono hcg e possono causare un risultato positivo temporaneo al test di gravidanza.
3. **Condizioni patologiche con produzione di hcg:** alcune condizioni, come il tumore ovarico o il carcinoma testicolare, producono hcg. Anche dopo la menopausa, altre cellule possono sintetizzare hcg. In questi casi, la positività delle urine va confermata con test del sangue per evitare diagnosi erranee.

#### Andamento della concentrazione di hcg e monitoraggio della gravidanza

Durante il primo mese di gravidanza, la concentrazione di hcg raddoppia ogni 2-3 giorni. Questo andamento fisiologico consente di monitorare lo stato di salute della gravidanza.

- **Test sulle urine vs. Esame del sangue:** per monitorare adeguatamente la gravidanza e ottenere dati quantitativi, il test sulle urine non è sufficiente. L'esame del sangue è più indicato per rilevare i livelli precisi di hcg, consentendo di stimare l'età gestazionale e diagnosticare eventuali patologie.
- **Patologie del primo trimestre:**
  - **Gravidanza ectopica:** questa condizione si verifica quando l'embrione si impianta al di fuori dell'utero, spesso nelle tube. In tali casi, l'hcg non segue il normale ritmo di raddoppiamento ma aumenta solo del 66%, un segno di allarme.
  - **Interruzione di gravidanza:** una progressione anomala (aumento-stabilizzazione-diminuzione dell'hcg) richiede un monitoraggio continuo. Se entro 15 giorni l'hcg non viene più prodotta, significa che la gravidanza è interrotta. Diversamente, l'hcg persistente può segnalare la presenza di cellule sinciziotrofoblastiche residue.
- **Gravidanza multipla e mola vescicolare:** durante il primo trimestre, concentrazioni più elevate di hcg rispetto a una gravidanza fisiologica possono indicare una **gravidanza multipla** o una **mola vescicolare**, una patologia dovuta alla proliferazione anomala del tessuto trofoblastico.

#### Modificazioni del profilo biochimico in gravidanza

La gravidanza, considerata una **condizione parafisiologica**, comporta adattamenti metabolici significativi, tra cui:

- **Aumento degli ormoni steroidei:** incremento di estrogeni e progesterone, influenzando il metabolismo lipidico e glucidico.

- **Emodiluizione:** la componente extracellulare del sangue aumenta più rapidamente rispetto alla componente cellulare, causando una riduzione della concentrazione di emoglobina e altre sostanze.

### **DIABETE MELLITO GESTAZIONALE**

Il Diabete Mellito Gestazionale (GDM) è una comune complicazione della gravidanza. Viene definito come il diabete diagnosticato nel secondo o terzo trimestre e che non era presente nella donna prima della gravidanza (ADA 2018). È importante notare che il GDM rappresenta una condizione clinica distinta dal diabete di tipo 1 e di tipo 2.

#### **Diagnosi del GDM**

Per diagnosticare il GDM, è fondamentale eseguire un test della glicemia plasmatica a digiuno su tutte le donne in gravidanza:

1. **Se il risultato è  $\geq 126$  mg/dL:** viene diagnosticato il Diabete Mellito, non il GDM.
2. **Se il risultato è  $< 126$  mg/dL:**
  - a. **Se la glicemia plasmatica a digiuno è  $\geq 92$  mg/dL:** si diagnostica il Diabete Gestazionale.
  - b. **Se la glicemia plasmatica a digiuno è  $< 92$  mg/dL:** è necessario pianificare un test di carico con 75 g di glucosio, da effettuarsi tra la 24<sup>a</sup> e la 28<sup>a</sup> settimana di gestazione.

#### **Raccomandazioni per la diagnosi**

Nel 2011, le raccomandazioni dell'ADA hanno modificato i criteri di diagnosi del GDM, aumentando la prevalenza stimata di questa condizione al 18%. È stato consigliato di non utilizzare il valore della glicemia plasmatica a digiuno ( $\geq 92$  mg/dL) durante la prima visita prenatale per diagnosticare il GDM. Questo cambiamento è motivato dal fatto che molte donne in gravidanza effettuano gli esami ematochimici molto presto (tra la 6<sup>a</sup> e la 7<sup>a</sup> settimana di gestazione), prima che si stabilizzino i cambiamenti ormonali associati alla gravidanza. Questi cambiamenti possono portare a una riduzione della glicemia a digiuno, che normalmente si verifica a partire dalla 16<sup>a</sup> settimana.