

## Analisi Chimica del siero

Il sangue **veicola** un grande numero di sostanze, e i **liv. ematici** di queste sostanze dipendono da **processi metabolici** o da eventuali **patologie** in corso. Il riscontro di **alterazioni** nei livelli plasmatici di queste sostanze è di **notevole importanza** per la diagnosi di numerose malattie a l'adeguata terapia. Le **sostanze** normalmente misurate nel siero possono essere distinte nelle seguenti categorie ->

-> **sostanze normalmente presenti nel siero che svolgono una funzione fisiologica.**

*glucosio, ioni come Cl, K, Na, Bicarbonato, Ca, Mg, Pi, proteine come albumina, trigliceridi, colesterolo, ormoni e vitamine.*

-> **metaboliti** tra cui annoveriamo l'urea, l'acido urico, la creatinina, gli ioni ammonio, e la bilirubina.

-> **sostanze rilasciate dalle cellule come conseguenza di eventi proliferativi anomali o di aumentata permeabilità della membrana conseguenza di un danno cellulare.** Tra queste si annoverano la *lattico deidrogenasi, la alanina transferasi, la aspartato aminotrasferasi la creatina chinasi CK, le amilasi e le fosfatasi (alcalina ed acida).*

-> **farmaci o sostanze tossiche** tra cui *antibiotici, cardiotonici ed antiaritmici, anti convulsi vanti, salicilati, alcool ed altre sostanze assunte dai tossicodipendenti*

Il **plasma** rappresenta la frazione del sangue in equilibrio con i tessuti e contenente tutte le **sostanze** di origine tissutale, di conseguenza quasi **tutti gli esami** ematochimici si svolgono su **plasma** o più comunemente su **siero**, che rappresenta la parte liquida separata per centrifugazione dal **sangue coagulato**. Rappresenta quindi plasma privo dei fattori della coagulazione e di fibrinogeno, ed è il campione più frequentemente **utilizzato** nei test di chimica clinica. Per la preparazione, si utilizzano o provette contenenti **granuli** di un materiale **non solubile** che accelera la coagulazione oppure provette con un **gel** che durante il processo si **interpone** tra coagulo e siero. Altre sostanze, localizzate **anche negli eritrociti**, sono misurate nel **sangue intero** (*gas, metalli, farmaci*).

## Carboidrati

### Cenni sul metabolismo

Il **glucosio** fornisce la maggior parte della energia utilizzata nei processi cellulari. Negli alimenti è presente in forma di **polisaccaridi** (amido) o di **disaccaridi** (*saccarosio, lattosio, maltosio*), idrolizzati rispettivamente dalla *amilasi* e dalle *disaccaridasi* (*lattasi, maltasi, saccarasi*). I principali **metaboliti intermedi** del metabolismo del glucosio sono l'*acido piruvico, l'acido lattico e l'acetil CoA*. L'energia ottenuta dal met. del glucosio viene immagazzinata nei legami dell'ATP.

Il glucosio è **immagazzinato** nel **fegato** e nel **muscolo** sotto forma di **glicogeno**, oppure una seconda via metabolica può trasformare nel fegato il glucosio in **acidi grassi**, depositati nel tessuto adiposo, oppure in **amminoacidi**, usati per la sintesi proteica. Il **fegato** ha un ruolo **chiave** nell'indirizzare le molecole di glucosio verso le vie **cataboliche** per la produzione di energia, o quelle **anaboliche** per l'immagazzinamento o la biosintesi. Quando i depositi di glucosio sono esauriti, il fegato può **sintetizzare glucosio** mediante la **gluconeogenesi** da AA o dal glicerolo dei trigliceridi.

La **glicemia** è controllata da diversi meccanismi omeostatici ed è mantenuta entro i **70** e i **110 mg/dl**.

La determinazione della **glicemia** viene effettuata per ottenere una stima dell'**efficienza** di questi meccanismi omeostatici.

### *Misura della glicemia.*

La maggior parte dei laboratori misurano la glicemia in campioni di **siero**, ma poiché il siero ha una [acqua] > del sangue intero, e dato che il glucosio è disciolto nell'acqua, la concentrazione misurata nel siero tende ad essere **più elevata** di quella presente nel sangue intero.

La **permanenza** del sangue nelle provette **non** è consigliata in quanto il glucosio contenuto nel campione può essere **metabolizzato** dalle cellule ivi contenute, fino a che non sono separate per centrifugazione. La **velocità** con cui questo processo avviene **dipende** dalla **temperatura**. Se la temperatura è **bassa**, la concentrazione del glucosio può rimanere **stabile** per diverse ore. A **t ambiente** la concentrazione del glucosio si riduce dell'**1-2%** ogni ora. Per prevenire questa fonte d'errore, si può conservare il campione in provette con **fluoruro**, che inibisce la glicolisi. Il **glucosio** si mantiene costante anche in campioni nelle normali provette da ematochimica dopo che **siero** e **cellule** sono stati **separati** per centrifugazione. Campioni preparati in questo modo sono utili anche per misurare **altri parametri ematochimici**.

### *Metodologia di misurazione della glicemia*

Le **metodiche** utilizzabili sono essenzialmente 2 ->

-> **metodo vecchio** sfrutta le proprietà **riducenti** del glucosio. L'indicatore presente nella miscela, ridotto dal glucosio, **cambia colore**. La presenza di **altre sostanze riducenti** può sfasare i risultati.

-> **metodi enzimatici** sono basati sull'impiego di **esochinasi** o di **glucosio-ossidasi** enzimi che hanno come **substrato** solo il glucosio e non altre sostanze. La quantità di **glucosio** modificata dall'enzima è poi misurata nella miscela di reazione attraverso una **reazione colorimetrica** oppure attraverso un **sistema di misurazione dell'O<sub>2</sub>** (se la reazione enzimatica avviene con consumo di ossigeno). Effettuando diverse determinazioni nell'intervallo di pochi minuti, gli analizzatori possono calcolare la **velocità** della reazione che è **proporzionale** alla concentrazione del glucosio, tecnicamente preferibile alla semplice determinazione della **quantità del glucosio**.

Oggi sono presenti degli **analizzatori** per uso personale che determinano i liv. glicemici analizzando una **goccia** di sangue. Sono utili perché forniscono misure rapide al paziente, mediante le quali esso può **modificare** la terapia o la dieta in corso, ma molti sono **influenzati** dal valore dell'**Ht**. La glicemia è **più elevata** se l'**Ht** è **basso** e viceversa.

La determinazione della glicemia fornisce informazioni sullo **stato glicemico** nel momento in cui si esegue l'esame, mentre per ottenere una valutazione che si riferisce a periodi di tempo più estesi si può **dosare l'Hb glicosilata**, che si ha quando i liv. glicemici si mantengono elevati per parecchio tempo, e si ottiene mediante la **elettroforesi** o con metodi **cromatografici** su di un lisato di eritrociti.

### *Zuccheri diversi dal glucosio*

-> **fruttosio** alti liv. di fruttosio sono evidenziati in pazienti con alcune enzimopatie rare.

quando si usavano i metodi di dosaggio del glucosio basati sulle sue proprietà riducenti, la **fruttosemia** veniva evidenziata sulla base di un inaspettato **aumento** dei liv. di glucosio.

Oggi invece deve essere specificamente **ricercata e verificata**. I pazienti con questo difetto presentano l'impossibilità, per la mancanza di enzimi alternativi per il catabolismo del fruttosio, di ricavare **glucosio** da altri zuccheri. Non essendo quindi disponibile il glicogeno come fonte di riserva di glucosio (per la **inibizione** della **fosforilasi**) si ha **ipoglicemia**.

-> **galattosio** nella **galattosemia** è carente uno degli Enzimi che prendono parte al met. del galattosio. L'aumento dei liv. di galattosio nei primi giorni di vita del neonato provoca **gravi** alterazioni **fisiche e mentali**. Il test di screening è effettuato nelle **urine**,

### **Composti azotati non proteici**

Questo gruppo comprende sostanze a **basso** PM contenenti azoto N (*azoto non proteico*). Tra queste vi sono **urea, creatinina** ed **acido urico**, che rappresentano metaboliti intermedi del met. delle **proteine** e degli **acidi nucleici**. Sono normalmente presenti nel sangue in concentrazioni di **mg/dl** in quanto sono **velocemente** eliminate con le urine.

### **UREA**

#### **Cenni sul Metabolismo**

Enzimi detti **aminotransferasi** catalizzano il **trasferimento** di gruppi aminici tra gli AA, che possono anche essere **rimossi** dalle molecole amminoacidiche nelle reazioni di **interconversione** e riutilizzati dal pool di AA circolante. I gruppi aminici sono liberati in forma di **ioni ammonio** e, giunti nel fegato, sono usati per la sintesi dell'**urea**. L'urea diffonde nei liquidi **intra** ed **extra** cellulari, viene concentrata nelle urine e poi eliminata. In condizioni di equilibrio, vengono **escreti 25g** di urea per dì.

#### **Misurazione della concentrazione di urea**

I metodi **chimici** per la misurazione della concentrazione di urea nel siero sono stati **sostituiti** quasi completamente da metodi **enzimatici**, che impiegano le **ureasi**, enzimi altamente specifici per l'urea. I dosaggi della concentrazione dell'urea sono **corretti** ed **espressi** come **contenuti di azoto della molecola**, parametro riferito come **Concentrazione di azoto ureico (BUN)**. Se si tiene conto della intera molecola dell'urea, in cui l'N occupa i **28/60** del **PM**, si deve moltiplicare il **BUN** per **2.14**.

#### **Considerazioni cliniche**

I valori di BUN nei maschi sono leggermente **superiori** a quelli nelle femmine e sono indice del **catabolismo** delle proteine. Il **BUN** è ai valori superiori della norma nel caso di diete **iperproteiche**. Bassi valori di **BUN** non sono generalmente considerati patologici in quanto sono ritenuti la conseguenza di una **dieta a basso apporto proteico** oppure ad una **riduzione del volume plasmatico**. Valori **molto ridotti** di **BUN** sono un imp. parametro delle **epatopatie gravi**.

-> L'**aumento** della [urea] nel sangue è definita **uremia**, anche se spesso questo termine è riferito all'**aumento di concentrazione** di **tutti** i prodotti del catabolismo dell'azoto. La **causa più comune** di uremia è la **ridotta escrezione renale di urea** per insufficienza renale.

-> Con **iperazotemia** si intende l'**aumento** di **tutti** i composti azotati a basso **PM**

-> Con **uremia pre-renale**, si intende la uremia causata da **meccanismi** che agiscono a monte della **filtrazione glomerulare**, quindi *shock, disidratazione, o aumento catabolismo prot.*

-> Con **uremia post-renale** si intende la uremia causata da **ostruzione** delle vie urinarie a liv. degli ureteri, della vescica o dell'uretra.

-> Con **uremia renale** si intende la uremia causata da **patologie** che provocano lesioni a carico dei **glomeruli**, del **microcircolo renale** o dei **tubuli renali**.

## CREATININA

### Cenni sul Metabolismo

E' il prodotto terminale del metabolismo della **creatina**. E' presente nel **muscolo scheletrico** dove partecipa come **creatina fosfato** ai processi di **immagazzinamento dell'energia**. La **creatina fosfato CP** è convertita a **creatina** in una reazione accoppiata con la sintesi di **ATP** dall'**ADP**. Nel corso della reazione, mano mano che la energia è utilizzata e la **CP** rigenerata, una **parte** della creatina viene trasformata in **creatinina**, portata nel sangue ed **eliminata dai reni**. I valori normali della **creatininemia** sono per il **maschio** di **0.6/1.3 mg/dl** e per la **donna** di **0.5/1 mg/dl**.

La produzione **giornaliera** di creatinina resta **costante** a meno che non si abbia **degenerazione** del tessuto muscolare per **traumi** da schiacciamento o per **miopatie degenerative**. La **filtrazione glomerulare** influenza l'escrezione di **creatinina** meno di quella di urea, in quanto la prima può essere **compensata** da una **maggiore** escrezione dai **tubuli**.

### Considerazioni cliniche

La **creatininemia** aumenta quando la **funzione renale diminuisce**. Se la funzione renale declina lentamente e insieme si ha anche una **riduzione** della massa muscolare, allora la **creatininemia** inizialmente può rimanere a **liv. normali**, ma la **velocità** di escrezione (**clearance**) nelle **24h** sarà **inferiore**. La **Clearance** della creatinina è un importante **indice di funzionalità renale**.

Il **rapporto tra BUN e creatinina** permette di **discriminare** tra le possibili cause di uremia.

-> in **condizioni normali**, il rapporto è compreso tra **12 e 20**.

-> se il **rapporto è superiore a 20**, allora vuol dire che i valori di **BUN** sono > di quelli della **creatinina** ed è indice di una uremia di origine **non-renale** (spesso pre-renale)

-> se il **rapporto è inferiore a 12**, allora vuol dire che i valori di **BUN** sono < di quelli della **creatinina**, e ciò si ha nel **trapianto renale** e dopo **terapia dialitica**, dove la **[urea]** si abbassa più velocemente di quella della creatinina, che è meno influenzata dalla funzione renale

-> nella **insufficienza renale cronica**, i livelli di **urea** aumentano costantemente mentre quelli di **creatinina** raggiungono un **plateau**, in quanto questa può essere **eliminata** anche tramite l'apparato **gastrointestinale**.

## ACIDO URICO

### Cenni sul Metabolismo

L'acido urico è il **prodotto terminale** del **catabolismo delle purine**. La sintesi e la degradazione di **RNA** e di **DNA** comportano un **continuo** ricambio del **pool purinico** dell'organismo. La sintesi di ac.



urico si ha nel **fegato**. L'ac. urico nel sangue arriva ai reni dove viene **filtrato**, parzialmente **riassorbito** e anche **attivamente secreto** prima di essere concentrato nelle urine. Con una dieta a **basso contenuto** purinico l'escrezione giornaliera di ac. urico è di **0.5 g**, con una dieta normale, il valore **raddoppia**.

### Iperuricemia

L'ac. urico è **poco solubile**, quando la sua concentrazione è **elevata**, può **precipitare** e formare **crystalli** di **urato** e quindi di **calcoli** (se ciò avviene nelle urine). Cristalli di urato possono precipitare anche nei **tessuti connettivi**, in particolare nelle articolazioni determinando la **gotta**. La presenza dei cristalli innesca **reazioni infiammatorie** con rilascio di **enzimi leucocitari**, **danno tissutale** ed **acidificazione** dell'ambiente che porta ad ulteriore **deposito** di cristalli. Le articolazioni diventano quindi **gonfie dolenti** ed **infiammate**. I liv. di ac. urico sono **maggiori** nella popolazione maschile, quindi la gotta è più **frequente** nell'uomo che nella donna.

L'**uricemia** è influenzata sia dalla produzione (si ha aumento in corso di *leucemie* o di altri *tumori maligni* con attiva proliferazione cellulare, che porta ad un **aumento** di ac. urico e alla possibile **precipitazione** di questo nei reni, con conseguente **insufficienza renale acuta**) che dalla escrezione di ac. urico. La **gotta** si può classificare in ->

-> **primaria** se è provocata da una **iperproduzione** o da una ridotta **escrezione** tubulare

-> **secondaria** se è dovuta ad una **iperproduzione** di ac. urico, conseguente ad **aumentato** ricambio degli ac. nucleici, o ad una ridotta **escrezione** dovuta ad una **nefropatia** acquisita.

La **terapia** si ottiene utilizzando farmaci **uricosurici** oppure inibendo l'attività della **xantina-ossidasi** e mantenendo **alcalino** il Ph delle urine.

### ALTRE SOSTANZE AZOTATE NON PROTEICHE

Comprendono **ioni ammonio** e **amminoacidi** che ne costituiscono la maggior parte.

### Bilirubina

#### Cenni sul Metabolismo

Il **metabolismo** della **Hb** rilasciata dai **GR** invecchiati porta alla formazione dell'**eme** così come anche il **catabolismo** della **mioglobina** dei muscoli. Perso l'**atomo di Fe**, l'eme viene ossidato a formare la **bilirubina**, un pigmento giallo **poco solubile** in acqua. Per circolare nel sangue, deve **legarsi** ad una proteina plasmatica, l'**albumina**. Giunta al fegato, essa negli epatociti viene ->

-> **captata**

-> **coniugata con ac. glicuronico**

-> **riversata in questa forma nella bile ed escreta così nell'intestino**

La glicuronazione della bilirubina conferisce alla molecola **due cariche negative** rendendola quindi solubile in fase acquosa. Se per qualche motivo è impossibile eliminare la bilirubina con la bile, essa torna in **circolo** determinando un **aumento** dei liv. ematici di bilirubina. Gli **epatociti normofunzionanti** tenteranno di captare la forma coniugata in circolo così come fanno per quella non-coniugata. Se la **bilirubina** permane in circolo per **molto tempo**, è possibile che la forma

coniugata formi un **legame** covalente con l'**albumina**, che non può entrare nel fegato e rimane in circolo.

Una volta che la **bile** è nell'intestino, i batteri convertono la bilirubina in **urobilinogeno**, un insieme di composti incolori che vanno incontro ad **ossidazioni** successive con formazione del **pigmento bruno urobilina**, escreta nelle feci. L'urobilinogeno viene parzialmente **riassorbito** dall'intestino per cui può anche essere **escreto con le urine**.

### Esame della concentrazione della bilirubina

Si distinguono due tipi di bilirubina ->

-> **forma coniugata** detta anche **bilirubina diretta**, misurata mediante una specifica reazione chimica (**diazotizzazione**) senza alcuna modificazione in quanto è una **forma** solubile in acqua

-> **forma non-coniugata** detta **bilirubina indiretta** che viene calcolata come **differenza** con la **bilirubina totale** della **forma diretta**.

-> **bilirubina totale** richiede per la determinazione la **solubilizzazione** della forma non coniugata prima del **dosaggio chimico**.

Il **campione** ideale per il dosaggio della bilirubina è il **siero** non emolizzato che non contenga **grassi** o altre sostanze in **eccesso** che possono conferire al campione **torbidità** od colorazioni anomale in grado di interferire con alcuni metodi **colorimetrici** di determinazione della bilirubina.

L'esposizione del **siero** alla **luce** può determinare una **riduzione** del contenuto di bilirubina.

### Considerazioni cliniche

**L'ittero** è una colorazione della pelle e delle sclere giallastra che compare quando i valori di **bilirubinemia** superano i **2.5 mg/dl**. Nell'**adulto** la bilirubina diretta non supera i **0.3 mg/dl** mentre la bilirubina totale va da **0.1** a **1.2 mg/dl**. Occasionalmente in adulti **sani** con bilirubina diretta normale si possono osservare valori di bilirubina totale **pari o superiore a 2 mg/dl**. Questi soggetti presentano un **difetto** nella **captazione** epatica di bilirubina e presentano una **variante** della **sindrome di Gilbert**

**L'ittero fisiologico del neonato** è dovuto alla relativa **incapacità** di coniugare la bilirubina da parte del **fegato immaturo** del neonato.

**Nelle anemie emolitiche** di qualsiasi natura, ci si deve aspettare un **aumento** della prod. di **bilirubina** nella forma non coniugata in quanto derivata da un aumento della Hb plasmatica, sempre che la **funzione epatica** sia normale.

La determinazione della bilirubina totale e diretta serve a **valutare** se l'epatopatia coinvolge le **funzioni epatocellulari** (bilirubina tot. elevata e bilirubina diretta bassa) o se deriva da un **blocco** a valle del fegato (bilirubina totale e diretta elevate).

**La bilirubina delta** è così detta quella formata dal legame covalente della bilirubina con l'albumina, che si ha quando aumentano i liv. di **bilirubina diretta** per parecchio tempo.

## Calcio Magnesio e Fosforo

### Introduzione

Sia **Ca** che il **Mg** sono presenti in **soluzione acquosa** come cationi **bivalenti** ( $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ )

I **valori normali** per il Ca sierico sono compresi tra **9 e 11 mg/dl**. Per quanto riguarda il magnesio, invece, i **valori normali** sono compresi tra **1.8 e 3 mg/dl**. Circa la metà del calcio e del magnesio circolante è **disciolta** nel plasma, quindi in forma ionizzata, mentre la restante porzione è **legata a proteine anioniche** (albumina in prevalenza) o **chelata** con piccoli anioni.

La frazione **disciolta** è quella fisiologicamente rilevante. Il Ca partecipa ai processi della **coagulazione**, ai fenomeni di **contrattilità** del muscolo scheletrico e del cuore, e a **molteplici altre funzioni**. Sia il **Ca** che il **Mg** sono importanti nei fenomeni di **eccitazione** ed di **conduzione** dei tessuti eccitabili.

I **fosfati** formano lo scheletro degli **acidi nucleici** RNA e DNA e sono essenziali per l'**immagazzinamento** e la **conversione di energia** in composti come **ATP** e **creatina-fosfato**. I fosfati sono anche imp. nella formazione di metaboliti intermedi dei carboidrati, alcuni dei quali **svolgono funzioni regolatorie**, come il **2-3 difosfoglicerato (DPG)** che modula la **dissociazione dell'O<sub>2</sub>** dalla emoglobina.

### Cenni sul metabolismo

Vedere capitolo relativo il metabolismo dell'osso

### Considerazioni cliniche

#### -> Alterazioni dell'omeostasi del calcio

**Malattie delle paratiroidi, osteopatie metaboliche e anomalie del met. della vit. D**

sono tra le cause più frequenti di alterazioni dell'omeostasi del calcio.

**L'ipercalcemia** si osserva frequentemente nei pazienti con **neoplasie maligne mieloma multiplo** e **sarcoidosi**. La ipercalcemia può condurre ad alterazioni mentali dei pazienti, che mostrano **confusione** e **incapacità a comunicare**.

**L'ipocalcemia** si può avere o in **carezza di albumina**, ove però sarà deficitaria la quota di Ca legato alle proteine mentre la frazione ionizzata resterà normale, Si può avere una **vera ipocalcemia** in corso di **pancreatite**, dovuta al **sequestro** di Ca nel tessuto danneggiato. Essa porta a **ipereccitabilità neuromuscolare** che si manifesta con tetania. I pazienti con **insufficienza renale cronica** necessitano di integrazioni di Ca nella dieta. La **rimozione chirurgica** delle **paratiroidi** causa anch'essa **ipocalcemia**.

#### -> Alterazioni dell'omeostasi del fosforo

I **fosfati** sono **essenziali** per il trasporto **insulino-dipendente** del glucosio nelle cellule. Al trasporto dell'**esoso** nelle cellule segue la sua **fosforilazione** e il processo è accompagnato da un **flusso di K verso il compartimento intracellulare**. L'equilibrio tra i fosfati nel **siero** e quelli nei **depositi intracellulari** dipende dal **metabolismo** dei carboidrati e dal **Ph del sangue**.

#### -> Alterazioni dell'omeostasi del Magnesio

In funzione della sua caratteristica di legarsi all'albumina, il **Mg diminuisce** in modo parallelo a quanto avviene per il **Calcio**. **Malassorbimento** e **Digiuno** possono portare

ad un **deficit di Magnesio** che si osserva solo dopo la *deplezione delle scorte del organismo*. Anche la *diarrea cronica* e *l'uso di diuretici* potenti possono portare ad *ipomagnesemia*.

I **disordini** dell'omeostasi del **magnesio** possono aggravare gli effetti dell'ipopotassiemia e dell'iperpotassiemia.

### **Determinazioni della Concentrazione di Ca, Pi e Mg.**

#### **-> Calcio**

Viene normalmente determinato il **Ca tot.** -> *ionizzato, chelato o legato alle proteine*.  
Le misurazioni possono essere effettuate con **elettrodi iono-selettivi** su sangue intero o siero. La determinazione delle concentrazioni dello ione deve essere effettuata su **campioni di siero** per evitare interferenze con gli *anticoagulanti* usati per i campioni di plasma, che spesso sono *chelanti il Calcio*. Lo ione può essere misurato mediante

-> *spettrofotometria ad assorbimento atomico*

-> *dosaggi colorimetrici* (coloranti che legando il Ca cambiano colore)

-> *elettrodi iono-selettivi.*

Per il dosaggio del Calcio, possono anche essere usati campioni di **sangue intero** o di **plasma** raccolti in eparina, che **non** è un chelante il calcio, I campioni devono essere freschi e accuratamente *preparati e conservati*. Un **Ph alcalino** ad esempio fa sì che il Ca ionizzato si leghi alle proteine, mentre un **Ph acido** provoca un aumento del calcio ionizzato (gli *ioni H<sup>+</sup> spiazzano le molecole di calcio legate alle proteine*). Per cui le misurazioni dello ione calcio devono o essere effettuate su **campioni di sangue intero** rapidamente oppure deve essere *riequilibrato il Ph*.

#### **-> Fosforo e Magnesio**

Il *fosforo* è misurato nei liquidi corporei come miscela di fosfati *monobasici e bibasici* le cui proporzioni cambiano a seconda del Ph. Sia il *fosforo* che il **Mg** possono essere misurati con **metodi colorimetrici**. Il **Mg** anche con *spettrofotometria ad assorbimento atomico*.

## Esame delle Feci

### Generalità

Spesso si cerca di evitarlo, sia perché ai pazienti non piace raccogliere i **campioni** del proprio materiale fecale, sia perché il personale infermieristico e di laboratorio tende a condividere questa avversione. Tuttavia, le patologie del tratto **gastrointestinale** sono diffuse e questo esame aiuta molto a chiarire i relativi **quesiti clinici**.

Esistono **diversi mezzi** per attuare il prelievo del campione, che può essere eseguito come ->

-> **prelievo casuale** durante un'esame rettale

-> **campione raccolto** durante la defecazione

### Campioni normali

L'**adulto** evacua normalmente dai **100 ai 300 g** di feci al giorno. Il materiale è costituito di una percentuale di **acqua**, fino al **75%**. Sono presenti per la maggior parte **batteri** e **residui cellulari**. Per il resto si hanno **residui vegetali**, **grassi** e cellule **epiteliali desquamate**. Rappresenta ciò che resta dei **10 l** di materiale ingerito comprendente **cibo**, **succhi gastrici**, **saliva**, **succo pancreatico** e **bile**.

Il **tenue** digerisce **grassi**, **proteine** e **carboidrati** e assorbe importanti sostanze come le **vitamine liposolubili**, il **ferro** ed il **calcio**. Assorbe anche grandi quantità di **acqua** con gli **elettroliti** in essa contenuti.

Il **colon prossimale** assorbe la maggior parte dell'**acqua residua** e i batteri ivi contenuti degradano molti **prodotti terminali del metabolismo**.

Il **colon distale** funge da sede di **immagazzinamento** delle feci in attesa di essere evacuate.

Il colore marrone è dato dalla degradazione dai batteri dei pigmenti biliari in **stercobilina** e l'odore è dato dai prodotti di degradazione proteici **indolo** e **scatolo**.

### Raccolta del Campione

I **campioni casuali** sono raccolti per **test qualitativi** come la **ricerca di sangue occulto** o la ricerca di **leucociti**, **batteri** e **parassiti**.

### Esami di laboratorio

#### Esame Macroscopico

Deve valutare -> **forma**

-> **dimensioni**

-> **consistenza**

-> **colore ed odore**

-> **eventuale presenza di muco, pus, sangue, frammenti di tessuto, parassiti.**

**Alterazioni** nella **dimensione** e nella **forma** indicano **alterata mobilità** del colon.

Un **calibro grande** indica la **dilatazione** del colon, **feci a nastro** indicano invece un **diametro** eccessivamente **ridotto** quindi diminuita elasticità o **ostruzione parziale**.

Feci **piccole** e **rotondeggianti** sono tipiche di una **stitichezza cronica modesta**, forme gravi causano la formazione di masse **fecali compatte**.

#### Diarrea

Costituisce pericolo nei pazienti **anziani**, nei **bambini** e in coloro che presentino una **omeostasi nutrizionale** o **idro-salina** instabile. Una **diarrea acquosa** o **mucosa** è tipica della **sindrome del**

**Colon irritabile.** E' possibile eseguire **coprocolture** per ricercare **batteri enteropatogeni** nelle feci causa di diarrea, o **protozoi parassiti**. L'**intolleranza al lattosio** è causa frequente di sintomi **gastroenterici** riferibili sia alle prime vie che al colon.

L'obiettivo più comune per cui i **campioni di feci** vengono inviati al laboratorio è proprio la ricerca delle cause di una **dissenteria**.

### Sangue nelle feci

#### ● Principi di base

Per ricercare sangue nelle feci, si sfrutta l'attività **perossidasi** dell'eme, che ossida composti usati come indicatori **colorimetrici**. Sanguinamenti nel tratto gastrointestinale porta alla formazione di **ematina perossidasi-positiva**. Si possono avere due situazioni ->

-> Presenza di **grandi quantità di sangue**, che dà alle feci un colore catramoso o nerastro detto **melena**.

-> Presenza di **piccole quantità di sangue** che non modifica il colore delle feci e può passare inosservato (**sangue occulto**).

Piccolissime quantità di sangue, pari a **0.5-2 ml/die** non sono considerate patologiche.

#### ● Sanguinamenti macroscopici

Il **guaiacolo** costituisce l'indicatore più usato per la ricerca di sangue nelle feci. Un sanguinamento **evidente** tuttavia non richiede particolari indagini di laboratorio, bisogna solo dimostrare il colore rosso o nero delle feci è veramente **causato dal sangue**.

-> Feci di colore **nerastro** sono dovute a **grandi sanguinamenti nelle alte vie digerenti**, dove **l'emoglobina** viene a contatto con i succhi gastrici

-> Feci di colore **rosso cupo o brillante** sono dovute a sanguinamenti a livello del colon.

-> Se il **tempo di transito del materiale nel digerente** è molto rapido, sangue di origine **gastrica** od **esofagea** può rimanere di colore **rosso**, o viceversa, il sangue proveniente da emorragie nel **colon** può **annerirsi** per la presenza di **sostanze anomale**.

La **melena** può perdurare anche dopo la **cessazione** del sanguinamento, e così gli esami per il sangue occulto possono rimanere **positivi** anche per **5 gg** dopo che l'emorragie è cessata.

#### ● Screening per la presenza di sangue occulto nelle feci

La ricerca di sangue occulto viene effettuata nella speranza di trovare **lesioni asintomatiche** molto prima che si presentino. Le **più frequenti** patologie delle **prime vie digerenti** che possono portare alla presenza di sangue occulto nelle feci sono **ulcera peptica**, **gastrite** e il **carcinoma gastrico**.

I test devono essere eseguiti correttamente e i **risultati positivi** devono promuovere l'attuazione di ulteriori **accertamenti** per individuare i **falsi positivi**. Più difficile è individuare i **falsi negativi**.

La procedura più accettabile per la ricerca di sangue occulto su **larga scala** è quella di fornire **striscie** o **vetrini** al paziente di modo che possa esso stesso allestire **campioni** da feci evacuate in diversi giorni.

La presenza di **carne** nella dieta, **sanguinamenti** dal **naso** o dalle **gengive** e l'impiego di modeste quantità di **acido acetilsalicilico** producono **falsi positivi**.

Un **falso negativo** ha maggiore rilevanza clinica. Anche dopo l'esecuzione di **6 test**, la % di falsi negativi è del **20%**. La maggior parte dei pazienti con **lesioni significative** non ha più di **1 o 2** risultati



positivi su 6 ricerche effettuate.

### Esame microscopico

#### ● Parassiti

I *parassiti* e le loro *uova* possono essere messe in evidenza con l'esame microscopico, anche se i *nematodi* adulti ed i segmenti dei *platelminti* sono visibili anche ad occhio nudo. Il materiale fecale **non** deve essere conservato a lungo e l'esaminatore deve avere una certa *esperienza*. Per l'esame di *amebe* e di altri *parassiti mobili*, l'esame deve essere effettuato su feci **evacuate da poco tempo** e **non** raffreddate sensibilmente.

Procedure di **concentrazione** possono essere utili per la ricerca di **uova** e di **elminti**.

#### ● Materiale non digerito

L'esame microscopico delle feci permette anche di valutare l'efficienza della **digestione**. Presenza di  **fibre muscolari** striate è indice di  **scarsa proteolisi**. Un certo quantitativo di **grassi**, il **5-7 %** dell'apporto dietetico, è **normale**, e cambiamenti dietetici possono influenzare il risultato degli esami effettuati su campioni casuali. Bisogna quindi, in caso di **sospetto malassorbimento**, effettuare l'esame del campione casuale delle feci solo dopo aver ottenuto informazioni sul **cibo assunto** nel periodo immediatamente precedente l'esame.

#### ● Elementi cellulari

La presenza di un certo numero di cellule epiteliali nelle feci è **normale**, ma un numero eccessivo è indice di una **irritazione** della **mucosa**. I **leucociti non** sono costituenti **normali** delle feci. La loro presenza indica l'esistenza di un **processo infiammatorio** delle basse vie digerenti. Se il loro numero è **elevato**, è indice di una **infiammazione grave**. L'**assenza** di leucociti tuttavia **non esclude** un processo infiammatorio.

Il riscontro di **eritrociti intatti** nelle feci è indice di sanguinamento nelle basse vie digerenti, **ano** o **retto**, perché nelle emorragie nelle prime vie digerenti, gli eritrociti vengono **sempre danneggiati**.

### Sindromi da Malassorbimento

Un notevole numero di patologie può portare all'**eccesso** di **grassi** nelle feci. Un utile *esame di screening* è la colorazione di uno striscio di feci con coloranti specifici per i grassi.

E' necessario sospettare **malassorbimento** in un paziente **bambino** o **giovane** adulto con **irritabilità intestinale** persistente, **crescita stentata** o **alvo irregolare**.

#### ● Contenuto fecale di lipidi

Per quantificare l'escrezione fecale di lipidi è **necessario** conoscere l'apporto alimentare di grassi e raccogliere le feci in un determinato periodo. La procedura utilizza un **apporto alimentare** di **100gr** di lipidi al giorno e la raccolta delle feci per **3 gg**. L'escrezione di più di **6 gr** di lipidi al **giorno** è indice di una anomalia. L'escrezione può salire anche a **50 gr**.

**Epatopatie e malattie biliari** sufficientemente gravi da dare **steatorrea**, tendono a manifestarsi prima con **ittero** e anomalie **ematochimiche** che con steatorrea. Il dosaggio del **carotene sierico** (la **vit. A** necessaria dei meccanismi di assorbimento dei lipidi per essere assorbita) può essere usato come **screening** per il **malassorbimento lipidico**.

#### ● Utilizzo dei carboidrati

La presenza di **steatorrea** nella **celiachia**, **sprue** non tropicale e tropicale o **malattie infettive** della

parete intestinale è **associata** ad altri problemi di malassorbimento, quale quello dei **carboidrati**.

### **Test al D-xilosio**

È un test di **screening** per evidenziare il malassorbimento dei carboidrati. Si somministra per via **orale** una dose di **25 gr** di **xilosio** e si determina il **quantitativo escreto con le urine 5 h** dopo.

In condizioni **normali**, viene escreto un quantitativo superiore ai **5 gr**, l'escrezione di una quantità **inferiore** è indice di malassorbimento. Una escrezione normale richiede ovviamente anche una normale funzione renale. La sua escrezione può essere ridotta anche nelle **nefropatie**.

#### ● **Intolleranza al Lattosio**

La maggior parte dei polisaccaridi assorbiti dall'intestino sono **disaccaridi** che devono quindi essere prima separati nelle loro **componenti** dalle disaccaridasi. Ognuno di questi enzimi può essere colpito da deficit, il più comune è il deficit di **lattasi**. La attività lattasica intestinale **diminuisce** con l'età, per cui la intolleranza al lattosio è più comune negli **adulti** che nei **giovani**. Esistono anche differenze legate alla **razza**. Una attività carente si accompagna a **crampi addominali, diarrea, meteorismo e malessere generale** dopo l'ingestione di **latte** o **latticini**. Una analisi per evidenziare questa deficienza è **l'analisi del respiro**. Un paziente assume **1gr / kg** di lattosio, e un **aumento** dell'H<sub>2</sub> espirato è indice di un **deficit di lattasi**.

#### ● **Perdita di proteine**

Non esistono metodi soddisfacenti per la determinazione delle **proteine fecali totali**. Alcuni pazienti, in cui si verifica una grave **perdita di proteine con le feci**, sono affetti ad una condizione definita **enteropatia protido disperdente**. Nell'intestino, le proteine sono degradate enzimaticamente in **amminoacidi**. Anomalie dell'assorbimento si verificano in caso di **anomalie della mucosa** o se la perdita di proteine eccede la capacità della mucosa di riassorbimento.

### **Osservazioni cliniche**

Pazienti affetti da **malassorbimento** possono presentare **ipoalbuminemia** per eccesso di perdita di proteine e/o malnutrizione. Insufficiente assorbimento di **vitamine liposolubili** può portare ad **ipoavitaminosi A** o a coagulopatie associate alla **carenza di vitamina K** o a **osteoporosi** per **ipoavitaminosi D**.

Un test utile per valutare la **funzione pancreatica** è il **dosaggio dell'escrezione urinaria di Bentiromide**.

Questo è un peptide sintetico legato all'**ac. para-aminobenzoico PABA**. La **chimotripsina** idrolizza il legame tra **bentiromide** e il **PABA** consentendo l'assorbimento di quest'ultimo che viene **coniugato** dal fegato e escreto nelle urine come **arilamine**. Il **57%** di arilamine introdotte è **escreto** nelle **prime 6 h**. Valori di escrezione inferiori al **50%** della quantità introdotta sono sintomo di **insufficienza pancreatica**.

La **diagnosi** definitiva di **anomalie** della **mucosa intestinale** si possono avere solo con l'esame **biptico** di campioni ottenuti per **endoscopia**.

## Liquido Cefalo Rachidiano

La **puntura lombare** ed il conseguente esame del liquor rappresenta una importante procedura diagnostica ed anche una via per introdurre direttamente **farmaci** o **mezzi di contrasto** nel SNC.

### Origine e Composizione

Origina dai **plexi corioidi** nei ventricoli cerebrali e circola nei ventricoli e negli spazi sub-aracnoidei del cervello e del midollo. E' un **mezzo supplementare** di **nutrimento** per il SNC, **rimuove** sostanze di scarto e protegge il cervello dagli **insulti meccanici**.

La **concentrazione** di molti elettroliti varia con la loro concentrazione plasmatica, in quanto il **liquor** deriva da processi di **filtrazione**, **riassorbimento** e **secrezione selettiva** dal plasma. In condizioni patologiche, molte **molecole** che normalmente non passano la **barriera emato-encefalica** possono raggiungere nel liquor concentrazioni elevate. Normalmente non sono presenti cellule, **eritrociti** ed **leucociti** sono presenti nel liquor solo come conseguenza di **emorragie**. La **bilirubina** è normalmente assente, e può essere dimostrata solo in pazienti che abbiano subito emorragie, e deriva dal **metabolismo** in loco della **emoglobina**.

### Pressione del Liquor

La **pressione** è mantenuta a livelli normali grazie al continuo **riassorbimento** di liquor a livello dei **villi aracnoidei** in quantità uguale alla sua produzione. La pressione del liquor è influenzata dalla **pressione venosa centrale**, in quanto tutto il liquor riassorbito è immesso nella circolazione venosa.

### Rapporti anatomici

Sebbe la **produzione** e il **riassorbimento** del liquor siano continui, nel **sacco lombare**, ove si effettua il prelievo, si può avere una condizione di **stasi**, per cui nel liquor lombare possono aumentare le **proteine** e il numero di **cellule** per microlitro. Tuttavia è la sede preferenziale per effettuare il prelievo in quanto l'unica struttura nervosa è il **filum terminale** del midollo, e quindi il rischio di fare danni è **molto basso**.

### Indicazioni per la puntura lombare

La puntura si effettua nel **terzo**, **quarto** o **quinto** spazio intervertebrale lombare. L'individuo viene fatto distendere sul **fianco sinistro** poi si individua il punto del prelievo mediante la intersezione tra la linea **interspinosa** e quella tracciata tra le due **creste iliache superiori posteriori**. In alcuni casi, durante la puntura si può avere la **rottura di piccoli vasi** che possono contaminare di sangue il campione. La puntura lombare deve essere effettuata se si sospettano **meningiti**, **emorragie subaracnoidee** o altre **condizioni patologiche**, come il sospetto di una **alterata circolazione del liquor**.

### Pericoli derivanti dalla pressione intracranica elevata

Il rapido prelievo di liquor può causare il fenomeno conosciuto come **ernia** o **incuneamento** del tronco dell'encefalo, dovuto allo **squilibrio pressorio** che si verifica nello spazio subaracnoideo con lo spostamento del **tronco dell'encefalo** da una regione ad **alta P** (l'interno del cranio) ad una a **bassa P** (il canale vertebrale).

### Esame del Liquor - generalità

Le prime caratteristiche del liquro che devono essere prese in considerazione sono ->

-> **aspetto**

-> **consistenza**

-> **tendenza a coagulare**

Deve essere annotata la pressione al momento del prelievo. La concentrazione delle **proteine** e del **glucosio** sono determinate in genere di routine. In base al sospetto diagnostico, si possono effettuare test per la ricerca di **microorganismi** nel liquor. Sono richiesti con una certa frequenza anche altri **esami chimici**, come la determinazione di *bilirubina*, *urea*, *acido lattico* e *glutammina*.

### **Aspetto**

Normalmente il liquor ha la **consistenza** e la **limpidezza** dell'**acqua**. E' utile quindi confrontare il colore del campione con quello di una provetta di acqua.

Se l'aspetto è **torbido**, è indice della presenza di un **numero considerevole di leucociti**. Una lieve **opalescenza** è indice della presenza di un numero di leucociti pari a **200 / 500** per microlitro. Una colorazione **giallastra** (*xantocromia*) indica un **sanguinamento pregresso** o **alte concentrazioni di proteine**. Il **Ph** è più basso di quello del sangue arterioso.

### **Presenza di sangue**

Può essere dovuta o a **contaminazione** di sangue avutasi durante la puntura, oppure ad una **pregressa emorragia subaracnoidea**. Se il liquor, alla terza provetta prelevata, tenderà ad essere più chiaro che alla prima, vuol dire che il sangue deriva da un **trauma locale** per la puntura. Se invece ciò non accade, e dopo centrifugazione il liquor non torna chiaro ma assume una **colorazione giallastra**, ci si trova di fronte ad un **pregresso sanguinamento**.

### **Coagulabilità**

Una **coagulazione** spontanea del liquor può aversi ogni qual volta la concentrazione delle proteine sia **alta**. Il coagulo si forma per la conversione del **fibrinogeno** in **fibrina**, che in condizioni normali **non** è presente nel liquor, ma quando si altera la permeabilità della **barriera emato-encefalica** le proteine plasmatiche possono raggiungere il liquido (in primis l'*albumina*, il cui PM è basso). Una **emorragia subaracnoidea** non rende il liquor coagulabile, mentre una significativa contaminazione di sangue per una **rachicentesi** traumatica può farlo.

### **Esame del Liquor - Pressione**

La pressione del liquor negli adulti nel sacco lombare, in posizione **distesa**, varia da **75 mm/H<sub>2</sub>O** a **200 mm/H<sub>2</sub>O** con un valore medio di **120 mm/H<sub>2</sub>O**. Se la puntura è effettuata in soggetti in posizione **seduta**, la pressione assume un valore simile a quello misurabile a livello del **collo** del soggetto. Un modesto aumento della P si osserva in soggetti **ansiosi** o che tengono le gambe troppo flesse contro l'addome determinando un **aumento** della **P venosa** e quindi di quella del **liquor**. L'aumento della **P** del liquor può essere rilevata nei pazienti affetti da **tumori intracranici** o da **meningiti tubercolari**.

### **Test di Queckenstedt**

Si effettua la compressione delle **vene giugulari** per qualche attimo. L'occlusione provoca un mancato riassorbimento di liquor e quindi un **aumento** della sua **P** nel compartimento intracranico. Contemporaneamente si misura la **P** nel **sacco lombare**. In **assenza** di ostacolo alla circolazione, la variazione della pressione si trasmette al liquor del sacco lombare (il manometro rileva aumento della **P** e torna alla normalità rapidamente quando l'occlusione delle giugulari è rimossa). Se si ha **occlusione parziale o totale**, **non** si ha un aumento della **P** o si ha un **ritorno alla normalità** più

lento (>20 secondi). Questa procedura è rischiosa nei pazienti con **aumento** della P intracranica o **ipersensibilità** dei barocettori carotidei.

#### *Pressione del liquor all'inizio e al termine del prelievo*

Il prelievo di un certo volume di liquor comporta una diminuzione della sua pressione. Ogni **ml** di liquor prelevato, comporta una riduzione di **5 – 10 mm/H<sub>2</sub>O** della pressione. Se si prelevano **10 ml**, al termine del prelievo il valore della P del liquor sarà inferiore di **50 – 100 mm/H<sub>2</sub>O**. Una riduzione inferiore suggerisce che la **quantità di liquor** sia aumentata come nell'idrocefalo. Un **calo cospicuo** di liquor indica che il **volume efficace** di liquor è basso.

#### *Esame del liquor – conteggio delle cellule*

Normalmente il **liquor** è privo delle cellule, anche se un numero di linfociti pari a **5** per **microlitro** è normale. Nei **bambini** il limite è più alto, e corrisponde a **20** per **microlitro**. La presenza di **granulociti** e di cellule **mononucleate** non è mai normale. Se il numero di **eritrociti** rilevati diminuisce col procedere del prelievo, significa che derivano dall'evento **traumatico** associato alla puntura.

#### *Contaminazione ematica del campione*

Spesso è necessario, in campioni contaminati durante il prelievo, determinare la concentrazione di **proteine** e di **leucociti**. Una regola per correggere i risultati delle analisi è -> la **contaminazione** del campione fa **aumentare** il numero di leucociti di **1 / 2** cellule ogni **1000** eritrociti per microlitro. Per quanto riguarda la **concentrazione delle proteine**, la contaminazione ematica del campione comporta un **aumento** di concentrazione di proteine pari ad **1 mg/dl** ogni **1000** eritrociti per microlitro.

#### *Conteggio differenziale dei leucociti*

Il campione utilizzato per il conteggio viene spesso **colorato** per mettere in evidenza i nuclei e distinguere tra **granulociti** e cellule **mononucleate**. Per studi morfologici più accurati, si usa il **sedimento** del campione ottenuto per centrifugazione **strisciato** e **colorato**.

#### *Esame del liquor – Analisi Chimica*

##### ● **Proteine**

Normalmente il liquor ha un contenuto **basso** di proteine in quanto le molecole di grosso PM non attraversano la **barriera emato-encefalica**. La concentrazione proteica è meno dell'**1%** di quella plasmatica -> **50-80 mg/dl**. Il rapporto **albumina/globuline** è maggiore che nel plasma, in quanto l'albumina ha **PM** minore e passa più facilmente la barriera. La concentrazione proteica **aumenta** per

-> **aumento permeabilità** della barriera emato-encefalica per un **processo infiammatorio** come nelle forme gravi di **meningite**.

-> **presenza di alta concentrazione di cellule batteriche e leucociti** che si hanno nelle **meningiti purulente**.

-> in **presenza** di una **malattia degenerativa del SNC**, in assenza di un concomitante aumento del numero delle cellule, come la **sclerosi multipla** e la **neuroleue** o in presenza di un **blocco subaracnoideo**, dove le proteine si accumulano **distalmente** al blocco.

-> **tumori** intracranici possono causare **aumenti** del contenuto proteico del liquor.

##### ● **Glucosio**

La concentrazione di glucosio nel liquor (**glicorrachia**) in condizioni normali è pari al **60-80%** di

quell nel plasma, e le **modificazioni** della glicemia si riflettono con **30-50 min** di ritardo sui valori della *glicorrachia*. La concentrazione normale di glucosio nel liquor è pari a **45-80 mg/dl** e una valutazione corretta dei valori di glicorrachia necessitano di **un confronto** con i valori di glicemia, valutati almeno **30-60 min** prima il prelievo di liquor, e questo valore generalmente è più **alto** di **20 mg/dl**. In corso di *meningiti purulente*, si osservano notevoli **riduzioni** della glicorrachia per le attività **metaboliche** di *batteri* e *leucociti*. Il metabolismo del glucosio continua anche dopo il prelievo del liquor ->

-> nei casi in cui si sospetti la presenza di *batteri, funghi o protozoi*, la determinazione della [glucosio] dovrebbe essere eseguita **immediatamente**.

- **Acido Lattico**

La concentrazione di **ac. lattico** riflette l'attività **glicolitica** che si svolge in loco nel liquor. La concentrazione normale di *lattato* è compresa tra **10 e 20 mg/dl**. L'**aumento** può essere associato ad una grave *acidosi lattica sistemica*, o, se si ha un aumento di lattato nel liquor senza acidosi lattica, può essere **indice** di un **aumentato metabolismo** di glucosio da parte di leucociti o altri microorganismi. Livelli superiori a **35 mg/dl** sono osservabili solo in condizioni di *meningiti fungine* o *batteriche*.

- **Urea**

La concentrazione di **urea** è più o meno simile a quella del plasma. Se aumenta nel plasma, lo fa anche nel *liquor*.

- **Glutamina**

La *glutamina* nel liquor è sintetizzata nel SNC a partire da *ioni ammonio* e *ac glutammico*. Se l'**ammonemia** è elevata, la concentrazione di *glutamina* nel liquor può aumentare. La concentrazione di *glutamina* nel liquor è correlata con la **gravità** della encefalopatia da *insufficienza epatica*. Valori superiori a **20 mg/dl** devono essere considerati **elevati**.

- **Enzimi**

La misura delle attività enzimatiche come quelle della **LDH**, della **AST** e delle **ALT** dà valori leggermente **inferiori** a quelli nel plasma. L'attività della **AST** è alterata nelle patologie *infiammatorie, degenerative* od *emorragiche* del SNC.

### **Esame del liquor – Analisi Microbiologica**

Un numero significativo di *batteri, funghi, protozoi* può essere identificato nel liquor dopo esame di uno **striscio colorato** del sedimento ottenuto per *centrifugazione*. L'impossibilità di identificare dei microorganismi non deve **mai** essere considerata come **prova definitiva** di assenza di infezione, in quanto con l'esame dello striscio si possono identificare massimo **10<sup>5</sup> microorganismi per microlitro**.

Nelle *meningiti*, la % di successo diagnostico dopo *colorazione di Gram* è del **80-90%** prima del trattamento terapeutico e scende a **60%** dopo l'inizio del trattamento.

La ricerca di microorganismi nei liquidi biologici come il *liquor* è importante quanto quella che si effettua sul sangue, ma il compito è relativamente più *facile*. E' bene effettuare una *centrifugazione* del campione -> **per preparare strisci, si usa il sedimento**

-> **per la ricerca di antigeni, si usa il sopranatante.**



- **Ricerca di Antigeni**

Queste metodiche sono richieste in quanto forniscono i risultati diversi giorni prima di quanto non faccia l'esame colturale e forniscono una **diagnosi precisa**. Però queste sono analisi *costose* e richiedono un certo dispendio di *tempo* al laboratorio afferente. Inoltre, **nessuno di questi** test fornisce indizi sulla **suscettibilità antimicrobica** del germe individuato, quindi indicazioni sulla terapia da applicare per passare da una terapia *antibiotica* ad ampio spettro, costosa e potenzialmente tossica, ad una *mirata*, più sicura. E' quindi comunque necessario isolare il microorganismo in **coltura** ed eseguire i **test di sensibilità in vitro**.

In alcune situazioni, la ricerca di **ag** è molto utile. Se al momento del prelievo il paziente è in **terapia antimicrobica**, la probabilità che l'esame colturale sia **falsamente negativo** è alta. In questi casi la ricerca dell'**ag** può essere *l'unico modo* per giungere alla identificazione dell'agente infettivo.

La ricerca degli antigeni deve essere sempre eseguita conoscendo, prima ->

- > **numero di leucociti**
- > **formula leucocitaria**
- > **concentrazione di glucosio e di proteine**
- > **i risultati della colorazione di Gram**

- **Colture**

I campioni di liquor possono essere inoculati in *terreno agar-sanguiei* (con sangue di pecora) o *agar cioccolato* per la ricerca di *Haemophilus Influenzae* e di *Neisseria Gonorrhoeae*. L'osservazione di queste colture deve iniziare solo **dopo 12 ore**.

#### *Esame del liquor – trattamento del campione*

Il campione, dopo raccolto, deve essere subito trasportato al laboratorio e deve essere conservato in **condizioni** di assoluta **sterilità**. Gli **eritrociti** vanno incontro a *emolisi* entro **1 ora** dal prelievo determinando un cambiamento fuorviante del colore del soprannatante. *Neutrofili* e *cellule di tumori maligni* possono andare incontro a **fenomeni degenerativi**. Inoltre *cellule* e *batteri* continuano a metabolizzare il glucosio, portando ad un anomalo abbassamento della sua concentrazione.

## Curve ROC

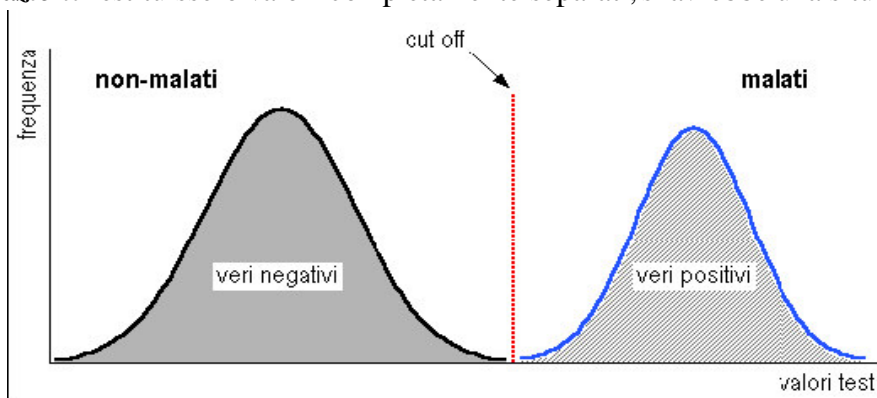
### Definizioni generali

#### Punto di Cut-Off

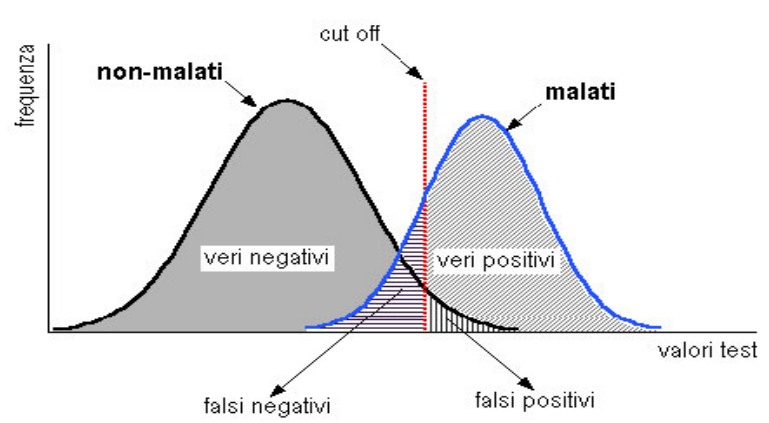
Il valore di **Cut-Off** è il valore *soglia* da definire sulla scala di lettura di un test quantitativo, sulla base del quale definire certi risultati come **positivi** ed altri come **negativi**.

Un grande problema che genera *incertezza* nella interpretazione di un test quantitativo è appunto il fatto che nella grande *maggioranza* dei casi esiste una zona di *sovrapposizione* fra le **distribuzioni** dei risultati del test rispettivamente nella popolazione dei **malati** e in quella dei **sani**.

Se le *due popolazioni* restituissero valori completamente separati, si avrebbe una situazione simile ->



In questo caso sarebbe perfettamente possibile *discriminare* tra la popolazione dei **sani** e quella dei **malati**. Purtroppo, nella pratica si verifica sempre una certa *sovrapposizione* della distribuzione dei sani e dei malati ->



La *capacità diagnostica* (o *validità* o *performances*) di un test ad un determinato valore di **cut-off** consiste nella capacità di condurre ad una *diagnosi negativa* nei soggetti non affetti da una malattia, e in una *diagnosi positiva* nei soggetti affetti dalla malattia.

#### Sensibilità e Specificità

Test in esame ↓	Golden test ↓	
	positivo (malato)	negativo (non-malato)
positivo	a	b
negativo	c	d

Il confronto tra i risultati del test con l'*autentico stato* di ogni individuo consente di stimare due importanti *parametri* ->

**Sensibilità**, che consiste nella capacità di un test di individuare tutti i *soggetti malati* senza che alcuno di questi venga *erroneamente* definito sano. Indica la capacità del test di generare *veri positivi* e il minor numero di *falsi negativi*.

$$Se \rightarrow VP / (VP+FN)$$

**Specificità**, che consiste nella capacità di un test di individuare solo i *soggetti veramente portatori* della malattia e di non definire alcun soggetto *sano* come *ammalato*. Indica quindi la capacità di un test di generare *veri negativi* e il minor numero di *falsi positivi*.

$$Sp \rightarrow VN / (VN+FP)$$

### Valore predittivo positivo e negativo

In test non effettuati a scopo di screening ma utilizzati a scopo **diagnostico**, importanti sono altri due parametri, il *valore predittivo positivo* e *negativo*, che indicano, a fronte di un *certo risultato del test*, la probabilità che il paziente in questione sia **realmente** o **meno** provvisto del *carattere in questione*.

**Valore predittivo positivo**, indica la probabilità che un soggetto il cui test è positivo sia veramente ammalato

$$VP^+ \rightarrow VP / \text{totale dei positivi (VP+FP)}$$

**Valore predittivo negativo**, indica la probabilità che un soggetto il cui test sia negativo sia veramente sano

$$VP^- \rightarrow VN / \text{totale dei negativi (VN+FN)}$$

Modificando il punto di *cut-off*, si può ottenere un aumento di *sensibilità* ed una riduzione di *specificità* e viceversa. Quando le due distribuzioni sono di tipo *normale*, allora il valore di cut-off corrispondente al *valore di cut-off ottimale*, (ovvero il valore che *minimizza* gli errori di classificazione), corrisponde al valore in ascissa che rappresenta la *intersezione tra le due distribuzioni*.

Un *metodo empirico* utilizzato per la scelta del *cut-off* consiste nel fissare *a priori* un valore di *specificità*, generalmente  $> 0.9$  e quindi calcolare la corrispondente *sensibilità* del test alla *suddetta condizione*.

### Le curve ROC – Il principio di base

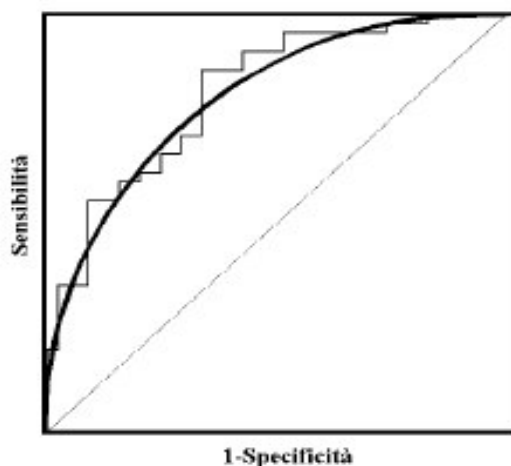
L'analisi **ROC** viene effettuata attraverso lo studio di una *funzione* che lega, in un *test quantitativo*, la probabilità di ottenere un risultato *vero positivo* nella classe dei veri malati (**la sensibilità**) con quella di ottenere un *falso positivo* nella classe dei non-malati (**1-specificità** ->  $FP / (FP+VN)$ ). Vengono quindi studiati i rapporti tra i **veri allarmi** ed i **falsi allarmi**.

Tutto questo si può raffigurare in un grafico riportando, per ogni determinato valore di *cut-off* possibile di un test, in un *sistema di assi cartesiani*, la proporzione di **veri positivi** in ordinata (y) e di **falsi positivi** in ascissa (x).

Se il risultato del test è riportato su *scala continua*, si possono calcolare i valori di *sensibilità* e di **1-specificità** per *ogni valore* registrato. Altrimenti, si può suddividere l'intera gamma di valori ottenuta

effettuando il test sia nella popolazione dei *malati* che in quella dei *non-malati* in una serie  $k$  di intervalli, il cui numero dipende dal numero *totale* dei dati disponibili e dalla *risoluzione* della curva che si desidera ottenere. Per ogni *intervallo*, si calcola la *sensibilità* e la *1-specificità*. Per esempio in un test *ELISA* effettuato su una determinata popolazione rispetto ad un determinato carattere che restituisce un insieme di valori compreso tra  $0$  e  $2.0$ , si possono definire  $k=20$  intervalli con ampiezza omogenea pari ad  $0.1$ .

Riportati sul *piano cartesiano* ciascuna coppia di valori ottenuta ( $Se$  e  $1-Sp$ ), si genera una **curva ad andamento spezzato (ROC-plot)** che, per interpolazione, è possibile eliminare la *scalettatura*, processo definito *smoothing*, e generare una curva (**ROC-curve**) che rappresenta una *stima* basata sui parametri ottenuti dall'insieme dei *dati sperimentali*.



La *capacità discriminante* di un test, ovvero la sua capacità a distinguere tra la popolazione dei *malati* e quella dei *non-malati*, è proporzionale all'estensione dell'**area** sottesa la *curva ROC*, il cui valore può essere espresso come la *percentuale* che il risultato di un *test positivo* appartenga ai **veri positivi** piuttosto che ai **falsi positivi**.

Su queste basi, si possono distinguere diverse casistiche ->

-> un *test perfetto*, completamente privo di *falsi positivi* o *falsi negativi*, avrebbe una **AUC (area under curve)** pari ad **1**, corrispondente all'area del quadrato con coordinate  $\{0,0\}$ ,  $\{0,1\}$ ,  $\{1,0\}$  e  $\{1,1\}$ , indicante una **probabilità del 100%** di una corretta classificazione tra i soggetti appartenenti alla popolazione dei *malati* e quelli appartenenti alla popolazione dei *non-malati*.

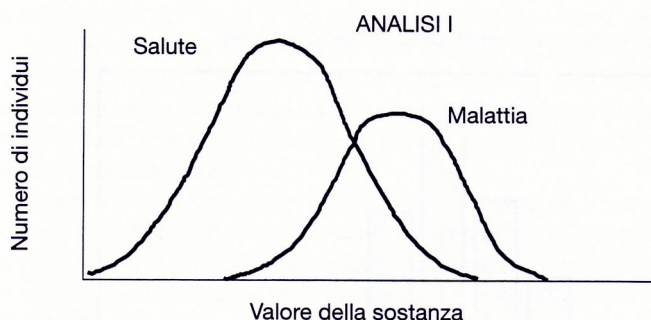
-> Un *test assolutamente privo* di valore informativo, avrebbe in grafico al posto di una curva una *retta* con **coefficiente angolare** pari a **1**, la cui **AUC** sarebbe uguale a **0.5**, ovvero il **50%** di probabilità che un test positivo ricada nella popolazione dei **veri positivi**.

In genere in una **curva ROC**, sono privi di importanza i segmenti della curva *sovrapposti* all'asse o delle *ascisse* o delle *ordinate*, in cui i valori di *cut-off* presentano o elevata **Sp** e bassissima **Se** o viceversa, in quanto esistono **sempre** altri valori di *cut-off* che forniscono una migliore **Sp** senza perdita di **Se** e viceversa.

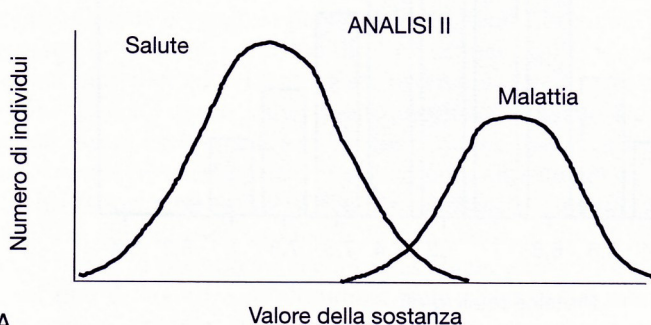
Tra due diverse analisi, ciascuna dotata di *caratteristiche diverse* per distinguere tra la popolazione dei *sani* e quella dei *malati* e quindi dotate ciascuna di una *diversa curva ROC*, l'aspetto delle curve indica la capacità relativa delle due analisi nel diagnosticare lo **stato di malattia**. Le **ROC-curve**

posizionate più in **alto** ed a **sinistra** sono considerate migliori di quelle posizionate più in **basso** ed a **destra**. L'esame della curva roc permette di scegliere con **maggiore facilità** il valore di **cut-off** a livello del quale l'analisi fornisce il **miglior compromesso** tra la **sensibilità** e la **specificità**.

**Nel primo test** (analisi I) le curve sono notevolmente **sovrapposte**, e ciò non permette una accurata distinzione tra le popolazioni dei **malati** e dei **non-malati**.

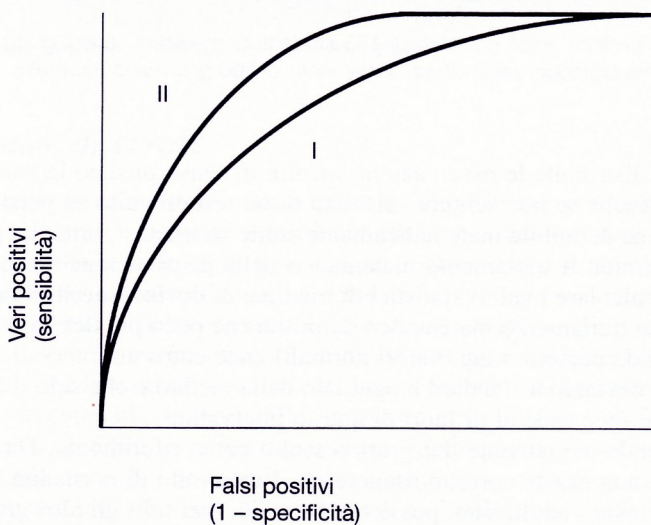


**Nel secondo test** (analisi II) le curve invece mostrano una buona **separazione**.



A

**Le curve ROC delle rispettive analisi**, infatti mostrano come l'**analisi II** sia caratterizzata da una **migliore sensibilità** (Se) e da una **migliore specificità** (Sp) in un **ampio intervallo** di valori soglia (**cut-off**) possibili.



B

# Lipidi

## Definizioni

I **lipidi** sono molecole organiche composte soprattutto di **carbonio** ed **idrogeno**. Le classi biologicamente più significative sono ->

-> **grassi neutri** comprendenti i **trigliceridi** composti da **3** molecole di acido grasso legate ad **1** di glicerolo. Il **tessuto adiposo** contiene grandi riserve di **trigliceridi** che rappresentano il pool più **rapidamente** mobilizzabile

-> **i lipidi coniugati** che contengono, oltre ad **acidi grassi** e **glicerolo** anche **fosfati** e **zuccheri** e son detti **fosfolipidi** o **glicolipidi** rispettivamente, e sono costituenti integrali delle membrane

-> **gli steroidi** comprendenti il **colesterolo**, lo steroide di maggior importanza biologica. Svolge importanti funzioni **metaboliche** ed è anch'esso un **componente delle membrane cellulari**.

Poiché i lipidi sono **insolubili** in soluzioni **acquose**, necessitano nel plasma di mezzi di trasporto. Alcuni di questi si legano con **modesta affinità** all'**albumina** altri entrano nella conformazione delle **lipoproteine** circolanti, contenenti **trigliceridi**, **colesterolo** e **fosfolipidi** associati con proteine specializzate dette **apoproteine**.

## Metabolismo dei lipidi

Le **riserve di energia** dell'organismo sono formate principalmente di **ac. grassi**, immagazzinati in forma di **trigliceridi** nel tessuto adiposo, da cui possono essere **idrolizzati** o per produrre **energia** direttamente o per essere convertiti in **glucosio** nella **gluconeogenesi**.

Il **colesterolo** può derivare dalla **dieta** od essere prodotto **endogenamente** ed è un importante costituente delle **membrane** ed è utilizzato nella sintesi degli **ac. biliari** e degli **ormoni steroidei**.

I **fosfolipidi** sono anch'essi importanti costituenti delle **membrane** e, in soluzione, **diminuiscono** la tensione superficiale dei liquidi. Hanno origine principalmente nel **fegato** e nell'**intestino**.

In **circolo**, i lipidi sono organizzati a formare con le apoproteine le **lipoproteine**, di cui esistono varie classi -> **Chilomicroni**, che si formano nell'**intestino** dopo l'assunzione di **trigliceridi** e di **colesterolo**.

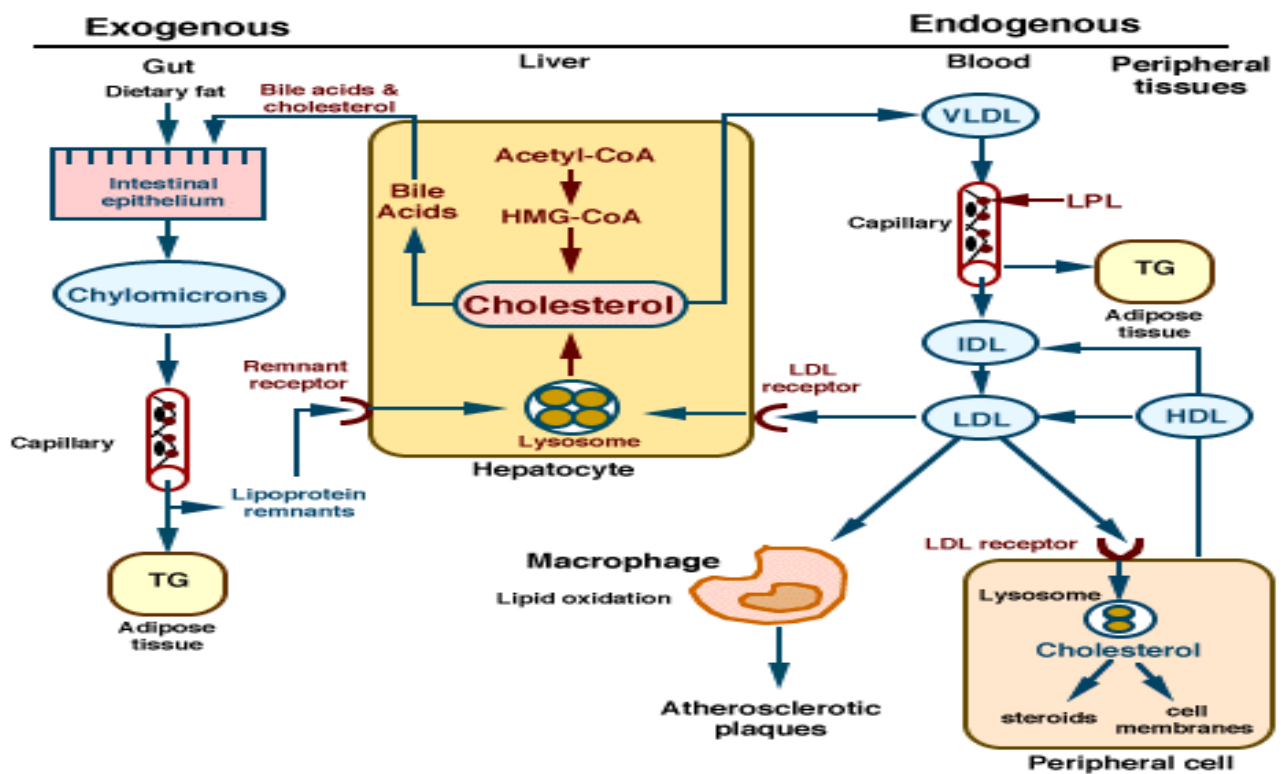
Vengono rilasciati nella **linfa** e poi raggiungono il **sangue**. Rilasciano **trigliceridi** al tessuto **adiposo**. Presentano sulla superficie l'**apoproteina B48**. Al termine del processo, i **residui** dei chilomicroni (**remnants**) vengono captati dal **fegato**.

-> **VLDL** o **lipoproteine a bassissima densità**, sono prodotte in seguito alla **sintesi di trigliceridi** da parte del **fegato** a partire dagli ac. grassi e contengono la **apoproteina B100** (conosciuta in clinica come **apoB**). In circolo sono modificate dalla **lipoprotein lipasi LPL** portando alla formazione delle **IDL** a densità intermedia che possono essere rimosse come **remnants** dal fegato.

-> **LDL** sono prodotte a partire dalle **IDL** per perdita della **apoE**. Le **LDL** vengono per il **70%** captate dal **fegato** mentre per il rimanente **30%** vengono captate da **altri tessuti**.

-> **HDL** modulano i livelli di **colesterolo** mobilizzandolo dai tessuti e **reintroducendolo** in circolo per introdurlo in **vie metaboliche** o indirizzarlo verso l'**escrezione**. Contengono anche **fosfolipidi** e l'apoproteina **apoA1** e sono rilasciate in circolo e sintetizzate **dal fegato**.





### Separazione e determinazione della concentrazione dei lipidi sierici e delle lipoproteine

I più importanti esami di laboratorio che riguardano i lipidi nel siero consistono nel dosaggio dei trigliceridi, nel dosaggio del colesterolo totale e nel dosaggio della frazione di colesterolo riferibile alle HDL. Le nuove metodiche permettono di determinare anche la concentrazione sierica delle apoA1 e delle apoB, che sono componenti delle HDL e delle LDL rispettivamente e quindi danno importanti informazioni riguardo la distribuzione delle 2 specie lipoproteiche nel siero del paziente. Gli ac. grassi liberi FFA e i fosfolipidi non vengono determinati di routine, ma solo in caso di specifiche alterazioni.

### Determinazione del colesterolo

I metodi per la determinazione del colesterolo in passato erano basati su metodi colorimetrici mentre oggi utilizzano la colesterolo ossidasi garantendo una specificità maggiore. Tuttavia, la scarsa solubilità dello sterolo né limita nel siero la quantità disponibile per i metodi enzimatici impiegati nella determinazione.

### Determinazione dei trigliceridi

I trigliceridi vengono determinati misurando la quantità di glicerolo liberato durante la loro idrolisi. I trigliceridi possono contenere differenti ac. grassi in proporzioni non prevedibili. I trigliceridi utilizzati come standard in queste misurazioni possono avere una composizione diversa dai trigliceridi contenuti nel campione.

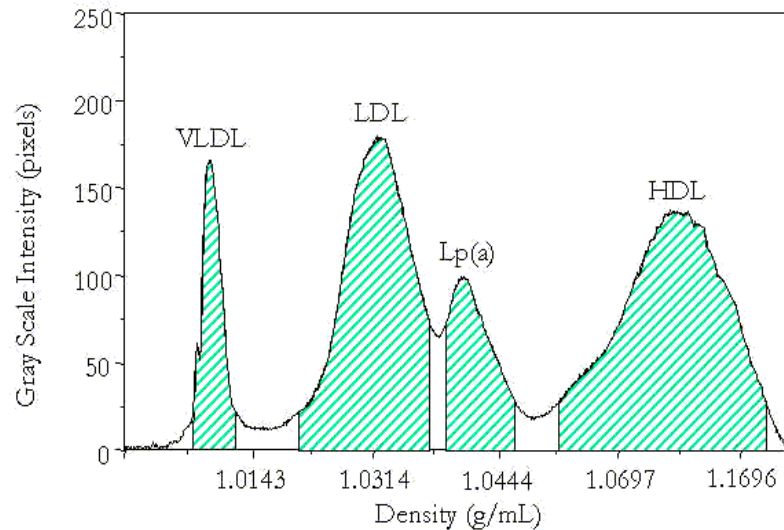
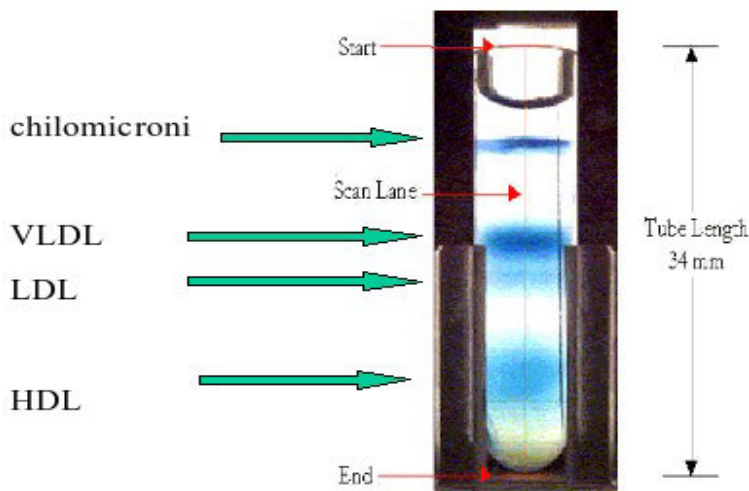
### Frazionamento per ultracentrifugazione delle lipoproteine

Le sostanze lipidiche sono meno dense dell'acqua e tra di loro, i trigliceridi sono meno densi di fosfolipidi e di colesterolo. Quindi, le lipoproteine meno dense sono quelle a contenuto di trigliceridi più elevato. I chilomicroni hanno un elevato contenuto di trigliceridi e peso specifico minore di quello del plasma, tendono quindi a portarsi verso l'alto in condizioni favorevoli alla separazione dei grassi dall'acqua, come si verifica mantenendo un campione in frigorifero per una notte. VLDL, LDL ed HDL

hanno in **quest'ordine** densità **progressivamente** maggiore dei chilomicroni.

Dopo **refrigerazione**, i chilomicroni in **eccesso** si portano verso la superficie e formano uno **strato cremoso**. Se dopo refrigerazione il campione si mantiene **torbid** indica un aumento delle **VLDL**. Gli aspetti possibili possono **combinarsi fra di loro** quindi un campione **uniformemente torbido** indica un **aumento** delle **VLDL** con i **chilomicroni normali** mentre una **crema** sulla superficie di un campione **torbido** indica un **eccesso** sia di **chilomicroni** che di **VLDL**.

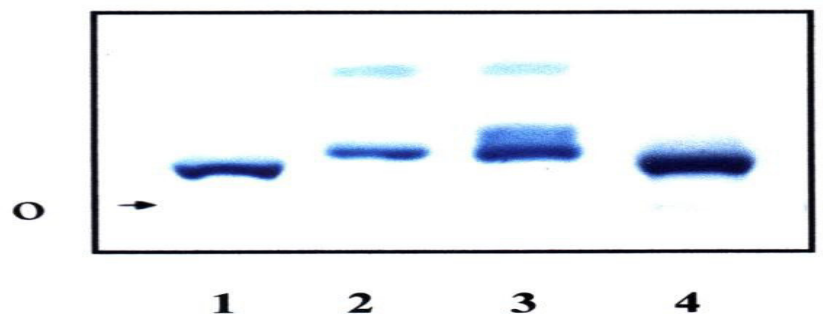
Si può ottenere la separazione delle **lipoproteine** utilizzando la **ultracentrifugazione** ->



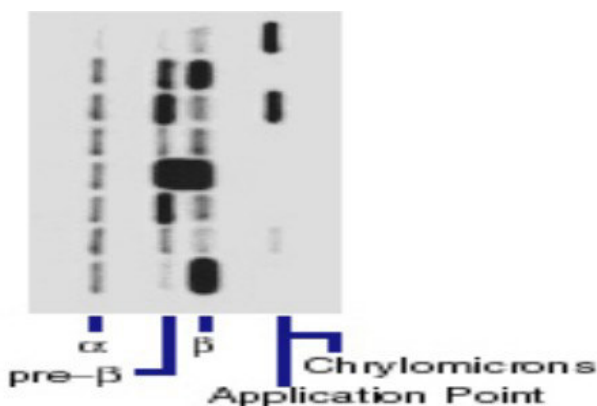
*Densitogramma di una separazione per centrifugazione delle lipoproteine del plasma.*

Poiché la ultracentrifugazione **non** è un metodo disponibile nella **maggior parte dei laboratori**, sono state sviluppate altre metodiche, tra cui, la più importante, la **elettroforesi delle lipoproteine sieriche**, che permette la individuazione, esaminando il tracciato elettroforetico in grafico, di diverse **bande di migrazione** ->

- 1- frazione LDL ottenuta per precipitazione selettiva.
- 2- plasma di un paziente normale.
- 3- plasma di un paziente iperlipidico.
- 4- frazione LDL ottenuta per ultracentrifugazione.



**I chilomicroni** si fermano all'origine della corsa elettroforetica  
**Le LDL** si fermano in posizione **beta**.  
**Le VLDL** in posizione **pre-beta**.  
**Le HDL** in posizione **alfa**.



Sulla base della *elettroforesi* delle lipoproteine sieriche, sono stati distinti *sei quadri* caratteristici di distribuzione delle *lipoproteine sieriche* ->

	fenotipo	chilomic	VLDL	IDL	LDL	COLE	triglic	Aspetto del siero
<b>I</b> – maggiori <i>chilomicroni</i> e <i>triglic</i> <i>-ceridi</i> .	I	++			-	+	+++	Tappo cremoso, siero limpido
<b>IIa</b> – maggiori <i>LDL</i> e quindi <i>colesterolo</i>	IIa				++	++	N	Siero chiaro giallo
<b>IIb</b> – maggiori <i>VLDL</i> ed <i>LDL</i> quindi sia <i>colesterolo</i> che <i>trigliceridi</i>	IIb		++	N	++	++	++	s.lievemente torbido
<b>III</b> – maggiori <i>IDL</i> e leggermente aumentate <i>VLDL</i> e <i>chilomicroni</i>	III	+	+	++	-	++	++	s.torbido opaco, strato cremoso
<b>IV</b> – maggiori <i>VLDL</i> > + <i>trigliceridi</i>	IV		++		N/-	+	++	s.torbido opalescente
<b>V</b> – maggiori <i>VLDL</i> e <i>chilomicroni</i> > + <i>trigliceridi</i> e poco aumentato il <i>colesterolo</i> .	V	++	++		-	+	++	Tappo cremoso, siero torbido

### Considerazioni cliniche

La determinazione dell'**assetto lipidico** è importante come mezzo per valutare il **rischio individuale** di sviluppare una **cardiopatía coronarica**. I **principali fattori** che influenzano la concentrazione dei **lipidi nel sangue** sono -> **apporto di colesterolo con la Dieta**.

-> **apporto calorico totale**.

I grassi assorbiti con la dieta sono trasportati al fegato come **chilomicroni** che dovrebbero scomparire dopo alcune ore dal pasto > il riscontro di **chilomicroni** in un individuo a **diggiuno** è un evento anomalo.

Un **apporto calorico elevato** mantenuto per un tempo prolungato produce un persistente aumento dei **trigliceridi** associati alle **VLDL**.

Un **apporto di grandi quantità di carboidrati** provoca anch'esso un rapido aumento di **trigliceridi** e quindi di **VLDL**.

Una dieta ricca di **grassi saturi e colesterolo** aumenta il contenuto di colesterolo delle **LDL** mentre il consumo di **grassi insaturi** può portare ad una **riduzione** del colesterolo totale.

### Ipercolesterolemia

Insieme a molti altri fattori di rischio (*fumo, età, sesso, sovrappeso, ipertensione*) costituisce una **grave minaccia** per la salute in quanto **predispone alla cardiopatía coronarica**.

Oggi è definitivamente accertato che il **colesterolo totale** predispone alla cardiopatía coronarica.

Il riscontro di **bassi** livelli di **colesterolo-HDL** è **inversamente** correlato alla insorgenza di cardiopatía.

Il riscontro di **alti** livelli di **colesterolo-LDL** è invece **direttamente** correlato all'insorgenza di cardiopatía.

Per quanto riguarda i valori della **colesterolemia** totale, individui con valori inferiori a **200 mg/dl** sono considerati normali, individui con valori tra i **200** e i **239 mg/dl** sono considerati ai limiti superiori della norma, livelli pari o superiori ai **240 mg/dl** sono considerati elevati.

Una **ulteriore suddivisione** prende in considerazione il **colesterolo-LDL** e afferma ->

-> individui con valori < **130 mg/dl** sono considerati normali.

-> individui con valori tra **130** e **159 mg/dl** sono considerati ai limiti superiori della norma.

-> individui con valori > **160 mg/dl** sono considerati a rischio elevato.

## Blood Cholesterol Guidelines

### TOTAL CHOLESTEROL (mg/dL)

< 200	Desirable
200-239	Borderline High
240+	High Cholesterol "Hypercholesterolemia"

## Blood Cholesterol Guidelines

### LDL CHOLESTEROL (mg/dL)

< 100	Optimal*
100-129	Near Optimal*
130-159	Borderline High Risk
160-189	High Risk
>190	Very High

### Ipercolesterolemia familiare FH

Esistono condizioni in cui gli *elevati livelli di colesterolo* in certi soggetti sono riferibili ad una **base ereditaria**. Gli individui in questione possono essere ->

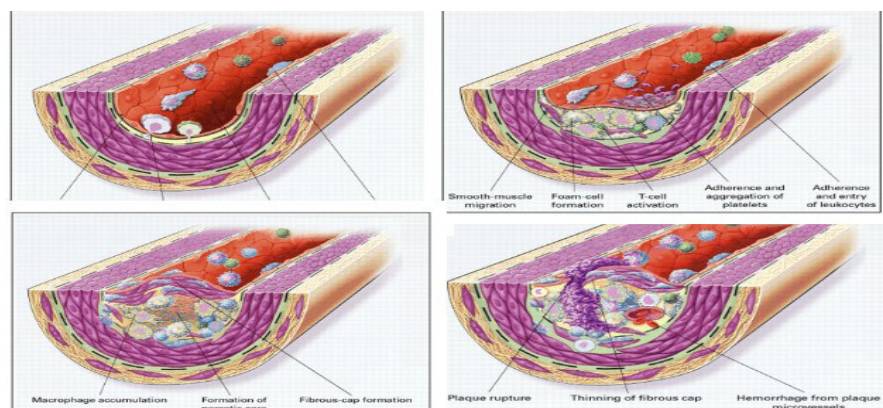
-> *eterozigoti* per il gene in questione, e di questi **1 su 500** ha il *colesterolo 2 volte la norma*, e ha *attacchi cardiaci* intorno ai **35 anni**.

-> *omozigoti* per il gene in questione, **1 su 10<sup>6</sup>** ha *attacchi cardiaci* tra i **2 e i 20 anni**.

I **difetti** che stanno alla base di questa condizione sono a carico del gene che codifica per il *recettore delle LDL* che non è più in grado di *internalizzare* le LDL ed utilizzarne il colesterolo, con la conseguenza che queste si *accumulano nel sangue*. Questi difetti possono essere distinti in **5 classi**->

- Classe 1: **non sono sintetizzati** recettori
- Classe 2: i Recettori vengono prodotti ma **non trasportati dal Ret Endoplasmatico al Golgi**.
- Classe 3: i Recettori raggiungono la superficie cellulare ma **non possono legare le LDL**.
- Classe 4: i Recettori legano le LDL, ma non si riuniscono in coated pits e non possono internalizzarsi. **La mutazione è sulla porzione citoplasmatica del recettore**.
- Classe 5: **il Recettore non può riciclare**.

L'*ipercolesterolemia* nelle sue varie forme, portando all'accumulo di **LDL**, è un importante fattore di rischio per l'insorgenza della patologia *aterosclerotica*. Le **LDL** nel plasma, in seguito ad un danno endoteliale che permette *l'infiltrazione* delle LDL e il loro legame alle *proteine della matrice*, vengono modificate ed *ossidate* dalle stesse cellule endoteliali e dai macrofagi. Le LDL ossidate non sono più riconosciute dal *recettore delle LDL*, esercitano una azione *pro-infiammatoria* e *pro-trombotica*





richiamando leucociti nella sede del danno, che hanno il ruolo di eliminare le **ox-LDL**, internalizzandole mediante i loro **recettori Scavenger**. Il successivo reclutamento delle **cellule muscolari lisce della media** e la trasformazione, per accumulo di LDL ossidate, dei macrofagi e delle cellule muscolari lisce in **cellule schiumose**, porta alla formazione prima delle **strie lipidiche** e successivamente della **placca aterosclerotica**, che può andare incontro a varie modificazioni e determinare parziale occlusione del vaso, o trombosi con completa occlusione. Se ciò si verifica a carico delle coronarie, ecco la insorgenza della **cardiopatía coronarica ischemica** e l'attacco infartuale.

### **Il Diabete come fattore di rischio per l'aterosclerosi**

Il **diabete** è un importante fattore di rischio per la insorgenza di cardiopatía ischemica per tutta una serie di motivi, in primis l'**aumento** di glucosio che porta ad un **aumento** dei grassi plasmatici e quindi **aumento** delle **LDL**.

- Elevazione del glucosio e dei grassi plasmatici
- Il glucosio si lega alle proteine ed è tossico
- aumentano le LDL e calano le HDL
- Alterazioni dei meccanismi di segnali cellulari
- Aumento del danno ossidativo
- Le cellule vanno in apoptosi
- Le cellule Endoteliali della muscolatura liscia diminuiscono la produzione di NO
- I vasi non si dilatano
- I leucociti aderiscono ai vasi e migrano al loro interno
- Aumentano le LDL ossidate
- Le cellule della muscolatura liscia proliferano e migrano
- La produzione di altri vasodilatatori è inibita
- La produzione di vasocostrittori è aumentata (aumento della pressione)
- Diminuisce la sintesi del Collagene nelle placche
- Si attivano i meccanismi dell'ocoagulazione

### **Terapie**

Le terapie per abbassare la **colesterolemia** comprendono ->

-> l'**attuazione di specifici regimi dietetici**.

-> l'**uso di resine per-os** che permettono di sequestrare gli ac. biliari ed impedire quindi l'**assorbimento** del colesterolo.

-> **somministrazione di farmaci che bloccano la sintesi del colesterolo intracellulare**.

La **riduzione** dei livelli plasmatici di colesterolo richiede dalle **4** alle **6** settimane, è quindi opportuno lasciar trascorrere questo **intervallo minimo** prima di procedere alla valutazione degli **effetti** della terapia.

# I Markers Tumorali

## Introduzione

I **marcatori tumorali** sono sostanze prodotte sia dal tessuto normale che da quello neoplastico, le differenze che si osservano sono solo a livello **quantitativo**.

Alcuni **markers** tumorali sono -> *prodotti metabolici delle cellule neoplastiche*

-> *prodotti di attività endocrine anomale* (produzione ectopica)

-> *sono markers specifici della neoplasia* (ag tumorali, enzimi ecc...)

Un marcatore, per essere **utile nella pratica clinica**, deve permettere di **individuare** la presenza di una neoplasia e di **controllarne l'evoluzione**. Un **markers ideale** dovrebbe essere **specifico** per *tutti* i tumori dello *stesso tipo* e la sua **concentrazione** nel siero del paziente dovrebbe essere **proporzionale** alla **massa del tumore**. I marcatori tumorali ->



## Tipologia di Markers Tumorali

Per ciascun **tipo** di neoplasia bisogna indicare i marcatori **appropriati** ->

**I marcatori di prima scelta** : sono associati alle caratt. biologiche (*estensione* e *tipo istologico*) e all'*andamento clinico* della neoplasia. Garantiscono un rapporto **costo/risultato** favorevole nella pratica routinaria

**I marcatori di seconda scelta** : sono associati alle *caratt. biologiche* ma non all'*andamento clinico* della neoplasia. Hanno importanza come utilizzo accessorio per *informazioni addizionali* o per *mancanza* del *marcatore di prima scelta*

**I marcatori affini** : appartengono a *famiglie* biochimiche nelle quali esistono **più molecole** che dovrebbero dare informazioni *simili* in una data *patologia*.

## Utilizzo diagnostico dei marcatori tumorali

Non vi è utilizzo dei **markers** tumorali per scopi diagnostici in quanto essi sono dotati :

-> *bassa sensibilità e specificità*

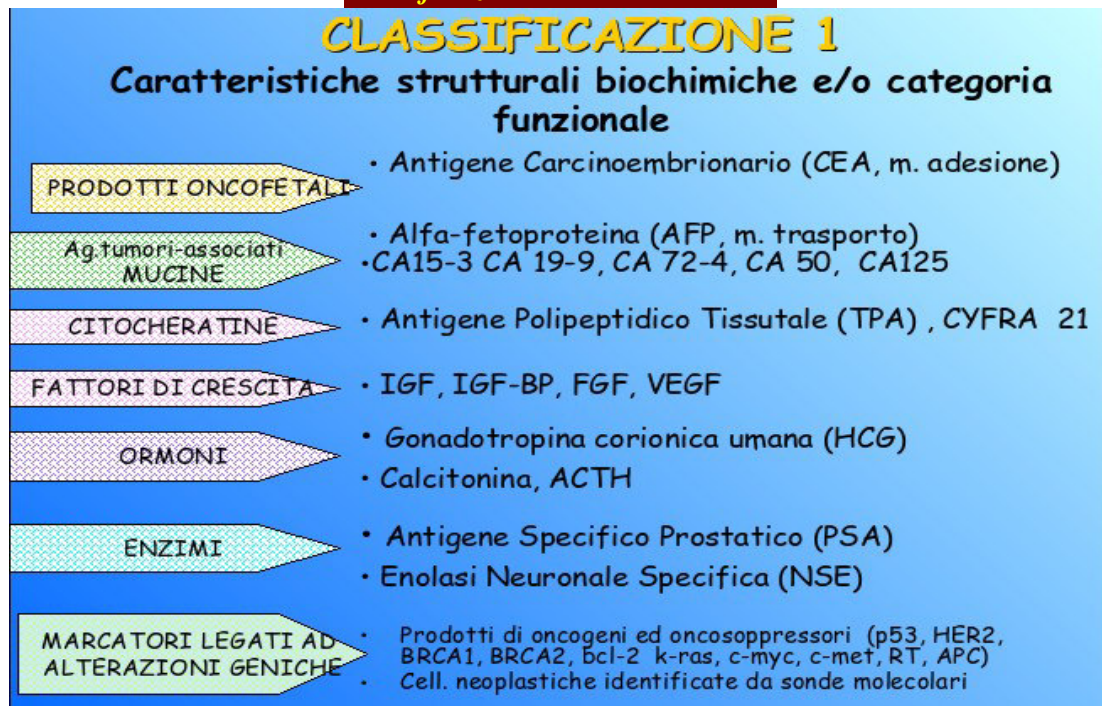
-> *Elevati livelli in malattie non-neoplastiche*

-> *La maggior parte non discriminano tra situazioni benigne e maligne*

-> *Il loro dosaggio è un test aggiuntivo di conferma*



## Classificazione markers tumorali



## Markers Metabolici

Tutti gli esami standard di *chimica clinica* possono subire delle **alterazioni** dipendenti dalla presenza di un **tumore** -> L'invasione di una neoplasia nel **midollo osseo** causa la **riduzione** in circolo di **eritrociti, leucociti e piastrine**, il cui numero in circolo è anche molto **sensibile** degli effetti della **chemioterapia**.

- > L'**intensa proliferazione** delle cellule tumorali, per l'**aumentato** turnover degli ac. nucleici, porta al rilascio di grandi quantità di **ac. urico**, i cui livelli aumentano anche quando vi sia **aumentata** distruzione delle cellule tumorali per fenomeni **necrotici** o **chemioterapici**.
- > In conseguenza di una neoplasia, **può essere alterato lo stato metabolico** del paziente con conseguente **riduzione** dei valori sierici di **albumina, pre-albumina, colesterolo e trigliceridi**. Tutto ciò può essere causato dal rilascio di **TNF** o **chachettina** (perchè causa *chachessia*) che **rallenta** il metabolismo inibendo la **lipoprotein-lipasi**.
- > La **riduzione** dei livelli di **albumina** o di altre proteine del siero può anche essere causata da una **diminuita** capacità **proteosintetica** del **fegato**, per la presenza anche di **estese metastasi**.
- > Durante una neoplasia, i livelli sierici di alcuni **enzimi**, come la **LDH**, sono **elevati** il **rilascio** di questi stessi dalle **cellule tumorali**.
- > La **disseminazione metastatica** della neoplasia al fegato può determinare ostruzione delle **vie biliari intraepatiche** con aumento dei livelli di **fosfatasi alcalina, bilirubina coniugata e bilirubina totale**.

Questi esami di laboratorio **non sono tumore specifici**, ma possono essere **indice** di una neoplasia molto **estesa**.

## Markers Endocrini

I **tumori** più facilmente identificabili grazie ad **alterazioni metaboliche** sono quelli **endocrini**, perché producono **elevate** quantità di ormoni attivi in maniera **autonoma** e svincolata **dai meccanismi di controllo**, dando luogo a **sindromi endocrine** da eccessiva produzione ormonale.

Alcune neoplasie producono ormoni **non caratteristici** del tessuto di origine (detta **produzione ectopica**), tra cui abbiamo ->

- > **alcuni carcinomi del polmone** che possono rilasciare **ACTH** dando luogo ad una **sintomatologia** tipica della sindrome di **Cushing**, da eccesso di produzione di **acth** che va ad agire sulla **corticale del surrene**.
- > Altri tumori possono **sconvolgere il bilancio idro-elettrolitico** dell'org. producendo in eccesso l'ormone **antidiuretico**.
- > **Emangiomi cerebellari** possono produrre **eritropoietina** in eccesso che stimola una eccessiva **maturazione dei globuli rossi**.

La produzione **ectopica** di ormoni da parte di un tumore è l'eccezione non la regola, quindi queste **sintomatologie endocrine** non rappresentano buoni markers tumorali, in quanto **non sono** sempre **presenti** nei tumori di un certo tipo.

Un marker endocrino utilizzabile con successo è la **calcitonina**, rilasciata in circolo in eccesso dal **carcinoma midollare** della tiroide.

## Enzimi utilizzabili come markers tumorali

### Fosfatasi acida prostatica

E' prodotta specificatamente dalle **cellule della prostata** (ovviamente solo nell'uomo), ed un suo aumento sierico è indice della presenza di una **carcinoma prostatico**.

L'**enzima** può essere rilevato dosando la sua **attività a Ph acido** oppure con metodi **radio immunologici**, la cui sensibilità è però così alta che spesso forniscono risultati **positivi** quando magari i liv. alti di enzima sono dovuti solo ad una **ipertrofia benigna** della prostata.

La determinazione di questo enzima **non** è utilizzabile come **test di screening**, ma la positività dell'esame è **indicativa** per coloro per i quali si sospetta già la presenza di tumore. Può anche essere utilizzato per **controllare l'eventuale presentarsi di recidive** dopo l'ablazione chirurgica del carcinoma.

### Creatina Chinasi CK

E' un enzima prodotto specificatamente dalle **cellule muscolari striate** (isoforma **MM**), dal **muscolo liscio** e dal **cervello** (isoforma **BB**) e dal **miocardio** (isoforma **MM** e **MB**).

Cellule **tumorali** di diversa origine (**carcinoma del polmone, della mammella e dell'ovaio**) possono **sintetizzare e rilasciare** in circolo **CK**.

La determinazione di queste **attività CK atipiche** si ha in genere quando la ricerca della **CK** la si fa per altre ragioni. **Dosaggi ripetuti nel tempo** permettono di distinguere la **CK** ectopica da quella originata dal danneggiamento di tessuti, in quanto nel primo caso i suoi livelli si mantengono **costanti** nel tempo. In queste occasioni, la **CK** è sempre rappresentata dall'isoforma **BB**, raramente dalla **MB**. La **determinazione di CK-BB** in circolo è un **markers tumorale significativo** ma non permette di

stimare le **dimensioni** e il **tipo** di tumore.

### *Fosfatasi Alcalina*

Le varie forme di *fosfatasi alcalina* possono essere distinte per **riscaldamento** o per **separazione isoenzimatica**, e sono prodotte specificamente da *fegato*, *osso* e *intestino*.

**Tumori metastatici** del fegato causano ripetutamente un **aumento** della fosfatasi alcalina nel **siero**, e analogamente **tumori ossei** causano un **aumento** della isoforma ossea dell'enzima. In alcuni tumori, si ha il **rilascio** della forma placentare dell'enzima, chiamata **enzima di Regan**.

### *Antigene prostatico specifico*

Il tumore della prostata **raramente** è aggressivo e porta a morte, nella **maggior parte** dei casi si **sviluppa lentamente** e viene scoperto in seguito ad **autopsie** di uomini morti per **altre cause**.

Lo **screening** per il carcinoma prostatico richiede la-> **determinazione del volume della ghiandola mediante esplorazione rettale**  
-> **determinazione dell'antigene prostatico (PSA)**  
-> **ecografia ed eventualmente agobiopsia**.

Valori **elevati** di **PSA** possono anche essere indice di una **ipertrofia benigna** della prostata. Il **PSA** è una proteina sintetizzata esclusivamente dalla prostata e individuata con **saggi immunologici**.

Alcune **interpretazioni** del dosaggio del **PSA** ne possono **aumentare** il valore diagnostico :

-> utilizzo di **valori di riferimento** per età, in quanto il **vol. prostata** ed la **[PSA]** aumentano con l'avanzare della **età**, aumentando il **limite superiore** per ogni decade di vita del paziente  
L'utilizzo di **un solo intervallo di riferimento** comporta un maggior numero di **falsi positivi**  
d'altro canto, l'uso di **più intervalli di riferimento** comporta la possibilità di **non trovare** alcuni casi di neoplasia

-> l'**incremento dei valori di PSA** nel tempo deve far sospettare dell'esistenza di **neoplasia**

-> il calcolo del **rapporto tra [PSA] e volume ghiandola**, calcolata mediante ecografia, dovrebbe **correggere** gli aumenti di concentrazione del PSA dovuti ad ipertrofia della prostata e far **risaltare** di più gli **eccessi** dovuti alla presenza di una **neoplasia**

-> la **determinazione del PSA libero** e del **PSA legato** offre dei vantaggi, in quanto la quantità di **PSA libero** sembra essere **maggiore** nei pazienti che **non hanno** un carcinoma, mentre in quelli con la neoplasia è **maggiore** la quantità di **PSA legato**.

### *Ormoni come Markers tumorali*

#### *Gonadotropina Corionica Umana hCG*

La **hCG** è prodotta durante la gravidanza dal **sinciziotrofoblasto** della placenta, ma può essere **secreto** anche da alcuni tumori sesso-specifici -> **coriocarcinoma** e **la mola iditiforme della donna**

-> **coriocarcinomi a cell. germinali dei testicoli nell'uomo**

La produzione autonoma di **hCG** da parte di queste neoplasie porta ad un suo aumento nel **siero** e nelle **urine**. La ricerca di **quantità** molto basse di ormone è utile per il monitoraggio di **recidive** dopo la rimozione chirurgica del tumore.

Il **dosaggio** della **hCG** è inizialmente stato messo a punto come *test di gravidanza* e tali metodi hanno permesso determinazioni **quantitative precise** in gravidanza, dove la produzione di **hCG** è **elevata**, ma non permettevano di evidenziare le **piccole quantità** presenti nelle fasi iniziali della crescita di un **tumore** o di una **recidiva**. I metodi *immunologici* utilizzavano inoltre **Ig policlonali** che **cross-reagivano** contro gli ormoni ipofisari **LH, FSH** e persino **TSH**.

Oggi sono stati messi a punto test per il *dosaggio della hCG* dotati di maggiore **specificità** e **sensibilità** grazie all'uso di **Ig monoclonali** specifici contro le singole **sub-unità** della molecola.

Quasi tutti i saggi riconoscono la molecola **intera**, nelle sue subunità **alfa** e **beta**. In alcuni tumori tuttavia si può avere la produzione o solo della catena **beta** o solo della **alfa** e quindi questi tumori **non** vengono **evidenziati** dai **test standard**, ma richiedono **test specifici** per la determinazione delle singole subunità della **hCG**.

### *Prodotti OncoFetali*

#### *Antigene CarcinoEmbrionario*

Il *carcino embryonic antigen CEA*, è presente durante la vita fetale ma non nell'adulto ed è detto **antigene oncofetale** in quanto può essere prodotto da pazienti affetti da **tumori** del tratto **gastro intestinale** e del **pomone, mammella** ed **ovaio**. Livelli elevati di **CEA** si possono avere anche nei **fumatori** o in molte malattie **infiammatorie** per cui **non** è un **markers tumorale specifico**.

Il **CEA** è il parametro più importante per i tumori del *colon-retto*, nell'individuazione di **recidive** dopo rimozione chirurgica o chemioterapia. E' necessario stabilire **caso per caso** se sia necessario monitorare i livelli di **CEA** in quanto alcune neoplasie **poco-differenziate** non sono accompagnate da un *innalzamento dei livelli di antigene*.

Affinché il **monitoraggio** del paziente sia corretto, producendo, molte aziende, **Ig monoclonali** con **reattività diversa**, esso deve effettuare le **determinazioni del CEA** semopre presso lo **stesso laboratorio**. Il **CEA** può cambiare leggermente la reattività **antigenica** se legato al **Ca**, per cui si possono avere risultati diversi se l'esame viene effettuato su campioni o di **siero** o di sangue con **chelanti il Ca**. Sono state definite le **linee guida** della **ASCO** (*American Society of Clinical*

*Oncology*) per l'uso del **CEA** -> **non deve essere usato** come test di screening del carcinoma del colon retto

- > **può essere determinato** prima di un intervento chirurgico in un paziente con c. del colon-retto se ciò **può essere utile** per la **stadiazione** e **pianificazione** del trattam.
- > **può essere determinato** ogni 2-3 mesi dopo l'*ablazione* del tumore qualora si pensi di poter **intervenire** su eventuali metastasi epatiche.
- > **può essere** utilizzato per **seguire** la risposta al trattamento di metastasi.

Queste linee guida stabiliscono il **CEA** come marcatore di **prima scelta** per il **monitoraggio** del carcinoma del colon retto, nonostante la sua relativa **aspecificità** per questa neoplasia.

Il **CEA** ha un ruolo come **molecola** di **adesione intercellulare**. Nel tumore, questo può alterare le forze di adesione *intercellulare* o con il collagene della *matrice* portando ad un aumento del movimento cellulare e quindi favorisce la -> *diffusione metastatica*.

Il tumore può esprimere **alte concentrazioni tissutali** anche se i **valori sierici non sono elevati**:



- > per la **scarsa vascolarizzazione** del tumore;
- > per la **rapidità della clearance**.

I valori **normali** sono per i soggetti non fumatori **<5 ng/ml** e per i fumatori sono **<10 ng/ml**.

La misurazione dei livelli di **CEA** nella bile della colecisti permette di identificare precocemente la presenza di **metastasi** a livello epatico del **c. colon-rettale**. Si possono avere però falsi positivi in quanto aumentati liv. di **CEA** si possono avere anche nella -> **colecistite, colangite ed epatoma**.

### alfa-fetoproteina

E' la **principale** proteina del siero fetale analogamente all'**albumina** dell'adulto. E' un **antigene oncofetale** in quanto può essere espresso da alcuni tumori della **linea germinale** (teratoma immaturo e carcinomi testicolari ed ovarici). La **determinazione** dei liv. dell'**ag** attualmente è usata per la **diagnosi** di **tumore epatico**. Tuttavia, alcune alterazioni epatiche **non-neoplastiche** (cirrosi, epatite, necrosi) possono essere **accompagnate** da un **aumento** di **alfa-fetoproteina** nel siero, lo stesso può verificarsi anche in caso di **metastasi epatiche** di tumori di altri distretti.

### Antigeni tumore-associati della classe delle Mucine

#### ANTIGENI TUMORE-ASSOCIATI MUCINE

Gli antigeni tumore-associati di 1° o 2° scelta comprendono:

- **CA 125** (ovaio, mammella, polmone, pancreas, colon)
- **CA 19-9** (pancreas, colon-retto, stomaco, ovaio, vie biliari)
- **CA 50** (pancreas, colon-retto, prostata)
- **CA 15-3** (mammella, ovaio, pancreas, polmone)
- **CA 72-4** (stomaco, colon, pancreas, mammella)
- **TPA** (mammella, tumori ginecologici, gastrici, colon-retto)

Le **mucine** sono glicoproteine ad elevato **PM**, e sono costituite di una proteina globulare, **apomucina** legata a diverse catene **oligosaccaridiche**. Le mucine associate al gene **MUC-1** hanno un ruolo favorevole nella disseminazione del tumore.

Sono **secrete** dalle cellule secernenti di tessuti di origine **epiteliale** e riversate sulla **superficie**, e sono presenti nelle **secrezioni mucose** del tratto **gastrointestinale**, mucosa **cavo orale** ed **apparato respira.** e anche nel tratto **urogenitale** e sono presenti anche nel latte.

Funzionano come **colloidi** lubrificanti e protettivi della mucosa del tratto **gastrointestinale** e proteggono la mucosa dall'attacco di **enzimi digestivi, microorganismi e secrezioni acide**.

### Antigene CA-125

E' una **glicoproteina** normalmente presente nella donna nelle **tube di falloppio, cervice ed endometrio**. Compare nel siero in pazienti affetti da **carcinoma ovarico** o **adenocarcinoma** della **cervice** o delle **tube uterine**. Può essere prodotto anche da tumori di altri organi come **polmone** o tratto **gastrointest.** Nell'**1-2%** di pazienti, si trovano **alti** liv. di **CA-125** anche in malattie **non-neoplastiche**, come la **endometriosi** o la **malattia infiammatoria pelvica**.

L'applicazione più corretta del **CA-125** consiste nel **monitoraggio** della terapia e **controllo di**



eventuali recidive ma non in processi di screening.

### Antigene CA-15-3

E' un **ag** riconosciuto **contemporaneamente** da **2 anticorpi** monoclonali, detti **I15D8** ed **DF3**, e viene quindi misurato con una **tecnica a sandwich**, in cui l'**ag** lega **entrambi gli anticorpi**. Questa **doppia reattività** è indice di un **maggior** grado di **specificità**. E' elevato in **carcinomi della mammella** o talvolta in pazienti con **tumore del polmone**. Non può, tuttavia, essere usato come **test di screening** per il **c. della mammella** in quanto è elevato nel **5-6%** delle donne **sane**. Inoltre non è neanche sufficientemente **sensibile** da individuare il tumore nelle fasi precoci. Viene usato nel **monitoraggio delle metastasi** solo quando **non vi sia** altro metodo per controllare l'**evoluzione della neoplasia**. Un altro **marker** usato nel monitoraggio del carcinoma mammario è il **CA-27.29**, il quale rispecchia lo stesso **immunogeno** di **CA-15-3** ma riconosciuto mediante **epitopi diversi**, per cui presenta le stesse limitazioni.

### Antigene CA-19-9

E' una **mucina** formata da una **glicoproteina** la cui regione periferica corrisponde al **determinante Lewis<sup>A</sup>** dei gruppi sanguigni. Si trova nell'epitelio normale di ->

*> prostata, pancreas, colecisti e stomaco <*

I suoi livelli sono più **elevati** nei pazienti con adenocarcinomi di ->

*> pancreas, stomaco, colecisti, ovaio e polmone <*

I livelli sierici sono **elevati** nell'**80%** dei pazienti con **carcinoma pancreatico**, per cui è diventato un **marker** d'elezione per il monitoraggio di questo carcinoma. Livelli elevati si riscontrano anche nelle **malattie infiammatorie dell'intestino**, nella **cirrosi** e nelle **malattie reumatiche**.

## Altri Markers Tumorali

### Antigene Tumorale Vescicale

Un saggio per la diagnosi di tumore della vescica è il **BTA** (*bladder tumoral antigen*), che utilizza **due anticorpi monoclonali** per quantificare la proteina **FH** che protegge le cellule normali dall'attacco del complemento. Tumori che la esprimono hanno un **vantaggio selettivo** in quanto **meno suscettibili** all'attacco del sistema immunitario. Può risultare elevato anche in pazienti con **calcolosi** od **infezioni del tratto urinario**.

### Sangue occulto nelle feci

E' utile come **screening** per il carcinoma colon-rettale, ma sangue nelle feci può essere evidenziato anche in caso di **ulcere** o di **emorroidi**. Si esamina un campione di feci assorbito su di un cartoncino impregnato con resina di **guaiaco**. Si aggiunge **acqua ossigenata** di modo che l'attività perossidasi della **Hb** determina la comparsa di una **colorazione blu**. La sensibilità del test può essere aumentata **reidratando** i campioni di feci essiccate durante il trasporto.

### Recettori per gli Estrogeni e per il Progesterone

La presenza di **recettori per gli estrogeni ER** e per il **progesterone PR** nelle cell. tumorali indica la

possibilità del tumore di rispondere a **variazioni** dello stato endocrino della paziente e a terapie date dalla somministrazione di **estrogeni** od **antagonisti degli estrogeni**.

I **ER** si trovano nel citosol o nel nucleo delle cellule e, una volta legato l'ormone, il complesso interagisce con il **DNA** determinando l'espressione di geni tra cui quelli che codificano per i **PR**, la cui presenza è indice di **funzionalità** del sistema **estrogeni-ER**.

La presenza di entrambi i R suggerisce che il **tumore** risponderà alla **terapia endocrina**.

L'esame viene effettuato mediante tecniche di **immunoistochimica** utilizzando **Ig monoclonali** specifici legati a **fluorocromi** in grado di legare specificamente gli **ER** e i **PR** nelle cellule di sezioni sottili ottenute da **biopsie di mammella**.

Altri **markers** identificabili nelle neoplasie mammarie sono la **catapsina D**, il **recettore dell'EGF**, e la **oncoproteina HER/neu**, che danno informazioni circa l'**aggressività** del tumore.

### **Papillomavirus**

Sono stati riconosciuti come gli agenti causali di **verruche volgari cutanee** e di **verruche anogenitali** e sono associati anche al **carcinoma della cervice** uterina. Non è possibile coltivare il virus, esistono però delle **sonde DNA** specifiche per i **diversi tipi di HPV**. L'analisi può venire effettuata su **sezioni** ottenute da **biopsie cervicali** o su DNA estratto da **biopsie** o **strisci cervicali**.

### **Riarrangiamenti genici**

Le **malattie linfoproliferative** sono in genere considerate benigne se **policlonali** o maligne se **monoclonali**. Un indice di **monoclonalità** tradizionale è la presenza di un **picco M** nella frazione immunoglobulinica del siero di pazienti con **mieloma multiplo**. Nel caso però di **linfomi** di cellule B non secementi o di cellule T, tale **marker** non sempre è presente.

Nei casi di **diagnosi** difficile, oggi è possibile analizzare il **DNA** mediante le tecniche del **southern-blot**

#### **-> Southern Blot**

Richiede l'estrazione di DNA genomico da una popolazione di almeno **20 milioni** di cell. Tale DNA viene quindi **digerito** con **endonucleasi** di restrizione che tagliano il DNA a livello di specifiche **sequenze nucleotidiche**, dando origine a frammenti di alcune centinaia di basi. Questi vengono **separati** per elettroforesi, trasferiti su una **membrana di nylon** o **nitrato di cellulosa** e quindi incubati con delle **sonde** di DNA **radioattive** che formeranno complessi a doppia elica nei siti ove è presente **omologia di sequenza**.

Il DNA normale ricavato da una pop. policlonale, mostrerà una **serie di bande** riferibili ai frammenti generalmente osservabili in quella linea germinale. Una pop. **monoclonale** darà origine ad una **sola banda** per la presenza di un **singolo riarrangiamento genico** che può riguardare solo le cell. **B** o **T**. Questo test è in grado di individuare la presenza di meno del **5%** di **cellule monoclonali** all'interno di una popolazione policlonale.

Per avere maggiore **sensibilità**, si può utilizzare prima la **PCR**.

In alcuni pazienti affetti da **leucemia linfoblastica acuta** e nella maggior parte di quelli affetti da **leucemia mieloide cronica** si ritrova la presenza nelle cellule tumorali di una traslocazione **9 – 22** che

porta adiacenti due geni *abl* e *bcr* a formare il cromosoma *philadelphia* contenente il **gene ibrido *abl/bcr*** codificante una proteina ad attività tirosin chinasi sempre attiva, **responsabile** dello sviluppo della neoplasia. Utilizzando sempre il **Southern Blot** in modo simile è possibile dimostrare la presenza del riarrangiamento *bcr/abl*. Queste stesse tecniche permettono di individuare anche la presenza di **altri riarrangiamenti** come quello che si ha nella traslocazione **15 – 17** e la formazione del **gene ibrido *RAR $\alpha$  / PML***, che si ha nella *leucemia promielocitica*.

#### -> Ibridazione con sonde fluorescenti

È un test utile per evidenziare **alterazioni cromosomiche** come le aneuploidie ed è detta **FISH**. Si effettua utilizzando **sonde di DNA** legate a molecole fluorescenti. Le cell. da esaminare si fanno **crescere in vitro**, successivamente si trattano con *calcemide* per far arrestare la crescita in *profase*. Le cellule vengono fissate e incubate con la sonda, che si andrà a legare con le sequenze per cui presenterà omologia... sonde **specifiche** ad esempio per il cromosoma **9** legheranno tutti i **segmenti** facenti parte del cromosoma 9, quindi anche quelli presenti su altri cromosomi in seguito a processo di **traslocazione**.

## ImmunoMetria (alcuni grafici)

# IMMUNOMETRIA

## REAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

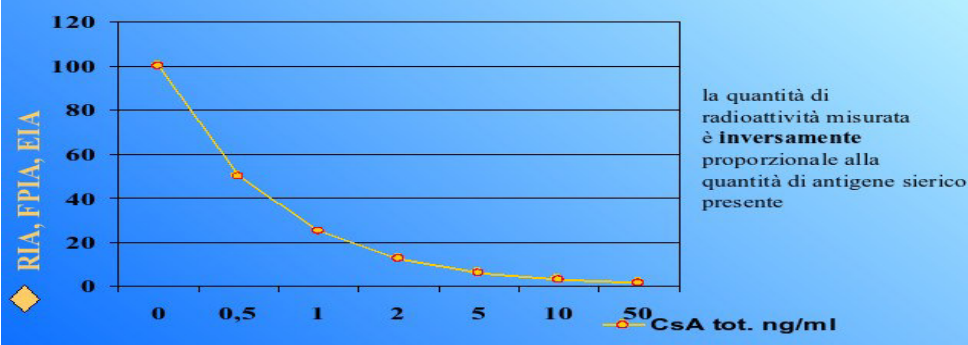
Metodi analitici quantitativi di peptidi **antigenici** –(solubili) mediante l'utilizzo di **anticorpi** poli- o mono- clonali:

*"elevata sensibilità analitica"*



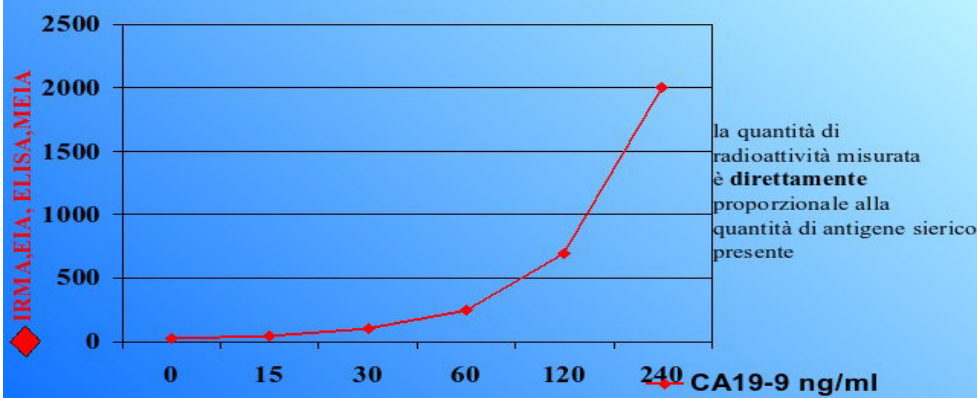
## Sistemi Competitivi

### Curva di calibrazione Sistema competitivo



## Sistemi non – Competitivi

### Curva di calibrazione Sistema non competitivo



## Medicina Trasfusionale – sistema gruppi ematici

### Gruppi sanguigni - fisiologia

Sulla **membrana eritrocitaria** sono presenti diverse molecole, *proteine* e *carboidrati* in grado di indurre una **risposta immunitaria**. Fino ad ora sono stati individuati **26** sistemi gruppo-ematici, i più importanti sono il **sistema antigenico AB0** e il **sistema antigenico Rh**.

#### Sistema gruppo-ematico AB0

##### Generalità

Gli **antigeni** principali di questo sistema sono definiti **A** e **B** e gli anticorpi contro questi antigeni **anti-A** e **anti-B**. La specificità e la presenza di queste **Ig** sono la conseguenza dell'esposizione ad **antigeni** ambientali **ubiquitari** che hanno struttura e specificità sovrapponibile a quella degli **antigeni eritrocitari**. Nonostante tutti gli individui vengano in contatto con questi determinante antigenici ambientali, ogni individuo possiede solo **anticorpi** contro **antigeni che non possiede**.

##### Geni e antigeni

Gli **antigeni** del sistema **AB0** sono costituiti da particolari **gruppi carboidratici** alla estremità di una corta **catena glucidica** legata ad una macromolecola **lipidica** o **proteica** inserita nella membrana **eritrocitaria**. La maggior parte è legata a carboidrati o lipidi di membrana detti **glicosfingolipidi**.

I **geni A** e **B** codificano per 2 **glicosil-transferasi** diverse :

-> il prodotto del gene **A** catalizza l'attacco di una molecola di *N-acetilgalattosammina* al residuo di *galattosio* terminale di una corta catena carboidratica, e si forma l'**antigene A**

-> il prodotto del gene **B** catalizza l'attacco di una seconda molecola di *galattosio* al residuo di *galattosio* terminale della catena carboidratica, con la formazione dell'**antigene B**.

Prima di poter accettare lo zucchero, una molecola di *fucosio* deve essere legata al *galattosio*, ed tale molecola, priva dei monosaccaridi che determinano la specificità A o B è detta **sostanza H**. Le cellule che non presentano né **specificità** di tipo **A** e né di tipo **B** sono dette appartenenti al gruppo **0**. L'attacco del residuo di *fucosio* a quello di *galattosio* terminale della catena glucidica è mediato da un enzima chiamato **fucosil-transferasi**, il prodotto del **gene H** che è sito sul cromosoma **19**.

Rarissimi **individui** sono omozigoti per l'allele *h* (*hh*), che è **inattivo**, per cui non producono l'enzima necessario al trasferimento del *fucosio* sul *galattosio*, cosicché i loro **eritrociti** non posseggono la **specificità H**, e neanche gli antigeni **A** o **B** in quanto la sostanza **H** è necessaria per la loro formazione. Il siero di questi individui contiene **Ig anti-A**, **anti-B**, e **anti-H**, e tale costituzione è detta **fenotipo Bombay**.

Esistono **diversi alleli** del locus AB0 ed i più comuni sono gli alleli **A**, **B** ed **0**.

-> Individui con genotipo **00** non producono enzimi per trasformare la sostanza H in antigene A o B, per cui le loro cellule hanno **attività H** e il loro siero contiene anticorpi **anti-A** e **anti-B**. Appartengono al **gruppo 0**.



- > Individui con genotipo **A0** od **AA** posseggono gli eritrociti con **antigeni A**, per cui sono detti del **gruppo A** e il loro siero contiene anticorpi **anti-B**
- > Individui con genotipo **B0** o **BB** posseggono gli eritrociti con **antigeni B**, per cui sono detti del **gruppo B** e il loro siero contiene anticorpi **anti-A**
- > Individui con entrambi gli alleli **A** e **B**, quindi con genotipo **BB**, posseggono entrambi gli antigeni **A** ed **B** per cui sono detti di **gruppo AB** e non posseggono nessun tipo di anticorpi

### Sottogruppi di A

Nella popolazione generale sono presenti due **alleli A**, l'allele **A1** e l'allele **A2** che codificano per due differenti **transferasi** :

- > la transferasi **A1** non è molto efficiente nel trasformare la **sostanza H** negli **antigeni A e B** per cui conferisce una **debole specificità antigenica A** agli eritrociti, sui quali rimane una quota di sostanza H.
- > la transferasi **A2** è in grado di trasformare **tutta la sostanza H** in **antigene A**.

Individui con genotipo **A2A2** o **A2A0** hanno eritrociti con **fenotipo A2**, mentre individui con genotipo **A1A2** hanno fenotipo **A1**. L'espressione fenotipica di un gene **A1** o **A2** non è modificata dalla **coesistenza** di un gene **B**. Il **20%** dei soggetti di gruppo **AB** è **A2B**, mentre la maggiore parte è **A1B**. Nel siero di individui con **fenotipo A2** o **A2B** possono essere presenti anticorpi **anti-A1** con tutti i problemi annessi in caso di **trasfusione** di sangue, visto che il fenotipo più rappresentato è quello **A1** (si ha **agglutinazione** delle emazie che esprimono l'**antigene A1**).

Le **varianti di B** sono piuttosto rare e solo poche sono associate a scarsa attività.

### Anticorpi del sistema AB0

Lo stimolo della produzione degli anticorpi **anti-A** ed **anti-B** è dato dal **continuo** contatto con componenti delle **pareti batteriche** che presentano strutture simili a quelle che caratterizzano i **glicosfingolipidi eritrocitari** e che induce nell'individuo immunologicamente attivo la produzione di **anticorpi** specifici per l'**antigene** che non possiede. I batteri possiedono anche il **gruppo galattosio – fucosio**, nonostante ciò anticorpi **anti-H** sono rari in quanto quasi **tutti** gli eritrociti hanno la **sostanza H**. Gli **anti-A** e gli **anti-B** appartengono alla classe delle **IgM** e sono in grado di causare la **agglutinazione** e la **emolisi** degli eritrociti **mediata dal complemento**. Alcuni di questi appartengono alle **IgG** e **opsonizzano** l'eritrocita senza arrecarvi danno immediato. Questi possono **attraversare la placenta** e dare la *malattia emolitica del neonato*.

### Secrezione o non secrezione

Le **sostanze A**, **B** ed **H** possono essere presenti nelle secrezioni dell'organismo, e la capacità di secernere queste sostanze dipende dal **gene secretore (Se)** sito sul cromosoma **19**. I soggetti secretori di gruppo **A** o **B** o **AB** avranno nella **saliva** rispettivamente la sostanza **A**, **B** o **entrambe**. L'incidenza del **gene Se** raggiunge l'**85%**.

## Sistema gruppo-ematico Rh

### Generalità

Il **sistema Rh** è il più importante dopo il sistema **AB0**, ma a differenza di quest'ultimo, gli **anticorpi anti-Rh** non vengono prodotti se non **dopo il contatto con l'antigene**. L'antigene più importante del sistema Rh è detto **antigene D** ed è presente sulle emazie dell'**85%** degli individui. Chi non lo possiede può formare anticorpi **anti-D** se esposto al contatto con l'antigene, tuttavia la probabilità dei soggetti **Rh-negativi** di formare anticorpi **anti-D** al contatto con cellule **Rh-positive** è del **50-75%**.

### Antigeni del sistema Rh

Gli individui con gli **eritrociti** esponenti l'**antigene D** sono detti **Rh-positivi**, viceversa **Rh-negativi**. Oltre a D, anche altri **4 antigeni**, i cui geni sono siti sul cromosoma **1**, hanno **importanza clinica**. L'antigene **D** è stato il primo ad essere individuato in quanto contro di esso si formano più **facilmente anticorpi** specifici.

### Geni Rh

I geni codificanti per gli **antigeni Rh** vengono ereditati in blocco, come **aplotipo**. I prodotti dei geni Rh hanno un **alto contenuto di lipidi** ed entrano nella composizione della membrana eritrocitaria in maniera **più integrale** rispetto agli antigeni **ABH**. Ogni individuo nel proprio genoma, avendo **2 cromosomi 1**, possiede **2 aplotipi**, quindi :

-> se sui cromosomi **1** è presente la stessa serie di alleli, i **globuli rossi** avranno **1** solo set di **antigeni**.

-> se sui cromosomi **1** sono presenti alleli **diversi**, gli aplotipi saranno **2**.

Dei **5 più comuni antigeni**, ogni individuo deve possederne almeno **2** (**c** e **C**, **e** e **E**), e questo fenotipo minimo è presente negli individui con **genotipo rr**, mentre la dimostrazione del fenotipo Rh può evidenziare massimo la presenza di **5 diversi antigeni**, e si verifica con il genotipo **R1R2**.

Gli individui **Rh-negativi** mancano dell'allele **D**, ma possono avere sia **C** che **c** in entrambi gli aplotipi e la stessa cosa vale per **E** ed **e**.

### Anticorpi anti-Rh

Tutti gli individui **Rh-negativi** formano anticorpi **anti-D** se vengono messi in contatto con l'**antigene D** esposto da cellule **Rh-positive**. E' più probabile che ciò avvenga durante una **trasfusione** che durante una **gravidanza**, in quanto nel primo caso l'individuo viene in contatto con un numero di cellule **Rh-positive** di sicuro maggiore. Gli anticorpi contro gli altri **antigeni del sistema Rh**, (**E** ed **e**, **C** e **c**) si hanno così raramente che nelle **pratiche trasfusionali** non si ritiene utile verificare la compatibilità tra **donatore** e **ricevente** riguardo questi antigeni. Gli anticorpi **anti-D** sono generalmente della classe **IgG**, non attivano il complemento ma **opsonizzano** le cellule circolanti che vengono eliminate a livello del **sistema reticolo-endoteliale**. Nella ricerca degli anticorpi **anti-Rh** si può eseguire un test in provetta nel quale si ha solo una **limitata agglutinazione** degli eritrociti in

quanto gli anticorpi si limitano a **ricoprire le emazie**.

### **Immunoprofilassi Rh**

La formazione di anticorpi **anti-Rh** in donne gravide **Rh-negative** si può prevenire somministrando per via parenterale anticorpi **anti-D preformati** nel momento in cui le cellule **Rh+** entrano nel circolo materno ad un livello più **alto**. Gli anticorpi iniettati **mascherano** i siti antigenici presenti sulle cellule fetali **Rh+** che quindi perdono la capacità di indurre la produzione di anticorpi dall'organismo materno.

In genere si **iniettano 300 microg** alla 28° settimana e la dose viene somministrata di nuovo al momento della **nascita di un bambino Rh+**.

In caso di trasfusione **Rh incompatibile**, occorre somministrare **25 microg** di **anti-D preformato** per ogni **ml** di sangue erroneamente trasfuso.

Le cellule **Rh+** vengono quindi rivestite dell'anticorpo **anti-D preformato** e vengono eliminate dalla milza, impedendo che l'individuo vada incontro ad **immunizzazione**.

### **Alloimmunizzazione eritrocitaria**

La produzione di **alloanticorpi** contro **antigeni eritrocitari** si realizza quando nel **sangue** di un individuo entrano **eritrociti** con **spettro antigenico** diverso. **Gravidanza** e **trasfusioni** sono le condizioni tipiche.

L'immunizzazione produce inizialmente anticorpi **IgM**, la cui presenza è breve, e **IgG** che sopravvivono a lungo. Gli anticorpi possono determinare :

-> **emolisi dei globuli rossi** in vivo (**IgM** che attivano il **complemento**)

-> **opsonizzazione delle emazie** (**IgG** che **non** attivano il **complemento**)

La risposta anticorpale specifica per un dato antigene si indebolisce col tempo, per cui se vengono trasfuse **emazie** positive per l'antigene in pazienti immunizzati in cui però non si è riuscita a dimostrare la presenza di **Ig** specifiche, la **sintesi dell'anticorpo** riprende ed esso riappare in circolo -> **risposta anamnestic**, che provoca la **distruzione** delle emazie trasfuse.

### **Produzione di anticorpi in assenza di stimolo apparente**

Gli anticorpi **anti-A** ed **anti-B** sono gli unici che si ritrovano nel **siero** di pazienti mai venuti a contatto con l'antigene. Tuttavia talvolta è possibile individuare anche **anticorpi** contro altri **antigeni** eritrocitari in soggetti **mai** venuti a contatto con **eritrociti umani**. Sono chiamati...

-> **anticorpi naturali** e lo stimolo immunogenico che induce la loro produzione consiste in materiale ambientale **antigenicamente simile** agli antigeni eritrocitari in questione. In genere sono **IgM** con *optimum* di attività a **30°C**, alcuni mantengono attività a **37°C** e vengono perciò tenuti in maggiore considerazione, comprendenti le **Ig anti-A** ed **anti-B** che sono le **più importanti dal punto di vista clinico**.

Esistono altri anticorpi naturali per gli antigeni dei **sistemi lewis, Ii, P o MNS**. Le **Ig anti-Lewis** sono abbastanza comuni nella popolazione **non immunizzata** ma è piuttosto raro che causino **emolisi** in vivo... infatti la **maggior parte** non causa assolutamente **problemi clinici**.

### Siero anti-globuline umane (Siero di Coombs)

#### Definizione

Il termine **siero di coombs** è utilizzato per indicare un reagente contenente **anticorpi anti-globuline umane**. Si possono ottenere **Ig anti-Ig umane** -> **polispecifiche** (*panspecifiche*)

-> **monospecifiche**, che possono essere dirette contro un preciso **dominio** delle molecole anticorpali o contro le **frazioni del complemento**.

Le metodologie moderne fanno uso di **anticorpi monoclonali** che permettono di definire globuline con più **precisa specificità**. I test di screening nei centri trasfusionali utilizzano reagenti **specifici** contro le **IgG** e contro **frazioni del complemento**. Due test fanno uso del siero di coombs...

- > **test diretto dell'antiglobulina (DAT)** o **test di coombs diretto**, consente di rilevare con l'uso di **siero antiglobuline** la presenza di **Ig** o di **complemento** sulla superficie degli **eritrociti**.
- > **test di coombs indiretto (IAT)**, che viene eseguito **incubando** il siero in esame (che si sospetta contenere gli anticorpi) con cellule che **possiedano gli antigeni corrispondenti**.

#### Test di Coombs diretto (DAT) o test diretto dell'antiglobulina

Gli **eritrociti** normali non contengono **mai** anticorpi legati. Con il **DAT** le **emazie** sono esaminate subito dopo il prelievo senza pre-trattamenti (se non un **lavaggio** per rimuovere le proteine non legate specificatamente come le **Ig**). Il siero antiglobuline è in grado di riconoscere le **Ig** o **frazioni del complemento** legate alle **emazie** e di causarne l'**agglutinazione**. Se la si osserva, si procede con **reagenti monospecifici** per chiarire la **natura** delle globuline legate.

-> **test di coombs diretto in presenza di Anemia Emolitica Autoimmune**. Questa è la causa più frequente di **positività** del test. I pazienti possiedono **IgG** o **IgM** che reagiscono contro i loro stessi **eritrociti** (e quasi sempre anche contro quelli di qualsiasi altro individuo), i quali non sono più in grado di attraversare i **capillari** della milza e sono predisposti alla fagocitosi da parte dei **macrofagi** del sistema reticolo-endoteliale. Si ha **distruzione** degli eritrociti, mentre il **midollo** non è in grado di compensarne la perdita -> **anemia**.

Questo tipo di anemia è classificata in base al tipo di anticorpo responsabile in

- > **anemia emolitica da anticorpi freddi**, principalmente **IgM** con *optimum* ben al di sotto di 37°C. Si attaccano in genere **transitoriamente** agli eritrociti, cosicché non è facile individuarne la presenza col **test di coombs**, ma ciò basta per attivare il **complemento**. La positività infatti in questi casi è riferibile solo alla presenza delle **frazioni del complemento**.
- > **anemia emolitica da anticorpi caldi**, principalmente **IgG** che rimangono **adesi** sulla superficie dei **globuli rossi** fino a che rimangono in circolo, e può insorgere

a qualsiasi età. Le anemie emolitiche autoimmuni sono nel **70%** da **anticorpi caldi**

-> **test di coombs diretto in assenza di autoimmunità.** Non tutte le positività del test sono riconducibili alla presenza di **autoanticorpi**, spesso le **Ig** si legano alla membrana per cause diverse tra cui la presenza di **farmaci**, che inducono la sintesi di **anticorpi anti-farmaco** che possono legarsi agli eritrociti in quanto questi possono essere o **rivestiti dal farmaco**, oppure da un **complesso immune** formato dal farmaco e dall'anticorpo.

### **Test di coombs indiretto o test di screening anticorpale o test indiretto dell'antiglobulina**

In caso di trasfusione è importante ricercare anche la presenza di anticorpi diversi dagli anti-A e anti-B, quindi i **campioni di sangue** dei pazienti sono sottoposti ad uno **screening** per valutare la presenza di **anticorpi ignoti**.

**Globuli rossi** con una ampia gamma di antigeni eritrocitari sono utilizzati come **reagente** per individuare la **presenza di anticorpi** nel siero in esame.

### **-> Tipizzazione e screening pre-trasfusionale (type and screen)**

Le prove crociate di **compatibilità** tra il campione di sangue da trasfondere e il sangue del ricevente **dovrebbero** essere eseguite solo quando vi sia una **elevata probabilità** di effettuare la **trasfusione**. Alcuni tipi di intervento chirurgico richiedono solo raramente un supporto di sangue (il **25%**), in altri la probabilità di dover effettuare una trasfusione scende al **10%**. Anche se la probabilità di effettuare una trasfusione è molto bassa, il centro trasfusionale...

-> **determina** il fenotipo **AB0** ed **Rh** del **sangue del paziente** e **ricerca anticorpi nel siero**, mantenendo comunque un campione del sangue del paziente. **Se :**

-> **l'esito del test è positivo, si procede alle prove crociate di compatibilità**

-> **altrimenti si effettua solo una ricerca computerizzata di compatibilità con unità presenti in emoteca**

-> se le **prove crociate** indicano **incompatibilità** ma la **ricerca degli anticorpi** è **negativa**, è **improbabile** che la presenza di **Ig** diventi clinicamente significativa a posteriori

-> se il **test di ricerca degli anticorpi** è **positivo**, è necessario preparare una scorta di sangue **privo dei corrispondenti antigeni** ed effettuare le **prove crociate di compatibilità** completa, con anche il **test dell'antiglobulina**.

### **-> Prove di compatibilità (cross-match)**

Prima di eseguire una trasfusione, le cellule di **donatore** e di **ricevente** vengono sottoposte al **cross-match** per verificare la presenza di **compatibilità sierologica**. Il test viene eseguito **mescolando** il **siero** del paziente con le **cellule** del **donatore** e **centrifugando** il campione per accertare l'**assenza** o la **presenza** di **agglutinazione**.

Se lo **screening anticorpale** del sangue del ricevente è **positivo**, è necessario prima **identificare** l'anticorpo e poi **saggiare la compatibilità** con le cellule di un **possibile donatore**



che non abbiano l'antigene corrispondente con il **test indiretto dell'antiglobulina**.

L'aggiunta di **siero antiglobuline umane** nella provetta di reazione aumenta di molto la **sensibilità** del test :

- > **IgM** fortemente reattivi causano **agglutinazione grossolana e visibile**
- > **IgG** e anticorpi più deboli causano **scarsa o assente** agglutinazione. Se quindi non si osserva agglutinazione, il siero del paziente e le cellule del donatore vengono **incubate a 37°C per 15-30min** per permettere alle eventuali **Ig** di legarsi. Dopo il campione viene **lavato** per levare le proteine non legate e incubato con **siero anti globuline umane** che causerà l'agglutinazione delle cellule se queste saranno **rivestite di anticorpo**.

La **prova crociata di compatibilità** è il miglior test disponibile, ma non garantisce che le cellule del donatore avranno una **normale sopravvivenza** nel sangue del ricevente o che il **paziente** non presenterà **alcun problema** dopo la trasfusione.

### *Prove pre-trasfusionali*

#### *Prove a carico del sangue del Donatore*

Il **sangue del donatore** deve risultare **negativo** alla ricerca dell'**antigene** di superficie dell'**HBV**, delle **proteine del core dell'HBV**, dell'**antigene p-24** e degli **anticorpi anti-HIV tipo 1 e tipo 2**, del **virus della leucemia umana HTLV** e del virus della **epatite C**. Vengono eseguiti anche **test** per la **sifilide**.

Se il sangue risulta **positivo** in anche uno solo di questi test, **non viene usato per la trasfusione**.

#### *Prove a carico del sangue del Ricevente*

Il **sangue del ricevente** viene esaminato per conoscere il **gruppo-ematico** nell'ambito dei sistemi **AB0** ed **Rh**. Occorre inoltre verificare che il **siero** del paziente non contenga **anticorpi anti-eritrociti** anomali. I risultati dei test devono essere **sempre** confrontati con quelli dei campioni **registrati** e conservati nel **centro trasfusionale** per evitare **errate attribuzioni dell'identità** e per verificare che i **test di screening per gli anticorpi** non si siano modificati, cosa che **può avvenire** nel giro di **giorni, settimane o mesi** dopo la trasfusione.

#### *Test di compatibilità per gli eritrociti*

Campioni di sangue del **ricevente** e del **donatore** devono essere sempre sottoposti alle **prove crociate di compatibilità**, importanti per quei pazienti in cui si siano dimostrate l'esistenza in circolo di **anticorpi anti-antigeni eritrocitari**.

#### *Selezione degli Emocomponenti*

Gli **eritrociti** da trasfondere possono esprimere **antigeni** verso cui il ricevente possiede **anticorpi**

**Non** possono essere trasfusi eritrociti di gruppo **A** o **AB** in pazienti con anticorpi **anti-A** e viceversa. Unità di sangue di gruppo **0** contenente anticorpi **anti-A** ed **anti-B** possono provocare **danni** alle cellule di riceventi di gruppo **A**, **B** ed **AB**, infatti il concetto di **gruppo 0** come *donatore universale* va applicato ai loro **eritrociti** e non al **sangue intero**. Individui di gruppo **AB** possono ricevere emazie di qualsiasi gruppo nell'ambito del **sistema AB0**.

Nel caso del **sistema Rh**, trasfondere sangue **Rh+** in pazienti **Rh-** può indurre nel **60-70%** dei casi la comparsa di **anticorpi anti-D**, per cui è necessario evitare un simile trattamento. Trasfondere sangue **Rh+** in donne in **età fertile** conduce alla comparsa della **malattia emolitica del neonato** per tutti i nati **Rh+** di queste donne. Si dovrebbe preferire quindi l'utilizzo di **emocomponenti** gruppo-specifici, però la presenza di **Ig anti-A** od **anti-B** nel sangue del donatore non causa in genere problemi. Il **plasma** di gruppo **0** deve considerarsi più **pericoloso** di altri e deve rappresentare l'**ultima scelta**.

### *Cambiamenti metabolici durante l'emoconservazione*

Durante la conservazione possono avvenire **cambiamenti metabolici** nei globuli rossi e nel plasma, quali -> **fuoriuscita** del **K** dagli eritrociti

-> **caduta** dei **livelli eritrocitari** di **2,3DPG** e spostamento della **curva di dissociazione Hb** con l'**ossigeno**.

-> **caduta** dei livelli di **ATP** negli **eritrociti** e aumento della **Hb plasmatica** per aumentata **emolisi**.

Questi sono definiti **danni da immagazzinamento**.

## *Terapia con emocomponenti*

### *Componenti cellulari*

Le **unità di sangue** utilizzabili per le trasfusioni sono composte di **cellule** e di elementi **non cellulari** utilizzabili per fornire al paziente **uno** o **più elementi sostitutivi** in relazione alla sintomatologia. La **somministrazione** di componenti ematici è **sempre accompagnata da rischio**.

### *Prodotti eritrocitari*

Le **trasfusioni** di **globuli rossi** hanno la funzione di **ripristinare** la capacità di trasporto dell'**ossigeno** del sangue del ricevente.

#### *-> Sangue Intero*

E' sangue prelevato dal paziente cui è aggiunta una **sostanza anti-coagulante** e **conservante** (in genere son prelevati **450 ml** diluiti con **63 ml** di anticoagulante). *Leucociti* e *piastrine* non sopravvivono alle **basse temperature (1-6°C)** cui il sangue viene conservato, per cui questo dal punto di vista **funzionale**, consiste di soli *eritrociti* e *piastrine*. *Albumina* e molte *globulin* si mantengono **intatte**, mentre i *fattori della coagulazione* si **deteriorano**. Il suo uso è giustificato solo nel caso in cui sia necessario **aumentare** la capacità di trasporto dell'**O2** e

anche il **volume ematico** (sono quindi esclusi i pazienti in **condizioni cardiache precarie**)

#### -> *Concentrati di eritrociti*

Sono **eritrociti** separati dal plasma mediante **centrifugazione** e conservati insieme all'**anti coagulante CPDA-1** a basse temperature per **35 gg**. L'aggiunta di **sostanze nutritive** aumenta il **tempo di conservazione** a **42gg**. Il **concentrato eritrocitario** mantiene la **capacità di trasp l'O2** senza essere diluito nel **volume di sangue originario**. E' utile per chiunque abbia una sintomatologia riferibile a **carente trasporto di ossigeno** ai tessuti (*anemie acute/croniche*)  
La **quota di plasma residuo** può indurre **immunizzazione** in individui **sensibilizzati**.ù

#### -> *Concentrati eritrocitari privi di leucociti*

I normali **concentrati eritrocitari** contengono un numero di *leucociti* superiore a **10<sup>9</sup>**. Mediante **centrifugazione** (che è il metodo più semplice), separazione meccanica tramite **filtri** (oggi molto più efficace) o lavaggio con soluzioni **saline** o di **glicerolo** si possono ottenere concentrati di eritrociti quasi del tutto **privati dei leucociti**. L'efficienza con cui i *leucociti* vengono rimossi dipende dal **metodo usato**, ma in genere ogni metodo deve lasciare disponibile almeno l'**80%** degli eritrociti presenti prima del trattamento. Questi sono usati in individui **sensibilizzati** verso antigeni leucocitari e che siano andati incontro a **reazioni di trasfusioni febbrili non emolitiche** o nel prevenire infezioni da **CMV** o l'alloimmunizzazione **HLA**.

#### -> *Emazie congelate e deglicerizzate*

E' un **emoderivato** quasi totalmente privo di *piastrine* ed *plasma* ed è destinato in genere a pazienti appartenenti a **gruppi rari**. Il congelamento delle emazie avviene aggiungendo alla sospensione cellulare un **agente crioprotettivo** (glicerolo) che eviti il danno alla membrana. I **globuli rossi** sospesi sono quasi totalmente privi di *plasma*, *piastrine* ed *leucociti*. Possono essere conservati anche per **anni** e una volta che la sospensione è stata **scongelata e trasfusa** almeno il **70%** dei **globuli rossi** sopravvive normalmente. E' meglio **non superare** i **3 anni** di conservazione, dopo lo scongelamento le **emazie** devono essere usate entro le **24h**. L'uso di questo emoderivato è indicato nei pazienti che abbiano presentato **gravi reazioni** contro i **leucociti** o contro altri **componenti plasmatici** dei **concentrati eritrocitari freschi**.  
Emoderivati congelati possono essere conservati per gli individui con **gruppi ematici rari**, per i quali è difficile trovare **sangue compatibile**, o per le **trasfusioni autologhe**.

### *Concentrati di piastrine*

Sono attualmente presenti **2 tipi di preparazioni piastriniche** ->

#### -> *Concentrati di piastrine da singola unità, detti piastrine da sangue intero*

Sono piastrine ottenute da una **singola donazione** in numero di **5,5x10<sup>10</sup>** sospese in una piccola quantità di **plasma**. Una unità di concentrato piastrinico è formata da piastrine ottenute da unità di **450ml** di sangue intero (raccolto con **anticoagulante** in apposite sacche)

e separate per **centrifugazione** e poi **risospese** in **50-75ml** di plasma. Possono essere conservate per non più di **5 gg** in un apposito **agitatore** per evitarne l'**aggregazione**. La loro sopravvivenza una volta **reinfuse** diminuisce in funzione del **tempo di conservazione**.

#### -> *Concentrati piastrinici da aferesi*

Sono preparati per **citoferesi** e contengono almeno  **$3 \times 10^{11}$**  piastrine, l'equivalente di **6-8 unità** di piastrine ottenute dal sangue prelevato da **6-8 donatori**. Questa tecnica permette di trattare **grandi volumi di sangue** da un **singolo donatore** in quanto gli **eritrociti** e i **leucociti** vengono subito **reinfusi** nel donatore. A differenza dei **concentrati piastrinici** da sangue **intero**, questi invece sono ottenuti da un **singolo donatore** e quindi **riduce** il rischio di **infezioni** o di **immunizzazioni** da trasfusione perché si riduce il numero dei donatori.

#### -> *Effetti terapeutici dei Concentrati di piastrine*

Un concentrato piastrino, in media, contiene  **$5,5 \times 10^{10}$**  piastrine. La trasfusione di una **unità** di piastrine comporta l'aumento delle piastrine in circolo di **5000 – 10000/microl/m<sup>2</sup>** di sup. corporea. L'incremento **post-trasfusionale** delle piastrine è verificato dopo **1h** e **24h** dalla trasfusione, ed è espresso come **CCI**

**CCI**=incremento assoluto/ $\mu$ l x (Sup. Corporea  $m^2$ / N° di piastrine trasfuse  $10^{11}$ )

Il N° **assoluto** si ottiene sottraendo il n° di piastrine misurato **prima della trasfusione** con il n° di piastrine misurato **dopo**, il **n° di piastrine trasfuse** invece si ottiene moltiplicando il **n° delle unità** (sacche) per **0.55**.

La principale **condizione patologica** per cui è indicata una **infusione di piastrine** è la **trombocitopenia sintomatica**. La terapia è più efficace quando la causa patogenetica risiede in un **difetto di produzione** che in un **aumento di distruzione** periferica o **sequestro** delle piastrine in quanto quelle **trasfuse** andranno incontro agli stessi fenomeni di sequestro e distruzione. Anche i pazienti **splenomegalici**, in cui si ha una **umentata distruzione** delle piastrine per processi **autoimmunitari** traggono poco beneficio da queste trasfusioni. E' molto **importante** determinare la conta piastrinica dopo la **trasfusione** in quanto serve a verificare la **efficacia** della **terapia piastrinica**.

#### -> *Anticorpi anti-piastrine*

Le piastrine posseggono come **antigeni di superficie** quelli del **sistema ABO**, e gli **antigeni HLA** in comune con *leucociti* e altri tessuti dell'organismo. **Anticorpi** verso antigeni HLA sono più **efficaci** nel danneggiare le piastrine di quanto non facciano gli **anticorpi anti-A e B**

Le **difficoltà** ed il **costo** della tipizzazione HLA e della ricerca degli anticorpi rendono di fatto **impossibile** sottoporre **tutte le trasfusioni** piastriniche a **prove di compatibilità**. Inoltre, la **quantità** di piastrine da somministrare deve essere determinata in base alla **patologia** presente e devono essere prese in considerazione le **cause** della **trombocitopenia** e la localizzazione della eventuale **emorragia**. Un numero di **50000 / microl** in genere è sufficiente a **garantire** una **normale** funzione emostatica.

### Concentrati di Leucociti

Consistono in preparati da citaferesi (detta **leucaferesi**) che debbono contenere minimo  $10^{10}$  cellule. Le **unità** ottenute contengono in genere  $10^{10}$  **granulociti** in **300-500 ml** di **plasma**. Il prodotto è inevitabilmente **contaminato** con una certa quota di **eritrociti** e un buon numero di **piastrine**. L'uso di questi concentrati è indicato solo in pazienti con **gravi granulocitopenie** in corso di **sepsi batterica**. Sono necessarie **ripetute somministrazioni** che impongono un **alto rischio** di reazioni trasfusionali.

### Componenti plasmatici

L'industria farmaceutica **purifica** e rende disponibili **frazioni plasmatiche** contenenti *albumina*, *gamma-globuline*, *fattori della coagulazione* e *serin proteasi*. Il rischio di **trasmissione virale** utilizzando questi concentrati oggi è **minore** in quanto la preparazione è **controllata** e le soluzioni sono sottoposte a **pastorizzazione**.

#### -> *Plasma fresco Concentrato (FFP)*

È la parte liquida delle **unità di sangue** separata e refrigerata a **-18°C** entro **6h** dal prelievo. Contiene in forma attiva i **fattori labili della coagulazione (VIII, V)**, insieme a tutti gli altri e a tutte le **altre proteine plasmatiche**. La principale **indicazione** per il suo impiego consiste in **difetti nella emostasi per deficit di fattori della coagulazione**

#### -> *Plasma congelato entro 24h dalla raccolta*

È **meno costoso** del **FFP**, l'attività dei **fattori labili** è molto più variabile ma ha il medesimo **contenuto di fattori stabili, albumina, molecole ad attività battericida, opsonine** ed altri componenti.

#### -> *Plasma privo della frazione crioprecipitata*

È il **trattamento d'elezione** della **porpora trombocitopenica (PTT)** in quanto manca dei **multimeri del fattore di von Willebrand (vWF)**

### Criprecipitato e concentrati di fattore VIII

#### -> *Criprecipitato*

Rappresenta la frazione che **precipita a freddo** durante la preparazione del **plasma fresco congelato**. È un **residuo gelatinoso** contenente il **vWF, fattore VIII e fibrinogeno**, utile per trattare **emorragie lievi o moderate** in pazienti con la **malattia di vonWillebrandb**. Qualora siano necessarie **alte [vWF]** possono essere utilizzati **concentrati commerciali di vWF**. Il **FFP** ed il **crioprecipitato** sono gli unici preparati a contenere **fibrinogeno**. Infatti questo è utilizzato con successo nella **ipofibrinogenemia** e nella **coagulazione intravascolare disseminata (CID)**. Questi preparati prima della trasfusione devono essere sottoposti ad **inattivazione virale con calore** o con **solventi/detergenti**.



### -> *Concentrato di fattore VIII*

È un concentrato **liofilizzato** di plasma derivante da un **pool molto grande** di donatori. Contiene principalmente **fattore VIII**, ma anche **fibrinogeno** e altre proteine plasmatiche. In **commercio** sono disponibili preparati di purezza **bassa, intermedia e alta** a seconda del **metodo di purificazione** utilizzato, tra cui si ha :

-> Utilizzo di **anticorpi monoclonali**, che permettono di ottenere concentrati di **elevata purezza**

È disponibile anche la **proteina** ottenuta per **ricombinazione**, che ha il vantaggio di non trasmettere mai **malattie infettive**.

### *Concentrato di fattore IX*

Contiene tutti i fattori della coagulazione **vitamina K -dipendenti** (*protrombina, fattori VII, IX, X*) ed è ottenuto per **frazionamento** da un pool di **migliaia** di donatori. Rischio di trasmissione di **infezioni** è ridotto da metodi di **purificazione** e **trattamenti con calore**. È il trattamento d'**elezione** per affrontare **gravi emorragie** ed è indicato nei **deficit congeniti** di **fattore VII** e di **fattore X**.

### *Preparazione di globuline sieriche ed inibitori delle proteasi plasmatiche*

Il frazionamento del **plasma** ottenuto da un **pool di donatori** può rendere disponibili anche **concentrati di gamma-globuline**, utili come **sieri iperimmuni** in individui esposti al **virus varicella zoster** o al **virus dell'epatite B**. Gli **inibitori** di alcune **serin-proteasi** plasmatiche possono essere concentrati durante il frazionamento per farne un **uso terapeutico** durante **deficienze congenite** di tali fattori.

## *Trasfusione Autologa*

La **trasfusione autologa** che utilizza il **sangue** dello stesso paziente è una procedura assai sicura.

Viene effettuata in individui che **abbiano i requisiti** per poterla attuare **prima** di un **intervento chirurgico d'elezione**. Con adeguato **supplemento di Fe**, è possibile sottrarre al paziente **2 o più** unità di sangue con il ritmo di **1 a settimana**, a partire da **35-42gg** prima dell'intervento. I **campioni** vengono mantenuti in frigorifero, mentre se è possibile **congelarli** il tempo tra i prelievi e l'autotrasfusione può essere **esteso all'infinito**.

Una procedura utilizzata per **recuperare il sangue** durante l'intervento chirurgico è detta **recupero intraoperatorio**. Con questa tecnica il sangue viene **filtrato e lavato** e può essere **reinfuso** nel paziente durante l'intervento.

Un'altra procedura è l'**emodiluizione preoperatoria normovolemica** che consente di ridurre l'**Ht** e quindi di ridurre la perdita di **globuli rossi** durante l'**operazione chirurgica**. Queste metodiche hanno l'**innegabile vantaggio** di eliminare il rischio di **infezioni** e di **alloimmunizzazione**.

## Emocomponenti irradiati

La **malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD)** è una patologia conseguente alla **trasfusione** che si osserva in pazienti **immunocompromessi**. I **linfociti T** trasfusi **attaccano** le cellule dell'ospite. I **sintomi** sono **dermatite esfoliativa, diarrea, danni epatici, aplasia midollare**. Può essere prevenuta **irradiando** i componenti ematici da somministrare al paziente con una **dose di 25 Gy** letale per i **linfociti** ma non per le **emazie, piastrine e granulociti**.

## Emaferesi Terapeutica

L'**emaferesi terapeutica** consiste nella sostituzione di **cellule, plasma o componenti plasmatici** con componenti **normali**. Si distinguono :

### -> Plasmaferesi

Consiste nella **rimozione** del **plasma** e nella sua sostituzione con altro plasma o **sostituti**

### -> Citaferesi

Si intende la rimozione di un tipo **cellulare** come **piastrine trombocitaferesi, leucociti leucocitaferesi, eritrociti eritrocitaferesi**.

E' indicata, ad esempio, nella condizione di **iperviscosità del plasma**, corretta **rimuovendo** il plasma e sostituendolo con **sostituti plasmatici cristalloidi o colloidali**. Se il fattore che rappresenta la **causa eziopatogenetica** si trova in circolo, il difetto può essere corretto, in quanto una singola **plasmaferesi** è in grado di sostituire fino al **90%** del **fattore patogeno**.

La **tecnica** prevede l'uso di **separatori a flusso continuo o intermittente** ed è necessario stimare il **V ematico** e sottoporre il sangue del paziente ad uno **screening coagulativo** e ad una **valutazione degli elettroliti** per **titolare opportunamente le soluzioni di sostituzione**.

## Complicanze nelle trasfusioni di sangue

Le complicanze sono definite **immediate** e **tardive**. Si definisce **reazione trasfusionale** qualunque reazione che intervenga nel paziente **durante** o **dopo** la trasfusione.

### Reazioni trasfusionali immediate

Si distinguono sulla base della **causa** che le determina in **immunologiche** e **non-immunologiche** e in un terzo grande gruppo di **reazioni acute non emolitiche**.

### Reazioni mediate da meccanismi non-immunologici

#### -> Reazioni emolitiche

Solitamente le reazioni emolitiche sono mediate da anticorpi, ma talvolta possono essere causate da cause **meccaniche**, come il passaggio attraverso **bypass** o **pompe da infusione**. Se il prelievo non è

stato effettuato in condizioni di **asepsi scrupolosa**, possono verificarsi **contaminazioni batteriche** e il **rilascio di E batterici** causa emolisi.

Per **prevenire** i rischi di contaminazione, è necessario esaminare ad **occhio nudo** il campione prima di dare l'autorizzazione a procedere per **verificare la presenza di emolisi**. Se viene somministrato un campione contaminato ad un paziente, i **sintomi** sono quelli di una **reazione emolitica immediata** con **shock** ed **febbre** per la liberazione di endotossine batteriche. La febbre raggiunge e supera i **40°C** già nel **corso di una trasfusione**, e compaiono anche **violenti brividi** e segni di un **collasso cardiocircolatorio**.

#### -> **Aggregati**

Durante il periodo di conservazione del sangue si possono formare **aggregati** formati da **detriti cellulari**, che nel paziente possono causare **microembolie polmonari** e disfunzioni respiratorie. Per prevenire ciò, si usano **filtri da 150 microm** per eliminare gli **aggregati**.

#### -> **Complicanze metaboliche**

Avvengono anch'esse **durante la conservazione** e portano ad *iperkaliemia, ipocalcemia, intossicazione da citrato, acidosi, ipernatriemia e ipotermia*.

### **Reazioni mediate da meccanismi immunologici**

#### -> **Reazioni trasfusionali emolitiche immediate**

##### *Generalità*

Sono le più **gravi** ma le **meno comuni**. Sono dovute ad **incompatibilità** di gruppo **AB0** e sono dovute per lo più ad **errori di etichettatura** o di **identificazione**.

Le cellule **incompatibili** trasfuse vengono incontro con gli anticorpi **anti-A** e **B** del sangue del paziente, queste, essendo essenzialmente **IgM**, **attivano** rapidamente il **complemento** e provocano la **lisi intravascolare** delle emazie. Gli altri anticorpi contro gli altri antigeni eritrocitari, essendo per lo più **IgG**, si limitano ad **opsonizzare** le cellule bersaglio e a destinarle alla distruzione nel sistema **reticolo – endoteliale**.

Queste gravi reazioni emolitiche in genere, essendo i test di **compatibilità pre-trasfusionali** molto accurati, avvengono se **viene sottoposto alla prova** il campione sbagliato o se viene **somministrato il sangue sbagliato**.

##### *Sintomatologia*

Sono spesso caratterizzate da **febbre**, **brividi violenti** e **caduta della pressione** arteriosa. Sintomi secondari sono **palpitazione**, **ansia**, **dolore retrosternale** o **lombare** e **sensazione di calore**. Questi sintomi sono conseguenti alla **interazione antigene anticorpo** nel compartimento vascolare.

-> **una coagulazione intravascolare disseminata** è la conseguenza di una **attivazione** del

complemento che innesca la cascata **coagulativa**, la formazione di **trombina** e l'attivazione del **sistema fibrinolitico**. Si ha quindi una **coagulopatia emorragica** per consumo dei fattori di coagulazione e lisi dei coaguli già formati e consumo delle piastrine. Le **emazie** vengono **imbrigliate** e lese dal **reticolo di fibrina** dei coaguli.

-> **l'insufficienza renale** consegue invece alla **chiusura** dei tubuli renali ad opera delle emazie rivestite di **Ig** e conseguente **necrosi tubulare acuta**. La **Hb** libera attraversa il **filtrato glomerulare** quindi la **emolisi intravascolare** è accompagnata anche da **emoglobinuria**. Il **trattamento** è volto a **ristabilire** la pressione renale e a riprendere il **controllo** della pressione arteriosa e a **forzare la diuresi** per liberare i tubuli occlusi e **correggere le anomalie coagulative**.

#### *Esami di Laboratorio*

In caso di sospetta **reazione emolitica acuta**, deve essere sospesa la trasfusione e **controllato il nome** del paziente e il **tipo** di sangue, in quanto gli errori di etichettatura sono le cause più frequenti. Si esamina il **campione** prelevato dopo la trasfusione e si confrontano i due campioni **pre-trasfusionale** e **post-trasfusionale** (si sottopongono al **test diretto dell'antiglobulina** e alle **prove crociate** di compatibilità).

### **Reazioni acute non-emolitiche**

#### -> **Reazioni febbrili**

E' definita **reazione febbrile** l'aumento di **uno** o **due** gradi **durante** o **subito dopo** la **trasfusione**.

Alcuni individui (donne in **gravidanza** e **politrasfusi**) hanno **anticorpi** contro **proteine plasmatiche** o componenti **cellulari**. In questi la *reazione febbrile* è da ricondurre alla **reazione immunitaria** contro questi componenti -> **reazione trasfusionale febbrile**

#### *Sintomatologia*

**Cefalea**, **malessere generale**, **febbre** che dura meno di 24h sono sintomi caratteristici. Possono comparire anche **brividi violenti** che rappresentano il sintomo più fastidioso. Spesso queste reazioni sono **piuttosto lievi**.

#### *Patogenesi*

Nella maggior parte dei casi, sono responsabili **anticorpi** contro i *leucociti* che inducono il rilascio di **pirogeni endogeni** (**IL-1**, **IL-6**, **TNF-alfa**) che o sono specifici per gli **antigeni** dei granulociti o per gli antigeni **HLA** comuni a tutti gli altri tessuti. In altri casi le citochine responsabili sono rilasciate durante la **conservazione** del sangue da trasfusione.

#### *Esami di laboratorio*

Controllare il sangue di **ricevente** e **donatore** per esaminarne la compatibilità a questo riguardo sarebbe **complesso** e **costoso**, per prevenire le reazioni si usano **filtri** per la **rimozione dei leucociti** per ottenere un concentrato **eritrocitario** o **piastrinico** non contaminato da *leucociti*.

#### -> **Orticaria**

**Prurito** ed **eruzioni cutanee** si accompagnano frequentemente all'**emoterapia** nei pazienti **politrasfusi**, e consistono in **reazioni allergiche** contro prodotti solubili nel plasma del donatore **mediate dalle IgE**. Non viene in questi casi interrotta la trasfusione, ma vengono somministrati invece **antistaminici**.

### -> *Reazione anafilattoide*

Nel **deficit di IgA** (accompagnato spesso ad **infezioni ricorrenti** del tratto *gastrointestinale* o *respiratorio*) si possono produrre **anticorpi anti-IgA** nella stimolazione immunitaria che si legano con **avidità** elevata alle **IgA** nel plasma del donatore con la formazione di **complessi immuni** e attivazione del **complemento**, che porta alla cosiddetta -> *reazione anafilattoide*

### -> *Danno polmonare acuto da trasfusione*

Consegue ad una **insufficienza acuta respiratoria** che si ha circa **4h** dopo la trasfusione e deve essere **trattata** con **assistenza respiratoria**. Sembrano coinvolti **anticorpi anti-leucociti** che inducono **agglutinazione** dei leucociti ed **intrappolamento** nei vasi polmonari. Le **citochine** ed i **mediatori infiammatori** inducono un aumento della permeabilità vascolare con **edema alveolare**.

### *Reazioni trasfusionali tardive*

Sono così definite qualunque **effetto collaterale** che si abbia dopo **24h** o più dalla trasfusione. L'effetto **ritardato** più comune è sicuramente la **trasmissione di malattie infettive**.

### *Reazioni tardive dipendenti da meccanismi immunologici*

#### -> *Reazioni emolitiche tardive*

Si ha in individui **sensibilizzati** verso un antigene, ma **negativi** alla ricerca degli **anticorpi**. Se questi sono sottoposti a terapia trasfusionale e vengono nuovamente in contatto con l'**antigene** in questione, il paziente va incontro ad una **reazione emolitica tardiva**, I segni di laboratorio sono **mancata osservazione** di incrementi stabili dell'**Ht** e della **[Hb]** come altresì atteso, **positività** allo screening anticorpale, **presenza** di anticorpi **adesi agli eritrociti** trasfusi, **aumento liv. sierici di bilirubina** e **insufficienza renale** reversibile.

#### -> *Malattia del trapianto contro l'ospite*

Vd. paragrafo su *emocomponenti irradiati*.

#### -> *Porpora post-trasfusionale*

E' una **rara** reazione tardiva che compare **una settimana** dopo la trasfusione come **trombocitopenia**. E' data dalla presenza di anticorpi **anti-HPA-1A**. L'introduzione di piastrine **HPA-1A +** induce la formazione di **complessi immuni** che portano alla distruzione, aderendo ad esse, delle piastrine.

#### -> *Emosiderosi trasfusionale*

Un **unità** di concentrato eritrocitario contiene **250mg** di **Fe**. La trasfusione di sole **6 unità** di questi concentrati porta alla **saturazione dei depositi di Fe** (tot. **500-1500mg**), dopodiché, il **Fe** si inizia ad accumulare nel **fegato, pancreas, cute e cuore**. Si ha la morte per **insufficienza cardiaca** causata dall'**accumulo di ferro** nel miocardio.



## Trasmissione di infezioni per trasfusione di emocomponenti

### -> Virus della immunodeficienza umana HIV

La trasmissione dell'HIV tipo I/II tramite le trasfusioni è un problema che riguarda il mondo intero, ma più presente in passato, in quanto attualmente sono **obbligatori** gli esami di screening per la ricerca degli **anticorpi anti-HIV-1** ed **anti-HIV-2**. I test disponibili per la ricerca degli anticorpi HIV I/II sono diversi :

### -> Dosaggio immunoenzimatico ELISA

I test impostati su questo metodo sono i più utilizzati, sono dotati di grande **sensibilità** ma poca **specificità**, per cui sono frequenti i **falsi positivi**. Si usa il **virus inattivato** cresciuto in coltura in una linea di **cellule linfoidi umane**. E' il primo test che si esegue nella ricerca degli **anticorpi**, ma essendo poco specifico, il campione **positivo** al primo test viene sottoposto ad un **secondo test** in doppio. Se è **positivo** ad uno o ad entrambi i dosaggi ripetuti, il campione detto *ripetutamente reattivo* viene sottoposto al **Western Blot**.

### -> Il Western Blot

Il **Western Blot** è il test di conferma, molto **sensibile** ma anche molto **specifico**, se quest'ultimo risulta **negativo**, il campione, anche se positivo all'ELISA, viene giudicato definitivamente **negativo**. In questo test, le **proteine** e le **glicoproteine** virali vengono separate per **elettroforesi** su poliacrilamide e successivamente **trasferite** su membrana di **nitrocellulosa**, che viene incubata con il siero in esame. La **fissazione** degli anticorpi è **evidenziata** utilizzando **Ig anti-Ig umane** legate a fluorocromi o ad isotopi radioattivi. La **positività** del test è indicata dalla presenza di **bande** legate a specifiche proteine virali quali la **gp120**, la **gp41** oppure le proteine del core **p24** e **p55**.

Questi **test** hanno eliminato il rischio di trasmissione **trasfusionale** del virus **HIV**. E' possibile, però, che un **donatore** in fase **viremica** (detta *finestra di sieronegatività*), che non ritiene di appartenere ad una **categoria a rischio**, doni il suo sangue che viene trasfuso. Per ridurre questa *finestra*, è stato introdotto un terzo test di screening per **individuare la presenza dell'antigene p24 dell'HIV**.

### -> Virus dell'Epatite C

La frequenza di trasmissione trasfusionale di **epatite C** si è ridotta da quanto sono stati introdotti test di **screening** per questo virus (**HCV**). L'incidenza è diminuita da **1/5000** ad **1/50000** e con i nuovi saggi è stimata ad **1/103000**.

L'**epatite C** è caratterizzata dalla tendenza a sviluppare una **epatopatia cronica** le cui complicanze sono :

- > la **tendenza a sviluppare una epatite cronica attiva**
- > la **possibile evoluzione verso la cirrosi post-necrotica**.

### -> Virus dell'Epatite B

La trasmissione del **virus dell'Epatite B** comporta la comparsa di **ittero** e **aumento delle proteine sieriche** dopo **6-12 settimane** dalla trasfusione. L'infezione varia da una forma **lieve** ad una **epatite**

**fulminante**. Lo **screening** è effettuato su tutti i donatori e ha ridotto di molto l'incidenza della malattia.

-> *Citomegalovirus CMV e Virus di Epstein-Barr EBV*

Questi virus infettano **granulociti** e cellule **mononucleate**, caratterizzata da una malattia virale **lieve** con **epatite** ed alterazioni infiammatorie a carico di altri organi. Gli individui a rischio sono quelli privi di **anticorpi anti-CMV** nel siero e quelli **immunocompromessi**. L'uso di **emocomponenti CMV-negativi** è il modo **migliore** per **prevenire** questo rischio.

-> *Virus dell'Epatite A*

L'epatite A **post-trasfusionale** è un evento **raro**, il tempo di incubazione è di circa **28gg**. E' nota la trasmissione dell'infezione con emocomponenti ottenuti da frazionamento di **pool plasmatici** trattati con solventi o detergenti, in quanto il virus **HAV** non avendo un **envelope lipidico** non è soggetto a questi **tipi di trattamenti**.

## Antigeni ed Anticorpi Leucocitari Umani

### Generalità

Gli **antigeni leucocitari umani (HLA)** rappresentano un insieme di **glicoproteine polimorfe** importanti nella regolazione della **risposta immunitaria** e nelle **reazioni di istocompatibilità** e anche nel campo delle **trasfusioni**. I geni che codificano per questi antigeni sono siti sul cromosoma **6**.

La **regione cromosomica** contenente i geni in questione è definita **regione HLA** o **complesso maggiore dell'istocompatibilità (MHC)**. Gli antigeni che costituiscono il sistema sono :

-> *HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP* <-

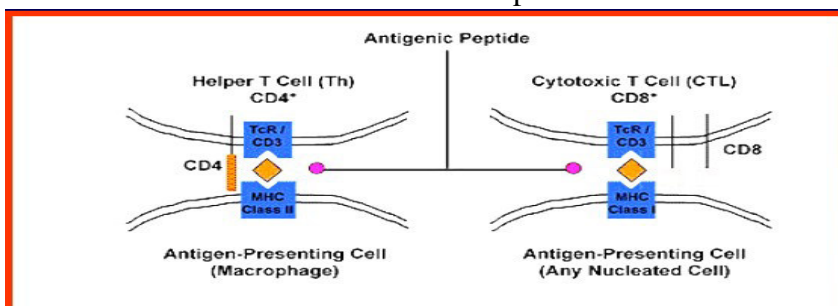
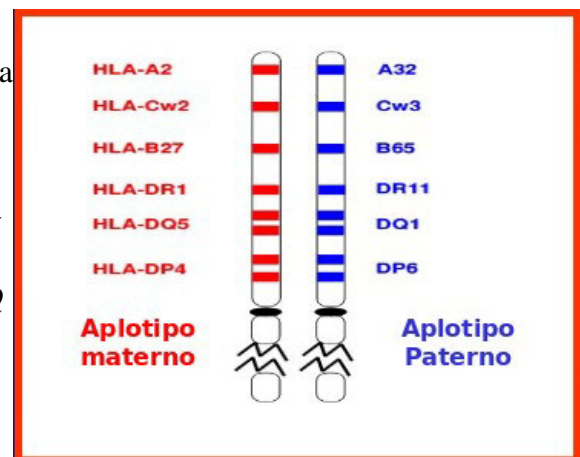
L'insieme dei geni **HLA** su di un singolo cromosoma e trasmesso insieme è detto **aplotipo**, ogni individuo possiede **due aplotipi**, ciascuno ereditato da uno dei due genitori.

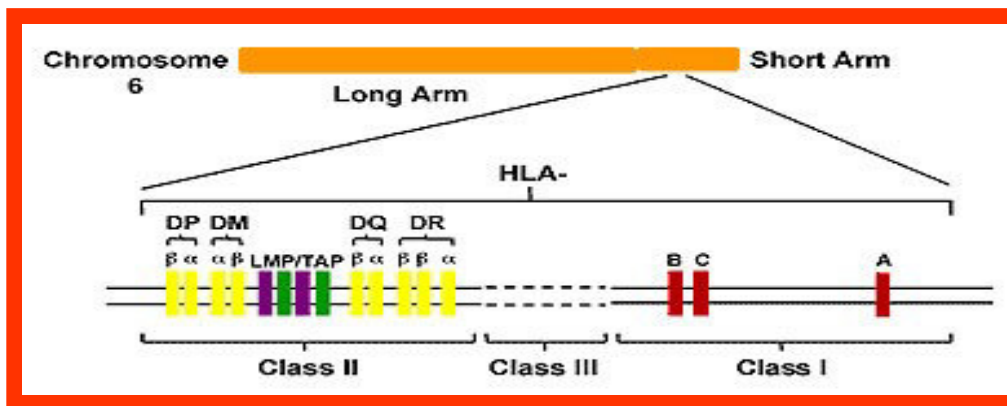
La maggioranza degli individui è **eterozigote** per i geni del complesso HLA ->

Gli antigeni HLA sono divisi in due classi maggiori e in una minore :

-> **gli antigeni HLA di classe I** sono l'*HLA-A, B e C*, presenti sulla membrana plasmatica di tutte le cellule nucleate

-> **gli antigeni HLA di classe II** sono l'*HLA-D, DR, DQ e DP*, presenti sui **linfociti B, macrofagi ed cellule dendritiche**, nel complesso definite **APC**.





Ogni antigene è costituito da **due catene**, nel caso del **MHC-I**, da una catena **alfa** e la **beta2-microgl.** e nel caso del **MHC-II** da una catena **alfa** e da una catena **beta** entrambe codificate da geni presenti nel **locus MHC**.

Tali antigeni sono quindi coinvolti :

- > nelle risposte immunitarie contro **antigeni estranei extracellulari od intracitoplasmatici**
- > nel **riconoscimento** e nel **rigetto** di trapianti.

### Determinazione dell'HLA

La **tipizzazione** degli antigeni **HLA** è più complessa di quanto avviene con gli antigeni eritrocitari e coinvolge metodi **sierologici**, **cellulari** e di **biologia molecolare**.

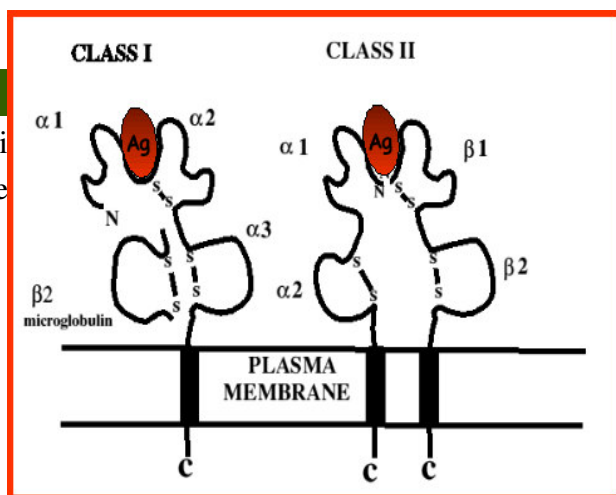
#### -> Metodi sierologici

Consiste nel **riconoscimento** degli antigeni HLA mediante l'utilizzo di anticorpi specifici per i diversi **determinanti** dei diversi antigeni HLA.

La maggior parte degli anticorpi è ottenuta da individui **politrasfusi** o da **donne pluripare**. Ogni campione di cellule da esaminare per la ricerca degli antigeni HLA di superficie deve essere cimentato contro un **vasti spettro di antisieri**. Nei test normalmente usati, la **reattività** si identifica mediante :

-> **Reazioni di agglutinazioni**, più **facili** da eseguire ma **meno sensibili**, danno più **falsi positivi**.

-> **Test di citotossicità**, nei quali gli antigeni HLA vengono identificati in base alla loro **reattività** verso specifici anticorpi **evidenziata** mediante un test di citotossicità, che si basa sulla capacità delle cellule che hanno legato gli **anticorpi** in un mezzo privo di complemento di **fissare il complemento** quando questo viene aggiunto dopo nella soluzione, determinando la morte delle cellule con gli anticorpi legati. La morte delle cellule è evidenziabile aggiungendo un **colorante macromolecolare**, che non è in grado di colorare le cellule vive, ma che le cellule morte **non riescono ad escludere**, per cui vengono colorate. L'**intensità** di colorazione è **direttamente proporzionale** alla forza e alla specificità nella reazione tra



l'anticorpo e la superficie della cellula.

Sui **campioni di siero** del paziente si può evidenziare l'alloimmunizzazione HLA (ovvero la presenza di **anticorpi anti-HLA**) utilizzando pannelli di **linfociti a diversa specificità** che vengono messi a contatto col siero del paziente. La presenza di **reattività** è evidenziata dalla **colorazione** delle cellule. Con questo test si identificano i **pannelli di anticorpi reattivi (PRA)** e i risultati sono riportati come **% di PRA** e indicano il **numero di linfociti** che reagiscono con il siero del paziente.

#### -> **Metodi Cellulari**

Il test principe mediante il quale vengono determinati gli **antigeni HLA-D** è la **coltura mista linfocitaria**. I **linfociti del donatore** e quelli del **ricevente** vengono **coltivati insieme** e al mezzo

di coltura viene aggiunta **timidina radioattiva**, che verrà incorporata solo nel DNA delle cellule in **attiva proliferazione** in concentrazione direttamente proporzionale alla **intensità** di proliferazione. **Alti** valori di timidina triziata incorporata indicano una **avvenuta stimolazione** dei linfociti. Questo test **non è disponibile** nella maggior parte dei laboratori, che quindi non possono determinare con facilità gli **antigeni HLA-D**, mentre invece gli antigeni di classe I **HLA-A** e **B** e di classe II **HLA-DR** sono determinabili con una certa **facilità**.

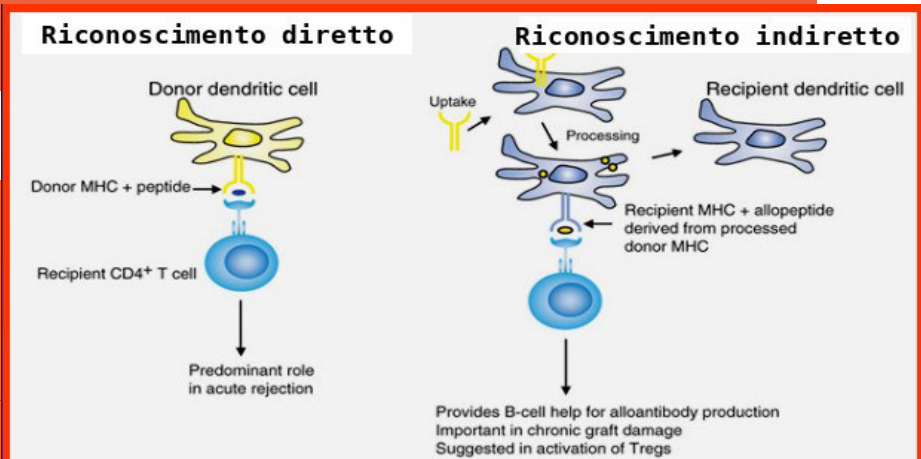
#### -> **Metodi di Biologia Molecolare**

L'applicazione degli **studi sul DNA** per la tipizzazione degli **HLA** ha migliorato di molto la **sensibilità**, la **specificità** e anche le nostre **conoscenze** sulla complessità molecolare del **MHC**. Tra le tecniche molecolari utilizzate, sono da annoverare :

- > *l'analisi del **polimorfismo** della lunghezza dei **frammenti di restrizione***
- > *la reazione a catena della polimerasi **PCR***
- > *l'analisi della sequenza dei **trascritti** dei geni HLA, la **PCR inversa RT-PCR***

La **PCR** allele specifica fornisce **sequenze di DNA** che possono poi essere analizzate tramite **dot-blot** od **analisi della sequenza**.

- ⇒ **PCR-SSO - oligonucleotidi sequenza specifici**
- ⇒ Amplificazione DNA
- ⇒ Addizione DNA su membrane preaderite con oligonucleotidi specifici per i diversi alleli HLA
- ⇒ Identificazione di bande di ibridizzazione
- ⇒ **PCR-SSP - primers sequenza specifici**
- ⇒ Amplificazione dei singoli alleli mediante primers sequenza specifici
- ⇒ Elettroforesi su gel di agarosio
- ⇒ Lettura ai raggi UV mediante bromuro di etidio
- ⇒ **PCR-SBT - sequenziamento nucleotidico**
- ⇒ Amplificazione dei singoli alleli mediante primers sequenza specifici
- ⇒ Sequenziamento nucleotidico mediante sequenziatori automatici





## Linkage Disequilibrium e distribuzione degli antigeni

Con questo termine si indica la **maggior frequenza** di trasmissione di alcuni **alleli** a loci strettamente concatenati **rispetto a quanto atteso** dall'esame della loro frequenza **nella popolazione generale**. Può interessare anche **più di due loci**, come **HLA-A1-B8-DR3**, ad esempio, geni che si presentano in alcune famiglie **insieme** con una frequenza assai maggiore di quanto accadrebbe se le **associazioni fossero strettamente casuali**.

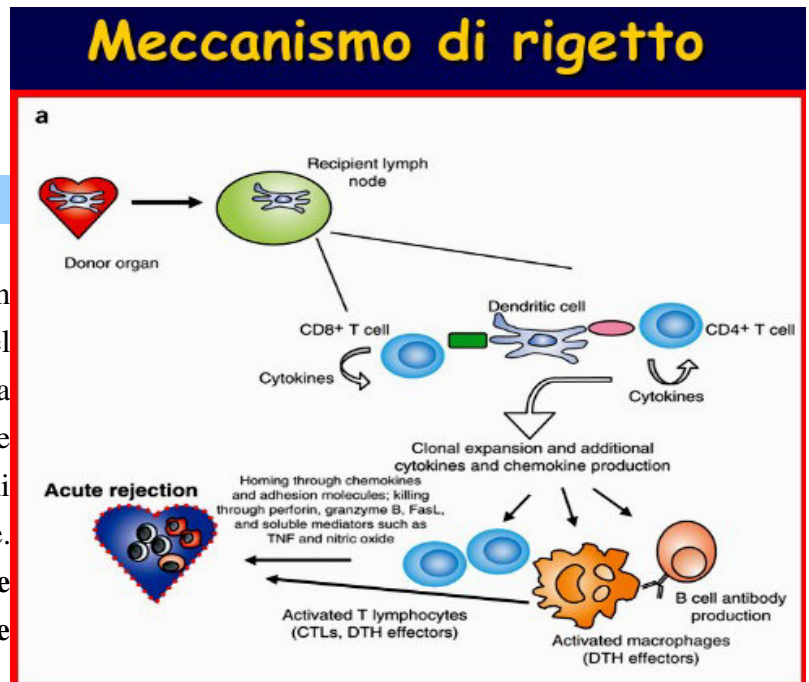
## Applicazioni cliniche della Determinazione dell'HLA

Sono sostanzialmente **quattro** le principali *aree cliniche* in cui è importante la tipizzazione dell'HLA

- > i **trapianti di organi**
- > la **medicina trasfusionale**
- > l'**associazione di aplotipi HLA con particolari malattie**
- > l'**accertamento di paternità e l'identificazione dei genitori**

### -> Trapianti d'organo

La **tipizzazione** degli antigeni HLA è solo un aspetto della **selezione del donatore** nel trapianto d'organo. Si deve avere **inoltre** la **compatibilità del gruppo ABO** e il ricevente **non** deve avere **Ig** che reagiscano con gli **eritrociti** o i **leucociti** del donatore. L'allestimento di **culture miste leucocitarie** è utile per **escludere reattività immunitarie cellulo-mediate**.



-> se donatore e ricevente sono **consanguinei**, la **concordanza HLA aumenta** le possibilità che il trapianto non venga rigettato.

-> nel caso di **gemelli monozigoti** è identico **tutto il materiale genetico** quindi sicuramente non si avrà il rigetto del trapianto

-> fratelli **non gemelli** hanno in comune solo una **frazione di materiale genetico** e quanto più i tessuti sono **simili** riguardo alla **concordanza HLA** tanto più il **trapianto sarà compatibile**, e la concordanza di **due aplotipi** offre maggiori garanzie di successo che non la concordanza di **un solo aplotipo**.

-> se donatore e ricevente **non sono parenti**, le previsioni basate sulla **concordanza HLA**

sono **meno sicure**. La sopravvivenza del trapianto **non migliora** di molto utilizzando tessuti che condividono con l'ospite **uno o più** antigeni HLA. Se sono presenti **anticorpi anti-HLA preformati** è importante usare tessuti che **non contengono** l'antigene contro



cui tali anticorpi sono specifici.

### *Test di Compatibilità tra Donatore e Ricevente*

- Tipizzazione HLA donatore/ricevente
- **Dosaggio anticorpale nel ricevente:**
  1. Test XM (Cross-match o reazione crociata)
  2. Test PRA (Panel Reactive Antibodies)

E' importante, nel pre-trapianto, effettuare la **ricerca** nel siero del ricevente di **anticorpi** contro i leucociti del **donatore**, una ipersensibilizzazione **pre-esistente** verso gli antigeni HLA può causare un **rapido rigetto** (test di *reazione crociata XM*).

I principali problemi che possono presentarsi nel trapianto d'organo sono :

-> **il rigetto del trapianto**, in cui l'**ospite** riconosce come estraneo l'**HLA** sulle cellule del tessuto del **donatore** e rigetta il trapianto. E' di **maggiore rilevanza** nei trapianti di organi **solidi** e non di **midollo osseo**, in quanto i pazienti prima del trapianto sono sottoposti a chemioterapia che **distrukge il sistema immunitario**.

-> **la malattia del trapianto contro l'ospite**, nella quale le **cellule** del tessuto trapiantato attaccano le **cellule** dell'ospite riconosciute come **estrane**e per la **incompatibilità** tra gli **antigeni**.

### *-> Trasfusioni*

Le **trasfusioni** possono causare **alloimmunizzazione** contro gli antigeni HLA. Le preparazioni di **eritrociti deprivate** di *leucociti* e *piastrine* meno facilmente causano immunizzazione, mentre le preparazioni di **piastrine** sono **fortemente immunogene**. Pazienti sottoposti frequentemente a **trasfusione** di piastrine sviluppano una **risposta anticorpale** contro antigeni **HLA** di classe **I** e contro antigeni specifici delle piastrine nel **30-60%** dei casi. Questo è il caso dei pazienti sottoposti a **chemioterapia** che causa **trombocitopenia**, i quali sono esposti quindi a piastrine provenienti da diversi donatori. Esistono diversi metodi per diminuire l'**alloimmunizzazione** :

-> **il test di compatibilità crociata delle piastrine**, test alla portata solo di **pochi laboratori** che **limita** il numero di **donatori disponibile**, quindi benché sia meglio usare un concentrato di piastrine **compatibile**, spesso non se ne può disporre.

-> **riduzione del numero dei donatori con cui un singolo paziente viene a contatto**

-> **selezione di donatori**, anche non consanguinei, ma che abbiano antigeni compatibili.

La presenza di **anticorpi specifici** contro le piastrine è evidente quando il paziente **non trae più beneficio** dalle trasfusioni e quando si **riduce** l'incremento del numero di piastrine dopo la trasfusione. In questi casi, è necessario **identificare l'anticorpo** responsabile e selezionare nuovi **donatori compatibili**.

## -> Associazione tra HLA e malattie

E' **difficile** dimostrare che alcune malattie sono associate a specifici antigeni **HLA** a causa del fatto che esistono una grande varietà di fenotipi. Il problema può essere affrontato in **due modi** diversi :

-> **confronto** della frequenza di uno specifico antigene in un **gruppo di pazienti non consanguinei** affetti dalla malattia, in relazione a quella in una **popolazione di controllo**.

-> **studio di famiglie con aplotipi conosciuti** per individuare se una **particolare malattia** compare in famiglie con un **particolare aplotipo**.

Si può quindi verificare se sequenze, **entro** o **vicino** alla regione HLA, possono conferire una **certa suscettibilità** ad una determinata malattia.

L'associazione più rilevante è tra **alcune malattie reumatiche** e l'allele **HLA-B27**, la **narcolessia** e l'allele **HLA-DR2** e la **miastenia gravis**, il morbo di Addison e l'epatite cronica con l'**HLA-Dw3**.

Disease	HLA allele	Relative risk	Sex ratio (♀:♂)
Ankylosing spondylitis	B27	87.4	0.3
Acute anterior uveitis	B27	10	<0.5
Goodpasture's syndrome	DR2	15.9	~1
Multiple sclerosis	DR2	4.8	10
Graves' disease	DR3	3.7	4-5
Myasthenia gravis	DR3	2.5	~1
Systemic lupus erythematosus	DR3	5.8	10-20
Type I insulin-dependent diabetes mellitus	DR3/DR4 heterozygote	~25	~1
Rheumatoid arthritis	DR4	4.2	3
Pemphigus vulgaris	DR4	14.4	~1
Hashimoto's thyroiditis	DR5	3.2	4-5

## Futuro nei trapianti

### Il trapianto di cellule staminali

eviterebbe:

- la compatibilità donatore/ricevente
- il rigetto
- il reperimento di organi
- le problematiche dei farmaci immunosoppressivi

## Microbiologia Apparato Gastroenterico

Il 99% della flora intestinale ( $10^{11}$  batteri / g di feci) è costituito da -->

- *Bacteroides*
- *Clostridi*
- *Bacilli*
- *Peptostreptococchi*

L'1% della flora intestinale è invece composto da -->

- *Escherichia Coli*
- *Enterococchi*
- *Stafilococchi*
- *Miceti* e varie specie di *Protozoi*

### Meccanismi di Difesa dell'ospite

#### -> Barriere fisiche e meccaniche

La prima barriera difensiva è il **pH acido** dello stomaco in grado di **inattivare** il **99%** dei batteri. Le altre **difese fisiche** sono la **mucosa** e il **mucos**.

#### -> Ecosistema batterico

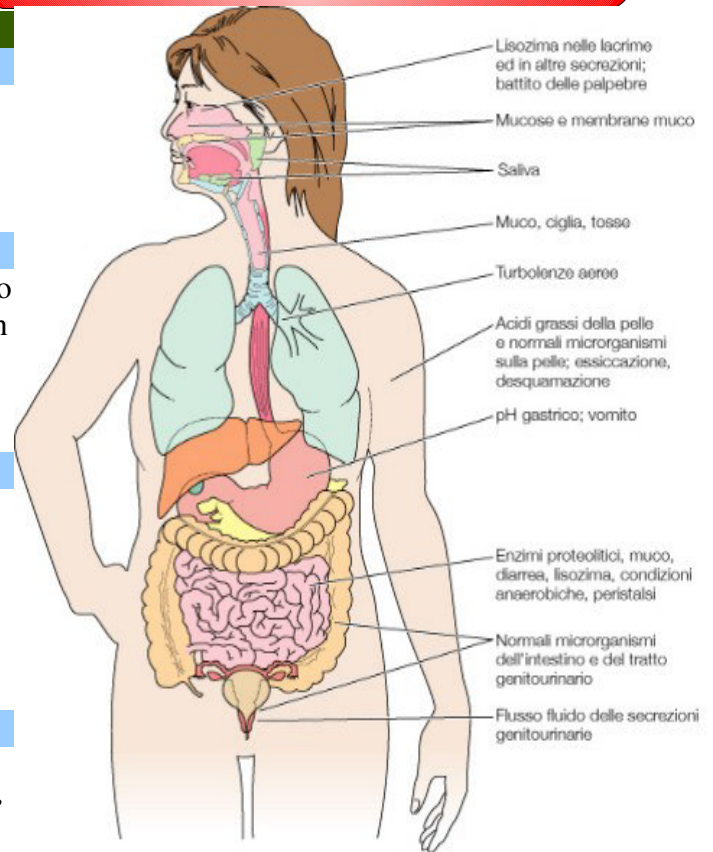
La **flora intestinale** impedisce l'impianto attraverso processi di **competizione** quali il consumo di sostanze **nutritive** e la produzione di **fattori tossici** per i germi.

#### -> Motilità Intestinale

La **motilità** dell'intestino mantiene un fisiologico assetto dell'*habitat enterico* attraverso un **equilibrato assorbimento di liquidi**, una normale **distribuzione** dei **batteri** della **flora**, ed **l'eliminazione** dei microrganismi **patogeni**.

#### -> Immunità intestinale

Nella lamina propria dell'intestino sono presenti in larga quantità **neutrofili**, **macrofagi**, **plasmacellule** e **linfociti**, responsabili della continua **lotta difensiva dell'ospite**. L'immunità specifica è data dalla presenza dei cosiddetti **coproanticorpi**, costituiti da **IgA** (abbondanti) ed **IgM**, entrambe **prodotte in situ** e in parte anche da **IgG**, provenienti dal **circolo**. Sono diretti contro **ag batterici** quali **endotossine**, **componenti della capsula** o **esotossine**.



### Sostanze antimicrobiche presenti nell'ospite

Sostanza	Origine	Attività
LISOZIMA	Siero, saliva, lacrime, sudore	Lisi della cellula batterica
COMPLEMENTO	Siero	Morte cellulare o lisi dei batteri; partecipa al processo infiammatorio
Proteine basiche e polipeptidi (istoni, $\beta$ -lisine ecc.)	Siero o tessuti	Rottura della membrana cellulare
Lattoferrina e transferrina	Secrezioni, siero	Inibizione della crescita microbica (binding del ferro)
PEROSSIDASI	Saliva, tessuti, cellule(neutrofili)	Ossidazione letale della cellula batterica
FIBRONECTINA	Siero e superficie della mucose	Opsonizzazione dei batteri
INTERFERON	Cellule virus-infette, linfociti	Resistenza alle infezioni virali
INTERLEUCINE	Macrofagi, linfociti	Causa febbre (IL-1); promuovono l'attivazione del sistema immune

## Meccanismi di aggressione microbica

### -> Tossine microbiche

Le tossine prodotte dagli enterobatteri patogeni possono essere classificate in ->

**enterotossine vere** -> le più classiche sono quelle di **Salmonella** e di **E. Coli** che agiscono attivando l'**adenil ciclasi**, con aumento della [AMP<sub>c</sub>] intracellulare. Poiché il movimento di materiale dall'interstizio al lume dell'intestino è condizionato dall'AMP<sub>c</sub>, il suo **aumento** induce il trasferimento di **ioni** e quindi di **acqua** nel lume.

**neurotossine** -> sono ingerite come **tossine preformate** e agiscono sul **SNC** e provocano spesso anche una **sintomatologia enterica**. A questo gruppo appartengono le tossine del **Botulino** e dello **Stafilococco**.

**tossine citotossiche** -> sono prodotte da molti patogeni, come **Shigella dysenteriae**, producono distruzione della **mucosa intestinale** con conseguente **colite dissenterica**.

### -> Adesività e Recettori

L'adesione alle cellule della mucosa intestinale è un importante fattore di patogenicità di molti germi che sono capaci di aderire mediante **estroflessioni di membrana**, detti **pili**, alla mucosa, la quale possiede anche specifici **recettori** che permettono l'adesione di **batteri** e di **tossine**.

L'adesione dei batteri permette ad essi di sfuggire ai meccanismi di **detersione meccanica** quali la **peristalsi** e il **movimento dei villi**.

### -> Penetrazione

Alcuni batteri, come **Shigella** e certi ceppi di **E. Coli** possono **penetrare** la mucosa, moltiplicarsi nelle cellule ed **invadere** la **lamina propria**.

### -> Capacità di resistenza ai meccanismi di difesa dell'ospite

Alcuni batteri resistono nei confronti del **potere fagocitario** dei macrofagi e dei polimorfonucleati nonché del **potere battericida** del complemento e dell'**opsonizzazione** degli anticorpi.

## Trasmissione delle infezioni

La trasmissione di infezioni a carico dell'apparato gastroenterico si ha in linea generica per ingestione di **acqua** o di **alimenti (carni, pollami, uova e loro derivati)** contaminati o dal microrganismo stesso o dalle sue tossine, prodotte dal microrganismo durante la sua moltiplicazione.

Le **infezioni alimentari** possono distinguersi in ->

-> **Intossicazioni alimentari**, causate dall'ingestione di cibi contaminati con le **tossine** prodotte da un microrganismo moltiplicatosi sull'alimento **precedentemente il suo consumo**.

Non è necessaria la presenza del germe per il manifestarsi della infezione.

- le intossicazioni alimentari sono quelle date dal **botulino** e dalle tossine **stafilococciche**.

-> **Tossinfezioni alimentari**, consistono nel consumo di alimenti contenenti sia i **germi** che le **tossine** da essi prodotte. I microbi si replicano nell'ospite e continuano a produrre tossine.

- le principali tossinfezioni sono quelle date dal **bacillus cereus** e da **clostridium perfringens**.

-> **Infezioni alimentari**, causate dalla infezione con microbi vitali contaminanti i cibi ingeriti.

- le principali infezioni alimentari sono date da **salmonella, shigella, E.coli, Yersinia enterocolitica, Campylobacter, Vibrio, Listeria monocitogenes** e la **Brucellosi**.

## Meccanismi Patogenetici

Le infezioni enteriche riconoscono essenzialmente **tre tipi** di patogenesi ->

- **non infiammatoria** data nella maggior parte dei casi da **enterotossine**
- **infiammatoria invasiva**
- da **penetrazione della mucosa**

Un semplice esame delle feci per la **ricerca di leucociti**, eseguito ponendo su un vetrino una piccola quantità di materiale fecale e colorandolo con **gram** o **giemsa**, è un importante indice diagnostico -> **l'assenza di leucociti** deve deporre a favore di un **processo infiammatorio** da tossine, virus o parassiti.



### Diagnosi Clinica

L'analisi della sintomatologia clinica è un importante punto di partenza per **indirizzare correttamente** la **ricerca microbiologica**.

### Diagnosi Microbiologica Sindromi non infiammatorie

#### Vibrio Cholerae

Il genere vibrio comprende numerosi batteri *aerobi*, *anaerobi* e *saprofiti* o *patogeni*. *V.Cholerae* è l'agente eziologico del **colera**, che nella forma più grave, si presenta con **diarrea acuta** caratterizzata da massiva perdita di acqua e di elettroliti, che può portare al **collasso cardiaco** in pochi giorni.

La malattia **epidemica** è limitata alle zone geografiche con scarsi livelli **igienico-sanitari**, ma possono avvenire episodi di colera in altre regioni per il rapido spostamento di turisti.

Il **contagio** è **interumano**, per ingestione di **acqua** o **alimenti** contaminati dal batterio (**infezione alimentare**). *V. Cholerae* viene ucciso a **56°C** per **30'** oppure in **pochi secondi** dalla **bollitura**. I vibrioni si suddividono in **3** tipi sierologici sulla base della **struttura antigenica**, **Ogawa**, **Inaba**, **Hikojima** e la variante **EL Tor**, che ha avuto larga diffusione in India.

La **virulenza** dei vibrioni dipende dalla presenza di una **esotossina** proteica termolabile, la cui azione si esplica sulla **adenil ciclasi** portando alla rapida modificazione dei flussi di **acqua** e di alcuni **elettroliti**.

#### Diagnosi microbiologica

Partendo da **campioni di feci**, si eseguono due passaggi in **acqua peptonata** (ove i vibrioni si replicano rapidamente) e successivamente si esegue la **semina** su terreno selettivo (**TBCS** o **agar triptosio** normale o alcalino). Su **TBCS** il vibrione si sviluppa rapidamente, entro **14-18 h** e da origine a **colonie giallastre** sul terreno verde. Le colonie sono poi sottoposte a **saggi di agglutinazione** impiegando siero polivalente anti vibrione colerico. Per la identificazione definitiva si usano **antisieri specifici**. Secondo la tipizzazione sierologica della WHO, si hanno

- > **V. Cholerae 0-1**, ceppi agglutinabili con l'antisiero polivalente
- > **V. Cholerae 0-1 atipici**, agglutinabili ma **incapaci di produrre enterotossine**.
- > **V. Choleare non 0-1**, non agglutinabili con l'antisiero polivalente (**NAG**), raramente capaci di provocare episodi diarroici mediante la produzione di una tossina **simil colerica**.

I **NAG** sono diffusi nell'ambiente e negli alimenti (**molluschi**) e possono acquisire una capacità **tossinogenica** in seguito alla produzione di una tossina **colerasimile**.

#### Escherichia Coli

Il **potere enteropatogeno** di E.coli dipende da almeno **2** di tre fattori quali ->

- > **capacità di aderire alla mucosa** del tenue per mezzo di **pili** in modo da sfuggire ai meccanismi di **detersione meccanica**.
- > **capacità di produrre enterotossine** una **termolabile** simile a quella colerica e una **termostabile**.
- > **potere invasivo**, inteso come capacità di **penetrare nelle cellule** dell'epitelio intestinale ma anche come **resistenza ai meccanismi di difesa dell'ospite**.

Gli **escherichia coli** patogeni si suddividono in diversi ceppi a seconda del meccanismo patogenetico **E.coli enteropatogeni (EPEC)**, danno **diarrea acuta** e **cronica** soprattutto nei bambini intorno ai **2 anni** la loro ricerca deve essere effettuata in caso di **epidemie di neonati**, **diarrea grave** e **cronica**.

**E.coli enterotossici (ETEC)**, danno **diarrea acquosa**, **coleriforme**. Presente nei paesi in via di sviluppo. La **diagnosi** è indicata in adulti con diarrea coleriforme provenienti da zone a rischio. Da la cosiddetta **diarrea del viaggiatore**.



**E.coli enteroinvasivi (EIEC)**, danno la **dissenteria bacillare**, la ricerca deve essere limitata ai pazienti con diarrea di tipo dissenterico provenienti da paesi a rischio.

**E.coli enteroemorragici (EHEC o VTEC)**, danno la **colite enteroemorragica**, con *nausea*, *vomito*, *dolori addominali* e produzione di *feci liquide con sangue* in assenza di febbre.

#### **Diagnosi microbiologica**

Nella diagnosi di infezione enterica da *E.coli* bisogna prima distinguere tra casi *sporadici* e casi *epidemici* di enterite con diarrea, e nei casi epidemici è opportuna la *sierotipizzazione* per controllare che in tutti i pazienti sia presente lo stesso sierogruppo.

I metodi con cui viene attuata la diagnosi di *E.coli* si basano sulle caratteristiche di ->

**adesività** -> i metodi **in vivo** si basano sulla **maggiore** persistenza nell'intestino dei ceppi adesivi rispetto a quelli non adesivi. I metodi **in vitro** studiano la capacità adesiva sulla base del **potere agglutinante** verso emazie di uomo o di cavia.

**produzione di enterotossine** -> tutte le metodiche derivano da quelle attuate per l'identificazione della **tossina colerica**. I test più semplici si basano sulla misura della **quantità di liquidi** che si accumulano nella cavia dopo l'inoculo di sospensione batterica o di un filtrato di coltura batterica.

**invasività** -> il **test di Sereny** valuta la invasività dei patogeni inoculando **10<sup>8</sup>** batteri nel sacco congiuntivale di una cavia e valutando la **comparsa di cheratocongiuntivite** entro **le 72 h**. Il **test in vitro** comporta l'impiego di **colture cellulari** tipo **HeLa**.

#### **Protozoi**

Sono responsabili di **enterite diarroica** solo i protozoi **Giardia lamblia**, **Entamoeba histolitica** e **Balantidium coli**. **Giardia**, in Italia, è un agente infettivo importante e spesso sottovalutato. La **giardiasi** è una infezione dell'**intestino tenue** con sintomatologia variabile -> **diarrea acquosa acuta** con o senza **febbre** oppure **diarrea cronica** o **recidivante**, della durata di mesi o anni. Nei pazienti affetti, i parassiti possono essere individuati in forma di **cisti** nelle feci, o come **trofozoiti** nel succo duodenale.

#### **Diagnosi microbiologica**

Per **1 settimana**, il paziente deve astenersi dall'assumere **medicamenti** o **mezzi di contrasto** che possano interferire con la ricerca microscopica. Il campione di feci fresche raccolto per la ricerca di **protozoi** è adatto anche per quella di **elminti**. Il materiale va raccolto in **contenitori sterili**. Il campione fecale si può raccogliere da ->

-> **materiale emesso naturalmente** o con **tampone**, è il metodo elettivo in quanto spesso permette di osservare le **cisti** dei protozoi.

-> **materiale emesso dopo purga salina**, ha lo svantaggio di emettere i protozoi senza dar loro il tempo di **incistarsi** e la morfologia dei trofozoiti è **meno caratteristica**.

-> **prelievo in rettoscopia**, per raccolta di materiale dalle lesioni con **pipetta sterile**.

Le feci tenute a **T ambiente** devono essere esaminate entro **30**. A **T superiori**, la fermentazione batterica può accorciare la vita delle **forme vegetative**. Le **cisti** possono essere evidenziate anche dopo qualche ora.

Dopo il prelievo, vengono eseguiti **3 esami**, quello **microscopico a fresco** e dopo colorazione con **Lugol** (si pone il materiale su un vetrino, si **stempera** in soluzione fisiologica con un bastoncino e si esamina al microscopio. Una variante prevede l'aggiunta di poche gocce di eosina alla soluzione fisiologica per contrastare i parassiti che rimangono **incolori**. Le feci si possono colorare con **Lugol**, a base di iodio, che mette in evidenza varie strutture dei parassiti.), l'esame dopo **fissazione** seguita da **arricchimento** mediante sgrassamento con etere e centrifugazione, e poi l'**esame colturale** in terreno di Robinson.

## Virus

In un gran numero di casi di *enterite acuta*, la ricerca di batteri è infruttuosa -> nel **75%** di queste forme, la causa è un **agente virale**. Nelle *infezioni enteriche virali*, i **virus** si moltiplicano nel citosol delle cellule epiteliali intestinali causando una *flogosi catarrale acuta* a liv. del tenue.

La **sintomatologia** è attribuibile oltre che al *danno della parete intestinale*, anche alla *risalita della flora fecale* sino al tenue, con successiva *alterazione della permeabilità*, dell'*assorbimento* e *motilità*. La *breve durata* di queste forme morbose non pone grossi problemi di diagnosi (*assenza di leucociti nelle feci*) né di terapia, che sarà sempre solo sintomatica.

I virus responsabili di *enterite acuta* sono i **Rotavirus** e i **Norwalk**

-> *l'enterite acuta* dovuta al **Norwalk** colpisce individui di tutte le età, ha *andamento epidemico* ed è *autolimitante* con sintomi di modesta entità che durano per **24-48h**.

-> *l'enterite acuta* dovuta al **Rotavirus** ha *andamento endemico* e colpisce prevalentemente i bambini. La sintomatologia dura da **5 ad 8 gg** con *diarree, vomito e febbre*.

## Stafilococchi

Le *enteriti da Stafilococco* possono essere distinte in **infiammatorie**, o primitive, e **non infiammatorie** o intossicazioni alimentari.

### a) *Enteriti infiammatorie*

Sono legate a **fattori favorenti** come la **età** e gli **antibiotici**, i quali sono in grado di determinare profonde *modificazioni* nell'ecosistema batterico intestinale, fino anche a dare una *enterocolite pseudomembranosa*. In passato si riteneva lo **stafilococco aureus** il responsabile di questa patologia, quando in realtà ne è solo *associato* quando il vero agente eziologico della patologia è *clostridium difficile*.

### *Diagnosi microbiologica*

Poiché lo **Stafilococcus aureus** è presente normalmente nella flora intestinale, deve essere ogni volta effettuata una **determinazione quantitativa** per valutare se la sua presenza nelle feci è normale o associata ad una infezione. Le *fece* devono essere *diluite* in soluzione fisiologica **1/100** prima di essere seminate in terreni solidi. La possibilità che lo **stafilococco** sia il responsabile della *enterite* è presa in considerazione solo se si hanno **40-50 colonie** sul terreno selettivo seminato con **0.1ml** di soluzione.

### b) *Enteriti non infiammatorie*

La *intossicazione alimentare* da **Stafilococcus aureus** è dovuta ad una *enterotossina preformata*. Ha un breve periodo di incubazione -> **1-6 h**. La **sintomatologia** è caratterizzata da *vomito* e *diarrea*. Gli **Stafilococchi** producono uno o più di un tipo di enterotossina, (fino ad ora sono state identificate **5** tipi di *proteine termostabili*), che agiscono **inibendo** l'assorbimento di *acqua* e stimolando il *centro del vomito* mediante il **vago**.

Rivestono importanza notevole i **portatori sani**, che albergano il batterio nell'**oro faringe** o nelle **cavità nasali**, e possono contaminare i cibi con la manipolazione.

### *Diagnosi microbiologica*

L'identificazione di **Stafilococcus aureus**, isolato su piastre di *agar-sale mannite* da alimenti o altri materiali, viene eseguita con *test biochimici*, da alcuni ritenuti associati alla *patogenicità*, anche se si è visto che ->

-> non è possibile porre in correlazione uno o più caratteri biochimici, come la *coagulasi* o la *DNAsi* con la patogenicità.

-> solo una **bassa %** di ceppi coagulasi positivi produce *enterotossine*, mentre sono stati trovati ceppi coagulasi negativi che le producono.

L'unico *critério* attendibile è la **ricerca** e la **dimostrazione** della produzione di *entero tossine*, mediante la *immunofluorescenza*, *l'elettroimmunodiffusione* etc.

### Bacillus

Il genere *bacillus* comprende diverse specie, una patogena, *Bacillus anthracis* ed altre saprofiti presenti prevalentemente nel **suolo**, nell'**aria**, nell'**acqua** quali *bacillus cereus* e *bacillus subtilis*. Sono **gram positivi**.

Si **moltiplica** nei cibi dove produce due diversi tipi di enterotossine che danno due sindromi diverse ->

- **la tossina diarroica**, che si dimostra, dopo un **periodo di incubazione** di **6-15h**, con **diarrea acquosa** e **crampi addominali**. Successivamente compaiono anche **nausea** e **vomito** che scompaiono dopo **20-24 h**.

- **la tossina emetizzante**, che ha un periodo di incubazione più corto, massimo **6 h**, e una sindrome più acuta della precedente con **nausea** e **vomito** (simile a quella data dallo *Stafilococcus aureus*).

### Clostridium

I *Clostridium* sono microrganismi **anaerobi**, **bastoncellari**, **gram positivi** e **sporigeni**. Vivono preferenzialmente nel **suolo** o nel tratto intestinale di **uomo** ed **animali**.

#### ✓ *Clostridium perfringens*

Causa una modesta tossinfezione alimentare per la **ingestione di cibi** nei quali si sia moltiplicato per l'instaurarsi di adatte condizioni di **anaerobiosi**. Se ne conoscono **5 tipi**, A a E in grado di produrre varie tossine. Solo i tipi **A** e **C** sono pericolosi per l'uomo. La tossina induce la comparsa di perdite **idro elettrolitiche** intestinali. La **sintomatologia** consiste in **forti dolori addominali**, **diarrea** e **gas**.

#### ✓ *Clostridium botulinum*

La patogenesi della malattia è dovuta alla produzione di una **neurotossina**. Il batterio produce **spore** resistenti al calore, mentre la tossina è abbastanza labile al calore. Si conoscono **7 diversi tipi** di neurotossina, da **A** a **G**, e di queste solo i tipi **A**, **B** ed **E** sono riscontrabili nella patologia umana.

Si può presentare come ->

- ◆ **Botulismo alimentare**, per ingestione di cibi contenenti la tossina preformata
- ◆ **Botulismo da ferita**, dovuto alla formazione di tossina in vivo
- ◆ **Botulismo nel neonato**, nel quale la tossina è elaborata in vivo nell'intestino
- ◆ **Botulismo a patogenesi ignota**, colpisce individui di età superiore ai 12 mesi.

Si manifesta con **nausea**, **vomito** e **dolori addominali** che insorgono dopo **12-36h** dalla ingestione della tossina, successivamente compaiono i **sintomi neurologici**, che si manifestano con **paralisi dei muscoli scheletrici**, da quelli oculari a quelli respiratori che portano poi a morte il paziente.

La conferma della **diagnosi clinica** di botulismo viene solo con l'**isolamento della tossina**.

## Sindromi infiammatorie

### Shigelle

Le *shigellosi* sono malattie infettive che danno luogo ad una **enterite acuta**. La forma più grave presenta **febbre**, **dolori addominali**, **cefalea**, **tenesmo** e **diarrea mucosanguinolenta**. Le lesioni sanguinolente si limitano al **colon** e al **tratto terminale** dell'**ileo** e consistono in ulcerazioni superficiali coperte di una pseudomembrana costituita da **leucociti PMN**, **frammenti di cellule** e **batteri avvolti di fibrina**. Il genere shigella comprende ->

-> **gruppo A** comprendente **1** sola specie, la **S. dysenteriae** caratterizzata dalla capacità di fermentare la **mannite**.

-> **gruppo B** comprendente **S. flexneri**, di cui si conoscono **13** tipi sierologici, in base agli

### antigeni O e K.

-> **gruppo C** *S. Boydii*, di cui se ne conoscono **15** tipi sierologici, biochimicamente simili al gruppo B, ma distinguibili per proprietà antigeniche.

-> **gruppo D** *S. Sonnei*, di cui se ne conosce **1** solo sierotipo.

I **più tossici** sono quelli del gruppo **A**, che producono essenzialmente **2 tossine**, una *tossina enterotropa*, termostabile, legata all'antigene somatico **O** e prodotta da tutte le shigelle e una *tossina neurotropa*, termolabile.

Le *shigellosi* possono presentarsi sia in forma *endemica* che *epidmica*, e colpisce più di frequente i **bambini** dal **6°** al **18°** mese di età ed è più frequente nei mesi estivi e laddove esistano scarse condizioni igieniche.

La **trasmissione** avviene per via **oro-fecale**.

#### **Diagnosi Microbiologica**

Le *shigelle* rimangono vitali nelle feci solo per **breve tempo**, per cui è necessario eseguire l'esame colture il prima possibile, dopo *evacuazione* o per *tampone rettale*.

**Esame colturale** i tamponi rettali possono essere strisciati sulla **superficie di terreni di isolamento** (Hektoen). Se le feci sono **solide** è necessario diluirle con soluzione fisiologica. Nella fase **acuta** le Shigelle sono sempre presenti nelle feci, mentre nella fase **cronica** sono presenti saltuariamente.

**Diagnosi sierologica** Durante la convalescenza compaiono nel sangue **agglutinine** e spesso gli anti corpi possono essere messi in evidenza anche nelle **feci**. Gli **ab** circolanti **non hanno azione protettiva**, i **coproanticorpi** invece si.

### **Salmonelle**

Le **Salmonelle** fanno parte della famiglia delle *enterobacteriaceae* e sono raggruppate in **3** specie principali > *S. typhi*

*S. choleraesuis*

*S. enteritidis*

Le **Salmonelle** crescono facilmente su tutti i terreni di coltura sia in aerobiosi che in anaerobiosi. L'**habitat** naturale è il tratto intestinale di molti animali, anche se possono trovarsi in moltissimi altri ambienti. I principali distributori di **salmonella** nell'ambiente sono gli insetti.

Le principali varietà possono essere identificate in base all'**attività fermentativa** e ad altre reazioni biochimiche, tuttavia l'**identificazione definitiva** si basa sulla struttura antigenica. I più importanti antigeni di superficie sono >

- gli **antigeni H** legati alle ciglia, proteici, sono i più superficiali.
- gli **antigeni O** lipopolisaccaridi, legati alla parete batterica e mascherati dall'ag H
- gli **antigeni K** polisaccaridi, coprono parzialmente l'ag O. Sono distrutti dalla ebollizione per **2 h**.

L'infezione da salmonella può determinare svariate sindromi cliniche, fra le quali le più frequenti sono le **gastroenteriti** (localizzate all'intestino) e la **febbre enterica** o **tifoide** (a diffusione sistemica)

#### **Le gastroenteriti o salmonellosi minori**

Insorgono dalle **16** alle **48 h** dopo la ingestione di cibo contaminato. I batteri superano la barriera gastrica ed esplicano la loro azione a livello del colon e del tenue. Durante le prime **10-12 h** si ha una **fase di moltiplicazione** nel lume intestinale, poi una **fase di adesione** ai recettori delle cellule epiteliali, successivamente le salmonelle **penetrano nelle cellule** fino alla lamina propria e alla sottomucosa. Nella ultima fase, si ha la **moltiplicazione nei fagociti** e il passaggio nei **linfonodi mesenterici**. Nella **prima fase** non si hanno sintomi apprezzabili nelle ultime fasi si hanno **diarrea, nausea, vomito, febbre**.

### Diagnosi Microbiologica

Le feci, trasportate nel laboratorio nel più breve tempo possibile in contenitori sterili o in tampone rettale, possono essere **seminate** sia **in terreno solido selettivo** che in **terreno liquido di arricchimento**. Tra i terreni solidi vengono usati correntemente l'**enteric Hektoen agar**, l'**agar SS**, il **desossicolato citrato agar**, e l'**agar di Wilson Blair**.

### La Febbre enterica o tifoide

È una sindrome clinica provocata da **S. typhi**. Sindromi cliniche simili ma di minore entità possono essere date dalle **S. paratyphi**. Parte dei microbi ingeriti supera la barriera enterica e passa nei **linfonodi mesenterici**. Si verifica quindi una batteriemia di breve durata, in quanto il batterio viene subito sequestrato da **milza, fegato** e dal **sistema reticoloendoteliale**. In queste sedi il batterio si moltiplica velocemente, entra di nuovo in circolo e dà una **batteriemia persistente**, raggiungendo tutti gli organi, ma persistendo la moltiplicazione nella milza che diventa quindi un permanente **focolaio di infezione**.

### Diagnosi Microbiologica

Il periodo di incubazione è di **10-14 gg** con variazioni che possono andare da un min di **7 gg** ad un max di **21 gg**. La sintomatologia è data da **febbre intermittente**, il quadro morboso ha la durata di **4 settimane**. In base alla cinetica dell'infezione, si hanno le conseguenti possibilità diagnostiche >

- > **1° settenario** il test d'elezione è l'**emocoltura**, in quanto nella prima settimana l'emocoltura è positiva nel 90-100% dei casi.
- > **2° settenario** i test di elezione sono il **Widal** (la reazione di positività per le **agglutinine**) più l'**emocoltura** (la positività scende al 50%) più infine la **coprocultura**.
- > **3° settenario** i test di elezione sono il **Widal** più l'**emocoltura** (anche se le positività sono scese al 30% dei casi) più la **coprocultura** più una eventuale **urocultura**.
- > **4° settenario** il test di elezione è il **Widal**, in quanto scompaiono i batteri nelle urine e nel sangue e nelle feci. mentre la presenza di **Ig** contro le agglutinine batteriche raggiunge il titolo più alto.

### Campylobacter

Il genere **campylobacter** contiene tre specie, delle quali importante per la patologia umana è la specie **C. fetus**, con le due sottospecie **C. intestinalis** e **C. jejuni**.

Il **quadro clinico** non è specifico. Il periodo di incubazione varia da **16 h** a più di **48 h** e la sintomatologia è caratterizzata da **diarrea acuta** e **febbre** raramente accompagnata da **vomito, mialgie, cefalea, artalgie**.

Per la specie **C. jejuni** il discorso è più **benigno** e le complicanze setticemiche piuttosto rare.

Per la malattia causata da **C. intestinalis** che colpisce per lo più soggetti **deboliti** ed **immunodepressi** con frequenti setticemie, il quadro clinico è più **grave**. Inizia con malessere generale, cefalea e **febbre** che nel giro di due giorni raggiunge valori elevati ed un andamento **ondulante**, tanto da simulare una brucellosi od una malaria.

### Diagnosi Microbiologica

Per le **modalità di contagio** si può avere o il **contatto diretto** con animali infetti, come il pollame vivo o macellato, o la **ingestione** di cibi contaminati o di acqua contaminata. Il campylobacter rimane vitale per **3 gg** a temperatura ambiente e **7 gg** in frigorifero.



Una volta pervenute le feci in laboratorio, l'isolamento si esegue su terreno di **Campy-BAP** reso selettivo con l'aggiunta di sostanze anti microbiche, e posto ad incubare a **42°C** per **48 h** in una atmosfera al 5% di O<sub>2</sub> e al 10% di CO<sub>2</sub>.

### **Entamoeba histolitica**

L'uomo è l'ospite più importante di questo parassita. E' piuttosto **frequente** in Africa ed in America Latina.

La **malattia** si presenta come una **enterocolite** ad andamento cronico recidivante, con esordio graduale, **aumento delle scariche alvine giornaliere, dolori addominali, tenesmo, feci mucopurulente**. La cronicizzazione può determinare gravi effetti generali, come deperimento, anemia e febbre e **complicazioni localizzate** quali l'ascenso epatico e più raramente ascessi polmonari e cerebrali.

L'**ameba** attraversa la mucosa intestinale aiutandosi con gli pseudopodi, depolimerizzando il **cemento intercellulare** grazie all'azione di **ialuronidasi**. Superata la mucosa, si localizza nei **follicoli linfatici** dove dà luogo ad un focolaio suppurativo ascessuale che si apre nel lume intestinale. Le aperture formano delle vere **ulcerazioni**, dette a bottone di camicia. Il contagio avviene per via **diretta** (mani sporche) che per via **indiretta** (alimenti contaminati).

### **Diagnosi microbiologica**

Come tutte le amebe, presenta una forma vegetativa e una forma cistica. La diagnosi può essere posta mediante il reperto di amebe o delle cisti nelle feci.

### **Vibrio parahemolyticus**

E' un **vibrione** che causa una **diarrea acuta** molto frequente in Giappone ma eccezionale in Italia. Questo microrganismo, oltre ad un **effetto infiammatorio**, esplica la propria azione producendo anche una **enterotossina**.

La diarrea insorge **24 h** dopo la ingestione di cibo contaminato ed è **acquosa**.

### **Diagnosi microbiologica**

L'isolamento si effettua su **TBCS (tiosolfato citrato bile sali saccarosio)** previo arricchimento in soluzione salina ipertonica contenente 3% di NaCl a pH 7.4.

## **Sindromi da penetrazione della mucosa intestinale**

### **Febbre enterica o Tifoide**

– riferirsi al paragrafo sulle **salmonelle**.

### **Yersinia Enterocolitica**

E' un microrganismo pleiomorfo che causa una **grande varietà** di situazioni cliniche dipendenti da **età, sesso** e dallo **stato di salute** del paziente. La **via d'ingresso** è quella dell'apparato digerente. Nella **maggior parte** dei soggetti l'infezione si arresta allo stadio **inapparente** mentre in alcuni porterebbe alla **malattia conclamata**.

Dai **focolai primari** di impianto, il microrganismo si può portare al fegato, dove forma dei **micro ascessi**.

I **quadri clinici** vanno da dalla **enterite** o **enterocolite** alla **setticemia**. Si possono avere anche localizzazioni extra-intestinali e manifestazioni che complicano il quadro clinico come **eritema nodoso, poliartriti acute, sindromi oculari ed affezioni uretrali**.

La **setticemia** insorge più di frequente nel bambino affetto da emopatie e nell'adulto cirrotico o diabetico. L'**enterite** predomina nei bambini piccoli, mentre l'**eritema nodoso** si ha nelle donne in età avanzata.



### ***Diagnosi di Laboratorio***

La diagnosi si basa sull'isolamento di **Y. enterocolitica** dalle feci, dai linfonodi mesenterici e dal sangue. L'isolamento dalle feci è il più frequente, viene effettuato sui terreni usati per le *enterobacteriaceae*. Poiché l'*optimum di crescita* dei batteri è a **25-29°C**, si deve eseguire una doppia incubazione dei terreni seminati sia a **37°C** che a **25°C** per almeno **48 h**.

# Microbiologia Meningite

## Liquido cefalo rachidiano

Il **liquor** è prodotto dai **plexi corioidei** dei ventricoli cerebrali e circola nei ventricoli e nello spazio sub aracnoideale, attorno all'encefalo e alla corda spinale e ritorna al sistema circolatorio attraverso i **villi subaracnoideali**. Di norma è assolutamente **sterile**.

Il normale **volume** di liquor è pari a -> **nel neonato ad 40-60 ml**  
**nell'adulto ad 100-160 ml**

## Meningiti eziopatogenesi

La meningite è una **infiammazione** delle meningi (pia madre, aracnoide, dura madre che rivestono l'encefalo ed il midollo spinale) ed è l'infezione più **comune** e rilevante del SNC che può rapidamente progredire e portare a morte. E' estremamente importante che venga posta **tempestiva diagnosi di meningite**, che può essere considerata l'unica vera **urgenza** in ambito microbiologico.

Le **meningiti** possono riconoscere una eziologia **batterica** (o anche da *candida*, *amebe* o *toxoplasma*) a liquor **torbido** oppure una eziologia di altra natura a liquor **limpido** o **smerigliato** (meningiti asettiche).

Più particolarmente, i due gruppi di meningiti (detti **sindromi meningitiche**) possono essere classificati come ---

- **Meningiti batteriche acute**

In ordine di frequenza, sono causate da ---

- *Neisseria Meningitidis*
- **Pneumococco**
- *H. influenzae*
- **Enterobacteriaceae**
- *Streptococchi di gruppo B*
- **Listeria Monocytogenes**
- *Stafilococcus aureus*
- *Stafilococcus epidermidis*

<b>Neonati</b>	→	<i>S.agalactiae, L. monocytogenes</i>
<b>Bambini &lt;12anni,</b>	→	<i>N.meningitidis, H.influenzae, S.pneumoniae</i>
<b>Adulti</b>	→	<i>N.meningitidis, H.influenzae, S.pneumoniae, Gram negativi</i>
<b>Anziani</b>	→	<i>S.pneumoniae, L.monocytogenes, N.meningitidis Gram negativi</i>

- **Sindromi meningitiche asettiche**

Sono caratterizzate da un **esame batteriologico, microscopico e colturale** negativo. Possono essere causate da agenti che richiedono o no una terapia antibiotica ---

- **Sindromi che necessitano di terapia antibiotica**

- **Meningiti batteriche parzialmente trattate con antibiotico (decapitate)**
- *Miceti*
- **Tubercolosi**

- **Sindromi che non necessitano di terapia antibiotica**

- **Meningiti virali, da Virus ad RNA**
- *Meningiti da neoplasie, chimiche, reattive o secondarie a mal. sistemiche*
- *Meningiti per funghi, amebe, toxoplasmi, Sifilide, Herpes Simplex, Micoplasmi, forme batteriche L.*

## Meningiti Batteriche acute - eziopatogenesi

La eziopatogenesi delle meningiti batteriche procede attraverso fasi successive che comprendono ---

- ✓ **una fase di adesione**, consistente nell'adesione di alcuni batteri che provocano meningite alle cellule della mucosa **naso faringea** essendo dotati di recettori di superficie specifici.
- ✓ **una fase di colonizzazione**, nel quale il batterio colonizza la mucosa **naso-faringea**
- ✓ **una fase di penetrazione**, durante la quale i batteri penetrano nei tessuti sub-epiteliali, o

**attivamente** mediante invasione diretta, con o senza danneggiamento della cellula ospite, o **passivamente** mediante fagocitosi, e raggiungono così il *circolo ematico*. Nel sangue i batteri devono ->

- x evitare di essere fagocitati dai PMN e da cellule del sist. reticoloendoteliale.
- x evitare la lisi mediata dagli anticorpi specifici o dal complemento.

Superata la barriera ematica, i batteri si riversano nello **spazio subaracnoideale** e quindi nel liquor. Le vie preferenziali di ingresso sono i siti di resistenza minima, come i *plessi corioidei, la lamina cribrosa, i seni venosi durali e i siti di ferite chirurgiche o traumatiche del SNC*.

- ✓ una fase di **invasione**, a moltiplicazione incontrollata, nel liquor, che non è in grado di fermare la colonizzazione in quanto possiede pochi fagociti e basse concentrazioni di complemento e di Ig, che porta ad **infiammazione delle meningi**, conseguente la **risposta infiammatoria** causata dagli antigeni batterici, che inducono la produzione di ->

- x **interleuchina-1**
- x **Tumoral Necrosis Factor**

Ad opera di *monociti, macrofagi, astrociti* e cellule *endoteliali* nel SNC.

Le **vie di ingresso** dei batteri nel liquor essenzialmente consistono in ---

- Batteriemia sistemica** (la più frequente via di ingresso)
- Ingresso diretto** dal tratto respiratorio superiore
- Passaggio intracranico** attraverso una venula del nasofaringe
- Diffusione da focus contiguo d'infezione** (come la infezione dei seni paranasali, o trasudazione da un ascesso cerebrale...)

Se ci si riferisce alle caratteristiche *macroscopiche* e *microscopiche* del liquor nel corso di una meningite ad eziologia batterica, si possono distinguere quattro fasi evolutive ---

**1) Una fase di insorgenza**

In cui i microrganismi, sia nelle meningiti primitive che secondarie, arrivano alle meningi. Il liquor è di aspetto **limpido** o a volte anche **torbido** nel caso di carica batterica massiva. Gli elementi *nucleari flogistici* sono scarsi o addirittura assenti. **Positivo** è l'esame batteriologico e colturale.

**2) Una fase di risposta della difesa naturale**

In cui entrano in funzione i meccanismi di difesa naturale, in primis la **fagocitosi**, che libera ulteriori determinanti antigenici inducendo poi la risposta immunitaria primaria. Il liquor appare **torbido** per la presenza di *batteri, neutrofili, macrofagi* e rari *linfociti*. Questa fase ha una durata variabile, in relazione alla reattività individuale e alla efficacia della terapia.

**3) Una fase produttiva della risposta immunitaria**

In cui i linfociti B attivati riversano nel liquor **IgG specifiche**. Il numero di granulociti si riduce a vantaggio della quota linfocitaria. L'*esame batteriologico* in genere è **negativo**.

**4) Una fase di guarigione clinica e della Restitutio ad integrum**

Gli antigeni batterici sono pressoché scomparsi, il numero delle cellule flogistiche diminuisce progressivamente così come il tasso di Ig liquorali.

La **sintomatologia** delle meningiti batteriche è la seguente ---

- ★ Pregressa infezione delle alte vie respiratorie
- ★ Febbre, cefalea, rigidità nucale, disturbi mentali
- ★ Nausea, vomito, sudorazione profusa, debolezza ed irritabilità

## DECORSO DELLE MENINGITI

- **FULMINANTE**: con evoluzione rapida in coma e stato di shock quasi sempre irreversibile
- **ACUTA**: esordio e sviluppo nel corso di ore o di pochi giorni
- **SUBACUTA**: decorso lento e insidioso con segni meningei sfumati che talora non richiamano l'attenzione del medico (solitamente causata da bacillo tubercolare oppure da miceti)
- **RICORRENTE**: ripetuti episodi anche a distanza che sono espressione generalmente di un difetto dell'ospite, o delle difese immunologiche (es: trauma cranico, pazienti HIV+, ecc)
- **DECAPITATA**: forma il cui decorso è attenuato per il precoce intervento con terapia antibiotica.

### Sindromi meningitiche asettiche

#### Caratteristiche delle meningiti decapitate

Le meningiti decapitate rappresentano  $\frac{1}{4}$  di tutte le meningiti batteriche, sono caratterizzate da un **liquor** negativo all'esame **batterioscopico** e **colturale**, si ha però la presenza di neutrofili alterati e ipoglicorachia (la **glicorachia** del liquor equivale alla glicemia nel plasma).

Sono causa di un trattamento antibiotico incongruo che modifica le caratteristiche liquorali, determinando reperti sovrapponibili alle **meningiti virali**.

#### Caratteristiche delle meningiti virali

Nelle primissime forme, le meningiti virali possono presentare una reazione con **prevalenza di neutrofili**, fase sempre **transitoria**. La formula delle meningiti virali si modifica rapidamente ed in **72 h** si stabilisce l'aspetto del liquor con prevalenza di mononucleati linfoidi e iperbasofili.

#### Caratteristiche delle meningiti causate da batteri in forma L

Questi sono batteri privi di parete, che trovano un loro habitat ideale nei pressi dei **pleksi corioidei**. In caso di sospensione intempestiva della terapia antibiotica, ricostituiscono la parete, si moltiplicano e determinano una **recrudescenza** della malattia. Diverso è il caso delle **meningiti recidivanti**, che sono caratterizzate da un ampio periodo di benessere al di fuori della terapia, e sono in genere legate ad un **difetto anatomico congenito**, a processi **neoformativi localizzati**, a **difetti immunitari congeniti** od **acquisiti**.

### Diagnosi di Laboratorio

#### Modalità di Richiesta, Raccolta e Conservazione del campione

E' sempre preferibile eseguire l'**esame** del liquor all'**atto del prelievo**. Nella richiesta di esame è sempre **preferibile** indicare oltre ai principali dati anamnestici, anche se il paziente è o è **stato** in trattamento antimicrobico.

Il **prelievo** deve essere eseguito in condizioni di **rigorosa asepsi**, e il campione va raccolto in **due provette** --- una per l'esame **microbiologico** ed una per l'esame **chimico**.

Il campione prelevato potrà, in base alla situazione, o ---

◆ **essere inviato subito al laboratorio**

◆ **essere inviato al laboratorio successivamente**. In questi casi, il clinico dovrà provvedere ad effettuare una - **semina** su terreno di trasporto / conservazione  
- o **due strisci** ottenuti con il sedimento risospeso del liquor, la cui parte restante va inviata in laboratorio

Se l'invio del materiale avviene entro **1 o 2 h** dal prelievo, il campione può rimanere a T ambiente, altrimenti deve essere posto in termostato a **37°C**.

Il **mezzo di trasporto / conservazione** consiste di un tubo contenente tioglicollato

semifluido arricchito di alcuni fattori di crescita che favoriscono la coltura di batteri delicati, come il *meningococco* e l'*emofilo influenzale*. La **semina** va fatta per infissione con un tampone precedentemente immerso nel liquor e subito riposto nella provetta di custodia. Se sono contemplate **ricerche di virus**, è necessario **congelare** almeno una provetta di liquor sterile.

### **Esame Macroscopico**

L'aspetto del liquor può essere orientativo della natura morbosa. Di norma, è **limpido, incolore**. Le variazioni sono indicate come ---

- ◆ **ematico** di colore rossastro
- ◆ **xantocromico**, di colore giallo bruno di varia intensità, dopo centrifugazione
- ◆ **opalescente** di vario grado
- ◆ **purulento**
- ◆ **smerigliato**

L'opalescenza, che normalmente è indice di meningite batterica, talvolta può essere la massima espressione citologica di una forma virale, così come l'esordio di una meningite batterica può presentarsi a liquor limpido. Ciò significa che la valutazione dell'aspetto ha solo valore indicativo, non diagnostico.

### **Esame Microscopico**

Il liquor può essere esaminato a **fresco** per la conta degli elementi nucleati e dopo **centrifugazione** per la ricerca di particolari microrganismi come protozoi e miceti ---

#### ◆ **Conteggio delle cellule a fresco**

Il numero di cellule nei soggetti sani varia da **1 a 5 /microl**, nei bambini al di sotto di 1 anno, il limite superiore può arrivare a **15-20 /microl**. La tecnica di conteggio si esegue nella **camera di Nageotte**, un contenitore con una superficie di **1 cm<sup>2</sup>** divisa in **40 colonne**, dallo spessore di **1 mm** e dal volume complessivo di **100 microl**. Il liquido, mescolato e diluito volume/volume con liquido di Tink che distrugge le emazie, viene **posto nella camera di conteggio**. La conta viene effettuata su **8 colonne** ed il totale diviso per 10, in modo da ottenere il n° di cellule / microl.

#### ◆ **Esame citologico**

Si svolge dopo colorazione con **May-Grunwald Giemsa**. Nel caso di liquor molto torbidi, è sufficiente strisciare direttamente un'ansata sui vetrini, altrimenti si deve effettuare la **centrifugazione** per **5'** a circa **3000g**. Per i liquor a scarsa torbidità, si possono anche usare dei vetrini pre colorati. Per lo studio della **morfologia**, il metodo più idoneo è la citocentrifuga. Per poter interpretare correttamente i risultati morfologici di un liquor patologico, è necessario conoscerne le caratteristiche fisiologiche. La popolazione cellulare di un **liquor normale** è costituita da ---

- ★ **piccoli linfociti**, che rappresentano il **90-95%** della popolazione cellulare. Sono linfociti T.
- ★ **linfocita intermedio**, detto anche preimmunocito, rappresenta il **2-3%** della popolazione cellulare ed ha dimensioni maggiori e citosol basofilo.
- ★ **cellule istiocitoidi meninge**, hanno il carattere dei macrofagi con ampio citoplasma basofilo con fini granulazioni eosinofile e nucleo grosso rotondo.

In condizioni **patologiche** possono comparire anche ---

- ★ **granulociti neutrofili di vario numero** e grado di conservazione
- ★ **immunoblasti** nelle meningiti virali
- ★ **eccezionalmente plasmacellule**.

### **Caratteristiche Colturali**

#### ◆ **terreni di coltura**

E' consigliabile indirizzare la scelta verso terreni che garantiscano la crescita di tutti i



possibili agenti eziologici. E' consigliato l'uso di due piastre, *agar sangue* ed *agar cioccolato* ed una provetta di *tioglicollato semifluido*.

Per il **meningococco** e l'**emofilo** si impone l'uso di agar cioccolato più isovitalex o analogo arricchimento che contenga fattori di crescita, il tutto in ambiente **microaerofilo** (atmosfera con il 5% di CO<sub>2</sub>).

#### ◆ **tecniche colturali**

Nell'eseguire la semina su terreno di coltura, bisogna distinguere tra due possibili evenienze ---

★ invio immediato del liquor al laboratorio, cui segue immediatamente la semina. Se l'aspetto del liquor è >>

- **limpido**, è raccomandabile eseguire la semina delle piastre **compensando** il minor numero di germi con una maggiore quantità di inoculo. Una alternativa consiste nella coltura in **brodo nutritivo** accelerata dalla rotazione a **37°C per 2 h**.
- **opalescente**, si effettua la semina a **striscio** del centrifugato eventualmente risospeso nel proprio sedimento.
- **nettamente purulento**, si effettua la semina **diretta a striscio**, evitando ulteriori manipolazioni.

★ invio differito del liquor al laboratorio. In questo caso, la semina per striscio va eseguita direttamente dal **tampone**, velato di terreno di trasporto ed eventualmente in subcoltura dal **tubo di tioglicollato**.

#### ● **Caratteristiche bioumorali (esame chimico-fisico)**

Molteplici sono le sostanze del liquor che subiscono importanti variazioni in corso di meningite. Le più significative dal punto di vista **diagnostico** sono ---

#### ◆ **glucosio**

I valori liquorali della glicorachia corrispondono ai 2/3 di quelli ematici. I valori sono ridotti intorno ai **40 mg/dl** nelle meningiti batteriche, anche se un glucosio normale **non esclude** la diagnosi di meningite batterica. La **ipoglicorachia** sembra essere dovuta ad un **alterato** trasporto di glucosio nel liquor o anche ad un **aumentato catabolismo batterico** del glucosio. Nelle meningiti **virali** il glucosio è **normale** o lievemente **aumentato**.

#### ◆ **proteine**

Nei soggetti normali i valori di **proteiorachia** variano dai **14 ai 40 mg/dl** ed i costituenti differiscono da quelli plasmatici per quantità e composizione. L'origine delle proteine è **duplice** ---

★ una parte (la maggiore in condizioni normali) deriva dal **plasma**. Mancano però le **IgM**, le **beta-lipoproteine** e la **beta2-microglobulina** mentre il contenuto in **pre-albumina** è più elevato.

★ una parte è **prodotta in situ** dalle cellule linfo-plasmocitarie e liquorali, che sintetizzano **anticorpi** in occasione di stimolazioni immunitarie

In corso di **meningite batterica** aumentano di molto, oltre i **100 mg/dl**

In corso di **meningite virale** aumentano solo **lievemente**.

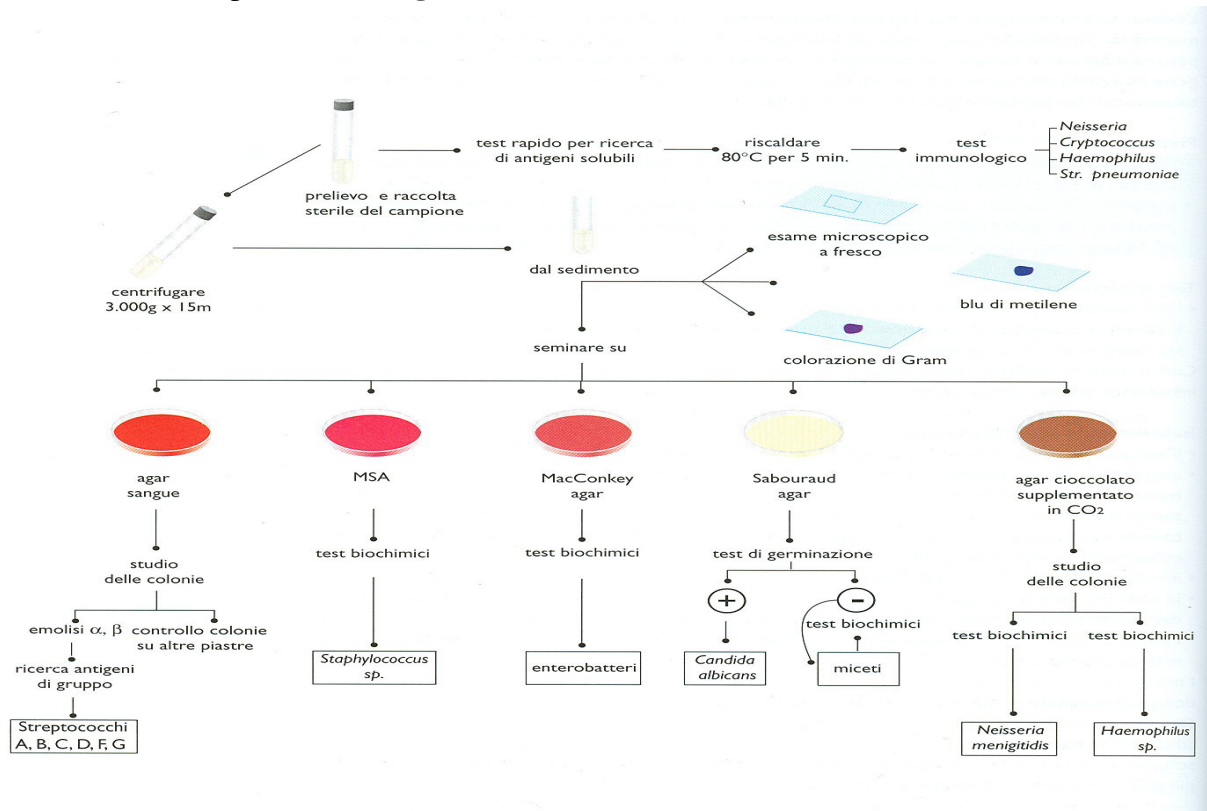
Importante è considerare il **rapporto** tra proteine liquorali e sieriche, ovvero tra le **IgG liquor/siero** e l'**albumina liquor/siero**. Se si ha un **abbassamento parallelo** dei due rapporti, è indice di **danno della barriera emato-encefalica**, invece l'abbassamento del rapporto delle IgG è indice di **sintesi autoctona di Ig**.

#### ◆ **cloruri**

I valori liquorali sono in media il **20%** più elevati di quelli ematici (**125mEq/l**). Valori inferiori a **100 mEq/l** sono indice di infezione tubercolare, se è esclusa la natura batterica.

## ◆ acido lattico

Valori superiori a **35 mg/dl** sono indicativi di infezione batterica.



## ● **Ricerca di antigeni batterici solubili**

In alcune situazioni, la diagnosi eziologica di meningite batterica è resa difficile da alcune concause che determinano una **falsa negatività**, come si ha nel caso di una precoce ed incompleta terapia antibiotica che determina una **lisi batterica** nelle prime **12-18 h**. La diagnosi in questo caso può essere eseguita con la ricerca degli **antigeni** batterici liberati nel plasma. Questa metodica viene utilizzata per la ricerca dei polisaccaridi capsulari di ---

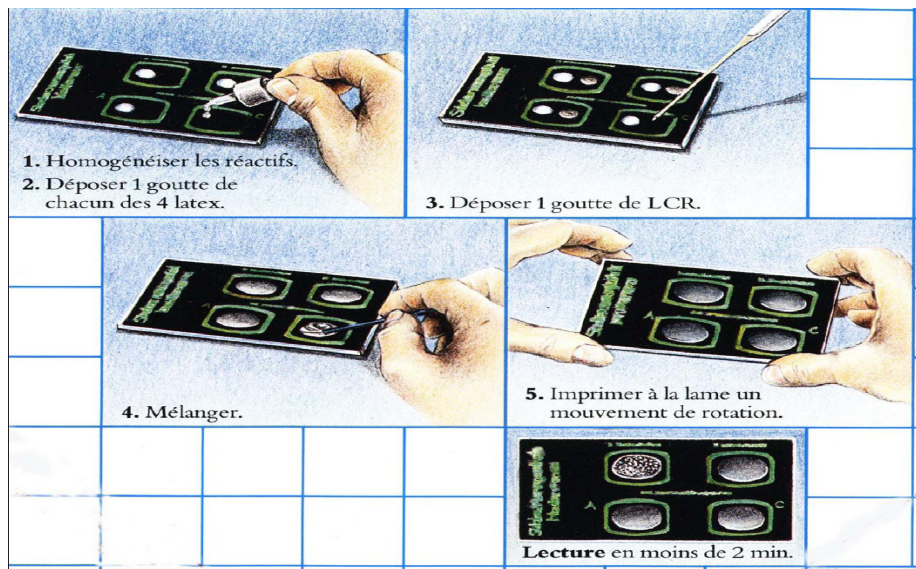
- ★ *Haemophilus Influenzae*
- ★ *Streptococcus Pneumoniae*
- ★ *Neisseria Meningitidis*
- ★ *C. Neoformans*

Le tecniche usate sono la **controimmunolettroforesi** e il **test di agglutinazione diretta**, che, per la facilità di esecuzione, è quello più usato.

## ◆ **Il test di agglutinazione diretta**

Si basa sul legame che si instaura tra la proteina A presente sulla superficie della maggior parte di *stafilococcus aureus* e la porzione **Fc (frammento cristallizzabile)** delle IgG, lasciando libero la porzione **Fab**, responsabile del legame con l'antigene. Facendo assorbire le IgG specifiche sulla superficie dello stafilococco (ceppo Cowan 1) in sospensione, è possibile, aggiungendo **una goccia** della sospensione ottenuta ad **1 gtt** di liquor, ottenere, in seguito alla interazione tra le IgG adsorbite sul batterio e gli antigeni contenuti nel liquor, l'**agglutinazione** degli stafilococchi, che è **visibile ad occhio nudo**.

La medesima cosa si può ottenere usando particelle di **lattice** con le IgG specifiche adsorbite sulla loro superficie (**agglutinazione al lattice**).



### *Meningite da Meningococco*

Il meningococco può dare ---

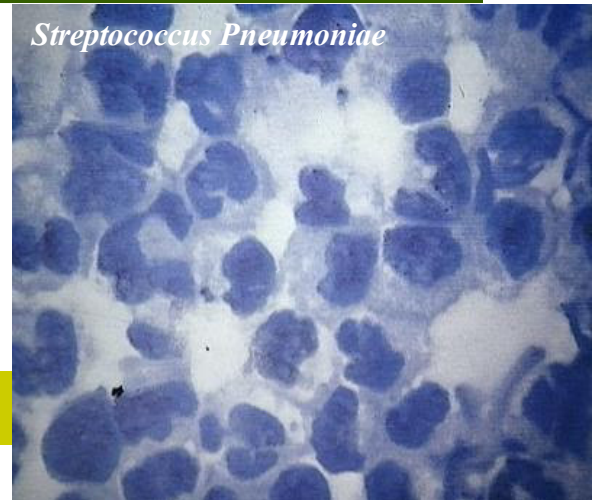
- ◆ *meningite*
- ◆ *meningite fulminante*
- ◆ *batteriemia occulta*

Sono stati identificati **10 sierogruppi** sulla base degli antigeni capsulari, in Italia sono definiti il sierogruppo **B** e **C**.

Sono **diplococchi gram-negativi**. All'esame del liquor, si osserva *ipoglicorachia* (40 mg/dl) e *pleiocitosi* (>10 leucociti a mm<sup>3</sup>).

Alla colorazione al **blu di metilene**, si osservano cocci blu scuro su sfondo grigio.

*Streptococcus Pneumoniae*



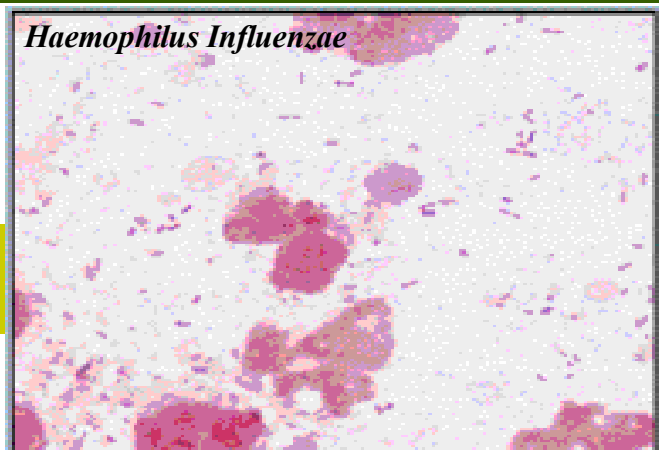
L'esame colturale si esegue su **agar cioccolato** incubato a 37°C in microaerofilia (5% di CO<sub>2</sub>).

### *Meningite da Haemophilus influenzae*

Sono definiti **6 sierotipi** in base ai polisaccaridi capsulari, da **A** ad **F**.

All'esame **microscopico**, alla colorazione con **blu di metilene**, si osservano coccobacilli blu scuro su sfondo blu-grigio.

*Haemophilus Influenzae*



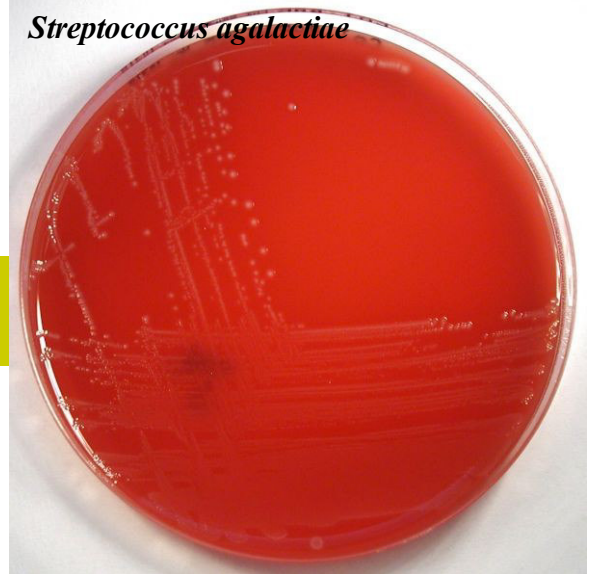


### **Meningite da *Streptococcus agalactiae***

Lo **streptococcus di tipo B** è la causa più comune di meningite del **neonato**, per trasmissione dalla madre al bambino. Si manifesta dopo la prima settimana di vita.

Il batterio *streptococcus agalactiae* è stato isolato dalle colture vaginali e rettali del **15-40%** delle donne gravide asintomatiche.

*Streptococcus agalactiae*



### **Meningite da *Listeria Monocytogenes***

*Listeria Monocytogenes*



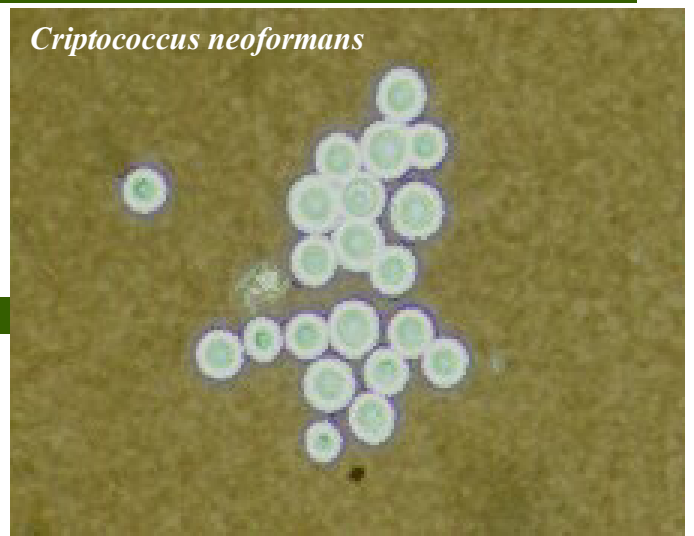
L'infezione da **listeria** è molto comune nei neonati in quanto le donne gravide possono ospitare il microrganismo, **senza sintomi**, nel tratto genitale o nel retto, trasmettendo così l'infezione durante il parto. Altre condizioni predisponenti sono ---

- ◆ *vecchiaia*
- ◆ *alcolismo*
- ◆ *pazienti affetti da neoplasie*
- ◆ *adulti immunodepressi*
- ◆ *pazienti con diabete mellito*
- ◆ *malattie epatiche*
- ◆ *insufficienza renale cronica IRC*

### **Meningite da *Criptococcus Neoformans***

*Criptococcus neoformans* colpisce per lo più persone immunocompromesse. E' un fungo diffuso nell'ambiente ed associato agli **escrementi degli uccelli**, può essere anche rinvenuto nel **latte, nella frutta, nei vegetali** e nella **sporcizia**.

*Criptococcus neoformans*



### **Meningite da *Candida albicans***

E' **rara** e colpisce per lo più persone con alterate difese immunitarie. La meningite da **candida** colpisce meno del **15% dei pazienti**, e tra tutte le specie **Candida albicans** è sicuramente quella più isolata.

## Real Time PCR

La *real time PCR (RT-PCR)*, detta anche *quantitative real time PCR (QRT-PCR)* o anche *kinetic PCR (K-PCR)* è una tecnica di biologia molecolare utilizzata per **amplificare** e simultaneamente **quantificare** una specifica sequenza di una data molecola di **DNA**. E' utile per determinare se una data **sequenza** è o meno presente nel campione, ed anche il **numero** di copie presenti. E' derivata dalla *quantitative PCR (Q-PCR)* che a sua volta deriva dalla *PCR* standard.

La procedura segue il meccanismo della PCR, ma il DNA è **quantificato** dopo ogni *round* di amplificazione ed in ciò consiste la definizione di PCR in *tempo reale*. I due metodi più comuni per quantificare le molecole di DNA ottenute in seguito alla amplificazione sono ->

-> uso di **molecole fluorescenti** che si intercalano nella doppia elica delle molecole di DNA

-> l'uso di **sonde oligonucleotidiche** che emettono **fluorescenza** quando si *ibridizzano* con sequenze complementari di DNA

Frequentemente la **RT-PCR** è combinata con la *trascrizione inversa* di campioni di **mRNA** in **cDNA** da amplificare nella reazione per quantificare la presenza di *piccole* quantità di RNA in campioni di cellule o tessuti, o per quantificare l'espressione del o dei **geni** di interesse in un *tempo particolare* o in una *particolare cellula* o *tessuto*.

## Introduzione

Le cellule di tutti gli esseri viventi regolano le proprie specifiche attività **attivando** od **inattivando** geni specifici. L'espressione genica corrisponde al numero di **copie** di **mRNA** presenti nella cellula in questione ottenute per *trascrizione* dal gene in questione.

Tradizionalmente, l'ammontare di un particolare **mRNA** prodotto da una cellula o tessuto veniva valutato mediante una tecnica conosciuta come *northern Blotting* ovvero l'RNA, isolato e separato mediante *elettroforesi su agarosio*, veniva marcato utilizzando **sonde di DNA** specifiche per il gene di cui si voleva valutare l'espressione, quindi il numero di molecole di mRNA da esso derivate. Tuttavia questa tecnica richiede un **largo ammontare** di molecole di RNA.

Per valutare l'espressione genica in una singola cellula, o in un piccolo numero, è necessaria una **certa amplificazione** del materiale da valutare. La **PCR** è una tecnica utilizzata per amplificare sequenze di DNA, ma può anche essere utilizzata per amplificare sequenze di mRNA previa *trascrizione inversa* delle sequenze oggetto dell'esame in **cDNA (DNA complementare)**, che viene successivamente amplificato mediante la reazione standard della PCR.

## PCR – concetti generali

Il punto di partenza della PCR è un DNA a doppia elica contenente la **sequenza** da amplificare, e due **primer oligonucleotidici** complementari per piccoli tratti di DNA che fiancheggiano la sequenza da amplificare stessa. I primer sono di solito lunghi **20** nucleotidi. Dopo di ciò, ottenuti





tutti i reagenti, si svolge il processo della PCR, in cui ogni ciclo di amplificazione è dato dalle seguenti tappe ->

-> **denaturazione** del DNA incubandolo alla T di **94-95°C**.

-> **raffreddamento** del campione ad una T tra i **36** e i **65°C** per permettere l'**appaiamento** dei **primer** sui filamenti opposti del DNA stampo, all'**estremità** della sequenza da amplificare.

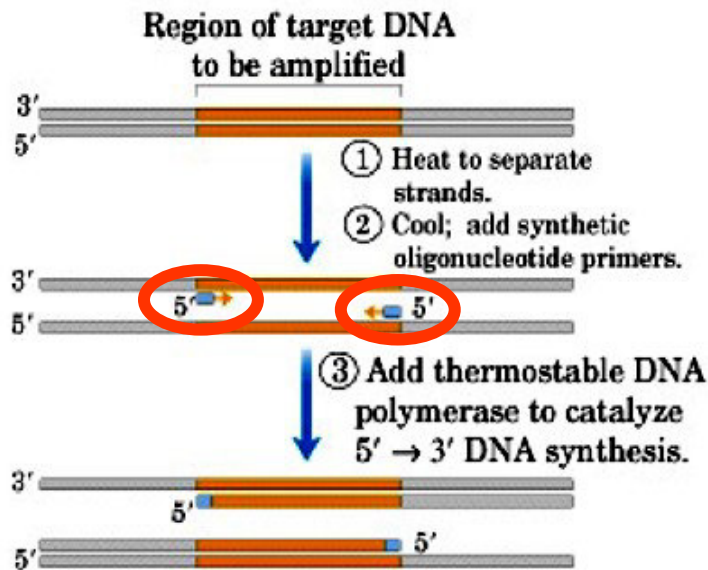
Le estremità **3'** dei primer si fronteggiano ->



-> **estensione** dei primer mediante la **DNA polimerasi** termo resistente **TAQ**, alla T di **70-75°**

-> **ripetizione** del ciclo di **riscaldamento** e di **raffreddamento** per associare di nuovo i primer e ripetere l'**estensione** mediante la **TAC-polimerasi**. Cicli ripetuti di **denaturazione**, **annealing** ed **estensione** permettono di ottenere un **aumento geometrico** dei prodotti della reazione, pari a ->

$$P \rightarrow 2^n \quad \text{dove } n \text{ è il numero dei cicli.}$$



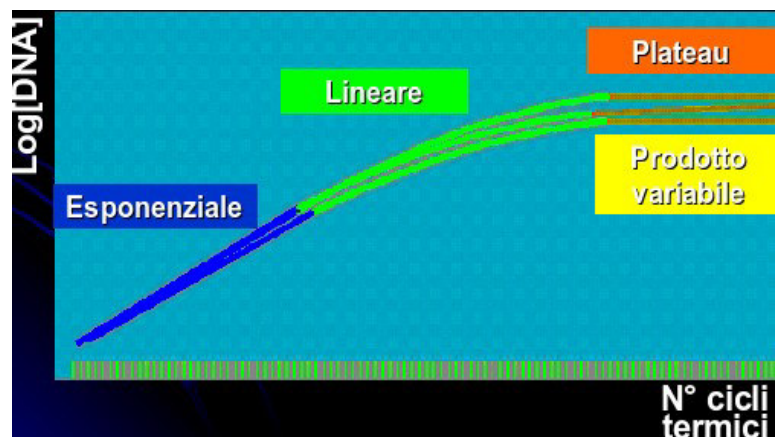
La **procedura** è rapida e dura solo pochi minuti, utilizzando un **termociclatore** si ottiene una PCR in poco tempo e automaticamente.

Il processo di duplicazione del DNA non procede all'infinito ma giunge ad una quantità max di prodotto, detta **effetto plateau**, determinato da ->

-> **quantità dei primers**

-> **attività della TAQ polimerasi**

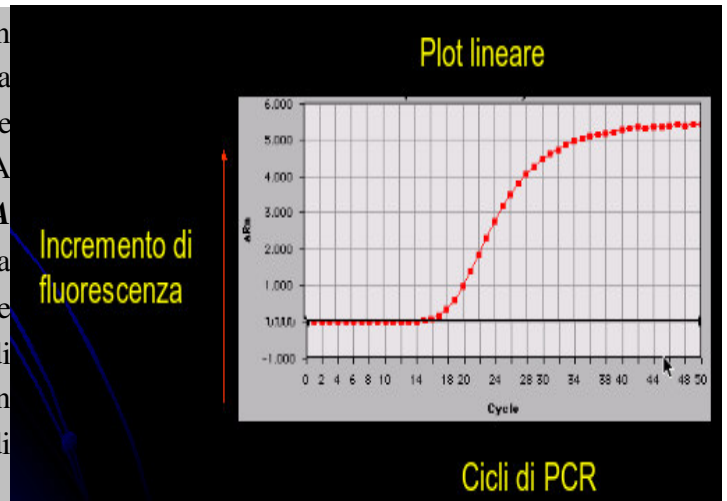
-> **re-annealing (ri-accoppiamento) dei filamenti.**



## Real Time PCR – meccanismo

La **Real Time PCR** misura in tempo reale l'**amplificazione** del DNA, durante la fase **esponenziale** della PCR, ovvero quando l'**efficienza** di reazione è influenzata solo minimamente dalle **variabili di reazione**, permettendo così di ottenere risultati ben più accurati rispetto alla PCR end-point tradizionale.

La quantificazione del prodotto di amplificazione in tempo reale avviene mediante la misurazione della **quantità di fluorescenza** generata che è direttamente proporzionale al numero di molecole di DNA amplificate nella reazione (sia che si parta da **mRNA** che da **DNA**). Questo è possibile introducendo nella miscela di reazione una **molecola fluorescente** che legandosi in misura proporzionale alle molecole di DNA amplificate, dà la possibilità di seguire da un punto di vista **visivo** la reazione grazie all'ausilio di specifici **software**

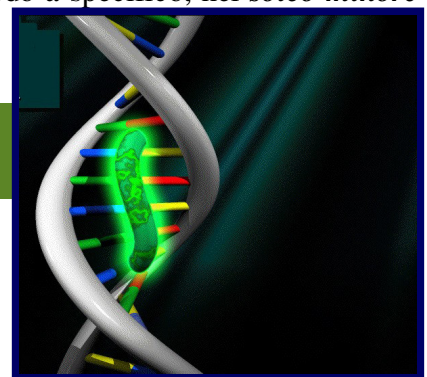


La **fluorescenza** si genera durante la reazione PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche. Principalmente, le chimiche sono basate o sul **legame di molecole fluorescenti**, come il **SYBR Green**, che si intercalano nella doppia elica del DNA, o utilizzando **sonde oligonucleotidiche**, come le **sonde Taqman**, specifiche per la sequenza che viene amplificata nella reazione.

## SYBR Green

Il **SYBR Green** è una molecola fluorescente che si intercala, in modo a-specifico, nel **solco minore** delle molecole di DNA a doppia elica (**dsDNA**).

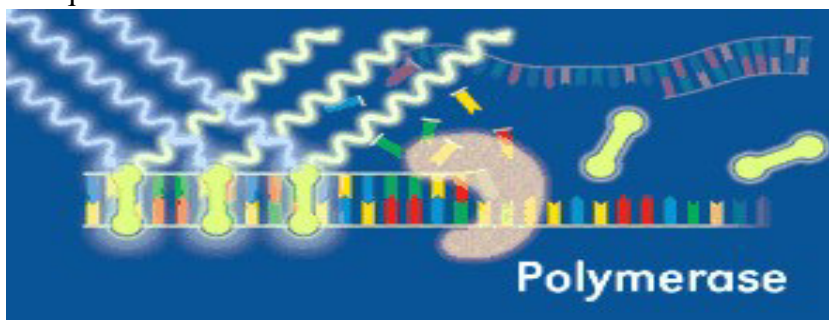
All'inizio del **processo di amplificazione**, la miscela di reazione contiene -> **DNA denaturato**, **primers** e la **mol. fluorescente**.



Dopo l'appaiamento (**annealing**) dei primers si legano solo **poche molecole di SYBR Green**



Durante la *elongazione* della doppia elica si ha un aumento di molecole fluorescenti che si legano al **dsDNA**, incrementando la quantità della fluorescenza, e mano mano che la reazione procede, col formarsi in senso *esponenziale* di un numero sempre maggiore di molecole di **dsDNA** si ha un aumento *proporzionale* delle molecole legate e quindi -> della **fluorescenza**



Tuttavia, l'uso di queste **molecole**

**fluorescenti** comporta degli aspetti negativi ->

-> la **molecola fluorescente** si lega in maniera *non-specifica e random* a qualunque doppia elica di DNA, includendo anche i *primers* appaiati fra loro, e ciò porta ad una erronea *sovrastima* della quantità di DNA prodotto nel corso della amplificazione.

Gli **aspetti positivi** dell'uso del **SYBR Green** consistono in ->

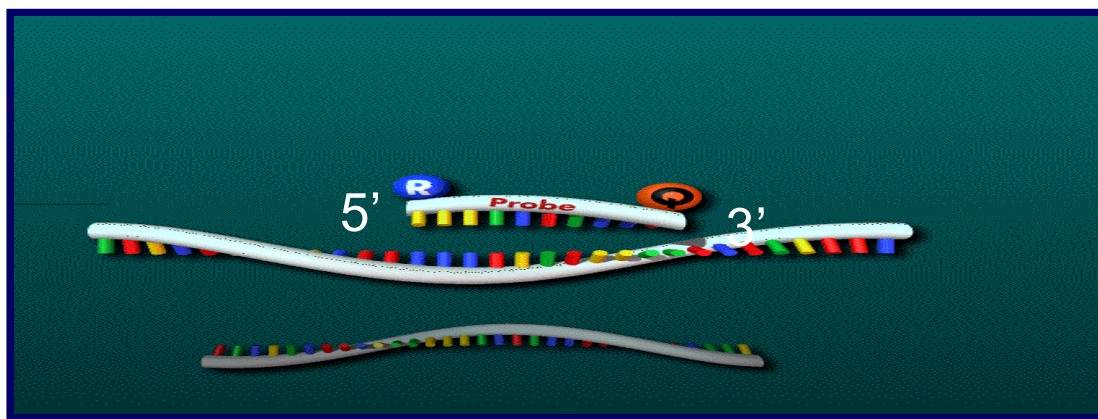
-> **semplicità di utilizzo**

-> **economicità** della procedura.

### Sonde TaqMan

Sono sonde ad *ibridazione* specifiche per il frammento di DNA di interesse e marcate con coloranti fluorescenti.

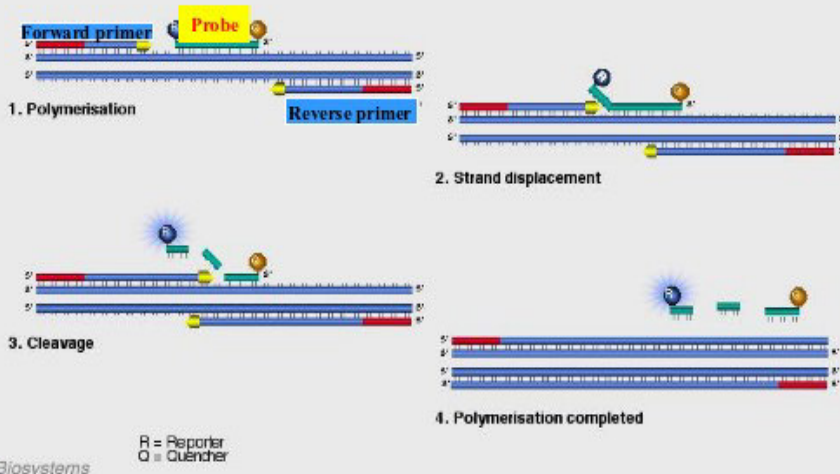
La **sonda Taqman** è un oligonucleotide disegnato per essere *complementare* alla sequenza bersaglio da amplificare nella PCR ed è progettata in modo da ibridarsi all'interno della sequenza bersaglio.



Presenta alla estremità **5'** un *fluoroforo* detto **reporter** e alla estremità **3'** una molecola detta **quencher**. Il **reporter** emette fluorescenza, che viene annullata dall'azione del **quencher**, solo quando le due molecole sono posizionate ad una certa distanza tra loro, ovvero quando sono **legate** all'estremità della **sonda taqman integra** (che in genere è lunga **20-25 bp**). Il **quencher** spegne la fluorescenza del **reporter** in quanto **assorbe i fotoni** da esso emessi.



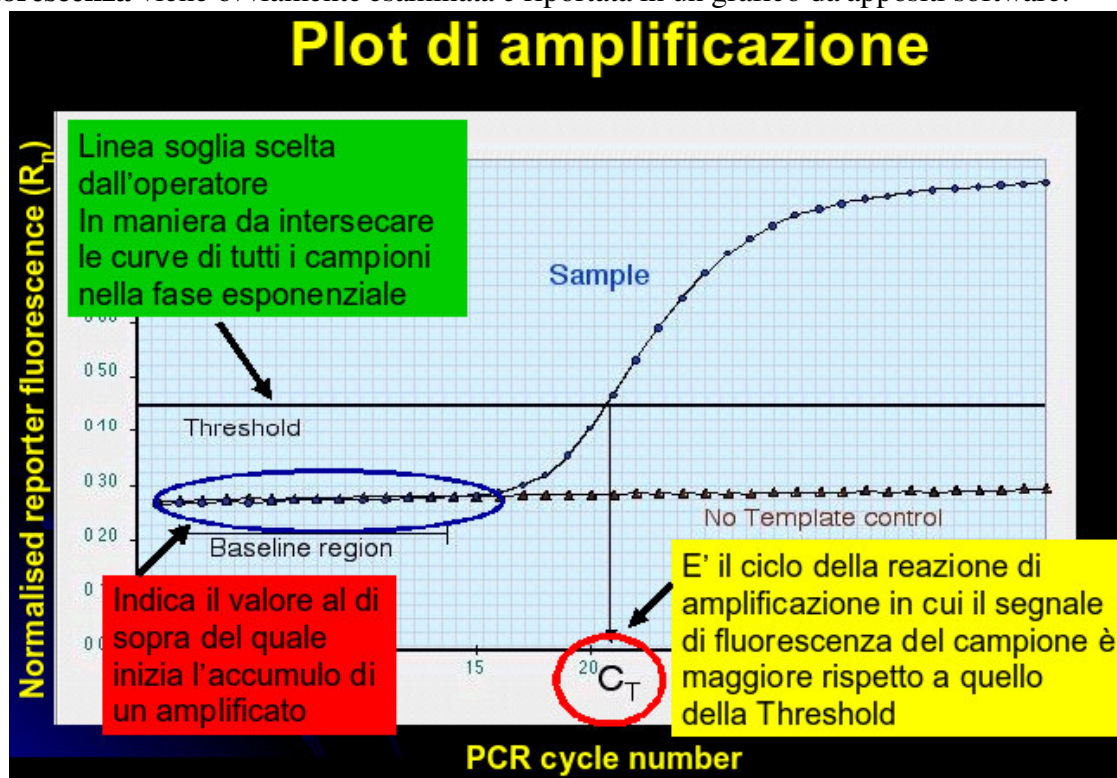
## Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan<sup>®</sup> chemistry)



Nella miscela di reazione, la **sonda taqman** durante il processo di **annealing** dei primers si va ad appaiare sulla sequenza complementare nel **DNA da amplificare**, analogamente a quanto fanno i primers. Nel successivo processo di **estensione**, la **TAQ**, essendo anche una **5'-3' esonucleasi**, è in grado, nel trovarsi la **sonda** legata al DNA, di **degradarla**.

La **distruzione** della sonda **Taqman** separa la molecola **reporter** dal **quencher**, permettendo così il **manifestarsi** della **fluorescenza**. La fluorescenza si accumula **ciclo dopo ciclo** in quanto **aumenta** la quantità di **sonda** tagliata, che è ovviamente proporzionale al numero di molecole di DNA risultato di ogni **ciclo di amplificazione della PCR**.

La **fluorescenza** viene ovviamente esaminata e riportata in un grafico da appositi software.



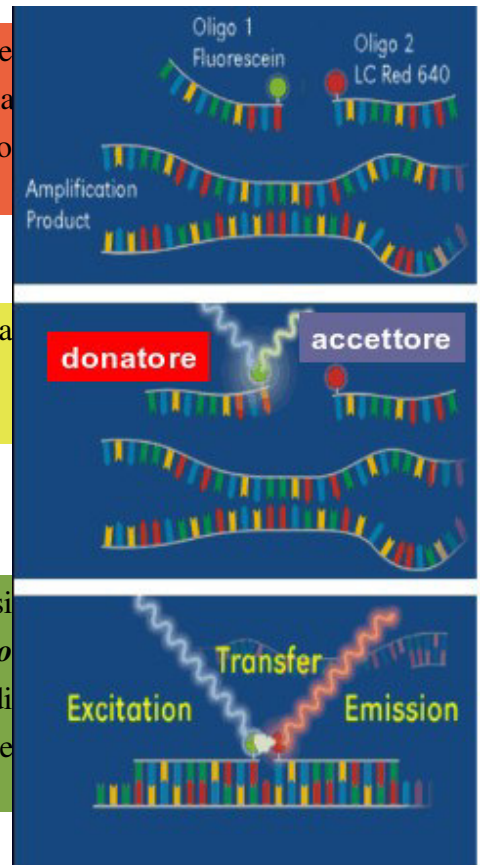
In **rosso** è indicata la **linea base**, in **giallo** è indicato il **ciclo soglia** e in **verde** è indicata la **linea soglia**, scelta dall'operatore e detta anche **threshold**.

## Le sonde FRET

Sono simili alle **taqman** perché si legano al DNA bersaglio e vengono poi **idrolizzate**. Sono però presenti **2** sonde ciascuna marcata con **un solo fluorocromo**, uno detto **accettore** e l'altro **ricevente**.

Quando le sonde **non sono legate** alle sequenze bersaglio, la fluorescenza proveniente dall'**accettore** non è rilevata.

Durante il processo di **annealing** della **PCR**, le sonde **FRET** si **ibridizzano** alle sequenze bersaglio e ciò **avvicina** il **fluoroforo** donatore a quello accettore, permettendo il **trasferimento** di **energia** tra i due e determinando la produzione di un segnale fluorescente dall'accettore che viene rilevato.





# Proteine del Siero e del Plasma

## Generalità

Le proteine del plasma rappresentano un gruppo **eterogeneo** di proteine, ciascuna delle quali possiede una specifica **funzione** o raggruppa in sé un **insieme di funzioni**. La concentrazione delle proteine del sangue varia in diverse condizioni **fisiologiche** e **patologiche**. La sintesi di ogni proteina è sotto **stretto** controllo **genico** e la sua **conc. plasmatica** varia da pochi **microgrammi** ad alcuni **grammi per litro**. I metodi di separazione delle proteine dal plasma e tra di loro si basano sulle caratteristiche **chimiche**, sugli aspetti **molecolari** e **fisici** delle proteine da separare, e sulla loro **funzione**.

## Metodi di Analisi

I *metodi di analisi* si possono distinguere in ->



## ->Precipitazione frazionata mediante sali

Si basa sulla **diversa solubilità** che le proteine hanno in acqua o altri solventi per separarle dalla **soluzione**. Le proteine in una soluzione possono **precipitare** per effetto di agenti denaturanti ->

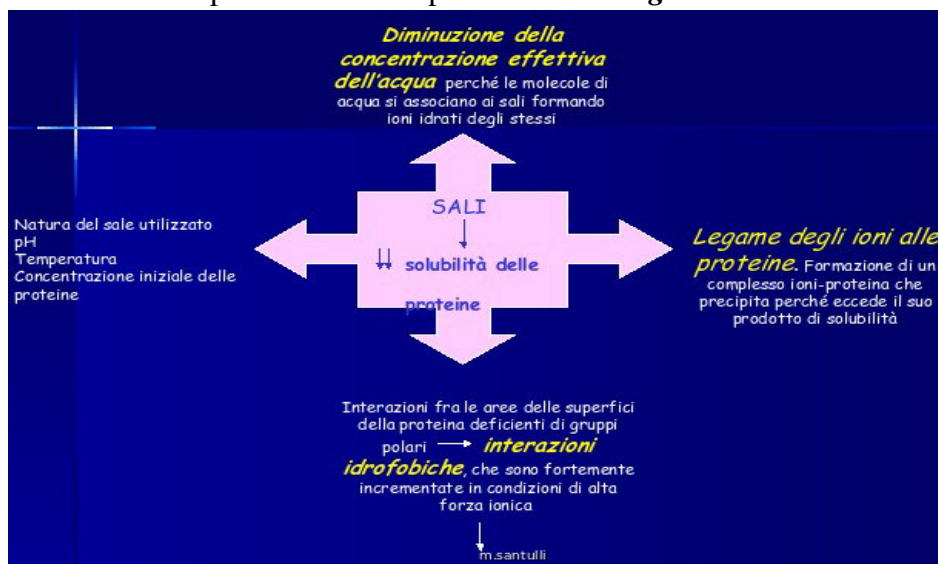
-> **calore**

-> **acidi forti**

-> **Sali di metalli pesanti**

Dopo che si è avuta la **precipitazione** delle proteine nella soluzione, esse vengono separate dalle altre sostanze in essa presenti mediante **centrifugazione** o **filtrazione**.

Se le proteine **non** devono essere **denaturate**, si usa il processo detto della **salatura**. Si aggiunge alla soluzione o alla sospensione proteica un quantitativo di **sali** progressivamente maggiore per ottenere la precipitazione di alcune componenti proteiche, in quando la **solubilità** delle proteine è influenzata dalla **presenza di sali**. Il sale più utilizzato nel processo di **salting out** è il **solfato di ammonio**.



Nella precipitazione con **solfato di ammonio**, si misura la concentrazione del sale come ->

-> **percentuale di saturazione** (è satura una soluzione con **4.05 M** di sale in acqua a **20°C**)

Si ottiene la seguente composizione delle proteine del sangue, espressa in percentuale ->

-> **albumina il 60%**

-> **globuline il 33%**

-> **fibrinogeno la frazione rimanente**

Il rapporto albumina e globuline deve essere **> 1**, in genere compreso tra **1,4 e 1,7**.

### ->Precipitazione frazionata mediante solventi organici

Si può ottenere la precipitazione frazionata delle proteine utilizzando **solventi organici** come ->

-> **alcoli, acetone e diossano**.

I solventi determinano la **disidratazione** delle molecole proteiche e la loro **aggregazione**. Il processo deve essere svolto a **bassa temperatura** e in un ambiente in grado di assorbire il **calore** sviluppantosi in seguito all'assorbimento del solvente organico con l'acqua (**bagno di ghiaccio**).

### ->Frazionamento secondo Chon

Si ottiene mediante l'aggiunta di **alcool etilico** a diverse temperature, variando la **concentrazione** di alcool e la temperatura si ottiene la precipitazione frazionata delle singole componenti proteiche del siero in **V frazioni**, che si ottengono incrementando mano mano la concentrazione del solvente ->

-> **frazione I fibrinogeno (a basse concentrazioni di solvente)**

-> **frazione II gammaglobuline**

-> **frazione III betaglobuline**

-> **frazione IV transferrina**

-> **frazione V albumina (ad alte concentrazioni di solvente)**

### ->Sedimentazione

E' possibile separare le proteine del siero in base al loro **peso molecolare** utilizzando la tecnica della **ultracentrifugazione**. Il **coefficiente di sedimentazione** è definito come la velocità di sedimentazione in un **campo di forza unitaria** (la **forza centrifuga** della **ultracentrifugazione**) e **dipende** da ->

-> **massa della molecola;**

-> **forma della molecola;**

-> **densità e dimensioni della molecola;**

-> **densità e viscosità del mezzo circostante.**

La **velocità** di sedimentazione di una molecola è proporzionale alla sua massa, ma una molecola più **densa** sedimenta più velocemente di una molecola meno densa a parità di densità del mezzo circostante. Il **coefficiente di frizione** della molecola col mezzo **aumenta** procedendo dalla forma **ellissoide** a quella a **bastoncino** o a **sigaro**.

### ->Migrazione elettroforetica delle proteine

Il termine **elettroforesi** indica il movimento di ioni o di molecole cariche sotto l'influenza di un **campo elettrico**. I gruppi **amminico** e **carbossilico** in soluzione acquosa sono fortemente ionizzabili

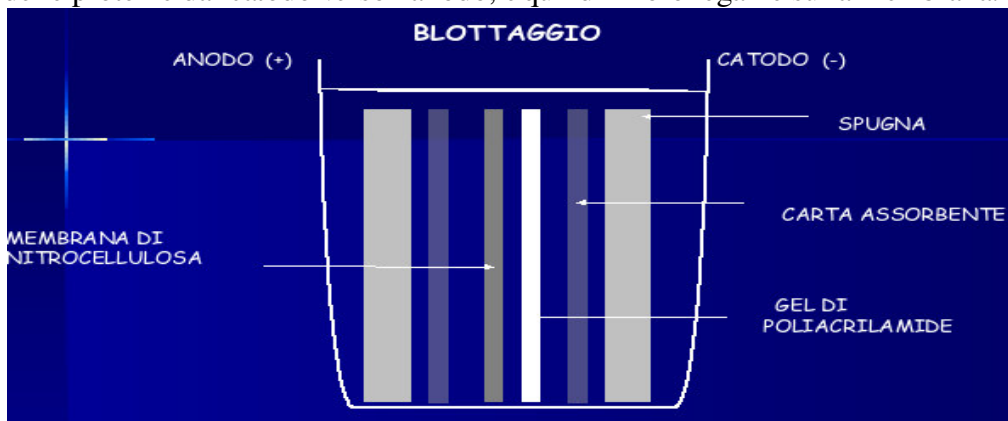
nei gruppi -> **R-NH<sup>3+</sup>** e **R-COO<sup>-</sup>**.

L'elettroforesi permette di ottenere la separazione delle proteine sulla base del peso molecolare facendo *correre* piccole quantità di campione contenenti le proteine da separare in *gel denaturante* di *poliacrilammide* o di *agarosio*, sottoposte ad un campo elettrico per un certo periodo di tempo. Le proteine, essendo cariche *negativamente* in soluzione acquosa a pH fisiologico, si spostano dal catodo all'anodo con una *velocità* tanto minore quanto maggiore è il loro **PM**.



**->Western Blot**

E' una tecnica che permette l'individuazione di una specifica proteina all'interno di un campione. Dopo aver ottenuto la *separazione delle proteine* del campione mediante **elettroforesi**, si devono trasferire le proteine dal gel su un supporto rigido come una **membrana** di *nitrocellulosa* o di *nylon*. Ciò avviene all'interno di una *camera umida* esposta ad un wattaggio costante che permette il lento passaggio delle proteine dal catodo verso l'anodo, e quindi il loro legame sulla membrana.



Dopo di ché si procede alla *individuazione della proteina* utilizzando metodi immuno enzimatici ->

**INCUBAZIONE CON ANTICORPO PRIMARIO E SECONDARIO E SVILUPPO**

<p><b>Y</b> ANTICORPO PRIMARIO</p> <p><b>Y</b> ANTICORPO SECONDARIO</p> <p><b>●</b> PEROSSIDASI</p> <p>La perossidasi, con la quale l'anticorpo secondario è coniugato, determina la degradazione ossidativa del Luminol e l'emissione di luce, che impressiona una lastra</p>	<p><b>Y</b> ANTICORPO PRIMARIO</p> <p><b>Y</b> ANTICORPO SECONDARIO</p> <p><b>◆</b> FOSFATASI ALCALINA</p> <p>La fosfatasi alcalina, con la quale l'anticorpo secondario è coniugato, determina la precipitazione di un substrato (BCIP) e la formazione di aggregati, visibili con l'utilizzo di un colorante (NBT)</p>
--	--

## ->Diafanizzazione

I tracciati elettroforetici vengono letti mediante la *scansione fotodensitometrica* delle singole bande trasferite su membrana di cellulosa. Il tutto viene convertito in un grafico con i picchi della curva di **base** e di **altezza** variabili e proporzionali all'**ampiezza** ed all'**intensità** della zona separata e colorata. Evidenzia solo **variazioni qualitative** delle proteine del siero in quanto l'altezza del picco non corrisponde perfettamente alla quantità delle proteine, in quanto ogni colorante usato ha **diversa affinità** per le proteine in questione. Inoltre la proteina che contribuisce ad una data frazione non è la sola che migra in quella zona.

Attualmente, la elettroforesi delle proteine su **acetato di cellulosa** o su **gel di agarosio** permette una ottima risoluzione e la divisione delle proteine in **7 bande elettroforetiche**.



## **Significato Clinico delle proteine plasmatiche**

Le proteine del sangue si possono dosare sia su **plasma** che su **siero**, anche se per problemi di strumentazione automatica il dosaggio per lo più si effettua su siero.

**Gli intervalli di riferimento** per le proteine del siero sono compresi tra **60 ed 84 g/l**.

I **valori sierici** non sono costanti per tutta la vita. Alla **nascita** la quantità delle proteine tot. è di **55 g/l** ed il **rapporto albumina/globuline** è **alto (2,10)**. Le concentrazioni sieriche delle proteine si mantengono **più basse** nei bambini e nelle donne rispetto agli uomini adulti. Oltre all'**età** e al **sexo** anche altri fattori possono far variare la concentrazione delle proteine sieriche, come **variazioni stagionali** o dopo **esercizio fisico**.

I **livelli plasmatici fisiologici** delle proteine dipendono dalla sintesi, dal catabolismo, dalla diminuzione nei vari compartimenti corporei e da perdite esterne. Le **plasma proteine** vengono sintetizzate principalmente dal **fegato**. Alla sintesi contribuisce anche l'**intestino** per le **lipoproteine** e i **monociti/macrofagi** per alcuni **fattori del complemento**. Il **metabolismo** delle proteine è rapido e continuo, giornalmente vengono rinnovati il **9%** delle proteine sintetizzate dal fegato e il **10-25%** di quelle circolanti. In condizioni **fisiologiche**, la perdita di proteine avviene attraverso l'apparato gastro

enterico, ghiandole esocrine, respiratorio e poco il rene (per le proteine a basso PM in piccole q.tà).

### Proteine della banda della pre-albumina

#### Prealbumina

E' la frazione che migra più velocemente ed è posta oltre l'albumina. E' presente nel plasma ma anche nel *liquor*, dove, essendo la concentrazione tot. delle proteine minore, è una dei *maggiori* componenti. La prealbumina può legare la *tiroxina*, e per questo è detta *tiroxin-binding prealbumin TBPA* e lega anche la proteina legante il retinolo (*vitamina A*) ovvero *retinol-binding protein RBP*. La sua concentrazione **diminuisce** nei casi di **deficit nutrizionali proteici**, lesioni **epatiche** (infatti è sintetizzata nel **fegato**, oltre che nella retina e in altri tessuti) e nel **diabete**. E' una **proteina della fase acuta**.

### Proteine della banda della albumina

#### Albumina

Rappresenta la banda più *stretta, intensa ed omogenea*. E' una proteina a basso PM, a singola catena polipeptidica. Ha forma *ellissoide asimmetrica* stabilizzata da **17** ponti S-S. E' sintetizzata come *precursore* di **24 aa**, avente un peptide segnale che viene rimosso prima della secrezione della proteina nel plasma. E' un ottimo *indicatore della funzionalità epatica*.

E' una **proteina di trasporto** (a bassa *specificità* ed *affinità* e *ampia capacità*) per farmaci, ormoni, ioni, piccole molecole. Inoltre contribuisce per la maggior parte della **pressione oncotica** del plasma.

-> Si osserva **IPOALBUMINEMIA** per

**Ridotta produzione da parte del fegato** in corso di *epatopatie gravi, emocromatosi epatiti croniche, epatopatie da farmaci e cirrosi*.

**Accumulo di liquido ascitico** nella cavità peritoneale in corso di *ipertensione portale*, un trasudato che ha origine dal peritoneo per blocco della circolazione linfatica per la presenza di *processi fibrotici* a carico del fegato cirrotico, in cui la specie proteica più rappresentata è proprio l'*albumina*.

**Ridotto apporto di proteine con la dieta**, in tutti i casi di *malnutrizione* o nella *anorressia nervosa* o nella *cachessia*, ovvero deperimento organico, che si accompagna a tutti gli *stati infiammatori cronici* o alle *neoplasie maligne* ed è causato dalla anorressia e dal consumo di metaboliti dalle cellule tumorali.

**Stati di iponutrizione** in corso di *malassorbimento* (sprue tropicale, morbo celiaco) per malattie della *mucosa intestinale*, tra cui anche le mal. infiammatorie croniche.

**Eccessiva perdita di proteine** a livello renale nelle *nefropatie* accompagnate da proteinuria, nelle ustioni e nelle *enteropatie protido-disperdenti*. Nella *sindrome nefrosica* il passaggio di proteine nel filtrato glomerulare va da un minimo di **2-3 g/die** nelle fasi iniziali ad un massimo di **20-30 g/die**. Proteinuria si riscontra anche nella *nefropatia diabetica* (**1 g/die**), nelle fasi iniziali è così bassa che non è riscontrabile con le normali tecniche elettroforetiche. In questi casi, è utile la determinazione della **microalbuminuria**

**Nella proteinuria ortostatica**, una anomalia benigna presente negli *adolescenti*. Le perdite proteiche cessano durante la notte.

**Perdita di proteine** attraverso la *cute ustionata*, per perdita della sua funzione di



barriera contro *fluidi* e *soluti*.

**Perdita di proteine** da aree di *mucosa* intestinale *infiammata* o *erosa*.

-> **Si osserva ANALBUMINEMIA**

In una **rara condizione ereditaria** in cui non si ha sintesi di albumina. I soggetti presentano la *protidemia totale* diminuita. Dal punto di vista clinico la **situazione è silente** in quanto entrano in azione meccanismi di **compenso** che mantengono l'equilibrio idrico tra i vari compartimenti pur **senza** l'apporto della albumina.

-> **Si osserva BISALBUMINEMIA**

**Nelle condizioni ereditarie** in individui *eterozigoti* per due varianti codominanti del gene dell'albumina, codificanti per due proteine con *mobilità elettroforetica* diversa o più lenta (*variante slow*) o più veloce (*variante fast*). Esistono oltre **20** varianti, tutte dovute alla **sostituzione** di un singolo aa che porta ad un *cambiamento della carica complessiva della molecola*. La condizione è *benigna*.

**Nelle condizioni acquisite**, per legame alla albumina di *piccole molecole cariche* che altera la mobilità elettroforetica della proteina determinando la comparsa di **due bande**.

La banda anomala aumenta all'aumentare della concentrazione della molecola, fino alla saturazione, dove tutta la banda dell'albumina è sostituita con quella anomala. L'**effetto è reversibile** mano mano che il farmaco è eliminato dal circolo. Si osserva in corso di terapia con *penicillina* o con i suoi *derivati*.

**In corso di iperbilirubinemia**, con formazione di legami *covalenti* tra la bilirubina diretta e l'albumina (detta *bilirubina delta*), che *accelera* la migrazione dell'albumina e causa un *allargamento* della banda verso l'anodo. L'albumina può anche legare la bilirubina *non coniugata*, agendo come meccanismo di difesa contro il *kernicterus*, detto ittero nucleare che si può verificare nella mal. *emolitica del neonato* o nell'*ittero neonatale* per la incompleta maturazione degli enzimi di coniugazione epatici.

Quando viene raggiunta la *saturazione*, la bilirubina può *depositarsi* nel tessuto nervoso del neonato. L'*albumina* quindi **tampona** variazioni di concentrazione della bilirubina libera dovute ad un aumento della bilirubina totale.

**In corso di diabete**, quando l'iperglicemia sussiste per periodi di tempo prolungato, l'albumina può venire *glicosilata* in circolo mediante meccanismi *non-enzimatici*.

### **Proteine della Banda alfa-1**

#### **Alfa1-Antitripsina**

E' una *glicoproteina* sintetizzata nel **fegato** come forma immatura, contenente una sequenza segnale che viene rimossa prima della secrezione nel plasma. E' un *inibitore delle proteasi*, quali **tripsina**, **chimotripsina**, **trombina**, **proteina C attivata**, **fattore XI** e **fattore XIII** della coagulazione. Durante processi infiammatori, i leucociti rilasciano nei tessuti una grande quantità di *enzimi proteolitici* che, se lasciati agire liberamente, produrrebbero **gravi danni** alle strutture circostanti.

-> **Si osserva deficit di alfa1-ANTITRIPSINA**

**Nelle condizioni ereditarie**, in cui si può avere l'insorgenza di *enfisema*. Fumo e altri irritanti inducono il rilascio di *enzimi proteolitici nei polmoni* che se non sono inibiti

dalla AAT causano *considerevoli danni* al parenchima polmonare -> **enfisema**.

**Nella cirrosi epatica** si può avere il deficit di AAT in quanto il fegato è la principale sede di **sintesi** della proteina, determinando una condizione patologica **grave**.

Il **deficit di AAT** può essere sospettato qualora non sia presente alcuna banda proteica nella regione **alfa-1** dopo la migrazione elettroforetica delle proteine sieriche.

La **proteina normale** di AAT è definita **M**, mentre quella variante associata al deficit è detta variante **Z**, mentre esiste una terza variante detta **S** che è associata a **ridotta** produzione di AAT. Nel deficit congenito, gli individui sono **omozigoti ZZ**, mentre individui **MZ** sono del tutto normali dal punto di vista clinico.

L'AAT è una **proteina di fase acuta** che aumenta nel siero dei pazienti in corso di reazioni **infiammatorie** e **stress fisici** come **traumi**, **interventi chirurgici** o altre patologie acute.

### **Alfa1-Antichimotripsina**

E' una **glicoproteina** che inibisce la **chimotripsina pancreatica** e protegge l'organismo da processi infiammatori e da danni tissutali e **modula la risposta immune** proteggendo da reazioni allergiche. Uno **sdoppiamento** della **banda alfa1** si può avere per aumento della **alfa1-fetoproteina** che è indice dopo il secondo anno di vita, di **epatiti evolutive** e di **carcinoma epatico**.

### **Proteine della Banda Alfa2**

#### **Alfa2-Macroglobulina**

E' una **glicoproteina** sintetizzata dal **fegato** ed è un **inibitore specifico** di proteasi plasmatiche. La sua concentrazione elevata nel siero fornisce ad esso una notevole **capacità di inibizione** verso le proteasi rilasciate in seguito a **stimoli infiammatori** o a **danni tissutali**, che altrimenti eserciterebbero una azione litica troppo lunga. Aumenta anche nelle **epatopatie**.

L'**alfa2-Macroglobulina** ha un elevato **PM**, circa **800'000 D**, che la colloca al secondo posto per grandezza dopo le **IgM**, per cui essa, anche nelle nefropatie più gravi, **non viene mai persa con le urine**.

#### **Aptoglobina**

E' una **glicoproteina** la cui funzione è quella di legare l'**Hb** rilasciata in circolo in seguito a **lisi intravascolare degli eritrociti**. Il complesso **aptoglobina-Hb** viene captato dalle cellule del sist. **reticolo endoteliale** che recuperano il **Fe** per riutilizzarlo. Ogni molecola lega **due molecole di Hb**. La concentrazione di **aptoglobina** aumenta dalla nascita fino all'età adulta. In caso di **emolisi** grave, i livelli di **aptoglobina** plasmatica si riducono rapidamente. L'**aptoglobina** non si lega alla mioglobina, per cui i suoi livelli rimangono invariati in caso di **rabdomiolisi** o anche gravi **mioglobinurie**.

Esistono diverse **varianti** di aptoglobina ->

-> il **tipo 1-1** che ha **2 catene leggere** e **2 catene pesanti** legate da **ponti disolfuro**.

-> il **tipo 2-2** che per un fenomeno di **uplicazione genica**, codifica per una proteina a catena leggera **doppia**, che può a sua volta legare altre **catene leggere** sino alla formazione di **polimeri di aptoglobina** di anche notevoli dimensioni

-> un soggetto **eterozigote** per i due tipi di catena leggera, è detto **tipo 1-2**, e possiede polimeri di **aptoglobina** di dimensioni diverse da quelli presenti nei soggetti con **tipo 2-2**.

La **determinazione** della concentrazione della **aptoglobina** veniva effettuata misurando la capacità di

legame alla **Hb**, oggi viene effettuata con metodi *nefelometrici* con anticorpi *anti-aptoglobina*.  
E' anch'essa una *proteina della fase acuta* che aumenta nel corso di patologie acute.

### **Ceruloplasmina**

E' una *glicoproteina* ed la maggiore responsabile del *trasporto del rame*. La regolazione della sua *sintesi epatica* è dipendente dalla concentrazione di **Cu** in circolo. Ogni molecola è in grado di legare fino a **6 atomi** di rame. La **riduzione** dei livelli di *ceruloplasmina* si osserva nel **morbo di Wilson**, caratterizzato da elevati *depositi tossici* di Rame nel **cervello**, nel **fegato** e nel **cuore**.

### **Proteina trasportatrice della Vitamina D RBP**

Non se ne conosce bene la funzione specifica, ma è la *principale* proteina trasportatrice della vitamina D in circolo. E' sintetizzata dal **fegato**.

## **Proteine della Banda Beta1**

### **Beta-lipoproteine**

Rappresentano la *componente proteica* delle lipoproteine circolanti contenenti fosfolipidi, colesterolo e acidi grassi. Formano una *banda piuttosto tenue*. Se le strisce elettroforetiche vengono colorate con *coloranti specifici* si distinguono le -> *alfa-lipoproteine*

-> *preBeta-lipoproteine*

-> *beta-lipoproteine*

-> *chilomicroni*.

### **Transferrina**

Costituisce la *maggiore* proteina plasmatica *legante il Fe* in modo reversibile. La transferrina capta il Fe assorbito nello stato  $Fe^{2+}$  e lo trasporta ai vari *organi di deposito* e di *utilizzo*. Può legare fino a *due ioni ferro*. Il Fe può entrare nei *precursori* degli eritrociti ed essere così inglobato nella molecola di **Hb** oppure entrare in altri tipi di cellule, come i *linfociti*, dotate dei *recettori per la transferrina*.

Nelle **anemie sideropeniche**, *aumentano* i livelli plasmatici di *transferrina*, dando origine ad un *modesto picco* nella regione *beta1*, che può essere confuso con un picco dovuto alle *immunoglobuline monoclonali*.

In presenza di **grave proteinuria**, la *transferrina* può essere *persa* con le *urine* con *impoverimento* del pool di Fe dell'organismo. Le perdite urinarie sono facilitate dal **PM** ridotto della proteina. Nelle proteinurie *modeste* viene principalmente persa l'*albumina*, solo nelle condizioni più *gravi* viene persa anche la *transferrina*. Esiste una *variante* della *transferrina* presente solo nel **liquor** della quale non si conosce però la *funzione fisiologica*.

## **Proteine della Banda Beta2**

### **Fattore C3 del Complemento**

E' l'unica **frazione del complemento** che è presente nel plasma in concentrazioni tali da poter essere rilevato alla *elettroforesi*. Migra in coda alla frazione delle **beta-globuline**. E' una *proteina della fase acuta* che richiede da **2 a 10 gg** per raggiungere il **massimo** livello dopo una infiammazione. Un'assenza di **C3** indica l'*attivazione* del sistema del **complemento** e quindi un **consumo** dei suoi **fattori** (ciò si verifica nelle *patologie autoimmuni* come il **LES** o in quelle da *complessi immuni circolanti*). Il metodo migliore per determinare la **concentrazione** di **C3** è la *nefelometria* e rappresenta un **parametro utile** per seguire l'**andamento** delle **autoimmunopatie**.

### Emopessina

E' una **glicoproteina** il cui gene è **espresso** esclusivamente nel fegato. Lega il gruppo *eme libero* in rapporto **1:1** e lo trasporta al fegato, dove viene captato dagli epatociti ed il **Fe recuperato**.

### Beta2-microglobulina

Costituisce la *catena leggera* degli **antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità MHC** e si trova in tutte le cellule che esprimono l'**MHC di classe I**.

### Fibrinogeno

E' l'unico **fattore della coagulazione** che raggiunge nel plasma concentrazioni sufficienti da essere individuato mediante elettroforesi. Migra tra la zona delle *beta* e delle *gamma* globuline. Nel corso della **coagulazione** del campione, il fibrinogeno viene convertito a *fibrina*. Se si utilizza per la elettroforesi quindi un campione di **siero**, il fibrinogeno risulta assente. I livelli di *fibrinogeno* aumentano in corso di *patologie acute*. La concentrazione di fibrinogeno influenza notevolmente la **VES** in quanto i **GR** ricoperti di **fibrinogeno** sedimentano più velocemente, si ha quindi un **aumento** della **VES** se aumenta il fibrinogeno. La sintesi avviene nel **fegato** ed in corso di *insufficienze epatiche* si ha **carenza di fibrinogeno**. La **coagulazione intravascolare disseminata** causa il consumo del fibrinogeno e una concomitante *fibrinolisi* con rilascio di *frammenti di fibrina* detti *fibrinopeptidi*. Una rara condizione è detta **afibrinogenemia** per la assenza completa di *fibrinogeno* o **disfibrinogenemia**, per la presenza di varianti di *fibrinogeno* che non coagulano efficientemente. Entrambi i soggetti presentano **alterazioni della coagulazione**.

### Proteine della Banda gamma

#### Gammaglobuline

Tutte le classi di immunoglobuline (*IgG*, *IgA*, *IgM*, *IgD* e *IgE*) migrano insieme nella **banda gamma**. Tra le varie classi vi sono piccole *differenze di migrazione*, per cui spesso le immunoglobuline possono estendersi dalla regione *gamma* a quella *beta* e talvolta anche a quella *alfa*. Tuttavia, queste piccole differenze **non sono sufficienti** a permettere di identificare all'elettroforesi le singole classi tra di loro. Le *Ig* sono l'espressione di diversi **cloni plasmacellulari** ->

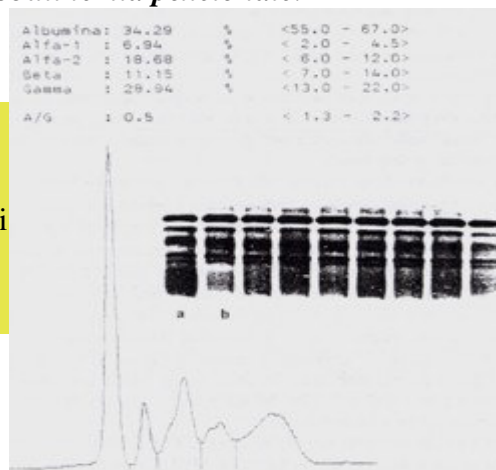
-> **l'aumento policlonale di Ig** si manifesta come un **aumento di colore** in tutta la zona *beta* e *gamma*.

-> **l'aumento monoclonale di Ig** si manifesta come la comparsa di una **banda stretta** in zona *alfa-gamma* che al densitogramma si evidenzia come un **picco** se la concentrazione delle *Ig monoclonali* supera **1 g/l**.

Quindi la **più importante applicazione** della elettroforesi delle plasmaproteine è quella di identificare i **picchi monoclonali** e di distinguere questi da quadri di **ipergammaglobulinemia policlonale**.

#### ->Ipergammaglobulinemia policlonale

Si osserva un aumento di tutte le classi di *immunoglobuline* in modo eterogeneo, in quanto è il risultato di una proliferazione policlonale di diverse popolazione di *plasmacellule* stimulate da processi infettivi cronici e da altre patologie immuni come le *collagenopatie*, e alcune malattie autoimmuni come il **LES** ed *l'artrite reumatoide*.



### -> *Ipogammaglobulinemia*

Si ha una carenza della banda gamma. In genere è *acquisita* e negli adulti e negli anziani deve far sospettare una malattia *immunoproliferativa*.

### -> *Gammapatie monoclonali*

Consistono nella proliferazione di un solo **clone plasmacellulare** e quindi la produzione di una sola **classe, sottoclasse, idiotipo** di **Ig** detta quindi monoclonale. La elettroforesi delle proteine mette in evidenza in questi casi una **banda netta** che si trova in **zona gamma**

detto **picco monoclonale**, in quanto tutte le **Ig** monoclonali migrano alla **stessa velocità** (detta anche **componente monoclonale della proteina CM**). Occasionalmente si possono evidenziare **due o più picchi** monoclonali e il **reperto di bande distinte** di **immunoglobuline** è definito **presenza di bande oligoclonali**. Queste bande monoclonali si ritrovano caratteristicamente nella **macroglobulinemia di Waldenstrom**, nel **plasmocitoma** ed in altre gammapatie monoclonali.

Si possono quantificare e tipizzare le **Ig** e le **catene leggere** della componente monoclonale utilizzando due metodologie di **dosaggio in fase liquida** ->

#### **Nefelometria**

L'antigene, che fa parte della **proteina che si ricerca**, viene fatto legare con **anticorpi specifici** e il campione viene fatto attraversare dai **fasci di luce** del nefelometro, i quali vengono **deviati** in misura proporzionale al **numero** e alle **dimensioni** dei complessi **antigene-anticorpo** formati.

#### **Turbidimetria**

E' un metodo che utilizza un normale **spettrofotometro**. Esiste un rapporto lineare fra **assorbanza** e **concentrazione**.



## Teoria dei Valori di Riferimento

Una *conoscenza* precisa della *distribuzione* del dato di laboratorio riguardo il *parametro in esame* è un *requisito* fondamentale per la **interpretazione diagnostica** dei dati di laboratorio. Per logica, essa avviene mediante la interpretazione del dato per **comparazione** (con un valore od un intervallo di valori di riferimento, definiti “normali”), che in pratica clinica può aversi mediante tre diversi modi :

*Sulla base dell'esperienza clinica*

*Sulla base della fisiopatologia*

*Sulla base di un processo statistico di comparazione.*

Il *processo* formale *corretto* per la interpretazione del dato consiste nella **precisa valutazione** del parametro in *assenza* od in *presenza* della malattia ipotizzata, e il **primo** dato da conoscere è appunto la **variabilità totale** del dato in **probabile assenza di malattia**.

In medicina si usa ancora il concetto di *valore normale* inteso come il comportamento del parametro in *assenza* di malattia. Può avere una *validità limitata* in contesti particolari, **ma non dovrebbe** più essere utilizzato praticamente oggi. La *norma* è una *categoria astratta* e non utilizzabile in una *corretta* comparazione del dato di lab. Non esistono, se non in misura astratta, soggetti **normali**, ma soggetti tutt'al più *privi di segni apparenti di patologia*.

Serve quindi un *criterio rigoroso* per interpretare il **dato di laboratorio**, rappresentato dall'uso dei *valori di riferimento* :

<b>1.INDIVIDUO DI RIFERIMENTO:</b> soggetto scelto per la comparazione secondo criteri predefiniti
<b>2.GRUPPO CAMPIONE DI RIFERIMENTO:</b> numero di individui di riferimento adeguato a rappresentare la popolazione di riferimento
<b>3. VALORE DI RIFERIMENTO:</b> Valore ottenuto dalla misura di un parametro su un individuo di riferimento.
<b>4. DISTRIBUZIONE DI RIFERIMENTO:</b> Distribuzione statistica dei valori di riferimento osservati nel gruppo campione di riferimento.
<b>5. LIMITI DI RIFERIMENTO:</b> Derivati dalla distribuzione di riferimento e utilizzati per descrivere lo scostamento dalla media di una data percentuale dei valori della popolazione di riferimento.
<b>6.INTERVALLI DI RIFERIMENTO:</b> Rappresentano la popolazione compresa tra due limiti di riferimento.
<b>7.VALORE OSSERVATO:</b> Valore ottenuto ai fini di una decisione medica. Può essere comparato con la distribuzione, i limiti e gli intervalli di riferimento.

Obiettivo della medicina di laboratorio è di **definire** se un soggetto è affetto da una patologia o no attraverso la **rilevazione** di una **serie di dati**. Poiché **non è possibile** conoscere l'andamento di un parametro nei *malati* ed in *tutta la popolazione*, si usano dei **campioni della popolazione** con caratteristiche **omogenee** a quelle del soggetto esaminato, e di **numerosità** sufficiente a rendere l'errore di campionamento trascurabile.

Questa procedura passa attraverso **tre** fasi ->

-> **la scelta della popolazione** che inizia con la scelta dell'**individuo di riferimento**, mediante *criteri di selezione* che specificano la **pop. di appartenenza** e *criteri di inclusione* sulla base di caratteristiche **omogenee** e **generali** (razza, età, sesso..)

- > **la selezione dei soggetti ad essa appartenenti.**
- > **la fase operativa di rilevazione dei dati.**

### Definizione della Popolazione

Si seleziona la popolazione sulla base del **criterio scelto**, che può essere lo *stato di salute* degli appartenenti la popolazione scelta, o nel caso della **farmacologia clinica**, la scelta degli **individui** che **assumono il farmaco** in esame. Non esiste alcun criterio di *normalità* sulla base del quale scegliere gli individui facenti parte della popolazione definita, infatti il criterio di **non patologia apparente** non può sostituirsi a quello di **sano**.

### Selezione dei Soggetti

La selezione dei soggetti, definito **camionamento**, deve effettuarsi su base rigorosamente **casuale**, e i principali **criteri di selezione** sono ovviamente *età, sesso*, e presenza di *condizioni fisiologiche particolari*, come gravidanza, pubertà etc...

Nella selezione dei soggetti da includere nella popolazione, si tende ad **ridurre** la variabilità **biologica** della popolazione, *inter e intra individuale*.

Si possono utilizzare in genere **due criteri** per la selezione dei soggetti di riferimento :

**Il criterio a posteriori** -> in cui si applicano ad una pop. molto **ampia**, **criteri di esclusione** per **escludere** le fonti di variabilità patologica e **criteri di partizione** basati sulle fonti di variabilità biologica **fisiologiche** (età, sesso..) e **parafisiologiche** (intossicazioni voluttuarie, alimentazione).

**Il criterio a priori** -> in cui si applicano **criteri di selezione** e di **partizione** decisi all'inizio che permettono l'**ingresso** nella popolazione da studiare, e non l'**esclusione**.

### Raccolta e Rilevazione dei Dati

I valori devono essere raccolti con metodi rigorosamente **standardizzati** e **specificati** e si devono tenere **sotto controllo** tutte le possibili fonti di variabilità **pre-analitica**, di modo da valutare la **consistente fonte di variabilità** che origina da questi fattori.

### Valori di riferimento individuali

Un approccio diverso consiste nel considerare i parametri di un **soggetto** in **apparente** o **relativa salute** e di **rapportare** a questo set di parametri eventuali **valutazioni successive**. Un esempio è il **follow up** dei marcatori tumorali o i risultati del **monitoraggio terapeutico dei farmaci**.

1 -> **Valori di riferimento associati con la "salute"**

2 -> **Valori di riferimento associati con condizioni particolari (morbose e non)**

a -> **Valori di riferimento individuali (basati sul singolo soggetto)**

b -> **Valori di riferimento basati sulla popolazione**

i -> **Valori di riferimento univariati**

ii -> **Valori di riferimento multivariati**

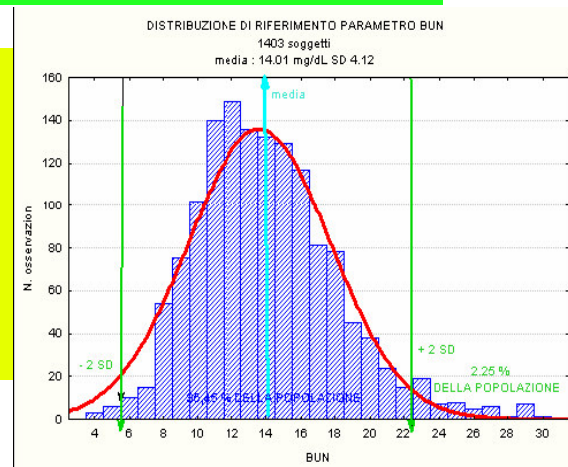
## I livelli decisionali

La **rilevazione di un dato di lab.** al di fuori dell'*intervallo di riferimento* per il clinico comporta tutta una serie di **decisioni** operative che vanno dalla -> **conferma del dato** alla -> **attuazione di strategie terapeutiche**.

La **presentazione dei valori di riferimento** sul referto assume una **notevole importanza** per la **valutazione diagnostica** dell'esame. In caso di trasposizione grafica dei dati rilevati, si possono avere **due tipi di rappresentazione** :

-> una basata sulla **misura di tendenza centrale (moda e mediana)** e sulla **misura di dispersione** intorno alla tendenza centrale, come si ha in caso di **distribuzione gaussiana** dei dati rilevati. In questo caso, si può decidere di includere **nell'intervallo di riferimento** i soggetti compresi entro la **media  $\pm$  2 SD**, indicando quindi il **95,5%** dei soggetti o entro la **media  $\pm$  3 SD** indicando in questo modo il **99,5%** dei soggetti.

-> in caso di distribuzioni **log-normali**, si può voler usare la **mediana** come misura di tendenza centrale e i **percentili**, o la **trasformazione logaritmica** della curva che consente di **normalizzare** il grafico e quindi l'uso della **deviazione standard** e la trasformazione in numero dei valori **logaritmici** trovati che definiscono l'**intervallo di riferimento**.



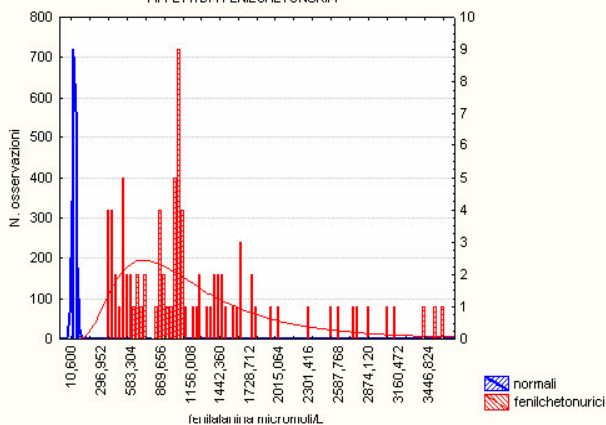
## La Variabilità diagnostica e la variabilità biologica

Il dato di laboratorio va valutato secondo **due contesti logici** diversi, un ragionamento di tipo **diagnostico** e di tipo **patogenetico** assieme.

- > **Il ragionamento patogenetico** procede dalla **patologia** all'**effetto clinico** e di **laboratorio** analizzando il **nesso causale** tra i due fenomeni.
- > **Il ragionamento diagnostico** procede in senso **inverso**, e ha lo scopo di fornire spiegazioni soddisfacenti per la **sintomatologia** osservata. La **diagnosi clinica** che ne deriva è il processo di **conversione** dei dati **clinici** e di **laboratorio** in una corretta **classificazione della malattia**.

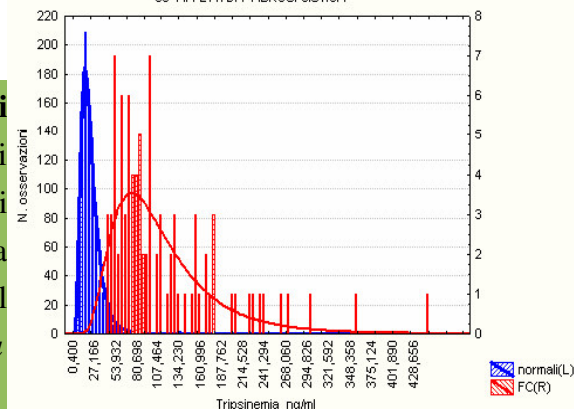
La **capacità** di un test di fornire informazioni valide a livello diagnostico è **funzione** della sua **validità**, l'insieme di **accuratezza** e di **precisione**, e della distribuzione dei valori trovati nella **popolazione dei sani** e dei **malati**, che consente di **allocare** un valore **in una delle due popolazioni**.

DISTRIBUZIONE SEGNALE FENILALANINA, IN 1000 NEONATI NORMALI E IN 88 AFFETTI DA FENILCHETONURIA



Nell'esempio affianco, tra le due popolazioni, **sani** e **malati non** vi sono **sovrapposizioni**. In base al valore trovato nel dosaggio della **fenilchetonuria** in un paziente, è possibile **allocarlo**, senza alcun dubbio, nella popolazione dei **sani** o dei **malati**, con una **probabilità di errore** trascurabile. Questa è una **condizione ideale** dal punto di vista **diagnostico**.

DISTRIBUZIONE DEL PARAMETRO TRIPSINEMIA (IRT) IN 900 NEONATI NORMALI E IN 89 AFFETTI DA FIBROSI CISTICA



Questa **condizione** non si presenta per **tutti i parametri biochimici**. Nel secondo esempio a lato, le curve sono **si differenti**, ma si osserva una parziale **sovrapposizione** tra i soggetti **affetti** e i **non-affetti** di Fibrosi Cistica. Nel validare la ipotesi diagnostica basandosi **solo** su questo dato di laboratorio, il medico **avrebbe molti dubbi**. Questa è la **condizione più frequente** in medicina di laboratorio.

Il **laboratorio** non fa diagnosi, ma il suo compito è quello di elevare la **validità** dell'analisi **riducendo** le fonti di variabilità **pre-analitiche** ed **analitiche** e definendo gli **ambiti** della variabilità **biologica fisiologica** e **patologica**.

Per analizzare correttamente un test, bisogna conoscerne la **variabilità intrinseca nel misurare il segnale** e integrarla con la **distribuzione del segnale** nelle due popolazione (degli **affetti** e dei **non affetti**).

### Punto di Cut-Off

Prendendo in esame sempre le **popolazioni** precedenti, si definisce **convenzionalmente** un punto, detto di **cut-off**, al di sotto del quale consideriamo il soggetto come **negativi** per la patologia, mentre al di sopra **positivi** per la stessa. Si possono quindi classificare i soggetti come -> **Veri Negativi**, se il test è nell'ambito della popolazione sana e sono **sani**.

- > **Falsi Negativi**, se il test ricade nell'ambito della popolazione sana ma sono **malati**.
- > **Veri Positivi**, se il test ricade nell'ambito della popolazione **malata** e lo sono.
- > **Falsi Positivi**, come sopra, con la differenza che i soggetti **non hanno la malattia**.

### Fattori che condizionano la **validità diagnostica** di un test di laboratorio.

1. **Variabilità preanalitica**
2. **Variabilità analitica**
3. **Sensibilità funzionale del test**
4. **Distribuzione nei soggetti sani**
  - a. Tendenza centrale (media, mediana)
  - b. Variabilità (S.D., percentili, range)
5. **Distribuzione nei soggetti affetti**
  - a. Tendenza centrale (media, mediana)
  - b. Variabilità (S.D., percentili, range)
6. **Probabilità a priori o prevalenza della malattia**

	Malattia assente	Malattia presente
Test negativo	Veri negativi	Falsi negativi
Test positivo	Falsi positivi	Veri positivi

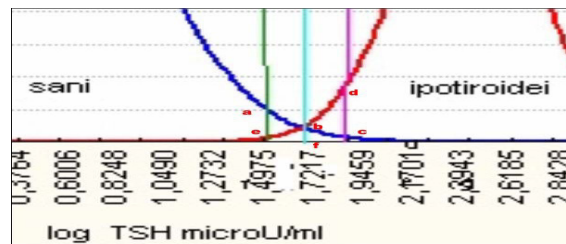
La **validità diagnostica** di un dato test è quindi **funzione** delle percentuali di individui **allocate** nelle quattro caselle dello schema alla sinistra, definite come **specificità** e **sensibilità** diagnostica del test sempre in

relazione al **punto di cut-off** scelto convenzionalmente. La **scelta** del punto di **cut-off** dipende ->

- > dalla **distribuzione** delle due popolazioni
- > dalle **caratteristiche** della malattia in esame, come la **gravità**, le possibili **terapie**, il **costo**...



Si tratta della possibilità di ridurre i **falsi negativi** e aumentare i falsi positivi, e viceversa, a seconda di come **posiziono** la linea di **cut-off**, o al termine della curva rappresentante la distribuzione dei **sani**, o al principio di quella rappresentante la distribuzione dei **malati** o all'intersezione delle **due**.



### Sensibilità diagnostica

E' la percentuale di soggetti **indicati come positivi** applicando il test ad una **popolazione di soggetti** affetti dalla **malattia**. Se su 100 malati, 100 sono **positivi al test**, la **sensibilità** del test è il **100%**.

$$\text{Sensibilità} = \text{Positività nella malattia} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100 \quad (3.1)$$

**VP**=veri positivi **FN**=falsi negativi **VN**=veri negativi **FP**=falsi positivi

### Specificità diagnostica

E' la percentuale di soggetti **indicati come negativi** applicando il test ad una **popolazione di soggetti non** affetti dalla **malattia**. Se su 100 sani il test da 100 sono **negativi**, la **specificità** del test è il **100%**.

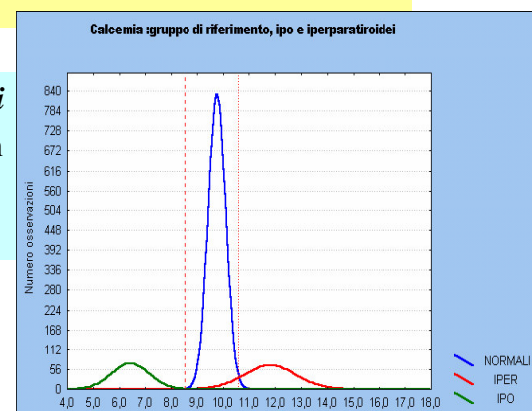
$$\text{Specificità} = \text{Negatività nella salute} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100 \quad (3.2)$$

Questi, **sensibilità** e **specificità**, sono valori che dipendono dalla **scelta** del punto di **cut-off**, dal tipo di malattia e dalle **scelte** dell'**operatore diagnostico**.

	TEST POSITIVI	TEST NEGATIVI	TOTALE
SOGGETTI AFFETTI <b>A</b>	<b>A+</b>	<b>A-</b>	<b>A+ + A-</b>
SOGGETTI SANI <b>S</b>	<b>S+</b>	<b>S-</b>	<b>S+ + S-</b>
TOTALE	<b>A+ + S+</b>	<b>A- + S-</b>	<b>(A+ + A-)+(S+ + S-)</b>

La complessità è **aumentata** anche dal fatto che **tutti** i parametri ematochimici variano sia in **aumento** che in **diminuzione**. Intuitivamente viene da pensare che il **campo di variazione** in aumento sia maggiore di quello in diminuzione, per cui un valore in **aumento** rispetto ai **valori di riferimento** abbia una **validità diagnostica** maggiore, ma spesso i parametri in aumento dimostrano anche una **maggiore variabilità biologica**, o meglio **patologica**.

Osservando l'esempio qui a destra, la **pop.** dei soggetti **ipoparatiroidici** dimostra una **ottima** separazione dalla popolazione di **riferimento**, in blu. Il **differenziamento** dei soggetti **iperparatiroidici** rispetto alla popolazione di riferimento invece è parzialmente sovrapposta ed il





punto di **cut-off** mette in evidenza un **ampio** numero di *falsi negativi* ed un **discreto** numero di *falsi positivi*. I soggetti sottesi alla curva rossa a **sn** della linea tratteggiata, rappresentano i *FN*, mentre i soggetti sottesi alla curva blu a **ds** della linea tratteggiata rappresentano i *FP*. Per aumentare i soggetti *iperparatiroidei* diagnosticati, bisognerebbe spostare a **sn** la linea di **cut off**, ma ciò vorrebbe dire aumentare il numero di soggetti *sani* ma con *test positivo*.

### Predittività e Prevalenza

Se applichiamo un test ad una **popolazione mista**, ovvero composta di *affetti* e di *non-affetti*, la capacità di un test di individuare i soggetti affetti e di porli al di **fuori** dell'*intervallo di riferimento* viene valutata in termini di ->

-> **Valore predittivo di un test positivo** la % dei *veri positivi* rispetto al **tot** dei positivi

$$\text{Valore predittivo di un test positivo} = \frac{\text{VP}}{\text{VP+FP}} \times 100$$

-> **Valore predittivo di un test negativo** la % dei *veri negativi* sul **tot** dei negativi

$$\text{Valore predittivo di un test negativo} = \frac{\text{VN}}{\text{VN + FN}} \times 100$$

-> **L'efficienza di un test** la % dei *risultati veri* (negativi e positivi) sul **tot** dei risultati

$$\text{Efficienza del test (frazione Correttamente classificata)} = \frac{\text{VP+VN}}{\text{VP+FP+FN+VN}}$$

VALORE PREDITTIVO DI UN TEST DI GRAVIDANZA			
	POSITIVI	NEGATIVI	TOTALI
GRAVIDE	90	10	100
NON GRAVIDE	180	720	900
TOTALE	270	730	1000
CALCOLO SENSIBILITA':	90/(90+10) = 90%		
CALCOLO SPECIFICITA':	720/(720+180) = 80%		
CALCOLO VALORE PREDITTIVO TEST POSITIVO:	90/(90+180) = 33 %		
CALCOLO VALORE PREDITTIVO TEST NEGATIVO:	720/(720+10) = 98,6%		
CALCOLO EFFICIENZA TEST:	720+90 / (1000) = 81,0%		

Questo vale a livello esplicativo, sulla base delle analisi eseguite su un campione della popolazione non esplicativo della popolazione reale, tuttavia il **valore predittivo** di un test, se applicato alla popolazione **reale**, varia in funzione della **prevalenza** della **malattia** o del **segno ematochimico** che stiamo rilevando. Il **calcolo** del valore predittivo in considerazione della **prevalenza** della malattia è una modifica del **Teorema di Bayes**, che indica in particolare la **probabilità**, *evento b*, che la **malattia** sia **presente** in presenza di un **determinato** risultato del **test** di laboratorio (*positività* o *negatività*). Permette conoscendo la **prevalenza** della **malattia** e la **sensibilità** e la **specificità** del test in esame di calcolare il valore **predittivo** del **test positivo** o **negativo**.

$$\text{Valore predittivo} = \frac{(\text{prevalenza malattia}) (\text{sensibilità test})}{(\text{prevalenza malattia}) (\text{sensibilità test}) + (1 - \text{prevalenza}) (1 - \text{specificità})}$$

La formula consente di **quantificare** il rilievo intuitivo che la **probabilità di diagnosticare**, con un determinato test, una determinata malattia è maggiore nelle malattie **più frequenti**. E ciò è il risultato

di una **combinazione** della *probabilità a priori* di incontrare una malattia con una *probabilità a posteriori*, valutata per ogni *risultato* del test scelto per *evidenziare la malattia*.

Il **fattore limitante** l'applicazione del *teorema di bayes* è la conoscenza della *prevalenza* della malattia, che si può avere solo con programmi di **screening** di massa. Il **VP** di un singolo test può essere **molto basso** per malattie rare, per cui è necessario utilizzare **più di un** test diagnostico.

### *L'Analisi Decisionale*

Un tentativo di **integrare** la *logica formale* di interpretazione di un **test** di laboratorio con la *clinica* è data dai cosiddetti **livelli decisionali**, che sono **valori** di determinati test che richiedono al **medico** una determinata **scelta clinica**, come la *formulazione* di una *ipotesi diagnostica*, attuazione di una *terapia* o esecuzione di *test ulteriori*.

La **analisi decisionale** consiste quindi in uno **schema ramificato** in grado di evidenziare le *diverse possibilità*, i *diversi eventi* e le azioni conseguenti che il medico deve intraprendere.

Il tipico **nodo decisionale** cui il medico si trova di fronte è :

- > **trattare** il paziente sulla base di una *ipotesi diagnostica* più o meno accertata
- > **non trattare** il paziente e **continuare** l'osservazione
- > **richiedere** una serie di *test diagnostici*

Questa **schematicità** è anche la **debolezza** di questi sistemi, in quanto nessuno è in grado di sostituire il **livello** di interpretazione che un buon clinico riesce a dare nel suo *informale* ed *intuitivo* ragionamento.

Sono tuttavia **utili** come **traccia logica** per non *sottovalutare* o *dimenticare* una possibile **ipotesi**.

### *Errore del Laboratorio ed Errore del Clinico*

Per **identificare** e **controllare** i *fattori di errore* sono utilizzabili sostanzialmente **tre sistemi** ->

- > **controllo di qualità sul dato analitico**
- > **controllo sulla qualità e l'osservanza delle procedure**
- > **l'auditing delle diagnosi cliniche**

L'**errore di laboratorio** è quantificato e controllato mediante i *controlli di qualità* obbligatori, che tendono a ridurre gli errori *intrinseci* dei metodi di misurazione del **dato di laboratorio**.

Negli **ultimi** due punti si annidano numerosi **fattori di errore** che **riducono** drasticamente l'efficacia complessiva dell'*uso del dato di laboratorio*.

I punti di **crisi** dell'intero processo dell'analisi di laboratorio sono :

- > **la scelta dei test** Bisognerebbe scegliere il test che meglio si **addice** a rispondere alle domande del medico, ma in questa fase si possono **compiere** moltissimi **errori**, in quanto i medici curanti non **sembrano tutti ben orientati** verso il *miglio* della informatività. Inoltre un test può essere scelto secondo modalità **temporali** completamente **sbagliate**.
- > **scelta del laboratorio** Se il medico è in condizione di poter scegliere il laboratorio, la scelta andrebbe fatta sulla base della **qualità** e del **costo** della prestazione.
- > **fase pre-analitica** Dal prelievo al trasporto in laboratorio, per l'**estemporaneità** di alcune

procedure, lo **scarso controllo** e l'**inventiva**, riguardo il trasporto, del personale, sono **tutti importanti** fattori di errore.

- > **la fase di misura in laboratorio** Anche in questa fase gli errori sono **frequenti** per l'uso di **strumenti mal tarati, impurezza** dei reagenti, **non-manutenzione** dei macchinari, presenza di **sostanze interferenti** e altro si sommano a tutte le possibili **fonti di errore**.
- > **la fase della interpretazione del referto e l'azione conseguente** E' quella in cui è più difficile valutare l'**azione del medico** o del **patologo clinico**. Alcuni errori nella interpretazione del dato possono essere **ridotti** dall'uso di **algoritmi diagnostici**, ovvero **procedure diagnostiche standardizzate**. Gli unici tentativi di **capire l'incidenza dell'errore** in questa fase sono quelli di **auditing** delle decisioni mediche , analizzando le azioni intraprese in conseguenza di un **referto più o meno contestualizzato**.

IL PROCESSO ANALITICO E I SUOI ERRORI	
Richiesta del test	<ul style="list-style-type: none"> <li>Scelta di test inappropriato</li> <li>Illeggibilità della richiesta</li> <li>Errata identificazione del paziente</li> <li>Mancata specifica richieste speciali</li> <li>Ritardo nella richiesta</li> </ul>
Raccolta campione	<ul style="list-style-type: none"> <li>Errata provetta o container</li> <li>Errata identificazione del paziente</li> <li>Volume inadeguato</li> <li>Campione non valido (emolisi etc)</li> <li>Errori nel tempo di raccolta</li> <li>Condizioni di trasporto improprie</li> </ul>
Misura analitica	<ul style="list-style-type: none"> <li>Strumento non correttamente calibrato</li> <li>Volume inadeguato</li> <li>Mix-up dei campioni</li> <li>Presenza sostanze interferenti</li> </ul>
Invio risposta	<ul style="list-style-type: none"> <li>Errata identificazione del paziente</li> <li>Errori di trascrizione</li> <li>Ritardi nella consegna</li> </ul>
Interpretazione risposta	<ul style="list-style-type: none"> <li>Errata o mancata valutazione sostanze interferenti</li> <li>Errori nella valutazione della specificità</li> <li>Inappropriata sensibilità del test</li> <li>Mancata valutazione dei limiti di precisione</li> <li>Errori valutazione dei valori di riferimento</li> <li>Errori valutazione soglie decisionali</li> </ul>

# Interpretazione dei Test di Laboratorio

## Variabilità Biologica e Variabilità della misura

### Analisi Formale per l'uso dei Test di Laboratorio

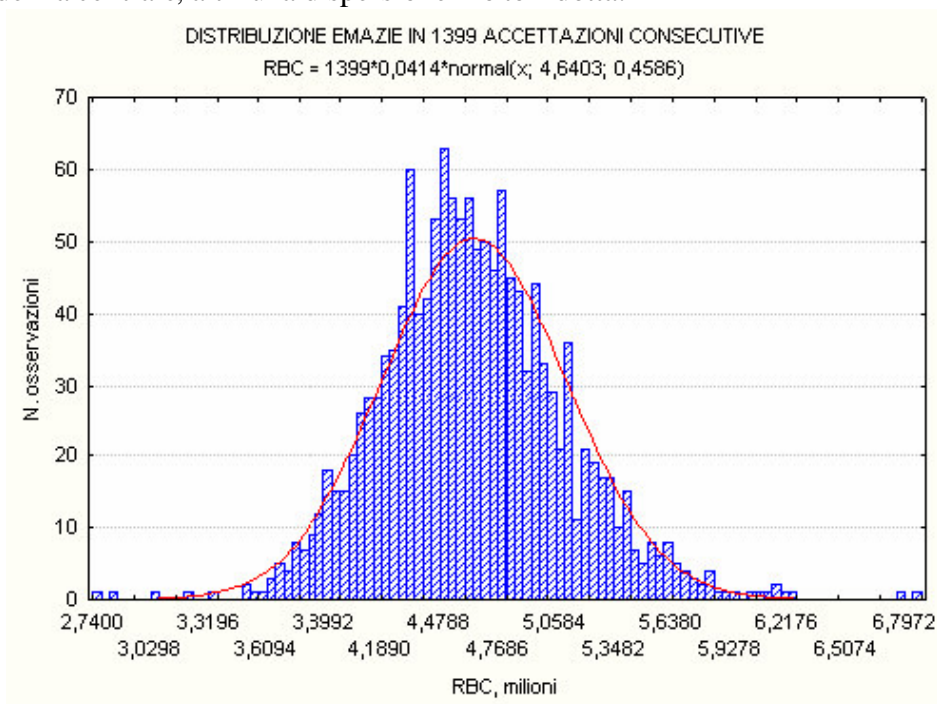
L'**interpretazione dei risultati** in medicina di laboratorio è un processo logico semplice. Consiste nell'attribuire il **valore in esame** alla popolazione dei soggetti *affetti* o a quella dei *non-affetti* della malattia di cui stiamo formulando la diagnosi. Le probabilità di errore dipendono da :

-> dalla **distribuzione del valore reale** nelle due popolazioni (*affetti* e *non-affetti*). Se il campo di variazione è molto ampio, se la sua *distribuzione* nella popolazione dei malati e dei non malati è diversa *quantitativamente* e se la *variabilità intorno alle medie* di questo valore è *minima*, allora la **probabilità di errore** nell'allocare un caso nella popolazione dei *malati* o in quella dei *non-malati* è **trascurabile**.

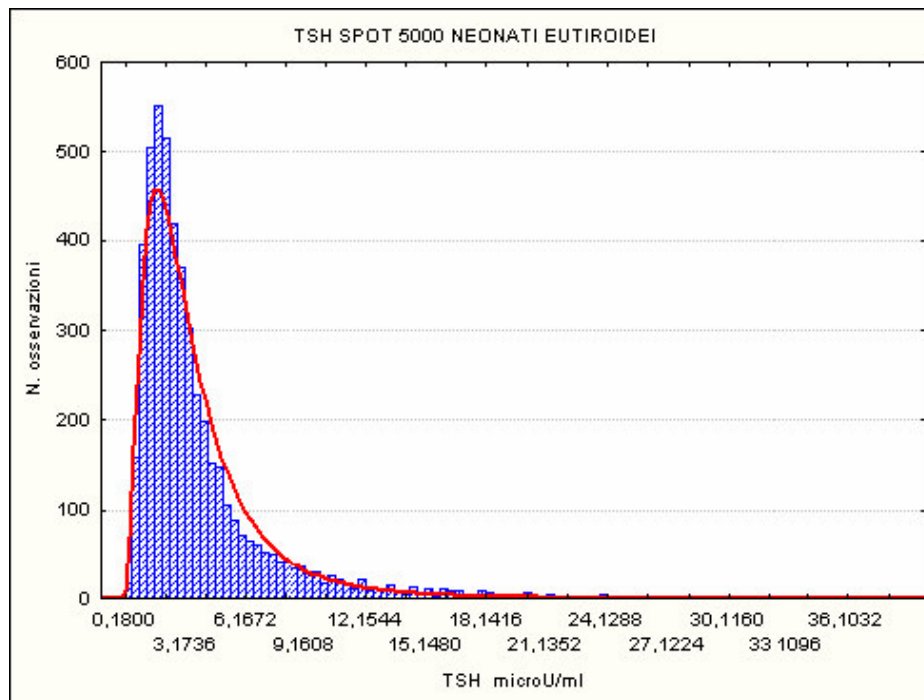
-> da quanto **il valore misurato è vicino a quello reale** e da quanto **la variabilità della misura è intorno al valore stimato**.

### Distribuzioni statistiche più comuni

Le distribuzioni statistiche più comuni sono quella **normale** e quella **log-normale**. Esaminando la distribuzione di un **parametro analitico** in una popolazione, si osserva una misura di **tendenza centrale** e una **variabilità**. Alcuni parametri possono mostrare una notevole dispersione intorno alla misura di tendenza centrale, altri una dispersione molto ridotta.



**Distribuzione di tipo Gaussiano** : con una distribuzione dei valori **simmetrica** intorno al valore centrale che corrisponde alla **media** e alla **mediana**, sia in *aumento* che in *diminuzione*.



**Distribuzione log-normale** : in questa distribuzione, si nota una *concentrazione* dei casi esaminati verso un determinato intervallo di valori più *spostato a sinistra* con una coda di valori verso i *valori alti della distribuzione*. Si nota l'**asimmetria** della distribuzione.

Esistono **due ordini di fattori** che influenzano la **forma** delle curve di distribuzione :

- > fattori **fisiopatologici** che influenzano la **variabilità vera**
- > fattori **relati alle tecniche di laboratorio**, detta **variabilità indotta**, che è inversamente proporzionale al **livello di validità del metodo usato**.

### *Le Sorgenti di Variabilità*

Le **sorgenti di variabilità** che si osservano si possono classificare in **4 categorie**, le prime due costituiscono la **variabilità biologica**, le ultime due invece **variabilità della misura** (ovvero gli *scostamenti del valore misurato dal valore reale*) :

- > la **variabilità interindividuale** : le differenze **reali** nel valore dell'analita che si osservano in funzione di fattori come *età, sesso, razza, assetto genetico* e *stato di salute a lungo termine*
- > la **variabilità intraindividuale** : le differenze **reali** nel valore dell'analita che si osservano nello **stesso individuo** in funzione del **tempo** e sono dovute a *ritmi circadiani, mensili ed annuali, all'attività fisica* ed allo *stato di salute a breve termine*.
- > la **variabilità preanalitica** : consiste nelle **modificazioni** che avvengono nel campione dalla sua *raccolta* al *trasporto* fino al momento della vera e propria misurazione analitica.
- > la **variabilità analitica** : in senso stretto, è quella legata al **metodo analitico** in sé, quindi relativa alla misura e correlata con la **validità** del metodo analitico utilizzato.

L'obiettivo della richiesta di un **test di laboratorio** consiste nell'identificare **se e quanto la variabilità** osservata eventualmente su di un determinato **valore analitico** sia o meno **correlata con**



**una malattia.** Tale **capacità diagnostica** è maggiore quando sono **minimizzate** tutte le altre cause di variabilità, mentre è **ridotta** dove sono presenti altri fattori di variabilità non **controllati**.

quindi -> **la riduzione della variabilità dei dati di laboratorio**

-> **la conoscenza delle fonti di variabilità non riducibili**

sono due **punti chiave** nell'aumento della validità dell'**informazione di laboratorio**.

### **La variabilità della Misura : pre-analitica ed analitica.**

La **variabilità della misura** è condizionata dalla variabilità inerente le azioni messe in atto nella misura di un referto, dal **prelievo** alla **consegna** e i fattori di variabilità intrinseci alla **misura stessa**.

#### **-> Ciclo analitico**

Il **ciclo analitico** comprende fondamentalmente **4 fasi** -> **la raccolta del campione.**

-> **il trasporto in laboratorio.**

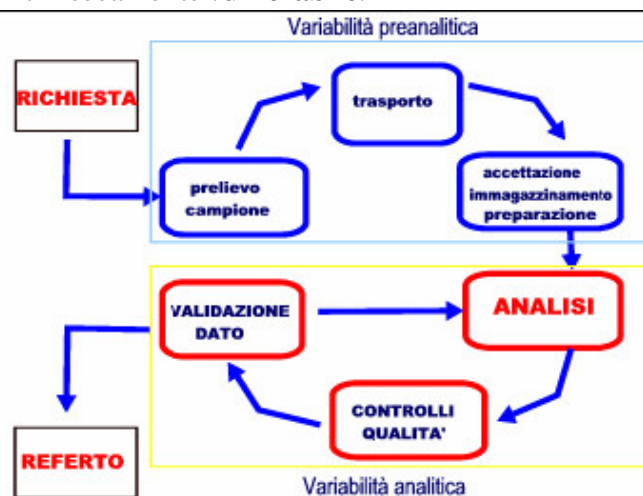
-> **l'immagazzinamento.**

-> **la sua misurazione.**

-> **la validazione della misura.**

Si distingue una **variabilità pre-analitica**, consistente nei **fattori** che possono condizionare la **concentrazione** dell'analita dal momento del suo **prelievo** fino alla **analisi** propriamente detta, da una **variabilità analitica**, che consiste nei fattori di variabilità intrinseci del metodo di misurazione e si aggiungono alla variabilità preanalitica a formare la **variabilità della misura**.

I tentativi di **ridurre** o almeno di **controllare** la variabilità **analitica** sono relativamente **semplici**, mentre per la variabilità **preanalitica** sono molto più complessi, in quanto se gli operatori dei laboratori hanno acquisito una **uniformità** nelle procedure e nel controllo dei metodi biochimici, lo stesso **non** si pu dire per quanto riguarda l'**iter** delle procedure dal **prelievo** fino all'**invio** al laboratorio, in quanto la **catena** di comando e controllo passa attraverso **figure professionali** diverse e numerose, per cui è più intrinsecamente **vulnerabile**.



#### **-> Variabilità preanalitica**

Attiene a **3 fasi** del ciclo, la **raccolta** del campione, il **trasporto** in laboratorio e il suo

*immagazzinamento.*

### **Raccolta del campione**

Per **tutti i campioni** (*sangue, urina, essudati o trasudati, liquor, liquido sinoviale, sudore, lacrime, latte etc...*) esistono ben precise **modalità di raccolta**. Una fase importante e spesso trascurata è la **informazione** del paziente, che passa attraverso una fase di *informazione aspecifica* ed una di *informazione specifica* riguardo i **tempi**, i **modi** i **rischi** e i **possibili effetti collaterali** del prelievo.

#### **-> Prelievo di sangue**

Il prelievo di sangue deve avvenire secondo ben precise **modalità** e seguendo le procedure di **cautela dei campioni infetti**.

**IL PRELIEVO DI SANGUE**

1. Standardizzazione dell'ora del prelievo ( ore 0700-0900) per i metaboliti senza ritmo circadiano o definizione di un'ora correlata al ritmo per quelli che lo dimostrano.
2. il paziente deve essere seduto o supino e deve aver mantenuto questa posizione per almeno 15-20 minuti prima del prelievo di sangue, e il luogo del prelievo deve essere facilmente accessibile senza esercizio fisico da parte del paziente.
3. Il paziente deve essere a digiuno dalla sera precedente
4. Il paziente deve aver praticato una dieta regolare nei giorni precedenti, non deve aver assunto alcol, il fumo va prescritto o comunque registrato.

01/03/2003      Prof. I. Antonozzi - Corso medicina di laboratorio AA 2002-03      25

Il sangue può essere prelevato -> **mediante puntura venosa**

-> **mediante puntura arteriosa**

-> **mediante puntura cutanea (sangue capillare)**

Dal prelievo di sangue possono essere ottenuti **4 diversi tipi di campioni** che vengono analiz-

-zati in laboratorio e sono -> **sangue intero**, ottenuto conservando il sangue con **anti coagulanti**, senza sedimentazione o centrifugazione.

-> **plasma**, ottenuto dal sangue con **anti coagulante** per **sedimentazione** o **centrifugazione**.

-> **siero**, si ottiene dal sangue **lasciato coagulare** e poi centrifugato per separare la **parte superiore**.

-> **sangue intero essiccato su carta**, si ottiene assorbendo il sangue su **carta da filtro** e lasciandolo asciugare a **temp. ambiente**.  
Può essere facilmente spedito per posta e sottoposto a molti tipi di analisi diverse.

I **diversi tipi di campioni** hanno usi diversi ed anche per lo *stesso analita* i risultati spesso non sono **comparabili**. Oltre alle differenze osservabili tra i campioni, lo stesso **prelievo** è fonte di variabilità **preanalitica**, importante è la scelta del **sito** e del **mezzo** di prelievo

(siringa, vacutainer, capillare) e della **tecnica del prelievo** in sé e delle **capacità del prelevatore**.

Errore **frequente** è l'**eccessiva stasi** ematica causata dal laccio emostatico mantenuto per troppo tempo. Un altro, è l'**apertura / chiusura** del pugno del paziente, esercizio fisico che comporta un **aumento** di *lattato*, *potassio* e *fosforo*. Altri errori comuni sono uso di una **siringa** troppo **stretta** e punture ripetute **nello stesso sito**. Un prelievo male eseguito spesso presenta **tracce di emolisi**, che se **lieve** non ha molta importanza, se massiccia può **alterare** le concentrazioni di **analiti** presenti in concentrazione maggiore nell'**eritrocita** che nel **plasma**

### -> Raccolta delle Urine

Si devono considerare raccolte di tipo -> **qualitativo**, per analisi microbiologiche o per il normale esame delle urine

-> **quantitativo** per analizzare la **funzionalità renale** esaminando la concentrazione di escrezione di determinati **metaboliti**.

E' necessaria una **accurata pulizia** dei genitali per evitare il trasferimento di **cellule** o di **batteri** al campione. Esistono diverse **modalità** di raccolta del campione :

-> **Campioni Random** preferibile un campione della **prima minzione** al mattino in recipienti di *plastica* e di *vetro* non necessariamente **sterili**.

-> **Campione Temporizzato** si registra il tempo di raccolta delle urine, alla fine del tempo stabilito si raccoglie **tutta l'urina** in un contenitore.

-> **Urina delle 24h** E' spesso **poco affidabile** in ambiente ambulatoriale. Si consegna al paziente un contenitore di **3-4 l** contenente la sostanza preservante o additiva scelta, si danno le istruzioni relative alla dieta e alla somministrazione di farmaci prima della raccolta, del tempo di raccolta delle urine (**ora di inizio** e di **fine**) e si raccolgono tutte le urine nel tempo prestabilito. Si deve misurare accuratamente il **volume totale** raccolto, importante per le successive analisi.

-> **Raccolta urine per esami microbiologici e colturali** si raccoglie l'urina dopo aver **disinfettato** i genitali esterni e la si divide in tre aliquote e si raccoglie quella **intermedia**.

-> **Raccolta delle urine nei bambini** E' una procedura fastidiosa per il paziente e si tratta di raccolte poco affidabili. Si pone un sacchetto intorno ai genitali, che viene raccolto non appena **contiene la quantità di urine** sufficiente. Raccolte temporizzate sono **molto più difficili**.

Le **urine** sono un liquido fisiologico di difficile conservazione. Il sistema usato per mantenere le urine è la **rapida refrigerazione** a **4°C** e a seconda delle analisi da fare possono essere aggiunti **preservanti** alle urine refrigerate, come *ac borico*, *toluene*, *cloroformio*, che però possono alterare alcuni analiti. I **cilindri** ed i **componenti cellulari** possono modificarsi a seconda del **Ph** e della **forza ionica** delle urine anche in tempi brevi dopo l'emissione.

La **crescita batterica** è un altro fattore di modificazione dell'ambiente urinario dopo la

raccolta. I campioni raccolti per esami **microbiologici** devono essere **subito esaminati**, mentre per esami **chimicoclinici** le urine possono essere **immagazzinate**.

#### -> Raccolta del Liquor

Viene generalmente prelevato per **puntura lombare** e si possono prelevare circa **15-20 ml** da un **soggetto adulto** senza avere fastidi. Il campione va raccolto in **3** provette per diversi esami quali *esami clinici e sierologici*, per gli *esami microbiologici* e per gli *esami citologico e microscopico*.

I **soggetti a rischio** per cui la raccolta di liquor rappresenta un pericolo sono :

- > soggetti con **pressione intracranica elevata**.
- > soggetti con **tumori del midollo spinale**.
- > soggetti con **sepsi in atto**, locali o generali.
- > soggetti con **tendenza al sanguinamento o piastrinopenici**.

La **misura** della pressione del liquor **deve essere preliminare** ad ogni prelievo :

- > è normale intorno ai **90-180 mm**
- > se è **> 180 mm** si prelevano solo **1-2 ml** di liquor, se c'è **caduta marcata della P** si **ferma il prelievo**.
- > se è **< 90 mm** si preleva **1 ml** e se c'è **caduta della P** si ferma il prelievo.
- > se la **P** è **normale**, si preleva **1-2 ml** di liquor e se **non c'è caduta della P** allora si può procedere e prelevarne **10-20 ml** con una caduta della pressione **trascurabile**.

#### -> Raccolta delle Feci

Presenta problemi di **accettabilità** e di **organizzazione** sia da parte del paziente che degli operatori. Molto importanti sono le **istruzioni date al paziente** :

- > **dieta e comportamento** da mantenere prima della raccolta
- > istruzioni per la **raccolta** vera e propria del campione
- > istruzioni sul suo **trasporto** al laboratorio

I **campioni** possono essere raccolti come **casuali** raccogliendo estemporaneamente materiale o come **campioni temporizzati** per tempi in genere di **72h**.

Nel caso di **campioni casuali**, la loro raccolta è legata alla analisi del **sangue occulto**, di **parassitosi intestinali** e della **attività digestiva**.

Il campione deve essere tenuto in **frigorifero**. Nei bambini il campione viene raccolto nel **pannolino**.

#### -> Saliva, sudore e lacrime

Sono utilizzati per il dosaggi di **metaboliti**, di **farmaci**, di **droghe d'abuso** e di **ioni**. Saliva e lacrime sono raccolte piuttosto facilmente e hanno un uso nel dosaggio di *farmaci* in ambito di **monitoraggio terapeutico** degli stessi. Il sudore viene raccolto dalla **sudorazione naturale** o sotto **stimolo con pilocarpine** ed è usato per il dosaggio di Na e Cl in caso di sospetta **fibrosi cistica**. Tutti questi campioni possono essere usati per il dosaggio di **droghe**.

## Raccolta ed Immagazzinamento dei Campioni

Il trasporto è un problema, in quanto è un **fattore limitante** nel tentativo di ridurre i tempi analitici, e durante il trasporto il campione si può trovare in situazioni **non standardizzate**.

I **fattori** da tenere **sotto controllo** durante il trasporto sono ->

- > **vibrazioni e scuotimenti** del campione, che possono essere causa di **emolisi**
- > **esposizione alla luce**, che può comportare la **degradazione** di sostanze fotosensibili
- > **esposizione al calore** alcuni composti (NH<sub>2</sub>, renina, fosfatasi acida e alcalina) sono **labili** al calore da **richiedere refrigeramento** immediato a **4°C** fino alla analisi. Anche **brevi esposizioni a temp. molto elevate** sono considerate **fonti di errore** e vanno evitate.
- > **esposizione all'aria** va evitata qualora si voglia analizzare il **Ph**, dosare **sostanze volatili** (NH<sub>2</sub>, etanolo...) o sostanze **legate** alle proteine la cui **frazione legata** dipende dal **Ph**. Inoltre campioni esposti all'aria vanno incontro ad **evaporazione** che comporta una **concentrazione** più elevata di **tutti gli analiti presenti**. Per evitare la evaporazione, che aumenta con la **T ambiente**, con il **ricambio dell'aria** e con l'inverso della **umidità**, sono importanti la **forma** della provetta e il suo **grado di riempimento**.
- > **contaminazioni chimiche e microbiche** che per i **campioni di sangue**, raccolti in provette sottovuoto e tappate ermeticamente il problema è poco rilevante, per invece le **urine** senza **preservanti** lo sviluppo di flora batterica deve essere considerato una **imp. fonte di errore**. La raccolta dei **campioni di urine** deve essere quindi **eseguito con rigore**.

I campioni non vengono subito **sottoposti ad analisi** appena arrivano al laboratorio, per cui bisogna tener conto che possono andare incontro a **modificazioni specifiche e aspecifiche** dei singoli analiti.

I **principali fattori** causa di alterazioni nei campioni **non immagazzinati correttamente** possono essere schematizzati in ->

- > **fattori fisici** tra cui importanti sono le alterazioni dovute alla **evaporazione**, già menzionate e alla **precipitazione di sostanze**. Inoltre le pareti della provetta possono **assorbire** o **rilasciare** diverse sostanze nel campione.
- > **fattori chimici** sono rilevanti quando si devono misurare **proteine** od **attività enzimatiche** e sono legati alla **aggregazione** o alla **denaturazione** delle proteine.
- > **fattori biologici** sono significativi nei campioni contenenti **cellule** (volute o meno), e consistono nella **lisi** cellulare e nel **rilascio** di sostanze endocellulari nel campione. Per i campioni di **plasma** e di **siero** sono significative le modificazioni di **CO<sub>2</sub>** e del **glucosio** quando immagazzinati a **+4°C**.  
La **CO<sub>2</sub>** evapora nei campioni immagazzinati a provetta aperta a temperatura ambiente, e a questa alterazione segue **aumento** del **Ph** fino a **Ph alcalino**, a cui alcuni enzimi possono essere distrutti. Il **Ph alcalino** influenza tutti quegli analiti per cui esiste un equilibrio tra la frazione libera e quella legata, come Ca, ormoni e alcuni farmaci.  
Il **glucosio** viene consumato dalla **glicolisi** che avviene a sangue intero e che causa la caduta dell'analita quanto intercorre un certo **tempo** tra la raccolta del campione e la separazione del **siero**.



L'**alterazione** della **permeabilità** della membrana eritrocitaria durante la conservazione causerà **aumento** di *potassio*, *fosforo* e di *magnesio*. La **refrigerazione** aumenterà la perdita del *potassio* per inibizione della funzione della **pompa Na – K** degli **eritrociti**. Durante l'immagazzinamento è **costante** la riduzione di attività di alcuni **enzimi**.

Per **periodi lunghi** è consigliabile il **congelamento** dei campioni, e va sempre tenuto presente che la attività degli **E** subisce notevoli **alterazioni** e che nel congelamento e nello scongelamento la struttura proteina ad alto PM può **subire delle modificazioni**.

Un **metodo** che consente di mantenere inalterate le concentrazioni degli analiti consiste nel **congelamento in azoto liquido** e rapido immagazzinamento a **-80°C**.

La completa **liofilizzazione** consente di ottenere campioni **stabili** per molti analiti per un **periodo di molti anni**.

1. **FATTORI FISICI**
  - 1.1. Evaporazione
  - 1.2. Solubilità
  - 1.3. Adsorbimento
  - 1.4. Desorbimento
  - 1.5. Diffusione
  - 1.6. Fotolisi
2. **FATTORI CHIMICO-FISICI**
  - 2.1. Denaturazione
  - 2.2. Polimerizzazione
  - 2.3. Aggregazione
3. **FATTORI METABOLICI**
  - 3.1. Alterazione dei sistemi energetici
  - 3.2. Alterazione dei gradienti di concentrazione
  - 3.3. Alterazione della permeabilità cellulare
  - 3.4. Alterazione della concentrazione dei metaboliti

I **campioni di urine** sono **difficili da conservare**, una rapida **refrigerazione** dopo la raccolta consente di evitare la **crescita batterica** che è uno dei principali **fattori di modificazione**. I campioni devono essere **protetti dalla luce** ed anche aggiunti di un **preservante**. Nessun metodo di conservazione o preservante può impedire la **decomposizione** dei cilindri, che possono essere identificati solo nelle **urine fresche**, raccolte da non più di **30'**.

La raccolta delle **urine** per studi citologici deve aversi con **metodiche diverse e specifiche**.

### -> **Variabilità ed errore della misura**

La **variabilità analitica** è l'errore che commettiamo nel determinare la **concentrazione** dell'analita. Se le fonti di errore fossero pari a **0**, i **replicati** sullo stesso campione sarebbero identici. Con...

**Valore reale**-> si intende il valore determinato con metodi di **gerarchia** superiore rispetto a quelli genericamente usati nella chimica clinica.

**Errore analitico**-> lo **scostamento** dal valore **vero** o **reale**, valutato col **metodo di riferimento**. Schematicamente, si distinguono due **generi** diversi di variabilità, quella **sistematica** e quella **casuale**.

**Errore sistematico**-> è la **differenza tra valore analitico e valore reale** che si presenta in **maniera regolare**, con **aumenti o diminuzioni consecutive di entità costante** o con **incrementi o decrementi progressivamente proporzionali**. **L'effetto** dell'errore sistematico sulla distribuzione dei valori replicati **non provoca aumenti nell'ampiezza della curva**, ma piuttosto un suo **spostamento su ambiti di valori diversi da quelli reali**.

**Errore casuale** -> è la differenza tra **valore analitico** e **valore reale** che si presenta in maniera **irregolare**, apparentemente non correlata a specifiche azioni, con aumenti o diminuzioni non consecutivi e con **dimensioni quantitative incostanti**.  
L'effetto dell'errore casuale sulla distribuzione dei valori replicati è quello di **aumentare la dispersione dei dati** e, quindi, nel caso di distribuzioni normali di aumentare l'**ampiezza della curva di distribuzione**.

L'**errore sistematico** in laboratorio è dovuto a fattori **stabili** e di tipo **generale** e quindi ai macchinari e agli impianti. L'**errore** si presenta ogni volta che si usa il componente **non ben tarato**.

L'**errore casuale** è legato a fattori contingenti, che possono indifferentemente causare un **aumento** od una **riduzione** del valore misurato e comprendono l'**inaccuratezza dell'operatore**, errori nella **preparazione dei reagenti**, **inadeguatezza** degli ambienti o degli impianti, **mancata standardizzazione** delle condizioni operative.

I fattori determinanti la **variabilità analitica** si possono schematicamente raggruppare :

- > **Fattori ambientali**, temperatura, microclima del laboratorio, campi elettromagnetici in grado di **alterare la taratura** dei detectors etc...
- > **Fattori tecnologici**, caratteristiche delle apparecchiature, progressiva riduzione col tempo delle *performances* dei detectors, livelli di *autocalibrazione* e *auto controllo* etc...
- > **Fattori chimici e biochimici**, variazioni nel **grado di purezza** di reagenti, e nell'**attività** di enzimi e nella **purezza** dell'acqua distillata utilizzata etc...
- > **Fattori umani**, capacità individuale dell'operatore e adesione ai protocolli di lavoro etc...

La **riduzione** dei fattori di variabilità analitica, quindi del tasso di errori **sistematici** o **casuali**, si ottiene mediante la :

- > **ottimizzazione delle procedure, dei metodi, dei macchinari** I responsabili dei laboratori devono scrivere **protocolli operativi** cui tutti debbono attenersi e devono riguardare non solo l'analisi ma la **funzionalità del laboratorio nel suo complesso**.
- > **controllo della produzione** comprendente il **controllo di qualità**, **analisi statistico-epidemiologiche** dei dati e gestione di una **banca dati** dei dati precedentemente archiviati.

La **valutazione** di un laboratorio si basa su parametri di tipo **analitico** e di tipo **tecnologico / organizzativo**. I **parametri** che permettono di valutare un **metodo** come valido, "buono", sono :

- > **Accuratezza** : definita come la **concordanza** tra la media dei valori determinati e il valore vero, calcolato con metodi di riferimento ovvero di **rango superiore**.
- > **Precisione** : definita come la **concordanza di diverse misure ripetute** sullo stesso campione. Assumendo che la variabilità sia legata ad **errori casuali**, si assume che, per curve **normali**, la **Deviazione Standard** della media delle misure sia una misura della precisione, o meglio della imprecisione, in quanto **aumenta** con l'**errore osservato**.
- > **Sensibilità** : definita come la **minima** quantità di **sostanza** evidenziabile col metodo in esame che è diversa da 0. E' il **limite inferiore di rilevazione**.
- > **Specificità** : la **capacità** di un metodo di **determinare** solo il costituente che si intende **det.** senza **interferenze** positive o negative da parte di **altri costituenti**. Questo

concetto ha alcuni *punti di contatto* con quello di accuratezza.

- > **Interferenza** : definita come l'effetto di un costituente sulla misura di un altro.
- > **Linearità** : definita come la relazione lineare tra la misura e la concentrazione reale dell'analita, da cui deriva l'*intervallo analitico*, intervallo entro cui la **misura** è proporzionale alla **quantità** di analita presente.

La chimica clinica utilizza *metodi di compromesso*, sufficientemente *validi* (accurati, specifici, sensibili, precisi) ma attuabili su un *gran numero* di campioni a *costo contenuto*. Accanto alle caratteristiche analitiche occorre tener presente anche :

- > **Praticabilità, Rapidità Operativa (turn around time)** ovvero il **t** di un ciclo analitico, **Possibilità di automazione e costo.**



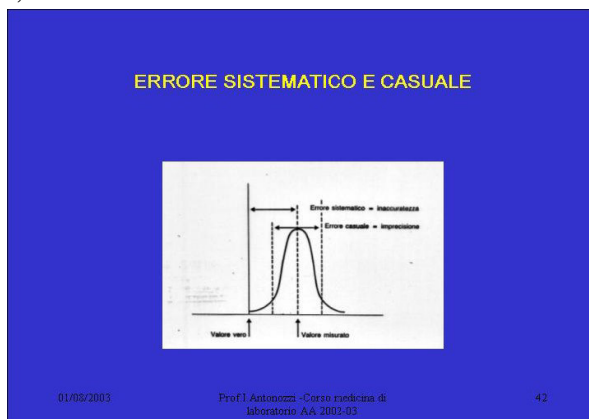
Il **valore reale** in sé non è un **concetto astratto**, ma esistono metodi, detti *di riferimento*, non praticabili in lab., che hanno una **% di errore** così bassa da **risultare trascurabile**, quindi i valori da essi ottenuti sono una stima di quello **vero**. I metodi in *chimica clinica* devono essere un **compromesso** tra *praticabilità, costo e caratt. analitiche*. Per valutare la corrispondenza con il valore vero, si usano -> **il confronto tra i valori dei campioni con quelli di analiti posti in quantità note.**

- > **il confronto tra i valori ottenuti e il valore reale ottenuto con metodi quantitativi più complessi e non attuabili in lab.**

La **gerarchia** dei metodi analitici viene posta valutando l'*accuratezza* e la *precisione* del metodo :

<b>METODI DEFINITIVI:</b> non dimostrano fonti di inaccuratezza, dà luogo a un <b>RISULTATO DEFINIVO</b> considerato la migliore approssimazione al valore vero	Spesso utilizzano una <i>misura di massa</i> , come la <i>diluzione isotopica</i> - <i>spettrofotometria di massa</i> .
<b>METODI DI RIFERIMENTO :</b> dimostra di avere inaccuratezza trascurabile rispetto all'imprecisione fornisce il <b>VALORE DI RIFERIMENTO</b>	Anch'essi richiedono la <i>standardizzazione</i> e <i>verifica</i> con i <i>metodi definitivi</i> , ma sono più complessi dei metodi correntemente usati, e più accurati e precisi.
<b>METODI A ERRORE NOTO:</b> metodi in cui l'entità dell'errore è determinata con il metodo di riferimento fornisce il <b>VALORE ASSEGNATO</b>	Sono quelli di <i>uso corrente</i> , lo scostamento dai valori reali viene <i>quantificato</i> ed eventualmente <i>corretto</i> con controlli a <i>conc. nota</i> e anche analizzando con un <i>metodo di riferimento</i> campioni <i>random</i> e/o quelli i cui valori sono <i>al di fuori</i> di certi limiti.
<b>METODI A ERRORE IGNOTO</b> accuratezza ignota: fornisce un <b>VALORE ASSEGNATO</b>	Danno un <i>valore assegnato</i> con un significato clinico la cui <i>rispondenza al vero</i> deve essere controllata sia quando il metodo viene <i>messo a punto</i> in laboratorio che per <i>ogni caso analitico</i> .

La **gerarchia dei metodi** indicata nella precedente figura costituisce lo **schema logico** dei controlli necessari per la messa a punto di un **sistema** o di un **laboratorio di analisi**. Essi devono essere **tutti a disposizione** del laboratorio, anche se **non** necessariamente **attivi** al suo interno.



### ->Controllo di qualità

E' una procedura **obbligatoria per legge** e ha come obiettivo quelli di tenere entro certi **limiti** gli **errori di analisi dei laboratori**. Deve essere un controllo di **precisione** (per scoprire l'eventuale comparsa di *errori* casuali) e di **accuratezza** (per scoprire l'eventuale comparsa di *errori sistemici*). E' costituito da **materiali di controllo** e da **procedure di controllo**.

### Materiali di Controllo

Sono **campioni** simili a quelli da analizzare, **stabili nel tempo** e con una composizione chimica il più possibile **indistinguibile** dai campioni da analizzare. Si classificano in :

- > **Controlli a titolo ignoto** non consentono la valutazione riguardo il **rapporto** tra valore **vero** e **misurato** ma permettono di controllare la **precisione** del metodo. Sono campioni con concentrazioni di analiti **non predeterminate** e di cui si controlla la **costanza** della risposta nel **tempo**.
- > **Controlli a titolo noto** consentono il controllo della **precisione** ed anche della **accuratezza** e sono campioni contenenti **quantità note** degli analiti da analizzare.

### Procedure di Controllo

Devono assicurare che il materiale di **controllo** sia lavorato in **maniera indistinguibile** da quella dei normali campioni analitici. Si opera generalmente nel **cieco** ovvero neanche gli operatori sanno **qual è il campione di controllo**. Le **procedure di controllo** devono essere codificate con precisione e devono costituire un **programma di valutazione** continua dell'attività analitica.

Possono essere controlli :

- > **di qualità interni al laboratorio**, per valutare la qualità interna ed eseguire le correzioni ove necessario. Si tratta di un **primo ed elementare** meccanismo di controllo
- > **di qualità esterni**, che si aggiungono ai primi, e si basano sulla preparazione ed invio dei campioni di controllo da un **ente esterno** che raccoglie i risultati per stilare un **rapporto** periodico sull'**attività** del laboratorio in esame e confrontarla con altri laboratori.

Il **controllo di qualità** è un processo importante del controllo laboratoristico e può essere usato con



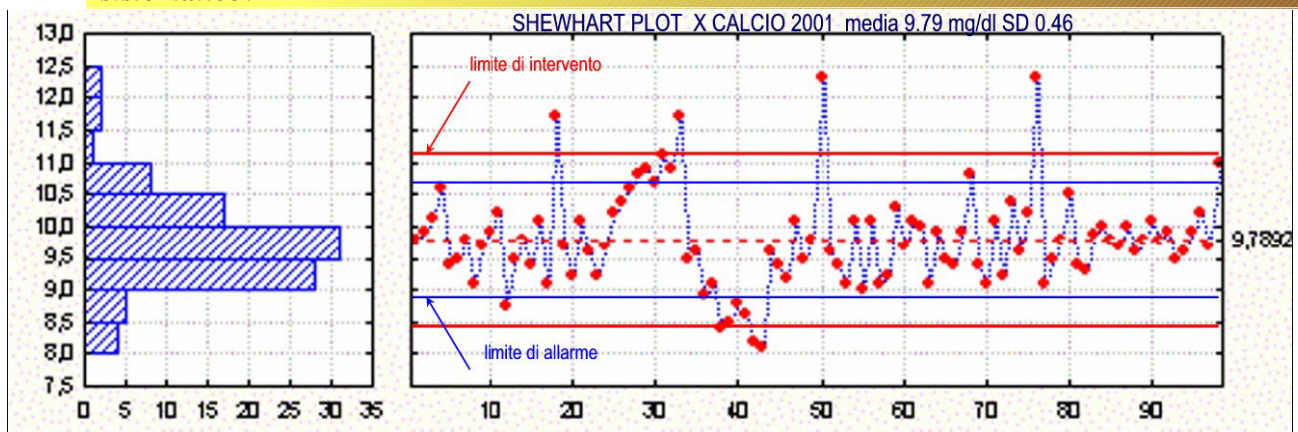
efficacia ove si disponga di un sistema di *gestione* dei risultati, di *protocolli* di controllo e di manutenzione dei macchinari e *periodiche rivalutazioni* dei metodi usati.

### Carte di Controllo

Esiste una *ampia tipologia* di carte di controllo tra cui le più usate sono le **carte di shewhart** e le **carte per somma cumulativa**. Il concetto base delle carte di controllo è di rappresentare *graficamente* gli scostamenti rispetto alla *media* (analisi di accuratezza) e alla *variabilità di lettura* (analisi di precisione) nella lettura di un parametro.

#### -> Carte di Shewhart

E' il metodo più *comune* ed *intuitivo*. Nella fase di *preparazione* ed *avviamento* si prepara il materiale da usare per tutto il *periodo del programma* poi si procede ad *analizzare* il materiale almeno per un *periodo di 30gg* col metodo da sottoporre al controllo. Dai dati a disposizione si calcola *media* e *deviazione standard* e si costruisce la carta, ponendo sull'asse x le mandate analitiche *ordinate per data* e sulla y le *concentrazioni* misurate. La *media* dei valori consiste in una *linea orizzontale* in corrispondenza della media e vengono riportate le linee pari a **+2SD** e **-2SD** (*StandardDeviation*) e due linee corrispondenti a **+/- 3SD**. I valori, riportati sulla carta, e compresi tra **+/- 2SD** sono detti *entro i limiti di allarme* o *in controllo* (essendo compresi entro il **95%** della prob. statistica calcolata), mentre quelli oltre i **+/- 3SD** sono detti *fuori controllo*. Oltre allo *scostamento dalla media*, un altro criterio che permette di tenere il dato sotto controllo è la presenza di *almeno 7 valori* che si trovano dallo stesso lato della *media* o dimostrano un trend in *aumento* od in *diminuzione*. Nel caso il valore sia oltre **+/- 3SD** l'indiziato è un *errore casuale*, nel caso di una *tendenza univoca*, l'indiziato è un *errore sistematico*.



#### -> Le Carte Cusom (Somma Cumulativa)

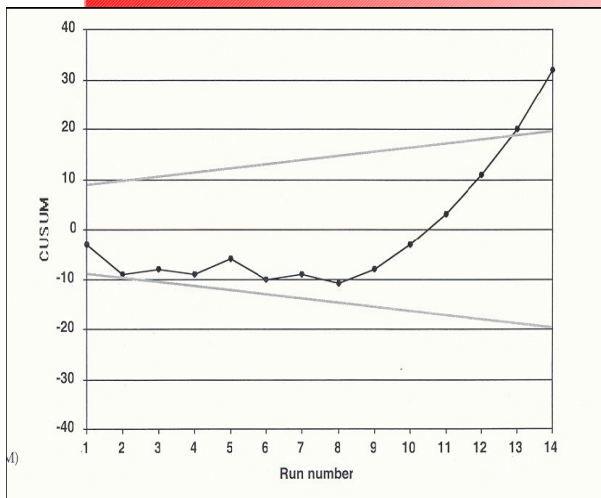
E' un metodo di controllo della qualità *utile* e *poco costoso*. Si basa su *tre assunti* :

- > La *popolazione* afferente ad un lab. è relativamente *costante* nelle sue caratter.
- > Il numero dei *soggetti da esaminare* non varia in maniera significativa.
- > Il numero dei *soggetti* che presentano *valori patologici* è relativamente *costante* e si può applicare un *criterio di esclusione* che li escluda dal Controllo di Qualità.

Se sono rispettate, allora la *oscillazione* dei valori *misurati giornalmente* per un parametro, esclusi i soggetti del terzo punto, dovrebbe *essere contenuta*. Scelto un parametro di riferimento vicino alla *media giornaliera*, si riportano su un grafico gli scostamenti dalle medie giornaliere le quali sono *considerate uguali a 0*. Le differenze casuali da un giorno ad



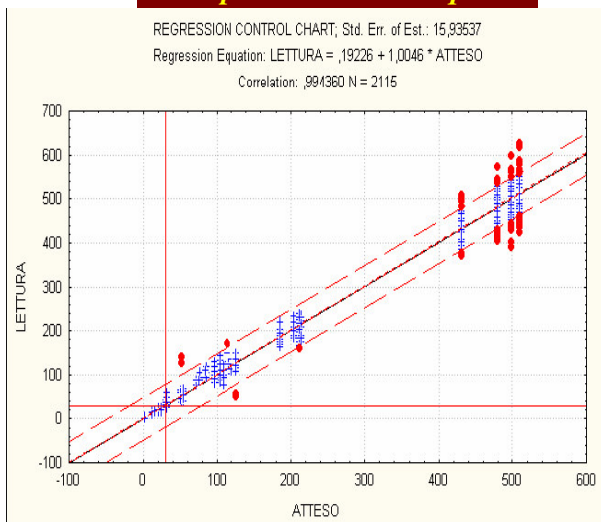
un altro provocheranno un **andamento** intorno alla retta rappresentata dal valore medio convenzionale. Scostamenti **ampi** o **tendenza** in un senso o nell'altro **di più di 7 elementi** rappresentano **errori casuali** o **errori sistematici**.



Gli **svantaggi** di questo metodo consistono in **variazioni** nella pop. afferente al laboratorio senza che questo **ne sia stato edotto** e quindi nel **considerare un errore** ciò che invece è dovuto alla semplice variazione della **popolazione**.

Il **vantaggio** è che non richiede la preparazione di campioni di controllo e può essere attivato in maniera **automatica** sul sistema gestionale del laboratorio.

-> **Altri tipi di controllo di qualità**



Può essere utile tenere sotto controllo l'**andamento dei valori** a diverse concentrazioni dell'analita. Occorre disporre di **controlli a concentrazione nota** che coprano il **range** analitico della determinazione da controllare e **interporre** saltuariamente nelle **mandate analitiche** l'intero range dei campioni. Si riporta in una **matrice di correlazione** il rapporto tra i **valori attesi** ed i **valori osservati** e si considerano come **fuori controllo** i valori al di fuori di una **stima dell'errore** predefinita.

## La Variabilità Biologica

### La variabilità inter-individuale

E' data dalla interazione **genotipo** ed **ambiente** che ha come risultato un **fenotipo biochimico individuale**. Comprende :

- > **La variabilità individuale** : ne è responsabile l'**assetto biochimico** individuale, ovvero il punto di equilibrio tra **assetto genomico** e le **influenze ambientali** che interagiscono con esso.
- > **La variabilità legata alla età** : è correlata al diverso **assetto biochimico** associato alle modificazioni fisiologiche che si accompagnano con l'avanzare dell'età e anche alla maggiore **incidenza** di malattie che si hanno nelle varie **fascie di età**.
- > **La variabilità legata al sesso** : è relativa agli analiti per i quali esistono **specifiche diff. tra** i due sessi, come gonadotropine ed steroidi sessuali, ma anche analiti **non specifici** ma per cui esistono differenze tra i due sessi, ma per la **maggioranza** degli analiti queste diff. non hanno **rilevanza clinica**.

## La Variabilità intra-individuale

Alcuni *analiti* dimostrano valori *stabili* nel tempo nello stesso individuo e variano solo in condizioni patologiche, *altri* invece hanno un *comportamento variabile* in relazione a cambiamenti fisiologici e patologici. La *variabilità* può essere correlata:

- > *con Ritmi Endogeni* come i ritmi circadiani di alcuni ormoni
- > *con il Ciclo Mestruale*, e le variazioni ormonali ad esso correlate (ma solo nella *donna*)
- > *con lo stile di vita*, con le *abitudini alimentari*, con il *ritmo sonno-veglia*, con l'*assunzione di farmaci* ed altro...
- > *con il passare delle stagioni*, vi sono infatti andamenti stagionali, anche del **5-10%** di certi analiti.
- > *con l'attività fisica* del soggetto in esame (che determina l'incremento di alcuni enzimi correlati alla funzione muscolare, come *CK, ALT, AST, Fosforo* e *Creatinina*) e con la *postura*. Il passaggio dalla *posizione distesa* (mantenuta a lungo) a quella *eretta* comporta una *riduzione* del volume sanguigno di circa il **10%**, a seguito del passaggio di liquido extracellulare aprotico, attraverso i capillari, in seguito *all'aumento della pressione idrostatica*. Cambiano quindi anche il *valore dell'ematocrito* e aumenta la *concentrazione proteica* e delle *sostanze non proteiche* ma *legate alle proteine*.

# ENZIMI E INDICI DI SOFFERENZA TISSUTALE 11

L'uso diagnostico degli enzimi ha due contesti principali: quello di **indicatori di funzionalità o di lesione** di cellule o tessuti e quello di **marcatori di specifici deficit enzimatici** nelle malattie genetiche e genetico-metaboliche.

I dosaggi enzimatici comunemente usati a scopo diagnostico sono numericamente limitati: solo una decina sono di impiego routinario; altri enzimi sono di uso clinico meno diffuso ma non meno importante, in quanto indicatori di patologie specifiche.

In base al tipo di reazione che catalizzano, gli enzimi sono **suddivisi in 6 classi**:

- I- OSSIDOREDUTTASI
- II-TRASFERASI
- III-IDROLASI
- IV-LIASI
- V-ISOMERASI
- VI-LIGASI

Attualmente gli enzimi sono **denominati in base a quattro criteri**:

1. il **nome sistematico**: che descrive la reazione catalizzata
2. una **denominazione pratica** (trivial): che spesso costituisce una semplificazione della denominazione sistematica:
3. Una **denominazione numerica**, proposta dalla E.C. della IUB che consiste in quattro numeri separati da punti: il primo rappresenta una delle 6 classi generali, il secondo e il terzo le sottoclassi, il quarto lo specifico numero in serie assegnato all'enzima nell'ambito della sottoclasse.
4. un **acronimo** ; molto spesso viene usata una sigla formata da un acronimo di due-tre lettere maiuscole, (ad es ALT = alanina aminotrasferasi) non approvata formalmente dalla Enzyme Commission e spesso fonte di confusione per la mancata standardizzazione delle sigle

NUMERO EC	NOME SISTEMATICO	NOME COMUNE	SIGLA
1. 1. 1.27	L-Lattato:NAD <sup>+</sup> ossidoreduttasi	Lattato Deidrogenasi	LDH
1. 1. 1.42	Threo-D,-isocitrato:NAD(P) <sup>+</sup> ossidoreduttasi	Isocitrato Deidrogenasi,	ICD
1.4.1.3	L-Glutamato:NAD(P) <sup>+</sup> ossidoreduttasi	Glutamato Deidrogenasi	GLD
2.3.2.2	(5-Glutamil)-peptide:amino-acido transferasi	©-Glutamiltrasferasi	GGT
2.6.1.1	L-Aspartato:2-oxoglutarato aminotrasferasi	Aspartato Aminotrasferasi(Transaminasi)	AST
2.6. 1.2	L-Alanina:2-oxoglutarato aminotrasferasi	Alanina Aminotrasferasi(Transaminasi)	ALT
2.7.3.2	ATPcreatina N-fosfotrasferasi	Creatina Kinasi	CK
3. 1. 1.3	Triacilglicerol acilidrolasi	Lipasi	Lip
3. 1. 1.7	Acetilcolina acetilidrolasi	Acetilcolinesterasi, Vera Colinesterasi, Colinesterasi I	ChE
3.1.1.8	Acilcolina acilidrolasi	Pseudocolinesterasi, Colinesterasi II	SChE
3. 1.3.1	Ortofosforico-monoestere fosfoidrolasi (alk)	Fosfatasi Alkalina	ALP
3.1.3.2	Ortofosforico-monoestere fosfoidrolasi (ac)	Fosfatasi Acida	ACP
3. 1.3.5	5'-Ribonucleotide fosfoidrolasi	5'-Nucleotidasi	5NT
3.2. 1. 1	1,4-a-D-Glucan glucanoidrolasi	Amilasi	AMY
3.4.21.4		Tripsina	IRT
4.1.2.13	D-Fruztoso- 1,6-bisfosfato D-gliceraldeide-3-fosfato-liasi	Aldolasi	ALD

## LA MISURA DEGLI ENZIMI IN CLINICA

Il quadro enzimatico cellulare è *correlato alla funzione svolta dalla cellula e quindi caratteristico e specifico nelle diverse cellule e nei diversi organi*. Inoltre la concentrazione degli enzimi all'interno della cellula è di parecchie volte (centinaia o migliaia) superiore alla concentrazione che si rileva all'esterno di essa, nell'ECF o nel plasma .

Questi due fenomeni (tipicità del quadro enzimatico e elevata concentrazione endocellulare) sono alla base dell'enzimologia diagnostica.

La misura degli enzimi nella gran maggioranza dei casi non avviene in termini di massa, ma in termini di attività. Si misura, in altri termini, la quantità di substrato che l'enzima contenuto nel campione da analizzare trasforma nel prodotto per unità di tempo.

Questo criterio di misura, su cui si sono basati i grandi progressi della enzimologia clinica, ha innegabili vantaggi in termini di praticità e di costo del dosaggio ma va anche considerato in alcune particolarità fisiopatologiche che possono falsare l'interpretazione generale del quadro.

Infatti:

1. La misura di attività *si correla ovviamente alla sola quantità di enzima attivo* presente in un determinato momento nel campione esaminato; non dà alcuna informazione sulla quantità di enzima prodotto.
2. La misura della attività *non tiene conto di eventuali frazioni di enzima presenti in circolo in forme inattive* o più o meno attive della frazione misurata
3. La misura della frazione attiva non tiene del pari conto di *situazioni "ambientali"* (condizioni della reazione, presenza di inattivatori o di potenziatori dell'enzima) *in condizione di modificare l'attività relativa dell'enzima*.
4. In alcuni rari casi nella sequenza delle reazioni usate per la valutazione dell'attività enzimatica possono *interferire altri enzimi* presenti in concentrazioni alterate nel campione esaminato

Per una corretta interpretazione dei valori in termini di attività occorre conoscere alcune delle particolarità metodologiche alla base dei dosaggi enzimatici: in particolare i diversi fattori che ne condizionano in vivo e in vitro l'attività.

## MISURAZIONE DELL'ENZIMA IN TERMINI DI ATTIVITA'

### FISIOLOGIA DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA

L'attività degli enzimi dipende dal cosiddetto *sito attivo*, ovvero da quella parte della molecola proteica, la cui struttura chimica determina la specificità per il substrato.

Il sito attivo si può ulteriormente suddividere in un **sito di legame** ed un **sito catalitico**. Il primo lega il substrato il secondo attiva la reazione catalitica.

Alcuni enzimi sono delle **oloproteine**, costituiti da soli aminoacidi, altri contengono, oltre alla parte proteica (**apoenzima**), anche sostanze non proteiche dette **cofattori**, in mancanza dei quali non ha luogo l'azione catalitica. Questi cofattori possono essere suddivisi in:

**Coenzimi**: non fanno parte integrante della struttura enzimatica. Un tipico esempio sono alcune vitamine.

**Gruppi prostetici**: stabilmente legati all'enzima, un esempio è il FAD o il gruppo *eme* dei citocromi.

**Cofattori metallici**: ioni metallici in presenza dei quali è possibile attivare una reazione enzimatica.

Tutte le reazioni chimiche avvengono ad una **velocità definita, che dipende dalle condizioni sperimentali**.

A seconda della cinetica di una reazione si definisce: **reazione di ordine zero** una reazione la cui velocità risulta indipendente dalla concentrazione del substrato. Esempio tipico quando la concentrazione del substrato è presente in forte eccesso; in questo caso la velocità di reazione risulta indipendente dalla concentrazione del substrato, almeno per tempi brevi. In questo tipo di cinetica, la velocità di reazione rimane costante, mentre, il prodotto di reazione aumenta linearmente con il tempo.

Nelle **reazioni di primo ordine**, invece, la velocità di formazione del prodotto è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza reagente. Una **reazione di secondo ordine** dipende da due termini di concentrazione: la velocità di formazione del prodotto è direttamente proporzionale alla concentrazione di due substrati.

La cinetica delle reazioni enzimatiche è descritta e regolata **dall'equazione di Michaelis-Menten**, che consente di definire la concentrazione del substrato che risulta più opportuno per l'effettuazione delle misure.

La velocità di reazione aumenta con l'aumentare della [S] (reazione di ordine uno) fino a raggiungere un limite ( $V_{max}$ ) oltre il quale l'aumento del substrato non fa più aumentare la V

(reazione di ordine zero) (si arriva a saturazione e non esiste più enzima libero per la reazione). Questo effetto può essere spiegato dalla teoria di Michaelis-Menten secondo cui si deve formare un complesso ES (enzima-substrato) per un piccolo tempo definito prima di arrivare alla formazione del prodotto: aumentando la [S] aumenta la formazione del complesso ES, quindi la V di reazione, fino ad arrivare ad una [S] che satura l'enzima: in altri termini, tutto l'enzima presente è in forma di complesso ES, quindi la V di reazione rimane costante a meno che non si aumenti la [E].

Se si assume che  $E+S \rightleftharpoons ES$  sia una reazione reversibile, si può definire la costante di equilibrio per la reazione di dissociazione dello stesso complesso

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

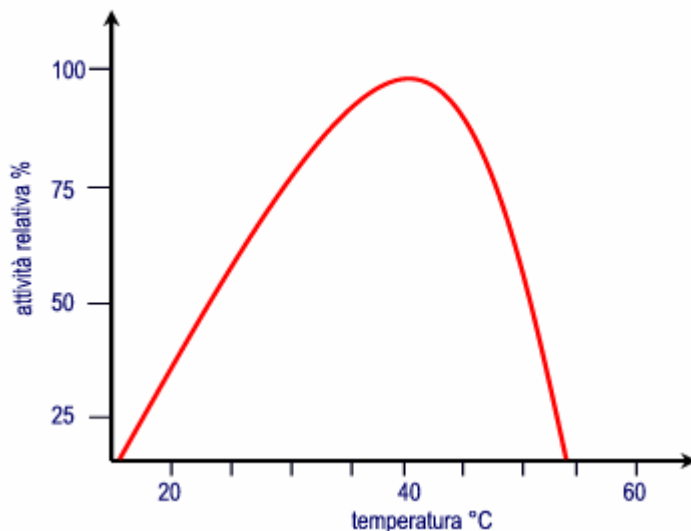
La  $K_m$  è detta costante di Michaelis-Menten: indica la [S] in cui metà dell'E è saturato, quindi corrisponde a quella [S] che determina una V pari alla metà della  $V_{max}$ .

## FATTORI DA TENERE IN CONSIDERAZIONE

### a) EFFETTO DELLE CONDIZIONI DI REAZIONE

Oltre alla integrità della molecola enzimatica (enzima, coenzima) influenzano l'attività dell'enzima anche le *condizioni in cui avviene la reazione*.

Tra le condizioni ambientali più importanti sono certamente la **temperatura** e il **PH** a cui la reazione avviene, la **concentrazione di substrato**, la presenza di **potenziatori o inibitori** dell'azione enzimatica.



La **temperatura**: con l'aumento della temperatura aumenta l'attività dell'enzima fino al raggiungimento di un picco; al di sopra di questa temperatura l'attività comincia di nuovo a decrescere, probabilmente a causa di una denaturazione dell'enzima.

Il **pH**: i diversi enzimi dimostrano un pH ottimale di attività, rilevante nella definizione delle condizioni in vitro di reazione e nei metodi di misurazione.

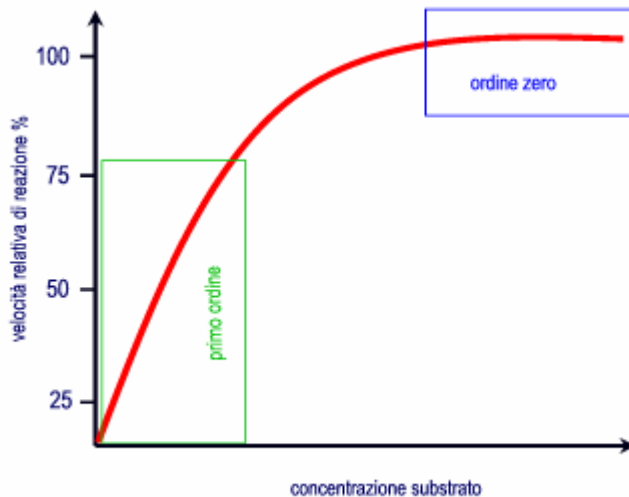
Un terzo fattore molto importante che condiziona la velocità di reazione è la **presenza di una quantità ottimale di substrato**.

La reazione procede inizialmente secondo una cinetica di primo ordine, caratterizzata da un eccesso di capacità catalitica dell'enzima rispetto al substrato presente. Intuitivamente, aumentando la concentrazione di substrato aumenterà proporzionalmente la quantità di prodotto per unità di tempo, fino a saturazione della capacità catalitica. Da questo punto in poi, poiché tutte le molecole di enzima sono impegnate nella reazione catalizzata, non si avranno ulteriori aumenti della velocità di reazione e si sarà istituita una cinetica di ordine zero.

Nella condizione di cinetica di ordine zero, la quantità di prodotto per unità di tempo è *funzione esclusivamente dell'attività enzimatica presente*. Sono quindi queste le **condizioni ideali per la misurazione dell'attività enzimatica: un eccesso di substrato e una correlazione tra prodotto e quantità dell'enzima presente secondo una cinetica di ordine zero**.

In questo tipo di misura l'attività dell'enzima viene valutata sulla base della quantità di substrato metabolizzato (in diminuzione in funzione del tempo) e/o della quantità di prodotto (in aumento in funzione del tempo). Poiché come regola generale è più semplice valutare un segnale in aumento che uno in diminuzione, viene in genere preferita la seconda ipotesi.





Per le misure delle attività enzimatiche devono quindi essere standardizzate le seguenti condizioni :

1. presenza in concentrazioni ottimali del substrato e di eventuali cofattori necessari alla reazione
2. condizioni ottimali e controllate di temperatura e pH
3. sensibilità e specificità del metodo di rilevazione del prodotto o del substrato risultante dalla reazione
4. condizioni sperimentali per cui la velocità di reazione sia funzione della sola concentrazione dell'enzima

#### b) LA CURVA CONCENTRAZIONE/EFFETTO

Le **determinazioni della quantità di enzima presente attraverso la misura delle velocità di reazione** sono in pratica delle **misure cinetiche**, in quanto misurano una trasformazione in un tempo prefissato.

Ci sono due criteri principali per effettuare questa misura:

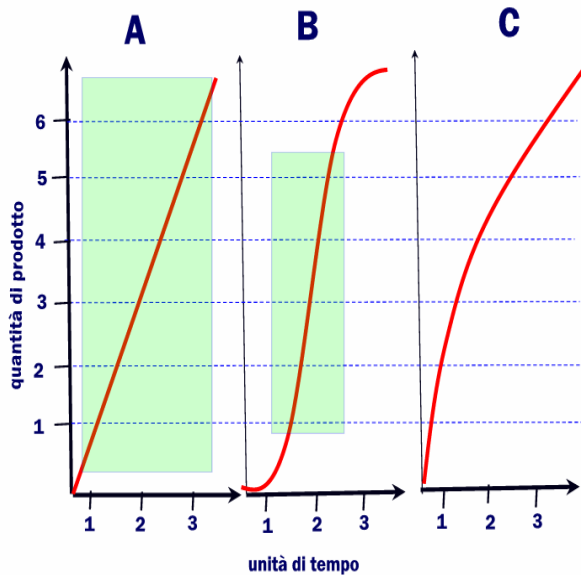
1. i **metodi a tempo determinato** (end point o fixed-time), in cui la variazione nel substrato o nel prodotto indotta dall'enzima viene misurata *dopo che la reazione è stata bloccata* a un tempo predeterminato;
2. i **metodi a monitoraggio continuo**, in cui la misura delle variazioni indotte dall'enzima viene *effettuata continuamente, per un periodo di tempo predefinito, senza bloccare la reazione.*

*Poiché si misura una velocità di reazione, un presupposto della validità del metodo è che la reazione catalizzata abbia una velocità di reazione costante nel tempo, per determinate condizioni. In effetti la velocità di reazione in alcune condizioni varia, per lo stesso enzima, in momenti diversi della reazione. In linea di massima, all'inizio della reazione, quando l'enzima da misurare viene messo in contatto con il substrato c'è una fase in cui la velocità di reazione è uguale a zero, ovvero nessuna molecola di substrato viene trasformata nel prodotto. Poi, man mano che il substrato entra in contatto con l'enzima la velocità di reazione aumenta progressivamente fino a quando tutte le molecole dell'enzima saranno impegnate nella reazione. Si osserva quindi un incremento della velocità di reazione fino a un massimo che rimane costante per un certo periodo: in questa fase della reazione enzimatica la quantità di prodotto per unità di tempo dipende (finché il substrato è in eccesso) solo dalla concentrazione dell'enzima. Si ha quindi una reazione di ordine zero, in quanto la velocità di reazione è funzione della potenza zero della concentrazione del substrato. Man mano che l'eccesso di substrato viene consumato la velocità di reazione declina a una funzione di primo ordine della concentrazione di substrato.*

**Nei dosaggi a monitoraggio continuo**, si assume che la velocità di reazione durante la fase a ordine zero rimanga costante per tutto il periodo dell'osservazione. Occorre quindi scegliere nell'impostazione del metodo di dosaggio, dopo aver studiato la cinetica della reazione, i tempi in cui la velocità di reazione per unità di enzima presente è costante

La figura mostra schematicamente **tre diverse possibili cinetiche**: in A, una cinetica lineare, in cui la quantità di prodotto formata per unità di tempo è costante e quindi il campionamento può avvenire in qualsiasi momento (area verde). In B invece una tipica curva con un ritardo iniziale di reazione e con una tendenza alla deplezione del substrato verso la fine del periodo osservato, in cui il monitoraggio per la valutazione dell'attività è corretto solo ove esiste un rapporto lineare tra tempo e prodotto: nella curva C invece la velocità di reazione varia con il tempo e quindi le misurazioni dell'enzima sarebbero diverse a seconda del tempo di campionamento scelto. In questo caso i metodi a monitoraggio continuo non sono consigliabile sono più utili i metodi a tempo fisso.

Quando, come nell'ipotesi C, le curve di reazione degli enzimi non sono lineari, si dovrà tentare, modulando opportunamente le condizioni sperimentali (temperatura, concentrazione del substrato, presenza di cofattori etc) di riportare la curva nelle condizioni A o, quanto meno B



**Un problema metodologico importante nei metodi a tempo fisso** ma meno rilevante nei metodi in cinetica enzimatica è posto dai campioni con concentrazioni di enzimi molto elevate, non infrequenti in molte patologie. Infatti nei metodi a tempo fisso il substrato pur se in eccesso, può essere trasformato dalle elevate concentrazioni di enzima *prima che il tempo prefissato sia trascorso*: si avrebbe in queste condizioni una sottostima della concentrazione di enzima. **Per contro nei metodi a monitoraggio continuo**, in cinetica, la velocità di reazione può essere tale, in presenza di elevate concentrazioni di enzima nel campione da dosare, da non consentire una misura affidabile. In questi casi le alternative sono due: o la diluizione del campione o, negli analizzatori che lo consentono, una riduzione del tempo di reazione

#### 5) MISURA, STANDARDIZZAZIONE DEL METODO E CONTROLLO DI QUALITÀ

In pratica molto spesso si usa per la determinazione del prodotto una reazione accoppiata (Fig. 5) che usa il prodotto della reazione in esame come substrato di ulteriori reazioni enzimatiche fino a produrre una sostanza con funzione di indicatore con la caratteristica di essere facilmente rilevabile colorimetricamente o fluorimetricamente.

In molti dosaggi viene usato come indicatore finale l'aumento o la diminuzione del  $\text{NAD}^+$  o del  $\text{NADH}$ , sostanze facilmente dosabili colorimetricamente con l'assorbanza a 340 nm. Un tipico esempio è il **metodo di Oliver-Rosalsky per la misura dell'attività della CK**:

<b>Creatina chinasi</b>	
<b>1.</b>	<b>creatina fosfato + ADP    creatina + ATP</b>
questa reazione è catalizzata dall'enzima CK presente nel campione da determinare. la quantità di ATP prodotta, nel tempo stabilito nel metodo è quindi funzione dell'attività dell'enzima CK presente nel campione. viene quindi accoppiata una seconda reazione:	
<b>esochinasi</b>	
<b>2.</b>	<b>glucosio + ATP    Glucosio 6P + ADP</b>
questa reazione è catalizzata dall'esochinasi, che è presente nel mezzo di reazione in quantità nota, costante e sufficiente ad assicurare la defosforilazione di tutto l'ATP prodotto dalla reazione 1. ne risulterà una quantità di glucosio fosfato equimolecolare rispetto all'ATP prodotto dalla reazione 1.	
<b>Glucosio 6-P deidrogenasi</b>	
<b>3.</b>	<b>glucosio 6P + <math>\text{NAD}^+</math>    6-fosfogluconato + NADH</b>
L'azione della glucosio 6-P deidrogenasi nella reazione 3 consente di produrre quantità di NADH equimolecolari con il glucosio 6P (reazione 2) e con l'ATP (reazione 1). L'NADH prodotto nella reazione 3 ha la funzione di indicatore.	

Con questo metodo, grazie all'accoppiamento di tre reazioni a cascata, viene prodotta una quantità di NADH equimolecolare con l'ATP prodotto dalla CK che agisce sulla creatina fosfato della reazione 1. Poiché la quantità di NADH prodotta è facilmente misurabile

colorimetricamente, da questa misura è possibile risalire all'attività del CK presente nel campione iniziale. Condizione essenziale perché le misure eseguite in questo modo siano affidabili è che non ci siano interferenze (ad es. causate da altri enzimi presenti nel campione) che possano produrre ATP nella reazione 1 o glucosio 6P nella reazione 2.

Se, nella precedente reazione registrassimo l'assorbanza a 340 nm nel corso della reazione, nelle condizioni ottimali per l'attività enzimatica, potremmo rilevare una curva della velocità di reazione formata da:

**Una fase iniziale** in cui la variazione dell'assorbanza appare molto lenta e in cui si raggiunge l'equilibrio termico e cinetico della reazione;

**Una fase lineare** in cui si instaura una cinetica di reazione di ordine zero e si osserva una correlazione lineare tra la variazione dell'assorbanza e l'attività enzimatica del campione. La pendenza di questo segmento lineare è funzione della quantità di enzima presente, e le misure dell'attività vanno fatte in questo intervallo.

**La terza fase** è caratterizzata dalla deplezione del substrato presente e quindi dalla mancanza di ulteriori modificazioni dell'assorbanza. Il tempo necessario per raggiungere questa fase dipende dalla attività enzimatica presente.

La molteplicità dei fattori che possono influenzare le reazioni enzimatiche ha giustificato il notevole sforzo fatto per la ottimizzazione, la standardizzazione e il controllo di qualità delle analisi di enzimologia clinica.

Nella messa a punto delle metodiche l'**ottimizzazione** consiste nel valutare quali condizioni di reazione (temperatura, pH, concentrazione del substrato, condizioni della lettura etc) sono in grado di dare una curva dose-risposta rettilinea su un range di attività enzimatiche più ampio e la massima ripetibilità del rapporto tra concentrazione e risposta.

Le **procedure di standardizzazione** sono basate sull'uso di standard di elevata purezza con attività catalitica certificata. Questi standard vengono usati per la costruzione delle curve dose/risposta e per il loro successivo controllo. Queste preparazioni sono disponibili per quasi tutti gli enzimi di interesse chimico clinico.

Assieme alla **standardizzazione dei materiali di riferimento** occorre, ovviamente anche standardizzare strettamente le **condizioni di reazione**.

Il **controllo di qualità nelle analisi enzimatiche** è particolarmente delicato in quanto il materiale di controllo può facilmente andare incontro a perdita di attività e quindi la cattiva performance può essere dovuta sia all'uscita di controllo del metodo sia alla perdita di attività del materiale di controllo.

Generalmente non sono usate preparazioni di enzimi ma piuttosto pools di sieri, dosati con metodi di riferimento, liofilizzati o congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Un ulteriore controllo della performance dei metodi enzimatici nel tempo si può ottenere ripetendo nella corsa successiva qualche campione della corsa precedente.

In linea di massima si considera accettabile, lavorando in enzimologia un CV da un giorno all'altro del 10% su campioni intorno ai limiti di riferimento e del 5% su campioni con attività enzimatiche elevate.

#### **d) LE UNITA' DI MISURA**

Per standardizzare le unità di misura indipendentemente dalle condizioni o dal substrato utilizzato, è stato introdotto il concetto di **UNITA' INTERNAZIONALE (UI)**, definita come **la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di  $1\mu\text{mol}$  ( $10^{-6}\text{mol}$ ) di substrato per minuto in condizioni ottimali a  $25^{\circ}\text{C}$ .**

L'UI non è una quantità assoluta, ma è **funzione del metodo usato**, pur se frutto di un processo di standardizzazione delle metodiche.

Questa grandezza ha portato ordine nella terminologia usata ma **non ha consentito la completa unificazione dei valori di riferimento**, che con i diversi metodi mantengono tuttora una variabilità consistente.

Un maggiore livello di standardizzazione si ottiene definendo l'attività enzimatica in termini di **attività specifica**, ovvero quantità di enzima per mg di proteina enzimatica o di **attività molecolare**, ovvero numero di molecole di substrato che possono essere trasformate da una molecola di enzima con un solo sito attivo o da un singolo sito per le molecole di enzima con diversi siti attivi, sempre in condizioni di misura ottimali.

La IUPAC e lo IUB hanno recentemente raccomandato l'introduzione di una nuova unità per definire l'attività enzimatica, denominata **Katal**. Il Katal rappresenta la produzione o la trasformazione di 1 mole per secondo di substrato e la concentrazione dell'enzima, compatibile con il sistema SI potrebbe essere definita in termini di katal/litro (kat/L)

# MISURAZIONE DEGLI ENZIMI IN TERMINI DI MASSA

La natura proteica dell'enzima rende possibile anche una sua misura in termini di massa, o utilizzando metodi immunometrici (radioimmunologici) o metodi di separazione cromatografica seguiti da determinazioni colorimetriche o fluorimetriche.

Solo pochi enzimi umani sono stati finora ottenuti in condizioni di purezza tali da consentire la loro utilizzazione come standards per le relative misure di massa. Ciononostante la loro capacità di combinarsi in maniera altamente specifica con determinati reagenti *consente di definire il numero di molecole presenti anche in presenza di preparazioni non del tutto purificate con tecniche di dosaggio dei ligandi*. Le informazioni così ottenute sono piuttosto misure dei *siti attivi nel legame*, piuttosto che misure dell'enzima; comunque non è risolto il problema chiave, in quanto si misurano siti attivi nel legame che non sempre e non necessariamente sono gli stessi di quelli relativi all'attività dell'enzima.

La formula utilizzabile per la misura della massa in base all'attività enzimatica è la seguente:

$$\text{Moli di enzima} = \frac{\text{moli di substrato trasformato} \times \text{secondo}}{\text{substrato trasformato} \times \text{secondo} \times \text{moli di enzima}}$$

e si basa sulla conoscenza **dell'attività molecolare dell'enzima** ovvero le moli di substrato che una mole di enzima è in condizione di trasformare per secondo. Naturalmente per definire questa grandezza occorre disporre di preparazioni di enzima di grande purezza, il che non è sempre possibile.

Un altro criterio per determinare le concentrazioni in termini di massa degli enzimi è basato su **saggi immunometrici**.

I metodi Immunometrici e immunoelettroforetici hanno consentito un notevole avanzamento nella misurazione di massa degli enzimi. Nell'interpretazione dei risultati occorre ricordare che nei metodi immunometrici sono effettivamente determinati i *determinanti antigenici* e non i *gruppi funzionali* sicché un enzima mutato nel gruppo funzionale ma non nel determinante antigenico sarebbe misurabile in termini di massa ma avrebbe un'attività assente.

Questo rilievo non costituisce necessariamente un handicap nella misura dell'enzima.

Infatti almeno in due diverse situazioni: 1. la presenza di precursori inattivi (vedi ad esempio il caso della tripsina, in cui i metodi immunometrici misurano tripsina+tripsinogeno) 2. la presenza di inibitori nel siero (come ad esempio nell'inibizione della colinesterasi da parte degli esteri organofosforici) la misura dell'enzima in termini di massa assume un significato clinico ben preciso circa la produzione dell'enzima piuttosto che rispetto alla sua attività.

Un'altra condizione in cui la misura di massa (ottenuta ad esempio sottoponendo a elettroforesi un miscuglio di isoenzimi e valutando le masse relative dei diversi composti) riveste una notevole importanza clinica è quella della **definizione delle concentrazioni relative dei diversi isozimi presenti**.

Comunque le misure di massa soffrono del notevole svantaggio del costo molto maggiore e di una informatività nel complesso decisamente minore rispetto alle tecniche di misura dell'attività. Per questi motivi, con pochissime eccezioni e salvo la determinazione degli isozimi, la misura di massa degli enzimi riveste oggi scarso rilievo clinico-diagnostico.

## GLI ISOENZIMI

**Una determinata attività catalitica è generalmente dovuta a diverse forme di enzima.**

Le diverse forme di enzimi con la stessa attività si distinguono in **isoenzimi (veri) e in isoforme**.

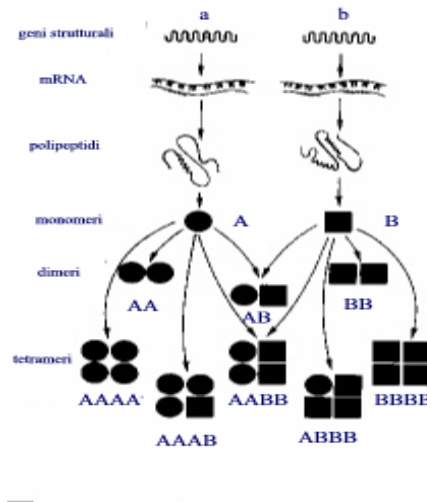
Il termine di **Isoenzima** si attribuisce *alle forme di proteine enzimatiche che originano da geni distinti*: si tratta quindi di forme multiple di enzima che possiedono la capacità di catalizzare una specifica reazione ma differiscono nella struttura (in quanto codificate da geni differenti) e quindi nelle caratteristiche funzionali.

Il termine di **isoforme** viene invece attribuito a *proteine enzimatiche che riconoscono la loro diversità in cause non genetiche*, quali ad esempio modificazioni post-traslazionali diverse.

Oltre agli isoenzimi di origine genetica, esistono delle molteplici **forme molecolari differenti nei diversi individui dovute a una variabilità allelica** (Allelozimi). La variabilità allelica di molti enzimi è notevole e di rilevante importanza patogenetica. Alcuni enzimi, come ad esempio la G6PD dimostrano una variabilità allelica notevole (oltre 200 alleloenzimi) con importanti differenze di incidenza delle varianti nelle diverse popolazioni. Per altri enzimi (ad esempio la LD) le varianti alleliche sono piuttosto rare.

Queste differenze alleliche individuali sono alla base di differenze individuali nel metabolismo e in definitiva della individualità del fenotipo biochimico.

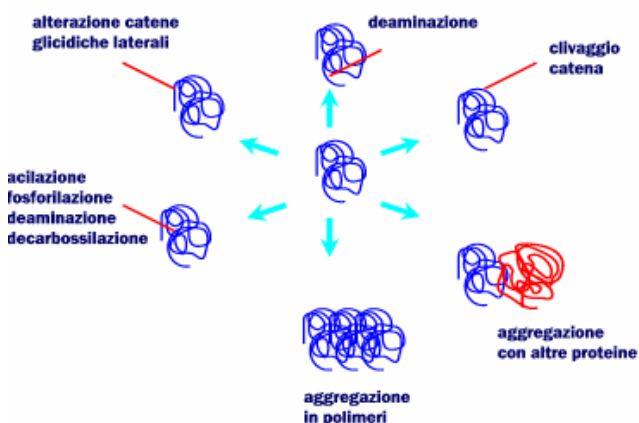
Un altro fattore importante dell'origine genetica degli isoenzimi è la **struttura oligomerica della proteina enzimatica**. In questo caso, la presenza di unità dimeriche o tetrameriche formate da monomeri codificati da differenti geni strutturali comporta la formazione di un *numero predefinito di molecole ibride*; un esempio tipico sono gli isozimi della CK e della LD.



Le **cause post-translazionali** (non genetiche) di modificazione delle molecole enzimatiche danno luogo a isoforme che possono differire sostanzialmente dall'enzima nativo sia per struttura chimica che per attività.

Si tratta generalmente di alterazioni della struttura proteica, tra le quali assumono importanza le seguenti modificazioni:

1. Aggregazione di diverse molecole di enzima, con formazione di un aggregato di PM multiplo rispetto alla molecola nativa
2. Combinazione con altre proteine, in particolare immunoglobuline sieriche, con formazione di "macro" molecole di enzimi. Evento particolarmente frequente e clinicamente significativo per amilasi, LD CK ALP, AST.
3. Modificazioni della struttura primaria del polipeptide (acilazione, fosforilazione, ossidazione dei gruppi sulfidrilici, clivaggio di parte della catena) e conseguenti alterazioni della conformazione proteica
4. Modificazioni della catena laterale glucidica, quando presente



La distribuzione degli enzimi e dei relativi isoenzimi *non è uniforme nelle diverse cellule o tessuti*: al contrario il corredo enzimatico è del tutto *caratteristico in quanto strettamente correlato alla funzione svolta*. La specificità nella distribuzione degli enzimi e degli isozimi veri nelle cellule e tessuti costituisce la base dell'enzimologia diagnostica.

Le differenze nella struttura chimica e nei determinanti antigenici degli isozimi e delle isoforme sono alla base delle tecniche che ne consentono la misura differenziata. Anche in questo settore, come in molti altri, le tecniche di biologia molecolare hanno rivoluzionato l'approccio alla conoscenza degli isoenzimi. Restano comunque tuttora in uso, in campo chimico clinico molte tecniche tradizionali, basate sulla elettroforesi zonale, sulla cromatografia a scambio ionico, sulla HPLC. I metodi immunochimici sono particolarmente efficaci per gli isozimi che derivano da loci multipli, che dimostrano la massima differenza antigenica. Ampiamente usati i dosaggi immunometrici, l'immunodiffusione, l'immuno-elettroforesi. Metodi alternativi di dosaggio degli isoenzimi consistono nella inattivazione selettiva in condizioni controllate di un isozima e quindi nella valutazione dell'attività residua o nell'immunoinibizione, con la stessa logica operativa.



## GLI ENZIMI DI INTERESSE DIAGNOSTICO

Di gran lunga più importante dal punto di vista chimico clinico è lo studio delle attività enzimatiche **nel sangue**. Nel plasma possono essere presenti enzimi specifici, ovvero che svolgono la loro funzione a livello ematico (esempio tipico gli enzimi interessati nella coagulazione) enzimi secreti nel sangue e che svolgono la loro funzione prevalentemente in altri tessuti ed enzimi cellulari che svolgono invece delle funzioni intracellulari ma che vengono riversati nel sangue in seguito al normale turnover cellulare. Altri enzimi sono invece secreti all'esterno (ad esempio gli enzimi digestivi); questi possono essere dosati nel sangue (oltre che nei secreti) o in quanto riassorbiti dall'esterno o in quanto immessi in circolo ad opera del normale catabolismo cellulare.

### Enzimi nel sangue

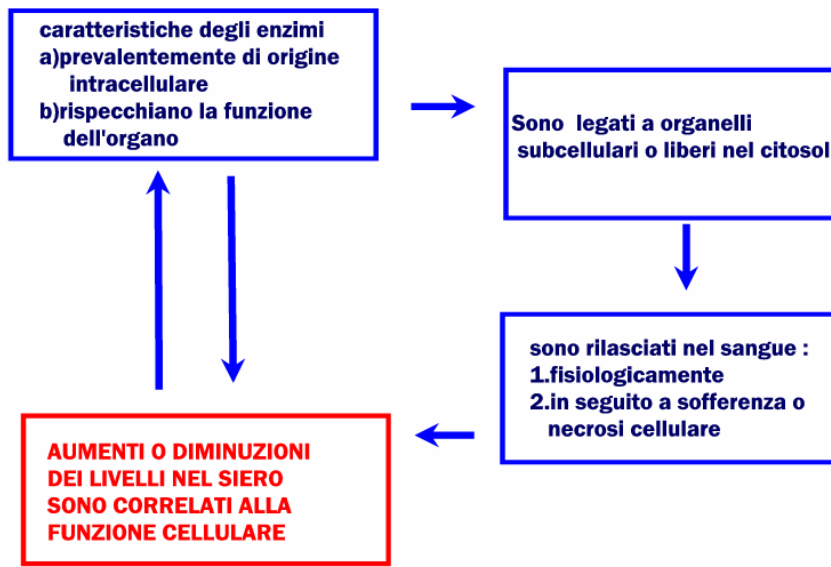
CLASSIFICAZIONE	ESEMPI
Enzimi Plasma-Specifici	Procoagulanti: trombina, fattore XII ( <i>Hageman factor</i> ), fattore X ( <i>Stuart-Prower factor</i> ), etc. enzimi Fibrinolitici o precursori: plasminogeno, proattivatore plasminogeno
Enzimi Secreti	Lipasi ( <i>ghiandole salivari, gastriche oxintiche e pancreas</i> ), $\alpha$ -amilasi ( <i>da ghiandole salivari e pancreas</i> ) tripsinogeno, colinesterasi, fosfatasi acida prostatica, antigene prostata-specifico
Enzimi Cellulari	Lattato deidrogenasi, aminotransferasi, fosfatasi acida ossea e alkalina, creatina chinasi, gamma glutamiltrasferasi etc

All'interno delle cellule, gli enzimi potranno essere presenti liberi nel citoplasma cellulare oppure essere contenuti in (o comunque legati a) organelli subcellulari, quali mitocondri, membrana cellulare ecc.

### Localizzazione intracellulare di alcuni enzimi

ORGANELLO	ENZIMA
Mitocondri	Aspartato Aminotransferasi (AST), Isoenzima Mitocondriale Creatina Kinasi (CK), Isoenzima Mitocondriale
Citoplasma	Aspartato Aminotransferasi, Isoenzima Citosolico Alanina Aminotransferasi (ALT) Creatina Kinasi Isoenzimi, CK 1-3
Granuli citoplasmatici	Lattato Deidrogenasi Isoenzimi, LD1-5
Lisosomi,	Fosfatasi Acida (ACP)
Zimogeno	Amilasi (AMY) Lipasi (Lip) Tripsina Immunoreattiva (IRT)
Retic. Endoplasmico	Gamma-Glutamil Transferasi (GGT)
Membrana Cellulare	Fosfatasi Alkalina (ALP) Gamma-Glutamil Transferasi (GGT) Acetilcolina Esterasi (ACE)

SCHEMA LOGICO ENZIMI NELLE CELLULE E NEL LEC



Come conseguenza logica di questi assunti, **gli aumenti o le diminuzioni di attività enzimatiche sieriche sono sempre direttamente correlati con alterazioni della funzione cellulare**.

## I FLUSSI DI INGRESSO DELL'ENZIMA NEL SANGUE

### a) Uscita degli enzimi dalle cellule

Con qualche semplificazione, si può affermare che il processo di uscita dell'enzima dalle cellule e il suo ingresso nell'ECF e nel sangue sia *condizionato dalla membrana cellulare*. I processi che tendono a danneggiare la funzionalità (principalmente diminuendone, con vari meccanismi il principale dei quali è l'anossia, la disponibilità energetica) la rendono più permeabile e, se persistenti ne possono causare la irreversibile distruzione. Poiché la concentrazione intracellulare degli enzimi è elevatissima in confronto a quella extracellulare, ne deriva, *anche di fronte a lesioni di scarsa estensione, un aumento rilevante della concentrazione plasmatica dell'enzima*.

Nel processo di progressivo aumento della permeabilità della membrana di fronte a fattori patogeni, *le prime molecole a passare nell'ECF sono quelle a più basso peso molecolare*; quindi le proteine -e gli enzimi- in ragione inversa alla loro massa.

Nei tessuti altamente vascularizzati, come ad esempio il fegato, il passaggio dell'enzima nell'ECF è probabilmente diretto, mentre in tessuti come il muscolo striato è probabile che l'enzima passi prima nel sistema linfatico e da questo passi poi al sangue. In linea di massima la presenza di un circolo sanguigno pervio ed efficiente costituisce un fattore che facilita il passaggio tessuto-sangue, mentre l'assenza o il blocco della circolazione sanguigna (come si osserva ad esempio nelle necrosi tessutali ampie) comporta un processo di diffusione degli enzimi cellulari più lento e un aumento nel sangue differito nel tempo.

Il passaggio degli enzimi all'esterno della cellula, nell'ECF, è anche *condizionato dalla localizzazione intracellulare delle molecole enzimatiche*: quindi, *i primi enzimi a riversarsi nell'ECF saranno quelli presenti nel citosol*; questi enzimi saranno i marker più precoci del danno cellulare, e indicheranno una fase in cui il danno può ancora essere reversibile. *Quando compaiono nell'ECF gli enzimi legati agli organelli subcellulari* si potrà presumere un danno cellulare esteso, con morte della cellula.

### b) Alterata produzione degli enzimi.

Un aumento della produzione di enzimi può essere messo in conto a diversi fattori, fisiologici e patologici:

*Fattori fisiologici*: aumenti di attività in seguito a cicli funzionali (accrescimento, gravidanza, attività muscolare): un tipico esempio è l'aumento di attività in seguito **periodi di accrescimento e apposizione ossea** (aumento attività osteoblastica) con relativo aumento dell'attività della ALP o in seguito alla gravidanza (aumento della produzione di Alp da parte della placenta).

*Fattori patologici*: **induzione di attività enzimatica** ad opera di fattori endogeni, quali ad esempio l'ostruzione biliare e l'iperbilirubinemia che stimolano la produzione di ALP da parte del fegato o di fattori esogeni, quali ad esempio l'alcol o diversi farmaci, che stimolano la produzione di GGT da parte del fegato.

La causa più frequente di **aumento dell'attività enzimatica non legata a danno cellulare** è comunque l'aumento della massa di cellule che producono un determinato enzima: ad es l'aumento della Acp prostatica nel caso di adenoma prostatico o del PSA nel caso di carcinoma prostatico.

## LA CLEARANCE DEGLI ENZIMI

Il meccanismo principale della eliminazione degli enzimi è quello della preventiva inattivazione della molecola nel plasma, seguita da una rimozione delle molecole inattive prevalentemente ad opera del SRE.

Il processo di clearance nel suo complesso appare piuttosto rapido, e le semivite degli enzimi interessati appaiono in molti casi dell'ordine di poche ore. Tempi di dimezzamento di alcuni enzimi sierici nell'uomo

Enzima	t.1/2 h	P M	Enzima	t.1/2 h	P M
<b>Alanina aminotransferasi</b>	50	110000	<b>Creatina kinasi</b>		
<b>Aspartatoaminotransferasi</b>	50	110000	isoenzimi, dopo infarto	12	-
Isoenzimi, dopo infarto	12	-	CK-3 (CK-MM)	20	85 000
Citoplasmico isoenzima	14	120 000	CK-2 (CK-MB)	10	87 000
Mitocondriale isoenzima	86	100 000	CK-1 (CK-BB)	3	88 400
<b>Lattato deidrogenasi</b>			<b>Fosfatasi Alcalina</b>		
LD 1	107	135 000	Intestinale	< 1	-
LD-5	10	135 000	Ossso	40	-
			Placenta	170	120 000

Una eccezione a questo meccanismo generale di biotrasformazione ed escrezione è costituita dall'Amilasi, un enzima con PM piuttosto basso che viene, oltre ai predetti meccanismi di inattivazione, anche escreto per via renale come molecola attiva.

Le attività enzimatiche che si osservano nelle urine, ad eccezione dell'amilasuria, sono legate alla lisi delle cellule di sfaldamento o di altre cellule fisiologicamente o patologicamente presenti e al successivo rilascio degli enzimi nelle urine.

## IL MECCANISMO DELL' AUMENTO DELLA CONCENTRAZIONE DI ENZIMA NEL SANGUE

In Condizioni normali le concentrazioni plasmatiche dell'enzima sono mantenute abbastanza stabili, con variazioni intraindividuali di poco conto, dell'ordine del 10-12 % e variazioni

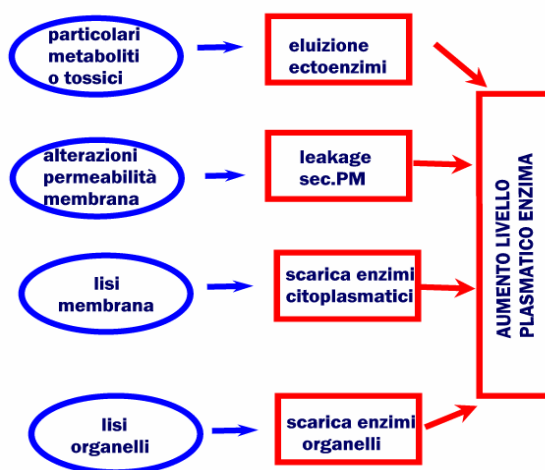
interindividuali più significative e correlabili, per i diversi enzimi, a precise variabili fisiopatologiche ( massa muscolare per la CK o l'AST; età per l' ALP ,etc.) .

In condizioni normali entra nell'ECF una certa quantità di enzima che viene rimossa ad opera dei diversi meccanismi che condizionano la clearance dal siero della molecola enzimatica. Questi meccanismi sono fondamentalmente tre: il catabolismo, l'inattivazione della molecola ad opera principalmente del SRE e del fegato e l'escrezione renale della molecola .

In linea di massima questi meccanismi catabolici hanno una limitata capacità di adattamento, specie nei confronti di aumenti improvvisi del carico. **Quando la dismissione dell'enzima dalle cellule aumenta oltre un certo limite, i meccanismi catabolici non riescono più ad adattarsi e quindi aumenta la concentrazione dell'enzima.** La clearance renale dell'enzima riveste una importanza secondaria, salvo che nel caso dell'amilasi, l'unico enzima di interesse clinico ad essere escreto nelle urine. La riduzione dei meccanismi di inattivazione della molecola, prevalentemente localizzati nelle cellule epatiche e del SRE può rivestire una certa importanza fisiopatologica in caso di grave insufficienza epatica ed essere alla base di un aumento delle concentrazioni ematiche.

Nel complesso la modulazione delle vie cataboliche non riveste una grande importanza fisiopatologica, proprio in quanto le dimensioni del fenomeno dell'immissione in circolo dell'enzima da parte delle cellule danneggiate sono enormemente più rilevanti delle possibili variazioni dei sistemi catabolici.

Quindi il momento del passaggio dalla cellula al fluido extracellulare è quello che assume, nella patogenesi del movimento enzimatico un rilievo assolutamente prevalente



Si tratta di un processo complesso con almeno tre componenti principali (eluizione degli ectoenzimi, alterazioni della membrana, necrosi cellulare), ciascuna delle quali ha uno specifico significato e valore in termini fisiopatologici e di valutazione della gravità del quadro.

Un aumento della sintesi di un enzima è di regola correlato a un aumento della massa delle cellule che lo producono: si può osservare in condizioni del tutto fisiologiche, come ad esempio per gli enzimi muscolari (CK,AST) in corso di allenamento e aumento della massa muscolare o in corso di accrescimento osseo (ALP): ovvero in condizioni patologiche, quando si osservi la proliferazione di un tessuto che fisiologicamente produce un enzima. In questo caso l'attività enzimatica viene ad assumere il valore di un marker di neoplasia; un esempio tipico è l'aumento della ACP in caso di neoplasie della prostata.

L'enzimologia diagnostica si interessa anche delle diminuzioni delle attività enzimatiche. Le diminuzioni della sintesi sono legate molto spesso a enzimopatie ed enzimopenie genetiche; possono essere legate a fattori acquisiti, come la cirrosi epatica o intossicazioni diverse.

## Ricapitolando: fattori che influenzano il livello plasmatico di un enzima

### 1. CLEARANCE (SEMIVITA)

1.1 Clearance renale

1.2 Inattivazione e rimozione per endocitosi (CC Kupfer, epatociti, SRE etc)

### 2. PASSAGGIO CELLULA ► SANGUE

**2.1. Eluizione degli ectoenzimi** per aumento dell'azione detergente del sangue

#### 2.2 Diffusione attraverso la membrana Cellulare

2.2.1 per gradiente

2.2.2 a seconda del PM

#### 2.3 Necrosi della membrana cellulare

#### 2.4 Localizzazione intracellulare

2.4.1 Citoplasmatici: passaggio rapido (danno reversibile ?)

2.4.2 Lisosomiali: media rapidità

2.4.3 Mitocondriali: passaggio lento (danno irreversibile?)

#### 2.5 Passaggio diretto cellula ECF Sangue

#### 2.6 Passaggio indiretto cellula ECF Linfa Sangue

#### 2.7 Entità della circolazione sanguigna e linfatica

### 3. ALTERATA PRODUZIONE

#### 3.1 Diminuita produzione

#### 3.2 Aumentata produzione

3.2.1 induzione enzimatica

3.2.2 aumento massa cellule produttrici



## GLI ENZIMOGRAMMI D'ORGANO

I fattori che condizionano l'utilità diagnostica di un determinato enzima sono diversi:

1. La validità (sensibilità + specificità), ovvero la corrispondenza tra la modificazione della concentrazione plasmatica e un determinato evento fisiopatologico.
2. La proporzionalità tra entità della lesione tissutale e incremento dell'attività enzimatica nel sangue.
3. La persistenza dell'incremento per un periodo di tempo sufficiente a consentirne l'identificazione
4. La disponibilità di metodi accurati, precisi e di costo contenuto.

La presenza nelle cellule dell'organo di quantità di determinati enzimi molto superiori a quelle presenti nel sangue e/o di un pattern enzimatico o di isoenzimi specifico costituisce la base logica per la definizione di quadri enzimatici di organo. Gli enzimi in molti casi ( fegato, miocardio, prostata , osso) costituiscono dei marcatori di funzione e di lesione estremamente sensibili e specifici .

Nella tabella 14 sono indicate le correlazioni più significative tra localizzazione dei diversi enzimi e uso diagnostico degli stessi .

Naturalmente, non tutti gli enzimi sono marcatori di danno tissutale ugualmente accurati, sensibili e specifici.

**Un primo fattore discriminante in termini di specificità è la diffusione dell'enzima:** come è evidente dalla precedente tabella, un aumento della LD totale può essere ascritto a un danno muscolare, epatico, a patologie ematologiche e linfonodali. Per contro una alterazione della colinesterasi o della lipasi possono essere segno di patologia dei soli organi in cui queste attività enzimatiche sono rilevabili, e quindi fegato e pancreas, rispettivamente.

**Un fattore discriminante in termini di sensibilità è invece la massa del tessuto o dell'organo danneggiato assieme al gradiente tra concentrazione intracellulare ed extracellulare.**

Un esempio molto dimostrativo è il confronto tra la possibile significatività diagnostica della ALT come marcatore di danno epatico e quella della ACP prostatica come marcatore di danno prostatico: il gradiente epatocita/sangue dell'AST è di circa 7.000:1 e la massa delle cellule epatiche è di oltre 1000 g, sì che si è calcolato che anche una sola cellula su 750 distrutta può comportare un significativo aumento della ALT sierica.

Per contro il gradiente cellula prostatica/sangue della ACP è di circa 1000:1 e il peso dell'organo è di circa 20 g: per avere un significativo aumento nel sangue deve essere distrutta una percentuale di cellule ben più elevata (1:75); la prostata ha una massa di oltre 50 volte minore del fegato e in termini di danno percentuale rispetto al fegato, per avere un movimento enzimatico significativo dovrebbe verificarsi un danno ben più grave.

Poiché l'entità dell'aumento dei livelli enzimatici nel sangue è funzione sia della quantità dell'enzima rilasciato nell'ECF, sia della sua clearance e semivita, due enzimi con uguale gradiente cellula/sangue ma con semivite diverse dimostrano una *sensibilità diagnostica proporzionale alla lunghezza della semivita*: a parità di ingresso nel sangue, quello con semivita più lunga si accumulerà in quantità maggiore e sarà di più facile interpretazione diagnostica. Valga come esempio quello della isocitratodeidrogenasi cardiaca, con un elevato gradiente miocardio/sangue, ma di scarso uso clinico in quanto viene rapidamente inattivata non appena penetra nell'ECF.

ENZIMA	SORGENTI PRINCIPALI	APPLICAZIONI CLINICHE
Aldolasi	Muscolo Scheletrico, Miocardio	Miopatie, necrosi muscolari
Amilasi	Pancreas, Ghiandole Salivari, Ovaio	Pancreatiti, neoplasie pancreatiche
Alanina Aminotransferasi	Fegato, Muscolo Scheletrico, Miocardio	Epatiti, epatopatie diverse
Aspartato Aminotrasferasi	Fegato, Muscolo Scheletrico, Miocardio, Rene, Eritrociti, Pancreas, Milza, Polmone	Epatiti, malattie muscolari, infarto miocardico
Antigene Prostatico-Specifico	Prostata	Adenoma e carcinoma prostatico
Colinesterasi	Fegato	Insuff. Epatica, sensib suxametonio, avvelenamento esteri fosforici
Creatina Kinasi	Muscolo Scheletrico, Miocardio, Muscolo Liscio, Cervello	malattie muscolari, infarto miocardico
$\gamma$ -Glutamilttransferasi	Fegato, Rene, Pancreas, Intestino	Epatopatie, colestasi
Fosfatasi Alcalina	Fegato, Osso, Mucosa Intestinale Placenta, Rene	Epatopatie, colestasi
Fosfatasi Acida	Prostata, Eritrociti Osso	Ca prostata, malattie ossee
Lattato Deidrogenasi	Miocardio, Fegato, Muscolo Scheletrico, Eritrociti. Piastrine. Linfonodi. Cervello. Polmone	malattie muscolari, infarto miocardico Epatopatie
5'-Nucleotidasi	Tratto Epatobiliare	Epatopatie, colestasi
Tripsina	Pancreas	Malattie pancreas, fibrosi cistica
Lipasi	Pancreas	Malattie pancreas

Un fattore discriminante in termini di **gravità della lesione** è la localizzazione intracellulare degli enzimi. → La comparsa di enzimi legati a organelli cellulari, in particolare mitocondri è indice certo di necrosi cellulare con lisi completa della membrana e la diffusione nell'ECF dell'enzima citosolico e di quello contenuto degli organelli.

In diversi casi l'enzima presente nel citosol e quello presente negli organelli sono due isozimi (v. oltre, aspartato aminotrasferasi) e dal relativo momento di comparsa si possono fare valutazioni sull'evoluzione della malattia. E' comunque sempre opportuno, quando si deve valutare l'entità della lesione a carico di organi o tessuti, accoppiare nel pannello analitico enzimi tipicamente citosolici con enzimi tipicamente contenuti negli organelli.

ENZIMA	membrana	citosol	granuli	mitocondri	microsomi	nucleo
ASPARTATO TRANSAMINASI		+		+		
ALANINA TRANSAMINASI		+				
CREATINA KINASI		+		+		
LATTATO DEIDROGENASI		+	+			
LEUCINA AMINOPEPTIDASI		+				
ARGINASI				+	+	+
ALDOLASI		+				+
-γ-GLUTAMILTRASFERASI	+				+	
COLINESTERASI	+					
FOSFATASI ALCALINA	+				+	
FOSFATASI ACIDA			+	+		
5-NUCLEOTIDASI	+					
AMILASI			+			
LIPASI			+			
TRIPSINA			+			

# MARCATORI DEL DANNO MIOCARDICO

Non si dispone finora di un singolo analita in condizione di correlarsi, sicuramente e definitivamente, con le condizioni anatomo-funzionali del muscolo cardiaco. Un tale indicatore ideale dovrebbe avere tre caratteristiche principali: quella di un **elevato gradiente di concentrazione** nel siero tra soggetti sani e affetti e quello di una **estrema precocità della sua comparsa** nel siero in caso di malattia assieme a una sua **persistenza per un periodo sufficientemente lungo** da monitorare l'andamento della malattia. Un'altra importante caratteristica sarebbe quella della specificità per la patologia miocardica.

Come spesso accade in medicina di laboratorio, in assenza di un singolo marker ideale, le informazioni necessarie vengono comunque raccolte utilizzando pannelli di analiti e **integrando i diversi segmenti di informazione**. Ciò rende l'uso dei test più complesso e **richiede quindi un maggior rigore logico**.

Per valutare l'uso dei markers di laboratorio, occorre anzitutto valutare il contesto clinico di fronte a cui il medico viene più frequentemente a trovarsi: il problema del soggetto con sospetta patologia miocardica può essere schematizzato in tre ipotesi principali e in alcune subordinate:

1. **La sintomatologia dolorosa stenocardica origina da una insufficienza coronarica e in questo caso è causata da una semplice ischemia o sono già presenti lesioni o necrosi cellulari?**
2. **In caso di necrosi accertata, il tempo decorso dall'inizio della patologia è compreso nella finestra temporale che consente di istituire una terapia ripercussiva efficace?**
3. **Quale è l'estensione della zona necrotica?**
4. **In presenza di sintomatologia dolorosa pregressa, è possibile diagnosticare un eventuale evento infartuale?**

Secondo la definizione del WHO la diagnosi di infarto deve essere basata sulla presenza di almeno due sintomi della triade **Dolore, alterazioni ECG tipiche e positività dei marker miocardici**.

Ciò in quanto si osservano molti quadri del tutto atipici: ad esempio, dal 10 al 30 % dei soggetti con IMA non riferiscono dolore tipico; dal 30 al 50 % dei soggetti non hanno quadri ECG diagnostici di IMA; solo il 25% dei pazienti hanno i valori degli enzimi "miocardici" CK o CK-MB elevati *nel primo campione esaminato all'atto del ricovero*. E' quindi evidente che basare la diagnosi solo su questi segni può portare a errori e ritardi.

Ovviamente poco si può fare per aumentare la specificità e la sensibilità diagnostica sul versante della rilevazione clinica o dell'esame ECG, mentre **è possibile migliorare il livello di validità (specificità + sensibilità) dei diversi test di laboratorio (presi singolarmente e come pannello) che consentono di porre diagnosi di IMA**.

Aumentare la validità diagnostica ( e l'utilità clinica) dei test significa anche (soprattutto) **aumentare la precocità della diagnosi rispetto all'inizio dell'ischemia miocardica**. Ciò ha una rilevanza notevole in termini di impostazione della terapia e quindi della prognosi del paziente. Infatti anche **poche decine di minuti di anticipo sulla diagnosi possono comportare significativi miglioramenti nella prognosi**.

Sarebbe certamente utile disporre di marcatori delle fasi "preischemiche" dell'insufficienza coronarica. Considerando una fase iniziale in cui prevalgono *fenomeni infiammatori locali*, si potrebbe ipotizzare un di alcuni markers di infiammazione; ma le ricerche fatte su Proteina C Reattiva e Sostanza Amiloide A, pur promettenti non hanno validato in maniera definitiva questi test.

I fenomeni collegati alla *formazione del trombo* ( monomeri liberi della fibrina, P-selectina) sono sembrati più promettenti, ma ancora non sono di uso clinico.

I fenomeni emodinamici seguenti alla riduzione del calibro arterioso sono valutabili solo con indagini morfofunzionali e perfusionali.

**Quindi non disponiamo finora di un marker biochimico che preceda la comparsa della sintomatologia clinica.**

La fisiopatologia della lesione ischemica

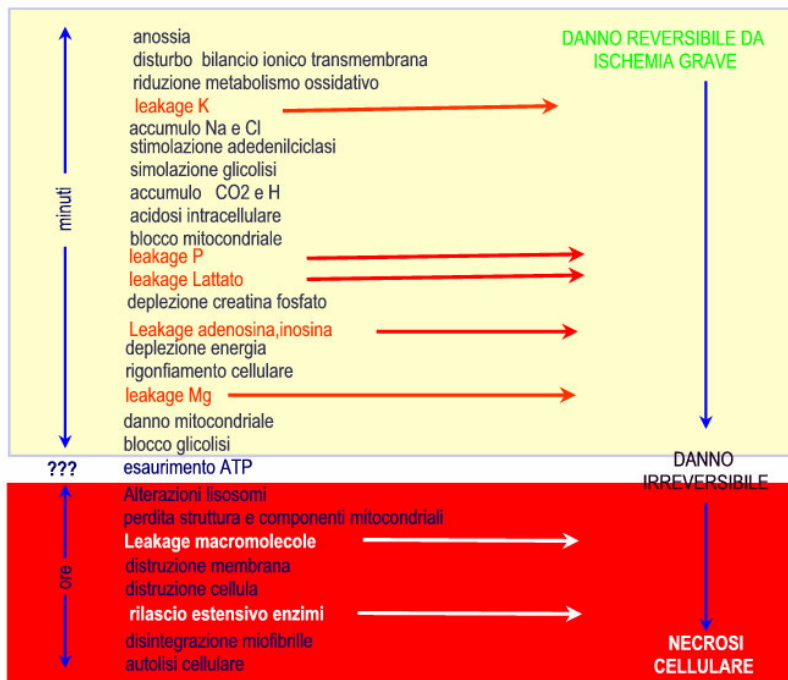
La condizione iniziale è quella della presenza di una placca ateromastica subendoteliale: queste placche sono generalmente ricoperte da una capsula fibrosa che può rompersi creando una soluzione di continuo dell'intima ed esposizione del materiale lipidico e cellulare della placca, su cui si forma il trombo : una volta formatosi questo cresce più o meno lentamente fino a occludere completamente l'arteria. Alla lesione anossica che consegue nel tessuto irrorato dal ramo occluso seguono una serie di conseguenze ,

immediate e a medio termine, di patologia cellulare.

Anzitutto la riduzione del metabolismo ossidativo cellulare comporta una disfunzione della pompa del sodio della membrana, con passaggio di K nell'ECF e accumulo di Na e Cl endocellulare. L'acidosi metabolica da accumulo di CO<sub>2</sub> e di H provoca un blocco, per ora reversibile dell'attività mitocondriale con deplezione della fosfocreatina, dell'adenina e dell'inosina. Il progressivo esaurimento dei legami ad alta energia delle cellule comporta il blocco della glicolisi e un grave danno mitocondriale. Fino a questo momento, che in termini temporali è di alcuni minuti dal blocco, le alterazioni provocate dall'anossia sono del tutto reversibili.

In questa fase vengono riversati dalla cellula miocardica nell'ECF diversi metaboliti e ioni (Lattato, adenosina, K Mg ecc), nessuno dei quali sembra però essere in condizione di determinare alterazioni ematochimiche rilevabili.

Con il completo esaurimento dell'ATP cominciano a verificarsi i danni cellulari irreversibili, caratterizzati



Patogenesi della lesione cellulare da ischemia : sequenza delle alterazioni cellulari da anossia:Le frecce rosse orizzontali indicano la immissione nell'ECF di metaboliti e ioni endocellulari. A sx è indicato l'intervallo temporale in cui queste alterazioni hanno luogo, a dx la natura, reversibile o irreversibile della lesione biochimica

dalle alterazioni dei lisosomi e dei mitocondri : comincia il leakage verso l'ECF delle macromolecole , la membrana cellulare viene distrutta con un massivo rilascio degli enzimi citoplasmatici, nucleari e mitocondriali e degli organelli.

Questa fase è caratterizzata, a differenza dalla precedente da una alterazione chimico-clinica significativa, dovuta al leakage di macromolecole ed enzimi caratteristici del tessuto miocardico.

Questa seconda fase ha una durata molto più lunga della precedente, dell'ordine di ore.

Infatti il miocardio è un organo che resiste molto meglio di altri all'ischemia. Nei modelli sperimentali il blocco del flusso sanguigno non provoca necrosi cellulare se non dopo 20-30 minuti di ischemia; e, se il blocco viene istituito in un tessuto miocardico in cui precedentemente era stato ridotto in maniera cronica il flusso, la necrosi cellulare ritarda ulteriormente, *fino a un'ora dopo il blocco*.

Inoltre anche la durata dell'insulto ischemico appare di importanza critica:

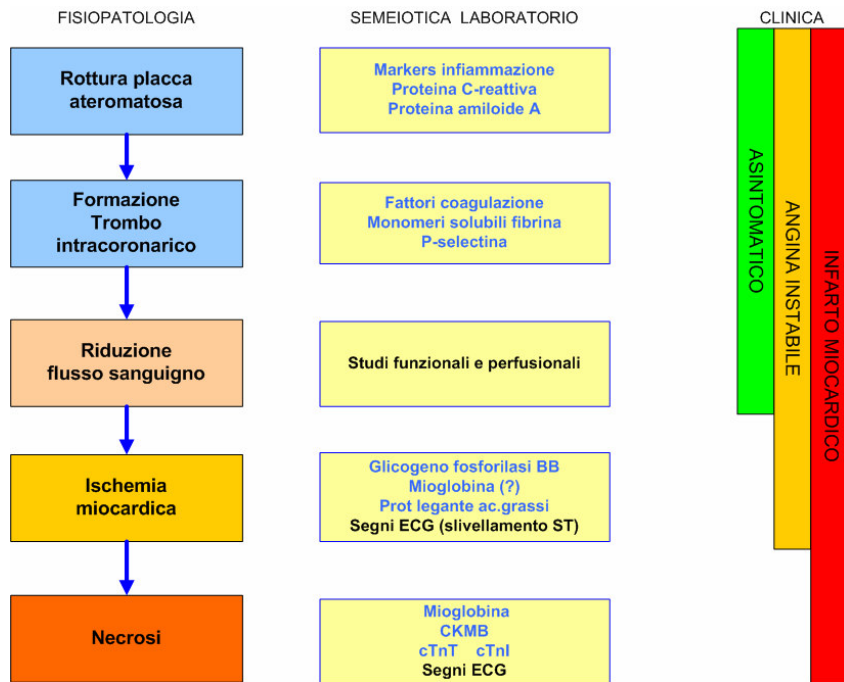
tre ore di ischemia comportano la necrosi dell' 80% delle cellule del territorio irrorato e solo dopo circa 6 ore si raggiunge il 100 % della necrosi cellulare.

I primi marker sono la **glicogeno fosforilasi**, isoenzima BB , la **mioglobina** e la **proteina legante gli acidi grassi** , che compaiono durante la fase di ischemia miocardica sintomatica.

**Il quadro laboratoristico completo però raggiunge la massima sensibilità e specificità diagnostica in caso di necrosi miocardica.**

Delle terapie possibili, la terapia trombolitica comporta, se somministrata entro la prima ora dall'inizio dei sintomi, una riduzione della mortalità del 50% e i pazienti trattati entro tre ore sono certamente quelli che ne traggono il maggior beneficio. Qualche beneficio della terapia trombolitica peraltro sembra esserci anche entro le 6 ore dall'inizio della sintomatologia dolorosa, mentre oltre questo limite i vantaggi appaiono del tutto opinabili.





Il laboratorio assume una grande importanza nella ischemia miocardica , con le alterazioni dell'isozima BB della glicogeno fosforilasi , della mioglobina e della proteina legante gli acidi grassi. I più tipici markers si positivizzano però solo quando si ha una necrosi miocardica. In questo contesto clinico diventa quindi assolutamente essenziale di:

- disporre di test di laboratorio in condizione di evidenziare precocemente la necrosi miocardica e
- contemporaneamente di utilizzare questi test secondo algoritmi diagnostici ben definiti che innalzino sensibilità e specificità diagnostiche dei singoli test.



### PROGRAMMA "DALLA PORTA ALLA TERAPIA"



### PROGRAMMA NACB "DAL BRACCIO ALLA RISPOSTA"

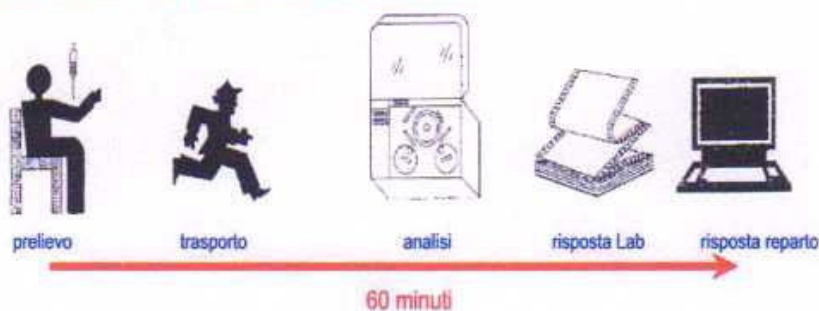


Figura 23 Obiettivi organizzativi e di Turn Around Time (TAT) per la diagnosi di laboratorio dell'ischemia miocardica secondo un programma centrato sulla clinica (National Heart Attack Alert Program USA) centrato sul Laboratorio (programma "Arm to Report") della National Academy Clinical Biochemistry USA)

La NACB, che certamente ha un interesse più centrato sul laboratorio ha invece posto come obiettivo quello di raggiungere un TAT di 60' (arm to report).

Il problema della diagnosi dell'IMA non è però solo quello di ottenere una risposta entro poche decine di minuti, ma anche quello di un elevato valore predittivo (positivo o negativo) di questa risposta.

E' infatti regola assoluta nella diagnosi di laboratorio dell'IMA che un singolo dosaggio negativo *non consenta assolutamente di escludere la diagnosi* Dufour et al (1989) hanno evidenziato che solo il 25% dei soggetti infartuati hanno un valore del CK o CK-MB elevato nel primo campione. Attualmente si tende quindi a ripetere i diversi dosaggi per un lasso di tempo che va da un minimo di tre a un massimo di 12 ore, a seconda del marker usato.

Quindi l'obiettivo di aumentare la sensibilità e specificità diagnostica dei marker miocardici può essere raggiunto solo utilizzando pannelli analitici ben definiti in termini di singoli analiti e di tempi di prelievo.

I marker miocardici sono rappresentati da enzimi o da proteine presenti nella cellula miocardica. Recentemente è stato studiato l'uso, come marker di infarto miocardico anche di proteine non di origine miocardica, ma correlate alla formazione del trombo, quali la *P-selectina*, un attivatore della coagulazione, *monomeri di fibrina* o altre proteine implicate nella formazione del trombo.

La specificità e la sensibilità dei markers miocardici è legata a diversi fattori, i principali dei quali sono:

1. **Peso molecolare** - condiziona il passaggio dall'interno della cellula all'ECF. Quindi in generale, i marker con PM minore hanno il picco nel sangue più precoce di quelli con PM maggiore
2. **Localizzazione intracellulare**: quelli citosolici generalmente sono più precoci di quelli strutturali o legati a organelli
3. **Clearance**: un tempo di dimezzamento basso tende a ridurre altezza e ampiezza del picco
4. **specificità miocardica** il marker deve esistere solo all'interno del miocita cardiaco.
5. **livelli plasmatici di riferimento** e differenza tra questi e i valori in patologia

## Marker miocardici

<b>•1. ENZIMI DI ORIGINE MIOCARDICA</b>
-Creatina kinasi totale CK
-Creatina kinasi isozima MB
-Aspartato tansaminasi AST
-Lattato deidrogenasi LD
-Lattato deidrogenasi Isoenzimi
-Glicogeno fosforilasi isoenzima BB
<b>•PROTEINE DI ORIGINE MIOCARDICA</b>
-Mioglobina
-Troponina I
-Troponina T

Fattori metabolici	Profilo lipoproteico Profilo metabolico: diabete, ipertrigliceridemia , NEFA etc Iperomocisteinemia Markers perossidazione lipidica Aumento viscosità
Fattori infiammatori	Hs CRP ICAM-1 VCAM-1 p-selectina
Fattori immunitari	Ab anti LDL Ab aanti HSP
Fattori coagulativi	Markers ipercoagulabilità : FBG D-Dimero, Fattore V Attivazione piastrinica Aumento fatt coagulaz : V-VII-VIII , Von Willebrand, XIII Diminuz fatt anticoag : Proteina S e C ,trombomodulina, AT III Mutazioni Protrombina

### GLICOGENO FOFORILASI, ISOZIMA BB

E' un enzima presente nel miocardio e nel cervello. Nel miocardio è presente nel reticolo sarcoplasmatico: in condizioni di ischemia perde il legame cogli organelli e diffonde nel citosol, donde passa in circolo. Aumenti significativi si osservano già alla terza ora dal dolore: inoltre appare significativamente aumentato anche nelle forme di angina stabile. In uno studio si è dimostrato il marker più sensibile dell'Ima nel corso delle prime 4 ore.

### MIOGLOBINA

La **mioglobina**, una proteina contenente eme che lega l'ossigeno all'interno del muscolo ha un peso molecolare di 18 kDa, abbastanza basso rispetto a quello delle molecole enzimatiche e quindi tale da *consentirle una facile e precoce uscita dalle cellule muscolari in casi di insulto anossico*. Ha una semivita piuttosto breve, di circa 4 ore, ed è rapidamente eliminata dal rene. I livelli di riferimento sono più alti negli uomini che nelle donne e sono correlati con la massa muscolare. Dimostra variazioni (10-15 %) da giorno a giorno e differenze razziali (maggiore nei soggetti di discendenza africana) significative. I valori plasmatici della mioglobina tendono ad aumentare nell'età avanzata, probabilmente per una diminuzione del filtrato glomerulare.

La mioglobina è un **marker molto precoce e sensibile (95-100%) ma poco specifico per la diagnosi di IMA**. Aumenta in maniera significativa entro 1-3 h dopo l'infarto, raggiunge un picco entro 4-12 h e scompare generalmente entro le 24 ore.

Il difetto della mioglobina è la sua bassa specificità: **aumenti consistenti si hanno in tutte le forme di trauma muscolare (da una contusione a una iniezione intramuscolare)**. Per ridurre i falsi positivi è stato proposto l'uso del dosaggio contemporaneo dell'anidraasi carbonica, isozima III che è presente nel muscolo scheletrico ma non in quello cardiaco. Un aumento contestuale della mioglobina e dell'anidraasi carbonica indica un danno a carico del muscolo scheletrico, mentre un aumento della mioglobina dissociato dell'aumento dell'anidraasi, indica un danno solo miocardico.

## CREATINA KINASI, CK

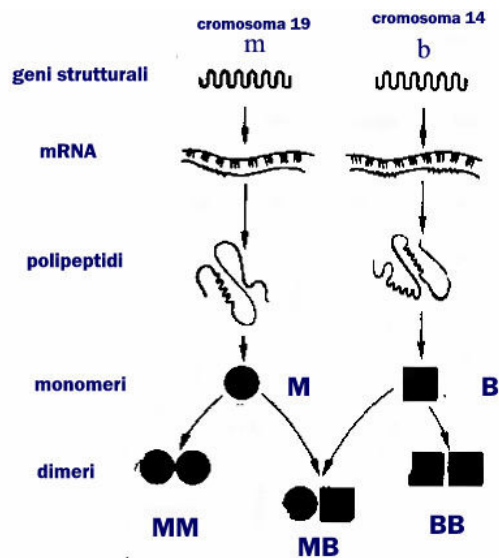
La CK catalizza la fosforilazione reversibile della creatina da parte dell'ATP. La fosfocreatina è presente nel muscolo in eccesso rispetto all'ATP: con la contrazione muscolare si consuma l'ATP e la CK catalizza la rifosforilazione dell'ADP. E' diffusa in diversi tessuti, in particolare nel tessuto miocardico, muscolare liscio e striato.

I diversi tessuti contengono caratteristiche concentrazioni sia di CK totale sia dei diversi isoizimi, e ciò consente in molti casi di identificare la fonte dell'enzima aumentato nel sangue

Contenuto di CK nei diversi tessuti:

tessuto	Plasma=1
•FEGATO	0
•RENE	10
•CERVELLO	1700
•CUORE	5000-8000
•MUSCOLO STRIATO	20000-30000
•MUSCOLO LISCIO	300-600

La molecola ha una struttura dimerica, composta da due subunità con PM ciascuna di circa 40.000, identificate con la lettera B (Brain) e M (Muscle) che sono prodotti di loci differenti situati rispettivamente sul cromosoma 14 e 19. Sono quindi possibili tre differenti combinazioni dimeriche: BB, BM e MM, definite in base alla mobilità elettroforetica anche CK-1, CK-2 e CK-3.



Genesi degli isoizimi della CK. I due geni strutturali, situati nei cromosomi 19 e 14 danno origine ai due monomeri M e B che, combinandosi formano gli isoenzimi MM BB e MB

Tessuto	CK totale(U/g)	CK-3 (MM) %	CK-2 (MB)%	CK-1 (BB) %
Muscolo Scheletrico	2500	98.9	1.1	0.06
Cervello	555	0	2.7	97.3
Miocardio	473	78.7	20.0	1.3
Stomaco	190	4.3		95.7
Intestino Tenue	112	1.2	0	98.8
Colon	138	2.1	0	97.8
Retto	267	1.2	0	98.8
Rene	32	2.8	0	97.2
Prostata	114	6	0	94
Utero	115	2.3	0	97.4

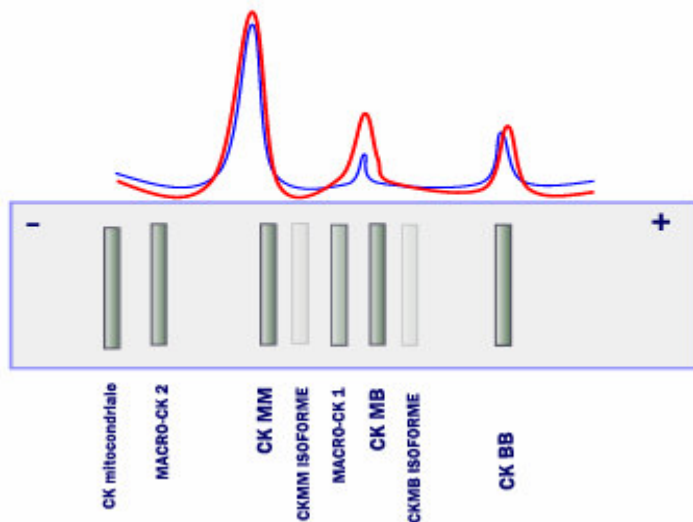


Fig 15 Elettroforesi e densitometria degli isoenzimi del CK. A partire dall'anodo si osservano i tre isoenzimi CK1 (CK-BB), CK2 (CK-MB) e CK3 (CK-MM). Tra CK-MM e CK MB si possono osservare isoforme del CK MB e tra CK-MB e CK-MM le isoforme della CK-MM.

Le Macro CK sono generalmente più spostate verso il catodo. La CK mitocondriale è la catodica delle isoforme.

Il tracciato densitometrico in alto rispecchia in blu un tracciato normale e in rosso un tracciato di infarto miocardico, con un incremento della frazione CK-MB. Nel tracciato non sono riportate eventuali isoforme

I tre isozimi BB, MM e MB sono tutti presenti nel citosol o associati a strutture miofibrillari. Possono essere presenti diverse isoforme, e in particolare quelle originate dal CKMM, denominate CKMM<sub>1</sub>, CKMM<sub>2</sub>, CKMM<sub>3</sub>, hanno scarso significato clinico. Possono anche essere presenti molecole complessate con Ig: si tratta delle cosiddette macroCK.

La macroCK1 è un complesso del CK-MM con IgG o IgA e migra elettroforeticamente tra le bande CK-MB e CK-BB. La prevalenza della isoforma MacroCK-1 nella popolazione di riferimento varia intorno al 2%, ed è associata con malattie gravi (neoplasie, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni, infezioni da HIV).

La MacroCK2 è invece una isoforma oligomerica mitocondriale con una prevalenza dallo 0.5 al 2.6%, associata anch'essa con malattie neoplastiche o epatiche gravi.

Ambedue le forme macromolecolari del Ck hanno una semivita più lunga delle forme dimeriche e quindi possono essere causa di un aumento dell'attività CK totale non legato a patologie muscolari o miocardiche.

Un quarto isozima è presente nella membrana mitocondriale, è codificato da un locus sul cromosoma 15 e costituisce circa il 10% dell'attività CK muscolare.

### VALORI DI RIFERIMENTO

La variabilità individuale è consistente e, in linea di massima, i valori del CK totale correlano con la massa e con l'attività muscolare dell'individuo. Generalmente i valori di riferimento sono più bassi nel sesso femminile, mentre sono notevolmente più elevati (x10) in epoca neonatale; I valori di riferimento nei soggetti di razza africana sono del 30 % più elevati che in quelli di razza europea. La semivita dell'isoenzima CK-MM è di circa 24 h, del CK-MB 12 h e del CK-BB 2 h

Adulto maschio: 24-195 u/l

Adulto femmina: 24-170 u/l

CK-MB normale <10 u/l

CK-MB Borderline 10-25 u/l

CK-MB Infarto mioc: >25 u/l

L'attività CK è aumentata in caso di esercizio muscolare vigoroso in condizione di anaerobiosi, mentre l'esercizio muscolare aerobico non interferisce con l'attività CK.

Cause frequenti di variabilità preanalitica del CK totale sono quindi l'attività fisica del paziente prima del prelievo.

Frequenti anche gli aumenti del CK dovuti a traumi muscolari anche minimi talora inavvertiti (iniezioni intramuscolari, ecchimosi etc.)



## PATOLOGIA

Il dosaggio del CK totale e il dosaggio dei diversi isozimi hanno una notevole rilevanza diagnostica nelle malattie cardiache, muscolari e in alcuni accidenti cerebrali.

### Malattie cardiache

La CK totale è elevata nel siero entro 3-6 ore dopo l'insorgenza del dolore stenocardico, per raggiungere il valore picco entro 18-30 h e per tornare rapidamente alla norma entro il 3°-4° giorno. Per escludere la possibilità di aumenti del CK di origine non miocardica (traumi, iniezioni intramuscolari, etc.) viene comunemente dosato l'isozima CK-MB che, ove aumentato, accerta la diagnosi di infarto miocardico. Si consiglia generalmente di ottenere almeno tre determinazioni del CK-MB, una all'ammissione in reparto, una dopo 12 e 24 h dopo l'inizio dei sintomi. Un aumento della CK totale e della CK-MB è stato riportato anche in diverse condizioni di sofferenza miocardica senza necrosi, quali l'angina pectoris, lo shock cardiogeno, lo scompenso congestizio, la defibrillazione o l'angioplastica coronaria percutanea.

### Malattie muscolari

In tutte le forme di distrofie muscolari, ed in particolare nella forma di Duchenne si osservano aumenti consistenti dell'attività CK totale (fino a x50 i limiti superiori della norma.) Tali valori aumentati possono essere presenti *prima della comparsa di qualsiasi sintomo clinico* e nel 50-80% delle portatrici sane di DM Tipo Duchenne.

L'isozima largamente prevalente è il **CKMM**: una piccola percentuale di CKMB può essere talora rilevata (<6%) e ciò si spiega con un fenomeno di regressione "fetale" del pattern enzimatico del muscolo distrofico.

Aumenti massivi (fino a X 200 i limiti di CK totale e di CKMM si osservano in tutte le forme di rhabdmiolisi acuta da qualsiasi causa: traumi da schiacciamento, infarti o necrosi muscolari, mioglobulinuria ricorrente o parossistica infezioni virali, tossine diverse.

Aumenti più contenuti possono essere causati da traumi muscolari (iniezioni intramuscolari!) crisi convulsive, sepsi. In alcuni stati psicotici acuti è stato riportato un aumento della CK, verosimilmente in rapporto con l'aumento della attività muscolare.

**Nelle malattie muscolari neurogene i valori di CK sono normali o solo minimamente aumentati.**

### Farmaci e droghe d'abuso

Diversi farmaci possono provocare aumenti massivi della CK totale: acido aminocaproico, anfotericina B, carbenoxolone, clofibrato, ciclopropano ecc.

Una aumento consistente della CK totale si osserva con la somministrazione di **droghe d'abuso**, quali anfetaminici, barbiturici, etanolo, eroina ecc..

### Malattie del SNC

Dopo traumi ed emorragie cerebrali si osservano aumenti della CK totale (fino a x5), dovuti alla frazione **CK-BB**.

Nella sindrome di Reye si osservano massivi aumenti della CK totale (x50) con tracce di CK-BB: la quantità di quest'ultima è correlata al danno cerebrale.

### Altre malattie

Nell'ipotiroidismo si osserva in oltre la metà dei casi un consistente aumento (5-10 X URL) della CK, in genere CKMM con talora anche CKMB

In diverse neoplasie si può osservare un aumento della CKMM e della CKBB.

Nei neonati di basso peso e in quelli con danni cerebrali è stato riportato un aumento della CK totale e della CKBB.

Dopo un infarto del miocardio i valori della CK totale tendono a rimanere invariati per un certo numero di ore, tanto minore quanto più estesa è l'area infartuata. Quindi, entro 4-6 ore si osserva un aumento molto rapido dei diversi enzimi: per prima la CKMB, che raggiunge il picco entro le 24 ore e quindi scompare piuttosto rapidamente in relazione alla sua semivita nel sierodi 10 h, per cui in seconda giornata può già essere tornata a livelli normali.

Successivamente all'incremento della CKMB si osserva un incremento della frazione CKMM che raggiunge un picco di 7-12 xURL tra 18 e 30 h dopo la sintomatologia dolorosa. Generalmente il valore della CKMM, in virtù della semivita più lunga, permane elevato fino alla quarta giornata dopo l'inizio della sintomatologia dolorosa. La sfasatura temporale dei due picchi rende piuttosto problematico l'uso dei rapporti tra i due isozimi CKMB e CKMM Per la diagnosi dell'IMA. Più utile appare il **rapporto CKMB e CKtotale** che normalmente è tra 0.03 e 0.06 (3-6%) e che invece nell'IMA sale a 0.1-0.3 (10-30%).



Costituiscono i marker di applicazione pratica più recente, con caratteristiche di notevole interesse che ne hanno fatto in un certo senso un riferimento diagnostico.

Si tratta di **marker altamente specifici**, che appartengono al complesso delle proteine contrattili del miocardio. Sono descritte tre troponine, la C, la I e la T. Poiché la troponina C muscolare e miocardica sono identiche il possibile uso come marker cardiaco è ridotto o precluso. Vengono invece utilizzate sia la troponina T (cTnT) sia la troponina I (cTnI). Quest'ultima troponina appare la più specifica per il danno miocardico.

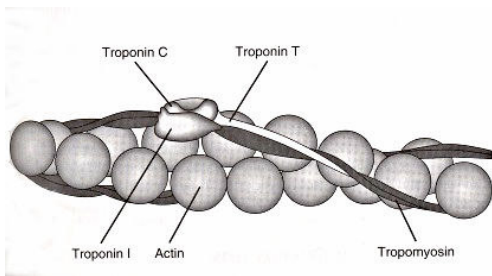
Le due cTn sono legate alle fibre muscolari cardiache e una ridotta frazione (2-6 %) è invece libera. Questa frazione aumenta rapidamente dopo l'insulto anossico, mentre le frazioni legate alle fibre vengono rilasciate in circolo lentamente 1-2 settimane dopo l'infarto miocardico

**Le troponine sono indosabili nei soggetti sani e aumentano nei modelli sperimentali di infarto anche prima della comparsa di necrosi.**

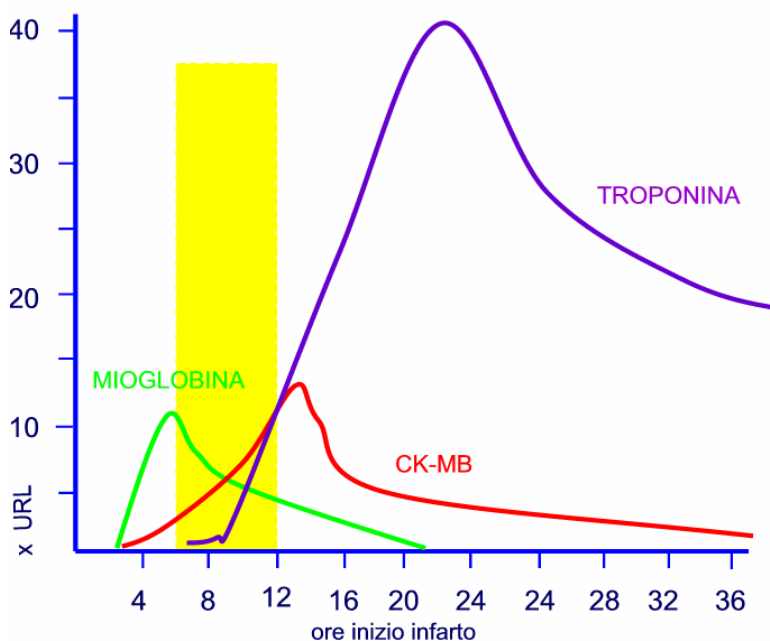
La troponina T aumenta entro 1-2 ore dalla comparsa del dolore,, raggiunge il picco entro le 18-24 h e quindi scende, rapidamente fino a 48 ore, più lentamente fino a normalizzarsi entro 7-10 gg.

Nella valutazione delle troponine occorre tenere presente che esse possono essere aumentate significativamente anche in presenza di ischemia: i pazienti con positività al test delle troponine ma negativi al CK-mb, vanno considerati a rischio di eventi ischemici e infartuali futuri e quelli con infarto miocardico e positivi all'atto dell'ingresso in ospedale per le troponine sembrano avere un decorso e una prognosi peggiore.

Un consistente vantaggio delle cTn rispetto agli altri markers è la virtuale assenza delle stesse dal siero normale per cui risultati falsi negativi possono essere messi in conto esclusivamente a errori di prelevamento o di analisi. In caso di lesioni del muscolo scheletrico, utilizzando i saggi immunometrici di seconda generazione non si osserva positività, data la mancanza di reattività crociata tra le due troponine cardiaca e muscolare da parte dell'antisiero usato.



**localizzazione delle troponine nella fibrilla muscolare**



## ASPARTATO TRANSAMINASI AST

Storicamente è stato il primo enzima utilizzato nella diagnosi dell'IMA. Attualmente la sua importanza è scemata e, anche per la sua bassa specificità nei confronti delle lesioni miocardiche, è considerato un test accessorio. Aumenta nel siero 6-8 h dopo la sintomatologia dolorosa, raggiunge un picco intorno alle 24 h e torna alla norma in quarta-quinta giornata

## LATTICO DEIDROGENASI, LH

La LD catalizza la ossidazione da lattato a piruvato

L'enzima ha un PM di 134000 ed è ha una struttura tetramericata costituita da quattro catene peptidiche di due tipi, H e M. i due peptidi sono sotto controllo genetico di due diversi loci, situati rispettivamente nel cromosomi 12 e 11. Di conseguenza sono presenti nel sangue e nei tessuti 5 diversi isoenzimi della LD:

LD-1	HHHH
LD-2	HHHM
LD-3	HHMM
LD-4	HMMM
LD-5	MMMM

sono stati descritti anche due ulteriori isoenzimi di significato clinico da definire: LD-c, identificato nel tessuto testicolare e negli spermatozoi e LD-6 nel siero di malati terminali

**L'enzima è presente nel citoplasma di tutte le cellule; non è legato a organelli subcellulari.**

I livelli di enzima tissutale sono mediamente circa 500 volte superiori a quelli osservati nel siero normale e quindi la fuoriuscita dell'enzima anche da una piccola lesione cellulare causa un significativo aumento della concentrazione plasmatica.

**Poiché i diversi tessuti mostrano quadri isoenzimatici molto diversi,** è possibile precisare l'origine tissutale dell'incremento osservato della LD totale.

### Isoenzimi della lattico deidrogenasi

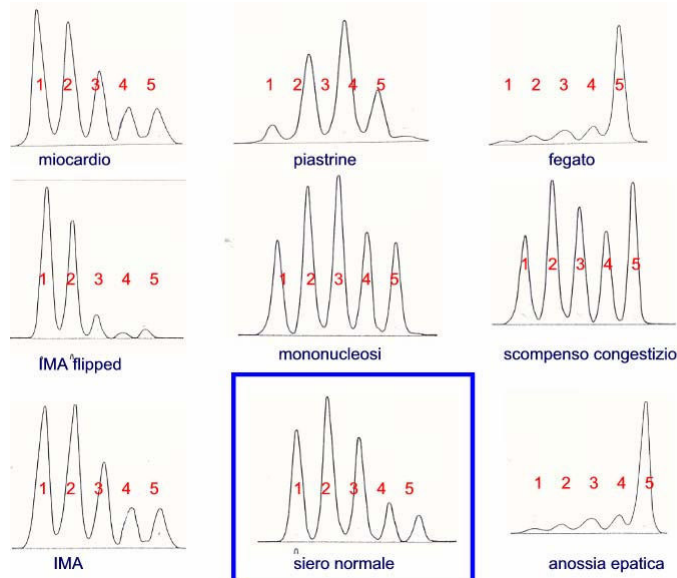
Isoenzima	LD1	LD2	LD3	LD4	LD5
Monomeri	HHHH	HHHM	HHMM	HMMM	MMMM
siero	25	35	20	15	5
RBC	40	35	15	10	0
Miocardio	45	40	10	5	0
Muscolo	0	0	10	30	60
Fegato	0	5	10	15	70
polmone	10	15	40	30	5
Rene	35	30	25	20	0

### VALORI DI RIFERIMENTO

Nell'età neonatale e infantile i valori sono lievemente aumentati, con una percentuale di LDH 5 lievemente aumentata e di LDH1 lievemente diminuita rispetto all'Adulto. L'esercizio muscolare causa lievi aumenti della LDH. E' essenziale per l'attendibilità della misura che il campione non dimostri tracce di emolisi, che può mentire un pattern isoenzimatico simile a quello dell'infarto miocardico..

### PATOLOGIA

La ubiquitarità dell'enzima lo rende un marker poco specifico per una lesione di organo e la sua determinazione viene generalmente interpretata congiuntamente ai valori di CK e AST



### Malattie cardiache

Nell'infarto miocardico la LD totale aumenta 8-12 h dopo l'insorgenza del dolore stenocardico, raggiunge il picco 24-48 h dopo per restare elevata circa una settimana. Gli aumenti non sono particolarmente consistenti (3-4 X URL).

**L'isozima LD1 aumenta significativamente rispetto all'isozima LD2 fino a superarlo (flipped ratio).**

### Malattie muscolari

Nella distrofia muscolare si osservano aumenti significativi dell'isozima **LD5**. Tipicamente, quando nelle fasi avanzate della malattia l'atrofia muscolare spiccata diminuisce la massa muscolare i valori tendono a tornare normali, con diminuzione della frazione LD5

### Isoenzimi della LDH in patologia

		<b>LD1</b>	<b>LD2</b>	<b>LD3</b>	<b>LD4</b>	<b>LD5</b>
<b>Valori di riferimento (adulto)</b>	<b>313-618 U/L</b>	<b>17-27%</b>	<b>29-39%</b>	<b>19-27%</b>	<b>8-16%</b>	<b>6-16%</b>
<b>miocardio</b>						
<b>Infarto miocardico</b>	<b>3-10 x</b>	↑↑	↑			
<b>Scompenso congestizio</b>	<b>2-3 x</b>	↑	↑		↑↑	↑↑
<b>polmone</b>						
<b>Infarto/embolia polmonare</b>	<b>2-6 x</b>			↑↑	↑↑	
<b>fegato</b>						
<b>Epatite virale</b>	<b>2-6 x</b>				↑	↑↑↑
<b>Epatite tossica</b>	<b>2-10 x</b>				↑↑	↑↑↑
<b>Cirrosi</b>	<b>1-2 x</b>				↑↑	↑↑
<b>sangue</b>						
<b>Leucemia granulocitica</b>	<b>2-15 x</b>			↑↑	↑↑	
<b>anemia Megaloblastica</b>	<b>5-10 x</b>	↑	↑			
<b>anemia emolitica</b>	<b>2-6 x</b>	↑↑	↑↑	↑		
<b>Altre malattie</b>						
<b>Carcinomatosi estesa</b>	<b>5-10 x</b>		↑↑	↑↑		
<b>Distrofia Muscolare</b>	<b>2-4 x</b>				↑↑	↑↑↑

### Malattie epatiche

Nelle **epatiti tossiche itteriche** si possono osservare aumenti consistenti (x10), soprattutto a carico della **LD5**; aumenti più contenuti nelle epatiti virali, nella mononucleosi infettiva, nell'ittero ostruttivo.

### Malattie ematologiche

La presenza di **emolisi** da qualsiasi causa comporta un significativo aumento della LD, in particolare dell'isozima **LD2**. Altra causa di rilevanti aumenti (fino a x50) della LD è la presenza di anemia megaloblastica.

### Altre malattie

In circa il 30% di soggetti nefropatici si osserva un aumento di LD totale con pattern isoenzimatico del tutto sovrapponibile a quello normale. Nelle neoplasie maligne si osserva un aumento spesso a carico delle **LD4 e LD5**. Nei tumori delle cellule

germinali si osserva un aumento in particolare della **LD1**.

Nei casi di **embolia polmonare** si osservano tipicamente valori molto elevati, con aumento a carico della **LD3**

La LD totale aumenta nel siero dei soggetti infartuati 12-18 h dopo l'inizio del dolore, raggiunge il picco 36-72 h dopo l'episodio infartuale (7-10 x URL) e resta elevata per una decina di giorni dopo l'infarto.

Caratteristico il pattern degli isoenzimi: la LD-1 è la prima ad aumentare, spesso supera il 45% della LD Totale. Generalmente la LD-2 aumenta in maniera significativamente inferiore o non aumenta affatto dopo IMA e si osserva (nell'80 % dei casi di IMA) il classico pattern del picco di LD1 che supera in altezza e in ampiezza quello della LD-2 (Flipped LD1, flipped ratio).

In linea di massima il dosaggio degli isoenzimi LD e della LD totale non riveste tanto una utilità diagnostica per l'IMA nelle prime ore quanto un **valore di conferma e di follow up** del decorso in seconda-terza giornata.

#### PEPTIDENATRIURETICO ATRIALE , BNP

I peptidi natriuretici hanno la funzione fisiologica di contribuire alla regolazione della volemia, del bilancio elettrolitico e della pressione arteriosa.

Questo ormone risponde a tutte le modifiche nelle performances miocardiche e non solo nel caso di necrosi miocardica.

La misura del BNP è molto utile nella diagnosi dello **scompenso cardiaco congestizio** , specie nelle sue forme meno clinicamente evidenti.

#### PROTEINA C-REATTIVA ,CRP

Si tratta di una proteina della fase acuta che, in concentrazioni molto bassa può essere collegata con il processo infiammatorio relativo allo sviluppo della placca

aterosclerotica. Naturalmente

tali basse concentrazioni non possono essere rilevate correttamente dai metodi tradizionalmente usati, per cui occorrono metodiche dedicate (la cosiddetta CRP ad alta sensibilità). Si tratta di un indicatore di rischio (particolarmente se correlati con i valori LDL), ma non specificamente di necrosi miocardica

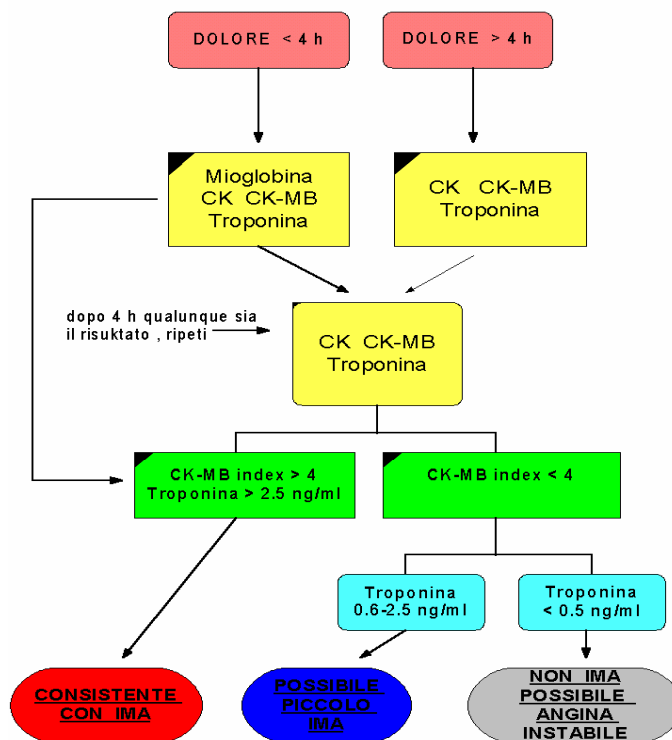
La diagnostica dell'infarto miocardico costituisce un punto molto delicato di integrazione tra dati clinici e laboratoristici, in cui non sono consentiti ritardi ed errori. Ciò anche in quanto sono descritti protocolli diagnostici ben precisi e con ottime caratteristiche di sensibilità e specificità, che hanno l'obiettivo di pervenire a una diagnosi di IMA nel più breve tempo possibile dopo l'insorgenza del dolore stenocardico. Il contesto diagnostico tipico è evidentemente quello dell'ammissione a un reparto di emergenza di un soggetto con dolore tipico ; poiché circa il 25% degli IMA non presentano il dolore tipico e poiché circa tre quarti dei soggetti inviati alla terapia intensiva non risultano affetti da IMA, si comprende bene che la diagnosi ha dei notevoli margini di errore.

Una prima suddivisione dei pazienti va fatta sulla base del tempo di comparsa del sintomo clinico: Il dolore può essere comparso da meno di 4 ore o da più di 4 ore. Il paziente andrà comunque immediatamente sottoposto al prelievo per la misurazione di marker cardiaci e un esame ECG. Nel paziente con insorgenza del dolore da meno di 4 ore è indicata la prescrizione del dosaggio della Mioglobina, del CK e CKMB e della Troponina ; ove possibile ,il dosaggio dell'isozima BB della glicogeno-fosforilasi , che sembra essere un marker più precoce ed attendibile della mioglobina.

Se i valori sono concordemente aumentati al disopra delle soglie decisionali per l'IMA, il clinico può considerare la diagnosi accertata e agire di conseguenza; si prescrive comunque un controllo dei valori entro 2-4 ore . Se i valori non sono aumentati oltre le soglie decisionali o se vi sono discordanze tra i 4 parametri, si ripete entro 2-4 ore il prelievo , e sulla base dei risultati potranno aversi tre diverse possibilità:

1. Un aumento del CK-MB index  $>4$  associato a un aumento della troponina  $> 2.5$  ng/ml, consistente con la diagnosi di IMA;
2. Un indice CK-MB  $<4$  con troponina tra 0.6 e 2.5 ng/ml , concitante con un IMA di piccole dimensioni e
3. Un indice CK-MB  $<4$  con troponina  $< 0.5$  ng/ml che permette di escludere l'Ima e fa propendere la diagnosi verso una forma di angina instabile . Se il dolore è comparso da più di 4 ore , non ha alcuna utilità, o può addirittura essere fuorviante il dosaggio dei marker precocissimi quali mioglobina e glicogeno-fosforilasi. Per il resto si ripete la procedura precedentemente descritta .

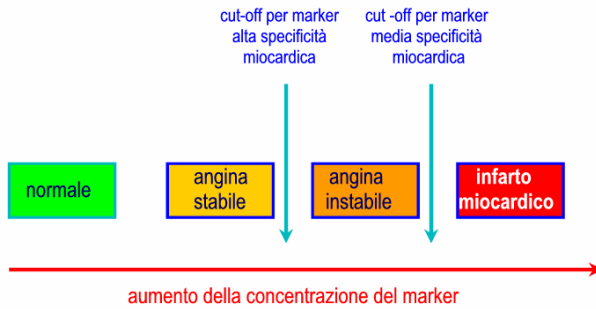
ALGORITMO DIAGNOSTICO PER DOLORE STENOCARDICO





**a. Stratificazione del rischio nei soggetti con insufficienza coronarica.**

Con l'uso dei metodi di ultima generazione, molto più sensibili, si è reso possibile stabilire due diversi punti di cut-Off, uno relativo alle sindromi di insufficienza coronarica e uno per il vero e proprio IMA.

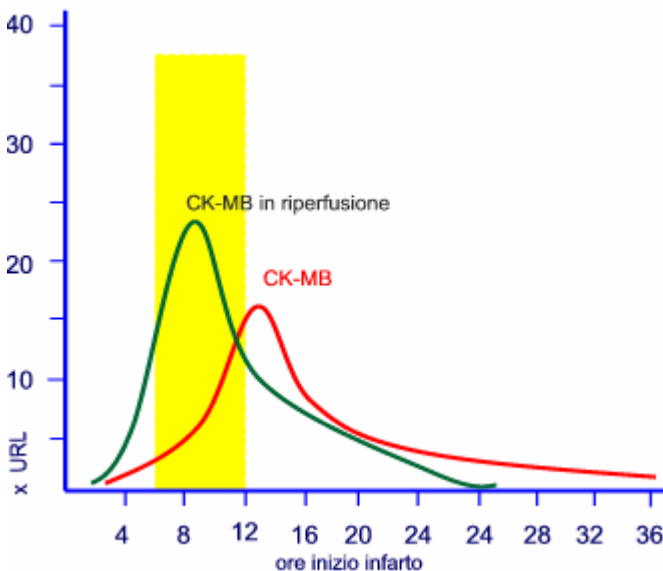


D'altra parte questi marker non sono ancora considerati di sufficiente sensibilità e specificità diagnostica per la diagnosi e lo screening dei soggetti con angina stabile o ischemia lieve

**b. valutazione della riperfusione.**

Se è stato possibile un intervento precoce con terapia trombolitica e se è avvenuta una riperfusione della area necrotica la presenza di vasi sanguigni pervi comporta che i marker di lesione necrotica invece che diffondere attraverso l'area necrotica e quindi entrare in circolo, possono entrare immediatamente in circolo, dando luogo a

un picco (in particolare di CKMB) che compare prima e che è più pronunciato di quanto ci si aspetterebbe in base all'entità dell'area infartuata, anche se la quantità totale del marcatore messo in circolo è la stessa. Quindi il dosaggio dei marcatori prima e 90' dopo la somministrazione dell'agente trombolitico può dare utili indicazioni sull'efficacia della terapia.



Andamento dei valori del CKMB in un caso di infarto miocardico della stessa entità senza (linea rossa) e con riperfusione da terapia trombolitica (linea verde). Il picco in terapia trombolitica è più precoce e più elevato, ma il movimento enzimatico dura un tempo minore, poiché la circolazione patente nella zona infartuale consente una più rapida messa in circolo degli enzimi della cellule necrotiche. In queste condizioni ideali, l'area delle due curve dipende dalla entità della zona infartuata e quindi è tendenzialmente la stessa

**c. diagnosi del reinfarto**

nei soggetti con IMA in atto è frequente la possibilità di un infarto subentrante. La diagnosi del reinfarto è particolarmente complessa quando si utilizzino marcatori quali le troponine o il CK totale, in quanto il loro aumento in seguito alla prima lesione maschera quello dovuto al reinfarto. Sono invece utili i marcatori precoci quali la Mioglobina o il CK-MB, che, rientrando entro un tempo breve dopo il primo evento nei valori normali, in caso di reinfarto tendono nuovamente ad aumentare.

## ENZIMI INDICATIVI DEL DANNO EPATICO

Il grado di lesione alla cellula epatica può essere stabilito con accuratezza attraverso la determinazione degli enzimi epatici nel sangue e attraverso la determinazione di alcuni analiti correlati alla funzione epatica.

❖ Vanno anzitutto considerati gli **enzimi presenti a livello della membrana dell'epatocita**, (**ALP e GGT**) che saranno i markers più sensibili e precoci di un eventuale danno. Questi enzimi possono essere rilasciati in circolo anche in casi di una **sofferenza minimale della cellula**: ad esempio basta un aumento delle sostanze tensioattive quali la bilirubina e i sali biliari nel ECF per provocare il distacco delle proteine enzimatiche adese alla membrana esterna dell'epatocita. Anche un fattore tossico (alcol) o anossico temporaneo, che non pregiudichi la funzionalità a lunga scadenza della cellula è in condizione di provocare il passaggio in circolo di questi enzimi di superficie.

❖ Se il *fattore patogeno cellulare* è **abbastanza grave e agisce abbastanza a lungo**, così da non consentire le pur elevate capacità riparative dell'epatocita, la membrana cellulare stessa va incontro a deiscenza, con messa in circolo di lamine di membrana con i relativi enzimi ad esse adesi e perdita della capacità semipermeabile della membrana stessa. In questo caso, il gradiente nella concentrazione di enzimi presenti sciolti nel citosol e fluido extracellulare provocherà un massiccio passaggio di proteine enzimatiche verso il sangue: saranno interessati in questa fase gli enzimi citosolici, ovvero principalmente la **ALT** e la frazione citoplasmatica della **AST**, ma anche la **LDH**, la sorbitolo deidrogenasi ecc..

❖ La fase successiva è quella della completa **distruzione della membrana** e della necrosi della cellula e dei suoi organelli. Si osserverà in questa fase il massivo passaggio in circolo degli enzimi citoplasmatici e soprattutto, degli enzimi presenti all'interno degli organelli cellulari: **GGT** presente nel reticolo endoplasmatico, **AST** presente nei **mitocondri**, enzimi presenti nel nucleo cellulare quali **ALH** e **PHI**.

Naturalmente non tutte le attività enzimatiche presenti nella cellula epatica hanno lo stesso rilievo diagnostico e fisiopatologico: è anzi in qualche maniera sorprendente il fatto che delle centinaia di enzimi attivi nel fegato solo pochi rivestano un uso clinico diffuso.

I più importanti sono certamente le due transaminasi, ALT e AST. Di questi il primo, la ALT era considerato l'enzima specificamente epatico e il miglior marker di danno epatocitico. Ciò è vero, **ma con molte limitazioni**. In effetti nelle epatiti in generale le ALT dimostrano una elevazione maggiore rispetto alle AST, come del resto c'è da aspettarsi in base alla semivita e al gradiente epatocita/sangue. Con una sola eccezione di un notevole interesse diagnostico e fisiopatologico: il comportamento delle AST nelle **epatiti alcoliche**. Infatti, mentre in tutti i casi di epatiti generalmente i valori delle ALT superano quelli delle AST, nel caso delle epatiti alcoliche i valori della AST totale sono maggiori di quelli della ALT; ciò in seguito a un maggiore rilascio di AST mitocondriale (senza danno cellulare apparente) e a una diminuzione della AST citosolica. Inoltre la deficienza di piridossina tipica dell'alcolismo comporta una diminuzione dell'attività ALT epatica.

Vanno anche considerate, nella fisiopatologia delle alterazioni enzimatiche, le **alterazioni che si osservano nella produzione degli enzimi epatocitari**. Della diminuzione della produzione di ALT nell'epatopatia alcolica si è già detto: un altro enzima influenzato è la ALP (isozima epatico), la cui sintesi negli epatociti viene stimolata dalla colestasi.

I quadri clinici principali diagnosticabili attraverso i marcatori di funzionalità epatica sono il quadro dell'epatite acuta, quello dell'epatite cronica e quello della colestasi.

Per “**danno epatico acuto**” (epatite acuta) si intende un danno a carico dell'epatocita che avviene e si manifesta improvvisamente e in un breve periodo di tempo. Il quadro laboratoristico correlato è quello dell'improvviso e consistente aumento delle transaminasi, generalmente superiore a x 8 URL, il più delle volte accompagnato a iperbilirubinemia. Segni legati alla disfunzione di altre attività dell'epatocita, quali ad esempio l'attività protidosintetica, possono essere presenti ma non costanti e non sempre sono parte integrante del quadro.

Per “**danno epatico cronico**” (epatite cronica) si intende invece un danno che si manifesta più lentamente e permane per un periodo di tempo più lungo, dell'ordine di almeno sei mesi, caratterizzato da un aumento delle transaminasi generalmente inferiore a x 4 URL, talora con un andamento intermittente e con periodi di normalità dei valori. Gli aumenti della bilirubinemia non costituiscono parte integrante del quadro e, quando presenti, sono di scarsa entità. Anche il quadro proteico – salvo aumenti delle immunoglobuline eventualmente legati alla causa eziologica – non mostra generalmente modificazioni significative e riveste scarsa utilità diagnostica.

## LE TRANSAMINASI

### EC 2.6.1.1 ASPARTATO AMINOTRASFERASI, AST, TRANSAMINASI GLUTAMMICOSSALACETICA, GOT.

### EC 2.6.1.2 ALANINA AMINOTRASFERASI, ALT, TRANSAMINASI GLUTAMMICO PIRUVICA, GPT

Le aminotrasferasi (transaminasi) sono un gruppo di enzimi che catalizzano il trasferimento di gruppi amminici tra aminoacidi e  $\alpha$  oxoacidi. Sono ampiamente diffuse in tutti i tessuti. La **AST** è un dimero costituito da due monomeri identici, ed è presente nelle cellule in una forma mitocondriale (mAST) e in una forma citoplasmatica.

La **ALT** è presente nel citosol delle cellule epatiche: presente in bassa concentrazione nelle cellule miocardiche e muscolari, costituisce un enzima molto specifico per le **malattie epatiche**. **Le transaminasi non hanno alcuna funzione nel siero**. Ambedue le transaminasi sono catabolizzate a livello epatico, con una semivita per la AST di  $17 \pm 5$  h e per la ALT di  $42 \pm 5$  h. L'isozima mitocondriale della AST è differente dalla forma citoplasmatica. Ambedue forme dimeriche con una massa di circa 90000 D, la AST-m dimostra una semivita più lunga (87 h) della forma citoplasmatica. Una isoforma della AST coniugata con immunoglobuline, la macro-AST ha una semivita ancor più prolungata e si osserva in soggetti che generalmente dimostrano livelli aumentati di AST senza che ne sia possibile individuare malattie epatiche o muscolari che li giustifichino.

Contenuto di transaminasi di diversi tessuti (siero = 1)

tessuto	AST	ALT
miocardio	7800	450
fegato	7100	2850
muscolo scheletrico	5000	300
rene	4500	1200
Pancreas	1400	130
milza	700	80
polmone	500	45
emazie	15	7

Isozimi ed isoforme delle transaminasi

	Semivita	Tessuto /plasma
AST citoplasmatica (30%)	17	7800
AST mitocondriale (70%)	87	
ALT	47	2850
Macro-AST	lunga	

## VALORI DI RIFERIMENTO

Valori di riferimento nel siero:

**ALT: 8-20 U/L**  
**AST: 10-30 U/L**

## VARIABILITA'

Le attività AST e ALT sono più elevate nei maschi e i valori superiori di riferimento sono stabili tra 25 e 60 anni

La variazione giorno per giorno dei valori delle ALT è del 10-30%, con un significativo ritmo circadiano (+45% nel pomeriggio). La variazione delle AST è più contenuta, dell'ordine del 5-10%. Esiste per la AST (e in misura molto minore per la ALT) una significativa correlazione con l'indice di massa corporea, con un aumento dei livelli plasmatici del 40-50% per i valori alti di massa corporea. L'esercizio vigoroso causa un aumento, più significativo negli uomini, fino al 300% dell'AST e del 50% dell'ALT. L'emolisi del prelievo causa un aumento della AST maggiore rispetto alla ALT.

I valori delle transaminasi sono stabili a temperatura ambiente per circa 24 ore, fino a tre settimane a 4°C, più a lungo se i campioni sono tenuti in congelatore.

## PATOLOGIA

I settori di patologia in cui la misurazione delle attività transaminasiche è particolarmente utile sono la **patologia epatica, muscolare e miocardica**.

Nella **necrosi epatica** (epatiti tossiche o infettive) i livelli di AST e ALT sono aumentati con valori talora di 100 volte il limite superiore di riferimento. I valori costituiscono un indicatore fedele dell'entità del processo di necrosi e del suo andamento.

Condizioni morbose con aumenti o diminuzioni delle transaminasi

<b>Aminotrasferasi aumentate</b>		<b>AST</b>	<b>ALT</b>
<b>Normale</b>	<b>Valori di riferimento</b>	<b>10-30 U/L</b>	<b>8-20 U/L</b>
		<b>URL</b>	
<b>1. Malattie cardiache</b>	<b>Infarto Miocardio</b>	<b>4-15</b>	<b>&lt; 5</b>
	Pericardite, Aritmie Cardiache, Reumatismo Articolare Acuto ,Atti Cardio Chirurgici, Insufficienza Cardiaca	<b>&lt; 5</b>	<b>&lt; 2</b>
<b>2. Malattie muscolari</b>	Dermatomiosite	<b>&lt;10</b>	<b>&lt; 5</b>
	Distrofia Muscolare	<b>&lt;10</b>	<b>&lt; 5</b>
	Rabdomioli	<b>20-200</b>	<b>10-100</b>
	Traumi muscolari	<b>VARIABILE</b>	<b>VARIABILE</b>
<b>3. Malattie epatiche</b>	<b>Necrosi epatocellulare</b>	<b>10-50</b>	<b>30-60</b>
	<b>Epatite alcolica</b>	<b>2-20</b>	<b>2-15</b>
	Epatite cronica		
	Cirrosi	<b>&lt; 5</b>	<b>&lt;10</b>
	Fegato Da Stasi	<b>&lt; 5</b>	<b>&lt;10</b>
	Carcinoma Metastatico	<b>5-25</b>	<b>&lt;10</b>
	Icttero Ostruttivo	<b>&lt;10</b>	<b>&lt;10</b>
<b>4. Altre malattie</b>	<b>Shock</b>	<b>&lt; 20</b>	<b>&lt; 20</b>
	<b>Pancreatite Acuta</b>	<b>&lt; 5</b>	<b>&lt;5</b>
	Infarto Renale	<b>&lt; 10</b>	
	Necrosi Cerebrale	<b>&lt; 2</b>	
	<b>Ustioni</b>	<b>VARIABILE</b>	
	Delirium Tremens	<b>&lt; 5</b>	
	Emolisi	<b>&lt; 2</b>	
	ipotiroidismo	<b>&lt; 2</b>	
	Gangrena	<b>&lt; 2</b>	
<b>5. Farmaci</b>			
	eparina	<b>&lt; 5</b>	
	salicilati	<b>&lt; 5</b>	
	tetraciclina	<b>&lt; 5</b>	
	cloropromazina	<b>&lt; 5</b>	
	isoniazide	<b>&lt; 5</b>	
<b>AST DIMINUITA</b>			
	Gravidanza	<b>0.5</b>	
	Chetoacidosi diabetica	<b>0.5</b>	
	Insufficienza renale	<b>0.5</b>	
	Deficit piridossal fosfato	<b>0.5</b>	



## Il rapporto AST/ALT in patologia (RAPPORTO DI DE RITIS)

<b>normale</b>	<b>0.7-1.4</b>
<b>Colestasi extraepatica</b>	<b>0.8</b>
	<b>&gt;1.5</b>
<b>Cirrosi</b>	<b>1.4-2</b>
<b>Epatiti virali prognosi buona</b>	<b>0.3-0.6</b>
<b>Epatiti virali prognosi cattiva</b>	<b>1.2-1.6</b>
<b>Epatiti croniche</b>	<b>1.3</b>
<b>Epatiti tossiche</b>	<b>&gt; 2.0</b>
<b>Epatiti alcoliche</b>	<b>2-6</b>

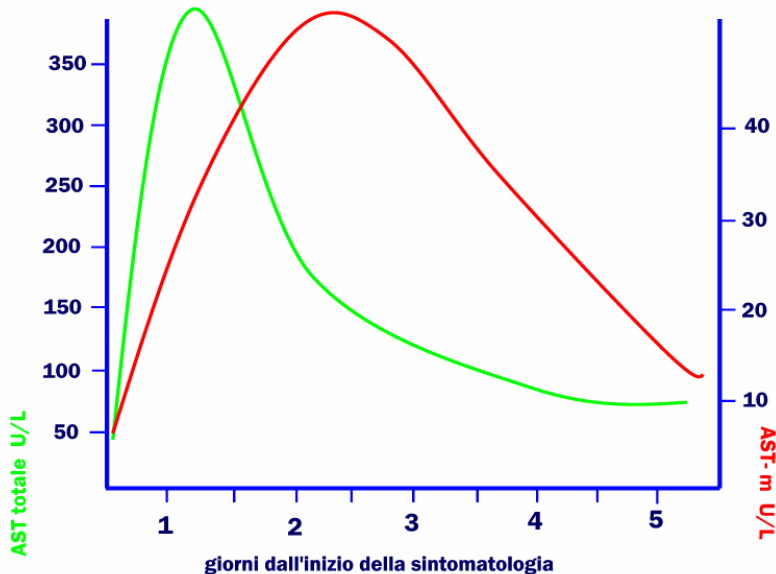
Generalmente consistenti aumenti della ALT si osservano solo nelle epatopatie e restano elevati più a lungo dell'AST: si usa a scopo diagnostico il rapporto AST/ALT (**Rapporto di De Ritis**) che in condizioni di salute o con un danno epatico lieve è di regola  $< 1$ .

Infatti la AST epatica è contenuta per il 30% nel citoplasma e per il 70 % nei mitocondri ed ha una semivita diversa, pari a 14 h quella citoplasmatica e 8 h quella mitocondriale. Nella fase iniziale della malattia viene dismessa la sola AST-c che pur essendo in concentrazione maggiore nel fegato ha una semivita molto più breve della ALT, che quindi presenta valori plasmatici più elevati. Quando avviene la necrosi cellulare viene dismessa la porzione di AST mitocondriale pari al 70% del totale, con inversione del rapporto tra attività ALT e AST: L'indice di De Ritis quindi aumenta notevolmente.

Altre forme di **sofferenza parenchimale epatica** (cirrosi, colestasi, carcinoma e altre neoplasie epatiche, somministrazione di alcol e di farmaci) sono caratterizzate da aumenti generalmente abbastanza contenuti delle transaminasi: valori più frequentemente osservati che vanno dai limiti superiori a 4-5 volte i valori superiori di riferimento

Nelle **malattie muscolari** si osservano aumenti consistenti delle attività transaminasiche del siero.

Una situazione tipica è quella dell' *infarto del miocardio*, in cui si osserva un aumento soprattutto a carico della AST entro 8 ore dall'inizio del dolore anginoso. I valori picco si osservano entro la prima giornata e il valore assoluto correla con l'entità della lesione infartuale. Per infarti di dimensioni medio-piccole gli incrementi sono dell'ordine di 4-5 volte il limite superiore della norma, mentre valori oltre 10 volte il limite superiore sono quasi sempre associati con infarti molto estesi e quindi prognosticamente sfavorevoli. Di una certa utilità per comprendere la dinamica dell'aumento delle AST è la valutazione del contributo delle ASTc e delle ASTm all'aumento della transaminasemia nei primi giorni dopo l'IMA: L'aumento delle AST totali nel primo giorno è prevalentemente a carico delle ASTc, mentre nelle giornate successive l'apporto delle ASTm è il maggiore responsabile dell'aumento delle AST totale.



Aumenti significativi di AST si osservano nelle distrofie muscolari progressive e nella dermatomiosite, mentre le transaminasi sono di regola normali nelle miopatie neurogene. I traumi estesi sono sempre accompagnati da aumento delle AST.

Aumenti fino a due-tre volte il limite superiore della norma possono osservarsi nelle pancreatiti acute e nelle malattie emolitiche nonché -(meno elevati)- nelle neoplasie maligne. L'interpretazione dei risultati della AST e ALT va fatta sempre con molta cautela nei soggetti con insufficienza renale in cui i valori risultano falsamente inferiori a quelli reali: ciò espone, questi soggetti a errori diagnostici in caso sia di necrosi muscolare sia di necrosi epatica. Ambedue le attività AST e ALT sono diminuite nell'insufficienza renale, per un effetto di legame con le proteine plasmatiche del P-5'-P, usato nella reazione. Il dosaggio della AST nel liquor ha dimostrato di correlare bene con l'entità del danno negli accidenti cerebrovascolari.



# IL QUADRO DI DANNO EPATICO ACUTO

Il quadro dell'epatite acuta è presente in epatopatie diverse, di origine infettiva, alcolica, tossica, ischemica, autoimmunitaria o da ostruzione biliare.

Le forme virali (HAV, HBV, HCV, EBV principalmente) costituiscono la stragrande maggioranza delle forme di epatite, anche se, nei paesi a struttura sanitaria avanzata si è osservata, nell'ultimo decennio una sostanziale diminuzione del numero complessivo dei casi.

Il problema clinico che il medico si pone di fronte a un caso di danno epatico acuto è triplice:

1. la natura del danno (eziologia) ;
2. la gravità dello stesso ;
3. il monitoraggio del suo andamento temporale (valutazione prognostica).

- ❖ **Le transaminasi** appaiono senza dubbio il test con migliore capacità discriminante per la diagnosi di epatite acuta. Fissando una soglia discriminante a 200 U/L per le AST si ottiene sensibilità diagnostica del 91% con una specificità del 96% . Una soglia discriminante di 300 U/L per le ALT consente di ottenere una sensibilità diagnostica del 96% ed una specificità diagnostica del 94%.

**La combinazione dei due test assicura, di conseguenza un valore predittivo molto elevato.**

- ❖ **Ictero ed iperbilirubinemia** sono rilievi incostanti nell'epatite acuta: più frequenti negli adulti (il 27% degli adulti e solo l'1% dei bambini affetti da epatite acuta dimostrano una bilirubina > 10 mg/dl) e più frequenti in alcune forme di epatite virale (70% dei casi di HAV, 33-50% dei casi di HBV e 20-33% dei casi di HCV). Un aumento di bilirubinemia > 15 mg/dl nell'epatite virale è segno sicuro di grave danno epatico e un valore > 25 mg/dl nell'epatite alcolica acuta costituisce un segno prognostico sfavorevole. **La forma diretta è nell'84% dei casi superiore al 50% della bilirubina totale e percentuali di bilirubina diretta inferiori debbono far prendere in considerazione eziologie diverse.**

**In linea di massima, c'è una scarsa correlazione tra attività transaminasiche e bilirubina nelle epatiti virali e nessuna correlazione nelle epatiti alcoliche.**

- ❖ **Il tempo di protrombina** costituisce un discreto indicatore prognostico. Aumenti del PT >4" rispetto ai valori di riferimento indicano un danno epatico grave e aumenti del PT > 20" o dell'INR > 6.5 sono comunemente considerati indicatori di rischio di vita. **L'albuminemia** non è generalmente un marcatore valido per le forme di epatite acuta, a seguito della sua semivita molto lunga.

	Picco ALT xURL	AST/ALT Rapporto	Picco Bili mg/dl	Aumento PT s
Epatite virale	10-40	<1	<15	<3
Epatite alcolica	2-8	>2	<15	1-3
Epatite tossica	>40	>1 precoce	<5	>5 transitorio
Epatite ischemica	>40	>1 precoce	<5	>5 transitorio

Naturalmente l'uso degli antigeni e anticorpi specifici costituisce il mezzo diagnostico sicuro e definitivo per la diagnosi delle forme virali. Sono disponibili numerosi markers delle epatiti virali, sia di natura antigenica sia di natura anticorpale. In linea di massima i marcatori

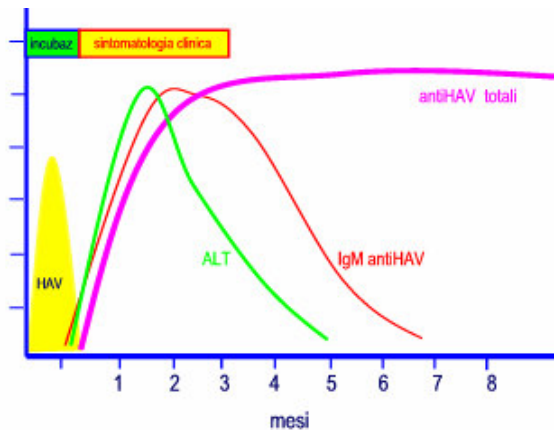
antigenici sono più precoci degli anticorpi e, tra gli anticorpi la frazione IgM è in genere la prima ad aumentare. Il miglioramento della sensibilità e specificità analitica ha consentito negli ultimi anni di diminuire sostanzialmente la soglia di positività. Nella tabella sono indicati i più usati marcatori antigenici ed anticorpali delle epatiti A,B,C.

## I marcatori di epatite virale

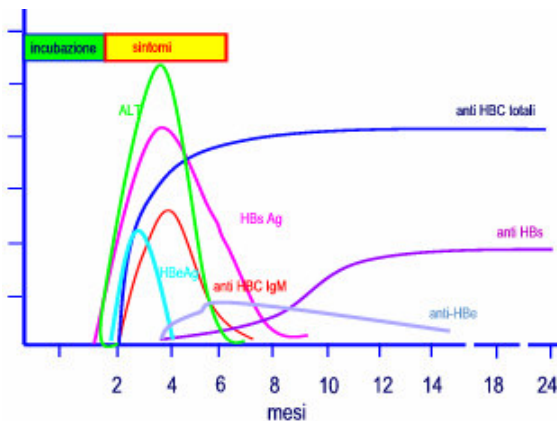
	marcatore	Campione	persistenza
Epatite A	Ag HAV RNA	Feci, sangue	incubazione
	Ab antiHAV IgM	sangue	Inizio -6mesi
	Ab antiHAV totali	sangue	3 mesi -sempre
Epatite B	Ag Superficie HBsAg	Sangue	1-6 mesi
	Ag core HBcAg	Sangue	1-6 mesi
	Ag e HBeAg	Sangue	1-6 mesi
	Ag HBV DNA	Sangue	1-6 mesi -anni
	Ab HbcAg IgM	Sangue	2-4 mesi
	Ab HbcAg totali	Sangue	2 mesi- anni
	Ab HBs Totali	Sangue	5 mesi- anni
Epatite C	Ag HCV RNA	Sangue	1-2 mesi + ricadute
	Ab anti HCV	Sangue	2 mesi- anni

## EPATITE VIRALE DI TIPO A (HAV)

Un picco di HAV RNA è presente nel sangue e nelle feci durante il periodo di incubazione, per scomparire generalmente con l'inizio della sintomatologia clinica. Il marcatore virale più precoce e sensibile è costituito dalle IgM antiHAV, che compare all'inizio della sintomatologia quasi contemporaneamente all'aumento delle transaminasi ALT e permane elevato uno-due mesi. Il titolo del anticorpi totali antiHAV comincia ad aumentare con un lieve ritardo, ma rimane elevato nel sangue per anni dopo la guarigione, in alcuni casi per tutta la vita. La sieropositività per l'HAV aumenta con l'età e raggiunge il 74% dei soggetti maggiori di 50 anni. In linea di massima la diagnosi di infezione da HAV usa le sole tecniche di dosaggio anticorpale, e hanno scarso uso clinico i test per il dosaggio degli acidi nucleici e dell'antigene.



## EPATITE VIRALE DI TIPO B (HBV)



L'HBV produce diversi antigeni proteici in condizione di indurre una risposta anticorpale.

Tra questi il più abbondante e di più precoce evidenziazione è l'antigene di superficie HbsAg. Sono prodotte anche due altre proteine antigeniche, l'antigene "core", HbcAg e l'antigene "e", HbeAg, di uso meno diffuso in clinica.

L' HbsAg comincia ad aumentare immediatamente dopo l'infezione per raggiungere il detection limit entro 1-2 mesi dopo. A questo punto generalmente si osserva

l'aumento delle transaminasi e della bilirubina. Dopo poco tempo, al massimo un mese, si inizia ad osservare il relativo movimento anticorpale, con aumento delle IgM

antiHbc e degli anticorpi antiHbc totali.

La presenza delle IgM antiHbc è considerata il test di maggiore importanza per la diagnosi di HBV. Le IgM antiHbc compaiono precocemente e il comportamento è analogo a quello osservato nell'infezione da HAV, con l'eccezione di un più sensibile ritardo rispetto all'aumento delle ALT. La convalescenza dall'infezione è indicata dalla caduta del titolo dell'HbsAg e dal contemporaneo aumento del titolo anticorpale antiHbs totale.

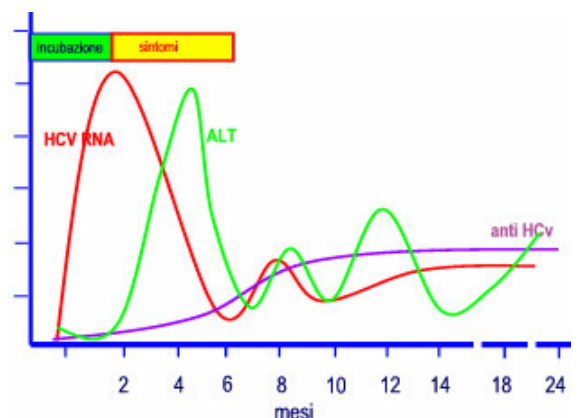
In alcuni casi si osservano ricadute, dimostrabili con aumenti del titolo antigenico HbsAg e delle transaminasi: in questi casi può osservarsi un elevato titolo di HbeAg e di HBVDNA. Questi due markers sono quindi molto utili per il monitoraggio delle cronicizzazioni.

## EPATITE VIRALE DI TIPO C (HCV)

Nel caso della infezione da HCV, i test disponibili commercialmente per la misura degli antigeni misurano o una proteina core HCV o l' HCV RNA nel sangue, questi ultimi con metodi RT-PCR che sono in grado di evidenziare fino a 100 copie di HCVRNA/ml.

Tipicamente si osserva nel sangue un aumento dell'HCVRNA una o due settimane dopo l'infezione e una o due settimane prima dell'aumento delle transaminasi e della sintomatologia clinica. Nel corso della malattia l'HCVRNA può essere presente intermittenemente, temporalmente correlato con le riacutizzazioni cliniche e con gli aumenti della transaminasemia. Il titolo anticorpale antiHCV viene misurato con test immunometrici di diversa sensibilità. Con i test di prima generazione, tuttora i più usati come screening l'aumento del titolo anticorpale comincia diventare evidente intorno alla 12 settimana dall'infezione. Con i metodi più sensibili, di seconda e terza generazione il tempo di scoperta è sceso intorno alla 6-7 settimana.

**In linea di massima la diagnosi presuntiva di una infezione da HCV viene posta per esclusione in presenza di una sintomatologia epatitica con negatività dei markers dell'HBV e dell'HAV.**

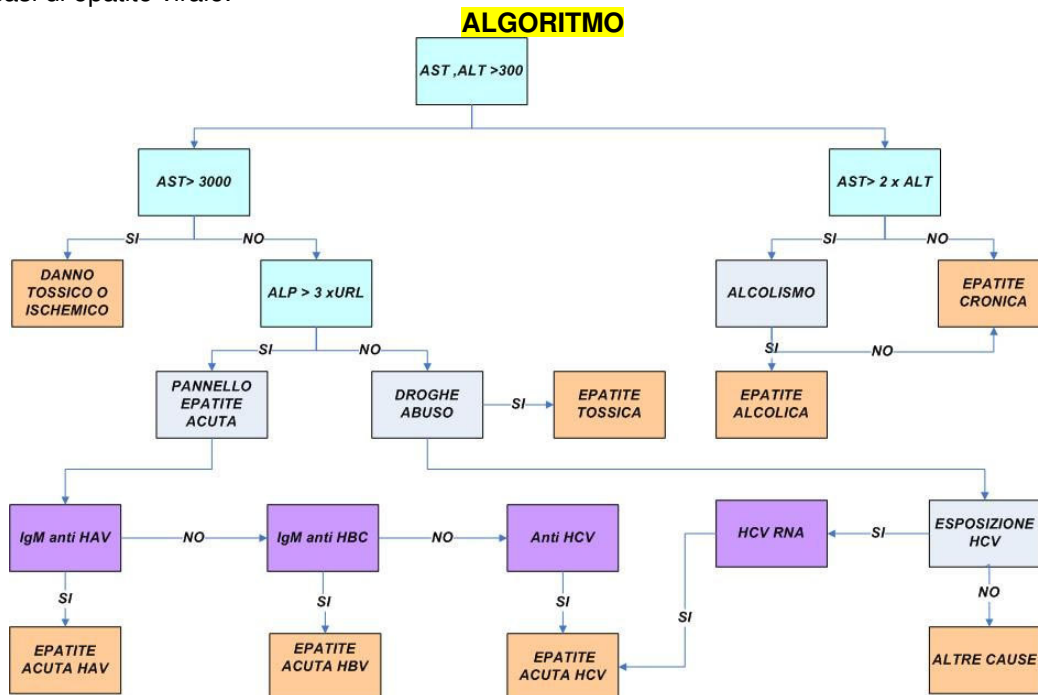


Le forme di **epatite di origine tossica o ischemica** si presentano comunemente con livelli di transaminasi molto elevati: > 100 URL, valori che si osservano molto raramente nelle epatiti virali. Oltre il 90% dei casi che dimostrano una AST picco > 3000 U/L sono riconducibili a una eziologia tossica o ischemica.

I **picchi di AST e ALT** sono precoci, e l'AST è in genere più elevata della ALT. Al rapido aumento segue una altrettanto rapida caduta dei livelli, con una normalizzazione precoce, spesso entro la prima settimana.

La bilirubina non è particolarmente elevata e nell'80% dei casi è inferiore a 2 mg/dl.

La **LDH** dimostra un aumento consistente e quasi costante nelle epatiti tossiche e ischemiche, con pattern degli Isoenzimi tipico mentre dimostra aumenti molto contenuti solo in circa la metà dei casi di epatite virale.



A partire da un quadro clinico suggestivo per l'epatite acuta, il primo segno chimico clinico sarà il dosaggio della aminotrasferasi. Un aumento di ambedue o della ALT solo al disopra di 300 U/L con una AST >3000 orienterà verso una sofferenza massiva degli epatociti, di origine tossica o ischemica.

Se l'aumento è meno rilevante, il dosaggio della ALP con riscontro di valori >3 volte gli URL conferma l'ipotesi di epatite virale acuta e quindi consiglia il dosaggio, in sequenza "logica" dei marcatori HAV,HBV,HCV.

Se la ALP è aumentata meno marcatamente (<3 URL) l'ipotesi principale è quella dell'epatite tossica da farmaci o da droghe d'abuso. Naturalmente come ipotesi primaria nei casi di tossicodipendenza dovrà essere formulata quella di una possibile epatite da HCV.

Il rilievo di un valore delle AST aumentato rispetto alle ALT dovrà sempre far porre l'ipotesi di una possibile epatite alcolica o di una epatite tossica da altra origine.

## IL QUADRO DI DANNO EPATICO CRONICO

Le epatiti croniche sono una malattia molto comune, con un rischio significativo di morbilità e mortalità a lungo termine. Da ciò deriva l'esigenza di una loro diagnosi (e trattamento) precoce, che può ottenersi solo attraverso l'uso di pannelli di test di laboratorio.

**La causa eziologica più frequente è la cronicizzazione di una infezione virale da HBV o da HCV o una epatite alcolica cronicizzata.** La diagnosi definitiva in molti casi è possibile solo attraverso un esame biotipico: in assenza di questo, **si considera diagnostica di una epatite cronica la persistenza di un aumento delle ALT 6 mesi dopo un episodio di epatite acuta ovvero un aumento inspiegato e ripetuto delle ALT osservato su un periodo di tempo superiore ai 6 mesi.**

I valori delle ALT che si osservano nell'epatite cronica non sono generalmente mai > 7 URL e la maggioranza dei casi dimostra valori < 4 URL. **La AST è generalmente più bassa delle ALT, salvo che nel caso di epatopatia cronica alcolica.**

**La fosfatasi alcalina non è generalmente aumentata e la bilirubina è anch'essa normale.**

### FATTORI DI RISCHIO DELL'EPATITE CRONICA

Sono considerati fattori di rischio alcolismo, malattie genetiche del fegato, fattori di rischio per infezione virale: emodializzati cronici, politrasfusi, operatori sanitari non vaccinati, tossicodipendenti, portatori di piercing e tatuaggi, soggetti con molti partner sessuali o presenza di malattie sessualmente trasmesse.

## ALTRE CAUSE DI EPATITE CRONICA

- ❖ Tra le cause rare di epatopatia cronica sono da ricordare l'**emocromatosi** e il **Morbo di Wilson**, diagnosticabile con la valutazione rispettivamente della percentuale di saturazione delle transferrina (> 45% nei soggetti malati) e con il dosaggio della ceruloplasmina.
- ❖ L'**epatite cronica autoimmune** costituisce circa 1/5 delle epatiti non virali e non alcoliche. Sono descritte diverse varianti. La prima forma dimostra un elevato titolo di anticorpi antinucleo e antimuscolo liscio, la seconda presenta invece un movimento anticorpale prevalentemente contro l'antigene solubile epatico (anti-SLA) o gli antigeni microsomiali epatici. Ambedue le forme sono caratterizzate dal punto di vista chimico clinico da un aumento lieve delle transaminasi e da una ipergammaglobulinemia policlonale.
- ❖ Un'altra forma di epatite cronica è quella **legata alla cirrosi biliare primitiva e alla colangite sclerosante primitiva**, ambedue malattie a patogenesi autoimmune in cui si ha una distruzione autoimmune dei dotti biliari. In queste forme di epatiti croniche il quadro enzimatico è caratterizzato dalla spiccata elevazione dei valori di GGT e ALP, molto più consistenti dei pur presenti (nel 50% dei casi) aumenti delle transaminasi. Anche in queste malattie la diagnosi è presunta sulla base del quadro enzimatico, ma può essere accertata solo attraverso il dosaggio degli anticorpi (anticorpi antimitocondriali AMA, anti catepsina ecc).
- ❖ Nel **deficit di  $\alpha 1$  antitripsina**, enzima normalmente presente nel siero con proprietà di inibizione della proteolisi, anche se il danno epatico costituisce un rilievo accessorio rispetto al quadro polmonare ben più rilevante, una forma di epatite acuta a comparsa molto precoce (talora in epoca neonatale che risolve talora in epatite cronica dell'adulto) colpisce circa la metà dei soggetti sia omozigoti che eterozigoti. Il dosaggio dell' $\alpha 1$  antitripsina e l'analisi della mutazione consentono la diagnosi.
- ❖ Un'ulteriore forma di epatite cronica è la cosiddetta **epatite steatosica non alcolica**. Questa forma è la più comune epatite cronica non virale e non alcolica. Frequentemente associata con alterazioni del profilo lipidico, si differenzia dal punto di vista clinico dalla epatite alcolica per presentare le ALT più elevate delle AST. La diagnosi differenziale definitiva è possibile solo per biopsia.

## FIBROSI E CIRROSI

Le epatiti croniche sono di particolare rilievo clinico in quanto, con una certa frequenza esitano in **cirrosi epatica**. I due processi patogenetici principali di questa evoluzione sono da una parte l'infiammazione cronica (epatite cronica) e dall'altra la fibrosi: la prima è correlata (anche se con molte variabili) a un quadro ematochimico di aumento delle transaminasi, mentre la seconda non è affatto correlata al danno epatocellulare. I possibili marcatori del processo fibrotico finora studiati (proteine quali collagene, elastina, fibronectina, enzimi quali la prolina idrossilasi, proteoglicani come l'acido ialuronico, ) non hanno consentito di evidenziare alterazioni clinicamente significative.

Un certo rilievo clinico assume nella valutazione del passaggio dalla fase infiammatoria a quella fibrotica, il **rapporto AST/ALT** che è tipicamente < 1 nelle epatiti croniche (fase prevalentemente infiammatoria/necrotica degli epatociti) e diventa > 1 nella fase prevalentemente fibrotica e cirrotica.

La specificità di questo rapporto in questo contesto diagnostico è del 75-100% con una sensibilità però decisamente più bassa.

Il dosaggio della  **$\alpha$ -fetoproteina** mostra generalmente valori elevati nella cirrosi epatica, con una sensibilità del 35% e una specificità del 98.5%. Un suo aumento quindi è correlato all'entità del processo fibrotico e un suo aumento in un soggetto con epatite cronica deve far sospettare una evoluzione cirrotica.

Anche il dosaggio dell'**albumina**, pur se meno sensibile di altri markers viene utilizzato nella valutazione del grado di disfunzione epatica: una diminuzione significativa depone per una evoluzione cirrotica dell'epatite cronica.

## CARCINOMA EPATOCELLULARE

In alcuni casi la epatite cronica può tardivamente essere complicata dall'insorgenza di un carcinoma epatocellulare. In questi casi viene generalmente suggerito il **dosaggio della AFP**, associata a scanning ultrasonico ogni 6 mesi.

Un altro test che ha dimostrato una certa utilità nella diagnosi del carcinoma epatocellulare in soggetti con cirrosi è il dosaggio della  **$\gamma$ -carbossi protrombina**, che ha dimostrato una maggiore specificità diagnostica. Purtroppo il test non è disponibile diffusamente.

# ENZIMI INDICATIVI DELL'OSTRUZIONE DELLE VIE BILIARI

## BILIRUBINA E SISTEMA BILIARE

### FISIOLOGIA

La bilirubina è il prodotto di degradazione dell'eme. Le cellule del SRE captano l'emoglobina (legata all'aptoglobulina dopo essere stata rilasciata dai GR), rimuovono il ferro e spezzano l'anello pirrolico dell'eme formando la bilirubina. Questa viene rilasciata nel plasma (**bilirubina non legata o indiretta**) e si lega, per la sua idrofobicità, all'albumina. Il complesso bilirubina-albumina segue la circolazione sistemica e, a livello dei lobuli epatici, la bilirubina viene staccata dall'albumina e captata dagli epatociti, dove è resa idrosolubile mediante coniugazione con acido glucuronico (**bilirubina coniugata o diretta**).

La bilirubina coniugata entra quindi, attraverso la bile, nel lume intestinale, dove la flora batterica la degrada ulteriormente a urobilinogeno, che subisce a sua volta processi ossidativi e viene scisso in pigmenti detti urobiline o stercobiline, escrete nelle feci a cui conferiscono il caratteristico colore marrone scuro. Una piccola parte dell'urobilinogeno è però riassorbita e raggiunge la circolazione sistemica e viene eliminata con le urine dal rene.

La bilirubina coniugata è detta diretta perché, date le sue caratteristiche di idrosolubilità, reagisce rapidamente nei test comunemente usati per la sua determinazione. Al contrario la bilirubina non coniugata è detta indiretta perché deve essere solubilizzata con alcol o altri solventi per reagire.

I metodi utilizzati calcolano la bilirubina totale e quella diretta, mentre quella indiretta viene calcolata per differenza.

### PATOLOGIA

In tutte le condizioni in cui una maggiore quantità di emoglobina viene rilasciata dai GR (**malattie emolitiche**) c'è un aumento di bilirubina, e in particolare di bilirubina non coniugata, questo perché il fegato non è in grado di coniugare molta più bilirubina di quello che fa fisiologicamente. Questa condizione è detta **ittero pre-epatico**, e in questa condizione è comunque aumentata la produzione di urobilinogeno, con conseguente colorito più bruno delle feci ed escrezione di urobilinogeno maggiore della norma nelle urine.

Nei processi morbosi caratterizzati da difficoltà **epatica a captare la bilirubina** la quantità di bilirubina indiretta aumenta, mentre quella diretta diminuisce. In questo caso si ha un colorito più chiaro delle feci ed escrezione di urobilinogeno minore della norma nelle urine.

Se invece c'è un **ostruzione delle vie biliari** la bilirubina coniugata (diretta) si riversa per via retrograda nel flusso sanguigno e la quantità di bilirubina e di urobilinogeno nell'intestino diminuiscono. La bilirubina non coniugata, data la sua alta solubilità, passa con facilità nelle urine, che assumono così un colorito scuro. Questa condizione è definita **ittero da ostruzione**.

Anche in caso di **gravi disfunzioni delle cellule epatiche** i valori di entrambe le frazioni (diretta e indiretta) aumentano, anche se con valori non paragonabili a quella dell'ostruzione delle vie biliari.

La **Sindrome di Gilbert** è dovuta a una variante genetica dell'enzima UDP-glicuroniltransferasi che coniuga la bilirubina all'acido glucuronico → ciò sta alla base di una condizione di lieve iperbilirubinemia (< 3mg/dl).

Per quanto riguarda i **sali biliari**, questi vengono normalmente escreti nella bile per emulsionare i grassi e poi vengono riassorbiti per alcuni cicli per poi essere eliminati con la stessa bile.

L'ostruzione delle vie biliari determina il riassorbimento dei sali biliari e il loro aumento in circolo, e questo può essere anche dovuto, oltre ai fenomeni ostruttivi, a fenomeni di alterata funzione epatica. Spesso l'intenso prurito che accompagna l'ittero è proprio dovuto alla presenza di Sali biliari.

La determinazione dei Sali biliari può avvenire con metodi spettrofotometrici, cromatografici e radioimmunologici.



Si tratta in effetti di un gruppo di enzimi differenti, codificati da geni diversi: uno sul **cromosoma**

**1**, che codifica per la forma più abbondante dell'enzima tissutale presente nel fegato, rene e osso con la stessa struttura proteica ma con diverso contenuto glucidico. Due geni situati sul **cromosoma 2** codificano per l'ALP placentare e intestinale e un ulteriore gene sul **cromosoma 2** per la ALP delle cellule germinali o similplacentare.

Nelle cellule la ALP è principalmente legata alle membrane cellulari; in particolare negli epatociti è localizzata sulla parte canalicolare della membrana cellulare. La ALP viene prodotta anche dalle cellule osteoblastiche e dalla parete intestinale.

Nel siero dell'adulto sono presenti principalmente ALP di origine osteoblastica ed epatica per circa la metà ciascuna e con piccole percentuali di ALP di origine intestinale. La separazione delle ALP di origine ossea ed epatica non è semplice e richiede tecniche quali l'immuno-elettroforesi e l'isoelettrofocusing.

E' presente una certa attività ALP nelle urine, che non rappresenta enzima escreto dal rene quanto enzima presente nelle cellule renali esfoliate nelle urine. I meccanismi del rilascio della ALP possono essere diversi. Con il danno colestatico aumenta la sintesi della ALP da parte degli epatociti: contemporaneamente l'azione dei sali biliari causa il distacco di frammenti di membrana dalle cellule canalicolari con conseguente rilascio dell'enzima ad esse legato. Quindi compariranno nel sangue sia la forma normalmente prodotta dall'epatocita sia la forma legata alla membrana, con PM più elevato e legata a lipoproteine.

La ALP di origine intestinale viene secreta nel lume e riassorbita per via linfatica donde passa nell'ECF.

Gli isoziemi della ALP hanno semivite molto diverse: quello osseo di circa 1 d, quello epatico di circa 3 d e quello placentare di oltre 7d: quello intestinale invece ha una semivita dell'ordine di minuti.

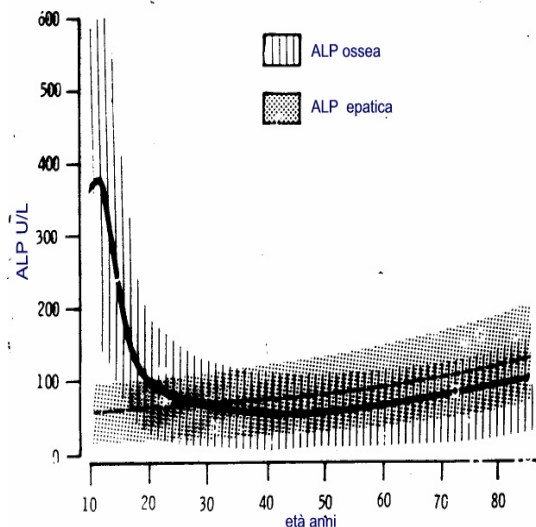
### VALORI DI RIFERIMENTO

I valori di riferimento della ALP sono dipendenti dal sesso e dall'età. Più elevati del 10-15% nei soggetti di origine africana

Valori di riferimento della ALP per sesso ed età: è indicato il valore del 95°percentile

anni	Maschi	Femmine
< 1	477	442
1-2	333	415
2-5	291	341
5-7	291	341
7-10	316	354
10-13	362	393
13-15	-	322
15-17	365	-
15-18	-	122
17-19	176	-
>18	-	86
>19	126	-

I valori della ALP totale sono legati a due diverse dinamiche (fig. 17). da una parte l'isoenzima di origine ossea, con valori elevati nel soggetto in fase di accrescimento osseo rispetto all'adulto e dall'altra l'enzima di origine epatica. Nelle fasi di accrescimento il principale responsabile dell'aumento dell'attività enzimatica è l'isoenzima di origine ossea.



### Andamento dei valori della ALP totale con le diverse età.

Nel periodo dell'accrescimento e della mineralizzazione ossea l'isoenzima osseo è il maggiore responsabile degli elevati livelli plasmatici dell'enzima. Quindi nell'età adulta l'isoenzima osseo e quello epatico sono grossolanamente equivalenti nel contributo ai livelli di ALP totale. Nell'anziano si osserva un lieve incremento dei valori, dovuto ad ambedue gli isoenzimi che aumentano sia per le modificazioni del rimodellamento osseo sia per quelle della funzionalità epatica.

Durante la gravidanza, (III trimestre) si osserva un aumento x2 o x3, in seguito all'apporto di isoenzima placentare e osseo). La somministrazione di farmaci antiepilettici induce la formazione dell'isozima epatico, con aumento dei livelli. Il tabagismo aumenta i livelli di circa il 10%, l'uso di contraccettivi orali li diminuisce del 20%.

### Patologia

#### Malattie epatobiliari

Il fegato risponde all'**ostruzione biliare** con una induzione della produzione della ALP e di altri enzimi da parte degli epatociti adiacenti i canalicoli biliari. Gli acidi biliari dissolvono parte della membrana con i relativi enzimi e quindi l'enzima entra in circolo provocando un aumento della ALP (e degli altri enzimi contemporaneamente rilasciati).

**La forma di ALP liberata in questo caso può essere differenziata dalla forma normalmente presente in quanto unita a una lipoproteina della membrana**

L'**ostruzione extraepatica** generalmente causa incrementi più consistenti (x10-12) rispetto a forme di ostruzione intraepatica (x2-3).

La disfunzione epatocellulare (epatiti infettive o tossiche, necrosi epatiche) generalmente causa aumenti meno consistenti dei valori di ALP.

#### Malattie dell'osso

I Valori di ALP sono correlati con l'attività di apposizione e neoformazione ossea. L'ALP infatti ha la funzione di scindere il pirofosfato che costituisce un inibitore della mineralizzazione ossea.

Aumenti da lievi a moderati si osservano nell'iperparatiroidismo primitivo e secondario, nell'osteomalacia e nella fase di guarigione delle fratture.

Valori molto elevati (x10-x25) si osservano invece **nell'Osteite deformante di Paget** e nei casi di

**neoplasie ossee.**

Valori generalmente normali si osservano nell'osteoporosi.

#### Altre malattie

Un aumento della ALP (isozima intestinale) è frequente nei soggetti diabetici, nei soggetti con cirrosi epatica o insufficienza renale.

Alcuni isoenzimi della ALP sono frequenti in soggetti con neoplasie, specialmente delle cellule germinali.

## **GAMMA GLUTAMIL TRASFERASI GGT**

### **EC 2.3.2.2 $\gamma$ -GLUTAMILPEPTIDE:AMINOACIDO $\gamma$ GLUTAMILTRASFERASI GGT**

Si tratta di una peptidasi che catalizza l'idrolisi di peptidi con la formazione di aminoacidi o peptidi di dimensioni minori. L'enzima è contenuto in diversi tessuti, con **massima concentrazione nel tessuto renale e quindi, in senso decrescente fegato, pancreas e intestino**. L'enzima è principalmente legato alla membrana cellulare. **Vi sono diversi isoenzimi, che non dimostrano una specificità per tessuto.**

**L'enzima presente nel sangue deriva in massima parte dal tessuto epatico.** Il meccanismo del rilascio dell'enzima, analogamente a quello della fosfatasi alcalina ALP è quello dell'effetto degli acidi biliari sulle cellule epatiche pericanalicolari, con rilascio di frammenti di membrana a cui sono legate GGT e ALP.

La semivita è di circa 7-10 gg.

#### **VALORI DI RIFERIMENTO**

I valori nei soggetti di origine africana sono circa il doppio di quelli dei soggetti di origine europea. Esiste una correlazione tra valori di GGT e massa corporea. Il fumo incrementa i valori di circa il 20%.

#### **PATOLOGIA**

##### **Malattie epatiche**

Il dosaggio del GGT costituisce un discreto marker di funzionalità epatica. **I maggiori aumenti si osservano nel 100% dei pazienti con tumori primitivi o secondari del fegato** e nella cirrosi biliare (> x10): aumenti più contenuti (x4-x10) si osservano nelle epatiti croniche, colestasi intraepatica o extraepatica, cirrosi, epatopatia alcolica.

**La GGT costituisce un test abbastanza sensibile per valutare l'abuso alcolico**, anche se solo il 30-50% dei bevitori ha una GGT elevata. Come valore soglia c'è quello di un minimo di due-tre dosi di superalcolici al giorno.

#### **Altre malattie**

Aumenti della GGT si osservano in diverse neoplasie maligne e nell'ipertiroidismo. La somministrazione di farmaci induttori enzimatici causa un aumento di 4-5 volte dei valori di GGT: barbiturici ecc. I contraccettivi orali riducono il livello dell'enzima.

## **5'-NUCLEOTIDASI 5'-NT**

### **EC 3.1.3.5 5'-RIBONUCLEOTIDE FOSFOIDROLASI NTP**

L'azione della NTP è quella di staccare fosfato inorganico dai nucleotidi. Diffusa a molte cellule, è di regola legata alla membrana cellulare. **L'enzima presente nel sangue deriva in massima parte dal tessuto epatico.**

Il meccanismo del rilascio dell'enzima, **analogamente a quello della fosfatasi alcalina e della GGT è quello dell'effetto degli acidi biliari sulle cellule epatiche pericanalicolari**, provocando un rilascio di frammenti di membrana ad elevato contenuto di enzima o degli enzimi adesi alla superficie cellulare.

#### **VALORI DI RIFERIMENTO**

2-17 U/L

#### **PATOLOGIA**

##### **Malattie epatiche**

**L'enzima ha un comportamento in patologia analogo a quello dell'ALP; aumenta in tutte le condizioni di ostruzione biliare intra ed extraepatica.** Aumenta nella colestasi da clorpromazina e nella cirrosi biliare.

## ALTRI MARKERS DI DANNO EPATICO

Un ottimo marker delle epatopatie gravi è la diminuzione dell'**urea** (per diminuita capacità del fegato di sintetizzarla a partire dallo ione ammonio), con conseguente aumento di ioni ammonio.

Un marker di rilievo è la **pre-albumina** (preferita all'albumina perché ha emivita più breve), diminuita in patologie epatiche acute e croniche.

Altri buoni markers sono i **fattori di coagulazione epatici**, che possono diminuire o avere una minore attività nelle lesioni epatiche. Il più importante (poiché ha emivita più breve) è il fattore VII, il cui deficit causa un allungamento del PT.

## CERULOPLASMINA E MALATTIA DI WILSON

La malattia di Wilson è una rara disfunzione epatica caratterizzata **dall'accumulo di rame** nel fegato, negli occhi, nel cervello e in altri organi. Sintomo patognomnico della malattia è la presenza di un anello pigmentato attorno all'iride. L'alterazione di laboratorio più evidente è invece la diminuzione della una proteina deputata al trasporto del rame, la ceruloplasmina, la cui funzione è quella di veicolare il rame nella bile per la sua eliminazione. **La patologia può assumere i caratteri di un'epatite acuta** da intossicazione da rame. Per la terapia vengono utilizzati agenti chelanti il rame, che permettono la sua eliminazione a livello urinario.

# ALTRI ENZIMI IMPORTANTI IN DIAGNOSTICA

## ALDOLASI

### EC 4.1.2.13 D-FRUTTOSO-1-6 BISDIFOSFATO D-GLICERALDEIDE -3- FOSFATO LIASI ALD

La ALD è un enzima della catena glicolitica e catalizza la scissione del fruttosio 1-6 difosfato a gliceraldeide 3 fosfato.

La molecola ha una struttura tetrameric. I monomeri che la compongono determinati da tre distinti loci di cui due, quelli che producono le subunità A e B sono simultaneamente attivi nella maggior parte dei tessuti, mentre quello che produce la subunità C è attivo solo nel tessuto cerebrale.

Gli isozimi A e B dimostrano significativa differenza nella cinetica delle reazioni catalizzate. In particolare la ALD A dimostra un'affinità verso il fruttosio 1-6 difosfato molto più elevata della ALD B.

### VALORI DI RIFERIMENTO

1m-11aa 2-12 U/L

adulto 1-6 U/L

### PATOLOGIA

Il dosaggio dell'aldolasi fornisce informazioni per molti versi sovrapponibili a quelle del dosaggio della CK dal quale tende ad essere sostituito nella pratica clinica. Nelle **distrofie muscolari genetiche** si osservano aumenti consistenti (x50 URL): nei portatori sani si osservano aumenti lievi ma significativi. Aumenti più contenuti si osservano nelle dermatomiositi, e nella distrofia scapolo-omerale, mentre nella miastenia e nella polimiosite i valori sono di regola nella norma.

**Nell'infarto miocardico si osservano aumenti abbastanza contenuti.** (x5- x8 URL).

**Aumenti consistenti (x7-x20 URL) con andamento parallelo a quello della ALT si osservano nell'epatite virale**, mentre nelle altre epatopatie i valori non sono generalmente diagnostici. **Consistenti aumenti di ALD si osservano in diverse neoplasie** (prostata, carcinomi specie se metastatizzati al fegato, leucemie e linfomi), **nelle psicosi acute e nella schizofrenia. La somministrazione di cortisonici o di ACTH può causare significativi aumenti dell'ALD.**



## FOSFATASI ACIDA

### EC 3.1.2.3 FOSFOIDROLASI MONOESTERE ORTOFOSFORICO ACP

Le fosfatasi acide sono un gruppo di isoenzimi (oltre 20) diffusi in numerose cellule e tessuti, che possono essere frazionati elettroforeticamente in 5 bande principali presenti in maniera differenziata nei diversi organi e tessuti :

banda 1: prostata  
banda 2: granulociti  
banda 3: piastrine, eritrociti, monociti  
banda 4: granulociti  
banda 5: osteoclasti monociti cc Kupffer

A livello subcellulare, la ACP è presente principalmente nei lisosomi. Normalmente nel siero è presente una attività ACP bassa, proveniente principalmente della frazione osteoclastica.

La prostata e il liquido seminale contengono circa 106 U/L di ACP, ovvero circa un **milione** di volte più che nel siero: da ciò deriva l'utilità del dosaggio della ACP (Prostatic Acid Phosphatase, PAP) nella diagnosi e nel **monitoraggio delle neoplasie prostatiche e in medicina legale**, per evidenziare la presenza di sperma.

### VALORI DI RIFERIMENTO

I valori dipendono dall'età e dal sesso. Alti nei bambini, si innalzano ulteriormente nell'adolescenza per scendere intorno ai 20 anni ai valori dell'adulto: **0.1-0.8 U/L**. La semivita dell'enzima è dell'ordine di **2-3h**. L'enzima dimostra variazioni significative giorno per giorno: l'isozima prostatico dimostra una **variazione del 30% che può salire al 100% nei casi di carcinoma della prostata**.

***Occorre ricordare che una causa possibile di variazione preanalitica dei valori di ACP è l'esplorazione rettale, che causa una scarica di ACP in circolo***

### PATOLOGIA

#### Malattie della prostata

L'enzima può aumentare in tutte le patologie prostatiche, da quelle infettive alle iperplasie, alle neoplasie. Gli aumenti di ACP in caso di neoplasia della prostata sono di scarsa entità quando la neoplasia è localizzata, intracapsulare; aumentano invece notevolmente e in maniera proporzionale alle dimensioni della neoplasia in caso di diffusione extracapsulare.

Nel 60% dei soggetti con neoplasia metastatizzata della prostata si osservano valori che possono raggiungere i x 50URL. Dopo terapia si osserva di regola, nei casi di successo, normalizzazione dei livelli di ACP, che possono di nuovo aumentare in caso di ricaduta o di metastasi.

#### Malattie dell'osso

Un aumento della ACP si osserva in molte malattie metaboliche dell'osso ed è correlato all'aumento dell'attività osteoclastica (es. iperparatiroidismo)

#### Altre malattie

Aumenti dell'ACP si osservano nelle ostruzioni delle vie urinarie e nella sindrome da carcinoide. **L'evidenziazione dell'attività ACP nel fluido vaginale raccolto su tampone è usato per dimostrare la presenza di liquido seminale in caso di sospetta violenza carnale.**

## AMILASI

### EC3.2.1.1 1,4- $\alpha$ -D GLUCAN IDROLASI

Le amilasi sono un gruppo di enzimi che **scindono i carboidrati complessi**. Nell'organismo umano sono presenti **due isoenzimi**, quello di origine salivare (S-amilasi) e quello di origine pancreatica (P-amilasi), prodotte da due loci presenti nel cromosoma 1. L'isozima salivare si presenta con 12 diversi fenotipi e quello pancreatico con 6 diversi fenotipi. I diversi fenotipi vanno incontro a modificazioni post-translazionali (deaminazione, glicosilazione ecc) che comportano la formazione di **numerose isoforme**.

**L'amilasi viene filtrata a livello glomerulare e compare nelle urine, dove può essere dosata.**

Sono talora presenti nel plasma delle forme di *macroamilasi*, (PM>200.000) una isoforma derivante dal legame della molecola enzimatica con una IgG, con formazione di un complesso che non passa il filtro renale. Quindi, nei casi di macroamilasemia l'attività amilasica urinaria è generalmente ridotta, mentre, riducendosi la clearance dell'enzima, l'attività sierica risulta aumentata.

#### CAUSE DI IPERAMILASEMIA E IPERAMILASURIA

malattie	Amilasemia totale	Isozima P	Isozima S
Valori di riferimento:			
<b>1. Malattie Pancreatiche</b>			
1.1 Pancreatite Acuta	3-6 x		
1.1 Pancreatite Cronica riacutizzata	2-3 x		
1.2 Complicanze			
Pseudocisti			
Ascite e versamento pleurico(versamento)	100 X		
Ascesso	variabile		
1.3 Trauma Pancreatico, (incluse manovre diagnostiche strumentali)	variabile		
1.4 Carcinoma Pancreatico			
<b>2. Malattie non pancreatiche</b>			↑
2.1 Insufficienza Renale			↑
2.2 Iperamilasemia Neoplastica	< 50 x		
2.3 Malattie ghiandole Salivari	2-10 x		
2.4 Macroamilasemia	.		
<b>3. Malattie di origine diversa</b>			
3.1 Malattie tratto Biliare	<4 x	↑	
3.2 Malattie Intra-addominali	<4 x	↑	
ulcera Peptica Perforata		↑	
Ostruzione Intestinale		↑	
Infarto Mesenterico		↑	↑
Peritonite	2-3 x	↑	↑
Appendicite Acuta		↑	↑
Gravidanza ectopica	< 8 x		↑
Aneurisma Aortico dissecante			
3.3 trauma Cerebrale			
3.4 Ustioni e shock traumatico			
3.5 iperamilasemia Postoperatoria			
3.6 ketoacidosi Diabetica	4 x	↑	
3.7 trapianto Renale			
3.8 alcolismo Acuto	3 x (10%)		
3.9 farmaci e droghe d'abuso			
oppioidi Medicinali		↑	
Tossicodipendenza da eroina			↑

#### VALORI DI RIFERIMENTO

**Nell'adulto 0-140 U/L.** Nel neonato è generalmente molto bassa e raggiunge a 1 anno i valori dell'adulto

**Una possibile causa di variabilità è la contaminazione del campione con saliva, che ha un contenuto di amilasi 700 volte superiore a quello del siero.**

## **PATOLOGIA**

### **Malattie pancreatiche**

L'aumento dell'amilasi che si osserva **nella pancreatite acuta** è molto precoce e significativo: compare entro 2-8 ore dall'inizio della sintomatologia dolorosa e permane 3-4 gg. Il picco (x4-6 URL) si raggiunge entro 72 h.

**L'aumento dell'amilasemia non compare in tutti i casi di pancreatite acuta.** In una percentuale variabile tra il 15 e il 25 % dei casi l'amilasi è entro limiti di riferimento. L'entità dell'aumento dell'amilasemia non è spesso correlato con l'entità della necrosi pancreatica.

**L'amilasuria rispetto all'amilasemia appare un test più sensibile e specifico per la diagnosi di pancreatite acuta,** in quanto compare in una percentuale maggiore di soggetti malati, raggiunge valori più elevati rispetto a quelli di riferimento e permane elevata più a lungo.

**Nelle pancreatiti croniche il dosaggio dell'amilasi appare di scarso rilievo clinico** in quanto il contemporaneo intervento di due fattori patogenetici contrapposti- la riduzione del parenchima secernente e l'aumentato rilascio dell'enzima dalla porzione del parenchima residuale – possono esitare in valori normali, diminuiti o lievemente aumentati.

### **Malattie non pancreatiche**

In diverse malattie neoplastiche può osservarsi una iperamilasemia, in seguito a produzione di S-amilasi o P-amilasi: tumori del polmone, neoplasie dell'ovaio.

Nei quadri di addome acuto (colecistite, appendicite, gravidanze ectopiche) si osservano quasi costantemente aumenti dell'amilasi.

**Nelle infiammazioni** della parotide e traumi parotidici possono osservarsi significativi aumenti dell'S-amilasi.

Molto frequente è una **iperamilasemia postoperatoria** (20% degli interventi chirurgici)

La somministrazione di **droghe d'abuso**, e in particolare l'eroina e gli oppiacei causano una iperamilasemia consistente e persistente. L'intossicazione alcolica acuta e cronica causano aumenti incostanti dell'enzima.

### **Macroamilasemia**

Si tratta di un reperto **abbastanza frequente**. Il reperto di una macroamilasemia non costituisce per se una malattia, ma può essere espressione di uno stato disproteidemico.

## LIPASI

### EC 3.1.1.3; TRIACILGLICEROLO ACILIDROLASI

La lipasi catalizza l'idrolisi dei legami esterici nei trigliceridi per produrre acidi grassi e acilglicerolo. Per espletare completamente la sua azione catalitica, la lipasi necessita della colipasi e della presenza di sali biliari. La colipasi, un coenzima della lipasi, è secreta dal pancreas ed è presente nel siero.

Nel processo digestivo dei grassi il meccanismo fisiologico consiste anzitutto nell'azione degli acidi biliari che promuovono la formazione delle micelle, a cui si lega la colipasi per formare un complesso colipasi-acido biliare. La lipasi si lega al complesso acido biliare/colipasi e consente quindi l'azione idrolitica sul substrato.

Lipasi e colipasi sono sintetizzate dalla cellula acinosa del pancreas e secrete in quantità equimolecolari. Mentre la colipasi viene escreta a livello urinario, la lipasi, escreta a livello glomerulare viene completamente riassorbita dal tubulo.

La lipasi pancreatica ha **tre isoforme**, la cui utilità diagnostica differenziale non è stata finora accertata.

Anche la lipasi, come l'amilasi, può formare un complesso con IgG e altre proteine per dar luogo a una macrolipasi.

### VALORI DI RIFERIMENTO

Molto variabili a seconda del metodo usato, generalmente <130 U/L

### PATOLOGIA

#### Malattie pancreatiche

L'aumento della lipasi che si osserva nella **pancreatite acuta** è molto precoce e significativo: compare entro 4-8 ore dall'inizio della sintomatologia dolorosa e permane 8-14 gg. Il picco si raggiunge entro 24 h.

**L'aumento della lipasi costituisce un indicatore più sensibile (>80%) e specifico (>60%) dell'amilasi nella diagnosi della pancreatite acuta.**

***L'uso coordinato del dosaggio della amilasi e lipasi consente una diagnosi di laboratorio della pancreatite acuta con ottima sensibilità e specificità diagnostica.***

La lipasi, analogamente all'amilasi e per gli stessi motivi fisiopatologici dimostra modificazioni in aumento o in diminuzione inconsistenti per la diagnosi di pancreatite cronica. Lievi aumenti si osservano nelle ostruzioni biliari.

#### Altre malattie

L'insufficienza renale comporta una diminuzione della clearance della lipasi con aumento nel plasma.

## TRIPSINA

La tripsina è una proteasi che idrolizza i legami peptidici formati dal gruppo carbossilico della lys o arg con altri aminoacidi. E' sintetizzata nelle cellule acinose del pancreas sotto forma di zimogeni inattivi, il tripsinogeno I e II che danno luogo alle due forme attive tripsina I e II. I proenzimi sono immagazzinati nei granuli di zimogeno delle cellule acinose e secreti nel succo pancreatico.

Nell'intestino, per azione dell'enterochinasi i tripsinogeni sono convertiti in tripsina.

### VALORI DI RIFERIMENTO

Adulto 100 –400 µg/L

Strettamente dipendenti dal metodo usato e quindi da determinare in ogni singolo laboratorio

### PATOLOGIA

#### Malattie pancreatiche

**Pancreatite acuta:** La tripsina I aumenta in parallelo con l'amilasi per raggiungere un picco in alcuni casi molto elevato (x2-x300)

**Nella pancreatite cronica i valori spesso non sono significativi**, in particolare quando non è presente steatorrea: in presenza di steatorrea invece i valori sono generalmente molto bassi.

#### Altre malattie

Valori inferiori al normale sono stati riportati per il **diabete**, con una correlazione alla gravità della malattia.

#### Dosaggio della tripsina nel fluido duodenale e nelle feci

La tripsina fecale è oggi considerata di scarso rilievo diagnostico, in quanto non si è in condizione di controllare la quantità di tripsina distrutta nel tratto Gi dalle proteasi.

## CHIMOTRIPSINA

La chimotripsina è una proteasi analoga alla tripsina che idrolizza i legami peptidici dei gruppi carbossilici di trp,leu,tyr,phe. E' sintetizzata nelle cellule acinose del pancreas sotto forma di zimogeni inattivi, il chimotripsinogeno I e II che danno luogo alle due forme attive chimotripsina I e II. I proenzimi sono immagazzinati nei granuli di zimogeno delle cellule acinose secreti nel succo pancreatico e nel lume intestinale sono trasformati nell'enzima attivo (chimotripsina I e II) ad opera della tripsina.

### VALORI DI RIFERIMENTO

Negli adulti 15-78 µg/L

Strettamente dipendenti dal metodo usato e quindi da determinare in ogni singolo laboratorio

### PATOLOGIA

**Utilizzata nella diagnostica pancreatico, con applicazioni sovrapponibili a quelle della tripsina.** La maggior resistenza alla digestione nel tratto intestinale rende il **dosaggi fecale** di questo enzima più informativo rispetto a quello della tripsina. Utilizzata nella diagnosi della **malattia fibrocistica del pancreas** (nei neonati affetti da Fibrosi Cistica possono osservarsi, nel sangue del cordone ombelicale, valori da 3 a 7 volte più elevati).

Abbastanza usato è il dosaggio della chimotripsina fecale o nel succo duodenale. **Nei soggetti con pancreatici croniche si osservano generalmente valori ridotti.**



## COLINESTERASI

### EC 3.1.1.7 ACETILCOLINA ACETILIDROLASI AChE EC3.1.1.8 ACILCOLINA ACILIDROLASI SchE

Le colinesterasi sono due enzimi che idrolizzano l'acetilcolina. Il primo, la colinesterasi "vera" è l'acetilcolinesterasi o colinesterasi I, il secondo la "pseudo"colinesterasi è la colinesterasi II. La colinesterasi vera è presente negli eritrociti, nel SNC e nelle sinapsi e terminazioni nervose. La pseudocolinesterasi è invece presente nel fegato, pancreas, cuore, siero, il suo ruolo fisiologico preciso non è conosciuto. **Il laboratorio clinico dosa questo secondo enzima**

Nel siero sono presenti diverse forme di colinesterasi e diversi isozimi.

Il gene che codifica per la SchE ha diverse varianti alleliche, oltre alla variante normale:

1. un gene che codifica una SchE poco attiva e resistente all'inibizione con fluoruro
2. un gene che codifica per una SchE poco attiva e resistente all'inibizione con dibucaina
3. un gene silente con SchE inattiva o assente.

#### VALORI DI RIFERIMENTO

4000-12000 U/L a 37°. Alla nascita i livelli sono ¼ di quelli dell'adulto e raggiungono i livelli adulti entro il 6° mese. Le donne hanno mediamente valori del 25% inferiori rispetto ai maschi.

#### PATOLOGIA

Il dosaggio della SchE viene utilizzato in tre diversi contesti diagnostici:

1. come marker per gli avvelenamenti con esteri organofosforici
2. per evidenziare le varianti SchE che predispongono a gravi incidenti con l'uso di determinati farmaci
3. come indicatore della funzionalità del fegato

#### Malattie epatiche

Poiché la SchE è sintetizzata nelle cellule epatiche, i suoi valori sono ben correlati con la funzionalità epatica. **Sfortunatamente l'ampia variazione interindividuale dei valori di riferimento non consente facilmente, in presenza di un determinato valore, di valutare se ci sia stata una diminuzione rispetto ai valori di base e questo fatto limita fortemente la validità diagnostica del test; l'informatività è massima in termini di confronto tra dati dello stesso individuo, anche tenendo conto che i valori nella stessa persona sono piuttosto stabili in assenza di malattia.**

Nelle epatiti acute e croniche si osserva una diminuzione dell'attività SchE del 30-50%, una diminuzione dal 50 al 70% si osserva nella cirrosi e nei carcinomi metastatizzati al fegato. Valori normali si osservano generalmente nell'ittero ostruttivo.

#### Diagnosi varianti SchE

La diagnosi dei soggetti portatori di queste varianti è essenziale in quanto la somministrazione di suxametonio (succinilcolina) e mivacurio come rilascianti muscolari in caso di interventi chirurgici potrebbe esporre i soggetti portatori di varianti SchE a apnee prolungate. Questi farmaci, strutturalmente analoghi alla acetilcolina, vengono distrutti dalla colinesterasi e, se il soggetto presenta un'attività colinesterasica ridotta, l'iperdosaggio relativo dei farmaci causa un'apnea prolungata che può richiedere una respirazione assistita. La frequenza di questa condizione è alta (1:1600 con una frequenza di portatori sani di 1:20) Il grado della sensibilità al suxametonio varia con il genotipo (omozigote o eterozigote) e col fenotipo del paziente.

Per caratterizzare le varianti occorre valutare il cosiddetto numero di dibucaina o il numero di fluoruro, che consente di valutare oltre all'attività totale, anche il grado di inibizione dell'enzima in presenza di concentrazioni variabili di queste sostanze.

Nel caso del **Test alla dibucaina**, i soggetti normali mostrano una inibizione del 70-90%, gli eterozigoti del 30-60% e gli omozigoti una inibizione < al 30%.

#### Intossicazioni da pesticidi.

Alcuni insetticidi organofosforici inibiscono l'attività di ambedue le colinesterasi.

I primi sintomi appaiono con riduzioni del 40%. I disturbi neuromuscolari compaiono per una riduzione dell'attività dell'80%, la morte avviene -a meno di misure di terapia intensiva- quando il livello è vicino a zero. I livelli individuali di SchE possono essere utilizzati per la monitoraggio dei soggetti esposti.

# EMOSTASI

CAPITOLO 5

## FISIOLOGIA DELL'EMOSTASI

### DEFINIZIONE

L'emostasi è quel processo che porta all'arresto del sanguinamento, processo che è finemente regolato da fattori attivanti e inibenti; un'insufficiente emostasi porta a emorragia, l'incapacità di mantenere il sangue fluido (eccessiva emostasi) porta alla trombosi.

L'emostasi consta di 4 fasi:

1. Spasmo vascolare
2. Formazione del tappo piastrinico
3. Coagulazione
4. Stabilizzazione della fibrina
5. Fibrinolisi (lisi del coagulo)

### 1. SPASMO VASCOLARE

La lesione di un vaso è seguita immediatamente dalla costrizione del vaso stesso, che serve a ridurre il flusso e quindi la fuoriuscita di sangue. Lo spasmo è dovuto sia al **riflesso nervoso**, sia a **vasocostrizione miogena locale** direttamente scatenata dalla lesione subita.

### 2. PIASTRINE E TAPPO PIASTRINICO

Le piastrine derivano dalla frammentazione dei megacariociti e sono cellule anucleate di dimensioni che vanno da 1 a 4  $\mu$ . Hanno vita media di circa 10 gg.

La struttura è tipica delle cellule eucariotiche (anche se sono prive di nucleo), in quanto contengono tutti gli organuli (RE, Golgi, mitocondri, citoscheletro formato da MT e MF con attività contrattile, una doppia membrana fosfolipidica).

**3 sono le caratteristiche peculiari delle piastrine a livello strutturale:** la prima è la presenza, sulla membrana fosfolipidica, di **proteine importanti nel processo di coagulazione** (come il fattore piastrinico 3, che attiva la coagulazione, e altre glicoproteine adesive). La seconda caratteristica peculiare è la **presenza di granuli**, distinti in granuli densi (che contengono ADP, ATP e calcio, oltre che fibrinogeno e fattore Von Willebrand) e granuli  $\alpha$ , che contengono importanti proteine piastriniche (fattore piastrinico 4,  $\beta$ -tromboglobulina, PDGF  $\rightarrow$  platelet derived growth factor). Il terzo fattore importante è il **sistema tubulare denso**, un sistema di tubuli nel quale avviene la sintesi di prostaglandine.

La formazione del tappo piastrinico a sua volta comprende tre fasi: adesione, aggregazione, secrezione piastrinica.

#### ➤ Adesione

Le piastrine vengono attivate dal contatto con il collagene sottoendoteliale particolarmente esposto nei tessuti danneggiati. L'adesione dipende dalla presenza del **fattore di Von Willebrand** e della **glicoproteina Ib**. Questi due fattori permettono l'adesione tra piastrine e superficie lesa.

#### ➤ Aggregazione

L'aggregazione è la capacità delle piastrine di legarsi le une alle altre. L'aggregazione dipende dal rilascio graduale e crescente di **ADP** da parte delle piastrine. Ci sono due fasi, che vengono denominate rispettivamente **ondata primaria di aggregazione** e **ondata secondaria di aggregazione**, in cui il rilascio dell'ADP aumenta. L'ADP, legandosi alla membrana delle piastrine,

attiva l'enzima **fosfolipasi**, che libera acido arachidonico, il quale viene convertito dall'enzima ciclossigenasi negli endoperossidi PGG2 e PGH2. L'attività dell'enzima trombassano-sintetasi su questi composti porta alla formazione di **trombossano A2**, attivo ma instabile, che si degrada rapidamente a trombassano B2, stabile ma inattivo. L'azione del trombassano A2 permette l'aggregazione piastrinica, e inoltre stimola la secrezione piastrinica.

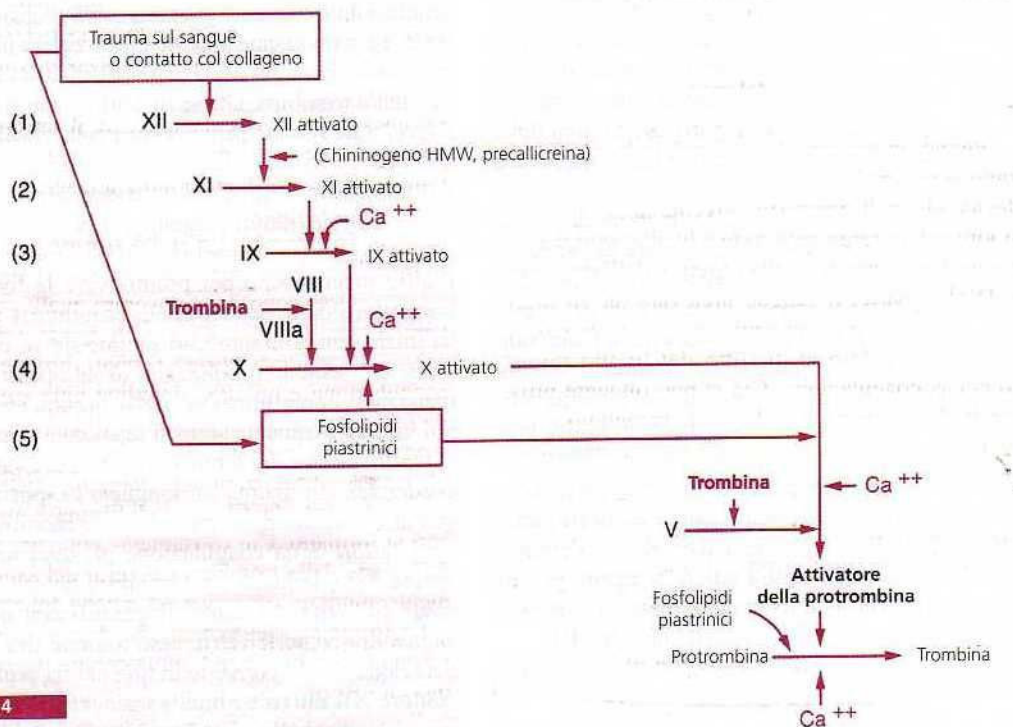
### ➤ **Secrezione piastrinica**

Si ha il rilascio di sostanze. Inoltre, in questa fase, il fattore piastrinico 3, fattore di membrana, accelera l'attivazione a cascata dei fattori di coagulazione.

## 3. COAGULAZIONE

Lo scopo della coagulazione è quello di generare la trombina, una serina proteasi che scinde il fibrinogeno in fibrina, la sostanza alla base del processo coagulativo. La coagulazione avviene attraverso due vie, che non sono separate ma cooperano, e sono la via intrinseca e la via estrinseca.

### ➤ **Via intrinseca**



**FIGURA 36-4**

La via intrinseca per l'avvio della coagulazione del sangue.

Questa via avviene per il contatto di alcune proteine plasmatiche (fattori XI e XII) con la superficie alterata dell'endotelio. Il primo fattore di attivazione è il fattore XII, che reagisce con collagene e altri costituenti esposti nel danno vasale. Il **fattore XII** attivato (XIIa) è coadiuvato da un cofattore, il **chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK)**, nell'attivazione del **fattore XI**. Inoltre lo stesso fattore XII, insieme al HMWK, converte la precallieina in callicreina, la quale a sua volta scinde il HMKW in bradichinina, vasodilatatore in parte anche responsabile dell'infiammazione. XIa attiva quindi il **fattore IX** attraverso una reazione calcio-dipendente. Il fattore IXa, insieme al fattore piastrinico 3, reagisce con il **fattore VIII** a formare il complesso attivatore del **fattore X** (anche questo processo è calcio-dipendente).

## ➤ Via estrinseca

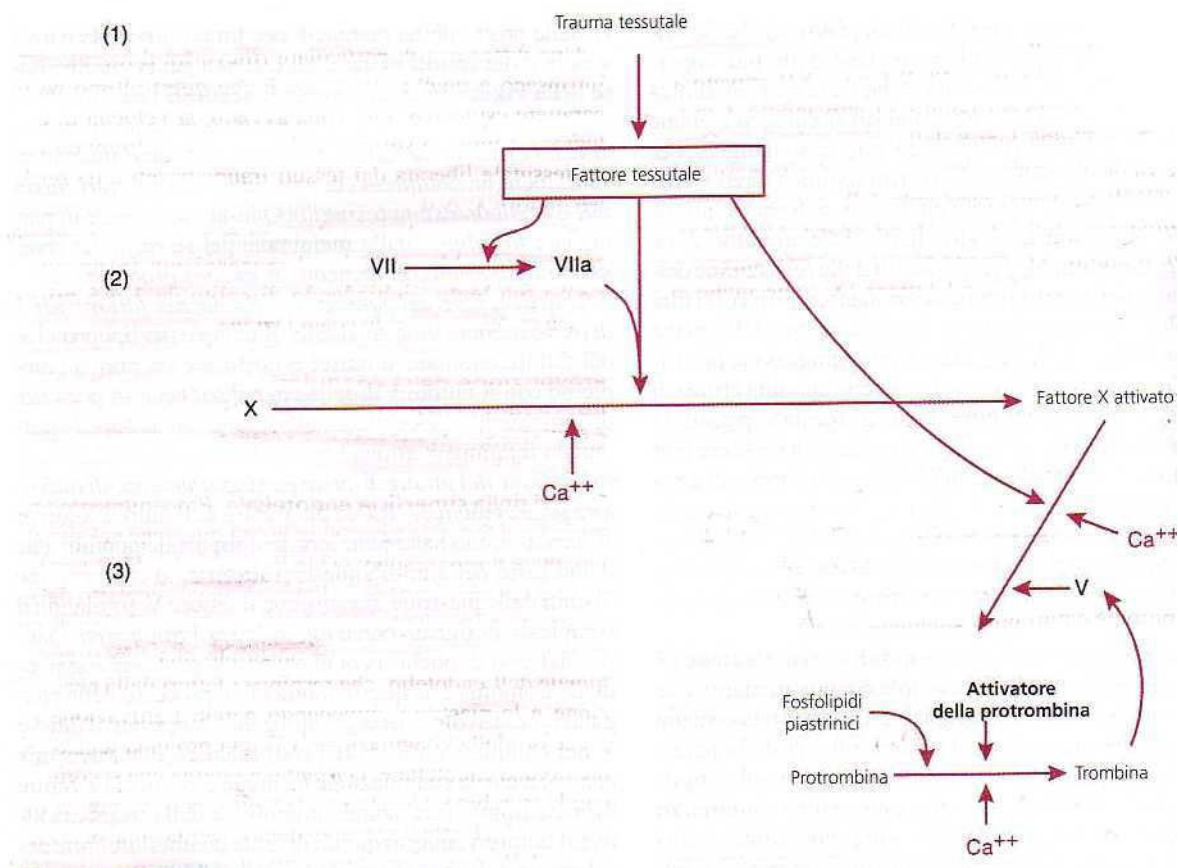


FIGURA 36-3

La via estrinseca per l'avvio della coagulazione del sangue.

Sostanze (tromboplastina tissutale o fattore tissutale) liberate dai tessuti danneggiati convertono il **fattore VII** in VIIa, il quale a sua volta attiva direttamente il **fattore X**.

## ➤ Via finale comune

Il fattore X deve interagire con la **protrombina**, e questo necessita **calcio**, **fosfolipidi**, e il **fattore V**. Il processo porta al taglio proteolitico della protrombina che diventa **trombina**. La trombina, enzima molto potente (*deve essere formato in piccole quantità, altrimenti potrebbe determinare la coagulazione di tutto il sangue circolante*), converte il fibrinogeno in fibrina. I monomeri di fibrina, per polimerizzare e formare il vero e proprio coagulo necessitano del **fattore VIII** attivato (VIIIa), che è a sua volta attivato dalla trombina (vedi grafico via intrinseca). La trombina e il fattore VIII sono quindi essenziali nel processo di coagulazione.

### CURIOSITA' SUI FATTORI DI COAGULAZIONE

Nella nomenclatura corretta il fattore I è il fibrinogeno, il fattore II è la protrombina, il fattore III è il fattore tissutale, il fattore IV è il calcio, il fattore XIII è il fattore stabilizzante la fibrina (v. dopo).

### IMPORTANZA DELLA VITAMINA K SUI FATTORI DI COAGULAZIONE

La vitamina K esiste in diverse forme (fillochinone, menachinone, menadione). E' presente nei **vegetali (spinaci, pomodori...)** ma viene soprattutto sintetizzata dalla **flora batterica intestinale** in quantità sufficiente a coprirne il fabbisogno. Questa vitamina ha il compito di fungere da **cofattore nella carbossilazione del glutammato a carbossigluttammato**, molecola che può **legare il calcio** e formare quindi i complessi proteina-calcio-fosfolipidi. Per questo la vitamina K è necessaria per la sintesi dei fattori protrombina, fattore VII, fattore IX, fattore X e proteina C.



## **DIFFERENZA TRA PLASMA E SIERO**

Il plasma è la parte liquida del sangue. Il siero è il liquido che rimane dopo che il sangue è coagulato, manca cioè dei fattori fibrinogeno, protrombina, VIII, V e XIII, ma contiene ancora gli altri fattori di coagulazione.

## **4. STABILIZZAZIONE DELLA FIBRINA**

Il **fattore XIII**, o **fattore stabilizzante la fibrina**, è una fattore sintetizzato sia dal fegato che dai megacariociti, e partecipa alla formazione di legami intermolecolari tra i monomeri di fibrina. Anch'esso è **attivato dalla trombina** (cioè convertito nella forma attiva durante la formazione del coagulo).

## **5. FIBRINOLISI**

Anche il sistema responsabile della lisi del coagulo consta di una serie di fattori (cascata proteolitica) che portano alla formazione dell'enzima attivo **plasmina**. Questa ha la funzione di **degradare la fibrina**, per impedire la produzione di una quantità eccessiva della stessa. La plasmina viene prodotta dal taglio proteolitico del **plasminogeno**, mediante un processo innescato dai cosiddetti attivatori del plasminogeno. Uno specifico **attivatore tissutale del plasminogeno (tPA)** è liberato dai tessuti nella zona di lesione vascolare. Altri due attivatori sono l'**urochinasi** e la **streptochinasi**. *Il primo è un enzima prodotto dai tessuti del tratto genitourinario, il secondo è prodotto dagli Streptococchi e vengono entrambi utilizzati in terapia per favorire la fibrinolisi.* A sua volta comunque anche la plasmina deve essere in qualche modo controllata, e questa avviene grazie alla presenza di due proteine plasmatiche, **l' $\alpha$ 2-antiplasmina** e **l' $\alpha$ 2-macroglobulina**. Infatti, *la plasmina, se presente in quantità eccessive, può dare proteolisi di altre proteine, causando danni ai tessuti.*

## **ANTICOAGULANTI NATURALI**

Impediscono al processo di emostasi di avvenire in modo incontrollato.

### **ANTITROMBINA III**

E' un inibitore della trombina e di altri fattori di coagulazione, e la sua capacità è aumentata significativamente in presenza di eparina. L'eparina è secreta dall'endotelio vasale, mentre l'antitrombina III, come i molti fattori di coagulazione, è sintetizzata nel fegato.

### **PROTEINE C e S**

La proteina C è prodotta dal fegato in forma inattiva ed è convertita nella sua forma attiva dalla trombina. Agisce inibendo i fattori VIIIa e Va. La proteina S accelera l'inattivazione di questi fattori da parte della proteina C.

### **INIBITORE DELLA VIA DEL FATTORE TISSUTALE**

E' una proteina che circola nel plasma complessata con lipoproteine e blocca la via estrinseca inibendo il fattore Xa. Anche la sua azione è aumentata dall'eparina secreta dall'endotelio.



# LABORATORIO DELL'EMOSTASI

## VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' PIASTRINICA

**N° Piastrine: 150.000 – 450.000 /  $\mu$ l**

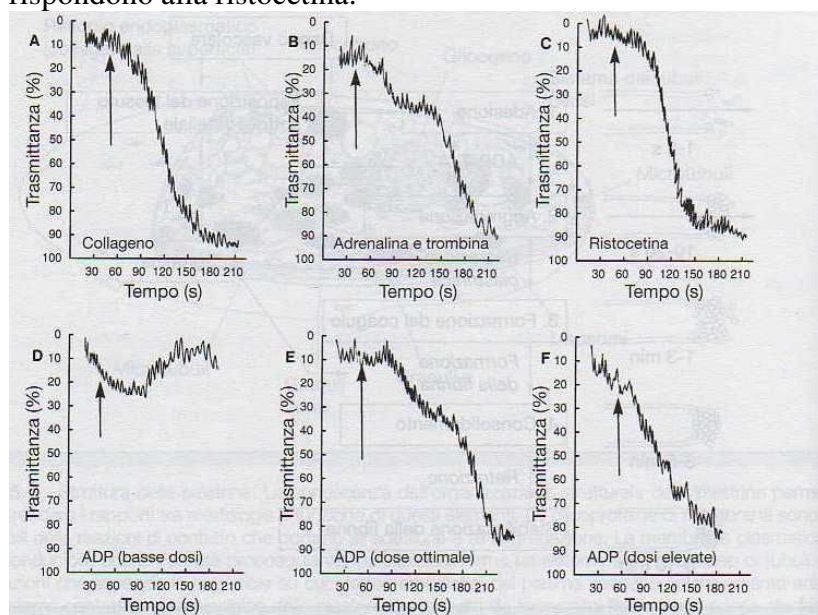
Un'alterata funzionalità piastrinica può derivare da un numero minore di piastrine (**trombocitopenia**) o da una loro alterata funzione (**trombocitopatia**).

L'analisi dello **striscio di sangue** è importante per determinarne il numero, ma anche per valutarne la morfologia, ma ha un grosso svantaggio: l'adesione delle piastrine al vetro o la loro non uniforme distribuzione sullo striscio possono modificarne la stima corretta → in genere si considera il numero normale quando è presente **una piastrina ogni 20 GR**, oppure se sono visibili **2-3 piastrine per campo microscopico**. Per il conteggio manuale una buona tecnica utilizzata è quella di osservare direttamente al microscopio in contrasto di fase un campione di sangue diluito 1:100 con ossalato di ammonio. Oggi però esistono **contatori elettronici**: si rende il sangue incoagulabile con acido etilendiaminotetracetico (**EDTA**) e le piastrine vengono calcolate insieme ai GR, differenziando le une dagli altri per le dimensioni. E' importante che il sangue prelevato dalla vena venga rapidamente mescolato con anticoagulante, e si deve **evitare di agitare** il campione, perché questo può causare aggregazione piastrinica.

### ➤ TEST di Aggregazione Piastrinica

L'aggregazione può essere valutata mettendo a contatto il plasma con una sostanza di cui è nota la capacità aggregante. Un buon metodo è quello di utilizzare **collagene**, **adrenalina** o **ADP esogeno**. Si misura quindi la variazione di torbidità (**trasmittanza**) attraverso l'**aggregometro** (una sorta di spettrofotometro modificato). E' importante che i pazienti che devono sottoporsi a questo test **non assumano farmaci** per l'intera settimana precedente, perché molto di questi possono interferire con il processo indotto da questi aggreganti. L'esame va effettuato a **meno di 3 ore** dal prelievo e i campioni non devono essere **mai refrigerati** (il freddo inibisce la funzione piastrinica). Si deve usare citrato di sodio come anticoagulante.

In genere stimolazioni con concentrazioni alte di ADP danno origine a una sola onda, quella con collagene e con ristocetina anche, quella con adrenalina dà normalmente una curva bifasica, come anche la trombina. E' importante sapere che pazienti con diverse patologie rispondono in modo diverso ai vari stimolatori di aggregazioni. Ad esempio quelli con **patologia di von Willebrand** non rispondono alla ristocetina.



### ➤ TEST di Adesività Piastrinica

E' un test impiegato raramente, e misura la capacità delle piastrine di aderire a microsferine di vetro.

### ➤ TEST dei Fattori piastrinici

Misurazione di fattore piastrinico 3, fattore piastrinico 4,  $\beta$ -tromboglobulina. La presenza di questi fattori nel plasma indica un'attivazione intravascolare delle piastrine (coagulazione intravascolare).

### ➤ TEMPO di Emorragia, Metodo di Ivy e Tecnica Template

Mantenendo la pressione a 40mmHg, tramite uno sfigmomanometro posto sopra il gomito, si effettua **l'incisione sulla superficie volare dell'avambraccio** (bisogna incidere la rete capillare e non le vene superficiali) e, **ogni 15-20 secondi**, il sangue che fuoriesce viene asciugato toccando con una carta da filtro solo la superficie della goccia. **La prova ha termine quando il sangue non fuoriesce più.**

La **tecnica di Ivy** prevede un **incisione di 3mm**. Il metodo Template è stato modificato fino alla sua standardizzazione nel metodo **Simplete II**, che consta di uno strumento sterile monouso in commercio con il quale si provoca nell'avambraccio una lesione lunga 5mm e profonda 1mm. **Con il metodo Ivy il tempo normale è 3-6 minuti. Con il Simplete II è di 6-9 minuti.**

## VALUTAZIONE DELLA COAGULAZIONE

### ➤ TEMPO di Lee-White

E' il **tempo di coagulazione del sangue intero**; è il test **più vecchio e meno accurato** e consiste nel misurare il tempo che il sangue impiega a coagulare in una provetta di vetro. Secondo questo metodo aliquote di 1ml di sangue appena prelevato vengono distribuite in **3 provette** che vengono poste a incubare a 37°C. Le provette sono delicatamente agitate ogni 30 secondi. Un coagulo stabile si forma **in 4-8 minuti**.

### ➤ TEMPO di coagulazione attivato (ACT)

E' stato osservato che l'aggiunta di **Celite** (particelle molto fini di argilla) accorcia notevolmente il tempo di coagulazione di sangue intero → il sangue coagula in **meno di 100 secondi**. Questo test inoltre permette una correlazione precisa tra dosaggio di **eparina** e risultato del test: nei soggetti che devono seguire una **terapia eparinica** si deve tendere a ottenere valori compresi **tra 300 e 600 secondi**. Questo test è quindi importante nel monitoraggio della terapia eparinica.

### ➤ TEMPO di Tromboplastina parziale (PTT)

Viene eseguito con sangue mescolato con citrato. Il plasma viene separato e posto in una provetta in cui vengono aggiunti calcio, fosfolipidi e caolino. Il tempo impiegato per la formazione del coagulo è detto Tempo di Tromboplastina Parziale, e varia normalmente **tra 28 e 40 secondi**, e **valuta l'efficacia (e quindi la presenza dei fattori) della via intrinseca.**

### ➤ TEMPO di Protrombina (PT)

E' il test per la coagulazione effettuato più frequentemente. I reagenti necessari sono **tromboplastina tissutale** (viene utilizzato generalmente estratto di cervello) e calcio, che vengono

aggiunti al plasma citrato → questi due elementi sono in grado di attivare, da soli, il fattore X attraverso la via estrinseca. Il valore normale del tempo di protrombina è compreso **tra 11 e 13 secondi**.

I valori di PT dipendono dal tipo di reagenti utilizzati e sono pertanto soggetti ad ampie variazioni tra laboratorio e laboratorio. Per questo motivo il PT è stato standardizzato secondo il metodo **INR** (*international normalized ratio*), che mette in relazione la preparazione tromboplastinica utilizzata dallo specifico laboratorio con un reattivo standard. In questo modo l'attività di ogni preparazione tromboplastinica può essere espressa con un valore, denominato ISI (*international sensitivity index*), che la quantifica in relazione con la preparazione standard il cui ISI è posto uguale a 1. Di conseguenza, il valore di PT corretto per questo valore darà un INR normalizzato tra i diversi laboratori, indipendentemente dall'attività della preparazione tromboplastinica utilizzata. La più comune applicazione del valore INR è nella standardizzazione degli effetti della terapia anticoagulante. La sua utilità è perciò limitata alla definizione della terapia anticoagulante. Esso non fornisce informazioni significative nel caso in cui il tempo di protrombina sia ridotto o allungato a causa di fattori diversi dalla terapia con anticoagulanti (quali epatopatie, malassorbimento, ipovitaminosi K). I valori di INR raccomandati in corso di terapia con dicumarolici in diversi stati patologici sono riportati nella tabella 5.5.

Il calcolo dell'INR viene effettuato con la seguente formula:

$$\text{INR} = \left[ \frac{\text{PT (paziente)}}{\text{PT (media dei controlli)}} \right]^{\text{ISI}}$$

**Tabella 5.5** Valori di INR raccomandati in alcune condizioni

Condizione	INR raccomandato
Trombosi venosa (prevenzione di situazioni ad alto rischio)	2-3
Trombosi venosa (trattamento)	2-3
Tromboembolia polmonare (trattamento)	2-3
Infarto miocardico acuto	
Prevenzione	2-3
Prevenzione di infarto ricorrente	2,5-3,5
Riduzione della mortalità	2,5-3,5
Arteriopatia periferica	2-3
Fibrillazione atriale	
Prevenzione di embolia arteriosa	2-3
Pazienti con protesi valvolari cardiache	
Impianto di valvole espantate	2-3
Impianto di protesi valvolari meccaniche (ad alto rischio)	2,5-3,5

## ➤ TEMPO di Trombina (TT)

Misura il tempo richiesto per la formazione del coagulo di fibrina in un campione di **plasma citrato** dopo l'aggiunta di una quantità definita di **trombina e calcio**. Il test valuta l'interazione tra trombina e fibrinogeno, in quanto il processo coagulativo **salta sia la via intrinseca che la via estrinseca**. Questo tempo, i cui valori normali sono compresi **tra 10 e 15 secondi**, aumenta in caso di deficit di fibrinogeno o nel caso ci siano nel plasma anticoagulanti attivati.

## ➤ DOSAGGIO del Fibrinogeno

**Le misure classiche** si basano sull'assunzione che l'aggiunta di trombina causi la trasformazione di tutto il fibrinogeno in fibrina → si misura la quantità di proteina presente nel coagulo e da questa si estrapola la quantità di fibrinogeno presente nel plasma. Con le **tecniche immunologiche** ci si basa sull'assunzione che il componente plasmatico che reagisce con gli anticorpi anti-fibrinogeno sia

realmente fibrinogeno. Il **test di precipitazione al calore** si basano sull'assunzione che tutto il materiale che va incontro a precipitazione con questa tecnica sia realmente fibrinogeno.

### ➤ **Fibrinopeptidi e monomero di fibrina**

Grazie all'attività della trombina, dal fibrinogeno si staccano due peptidi, i **fibrinopeptidi A e B**. La molecola residua è il monomero di fibrina. Il dosaggio dei fibrinopeptidi può risultare utile nel **monitoraggio di una coagulazione intravascolare**.

### ➤ **Identificare i singoli fattori**

E' possibile capire quale o quali fattori siano carenti **confrontando PT e PTT**.

<i>PT normale e PTT allungato</i> : alterazione fattori via intrinseca
<i>PT allungato e PTT normale</i> : alterazione fattore VII
<i>PT e PTT allungati</i> : gravi malattie epatiche, alterazioni dei fattori X,V o protrombina, fibrinogeno, alte concentrazioni di eparina.

Un metodo ottimo consiste nelle **prove di complementazione**, cioè nell'aggiungere al plasma del paziente i diversi fattori, per verificare quale fattore possa correggere le anomalie.

## **VALUTAZIONE DELLA STABILIZZAZIONE DELLA FIBRINA**

Un **test di screening** importante e semplice da effettuare è quello **del fattore XIII**: si induce la coagulazione aggiungendo calcio al plasma citrato del paziente. Si aggiunge quindi alla provetta 1ml di soluzione 5M di urea e si mette a incubare per 12 ore a 37°C. Un coagulo normale rimane solido dopo il trattamento, ma **in carenza di fattore XIII si ha una liquefazione totale del coagulo**.

## **VALUTAZIONE DELLA FIBRINOLISI**

### ➤ **TEMPO di Trombina (TT)**

Può essere utile anche da questo punto di vista.

### ➤ **PRODOTTI di degradazione del fibrinogeno (FDP)**

La plasmina scinde la fibrina in prodotti di degradazione, ma nel caso le **proporzioni tra plasmina, fibrina e fibrinogeno** siano **alterate**, la plasmina può demolire con altrettanta facilità il fibrinogeno, formando **prodotti di degradazione** dello stesso (che possono interferire con il corretto processo coagulativo → il siero normale non dovrebbe contenere né fibrinogeno né FDP). In caso di eccessiva attività plasminica, quindi, questi fattori saranno **presenti in circolo** in quantità significativa. I test per la determinazione degli FDP vengono praticati **sul siero**, perché, non essendo questi in grado di coagulare, saranno comunque presenti nel siero. La loro presenza è valutata **immunologicamente con anticorpi specifici**.

### ➤ **DOSAGGIO del D-dimero**

Quando viene idrolizzata la fibrina, vengono rilasciati peptidi con strutture antigeniche particolari, **caratteristiche della fibrina** ma non del fibrinogeno, perché presenti solo nella fibrina stabilizzata.

Il frammento più importante è chiamato **DD**, e può essere **ricosciuto da un anticorpo monoclonale**. Questo test valuta quindi **l'attività plasminica**.

### ➤ **TEMPO di lisi delle euglobine**

Le euglobine sono proteine che precipitano quando il plasma viene diluito e acidificato. Nella frazione euglobulinica precipitano **fibrinogeno, plasminogeno e attivatori del plasminogeno**. La **trombina è aggiunta alla soluzione** e converte il fibrinogeno in fibrina e attiva il plasminogeno. Il coagulo che si forma dovrebbe dissolversi in 2-6 ore, questo perché la plasmina che si forma dal plasminogeno non è contrastata dai fattori anticoagulanti presenti nel sangue. **Il test valuta quindi la fibrinolisi da parte della plasmina**.

### ➤ **Inibitore dell'attivatore del plasminogeno**

L'inibitore del plasminogeno è rilasciato dalle cellule endoteliali in risposta alla fibrina. Aumenti di livelli di questo inibitore sono stati osservati in pazienti affetti da trombosi o infarto miocardico.

### ➤ **Alfa2-antiplasmina**

È l'inibitore fisiologico della plasmina. **Un deficit di questo fattore comporta quindi eccessiva attività fibrinolitica**. Il dosaggio è funzionale (inibizione dell'attività idrolitica della plasmina su substrati cromogenici) o immunologico.

### ➤ **Plasminogeno**

Il dosaggio è funzionale (capacità degli attivatori del plasminogeno di innescare l'idrolisi plasmina dipendente su substrati cromogenici) o immunologico. **Un aumento di plasminogeno si osserva in donne in gravidanza e in soggetti obesi**.



# ALTERAZIONI DELL'EMOSTASI

## CAPITOLO 6

Innanzitutto è importante ***l'anamnesi del paziente***, che spesso ricorre allo specialista perché nota la comparsa di manifestazioni emorragiche anomale. È importante capire se la tendenza al sanguinamento è un problema recente o congenito, se le emorragie sono spontanee (emofilie, malattia di von Willebrand...) o provocate da traumi o interventi chirurgici (difetti di fattori IX o XIII...), la localizzazione delle lesioni (gli emofiliaci sanguinano a livello delle articolazioni...), l'anamnesi farmacologica (l'aspirina e gli antinfiammatori possono determinare alterazioni dell'emostasi). ***L'esame obiettivo*** può dare ulteriori informazioni: emorragie possono essere di diverso tipo → ematridi a livello delle articolazioni, ematomi sui muscoli, ematuria, petecchie o porpora sulla cute ecc. Naturalmente gli ***esami di laboratorio*** possono poi confermare le proprie diagnosi.

### ➤ **EMOFILIE**

L'emofilia è una grave malattia congenita caratterizzata dalla tendenza al sanguinamento. La patologia è **legata al cromosoma X** e quindi la frequenza è diversa in maschi e femmine → i malati sono quasi esclusivamente **maschi emizigoti**. La sindrome è causata da **carenza di fattore VIII e fattore IX**. L'**emofilia A** (fattore VIII) è anche detta emofilia classica. L'**emofilia B** (fattore IX) è anche detta malattia di Christmas. La gravità della patologia dipende dai livelli ematici del fattore in questione, che possono variare. La caratteristica classica sono gli **emartri**, sanguinamenti a livello delle articolazioni, fenomeni invalidanti fin dall'adolescenza. Compaiono anche **emorragie dei tessuti molli e intracraniche**, che possono essere mortali. Un emofiliaco non presenta però solo emorragie, ma anche **ritardo nella guarigione delle ferite**.

In laboratorio è importante determinare il fattore compromesso (vedi test di coagulazione); è anche importante determinare la presenza (non rara) di **anticorpi anti fattore VIII** nel siero. Per la terapia sono presenti in commercio preparazioni di fattore VIII e fattore IX ricombinanti (sintetizzati in laboratorio per evitare il rischio di infezioni da donatori malati ad esempio di epatite).

### ➤ **DEFICIT DI FIBRINOGENO**

Una condizione grave è l'**afibrinogenia**, una malattia dovuta ad assenza di fibrinogeno → chi è malato ha il sangue incoagulabile, ma paradossalmente in questi pazienti le emorragie spontanee non si sviluppano frequentemente. Condizioni più lievi sono le **disfibrinogemie**, in cui il fibrinogeno è strutturalmente alterato.

In assenza di fibrinogeno, effettuando i test PT, PTT e TT il sangue non coagulerà, e tutti i test di dosaggio del fibrinogeno daranno valore 0. Nelle disfibrinogemie i tempi saranno invece allungati. Un test chiave nella diagnosi delle disfibrinogemie è il **tempo di reptilasi**, in cui l'enzima reptilasi presente nel veleno di vipera causa la scissione del fibrinogeno nei fibrinopeptidi. Ciò permette la formazione del monomero di fibrina e il coagulo → se la molecola di fibrinogeno è alterata, sarà prolungato anche il tempo di reptilasi.

### ➤ **DEFICIT DEI FATTORI EPATICI K-DIPENDENTI (II, VII, IX, X)**

Durante epatopatie gravi la produzione di questi fattori sarà minore. PT e PTT saranno aumentati. Saranno inoltre diminuite le concentrazioni sieriche di antitrombina III, proteina C ed S. Nel caso il fegato sia seriamente compromesso la somministrazione della vitamina K non aiuterà molto.

## ➤ MALATTIA DI VON WILLEBRAND

E' dovuta a carenza del fattore omonimo, ed è una malattia emorragica trasmessa come carattere **autosomico dominante con penetranza variabile**. Poiché in questa malattia sono bassi anche i livelli del **fattore VIII**, si è guadagnata il nome di **pseudoemofilia**.

Il fattore di Von Willebrand e il fattore VIII sono proteina distinte che però nel plasma circolano come **complesso unico**. Naturalmente il deficit del fattore di von Willebrand determina una **scarsa adesione piastrinica**, e quindi compromette fortemente il successivo processo coagulativo. Il motivo per cui anche il fattore VIII è minore è attribuibile alla funzione di **"trasporto"** che il fattore di Von Willebrand ha sul fattore VIII. Esistono comunque **forme variabili della patologia**, che vanno a una carenza "lieve" alla totale assenza del fattore

In laboratorio si ha spesso **PTT allungato**, a causa del deficit del fattore VIII. Anche il **tempo di emorragia è allungato**. Caratteristica peculiare di questa patologia, da un punto di vista della diagnostica di laboratorio, è che nel test di aggregazione, **non c'è aggregazione in risposta alla ristocetina**. Anche il **test di adesività piastrinica è negativo** (le piastrine non aderiscono alle microsfere di vetro).

## ➤ ALTERAZIONE DELLE PIASTRINE

### TROMBOCITOPENIA

- ❖ La trombocitopenia può avvenire per **diminuzione della produzione di piastrine**, come nell'anemia aplastica e nelle emopatie clonali (leucemie, sindromi mielodisplastiche, emoglobinuria parossistica notturna). Le trombocitopenie da diminuita produzione non dipendono quindi da deficit isolato di megacariociti, ma da **patologie che riguardano tutto il midollo emopoietico** e che vanno ad alterare le staminali → alterazione morfologia e funzione cellulari delle varie linee differenziative, e alterazione quantitativa delle stesse.
- ❖ La trombocitopenia può avvenire per **aumento del sequestro delle piastrine**, cioè la vita delle piastrine è accorciata. In questo caso è elevato il numero di megacariociti nel midollo e, la milza, che normalmente contiene più di un terzo delle piastrine totali, ne contiene meno. Il numero di piastrine può diminuire in questo senso in quei casi che comportano elevato danno endoteliale (**febbre maculosa delle Montagne Rocciose, sepsi meningococcica, vasculiti...**).
- ❖ La trombocitopenia può avvenire per **distruzione accelerata di piastrine su base immunologica**, che può essere causata dalla presenza di **alloanticorpi** (*piastrinopatia neonatale alloimmune*, patologia simile alla malattia emolitica del neonato), di **autoanticorpi** (*porpora trombocitopenica idiopatica*, con presenza di IgG anti-piastrine) e **anticorpi contro farmaci** (*come chinina e chinidina*) che cross-reagiscono con le piastrine.
- ❖ La trombocitopenia può avvenire per **distruzione accelerata di piastrine su base NON immunologica**, come avviene nella **CID** (vedi dopo), nella **porpora trombotica trombocitopenica**, patologia ad alta mortalità che colpisce giovani adulti e che è associata a patologie del collagene, in cui si ha la formazione intravascolare di trombi, e nella **sindrome emolitico-uremica**, patologia dei bambini che interessa prevalentemente il rene, ma che dà alterazioni anche dei GR e delle piastrine, che vengono intrappolate nella microcircolazione renale.

## TROMBOCITOSI

Con questo termine si indica un **aumento del numero** normale di piastrine. E' una condizione molto frequente in **pazienti ospedalizzati** che presentano infiammazione acuta, o infezioni, tumori o sindromi mieloproliferative, o pazienti che subiscono **splenectomia** (ricorda che 1/3 delle piastrine è normalmente sequestrato dalla milza).

## ALTERAZIONI QUALITATIVE DELLE PIASTRINE

Le alterazioni qualitative sono frequentemente legate **all'uso di farmaci** quali acido acetilsalicilico e antinfiammatori, ma anche all'assunzione di alcol. **L'acido acetilsalicilico** va infatti a interferire con la secrezione piastrinica (prostaglandine, trombassano A2 ecc.), mentre **l'alcol** inibisce l'aggregazione indotta da ADP.

## ➤ COAGULAZIONE INTRAVASCOLARE DISSEMINATA (CID) (COAGULOPATIE ACQUISITE COMPLESSE)

La CID è una malattia molto grave caratterizzata sia da fenomeni emorragici, che, soprattutto, da **fenomeni trombotici**, dovuti a coagulazione intravascolare non controllata, e, come dice il nome stesso, disseminata.

Gli eventi scatenanti possono essere **infezioni** (ricorda l'attivazione del TNF- $\alpha$  da parte di gram-negativi → il TNF- $\alpha$  stimola la sintesi endoteliale del fattore tissutale della coagulazione), **interventi chirurgici**, **traumi**, **veleni di serpente** ecc.

**In laboratorio molto importante è il dosaggio dei fibrinopeptidi e del monomero di fibrina, che risulteranno notevolmente aumentati inoltre, l'alto consumo di fattori di coagulazione quali V, VIII e fibrinogeno determinerà un allungamento del PTT e del PT. Anche i prodotti di degradazione di fibrina e fibrinogeno saranno aumentati.**



# TROMBOFILIA E TROMBOSI

Un **trombo** è una massa insolubile che si viene a formare nei vasi o nelle cavità cardiache in seguito a un processo di coagulazione (piastrine e fibrina).

## Differenze tra trombo e coagulo

### Trombi

- ❑ Deposizioni di ammassi di piastrine con modesta quantità di fibrina sulla superficie vasale sulla quale scorre il sangue,
- ❑ friabili, variegati, aderenti almeno in parte alla superficie vasale,
- ❑ spesso con irregolarità della superficie che appare rugosa (strie di Zahn).
- ❑ specificazione organizzativa strutturale (gli elementi cellulari del sangue sono presenti in proporzione variabile perché il loro accumulo è in parte selettivo, dipendendo dalle modalità di formazione e di accrescimento del trombo stesso).

### Coaguli

- ❑ Rete di fibrina contenente vari elementi del sangue nella loro normale concentrazione,
- ❑ umido, lucido, liscio, di colorito rossastro
- ❑ ben staccabile dalla parete vasale perché non vi aderisce.
- ❑ mancante di una struttura organizzata

Roma, aprile '07

## Evoluzione del trombo

- **Dissoluzione** (per intervento del sistema fibrinolitico e dei monociti-macrofagi)
- **Organizzazione fibrotica** (sostituzione della massa trombotica con t. connettivale, inizialmente ricco di cellule schiumose contenenti lipidi, fibroblasti, fibre collagene ed elastiche, cellule muscolari lisce; neoformazione di vasi, calcificazione od ossificazione)

Roma, aprile '07

## Classificazione dei trombi

- **Distretto di formazione**
  - ◆ Trombi venosi (rossi)
  - ◆ Trombi arteriosi (bianchi)
- **Composizione**
  - ◆ Trombi semplici (una sola componente, piastrinica o fibrinica)
  - ◆ Trombi complessi (piastrine, eritrociti e fibrina)
- **Luogo di formazione**
  - ◆ Trombi autoctoni (si formano in corrispondenza di una lesione vascolare)
  - ◆ Trombi secondari o embolici (si formano attorno ad un embolo originato in un'altra sede)

- ❑ Trombi murali o parietali
- ❑ Trombi occludenti

Roma, aprile '07

## Caratteristiche delle trombosi arteriose e venose

### T. arteriose

- Il trombo si sviluppa su una parete vascolare gravemente lesa
- Il trombo è costituito principalmente da piastrine con un fine reticolo di fibrina
- Il trombo può formarsi anche in presenza di una normale velocità di flusso

### T. venose

- Il trombo si forma su una parete vascolare apparentemente integra
- Il trombo è costituito principalmente da fibrina e da eritrociti
- Il trombo si forma spesso in conseguenza di un rallentamento del flusso ematico

Roma, aprile '07

Il termine **trombofilia** indica la **tendenza a sviluppare trombosi**. La trombosi è la prima causa di morte negli U.S.A..

### DEFINIZIONE DI TROMBOSI

**Formazione intravitale di masse solide nelle cavità cardiache e nel lume dei vasi arteriosi o venosi a partire dai costituenti normali del sangue (Welch, 1899).**

### PATOGENESI DELLA TROMBOSI

*Nel 1856 Virchow ipotizzò i fattori patogenetici essenziali della trombogenesi in tre punti (triade di Virchow):*

- **Modificazioni della parete vascolare**
- **Modificazioni locali del flusso ematico**
- **Modificazioni della composizione del sangue**

In realtà però queste 3 condizioni sono tutte necessarie per la patogenesi della trombosi: il **danno vascolare** favorisce naturalmente l'aggregazione piastrinica per esposizione del collagene

sottoendoteliale; nelle trombosi arteriose la presenza del danno endoteliale è facilmente documentabile, in corrispondenza di lesioni di tipo aterosclerotico. Nelle trombosi venose il danno endoteliale gioca invece un ruolo meno importante (modificazioni submicroscopiche provocate dalla stasi venosa o da processi flogistici a carico della parete vascolare).

Il **flusso ematico** laminare costituisce un importante fattore antitrombogico → infatti esso permette la circolazione delle piastrine nella zona periferica della colonna centrale di sangue e, quindi, lontano dalle cellule endoteliali; modificazioni del flusso ematico possono esserci in caso di stasi o di turbolenza. **La turbolenza**, a livello dei punti di diramazione delle arterie, aumenta lo stress di taglio sull'endotelio, e quindi alla lunga può favorire il danno endoteliale e la conseguente attivazione del sistema piastrinico. **La stasi** ha un ruolo importante invece nella trombosi venosa; in questo caso aumenta soprattutto il contatto delle piastrine con l'endotelio.

Le principali **modificazioni del sangue** interessano soprattutto gli eritrociti e le proteine plasmatiche, i cui aumenti o modificazioni possono causare aumento della viscosità ematica, maggior contatto con le piastrine, ostacolo alla diluizione e all'allontanamento di fattori di coagulazione attivati. Questo può anche avvenire in seguito a leucemie o a causa di patologie mieloproliferative della serie megacariocitica.

***Quello che però Virchow non poteva considerare è probabilmente il fenomeno eziologico più significativo della trombosi, e cioè la modificazione di uno più fattori nella via coagulativa e in quella trombolitica.***

***Tra i fattori coagulativi sono sicuramente importanti aumenti di fibrinogeno, fattori VII e VIII e di Von Willebrand. Ma in assoluto il fenomeno principale alla base della trombosi è rappresentato da deficienze combinate dei fattori che regolano la via fibrinolitica.***

*Particolarmente importanti...*

### **DEFICIT DI ANTITROMBINA III**

E' importante il dosaggio immunologico o prove funzionali su substrati cromogenici. Pazienti con deficit di antitrombina III manifestano episodi tromboembolici spontanei.

### **DEFICIT DI PROTEINE C e S**

La condizione omozigote è incompatibile con la vita, quello eterozigote comporta trombosi venose ricorrenti.

### **RESISTENZA ALLA PROTEINA C ATTIVATA**

E' una patologia scoperta recentemente in cui il fattore V ha un aminoacido modificato sul sito di proteolisi da parte della proteina C attivata. La condizione omozigote è incompatibile con la vita, quello eterozigote comporta episodi tromboembolici spontanei.

**Gli esami da prendere in considerazione** sono quelli che valutano carenze nei sistemi anticoagulanti naturali e condizioni che favoriscono l'insorgenza spontanea di trombosi. Lo studio di questi casi deve essere effettuato tramite valutazione della via estrinseca (PT), di quella intrinseca (PTT) e via comune (TT), ma in generale di tutti i test precedentemente elencati.

### **ANTICOAGULANTE TIPO LUPUS (LAC)**

E' un'immunoglobulina circolante in grado di prolungare PT, PTT o entrambe. L'Ig in vitro inibisce l'interazione tra i fosfolipidi e i fattori di coagulazione, ma in vivo è associata a trombofilia, e non a sanguinamento.

Un test utile per diagnosticare la presenza di LAC è il **tempo di coagulazione don veleno della vipera di Russel diluito**. Il veleno di questo serpente attiva direttamente il fattore X, che, a sua volta, richiede calcio e fosfolipidi per attivare la protrombina. Il LAC naturalmente aumenterà





***LA TROMBOSI E' QUINDI UNA CONDIZIONE MULTIFATTORIALE, IN CUI INTERVENGONO FATTORI CHE VANNO A INFLUENZARE LA COSIDDETTA TRIADE DI VIRCHOW, E FATTORI GENETICI E METABOLICI IMPLICATI NELLE VIE COAGULATIVA E FIBRINOLITICA.***

***Fattori di rischio per la trombosi***

Trombosi arteriosa	Trombosi venosa	T. arteriosa e venosa
Arteriosclerosi	Obesità	Età
Sesso maschile	Ass. estrogenici	Obesità
Fumo	Vene varicose	Gruppo A
Iperensione	Infezioni	Ass. estrogenici
Diabete	Traumi	Ipermocistinemia
Ipercolesterolemia	Chirurgia	
Ass. estrogenici	Gravidanza	
Iperfibrinogenemia	Neoplasie	
Poliglobulia	Immobilità	
Lp(a)	Carenze di inibitori	

## Anemie da alterazioni della produzione eritrocitaria

### Anemie Carenziali

- **Anemie microcitarie ed ipocromiche**

La carenza di minerali e nutrienti essenziali per l'eritropoiesi provoca **anemia**

In queste condizioni, la sintesi dell'eme non può completarsi, si ha scarsa produzione di emoglobina, così il ciclo cellulare continua producendo cellule più piccole, **microciti**, e nel contempo la minore quantità di Hb ne determina **ipocromia**.

Le principali anemie carenziali ipocromiche e microcitarie sono ->

- **a. da carenza di ferro**
- **a. da malattie croniche**
- **a. sideroblastiche**

#### Anemia da Carenza di Ferro

##### Definizione

La carenza di Fe è una fra le cause più comuni di anemia, determina carente sintesi dell'eme e quindi della **Hb**. Si instaura quando l'organismo non riesce a modificare l'entità delle **entrate** con l'entità delle **perdite**. Apporto giornaliero di Fe -> **10-15 mg** <- in condizioni normali solo il **10%** del Fe viene assorbito -> **1mg** <- In condizioni di **deplezione** il nostro organismo può assorbire >> **25%** del Fe assunto.

L'anemia si instaura solo con l'**esaurimento** dei depositi di Fe -> i liv. sierici di Fe **diminuiscono**  
-> si riduce la sintesi di **Hb**  
-> GR **ipocromici e microciti**  
-> **MCH e MCHC** diminuiscono

##### Cause dell'anemia da carenza di Fe

-> **Deficienze nutrizionali** -> Si verificano principalmente nelle fasi della vita in cui vi è **aumentata** richiesta di Fe -> nei **primi anni di vita** quando l'espansione della popolazione eritrocitaria richiede l'apporto di **1 mg/kg** di Fe, mentre la riserva iniziale di Fe alla nascita è di soli **350-500 mg** -> negli **anziani**, in caso di dieta inadeguata

Nei paesi **occidentali** non si verificano quasi mai se non in situazioni di aumentata richiesta.

Frequenti nei paesi in **via di sviluppo**.

-> **Perdite di sangue** -> nel caso di **sanguinamento cronico** che può aversi ad ogni età anche se è più frequente nell'anziano e sono soprattutto di origine **gastrointestinale** come nel caso di *ulcere peptiche, gastrite, ernia iatale, neoplasie* o di origine dal **tratto urinario** come nel caso di *calcoli, tumori, mal. infiammatorie* dei reni, uretere e vescica.

> nel caso di **perdite mestruali abbondanti** nelle giovani donne in età fertile, che spesso adottano diete inadatte e hanno cicli mestruali irregolari e abbondanti

-> **Aumentata richiesta** -> nell'**adolescenza**  
-> nella **gravidanza**  
-> durante l'**allattamento**

##### Parametri di Laboratorio

Le caratteristiche distintive sono **sideremia** molto **bassa** e **TIBC** molto **alta**, la % di saturazione della transferrina è **< 5%** e la **ferritinemia** è **<10 ng/ml**. La **FEP** è molto **aumentata** per la minore sintesi dell'eme.

## Anemia da Malattie Croniche

### Definizione

Malattie **infiammatorie croniche**, **tumori**, **infezioni croniche** sono associate ad anemia, è il difetto di base consiste in -> **inefficiente** utilizzazione del Fe per l'eritropoiesi, ovvero sembra che il Fe non possa venire mobilizzato dai depositi nelle cellule del SRE

-> **I GR** contengono scarse quantità di Fe

-> **I tessuti di deposito** ne contengono abbondanti quantità

### Parametri di laboratorio

La **sideremia** è **bassa** e la **TIBC** è analogamente **bassa**, la % di saturazione della transferrina è compresa tra il **7%** e il **15%** mentre la **ferritinemia** è oltre i **50 ng/ml** e può raggiungere i valori di **2000 ng/ml**

## Anemie Sideroblastiche

### Definizione

Sono caratterizzate da **anomalie del metabolismo dell'eme**. Nel midollo sono presenti eritroblasti con granuli di Fe intorno al nucleo -> **sideroblasti ad anello** ed è presente una condizione di -> **quadro dimorfico del sangue periferico**, ovvero sono presenti **2 popolazioni di GR** una **normale** e una composta da cellule **ipocromiche**. Il **RDW** è **aumentato**. Il midollo appare **ipercellulare** ma non è rilevabile un aumento dei reticolociti -> **eritropoiesi inefficace**.

L'organismo possiede quantità adeguate di Fe ma **non** è in grado di **legarlo alla Hb**. Il Fe entra nelle cellule in via di maturazione e si accumula nei mitocondri perinucleari.

Si distinguono forme -> **congenite**

-> **acquisite**, a loro volta suddivise in *secondarie* e nelle forme *primitive o idiopatiche*

### Parametri di laboratorio

Gli indici variano a seconda che sia prevalente la popolazione normocromica o ipocromica. L'**MCV** può essere **aumentato**, **ridotto** o **normale**, l'**MCH** e l'**MCHC** sono spesso **diminuiti**, i valori della **sideremia** sono più **elevati** insieme alla % di saturazione della transferrina. Anche la **ferritinemia** è piuttosto **elevata**.

## Avvelenamento da piombo (saturnismo)

Negli adulti è dovuta a ambienti lavorativi, nei bambini spesso all'ingestione di prodotti non commestibili (vernici...). Il piombo inibisce molti enzimi nella sintesi dell'eme.

**2** sono i valori di laboratorio importanti per diagnosticare l'avvelenamento da piombo: il primo è l'aumento di acido  $\delta$

amino levulinico (ALA) dovuto a blocco dell'enzima  $\delta$

amino levulinico deidratasi e l'aumento di protoporfirina eritrocitaria dovuta al blocco dell'eme sintasi.

Tabella 3.3 Diagnosi differenziale delle anemie microcitiche ipocromiche

	Sideremia	TIBC	Ferritine-mia	FEP	HbA <sub>2</sub>	HbF	RDW
Carenza di ferro	Ridotta	Elevata	Ridotta	Elevata	Normale	Normale-ridotta	Elevata
$\alpha$ -talassemia	Elevata	Normale	Elevata	Normale	Normale	Ridotta	Elevata
$\beta$ -talassemia	Elevata	Normale	Elevata	Normale	Elevata	Elevata (variabile)	Elevata
Anemia da malattie croniche	Ridotta	Ridotta	Elevata	Elevata	Normale	Normale	Normale
Anemia sideroblastica	Elevata	Normale	Elevata	Ridotta	Normale	Normale	Elevata

TIBC, capacità totale di legare il ferro; FEP, protoporfirina eritrocitaria libera; HbA<sub>2</sub>, emoglobina A<sub>2</sub>; HbF, emoglobina F; RDW, ampiezza di distribuzione eritrocitaria.

- *Anemie macrocitarie o megaloblastiche*

Con **macrocitosi** si intende una condizione in cui il **MCV** è **> 100 fl** ed è facilmente rilevabile al conta cellule automatico che fornisce valori di MCV accurati e riproducibili, tuttavia il riscontro di un **MCV elevato non rappresenta** necessariamente una condizione di **anemia megaloblastica**. Il MCV deve essere sempre confermato dall'esame **microscopico** dello striscio di sangue periferico; a riguardo i primi segni rilevabili sono -> **ipersegmentazione** dei **polimorfonucleati** e rilevamento di **macroцитi ovali**

Le principali anemie macrocitarie o megaloblastiche sono ->

- *Anemia da carenza di Vitamina B12*
  - *Anemia da carenza di Acido Folico*
- Anemia da Carenza di Vitamina B12**

*Il deficit di B12 è frequentemente dovuto a malassorbimento -> Anemia Perniciosa*

L'anemia perniciosa è una malattia cronica con una predisposizione familiare dovuta al deficit del **fattore intrinseco (IF)** essenziale per l'assorbimento **ileale** della B12 e prodotto dalle cellule della **mucosa gastrica**, e la sua diminuita produzione è legata alla **atrofia della mucosa gastrica** o alla **gastrectomia** totale o parziale, **resezione dell'ileo** che danneggia i siti di assorbimento o a patologie intestinali come la **malattia celiaca** o l'**enterite regionale**.

E' caratterizzata da **megaloblastosi** delle cellule ematiche per carenza di B12, **aumentata** incidenza di fenomeni **autoimmunitari** e manifestazioni **neurologiche**. La mucosa gastrica atrofica non produce né il **IF** né **acido cloridrico** per cui le secrezioni gastriche hanno PH elevato.



L'approccio iniziale per la diagnosi differenziale tra la carenza di B12 e di acido folico consiste nel dosare i livelli **sierici** di **B12** e di **acido folico** e una volta accertata l'anemia il test di laboratorio **specifico** per porre diagnosi è il **test di Schilling**

*Il Deficit di B12 può anche essere dovuto a -> carenze dietetiche (vegetarianesimo stretto)*

*-> alterazioni metaboliche*

*-> crescita eccessiva di batteri intestinali che necessitano di B12 per il proprio metabolismo*

**Anemia da Carenza di Acido Folico**



La carenza di acido folico si instaura come risultato di **deficit dietetico** o **antagonismo da farmaci**  
Il deficit dietetico è particolarmente importante in tutte le situazioni in cui aumentano le richieste.  
Tra le cause di carenza di acido folico

-> **l'alcool** è la più comune causa, impedisce l'**assorbimento** dell'acido folico e **interferisce** con le reazioni **folato-dipendenti**. Gli etilisti cronici presentano multiple deficienze enzimatiche, funzionalità epatica ridotta e depositi di acido folico **ridotti** o **assenti**.

-> **gli antagonisti dell'acido folico** sono sostanze somministrate per la loro capacità di interferire con le tappe **folato-dipendenti**. del processo di moltiplicazione cellulare (antitumorali)

-> **i contraccettivi orali e gli anticonvulsivanti** sembrano ridurre l'assorbimento dell'acido folico

## Anemie ipoproliferative e sindromi da insufficienza midollare

Sono anemie che conseguono ad una **riduzione** quantitativa del tessuto midollare funzionante o ad una **riduzione** del **numero** assoluto di **cellule staminali** o alla presenza di **cellule staminali anormali**

Si parla quindi di **pancitopenia** se la diminuzione interessa tutte le cellule del sangue periferico

-> **leucociti** -> **piastrine** -> **eritrociti**

### Anemia aplastica

#### Definizione

E' una condizione patologica caratterizzata da **pancitopenia periferica** associata a diminuzione o deplezione delle **cellule staminali emopoietiche** midollari. E' una malattia grave ma **rara**.

#### Cause

La malattia è stata messa in rapporto con...

-> **l'esposizione ad alcuni farmaci** e numerose altre sostanze

-> **infezioni virali** precedenti, come **epatite B, CMV, Epstein-Barr, parvovirus B19**

-> **l'esposizione** ad agenti nocivi di altra natura, come **solventi, benzene, radiazioni** ecc..

E' noto che questi agenti citotossici generano una **ipoplasia midollare** dose-dipendente

-> **altre condizioni morbose** come il **LES**, fonte del danno alle cellule midollari sono gli auto **anticorpi** prodotti contro le cellule staminali o gli effetti dei **linfociti T** contro le staminali.

-> una **predisposizione ereditaria** verso l'aplasia midollare dimostrata da alcuni pazienti

-> la presenza di **neoplasie ematologiche** che possono determinare il manifestarsi della anemia

#### Reperti di laboratorio

I pazienti affetti presentano **pancitopenia** con **reticolocitopenia**. L'esame del midollo mostrerà una **ipopocellularità** di tutte le linee differenziative con prevalenza delle cellule midollari di supporto tra cui

*plasmacellule – linfociti – cellule reticolari di supporto.*

E' classificata come **aplasia grave** se -> **numero neutrofili < 500/microlitro**

**numero piastrine < 20000/microlitro**

**numero reticolociti <10000/microlitro**

### Sostituzione midollare

Consiste nella **pancitopenia** che si viene ad instaurare in seguito a **sostituzione** delle cellule del midollo con cellule di **altra natura** che possono essere

-> **cellule non ematopoietiche** come nel caso di *metastasi tumorali*

-> **cellule di origine ematopoietica** con caratteristiche proliferative anormali

La diagnosi è basata sulla dimostrazione della presenza di cellule tumorali nel midollo osseo o il reperto casuale di **forme bizzarre**.

### Anemia ipoproliferativa associata ad altre malattie

Malattie come il **inf. croniche, artrite reumatoide, LES, insufficienza renale cronica** sono condizioni che deprimono la funzione midollare con un meccanismo ancora sconosciuto.

#### Reperti di Laboratorio

Anemia **normocromica** e **normocitica** di grado moderato con sopravvivenza eritrocitaria normale, mentre i livelli sierici di **Fe** e **Transferrina** sono **diminuiti** e invece i **depositi di Fe** midollare sono **normali** o **aumentati**.



### ***Aplasia eritroide pura***

E' una forma morbosa caratterizzata da **ipoplasia** dei soli precursori eritrocitari che causa una grave anemia con **reticolocitopenia**.

L'**aspirato midollare** rivela assenza di precursori eritroidi, le altre componenti del midollo sono normali, mentre i **parametri eritrocitari** indicano eritrociti **normocromici** e **normocitici**, anche se talvolta è presente **macrocitosi**.

**Si classifica in una** -> **forma transitoria** associata spesso ad altre anemie, in genere emolitiche  
-> **forma acuta**, detta **crisi aplastica** caratterizzata da una rapida caduta dei livelli di **Hb** e del **Ht** e necessita di trasfusioni di sangue

Una aplasia eritroide è stata evidenziata anche in seguito alla **assunzione** di alcuni **farmaci** e può comparire in caso di deficit vitaminici.

## ***Anemia Refrattaria ed Eritropoiesi inefficace***

### ***Anemie refrattarie***

Sono caratterizzate un'**alterata produzione eritrocitaria** e sono **insensibili a qualsiasi trattamento** e sono considerate *pre-leucemiche*, ma la maggior parte non evolve in leucemia.

Queste condizioni morbose sono meglio definite come **sindromi mielodisplastiche** e comprendono diverse forme cliniche -> **anemia refrattaria idiopatica**

-> **anemia refrattaria con sideroblasti ad anello**

-> **anemia refrattaria con eccesso di blasti**

-> **anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione**

Reperto costante è una condizione di **eritropoiesi inefficace**, midollo **ipercellulare** e grande quantità di precursori eritroidi **anormali** con aspetto **megaloblastico**.

### ***Emoglobinuria parossistica notturna***

E' un raro disordine acquisito caratterizzato dalla proliferazione nel midollo di un clone **emopoietico anormale** che produce eritrociti con la capacità di **fissare il complemento** e più sensibili alla emolisi intravascolare **complemento mediata**.

Il sangue periferico contiene **tre** popolazioni distinte con diverso grado di sensibilità alla emolisi

-> **20-25** volte più sensibili -> **3-5** volte più sensibili -> cellule **normali**

La **gravità della malattia** dipende dalle proporzioni relative di queste popolazioni cellulari. La membrana del **GR** nella EPN presenta **alterazioni morfologiche** e **alterazioni biochimiche**

-> **ridotta** attività acetilcolinesterasica

-> **ridotte** glicoproteine di membrana

#### ***Reperti di laboratorio***

I GR del paziente vanno incontro ad **emolisi eccessiva** in soluzioni a **bassa forza ionica** (test allo zucchero) e in soluzioni **acidificate** con aggiunto il **complemento** (test emolisi acida di HAM)

Un reperto frequente è l'**aplasia midollare** causa di **leucopenia** e **trombocitopenia** oltre che della diminuita produzione di eritrociti.

La emolisi può essere **aggravata** durante il sonno da alcuni **farmaci** ed **alimenti**.

## **Anemie da eccessiva perdita di Globuli Rossi**

Una caduta dei livelli di **Hb** e dell'**Ht** può essere dovuta ad una **acuta perdita di sangue** o ad una massiva **distruzione dei GR**. La **reticolocitosi** è sempre presente.

### **Anemie dovute ad emorragia**

#### **Risposta emopoietica alla emorragia acuta**

Una perdita acuta di sangue stimola il midollo emopoietico. Il numero di **piastrine** e di **leucociti** sale ancor prima della **caduta dell'Ht** e si instaurano trombocitosi e leucocitosi.

Poiché non esiste un compartimento di riserva degli eritrociti nel midollo, il rimpiazzo di quelli persi richiede **giorni** o **settimane**, i livelli di eritropoietina aumentano già nelle prime 6 ore ed entro 24 ore compaiono in circolo i reticolociti (**reticolocitosi**) che raggiunge il picco dopo 6-10 giorni.

Se le **riserve di Fe** sono normali, l'**attività del midollo** aumenta di **2-3** volte, in caso contrario, l'**attività emopoietica** non può rispondere adeguatamente alla brusca **diminuzione dell'Ht**

Se il sangue si riversa nelle cavità corporee (**emorragia interna**) le cellule e l'Hb devono essere degradate, per cui si avrà >> un **aumento** dei livelli ematici di **urea** e **bilirubina**. Una **emorragia cronica** porta comunemente alla comparsa di anemia per carenza di Fe, perché col sangue vengono persi anche **GR** ed **emoglobina**.



## Anemie emolitiche

Con **anemia emolitica** si intendono quei disordini caratterizzati da una **riduzione** del tempo di sopravvivenza in circolo degli eritrociti. Il **grado** e la **severità** della anemia dipendono dalla velocità con cui i GR vengono distrutti e rimossi dal circolo e dalla **capacità del midollo** di compensare a questa perdita.

### Anemie emolitiche da difetti intrinseci ereditari

#### Alterazioni della membrana eritrocitaria

La membrana eritrocitaria è un doppio strato lipidico (**fosfolipidi** e **colesterolo**) disposti in stretta connessione con le proteine di membrana che formano lo **scheletro di membrana** da cui dipende la capacità del **GR** di resistere alle forze meccaniche che tendono a deformarlo nel passaggio attraverso i capillari e per resistere allo stress osmotico.

Alcune proteine dello scheletro sono **integrali**, altre sono **periferiche** (associate alla faccia citosolica della membrana) e altre si trovano sul lato **esterno**. Le proteine dello scheletro sono la **spettina** e l'**actina** insieme a molte altre proteine. Lo scheletro è **ancorato** alla membrana dalla proteina **anchirina**.

#### Sferocitosi ereditaria

È una **malattia emolitica** comune, trasmessa come carattere **autosomico dominante**. In alcuni casi di **SE** sono stati identificati i difetti molecolari responsabili, ma nella maggior parte dei casi non sono ancora stati identificati. La **sintomatologia** è lieve e spesso la malattia non viene diagnosticata fino alla maturità.

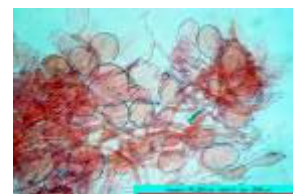
#### Alterazioni cellulari responsabili

Il difetto alla base della **SE** è la **perdita di frammenti della membrana** del GR, con produzione di uno **sferocita** con **< superficie / volume** più sensibile alla **lisi osmotica** e **meno deformabili**. La perdita dei frammenti di membrana si ha nei **sinusoidi epatici** e il difetto primitivo risiede in una **alterazione** di una proteina di membrana che determina una **ridotta deformabilità** (probabilmente il meccanismo consiste in una **interazione Ca-Spectrina**). Continui passaggi nei **sinusoidi epatici** portano alla formazione di **microsferociti** che vengono intrappolati nel **tessuto splenico** e successivamente **eliminati**.

#### Reperti di laboratorio

Nello **striscio di sangue periferico** si osservano cellule sferiche intensamente colorate e **prive dell'area pallida centrale (sferociti)**. Si osserva anche una **policromatofilia** che indica che la [reticolociti] è proporzionale alla anemia. La **MCHC** è diminuita (lo sferocita ha uguale concentrazione di Hb e minor V)

Si ha anche **aumento** della **bilirubina indiretta** della **lattico deidrogenasi** e **riduzione** della **aptoglobina**. La diagnosi differenziale è data dal **test di fragilità osmotica** in soluzioni mano mano più diluite. L'**autoemolisi** è spesso molto aumentata.



#### Ellissocitosi ereditaria

È una malattia associata ad un **difetto di struttura** dello scheletro di membrana, che porta le cellule della serie **rossa** ad assumere una forma **ellittica**. È ereditata con modalità **autosomica dominante**.

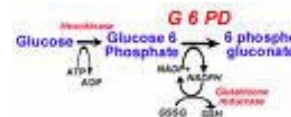
#### Piropoichilocitosi ereditaria

Si osservano **eritrociti** di aspetto variabile (**poichilociti**) che assumono forma di **lacrima, sferica**, o di **cellule frammentate**. Esistono diverse varianti della malattia classificate in base al **tipo** di emolisi e alle **alterazioni morfologiche** presenti nello striscio periferico. Sono spesso clinicamente **silenti**.

## Difetti ereditari degli enzimi eritrocitari

Le **enzimopatie** possono essere associate ad **alterazioni** del metabolismo cellulare con conseguente **diminuzione** della vita media della cellula. Il **grado di emolisi** dipende dalla natura del difetto enzimatico e dalla sua importanza nell'ambito del **metabolismo dell'eritrocita**.

### Deficit di Glucosio-6-fosfato deidrogenasi G6PD



La **G6PD** è responsabile della prima tappa della via dei **pentosi-fosfati** e catalizza l'ossidazione di **G6P** a **6-fosfogluconato** e come cofattore richiede **NADP** che viene ridotto a **NADPH** che rappresenta una importante **sorgente** di equivalenti **riducenti** che permette agli eritrociti di **resistere** agli stress ossidativi e **neutralizzare i fattori ossidanti** mantenendo il **glutathione** allo stato ridotto, molecola efficiente nel proteggere l'**Hb** contro gli stress ossidativi.

Il gene della **G6PD** è sito sul cromosoma **X** la mutazione è **espressa pienamente** dai maschi mentre la femmina **eterozigote** è generalmente normale, anche se può esprimere il difetto in modo parziale a causa della **inattivazione casuale** della X.

L'enzima normale è definito **variante B**, che differisce per un aminoacido dalla **variante A**. Con **variante A** si intende la variante A munita di minore attività enzimatica. I soggetti **portatori** della variante A sono più resistenti alla malaria e non hanno sintomi finché non vengono sottoposti ad uno **stress ossidativo** da farmaci.

#### Quadro clinico e Reperti di laboratorio

Il deficit di **G6PD** porta ad -> **ittero neonatale**

-> **anemia emolitica congenita**

-> **anemia emolitica indotta da farmaci**

-> **favismo**

Poiché l'attività di **G6PD diminuisce** con l'invecchiamento dell'eritrocita, i GR più vecchi sono più **sensibili** allo stress ossidativo che induce emolisi e **riduzione** dell'**Ht** e **emoglobinemia** ed **emoglobinuria**. La crisi emolitica si risolve spontaneamente in quanto le cellule più giovani non vengono distrutte (hanno maggiore attività enzimatica).

Una altra forma di **G6PD** è detta **variante mediterranea**, che ha att. enzimatica molto ridotta tanto che anche le cellule molto giovani hanno scarsa capacità di produrre **NADPH**. Gli episodi emolitici **sono più gravi** e sono scatenati da una grande varietà di stimoli.

Altri soggetti portatori di varianti più gravi presentano una **anemia emolitica cronica** conseguenza di una continua **emolisi intravascolare**.

### Deficit di Piruvato Chinasi PK

Rappresenta il **95%** delle enzimopatie non riconducibili a **G6PD**. Catalizza la **tappa finale** del ciclo glicolitico che rappresenta la **fonte principale** di energia dei GR (produce **2** molecole di **ATP** per ogni molecola di glucosio). La **carenza** dell'enzima produce un importante **deficit energetico** che si evidenzia con l'invecchiamento dell'eritrocita. Se non viene prodotto **ATP sufficiente**, il controllo dei flussi ionici attr. la membrana viene meno permettendo l'ingresso di **sodio** e **calcio** con il **danneggiamento** della organizzazione della membrana.

#### Quadro clinico e Reperti di laboratorio

Il deficit di **PK** e di altri enzimi glicolitici può determinare **anemia emolitica** con **aumento** della **autoemolisi** ed **aumento** dei livelli di **bilirubina indiretta**. I sintomi clinici più caratteristici sono

-> **anemia**

-> **ittero**

-> **splenomegalia**

## Alterazione della sintesi globinica (Emoglobinopatie)

### Cambiamenti fisiologici legati allo sviluppo

Negli stadi precoci della vita embrionale viene prodotta **Hb embrionale** dalle cellule del sacco vitellino. Alla **6° settimana** le cellule fetali iniziano a produrre **Hb fetale** ( $\alpha_2\gamma_2$ ) che trasporta O<sub>2</sub> nella vita prenatale. Dal **6° mese** di vita si ha la produzione di **catene  $\beta$**  e la progressiva sostituzione della **Hb F** con **Hb A**. A **1 anno** di età si iniziano a produrre le **catene  $\delta$**  e quindi la **Hb A<sub>2</sub>** che nelle cellule dell'adulto è presente alla concentrazione del **1-2 %**.

### Varianti emoglobiniche

**Sostituzioni aminoacidiche** nelle catene globiniche determinano la comparsa di varianti emoglobiniche con **alterata** struttura e solubilità, **capacità di resistere alla ossidazione**, instabilità, aumentata tendenza a produrre **metaemoglobina** e **alterata affinità per l'ossigeno**.

La variante più comune è -> **l'emoglobina S** che presenta la **sostituzione** dell'acido glutammico in posizione **6** nella catena con una valina.

Gli **alleli** delle catene globiniche sono **codominanti** (il prodotto è codificato dall'uno o dall'altro degli alleli della coppia autosomica), cosicché...

- > gli **eterozigoti** per il gene della catene  $\alpha$  e/o  $\beta$  esprimono **2 emoglobine diverse**
- > gli **omozigoti** per i suddetti geni esprimeranno **emoglobina dello stesso tipo**.

### Anemia a cellule falciformi

#### Definizione

È una malattia caratterizzata dalla assenza di **Hb A** e dalla presenza della **variante anomala Hb S**. L'individuo affetto è **omozigote** per l'**Hb S**.

#### Fisiopatologia

Quando l'**HbA** cede l'**O<sub>2</sub>** ai tessuti, le **interazioni** tra la catena  $\alpha$  e la catena  $\beta$  si modificano per ritornare allo stato originale non appena l'**HbA** lega l'**O<sub>2</sub>**.

Il residuo di **VAL** (sostituito al **GLU** in posizione **6**) forma una struttura che si adatta ad un **sito complementare** su molecole di **Hb** vicine, le quali si uniscono insieme formando **filamenti** che si intrecciano in **masse polimeriche insolubili**. Questo avviene in **carenza di O<sub>2</sub>**; se la quantità di O<sub>2</sub> viene ripristinata, la catena  $\beta$  riassume la conformazione originaria.

La formazione di aggregati insolubili dipende dalla **[HbS]** nella cellula rispetto alle altre **Hb**, in quanto sia la **HbA** (in misura **minore**) che la **HbF** (in misura **maggiore**) proteggono dalla polimerizzazione.

Gli **eritrociti** degli individui omozigoti vanno incontro a ripetuti eventi di **falcizzazione** e **defalcizzazione** che provocano la formazione delle cellule **irreversibilmente falcemiche**, poco flessibili e deformabili con **scarsa** resistenza meccanica ed osmotica per cui vanno incontro a **emolisi intravascolare** o a **eliminazione** da parte del SRE.

La **probabilità** che le cellule falcizzino è facilitata dalla bassa **tensione di O<sub>2</sub> (ipossia)** e dal basso **PH (acidemia)** ed è maggiore dove il **flusso** di sangue è **rallentato** e dove si accumulano prodotti di degradazione metabolica.

#### Considerazioni Cliniche

I pazienti con **anemia falciforme** presentano periodicamente...

-> **crisi emolitiche**

-> **crisi aplastiche** dove è depressa l'eritropoiesi, probabilmente per **carenza di acido folico**

-> **crisi infartuali** date dall'occlusione di vasi ad opera delle emazie falcemiche che portano a diminuita ossigenazione che aggrava la **falcizzazione** e **ipossia** del tessuto che va in **necrosi**. I tessuti colpiti sono = **t. osseo** in primis, organi parenchimatosi come **polmone, fegato, milza e rene**.

#### Reperti di laboratorio

**Bilirubinemia, Sideremia ed % di saturazione della transferrina** sono elevate, mentre la TIBC è normale, la **[Hb]** è ridotta e il **numero dei reticulociti** aumenta.





### **Trait falcemico**

Gli **eterozigoti** che hanno **1** allele anomalo **S** sono **asintomatici** e hanno **aspettativa di vita e morbilità** normali, e presentano il **tratto falcemico**. La presenza di una modesta concentrazione di **HbS** conferisce protezione alla **malaria**, questo allele infatti è frequente nelle regioni dove la malaria è **endemica**.

L'allele anomalo può dare **problemi** in caso di **anestesia** e viaggi ad **alte quote**.

### **Reperti di laboratorio**

I **valori ematologici** sono in genere **normali** e i pazienti esprimono **diverse proporzioni** di **HbA** e di **HbS** rispettivamente il **55-60%** ed il **35-45%**.

### **Talasso-drepanocitosi**

I pazienti ereditano un **allele S** ed una **catena  $\beta$**  anomala. La **gravità** della malattia dipende dalla quantità di catena  **$\beta$**  normale sintetizzata. Gli individui hanno diverse **proporzioni** di **HbA** o **HbS** e possono presentare malattia da **lieve** a **grave** con sintomatologia simile alla **anemia falciforme**.

### **Emoglobinopatia C**

L'**HbC** presenta una **sostituzione aminoacidica in posizione 6** (una **LYS** al posto del **GLU**) che produce una **Hb meno solubile** della **HbA**. Gli eritrociti che la contengono vanno incontro a **rigidità** e conseguente **frammentazione**.

- > la **eterozigosi** non causa anemia e neanche riduzioni della sopravvivenza degli eritrociti
- > la **omozigosi** determina una **anemia emolitica lieve**, e nel sangue periferico sono presenti **microsferociti, cristalli intracellulari e cellule a bersaglio**.

### **Emoglobinopatia SC**

I pazienti hanno ereditato sia l'**allele S** che l'**allele C**, tali soggetti si definiscono **doppi eterozigoti**, e presentano sia la **HbC** che la **HbS**. I sintomi sono simili alla anemia falciforme ma **meno gravi**. **Anemia** di grado **lieve** con **reticolocitosi** e numerose **cellule a bersaglio** nello striscio di sangue periferico.

### **Emoglobine instabili**

Mutazioni nella struttura della **Hb** possono rendere la molecola **instabile** tanto che **precipita** formando nei **GR** i **corpi di Heinz**. Gli eritrociti diventano **meno deformabili** e vengono sequestrati e distrutti dalla **milza**. Le manifestazioni sono quelle di una **anemia emolitica**.

Gli **indici ematologici** possono essere più o meno **alterati**, i test diagnostici comprendono il **test di stabilità al calore** e il **test di esposizione all'isopropanolo**.

### **Talassemie ( $\beta$ -talassemia, $\alpha$ -talassemia, $\delta\beta$ -talassemia)**

Sono sindromi caratterizzate o da **ridotta** o da **assente** produzione delle **catene globiniche**. Si classificano in ->  **$\beta$ -talassemie**

->  **$\alpha$ -talassemie**

->  **$\delta\beta$ -talassemie** (ma decisamente più rare)

### **Regolazione della sintesi delle catene globiniche**

I geni per le **globine non-alfa** sono siti sul cromosoma **11** mentre i geni per le **globine alfa** sul cromosoma **16**. Esiste un solo gene per le catene  **$\beta$**  sull'**11**, mentre esistono **2** geni per ogni cromosoma delle catene  **$\alpha$** , per un tot. di **4** su entrambi i cromosomi. Un importante elemento regolatorio della trascrizione presente a monte del **cluster** dei geni delle catene **non- $\alpha$**  è detto **regione di controllo del locus (LCR)**.

Una produzione **ridotta** o **assente** di catene globiniche può derivare da...

- > difetti a livello delle **sequenze codificanti**
- > difetti a livello della **trascrizione**
- > difetti a livello del **processing del trascritto primario**
- > difetti a livello della **traduzione**

Gli individui con  **$\alpha$ -talassemia** producono poche catene  **$\alpha$**  per cui le catene  **$\beta$**  in eccesso in questa condizione possono formare tetrameri  **$\beta_2\beta_2$**  detti **HbH** (prevalente durante la vita adulta), mentre le catene  **$\gamma$**  analogamente possono formare tetrameri  **$\gamma_2\gamma_2$**  detti **Hb Bart** (prevalente durante la vita fetale).

### **$\alpha$ -talassemie**

Nella  **$\alpha^0$  talassemia** entrambi i geni  **$\alpha$**  di un cromosoma sono **inattivi**, quindi la condizione di...

- > **eterozigosi** è indicata come - - /  **$\alpha \alpha$**  detto (**tratto  $\alpha^0$ -talassemico**)
- > **omozigosi** è indicata come - - / - -, condizione detta **idrope fetale** con **Hb Bart**. Le **Hb embrionali** permettono la sopravvivenza solo fino al **2° trimestre** di gravidanza, dopo di che le **Hb Bart**, che hanno una **elevata** affinità per l'O<sub>2</sub> che le impedisce di rilasciarlo ai tessuti, causano la morte del feto per **anossia**.

Nella  **$\alpha^+$  talassemia** un gene  **$\alpha$**  è attivo mentre l'altro è inattivo nel cromosoma, quindi la condizione...

- > di **eterozigosi** è indicata come  **$\alpha - / \alpha \alpha$** . I soggetti eterozigoti presentano 2 o 3 geni per le  **$\alpha$**  globine e non hanno problemi clinici. Gli **eritrociti** di eterozigoti adulti contengono poca **HbH**, e si presentano morfologicamente **microcitici** e **ipocromici**.
- > di **omozigosi** è indicata come  **$\alpha - / \alpha -$**
- > di **doppio eterozigote** è indicata come - - /  **$\alpha -$** . Questi individui presentano la **talassemia intermedia**, e le cellule hanno un contenuto di **HbH** tra il **4%** e il **30%** Sono presenti **anemia grave** ed **eritropoiesi inefficace**.

### **$\beta$ -talassemie forma omozigote ( $\beta^0$ -talassemie)**

Interessa **entrambi** i geni globinici **beta** sulla coppia di cromosomi **11**. Non è evidenziabile clinicamente alla nascita in quanto **non sono prodotte catene beta** mentre intorno ai **3-6** mesi di età la **ridotta** sintesi di globine si dovrebbe manifestare con **eritropoiesi inefficace** per emolisi intramidollare. Si ha come **compenso** una **aumentata** sintesi di **HbF** e di **HbA<sub>2</sub>**.

La situazione clinica di omozigosi prende il nome di **talassemia major**, i **GR** sono **ipocromici** e **microcitici** ed è presente **emolisi** di grado elevato ed **eritropoiesi inefficace**. E' presente marcata **splenomegalia** ed **ittero modesto**.

Le catene **alfa** si accumulano in eccesso, **non** formano tetrameri ma precipitano e formano i **corpi di Heinz** nei precursori eritroidi, responsabili della **emolisi intramidollare**. L'anemia provoca ritardo della crescita ed espansione midollare (indotta da iperproduzione di eritropoietina dai reni) con **anomalie scheletriche**.

La forma di talassemia dovuta a **delezione** dei geni **beta** e **delta** è in genere **meno grave** in quanto favorisce una **produzione compensatoria** di catene **gamma**.

### **$\beta$ -talassemie forma eterozigote ( $\beta^+$ talassemie)**

Interessa gli individui con **un solo** allele **beta** anomalo, che non presentano particolari problemi clinici. Tali individui hanno **livelli di HbA<sub>2</sub>** che arrivano al **7%** (come i  **$\beta^0$ -talassemici**) e livelli aumentati di **HbF** in modo variabile. Lo stato di **eterozigosi** determina una condizione detta **talassemia minor** caratterizzata da **eritrociti microcitici** e **ipocromici**, con presenza di **punteggiatura basofila** e **aumentata resistenza alla lisi osmotica**. Tuttavia l'**anemia** è **meno grave** come pure la **eritropoiesi inefficace**. **Sideremia** e la **saturazione della transferrina** sono in genere **normali**.

## Esami di laboratorio per la valutazione delle emoglobinopatie

Le caratteristiche cliniche di una anemia emolitica cronica sono importanti per una **prima valutazione** della condizione patologica. Per definire esattamente la mal. sono necessari però **test aggiuntivi**.

-> L'**esame dello striscio di sangue periferico** permette di ottenere informazioni utili per la diagnosi di una emoglobinopatia. I **GR** in genere sono **normocitici** e **normocromici** eccetto che nelle talassemie, dove sono **ipocromici** e **microcitici**. Spesso è presente una diffusa **policromatofilia** che indica una **reticolocitosi**. Possono essere rilevabili anche i cambiamenti morfologici dei **GR** tipici delle varie mal. (come i GR a falce, o a forma di mollusco bivalve nella emoglobinopatia C)

-> L'**elettroforesi dell'emoglobina** è il test più adatto per dimostrare la presenza di **Hb** anomale

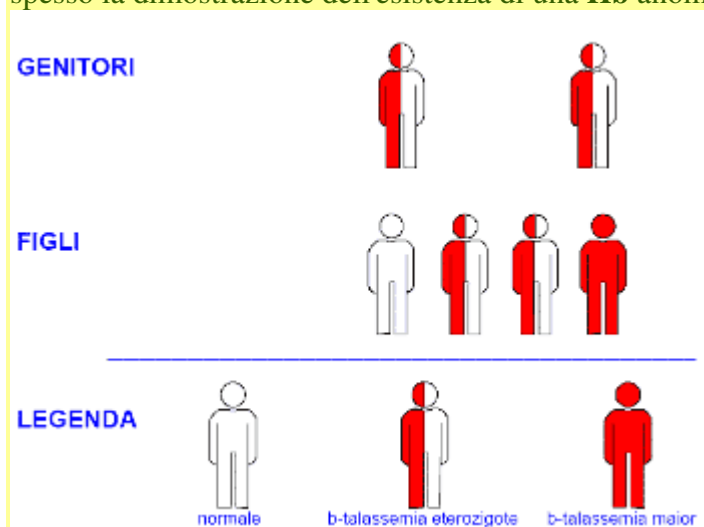
> Il **metodo dell'acido resistenza** distingue tra la HbF (resistente in ambiente acido e alcalino) dalla HbA.

-> I **cristalli di HbH** evidenziabili mediante colorazione sopravviale, conferiscono un aspetto a **palla da golf** ai **GR** dovuto alla **micropunteggiatura** causata dalla distruzione diffusa degli aggregati di **HbH**

-> il **test di screening per l'anemia falciforme** che mette in evidenza il processo di falcizzazione esponendo i **GR** a basse concentrazioni di O<sub>2</sub>

-> il **test di stabilità al calore** permette di distinguere le **Hb instabili**, labili al calore

La scelta del test da utilizzare richiede sempre la formulazione di una **ipotesi diagnostica** solida e spesso la dimostrazione dell'esistenza di una **Hb** anomala mediante il **test dell'elettroforesi**.



## Anemie emolitiche da difetti intrinseci acquisiti

### Emoglobinuria parossistica notturna

Vedi sopra (par. *anemie refrattarie e eritropoiesi inefficace*)

## Anemie emolitiche da difetti estrinseci

### Anemie emolitiche non immuni

L'emivita degli eritrociti può essere ridotta da agenti **fisici**, **chimici** oppure se sottoposti ad insulti **meccanici** che danneggiano la loro membrana.

### Traumi meccanici (anemia emolitica angiopatica)

Gli **eritrociti** possono essere danneggiati in presenza...

-> di **ostacoli fisici** che impediscono lo scorrimento del flusso vasale e che portano alla perdita di porzioni della membrana che **riducono il rapporto superficie/volume**, quali:

-> **difetti** nelle protesi valvolari cardiache (**anemia emolitica macroangiopatica**)

-> **capillari parzialmente occlusi da depositi di fibrina o coaguli** (**anemia emolitica microangiopatica**). I frammenti (**schistociti**) si formano nel passaggio attraverso le maglie di fibrina. Il numero delle **piastrine** è **ridotto**.

-> **nella emoglobinuria da marcia**, in cui i **GR** sono danneggiati dagli insulti meccanici nei vasi periferici della pianta dei piedi durante la marcia.



### Agenti chimici, fisici e tossici



Gli agenti fisici in grado di danneggiare i **GR** comprendono il **calore** durante le **ustioni gravi** nelle quali fino al **20-25%** degli eritrociti sono distrutti nelle prime 24-48 ore, ciò aggrava il danno renale indotto dalle variazioni pressorie, dalla perdita di liquidi e da altri prodotti di degradazione.

Alcuni agenti chimici o sost. tossiche sono in grado di danneggiare **direttamente** il **GR** come la **introduzione di acqua distillata**, il **gas arsina**, i **sali di rame** e sostanze **ossidanti**.



### Infezioni

Alcune infezioni come la **malaria**, o le infestazioni causate da **babesie** possono portare ad emolisi perché il **ciclo cellulare** del parassita comprende una fase di crescita e replicazione **entro i GR** che si conclude con la loro **lisi**.

### Anemie emolitiche mediate da anticorpi

L'attacco di **Ig** sulla membrana eritrocitaria determina la lisi del **GR** per il danno mediato dalle Ig stesse e l'**emolisi** può avvenire in sede **intravasale**, se l'anticorpo determina l'**att. del complemento** con lisi della membrana mediata dai MAC, o **extravasale**, se l'anticorpo **non** attacca il complemento ma **opsonizza** il **GR** determinandone la **cattura** e la **fagocitosi**.

Gli **Ig** sono diretti contro...

-> **Antigeni dei GR** (del gruppo A o B o del sistema Rh), o dei **GB**, o delle **piastrine** o anche **proteine del plasma**.

-> **Antigeni estranei**, come i farmaci, che si comportano da aptene e formano complessi sulla membrana dei **GR** o inducono la sintesi di **Ig cross-reattive** verso gli **antigeni self**.

### Anemia emolitica autoimmune AEA

Una **anemia emolitica autoimmune** si sviluppa per la produzione di **Ig** contro **antigeni** self presenti sui propri eritrociti con **riduzione della emivita** in circolo.

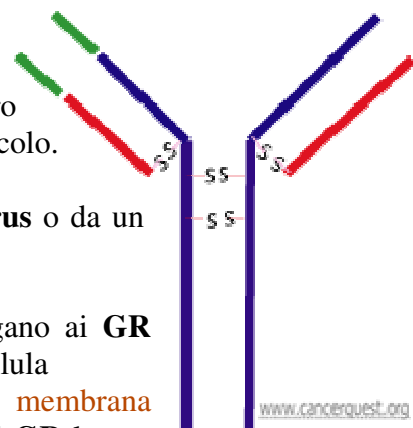
Tra le cause si annoverano...

- > la **modificazione** di antigeni di membrana degli eritrociti da un **virus** o da un **farmaco** di modo che questi vengano riconosciuti come estranei
- > la **produzione di Ig anti-eritrocitari** ad opera di farmaci
- > la **produzione di complessi farmaco-Ig anti-farmaco** che si legano ai **GR** bersaglio determinando l'**attivazione del complemento** e la lisi della cellula
- > l'**attacco del farmaco** (che si comporta come **aptene**) alla **membrana eritrocitaria** che induce lo sviluppo di **Ig** specifiche che opsonizzano il **GR** legato dal farmaco destinandolo alla **fagocitosi** da parte dei macrofagi splenici
- > la **produzione di Ig che cross-reagiscono** con gli antigeni eritrocitari.

Le malattie **emolitiche autoimmuni** possono essere classificate in...

- > malattie emolitiche autoimmuni **primarie o idiopatiche**
- > malattie emolitiche autoimmuni **secondarie**, ovvero associate ad altre malattie

Esiste anche una **seconda classificazione** che si basa sulla temperatura **ottimale** di azione dell'**Ig**



### Anemia emolitica autoimmune da anticorpi caldi

E' molto **comune** e genera danni più gravi di quella da anticorpi freddi. La lisi avviene in sede **extravasale** in quanto i **GR** opsonizzati vengono sequestrati dalla milza.

Si distinguono -> forme **lievi** e moderate, con livelli **emoglobinici** normali

- > condizioni **più gravi** con **MCV** elevato (reticolocitosi), alta **bilirubina indiretta** ed alti livelli di **lattico deidrogenasi** e concentrazioni di **aptoglobina** diminuite



**Il test dell'antiglobulina, o test di Coombs diretto, dimostra la presenza di Ig adesi ai GR, o di complemento. Le sindromi cliniche di AEA da Ig caldi comprendono le forme secondarie come quelle associate a malattie reumatiche, linfomi, forme da farmaci o da infezioni.**

Il reperto di **positività** al test di Coombs **non** giustifica un **trattamento** finché non compaiono altri dati di laboratorio che **attestino l'emolisi**.

### Anemie emolitiche autoimmuni da anticorpi freddi

Gli **Ig freddi** di queste malattie hanno un *optimum* di temperatura a **25 °C** o a **18 °C** o a **4 °C**. Normalmente non danno problemi, hanno rilevanza solo in pazienti sottoposti ad interventi cardiaci che comprendono l'utilizzo di **sostanze fredde** per indurre cardioplegia o nel caso (**raro**) di **agglutinazione delle emazie** nelle parti fredde del letto vascolare (**dita di mani e piedi**), detta **acrocianosi**. Gli **Ig freddi** determinano l'**attivazione del complemento** e la lisi **intravascolare** dei **GR**. La sintomatologia raramente è grave. Si riconoscono essenzialmente due forme...



-> **Anemia emolitica da agglutinine fredde** per la presenza di **Ig** contro **antigeni** eritrocitari che sono

**attivi a basse temperature** e appartengono alla classe delle **IgM**. **L'emolisi** è intravasale e **il test della antiglobulina** è positivo per la presenza di complemento sui **GR**

-> **Emoglobinuria parossistica a frigore** dovuta ad **Ig** della classe delle **IgG**. A **basse temperature** avviene l'attacco delle **Ig** alla membrana e dei **fattori complementari** mentre a **temperature alte** si ha la **attivazione del complemento** e la **lisi delle emazie**. E' associata ad **infezioni virali** e alla **sifilide**.

Compaiono **emoglobinuria** e **emoglobinemia**.



# MALATTIE DEI GLOBULI BIANCHI

Le malattie dei globuli bianchi possono essere classificate in **clonali e non clonali**. Nelle patologie clonali la malattia colpisce una cellula progenitrice dalla quale origineranno cellule a loro volta malate. Nelle malattie non clonali comprendono le alterazioni dei meccanismi di regolazione della proliferazione, le reazioni leucemioidi, l'aplasia e l'ipoplasia midollare e tutti i disordini qualitativi, congeniti e acquisiti, dei leucociti.

## MALATTIE NON CLONALI

### ALTERAZIONI FUNZIONALI DEI NEUTROFILI

Tra le alterazioni funzionali dei neutrofili sono sicuramente importanti le **alterazioni della chemiotassi**, meccanismo fondamentale per il reclutamento nei tessuti di questi fagociti nel sito di infiammazione. Le alterazioni della chemiotassi possono derivare dalla deficienza di fattori chemiotattici (citochine, integrine, selectine, ICAM e VCAM, complemento...).

Particolarmente importante è il **deficit del complesso integrinico CD11/CD18**, che normalmente è responsabile dell'attraversamento per diapedesi delle cellule endoteliali da parte dei neutrofili verso i tessuti.

L'attività chemiotattica dei neutrofili è inoltre ridotta da diverse sostanze, quali alcol, acido acetilsalicilico, farmaci antinfiammatori

**Test di valutazione della risposta chemiotattica in vivo (tecnica della finestra cutanea secondo Rebuck):** il test si esegue provocando una piccola abrasione cutanea, sulla quale viene posto un vetrino coprioggetto, che poi viene colorato per contare i neutrofili

**Test di valutazione della risposta chemiotattica in vitro:** è utilizzata la classica camera di Boyden, costituita da due compartimenti separati da una membrana porosa semipermeabile. Le cellule in esame vengono poste nella parte superiore della camera e in quella inferiore vengono posti i fattori chemiotattici; i neutrofili, richiamati, cercano di attraversare la membrana ma vi restano intrappolati. La membrana è quindi rimossa, colorata e analizzata.

Alterazioni importanti dei neutrofili sono anche la **alterazioni della fagocitosi**, di cui le principali sono 3:

1. **Malattia granulomatosi cronica:** patologia ereditaria legata al cromosoma X, caratterizzata da gravi infezioni ricorrenti da stafilococchi e gram-negativi, dovuta all'incapacità dei neutrofili di generare perossidi e superossidi (i geni alterati sono b558 e phox-91). Come conseguenza i microrganismi possono sopravvivere nei fagociti.
2. **Sindrome di Chediak-Higashi:** è una condizione caratterizzata da granuli lisosomiali giganti che contengono varie idrolisi ed enzimi. La sindrome è anche caratterizzata da parziale albinismo cutaneo, degli occhi e dei capelli. Si ha un'aumentata suscettibilità alle infezioni, in quanto i lisosomi, e quindi i processi di fusione di endofagosomi e lisosomi non funzionano correttamente.
3. **Deficit di mieloperossidasi:** è l'enzima che nei neutrofili converte il perossido di idrogeno in ione ipocloroso (HOCl), composto importante per uccidere i batteri. Il quadro clinico è simile alla malattia granulomatosi cronica.

La fagocitosi può essere analizzata mettendo a contatto le cellule fagocitarie con batteri, lieviti, o particelle rivestite con anticorpi o frazioni del complemento. Naturalmente è importante analizzare la morfologia dello striscio, per valutare ad esempio la presenza di granuli anomali. Un test importante è quello che valuta l'attività respiratoria (respiratory burst) con il **test al nitroblu di tetrazolio (NBT)**: le cellule fagocitarie vengono poste a contatto con endotossine che attivano gli enzimi ossigeno-dipendenti stimolando l'attività respiratoria cellulare. In presenza di attività NADPH-ossidasi il nitroblu di tetrazolio si riduce formando un pigmento blu-nero, che evidenzia la positività del test.

## **ALTERAZIONI FUNZIONALI DEI LINFOCITI**

Diminuzioni di linfociti provocano chiaramente immunodeficienza.

### **Immunodeficienze primarie**

#### **IMMUNODEFICIENZA COMBINATA GRAVE LEGATA A DEFICIT DI ADENOSINA DEAMINASI**

E' una malattia autosomica recessiva. L'enzima adenosina deaminasi interviene nel catabolismo delle purine e una sua carenza porta all'accumulo di deossiadenosina e di suoi precursori, che hanno diversi effetti tossici tra cui l'inibizione della sintesi del DNA. I linfociti non ne sono esclusi e anzi, ne sono particolarmente sensibili.

#### **SINDROME DI DIGEORGE**

E' invece un difetto di maturazione dei linfociti T, dovuto a una malformazione della 3° e 4° tasca branchiale nel feto, con conseguente difettoso sviluppo di timo, paratiroidi, strutture aeree e facciali. L'assenza delle ghiandole paratiroidi provoca alterazioni nel metabolismo del calcio e anomala contrattilità muscolare (tetania). Per quanto riguarda il sistema immunitario si osserva aplasia timica incompatibile con il normale processo maturativo dei linfociti T. Il difetto genico è dovuto a una delezione nel cromosoma 22, ma il gene non è stato ancora identificato, e quindi neanche il suo prodotto.

#### **SINDROME DEL LINFOCITA NUDO**

E' il deficit di espressione di MHC II sulle APC, ed è causata da mutazioni a carico dei fattori di trascrizione dell'MHCII, come CIITA. Ciò comporta la riduzione dei CD4+ attivati

#### **DEFICIT DI ESPRESSIONE DI MHC I**

E' spesso dovuta a mutazioni di TAP e si traduce con una carenza di CTL attivati.

#### **AGAMMAGLOBULINEMIA LEGATA AL CROMOSOMA X**

E' anche detta malattia di Bruton, ed è caratterizzata da totale assenza di anticorpi nel siero, dovuta a un deficit di maturazione dei linfociti B che non riescono a maturare oltre lo stadio pre-B. la malattia è causata da mutazione del gene per la tirosin-chinasi dei linfociti B, coinvolto nella traduzione del segnale nel processo maturativo dei linfociti B. Al contrario la maturazione e il numero dei linfociti T è normale

#### **DEFICIT SELETTIVI DI ISOTIPI IMMUNOGLOBULINICI**

Sono state descritte diverse deficienze che riguardano i diversi isotipi immunoglobulinici. Il più frequente è il deficit di IgA che riguarda 1 su 700 persone e si manifesta generalmente con episodi di infezioni delle vie respiratorie e intestinali. Naturalmente il difetto genetico riguarda il locus della catena alfa.

#### **SINDROME IPER-IgM LEGATA AL CROMOSOMA X**

E' una rara malattia causata da un'alterazione dei linfociti B che ne compromette la capacità di fare lo scambio di classe verso le IgA e le IgG. Il difetto è a livello del ligando di CD40 → viene a mancare lo stimolo fornito dai T-helper ai linfociti B per lo scambio isotipico

### **Immunodeficienze secondarie**

Classiche sono il virus dell'HIV, ma anche citomegalovirus, virus di Epstein-Barr e molti altri fattori come radiazioni, antimetaboliti, eccesso di corticosteroidi, stress ecc.

## **ALTERAZIONI QUANTITATIVE NON NEOPLASTICHE**

**Neutropenia:** è la diminuzione del numero assoluto dei neutrofili al di sotto di 200/ $\mu$ l, e può essere dovuta a ipoplasia del midollo, a carenze nutrizionali, a leucemie, a infezioni, a farmaci e a fenomeni autoimmuni. Naturalmente bisogna eseguire, per stabilire in senso quantitativo una neutropenia, il conteggio differenziale dei leucociti (formula leucocitaria), mentre per la valutazione qualitativa molto utile è l'esame del midollo osseo; altro test importante può essere quello di ricercare anticorpi anti-neutrofili (possibili origini autoimmuni). Una forma particolare è la neutropenia ciclica (ereditaria), in cui la neutropenia si manifesta circa ogni 21 giorni (si ritiene che ci sia una diminuzione ciclica dei CSF che determinano la granulocitopoiesi). Una forma ben più grave è l'agranulocitosi.

**Agranulocitosi:** è una grave neutropenia acuta; se è costituzionale (genetica) porta alla morte il bambino prima del compimento dell'anno di età. Se acquisita (spesso patologia autoimmuni o dovuta a uso di farmaci antinfiammatori, antitiroidei, antibatterici ecc.). L'agranulocitosi è caratterizzata da febbre alta e da lesioni ulcero-necrotiche alla faringe. La diagnosi si basa sull'attenta valutazione della formula leucocitaria. Per la terapia è necessaria la sospensione del farmaco e l'uso di antibiotici se è presente infezione.

**Reazioni leucemioidi:** il quadro è simile alla leucemia mieloide cronica, in quanto si osservano un gran numero di leucociti, maturi e immaturi, nel circolo sanguigno. Si tratta di una reazione però dovuta a stimoli da diversa natura, e non è una trasformazione neoplastica. Le differenze tra reazioni leucemioidi e leucemia mieloide cronica sono illustrate nella tabella:

<b>Reazioni leucemioidi</b>	<b>Leucemia mieloide cronica</b>
Leucociti solitamente <50000/ $\mu$ l	Leucociti solitamente >50000/ $\mu$ l
Granulazioni tossiche e corpi di Döhle	Granulazioni tossiche assenti
Basofilia assente	Numero di basofili di solito aumentato
Prevalenza di cellule a banda	Cellule in tutti gli stadi maturativi, con prevalenza di mielociti
ALPL elevata (>100)	ALPL <10
Milza solitamente non palpabile	Milza solitamente ingrossata
Cromosoma Philadelphia assente	Cromosoma Philadelphia presente nel 90% dei casi

**Mononucleosi infettiva:** è causata dal virus di Epstein-Barr ed è una patologia caratterizzata da leucocitosi; sono infatti aumentate le cellule T- regolatorie, o cellule di Downey, che contrastano i linfociti B infettati dal virus. Le cellule di Downey appaiono grandi e di aspetto atipico.

# **MALATTIE CLONALI**

## **MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE**

Sono un gruppo di **patologie neoplastiche** che interessano le staminali pluripotenti del tessuto emopoietico. Bisogna distinguere le malattie acute da quelle croniche.

## **MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE ACUTE**

**La leucemia acuta non linfocitaria (ANLL) o LEUCEMIA MIELOBLASTICA ACUTA (AML)** può essere divisa in **7 varianti** (da M1 a M7), a seconda della derivazione della proliferazione clonale

M1	mieloblastica	+ comune
M2	mieloblastica	+ comune
M3	promielocitica	
M4	mielomonoblastica	+ comune
M5	monoblastica	
M6	eritroblastica	- comune
M7	megacarioblastica	- comune

Di conseguenza questi fenotipi possono presentare aspetti diversi.

**E' una patologia dell'adulto** (a differenza di quella linfoblastica che è caratteristica del bambino); stanchezza e febbre sono sintomi presenti in tutte le forme; ciascuna forma ha poi aspetti particolari: ad esempio in M3 si manifestano emorragie e coagulazione intravascolare disseminata. In M4 e M5 un netto abbassamento di calcemia e potassemia. Il valore dei leucociti varia nelle varie forme da <5000 a >50000, quindi questo parametro è variabile.

La diagnosi di AML e la diagnosi differenziale dei vari sottotipi si basa sulla dimostrazione della presenza di cellule mature in circolo appartenenti alla serie mieloide e non a quella linfoide, e sulla identificazione del tipo cellulare coinvolto.

Le cellule LMA sono positive alla colorazione Sudan Nero e alla colorazione per la perossidasi

Inoltre con la **citometria a flusso** è possibile identificare le cellule utilizzando anticorpi monoclonali specifici prodotti contro antigeni di superficie (i vari CD 13,33,14,34,15,HLA-DR) e marcati a fluorescenza; un lettore ottico conta le singole cellule e inoltre lo scatter frontale della fluorescenza dà informazioni sul volume della cellula, mentre un sensore posto a 90° valuta la granularità cellulare misurando lo scatter laterale. Questo permette la valutazione dell'aspetto morfologico delle varie cellule e quindi del fenotipo della neoplasia.

In molte di queste neoplasie si riscontrano anche **alterazioni cromosomiche** (traslocazioni), che possono ulteriormente aiutare nell'identificazione del sierotipo.

## **MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE**

### **LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (LMC)**

E' anche definita leucemia granulocitica cronica ed è determinata da anomalie nella proliferazione di precursori mieloidi indirizzati verso lo sviluppo granulocitario. **Numerosissimi sono i neutrofili**, ma aumentati sono anche eosinofili e basofili. Il **numero totale di leucociti può arrivare a 250.000 cellule/ul.**

La patologia colpisce **adulti dopo i 20 anni**. I pazienti lamentano malessere, stanchezza, febbricola; la milza è quasi sempre aumentata, a volte addirittura occupa tutta la cavità addominale. Frequente è anche l'epatomegalia e i dolori ossei.

**Nella LMC sangue e midollo osseo presentano aspetti molto simili (e questo non è normale!).**

L'attività della fosfatasi alcalina è bassa o addirittura prossima allo 0.

Ma la caratteristica diagnostica chiave è la presenza del **cromosoma Philadelphia**, presente nel 90% dei casi, e dovuto alla traslocazione di materiale dal braccio lungo del cromosoma 22 al braccio corto di un altro cromosoma (di solito il 9). Questa traslocazione comporta la fusione tra un **protoncogene c-abl** e un tratto di DNA denominato BCR (**breakpoint cluster region**), e ciò provoca la trascrizione di un mRNA anormale che viene tradotto in una proteina chinasi (utilizzabile come marker) con attività trasformante.

In circa il 10% dei pazienti con LMC non è presente il cromosoma Philadelphia, ma in essi (generalmente anziani) la prognosi è di soli 8 mesi, contro i 40 mesi dei Ph-positivi.

### MENO IMPORTANTI

#### **MATAPLASIA MIELOIDE AGNOGENICA**

E' una malattia clonale della cellula staminale emopoietica caratterizzata da proliferazione incontrollata di cellule progenitrici in sede intra- ed extra-midollare. Si hanno anemia, febbre, ipercatabolismo, splenomegalia.

Sono visibili al microscopio negli eritrociti i corpi di Howell-Jolly. La fosfatasi alcalina leucocitaria è elevata. I neutrofili presentano ipersegmentazione del nucleo. Si verifica, in caso di aspirato midollare, il dry tap (puntura secca) per il fatto che il midollo è ricco di tessuto fibrotico.

Dal momento in cui la malattia entra in fase attiva, la sopravvivenza non supera l'anno.

#### **POLICITEMIA VERA**

Il termine più appropriato è eritrocitosi o eritemia, cioè un aumento dei globuli rossi. Un aumento spontaneo (o meglio non indotto) degli eritrociti viene appunto definito policitemia vera, che è diversa dalla policitemia secondaria o reattiva (vedi malattie G.R.). La patologia fa parte dei disordini mieloproliferativi in cui c'è un'eccessiva proliferazione di elementi eritroidi, ma è spesso accompagnata da leucocitosi e trombocitosi.

I pazienti possono manifestare sintomi relativi all'iperviscosità, quali disturbi visivi, cefalea, manifestazioni trombotiche.

Per la diagnosi differenziale con altre patologie è importante sapere che nella PV i livelli di eritropoietina sono bassi, la saturazione arteriosa dell'O<sub>2</sub> è normale, è sempre presente splenomegalia e bisogna naturalmente verificare se l'aumento della massa eritrocitaria è vero o se si tratti invece di un aumento dell'ematokrito secondario a una contrazione del volume plasmatico.

L'esame morfologico dello striscio di sangue e del midollo osseo possono aiutare nella diagnosi.

#### **TROMBOCITEMIA ESSENZIALE**

E' una malattia clonale della cellula staminale emopoietica caratterizzata da proliferazione eccessiva delle cellule della linea megacariocitica. Le piastrine sono aumentate (più di un milione per microlitro). Possono esserci fenomeni trombotici ma anche fenomeni emorragici (questo sembra strano ma è dovuto al fatto che le piastrine in circolo sono alterate, immature).

All'esame dello striscio di sangue ciò che salta all'occhio è l'enorme quantità di piastrine che mostrano spesso anomalie morfologiche. Nell'aspirato midollare si osservano megacariociti alterati.

Per distinguere la TE dalla TR (trombocitosi reattiva) bisogna innanzi tutto dire che in quest'ultima il numero di piastrine non arriva quasi mai al milione per microlitro, e che in essa la morfologia delle altre cellule ematiche è normale, a differenza della TE, in cui molte cellule ematiche presentano alterazioni morfologiche e funzionali.



## **SINDROMI MIELODISPLASTICHE**

Sono malattie caratterizzate dalla proliferazione incontrollata di cellule staminali pluripotenti. In esse si ha la **tendenza (25-30% dei casi) verso la leucemia acuta**, per questo sono state anche chiamate **sindromi pre-leucemiche**. Spesso l'evoluzione a leucemia è accompagnata da alterazioni cromosomiche (delezione braccio lungo cromosoma 5, perdita del cromosoma 5, monosomia 7, trisomia 8)

NOME	CLINICA	CELLULE ALTERATE	LABORATORIO
<b>ANEMIA REFRAATTARIA</b>	E' la più benigna e colpisce anziani	Ipercellularità midollare a carattere megaloblastico	Esami citologici del midollo
<b>ANEMIA REFRAATTARIA CON SIDEROBLASTI AD ANELLO</b>	Anemia ipocromica microcitica	Iperplasia del midollo con sideroblasti ad anello → difetto di incorporazione del Fe nei precursori eritroidi	Elevati livelli sierici di ferro ed elevata percentuale di saturazione del ferro
<b>ANEMIA REFRAATTARIA CON ECCESSO DI BLASTI</b>	Anemia normocromica macrocitica	Ipercellularità midollare con molti mieloblasti e con granulociti circolanti spesso aventi granulazioni abnormi	Esami citologici del midollo e del sangue
<b>ANEMIA REFRAATTARIA CON ECCESSO DI BLASTI IN TRASFORMAZIONE</b>	E' lo stadio più avanzato della precedente		
<b>LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA</b>		Forte aumento dei monociti immaturi nel sangue e nel midollo	Esami citologici del midollo e del sangue, alti livelli di lisozima

# ↓ MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE

## MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE ACUTE

### LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

E' una malattia dei **bambini (al di sotto dei 4 anni)**; si ha aumento di volume dei linfonodi, epatosplenomegalia, dolore e lesioni ossee, e come **complicanza la meningite leucemica**.



Per quanto riguarda il differenziamento con le leucemie mieloblastiche questo si basa su diverse **colorazioni a cui rispondono i due tipi di neoplasie**: le reazioni alla mieloperossidasi, al Sudan Nero e alle esterasi non specifiche sono positive nelle leucemie mieloblastiche, mentre le reazioni PAS e TdT sono positive nelle leucemie linfoblastiche.

Le leucemie linfoblastiche si dividono in **tre tipi**:

<b><u>LLA COMUNE</u></b>	TIPI DI CELLULE	IN TUTTE E 3	TERAPIA	PROGNOSI
<b><u>LLA-1</u></b>	Popolazione omogenea di cellule piccole con nucleo regolare grande e scarso citoplasma	Sono pochissimi i neutrofili in circolo, come anche gli eritrociti e le piastrine. Sia nel sangue che nel midollo si osservano <b>BLASTI</b> con grandi nuclei e citoplasma poco abbondante	Si basa naturalmente su farmaci che vanno a distruggere le cellule tumorali e a impedirne la proliferazione, con supporti trasfusionali e antibatterici	Migliore
<b><u>LLA-2</u></b>	Cellule sia piccole che grandi sia nel sangue che nel midollo. Il nucleo è indentato, con abbondante citoplasma			Intermedia
<b><u>LLA-3</u></b>	Cellule immature con grande nucleo vescicolare			Peggior

↓

Generalmente nelle LLA i blasti non mostrano il fenotipo caratteristico né delle cellule T né delle cellule B (LLA COMUNE). Esistono però altre tre varianti di LLA:

**-LLA a cellule T**

**-LLA a cellule B**

**-LLA a cellule null o indifferenziata**

**Nella forma a cellule T** possono essere marcati i classici CD4 e CD8 ed è una forma di LLA molto aggressiva e spesso resistente ai farmaci. La leucemia a cellule T umana dell'adulto è inoltre associata al virus omonimo, il retrovirus HTLV-1.

**Nella forma a cellule B** possono essere marcati anticorpi di membrana e nelle cellule sono presenti sempre traslocazioni cromosomiche. E' la forma più aggressiva di LLA.

**Nella forma indifferenziata** sono presenti soprattutto cellule pre-B, ma è stata poco caratterizzata.

## **MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE CRONICHE**

### **LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**

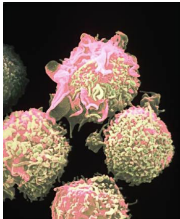
Differisce dalle altre forme di leucemia per il **decorso tipicamente lento** (molti anni). Colpisce in età adulta. La caratteristica peculiare è la **presenza di cellule B** morfologicamente normali ma **immunologicamente inerti** → il loro affollamento per mancata apoptosi non lascia spazio alle cellule B immunologicamente attive. L'immunità umorale è seriamente compromessa, e viene quindi a instaurarsi una immunodeficienza contro le infezioni soprattutto batteriche.

### **LEUCEMIA PROLINFOCITICA**

E' una forma più aggressiva della precedente, in cui le cellule sono meno differenziate, e quindi con capacità di crescita più rapida

### **LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE**

Si ha proliferazione clonale di diversi tipi cellulari, molti dei quali caratterizzati dalla presenza di **proiezioni citoplasmatiche fini come capelli** (presenza di anomali complessi ribosomi-lamellari), un aspetto nucleare particolare (cromatina "sale e pepe") e un'elevata affinità di un isoenzima specifico della fosfatasi acida tartrato-resistente (**TRAP-test**). E' presente splenomegalia. Spesso si ha difficoltà a ottenere aspirati midollari. Il quadro è simile alla leucemia linfatica cronica.

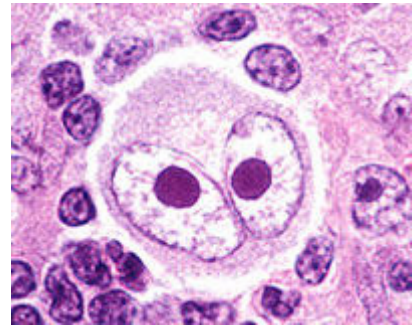


## **LINFOMI**

Sono tumori maligni degli organi linfoidei (linfonodi, milza, SRE).

### **LINFOMA DI HODGKIN**

E' un linfoma che è caratterizzato da cellule giganti (**cellule di Reed-Sternberg**) con caratteristici nuclei disposti specularmente e nucleoli ben evidenti (che appaiono come "**occhi di gufo**"), e che origina in un singolo linfonodo per poi diffondersi linearmente ai linfonodi contigui. Il disturbo d'esordio è l'**ingrossamento asimmetrico e non dolente dei linfonodi**. Caratteristica di questo linfoma è la **deficienza nell'immunità cellulo-mediata** a causa di un'anomala funzione dei linfociti T. *Molti aspetti di questa patologia sono ancora ignoti.*



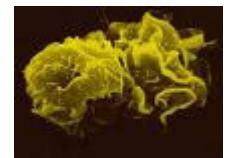
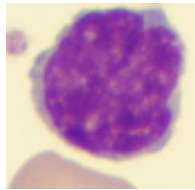
Può essere presente **anemia normocromica normocitica, monocitosi, eosinofilia e aumento di piastrine**. La **VES è aumentata** e questo riflette l'elevato turnover cellulare.

## LINFOMI NON HODGKIN

Vengono classificati soprattutto in base al grado di malignità: i linfomi a basso grado comprendono il linfoma linfocitico a cellule miste e i linfomi follicolari; i linfomi a medio grado di malignità si classificano a loro volta in forme diffuse e follicolari; tra i linfomi ad alto grado di malignità si trova il linfoma a cellule T, piuttosto raro.

Linfomi particolari sono:

- **il linfoma di Burkitt**, dovuto a proliferazione delle cellule B a causa del virus di Epstein-Barr, quando le cellule T regolatrici non riescono a contrastare l'azione proliferativa del virus nei confronti dei linfociti B.
- **il linfoma fungoide (o sindrome di Sèzary)**, caratterizzato da eritema diffuso ed esfoliazione della cute, e soprattutto dall'invasione da parte di cellule T neoplastiche della cute e conseguente formazione di protuberanze a forma di fungo (da qui il nome). Le cellule in questo linfoma sono cellule immature e presentano il nucleo che ha grossolanamente **l'aspetto del cervello**.
- **l'istiocitosi maligna** è una neoplasia degli istiociti (macrofagi), le cellule del SRE. Si hanno accessi febbrili, ingrossamento di fegato e milza. Spesso gli elementi neoplastici contengono al loro interno elementi midollari fagocitati (**emofagocitosi**). La prognosi è infausta.



## MALATTIE IMMUNOPROLIFERATIVE E DISCRASIE PLASMACELLULARI

Sono patologie caratterizzate da proliferazione incontrollata dei linfociti B

### GAMMAPATIE MONOCLONALI

Si ha, in queste patologie, l'eccessiva produzione di un'immunoglobulina. Derivano infatti dall'espansione clonale di un singolo linfocita B che è andato incontro a trasformazione neoplastica.

### MACROGLOBULINEMIA DI WALDENSTROM

Si ha un netto aumento di IgM, con aumento della viscosità del sangue, splenomegalia e linfadenopatia; inoltre le IgM in eccesso alterano la funzione piastrinica ed emostatica, con episodi emorragici e spesso danni oculari.

### MIELOMA MULTIPLO

E' caratterizzato dalla proliferazione incontrollata di un clone di plasmacellule, ha un andamento cronico e porta alla morte del paziente. Le plasmacellule neoplastiche infiltrano il midollo osseo e producono una grande quantità di immunoglobuline monoclonali.



Figure 1. Demineralizzazione multi-focale generalizzata del sistema scheletrico.

I **danni all'apparato scheletrico** sono dovuti a un *fattore stimolante gli osteoclasti*, che induce osteolisi e demineralizzazione ossea.

Si hanno inoltre, come nella precedente patologia, aumento della viscosità del sangue, alterazioni della funzione piastrinica ed emostatica.

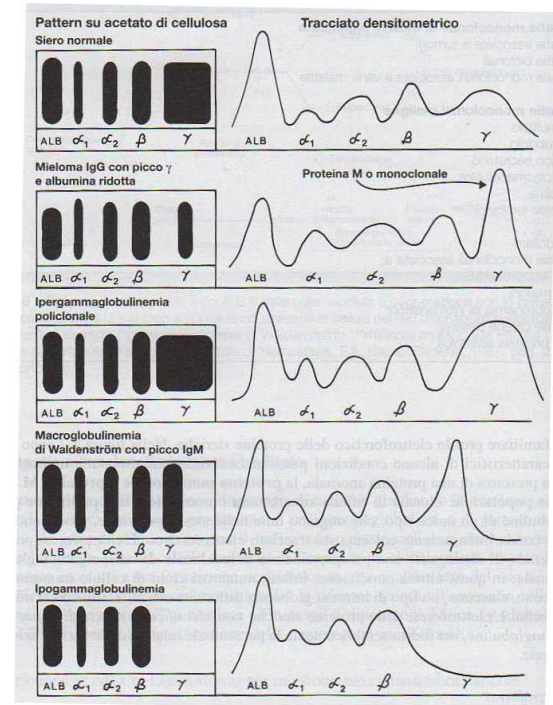
Nel mieloma multiplo è caratteristica una **VES elevatissima** (>100 mm/ora). L'esame del midollo evidenzia ipercellularità e numerose **plasmacellule** (+ del 20% della popolazione midollare). Altro fattore chiave è l'**ipercalcemia**, dovuta ai fenomeni di riassorbimento. L'elettroforesi delle proteine sieriche mette in genere in evidenza la **proteina monoclonale ("M")**, individuabile anche nelle urine

## VALUTAZIONE DI LABORATORIO DEI DISORDINI DELLE IMMUNOGLOBULINE

### ELETTROFORESI

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare, in base alla *carica elettrica* e alla *dimensione*, le proteine del siero. Il siero viene posto su un adatto supporto, quasi sempre agaroso, impregnato di un medium conduttore (tampone). Le molecole si separano perché la diversa carica e la diversa dimensione ne determinano una diversa velocità di *migrazione*. Le bande proteiche separate vengono identificate usando *coloranti delle proteine*, che conferiscono alle bande una colorazione la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di proteina. L'analisi quantitativa viene effettuata con un *densitometro*, che fornisce un tracciato che è il familiare profilo elettroforetico.

Le immunoglobuline fanno parte delle gamma-globuline, che ritrovano nella porzione più a destra del tracciato.

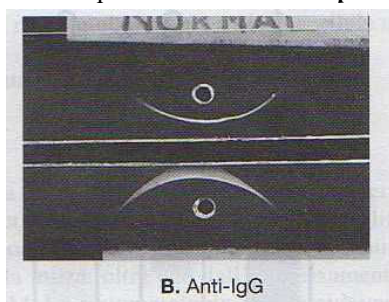


N.B. Nella gammopatie monoclonali si evidenzia la presenza di una proteina monoclonale o proteina M; questo è un quadro nettamente diverso da un'iper-gammaglobulinemia policlonali → nel primo caso la proteina creerà una banda unica intensamente colorata, mentre nel secondo, essendo diverse le Ig in eccesso, ci saranno diverse bande colorate a diverse distanze. Con l'elettroforesi però non si può identificare la classe di appartenenza delle Ig. E' quindi un *test quantitativo*.

### IMMUNOELETTROFORESI

Viene usata per identificare le diverse catene pesanti e leggere.

Il procedimento prevede un'elettroforesi del campione di siero su un supporto di gel di agar. Una volta separate le proteine (formazione di bande), le stesse vengono precipitate con antisieri specifici per ciascuna catena ( $\alpha, \gamma, \epsilon, \delta, \mu, \kappa, \lambda$ ). Si formeranno quindi degli archi di precipitazione visibili. Questo è quindi, a differenza del precedente, un *test qualitativo*, e *in parte fornisce anche una buona valutazione quantitativa*.



La figura indica un paziente con iper-IgG; infatti il pozzetto superiore indica un siero di controllo normale, quello inferiore è quello del paziente (è evidente nel pozzetto inferiore la maggiore grandezza, che si traduce in quantità di proteine)

Con lo stesso metodo si possono anche analizzare **campioni di urine**, che devono essere concentrate per aumentare la probabilità di individuare catene leggere o pesanti.

Per la ricerca delle catene leggere si usa il test di precipitazione al calore (anche **test di Bence Jones**): in un campione di urine riscaldato fino a 56°C le catene leggere precipitano, ma aumentando la temperatura fino all'ebollizione, il precipitato si ridissolve

Un metodo qualitativo più raffinato è l'**immunofissazione**: dopo elettroforesi su gel, le proteine sieriche vengono precipitate con antisieri specifici; le proteine che non reagiscono vengono lavate via e le bande di immunoprecipitazione identificate con una colorazione specifica.

Un metodo quantitativo più raffinato è invece **l'immunoprecipitazione (senza elettroforesi) in gel agar** impregnato con antisiero specifico, in cui il campione, posto in un pozzetto scavato nel gel, si diffonde e la proteina bersaglio dell'antisiero precipita formando un anello attorno al punto di applicazione, anello che è tanto più grande quanto è maggiore la quantità di Ig in questione.





# FUNZIONALITA' RENALE

*RIPASSO DI FISIOLOGIA...*

## **FUNZIONI DEL RENE**

- Escrezione di cataboliti (urea, creatinina, acido urico, ammonio, cistatina C ecc.)
- Regolazione del bilancio idrico-salino
- Regolazione dell'equilibrio acido-base
- Induzione della eritropoiesi (eritropoietina)
- Regolazione della pressione arteriosa (renina)
- Conversione della vitamina D nel suo prodotto definitivo (calcitriolo)
- Sintesi di amminoacidi

## **FILTRAZIONE GLOMERULARE**

I capillari renali sono impermeabili agli elementi cellulari e alle proteine del plasma ( $PM > 70000$ ). Inoltre, sostanze come calcio e acidi grassi, legati a queste proteine, non vengono filtrate facilmente. La **filtrabilità dei soluti** dipende naturalmente dalle dimensioni e dalla carica. Quest'ultima è molto importante per la non filtrazione delle proteine plasmatiche, che, oltre a essere grosse, hanno carica negativa, e nella membrana basale (ricorda i 3 strati) vi sono proteoglicani a carica negativa (repulsione), mentre le molecole cariche positivamente possono facilmente passare.

## **RIASSORBIMENTO e SECREZIONE NEL... TUBULO PROSSIMALE**

Il tubulo prossimale ha **un'alta capacità di riassorbimento attivo e passivo**, così che il 65% del filtrato in esso viene riassorbito. Questa elevata capacità è data biologicamente da un elevatissimo numero di mitocondri, dall'orletto a spazzola, e da numerosissime proteine carrier cotrasporto (es. sodio/glucosio e sodio/aminoacidi) e antiporto (es. Na/H). La pompa sodio-potassio rappresenta la principale forza motrice del riassorbimento del sodio, dell'acqua e del cloro.

Nella **prima metà del tubulo** il riassorbimento passivo del sodio si accoppia a quello di glucosio e aminoacidi.

Nella **seconda metà del tubulo**, poiché glucosio e aminoacidi sono quasi tutti riassorbiti, avviene un sempre un co-trasporto, ma sodio/cloro. Con il sodio viene riassorbita molta acqua.

Il tubulo prossimale è anche la sede primaria di **secrezione di acidi e basi**: Sali biliari, Ossalati, Urati, Catecolamine, oltre a Tossine e Farmaci → elevata velocità di clearance renale per queste sostanze (rifiuti).

## **ANSA DI HENLE**

Le branche ascendente e discendente dell'ansa hanno un epitelio basso, con pochi mitocondri, poca attività metabolica, senza orletto a spazzola.

La **branca discendente** è sottile e molto permeabile all'acqua e relativamente permeabile ai soluti: viene riassorbita il 20% di acqua e questo permette la diffusione di soluti attraverso le pareti.

La **branca ascendente** nella sua metà più distale è invece più spessa e impermeabile all'acqua, ma in grado di riassorbire per trasporto attivo **sodio, cloro e potassio, ma anche calcio, bicarbonato e magnesio**. Anche qui è molto importante la pompa sodio/potassio (come nel tubulo prossimale) → il sodio espulso nell'interstizio basolateralmente crea un gradiente di sodio che può entrare per diffusione dal lume attraverso la membrana → **1sodio porta con sé 2cloro e 1 potassio**. Gli altri ioni positivi vengono assorbiti negli spazi paracellulari (sempre nel tratto ascendente spesso) verso il liquido interstiziale, che è più negativo del lume (dovuto anche al fatto che nonostante ci sia un trasporto  $1Na2Cl1K$ , una piccola quantità di ioni potassio viene rilasciata indietro nel lume, che è quindi leggermente positivo. Qui vi è anche un **antiporto sodio-idrogeno**.

## TUBULO DISTALE (PARTE CONTORTA)

La parte contorta del tubulo distale presenta molte delle caratteristiche della parte spessa del braccio ascendente dell'ansa di Henle

## TUBULO DISTALE (PARTE REUNIENTE) E TUBULO COLLETTORE

2 diversi tipi di cellule: principali e intercalari.

Le **cellule principali** riassorbono sodio e acqua e secernono potassio → ciò è dovuto a una pompa sodio-potassio basolaterale che mantiene bassa la concentrazione endocellulare di sodio, che è quindi libero di diffondere dal lume trascinando l'acqua. Il potassio, elevato nella cellula (pompa), può diffondere verso il lume.

Le **cellule intercalate** riassorbono potassio e secernono idrogenioni → meccanismo di trasporto idrogeno-ATP-dipendente: l'idrogeno deriva in queste cellule dall'anidraasi carbonica ivi presente che produce ioni idrogeno e bicarbonato, che vengono secreti; gli ioni bicarbonato possono poi essere riassorbiti a livello delle membrane basolaterali. Il meccanismo di riassorbimento del potassio non è chiaro. Inoltre queste parti tubulari sono **impermeabili all'urea, riassorbono sodio e secernono potassio in un meccanismo dipendente dall'aldosterone, secernono grosse quantità di idrogenioni (eq. Acido-base), la loro permeabilità all'acqua è regolata da ADH**. La differenza principale dei tubuli collettori della midollare è che essi sono permeabili all'urea.

## Le condizioni primarie per la formazione di urina concentrata sono

1. Alti livelli di ADH
2. Alta osmolarità del liquido interstiziale della midollare renale, che fornisce gradiente osmotico all'acqua per il suo riassorbimento.

Dell'ADH ne parliamo dopo, ma come fa a mantenersi iperosmotico (fino a 1200mOsm/litro) il liquido interstiziale della midollare renale? Attraverso i **MECCANISMI CONTROCORRENTE**:

- a. Trasporto attivo di ioni sodio e cotrasporto di potassio, cloro e altri ioni nella porzione spessa dell'ansa di Henle verso l'interstizio midollare.
- b. Trasporto attivo di ioni nel tubulo collettore verso l'interstizio midollare.
- c. Diffusione limitata dell'acqua dai tubuli della midollare verso l'interstizio midollare.
- d. Diffusione passiva dell'urea (ricorda che stiamo parlando della midollare) dai tubuli collettori all'interstizio midollare.
- e. Vasa recta

Per quanto riguarda **l'ansa di Henle midollare** possiamo descrivere 7 stadi:

I. Assumendo che nell'ansa arrivi un liquido con una concentrazione di 300mOsm/litro

II. La pompa dell'ansa di Henle crea un gradiente di 200mOsm tra l'interno del tubulo e l'interstizio

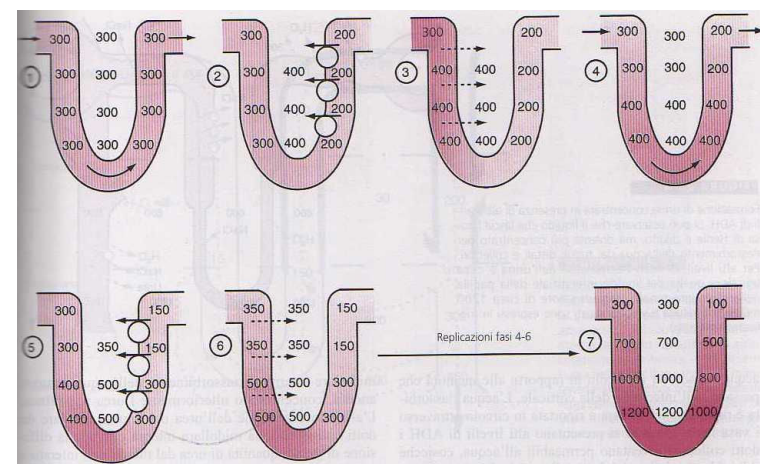
III. Il terzo stadio corrisponde al raggiungimento dell'equilibrio tra la branca discendente dell'ansa con l'interstizio tubulare (fuoriuscita dell'acqua dalla branca discendente per osmosi).

IV. Il quarto stadio è dovuto a un nuovo flusso di liquido dal tubulo prossimale al braccio discendente dell'ansa, che spinge il liquido iperosmotico che qui si è formato verso la branca ascendente

V. Quindi dalla branca ascendente nuovi ioni vengono pompati nell'interstizio, mentre altra acqua è trattenuta nel tubulo, fino a un nuovo gradiente di 200mOsm, e il liquido interstiziale aumenta fino a 500mOsm/litro.

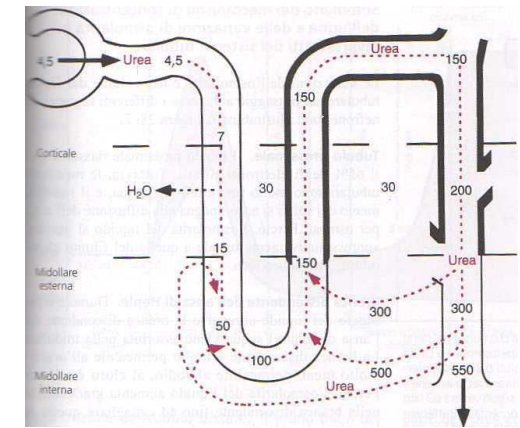
VI. Il liquido della branca discendente si porta nuovamente in equilibrio con quello interstiziale

VII. Replicazioni degli stadi 4-6, in un processo che intrappola gradualmente i soluti nella midollare e moltiplica il gradiente inizialmente formato dalla pompa ionica nella porzione spessa della branca ascendente fino a raggiungere nell'interstizio un'osmolarità di 1200-1400mOsm/litro.



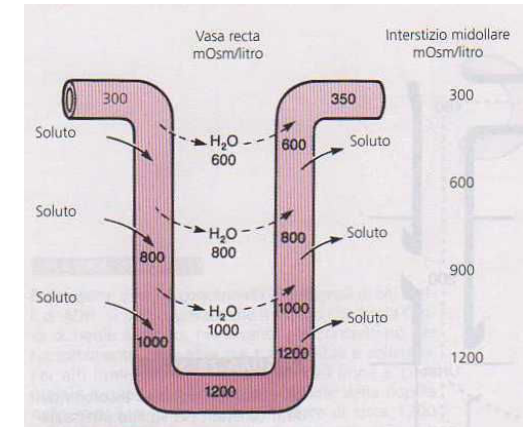
Infine dobbiamo considerare l'**urea** (e quindi non solo il cloruro di sodio), che a differenza del cloruro di sodio che è trasportato attivamente nell'ansa, fluisce passivamente dai dotti collettori nell'interstizio midollare e contribuisce al **40% dell'osmolarità (500mOsm/litro)** dell'interstizio stesso! Infatti, in presenza di rilevabili quantità di ADH, e quindi se avviene un rilevabile riassorbimento di acqua nei tubuli midollari, l'urea concentrata in grandi quantità nel tubulo collettore midollare diffonde in grandi quantità nell'interstizio midollare.

In condizioni normali il **40-60% dell'urea filtrata nel glomerulo viene espulsa**, ma grossa parte contribuisce a mantenere l'iperosmolarità dell'interstizio midollare in quanto **RICIRCOLA**: dall'interstizio midollare in cui diffonde può diffondere nel tratto sottile dell'ansa di Henle e tornare quindi, attraverso il braccio spesso, il tubulo distale e il tubulo corticale, al tubulo midollare, dove può ricominciare il ciclo e mantenere ipertonico il liquido interstiziale midollare.



Un ultimo fattore, ma non meno importante, per il mantenimento dell'iperosmolarità nell'interstizio midollare, è lo scambio controcorrente nei **vasa recta**, un sistema vascolare diverso dal resto del rene, in cui il flusso ematico è scarso (lento), che serve a minimizzare la perdita di soluti dall'interstizio della midollare.

Il meccanismo di scambio controcorrente è in realtà un modo per **MANTENERE L'IPEROSMOLARITA' E NON PER CREARLA** → i capillari sono a forma di U: nella discesa il sangue assorbe soluti per diffusione e cede acqua all'interstizio, fino a raggiungere 1200mOsm/litro; poi, nel braccio ascendente, avviene il contrario (l'acqua diffonde nel vaso e i soluti diffondono nell'interstizio) → si ha una perdita di soluti dall'interstizio molto trascurabile.



### SINTESI DI ADH NELL'IPOTALAMO-IPOFISI

L'ADH viene sintetizzato per circa 5/6 nel nucleo sopraottico e per circa 1/6 in quello paraventricolare. Viene accumulato in gocce di neurosecreto nei fasci che dall'ipotalamo vanno all'ipofisi, e quando i nuclei dell'ipotalamo vengono stimolati da variazioni di osmolarità si eccitano e l'eccitazione si propaga in questi fasci, fino al rilascio di calcio, che permette il rilascio delle vescicole.

Una seconda regione importante per la secrezione di ADH (e quindi nel controllo dell'osmolarità) è la regione anteroventrale del terzo ventricolo, regione **A3V3**. Qui si trovano due strutture importanti: superiormente l'organo subfornicale, inferiormente l'organo vascolare della lamina terminalis; tra questi due nuclei è compreso il nucleo preottico mediano; nella regione A3V3 si trovano **osmocettori**, che reagiscono a variazioni dell'osmolarità inviando segnali al nucleo sopraottico regolandone l'eccitazione e la secrezione di ADH. E' importante dire che questa zona è vascolarizzata da vasi che non presentano la barriera emato-encefalica, cosicché i soluti in questa zona possono filtrare come in ogni altro distretto (possono rilevare variazioni di osmolarità).

### SISTEMA DELLA SETE

L'ingestione di liquido è regolata dal meccanismo della sete (desiderio consapevole di bere acqua); la maggior parte degli stimoli che provocano rilascio di ADH provocano anche sete:

infatti l'**area A3V3** può stimolare la sete, infatti il centro della sete si trova subito anteriormente al nucleo preottico. Questo è formato da cellule che sono anch'esse osmocettori, che quindi reagiscono a soluzioni ipertoniche o a osmolarità più alta stimolando appunto la sete. → L'aumento dell'osmolarità infatti causa disidratazione cellulare nei centri della sete, e stimola a bere.

## VALUTAZIONE DELLA FILTRAZIONE GLOMERULARE

Lo studio della funzione di filtrazione glomerulare del rene viene effettuato attraverso la **clearance renale**, che indica il volume di plasma depurato da una certa sostanza nell'unità di tempo.

$$\text{Clearance} = \frac{U \times V/\text{min}}{P}$$

U = concentrazione urinaria della sostanza

V/min = volume urinario al minuto

P = concentrazione plasmatica della sostanza

**Ma quale sostanza può essere utilizzata come marker di filtrazione glomerulare?** Deve innanzi tutto essere un marcatore sensibile e specifico, e dovrebbe essere prodotto in maniera endogena e con biosintesi costante indipendentemente da: età, sesso peso, dieta o malattia; dovrebbe essere filtrato liberamente ed escreto solo dal glomerulo, senza secrezione tubulare, riassorbimento o modificazione; una volta nell'urina dovrebbe rimanere stabile fino a che può essere misurata routinariamente con costi limitati, in maniera automatica e con minime interferenze analitiche....

**La sostanza che meglio risponde ai suddetti requisiti è l'**inulina**, **polisaccaride esogeno** costituito prevalentemente da unità di D-fruttosio (PM 5.000): l'inulina viene completamente filtrata dal glomerulo ed eliminata con le urine senza essere né riassorbita né secreta dal tubulo; pertanto, la sua clearance corrisponde esattamente alla quantità di liquido filtrato dai glomeruli nell'unità di tempo. Per comodità di esecuzione, nella pratica clinica si ricorre più spesso alla creatinina, metabolita endogeno.**

**La creatinina è il metabolita endogeno di scelta per il calcolo di valori affidabili di clearance**

**I.R. maschio: 0.7-1.2 mg/dl femmina: 0.4-1 mg/dl**

- E' il prodotto terminale del metabolismo della **creatina** (fosforilata dall'enzima CPK in creatina-fosfato), presente nel muscolo scheletrico.
  - **La quantità di creatinina che si forma ogni giorno è costante**, tranne:
    - nei gravi danni del tessuto muscolare (schiacciamento)
    - nelle miopatie degenerative
    - in grandi sforzi fisici
  - La creatinina (P.M. 113) **non è tossica, non si lega alle proteine, non è influenzata dalla dieta**
  - I reni eliminano creatinina con grande efficienza
  - La quantità di creatinina prodotta ed escreta è proporzionale alla massa muscolare ed è generalmente maggiore negli uomini rispetto alle donne
- 
- *La determinazione della creatinina si basa sulla formazione, in ambiente alcalino, di un complesso colorato: creatinina-picrato, con lettura a 490 nm. (Jaffè). Interferiscono: glucosio, acido urico, bilirubina, acido piruvico, farmaci.*
  - *Anche il metodo enzimatico (anno 1980) che si basa sulla reazione catalizzata dalla creatinina-deaminasi non è esente da interferenze, come la iperbilirubinemia.*
  - *I metodi di riferimento sono: GAS-MASSA e HPLC*

## MISURAZIONE DELLA CREATININA

### CREATININA CLEARANCE

#### Modalità di esecuzione

I.R. 70 – 130 ml/min

- Raccolte le urine delle 24 ore, si deve misurare il volume (in ml) e calcolare il volume/minuto dividendo i ml totali per 1440 (minuti delle 24 ore).

Si eseguono i dosaggi della creatinina plasmatica e urinaria e si procede al calcolo della clearance:

- $Cl = \frac{Cr_U \times V/min}{Cr_P}$
- Cl: Clearance
- $Cr_U$ : Creatinina urinaria (mg/dl)
- V/min: Volume minuto
- $Cr_P$ : Creatinina plasmatica (mg/dl)

### CALCOLO DELLA CLEARANCE CREATININA MEDIANTE FORMULA SENZA RACCOLTA DELLE URINE (negli adulti)

#### Formula di Cockcroft e Gault

$$\text{Clearance creatinina} = \frac{(140 - \text{età in anni}) \times \text{peso corporeo}}{\text{creatinina} \times K}$$

Peso corporeo è espresso in Kg

Creatinina è espressa in mg/dl

K è una costante pari a: 72 uomo  
85 donna

**Un possibile problema** può sorgere per il fatto che le **cellule tubulari** secernono piccole quantità di creatinina nel filtrato. Questo fatto è relativamente poco importante in valori di filtrato glomerulare normale, ma quando la filtrazione si riduce a causa di una riduzione della funzionalità renale, il contributo tubulare diventa percentualmente assai maggiore. **Inoltre...**

I reni normali hanno una grande **capacità di riserva funzionale** → molti nefroni possono essere perduti senza che venga ridotta la capacità di eliminare i prodotti di scarto del metabolismo azotato. Quando diminuisce la clearance della creatinina, i livelli plasmatici di creatinina non aumentano fino a quando non sia stato perduto circa il 50% dei nefroni. Inoltre, se la perdita dei nefroni è lenta, i nefroni rimanenti vanno incontro a ipertrofia compensatoria, e, in questo caso, possono essere anche persi 2/3 dei nefroni prima che la creatininemia aumenti. Nei danni renali acuti, invece, la creatininemia aumenta più rapidamente.

La concentrazione plasmatica della creatinina è normalmente bassa (mai superiore a 1,5mg/dl), ma in presenza di gravi malattie renali, come già detto, questo valore aumenta considerevolmente.

**E' chiaro comunque che una singola determinazione della creatinina non ha senso, ma vanno fatti una serie di rilievi nel tempo.**

[Creatinina] siero

**Aumenta :** nefropatie con ↓ GFR (glom. filtr. rate); ↓ flusso renale (scomp. card. cong); ostruzioni vie urin.; shock; disidrataz.; traumi

**Aumenta in modo significativo quando metà dei nefroni non funzionano.**

**Diminuisce :** ridotta massa muscol.; denutrizione

**Valori di rif. :** 0.5-1.3 mg/dl



## Urea

L'urea è il prodotto di fissazione della ammoniaca che deriva dalla transaminazione e dalla deaminazione ossidativa degli aminoacidi. E' prodotta dal fegato (ciclo dell'urea) ed è eliminata principalmente per via renale

In soggetti con un normale apporto proteico giornaliero nella alimentazione (1g/kg di peso) i valori ematici di urea sono compresi tra 20 e 45 mg/dl

La concentrazione plasmatica in condizioni normali, tende a rimanere costante, ma è influenzata da diversi fattori extrarenali:

- disidratazione
- dieta
- sepsi, shock
- traumi
- neoplasie
- emorragie
- ingestione, catabolismo e perdita proteine dal tratto gastrointestinale

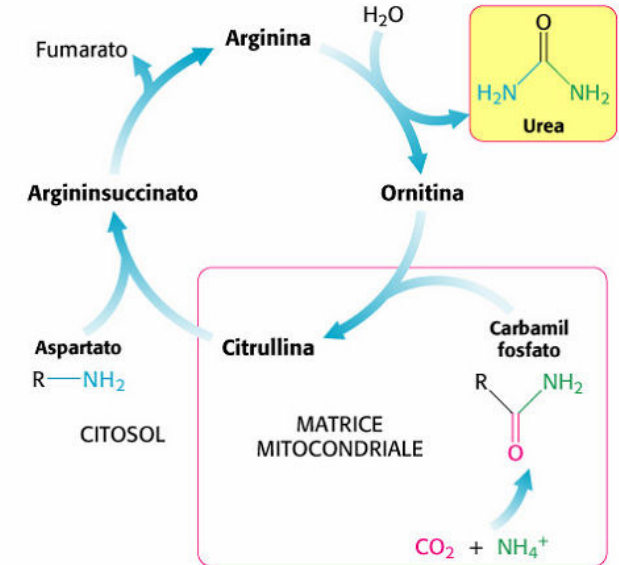
1. Uremia pre-renale causata da meccanismi che agiscono a monte della filtrazione glomerulare del plasma:

a) Diminuzione perfusione renale (stati di shock, disidratazione, emorragia)

b) Aumento catabolismo proteico (sanguinamento del tubo digerente, ustioni, febbre, emorragie in cavità o in tessuti molli, emolisi)

2. Uremia post-renale da ostruzione del tratto genitourinario

3. Uremia intra-renale: lesioni a carico dei glomeruli, del microcircolo renale o dei tubuli renali (glomerulonefriti, ipertensione maligna, necrosi corticale, farmaci o metalli nefrotossici, pielonefriti, diabete mellito, tubulopatie)



Al contrario di creatinina e urea, la [acido urico] nel siero NON è un buon indicatore di funzionalità renale

[Ac. urico] siero

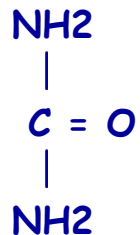
Prodotto dal catabolismo purinico. Filtrato dal glomerulo, in gran parte (90%) riassorbito dal tubulo prox. e secreto dal tubulo distale.

Aumenta: aumentato catabolismo nucleico (terapia antitumorale); gotta; Valori di riferimento: 3.5-7 mg/dl.

## Azoto ureico (BUN)

Alternativamente alla concentrazione ematica dell'urea, nella diagnostica di laboratorio viene più spesso determinata la concentrazione ematica dell'azoto ureico (BUN: blood urea nitrogen)

Dato che nella molecola di urea (PM 60) sono contenuti due atomi di azoto (PA 14), il rapporto urea / azoto ureico corrisponde a 60 / 28, cioè a 2,14; pertanto, in soggetti con un normale apporto proteico giornaliero nella alimentazione (1g/kg di peso) i valori ematici di azoto ureico sono compresi tra **9 e 20 mg/dl**



## BUN/creatinina

I.R. 12-20

### Rapporto diminuito: <12

Epatopatia o insufficienza epatica  
Dieta ipoproteica/digiuno prolungato  
Necrosi tubulare acuta  
(↑ creatinina)

### Rapporto aumentato: >20

*Con valori di creatinina normali*

Uremia prerenale  
Dieta iperproteica  
Emorragie gastrointestinali  
Stati ipercatabolici

*Con valori di creatinina aumentati*

Azotemia prerenale con nefropatia  
Insufficienza renale  
Azotemia post-renale



## Considerazioni cliniche BUN/creatinina

- Quando la funzione renale diminuisce: azoto aumenta più rapidamente della creatinina
- Dopo terapia dialitica o dopo trapianto renale: azoto diminuisce più rapidamente della creatinina
- Nell'insufficienza renale cronica di grave entità: azoto continua ad aumentare creatinina raggiunge un plateau

## Cistatina C (altro marcatore endogeno di filtrazione glomerulare)

- E' una proteina basica di basso peso molecolare (13359 Dalton) costituita da 120 aminoacidi.
- Appartiene alla superfamiglia degli inibitori delle proteasi (papaina, calpaina, catepsine).
- Prodotta da tutte le cellule nucleate
- **Liberamente filtrata dal glomerulo, riassorbita e catabolizzata nei tubuli prossimali. Non secreta dai tubuli**
- Sintesi relativamente costante nella maggior parte dei tessuti dell'organismo
- Scarsamente dipendente da fattori estrinseci: sesso, età, tipo di alimentazione, stato nutrizionale, infezioni
- Bassa variabilità biologica interindividuale (ca. 8%)

### VANTAGGI

1. Marcatore diagnostico più precoce e più sensibile per piccole variazioni di GFR
2. Marcatore prognostico importante : nefropatia diabetica ipertrofica funzionale

### SVANTAGGI

Non è sufficientemente standardizzato

## CISTATINA C (CysC)

### Metodi di dosaggio

- La cistatina C può essere misurata nel sangue e nei liquidi biologici con **metodiche immunometriche** come RID, RIA, EIA, FEIA o metodi immunoturbidimetrici e nefelometrici. I dosaggi suddetti sono poco pratici e presentano costi abbastanza elevati.
- Attualmente la DADE –Behring ha messo a punto un metodo **immunologico nefelometrico** (PENIA) che prevede, oltre l'uso di Ab anti-cistatina C, l'aggiunta di due reagenti che stabilizzano la reazione ed eliminano in parte possibili interferenze.
- **Intervalli di riferimento**  
Ancora non sono ben definiti e cambiano da Autore ad Autore. Si può affermare che essi variano in media nell'adulto tra **0,57 - 1,79 mg/L** mentre sono più elevati nei bambini e soprattutto nei neonati (ca. **2 mg/l**).
- Nel 1994 è stato messo a punto un **metodo immunologico turbidimetrico** (PETIA) che si basa su una reazione con Ab di coniglio anti-cistatina C legati a particelle di poliestere. La lettura turbidimetrica avviene alla lunghezza d'onda di 340 nm.

**Test complementare alla creatinina**

## DETERMINAZIONE DELLA PRP

La **portata renale plasmatica** (PRP) è data dalla quantità di plasma che circola attraverso l'apparato escretorio renale nell'unità di tempo. Condizione basilare per la determinazione della PRP è l'impiego di una sostanza che, in un solo passaggio attraverso il rene, venga completamente estratta dal sangue (non importa se ad opera del tubulo o del glomerulo) e totalmente escreta con le urine. La clearance di tale sostanza, vale a dire la quantità di plasma depurata dalla stessa nell'unità di tempo, corrisponderà al volume di plasma che attraversa il rene nell'unità di tempo cioè, appunto, alla PRP.

La sostanza che meglio di ogni altra risponde ai suddetti requisiti è il sale sodico dell'acido **para-ammino-ippurico (PAI)**, sostanza *esogena* che viene eliminata dal sangue sia per filtrazione glomerulare sia per secrezione tubulare.

Una condizione fondamentale per l'uso del PAI nella determinazione delle PRP è che la sua concentrazione ematica rimanga sotto i 10 mg/ml: oltre questo valore, infatti, si supera sia la capacità di *filtrazione glomerulare* sia la capacità di *secrezione tubulare*

## VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE TUBULARE

Appropriati sono i confronti delle concentrazioni urinarie e plasmatiche di glucosio, aminoacidi, fosfati, idrogeno, ioni ammonio, bicarbonato e i vari elettroliti. → Es. una glicosuria elevata con glicemia bassa indica una disfunzione del tubulo prossimale, mentre alterazioni nella capacità di regolare il PH indicano patologia dei tubuli distali e collettori.

## CAPACITA' DI CONCENTRAZIONE

La capacità di concentrare l'urina e di modificarne l'osmolarità dipende dalla funzionalità dei tubuli distali e collettori. L'osmolalità plasmatica è pari a 285mOsm/Kg, ma il rene, per conservare acqua, può portare l'osmolalità dell'urina a un livello 4 volte superiore.

**L'osmolalità può essere calcolata con la formula**

$$2 [\text{Na}^+] + \frac{\text{glicemia}}{18} + \frac{\text{BUN}}{2,8}$$

Dove  $\text{Na}^+$  è espresso in mEq/litro e glucosio e BUN in mg/dl.

Normalmente il rapporto tra osmolarità urinaria e sierica è di almeno 1:1 e, dopo carico idrico, dovrebbe raggiungere 3:1. Se questo rapporto si mantiene costantemente a valori inferiori a 1:1, è probabile che vi sia una disfunzione dei tubuli renali. Se invece il valore è costantemente più alto di 1:1, esso indica una patologia glomerulare.

### DIURESIS OSMOTICA

La diuresi osmotica è causata dalla presenza nel filtrato di un carico elevato di soluti elevato rispetto all'ambiente midollare ipertonico. Un esempio è l'iperglicemia. Una condizione in cui si instaura diuresi osmotica è la perdita di nefroni funzionanti → a ciascun nefrone residuo spetta un carico osmotico maggiore, condizione che favorisce la diuresi osmotica → progressiva perdita di capacità di concentrare l'urina.

### TEST DI CONCENTRAZIONE

E' il test più semplice per valutare la capacità del rene di concentrare l'urina: si determina il peso specifico di un campione di urina del primo mattino. Un peso specifico di 1,025 corrispondente a un'osmolalità di circa 850 mOsm/Kg indica che i reni hanno una capacità di concentrazione adeguata.

In realtà, per valutare meglio questo test, si deve controllare l'apporto idrico: dopo 12 ore di non idratazione l'osmolarità dovrebbe raggiungere il 75% e dopo 24 ore dovrebbe essere massima.

**il paziente deve svuotare la vescica e consumare una cena priva di liquidi alle 18, senza assumere altro alimento liquido o solido; alle 6, alle 8 e alle 10 della mattina successiva si raccolgono tre campioni di urina: in condizioni di normale funzionalità tubulare, negli ultimi due campioni, o almeno in uno di essi, il peso specifico deve superare 1,025**

### TEST DI DILUIZIONE

**al soggetto digiuno dalla sera precedente si fa svuotare la vescica e quindi si somministrano 1200 cc di acqua che devono essere bevuti in 30 minuti; nelle successive 4 ore, ogni 30 minuti si raccolgono separatamente le urine formate: in condizioni di normale funzionalità tubulare, il peso specifico di almeno uno dei due primi campioni deve scendere a un valore di 1,003**

# ELETTROLITI

## SODIO

**Siero: v.n. 135-153 mEq/L**

**Urine: v.n. 40-220 mEq/L**

Filtrato liberamente dal glomerulo e riassorbito il 75-90%

Cambiamenti di concentrazione determinano modificazioni dell'osmolalità

**Iponatremia** è uno dei più comuni disordini elettrolitici

Il tasso di diminuzione è direttamente proporzionale alla gravità dei **sintomi**:

- **lievi** cambiamenti psichici, astenia, nausea, crampi muscolari;
- **gravi** anomalie neurologiche (disorientamento, stato confusionale, coma, convulsioni)

Eziologia renale dell'iposodiemia comprende:

1. Terapia con **diuretici** (furosemide e tiazidico)
2. **Nefropatia** con perdite di sali
3. Insufficienza ipofisaria (carente produzione di **ADH**)
4. Insufficienza surrenalica (carente produzione di **aldosterone** perdita cospicua di sali)

Eziologia dell'iposodiemia extrarenale comprende:

1. Iperidratazione
2. Vomito
3. Diarrea
4. Perdita di liquidi interstiziali
5. Ustioni

## Ipernatremia

- Cause extra-renali: disidratazione, sudorazione, diarrea, pz. ricoverati non autosufficienti
- Cause renali: diabete insipido centrale e diabete insipido nefrogenico

N.B. l'escrezione renale di sodio ( $F_{Na}$ ), denominata anche **indice di insufficienza renale**, può fornire informazioni utili su un'IRA:

$$F_{Na} = \frac{\text{Sodio urinario} \times \text{Creatinina plasmatica}}{\text{Creatinina urinaria} \times \text{Sodio plasmatico}}$$

Un valore minore di 1 suggerisce che la patologia renale abbia un'origine pre-renale, mentre un valore maggiore di 1,5 indica un'insufficienza renale più probabilmente sostenuta da necrosi tubulare acuta

## Potassio

Siero: v.n. 3,5-5,3 mmol/l

Urine: 10-20 mmol/die

Potassio: catione intracellulare più rappresentato

2% appartiene all'ECF

**Parametro ematochimico di maggiore importanza**

- Anche in caso di carenza viene escreto con le urine
- Il contenuto di  $K^+$  nel siero varia con il variare del pH:

### Acidosi

Intracellulare                      Extracellulare



### Alcalosi cronica

associata a deplezione di  $K^+$

(es. terapia diuretica, vomito, abuso di lassativi)

## Potassio

### Implicazioni cliniche

#### Ipokaliemia:

- diminuzione dell'apporto dietetico del catione
- perdite nelle urine (iperaldosteronismo, diuretici, diuresi osmotiche, alcalosi)
- nelle secrezioni del tratto gastrointestinale (vomito, dissenteria, fistole, adenoma villosa dell'intestino crasso)

#### Terapia

Somministrazione di potassio p.o. o e.v.

#### Iperkaliemia

- massiccia distruzione tissutale
  - insufficienza renale e quindi insufficiente capacità di escrezione di  $K^+$
- Terapie:** 1. consiste nel deviare il catione dal compartimento extracell. a quello intracel.: infusione di glucosio e insulina,  $Na^+$ ,  $HCO_3^-$  o  $\beta$ -agonisti (sequestro intracel. di  $K^+$ )
2. Diuretici, resine a scambio ionico (nell'intestino) che legano il  $K$ , o procedure dialitiche
3. Somministrazione e.v. calcio, che antagonizza gli effetti del  $K$  sull'eccitabilità cardiaca

**Sintomi** dell'ipokaliemia e dell'iperkaliemia sono a carico del SNC, della muscolatura scheletrica, cardiaca e liscia. Possono mettere in pericolo la vita del paziente

# INSUFFICIENZA RENALE ACUTA (IRA)

E' CARATTERIZZATA: **OLIGURIA (<500 ML/24H), RAPIDO AUMENTO AZOTEMIA, AUMENTO RELATIVO PROTEINURIA**

LE ALTERAZIONI DELLE FUNZIONI RENALI POSSONO ESSERE DETERMINATE DA CAUSE D'ORIGINE:

**PRE-RENALE (O FUNZIONALE):** IPOPERFUSIONE

**INTRA-RENALE:** MALATTIE CHE COMPROMETTONO LA FILTRAZIONE GLOMERULARE, LA FUNZIONE TUBULARE, O DANNI AL SISTEMA CIRCOLATORIO INTRARENALE

**POST-RENALE:** CONSEGUENTE AD UN OSTACOLO MECCANICO DEL FLUSSO RENALE PER OSTRUZIONE DELLE VIE URINARIE

## IRA PRE-RENALE

**IPOVOLEMIA:** EMORRAGIE

**CONTRAZIONE DEL VOLUME EXTRACELLULARE (PERDITE):** VOMITO, DIARREA, USTIONI, SUDORAZIONE PROFUSA, ABUSO DI DIURETICI, DIURESIS OSMOTICA

**RIDOTTA GITTATA CARDIACA:** IMA, VALVULOPATIE, ARITMIE, INSUFFICIENZA CARDIACA SCOMPENSATA, TAMPONAMENTO PERICARDICO

**CAUSE EMODINAMICHE:** SHOCK, SEPSI, INSUF. CORTICOSURRENALICA

## IRA INTRA-RENALE

### 1. ORIGINE TUBULARE (CIRCA IL 75%) NECROSI TUBULARE ACUTA

**A) POST-ISCHEMICA:** IPOSSIA                      CONSUMO DI ATP                      NECROSI CELLULARE

DA UN PUNTO DI VISTA FUNZIONALE SI VERIFICA:

- A) OSTRUZIONE DEL LUME TUBULARE AD OPERA DI DETRITI NECROTICI
- B) RETRODIFFUSIONE DELLA PREURINA DAL LUME ALL'INTERSTIZIO
- C) ATTIVAZIONE DEL FEED-BACK TUBULO-GLOMERULARE

### 1. ORIGINE TUBULARE (CIRCA IL 75%) NECROSI TUBULARE ACUTA

**B) NEFROTOSSICA:** DOVUTA AD AZIONE LESIVA DIRETTA SULLE CELLULE DELL'EPITELIO TUBULARE. PRINCIPALI AGENTI RESPONSABILI:

ANTIBIOTICI AMINOGlicosidici, SPESSO DETERMINANO FORME NON OLIGURICHE IN QUANTO RENDONO I TUBULI INSENSIBILI ALL'ADH

FARMACI IMMUNOSOPPRESSIVI (CsA e FK506)

### 2. ORIGINE GLOMERULARE

#### A) GLOMERULONEFRITI ACUTE PRIMITIVE:

INFILTRAZIONE LEUCOCITARIA E PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE

GLOMERULARI CHE CAUSANO L'OSTRUZIONE DEI CAPILLARI GLOMERULARI

- GN POST-INFETTIVA, GN MEMBRANO-PROLIFERATIVA,
- GN RAPIDAMENTE PROGRESSIVA IDIOPATICA
- PORPORA DI SCHONLEIN-HENOCH, S. UREMICO-EMOLITICA

#### B) GLOMERULONEFRITI SECONDARIE:

- GN IN CORSO DI COLLAGENOPATIE (ES. LES, SCLERODERMIA)
- GN IN CORSO DI CRIOGLOBULINEMIA



# IRA POST-RENALE

## OSTRUZIONE INTRARENALE:

- **DA CRISTALLI: URATI** (FREQUENTEMENTE NEI PZ CON MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE SOTTOPOSTI A CHEMIOTERAPIA)  
OSSALATI
- **DA PROTEINE: CATENE LEGGERE**  
MIOGLOBINA  
EMOGLOBINA

## OSTRUZIONE EXTRARENALE:

- **URETERALE: NEOPLASIE, CALCOLOSI BILATERALE, COAGULI, FIBROSI RETROPERITONEALE, PAPPILLE NECROTICHE, ADERENZE**
- **VESCICALE: CALCOLI, COAGULI, NEOPLASIE, IPERTROFIA PROSTATICA, VESCICA NEUROGENA**
- **URETRALE: STENOSI, FIMOSI**

## SEGNI E SINTOMI DELL'IRA

- **DISTURBI GASTROINTESTINALI:** NAUSEA, VOMITO DIARREA
- **RITENZIONE IDRO-SALINA:** IPERTENSIONE ED EDEMI, EDEMA POLMONARE ACUTO
- **IPERPOTASSIEMIA (50% DEI CASI):**
  - DA RIDOTTA ELIMINAZIONE
  - DA AUMENTATA PRODUZIONE (IPERCATABOLISMO, EMOLISI)
  - JATROGENA (DIETA, INFUSIONI, SANGUE CONSERVATO)
  - DA ACIDOSI METABOLICA
- **ARITMIE DA IPERPOTASSIEMIA**
- **ACIDOSI METABOLICA** CON CONSEGUENTI ALTERAZIONI RESPIRATORIE E GASTROINTESTINALI, IPERPOTASSIEMIA
- **IPERFOSFOREMIA ED IPOCALCEMIA:** DA RIDOTTA ELIMINAZIONE RENALE DI FOSFATI.
- **IPERCATABOLISMO**
- **RIDOTTA ELIMINAZIONE DI ACIDO URICO**
- **ANOMALIE DELLA COAGULAZIONE:** DA INTERFERENZA DEI CATABOLITI AZOTATI CON LA FUNZIONE PIASTRINICA
- **SINTOMI NEUROLOGICI.** LETARGIA, SONNOLENZA, CONFUSIONE, AGITAZIONE....

## INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

### SEDIMENTO URINE

#### Pre-renale

Sedimento privo di cellule  
Presenza di cilindri ialini

#### Intra-renale

##### Necrosi tubulare acuta

Cilindri granulosi pigmentati  
Cilindri cell. epiteliali (20-30%)  
Microematuria  
Proteinuria <3gr/24 ore

##### Danno glomerulare

Cilindri eritrocitari  
proteinuria >3 gr/24

##### Nefrite glomerulare - interstiziale

Cilindri granulosi

Cilindri leucocitari

##### Danno cronico interstiziale

Larghi cilindri granulosi

#### Post-renale

Sedimento privo di cellule o piuria e/o ematuria

# L'ESAME DELLE URINE

## RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Le urine sono chimicamente e fisicamente molto labili; per questo è **necessario esaminare il campione entro 30 minuti** (e comunque entro un massimo di 2 ore) **dalla minzione**.

**La refrigerazione** permette di mantenere inalterate solo alcune caratteristiche del campione, ma comunque bisogna riportare a temperatura ambiente (37°C) il campione prima di analizzarlo → con il passare dei minuti cambiano molti aspetti nelle urine: il colore (a causa delle modifiche delle diverse sostanze cromogene), l'aspetto (in seguito a moltiplicazione batterica e precipitazione di cristalli), l'odore (in seguito a decomposizione di sostanze), il PH (alcalinizzazione dovuta all'azione dell'enzima batterico ureasi), i corpi chetonici (che sono molto volatili e diminuiscono rapidamente), il sedimento urinario (trasformato significativamente con il tempo).

### ⌚ RACCOLTA PER L'ESAME ROUTINARIO

E' preferibile un campione concentrato, cioè quello del primo mattino. Bisogna accuratamente evitare, nelle donne, la contaminazione con il sangue mestruale quando presente, e secreto vaginale.

### ⌚ RACCOLTA PER ESAMI QUANTITATIVI

Serve per valutare l'escrezione di metaboliti, ormoni o metalli. In questo caso la raccolta delle 24 ore è più adeguata allo scopo; durante la raccolta è opportuno evitare iperidratazione e vanno sospesi alcol e farmaci

### ⌚ RACCOLTA PER ESAME BATTERIOLOGICO

Bisogna raccogliere un campione che sia assolutamente non contaminato: si raccoglie il campione a metà del flusso menzionale dopo accurata pulizia del glande ♂ o del meato uretrale ♀ con soluzione antisettica. Può essere effettuata anche la puntura sovrapubica per la raccolta del campione.

L'esame delle urine si suddivide in tre momenti:

l'esame fisico

l'esame chimico

l'esame del sedimento urinario

## ESAME FISICO DELLE URINE

### 1. VOLUME

L'adeguatezza del volume è valutabile solo nel caso di raccolta delle 24 ore. Nella raccolta per l'esame routinario, un volume di 15-20 ml è sufficiente per eseguire le analisi necessarie.

#### VOLUME NORMALE (ml NELLE 24 ORE)

neonato	30-60
3-10 gg	100-300
10-60 gg	250-450
2 m- 1 a	400-500
1-3 a	500-600
3-5 a	600-700
5-8n a	650- 1000
8-14 a	800- 1400
adulti	600-1600
anziani	250-2400

**POLIURIA** (>2500 ml/24h) *La poliuria legata ad aumento di BUN e creatinina* può indicare chetoacidosi diabetica, parziale ostruzione del tratto urinario o necrosi tubulare acuta (IRA), in cui i reni perdono gradualmente la capacità di concentrare le urine. *La poliuria senza aumento di BUN e creatinina* può indicare diabete insipido e stati neurotici.

**OLIGURIA** (<500 ml/24h): disidratazione, IRA, shock, ipotensione, GN, ostruzioni ecc.

**ANURIA** (<100 ml/24h): ostruzione completa vie urinarie, shock, ipotensione, ischemia renale (GN, IRA)

## 2. COLORE

Il colore normale delle urine è il giallo paglierino, dato da **tre pigmenti**: l'urocromo, la cui concentrazione è considerata proporzionale al metabolismo basale, l'urocetrina e l'urobilina. Naturalmente il colore è proporzionale alla **diuresi**, quindi all'idratazione del soggetto.

Il colore va osservato sempre nelle urine fresche e dopo qualche tempo; le urine infatti tendono a scurire.

Un colorito **rosso** deve far sospettare ematuria.

Un viraggio consistente verso il **marrone** deve far sospettare la presenza di metaemoglobina, mentre un viraggio verso il **rosso-viola** deve far pensare alla presenza di porfirine.

Una colorazione **giallo-arancio** deve far pensare alla presenza di urobilina, mentre un colorito **giallo-verde** deve far ipotizzare la presenza di bilirubina.

**Molti farmaci** possono inoltre dare alle urine colori caratteristici....



Varie gradazioni di giallo	normale	
Giallo pallido	urina diluita	diabete mellito; diabete insipido; difetti capacità di concentrazione,
Ambra: giallo scuro + rosso	urina concentrata	febbre; sedimento laterizio
Arancio + rosso o + marrone	urobilina	
Arancio vivo	farmaci azoici	
Rosso	sangue o pigmenti ematici	
	Urati	
	Farmaci	levodopa, metildopa, antrachinonici
Rosso torbido	emazie	ematuria
Rosso scuro - marrone	mioglobina	
Rosso porpora	porfirine	porfiria
Marrone + giallo o + verde	bilirubina	ittero, epatopatie
Marrone - nero	melanina	Melanoma
	Ac omogentisico	Alcaptonuria
	fenolo	Int. fenolo

## 3. SCHIUMA

E' sempre importante **agitare il campione** delle urine per valutare la sua capacità di produrre schiuma.

SCHIUMA NORMALE	Piccola quantità	Normale
SCHIUMA ANORMALE	Bianca, abbondante	Proteine
	Giallo-verde, abbondante	Bilirubina

## 4. ASPETTO (TORBIDITA')

L'aspetto normale delle urine è **limpido**. Le quattro principali cause di un cambiamento di torbidità sono la presenza di cristalli, cellule, muco o batteri.

I **cristalli** possono essere fosfati, carbonati e sali d'ammonio (che precipitano in urine alcaline) o urati (che precipitano in urine acide).

Le **cellule** più frequenti sono leucociti ed emazie; più rari sono gli spermatozoi e le cellule epiteliali.

Una notevole quantità di **microrganismi** provoca una maggiore torbidità nelle urine.

La classificazione del grado di torbidità è la cosiddetta **classificazione di Schweizer**

Limpido	non sono presenti particelle visibili
Lievemente torbido (hazy)	Visibili alcune particelle; guardando un giornale attraverso il recipiente le lettere non sono Oscurate o distorte
Mediamente torbido (cloudy)	guardando un giornale attraverso il recipiente le lettere sono leggibili ma sfocate o distorte
Torbido	guardando un giornale attraverso il recipiente le lettere non sono visibili



Il **test di Schweizer**, che valuta la torbidità, si esegue antepo- nendo la provetta a un testo stampato e confrontando il risultato con la tabella di classificazione.

## 5. ODORE

L'odore normale delle urine è caratteristico, aromatico. La presenza di odore **ammoniacale, fetido o putrefattivo** indica che il campione è stato mal conservato; quando però tale odore è presente nelle urine appena emesse, si deve pensare a un'infezione delle vie urinarie. Un odore **dolce e fruttato** indica la presenza di chetoni, mentre odori di **zucchero d'orzo, piedi sudati, cavoli o luppolo** indicano la presenza di acidi organici.

# ESAME CHIMICO DELLE URINE

L'esame chimico delle urine viene oggi svolto in pochi minuti grazie all'invenzione delle **STRIP MULTIFUNZIONALI**, che permettono di misurare quantitativamente o semiquantitativamente una serie di parametri. La tecnica di esecuzione è semplice: si immerge la strip nel campione di urine, si lascia gocciolare l'eccesso di urina e si legge quindi il risultato rispetto alla scala cromatica standard.



## 1. PESO SPECIFICO

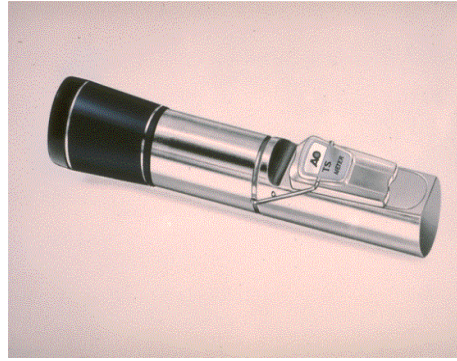
Il peso specifico o densità ha un grande valore diagnostico. Questo è dovuto alla presenza di circa 60-70 grammi di sostanze solide (soprattutto **urea e HCl**) eliminate nelle 24 ore.

Per la sua misurazione è generalmente usato il **densimetro a immersione**, un apparecchio di vetro dotato di uno stelo graduato in millesimi, di un corpo dotato del peso di taratura, e di un termometro. Si immerge l'apparecchio in un cilindro contenente urina e si misura sullo stelo graduato il punto di galleggiamento, che, corretto per la temperatura, indica il peso specifico delle urine. Uno strumento ancor più preciso è il **rifrattometro**, che misura l'indice di rifrazione del liquido (dall'indice di rifrazione si risale al PS urinario. Attualmente la misura del PS viene fatta con le stick multifunzionali.

**RANGE DI VARIAZIONE FISIOLÓGICA = 1,003 - 1,035**



Densimetro



Rifrattometro

Una diminuzione del PS può osservarsi in iperidratazione, in nefropatie, in malattie extrarenali come il diabete insipido. ↓

Un aumento del PS può osservarsi in ipoidratazione o iperalimentazione, in nefropatie, in malattie extrarenali come il diabete mellito, vomito e diarrea profusi. ↑

## 2. PH

L'acidità urinaria è espressione di una delle più importanti funzioni del rene, e cioè la regolazione dell'equilibrio acido-base. Il valore del PH urinario può comunque variare da **4,6 a 8**, ed è fortemente influenzato da molti fattori...

<p style="text-align: center;"><b>Fattori fisiologici che diminuiscono il PH</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Digiuno</li> <li>-Dieta carnea</li> <li>-Intenso esercizio</li> <li>-Ritenzione CO<sub>2</sub> notturna (per depressione del centro respiratorio)</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Fattori fisiologici che aumentano il PH</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Alcalosi post-prandiale</li> <li>-Dieta vegetariana</li> <li>-Aumento ventilazione polmonare</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Fattori patologici che diminuiscono il PH</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Acidosi metabolica</li> <li>-Acidosi respiratoria</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Fattori patologici che aumentano il PH</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Alcalosi metabolica</li> <li>-Alcalosi respiratoria</li> <li>-Batteri nelle urine che scindono l'urea in CO<sub>2</sub> e ione ammonio</li> </ul>

## 3. PROTEINE URINARIE

150 mg/24 h...

- 1/3 albumina (filtra nella membrana di filtrazione in piccole quantità)
- 1/3 glicoproteina di Tamm-Horsfall (secreta dai tubuli renali)
- 1/3 globuline a basso peso molecolare (IgG, IgA, microglobulina, proteine originate da leucociti e cellule epiteliali)

Con i test su striscia si osserva una positività per una concentrazione proteica **superiore a 10mg/dl**. Questo può avvenire in caso di scarsa idratazione o di prolungato esercizio fisico, ma al di fuori di questi casi la proteinuria, confermata dal dosaggio nelle 24 ore, **è sempre un segno di patologia**.



Possono comunque esserci, nei test su strip e nel metodo dell'acido solfosalicilico, **falsi positivi e falsi negativi...**

<b>TEST SU STRIP</b>	<b>METODO ACIDO SOLFOSALICILICO</b>
<i>Sensibilità diversa per le diverse proteine</i>	<i>Non differenzia le varie proteine</i>
<b>FALSI POSITIVI:</b> urine alcaline, uso di disinfettanti, lunga esposizione dello stick alle urine	<b>FALSI POSITIVI:</b> urine non limpide, mezzi di contrasto, farmaci
<b>FALSI NEGATIVI:</b> proteine diverse dalle albumine	<b>FALSI NEGATIVI:</b> urine fortemente alcaline

Sono **diversi i quadri di proteinuria**, sia a livello quantitativo che a livello qualitativo.

### QUADRI QUANTITATIVI

- Transitoria e intermittente:** non è un quadro patologico.
- Funzionale** (200-500 mg/24h): esercizio fisico, basse temperature, febbre, disidratazione.
- Ortostatica** (< 1000 mg/24h): iperlordosi con lievi disturbi vascolari renali. Si diagnostica facilmente valutando la proteinuria nelle ore notturne e in un campione raccolto dopo 2 ore di stazione eretta e deambulazione.
- Minima** (< 1000 mg/24h): si osserva in molte malattie renali (nefriti croniche e tubulopatie).
- Moderata** (1000-4000 mg/24h): si osserva in nefropatie acute e tossiche.
- Grave** (> 4000 mg/24h): si osserva in nefropatie glomerulari e tubulopatie gravi, nel rigetto del trapianto renale e in caso di insufficienza cardiaca congestizia.

### QUADRI QUALITATIVI

**Quadro glomerulare:** dipende dall'entità del danno glomerulare → maggiori sono i danni alla barriera di filtrazione, maggiore sarà il PM delle proteine filtrate (albumina, pre-albumina, beta-2-macroglobulina, globuline ecc.).

**Quadro tubulare:** danno tubulare → escrezione e/o non riassorbimento di Ig, lisozima, A1-macroglobulina, A2-macroglobulina.

**Proteinuria da iperafflusso (prerenale):** è un quadro legato a un aumento di concentrazione di proteine nel sangue (es. emoglobina in caso di emolisi intravascolare, mioglobina in caso di necrosi muscolare, proteina di Bence-Jones nel mieloma multiplo ecc.).

## 4. GLUCIDI

Prima si usava il test di Benedict per le sostanze riducenti, ma non era specifico per i vari zuccheri. Ora si usa la STRIP, o meglio la reazione “glucosio ossidasi/perossidasi” sulla strip, specifica solo per il glucosio.

<b>GLUCOSIO</b>	
<b>Obiettivo e rationale del test:</b> valutazione indiretta dello stato glicemico in pazienti affetti da diabete mellito attraverso il dosaggio del glucosio che, superata la soglia renale viene escreto con le urine.	
<b>Sensibilità:</b> 75-125 mg/dl	
<b>Falsi positivi:</b> contaminazione con ossidanti (ipoclorito ecc:) o formalina cattiva conservazione (esposizione all'aria) delle strip	
<b>Falsi negativi:</b> aumentate concentrazioni urinarie(> 500 mg/L) di ac Ascorbico corpi chetonici > 40 mg/dl campioni refrigerati	
<b>SOSTANZE RIDUCENTI URINARIE (Benedict)</b>	
<b>Obiettivo e rationale del test:</b> Valutazione di tutti gli zuccheri e altre sostanze riducenti presenti nelle urine	
<b>Sensibilità:</b> >250 mg/dl di zucchero	
<b>Falsi positivi:</b> acido ascorbico, ac nalidixico, cefalosporine, probenecid	
<b>Falsi negativi:</b> errori esecuzione (agitare la provette)	

sostanza	glucosio ossidasi	test di benedict
glucosio	positivo	positivo
<b>ALTRI ZUCCHERI</b>		
galattosio	negativo	positivo
fruttosio	negativo	positivo
lattosio	negativo	positivo
pentosio	negativo	positivo
saccarosio	negativo	positivo
<b>METABOLITI DIVERSI</b>		
acido urico	negativo	positivo
creatinina	negativo	positivo
acido omogentisico	negativo	positivo
<b>FARMACI</b>		
acido ascorbico	negativo	debolmente positivo
levo dopa	falso negativo	negativo
salicilato	riduce risposta positiva	negativo
acido nalidixico	negativo	positivo
probenecid	negativo	positivo
mezzi di contrasto (diatrizoati)	negativo	colore nero
penicillina	negativo	positivo
cloramfenicolo	negativo	positivo
acido p-aminosalicilico	negativo	positivo
streptomina	negativo	positivo
isoniazide	negativo	positivo
ossitetraciclina	negativo	positivo
fenotiazina	negativo	positivo
<b>CONTAMINANTI ESOGENI</b>		
ipoclorito	falso positivo	negativo
perossido di idrogeno	falso positivo	falso negativo
fluoruro di sodio	falso negativo	negativo

**GLICOSURIA:** il valore soglia per il riassorbimento del glucosio a livello del tubulo renale è di circa 180 mg/dl e, anche nei soggetti normali, il superamento di tale soglia comporta la comparsa del glucosio nelle urine. **Glicosuria si osserva:**

- In gravidanza (fisiologica)
- Diabete mellito
- Malattie endocrine
- Malattie metaboliche
- Malattie e tumori del SNC
- Patologie del tubulo renale
- Malattie varie (traumi, infarto miocardico, insufficienza epatica)
- Terapie con farmaci anticoncezionali e corticosteroidi

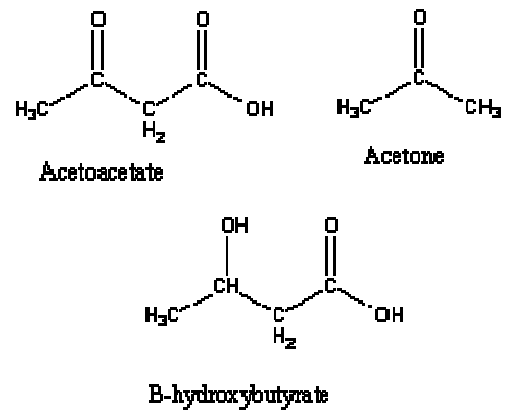
**ALTRE MELLITURIE:** altri disaccaridi e pentosi vengono normalmente escreti nelle urine (50mg/24 ore). Aumenti o diminuzioni possono osservarsi in malattie metaboliche o malattie dell'assorbimento intestinale.

**LATTOSIO:** spesso aumenta nei deficit di lattasi.

**GALATTOSIO:** aumenta fortemente nella galattosemia, rara patologia infantile in cui è bloccata la trasformazione del galattosio a glucosio 6-fosfato.

## 5. CORPI CHETONICI

1. ACIDO 3-IDROSSIBUTIRRICO	78%
2. ACIDO ACETOACETICO	20%
3. ACETONE	2%



<b>Obiettivo e razionale del test:</b> Valutazione dell'equilibrio metabolico nei pazienti diabetici per mezzo del dosaggio dei corpi chetonici (acido 3-idrossibutirrico:78%; acido acetoacetico 20%; acetone 2%)
<b>Sensibilità:</b> massima per l'acido acetoacetico: 5-10 mg/dl
<b>Falsi positivi :</b> campioni contenenti ftaleine o fenilchetoni
Levodopa
Composti con gruppi sulfidrilici (Mesna)
<b>Falsi negativi:</b> evaporazione dopo conversione ad acetone o diminuzione per fermentazione batterica

### *Nel bambino...*

La chetonuria è presente in una vasta gamma di situazioni, che vanno dall'aumento del catabolismo tessutale, a stati tossici e/o febbrili associati a vomito e diarrea, a uno scarso apporto di zuccheri.

### *Nell'adulto...*

Si deve ipotizzare chetoacidosi diabetica, soprattutto quando l'acido acetoacetico supera i 50 mg/dl (la soglia di normalità è 10mg/dl).

## 6. EMOGLOBINA E MIOGLOBINA

Emoglobina e mioglobina vengono misurate con STRIP in cui la carta è impregnata di tetrametilbenzidina, un cromogeno e un perossido organico. Il cromogeno, in presenza dell'anello dell'eme, vira dal giallo al verde-blu.



### **L'emoglobinuria va sempre correlata all'analisi di una eventuale ematuria.**

A livello tubulare l'emoglobina viene trasformata in emosiderina e ferritina, che continuano a essere presenti fino ad alcuni giorni dopo un'emolisi intravascolare. Per questo l'**emosiderina** è un segno certo dell'origine intravascolare dell'emoglobina.

**L'emolisi intravascolare** è sicuramente la causa principale di emoglobinuria, anche se esiste la possibilità di lisi dei globuli rossi risultanti da un'emorragia dell'apparato urinario. **Comunque la vera e propria emoglobinuria indica una emolisi intravascolare**, che può essere secondaria a diverse situazioni patologiche:

1. Cause infettive come malaria, bartonella e alcuni clostridi
2. Emoglobinopatie, carenza di G-6-PD
3. Malattie autoimmuni, porpora trombocitopenica, emoglobinuria parossistica notturna
4. Esercizio strenuo, protesi vascolari e valvolari

### **La mioglobinuria va correlata a distruzione di fibre muscolari.**

Cause possono essere traumi muscolari, sport violenti, ischemia muscolare massiccia, infarto miocardico esteso, gravi infezioni batteriche, farmaci, alcol, monossido di carbonio, punture di insetti e cause metaboliche.

## **Emazie, emoglobina e mioglobina**

### **1. Sensibilità del test:**

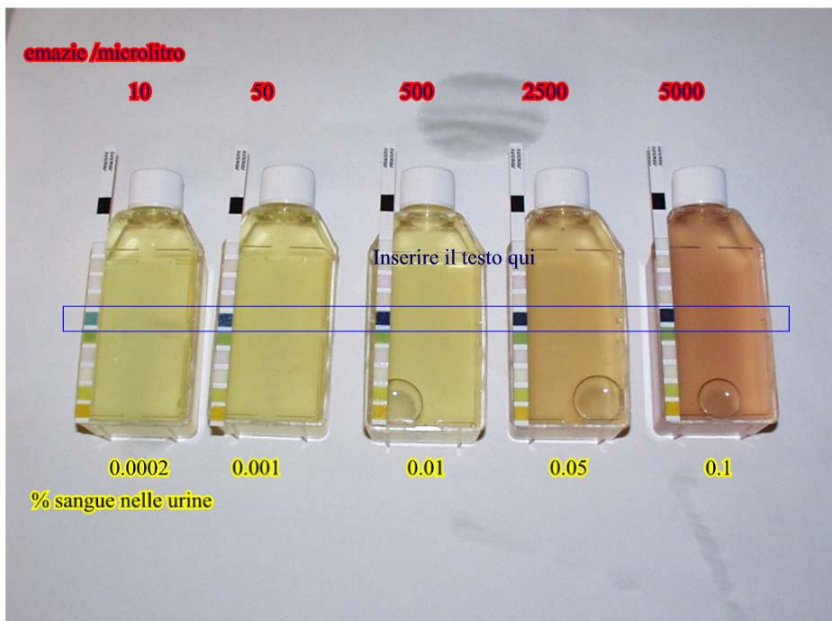
–5-20 emazie/ $\mu$ L ovvero 0.015- 0.062 mg/dL Hb

### **2. Falsi positivi:**

–contaminazione con ossidanti (ipoclorito ecc:)  
–Perossidasi microbica  
–Sangue da contaminazione mestruale

### **3. Falsi negativi:**

–somministrazione di farmaci riducenti: Vitamina C  
–Ridotta lisi delle emazie  
–Formalina come preservante  
–Trattamento con captopril



**Rapporto tra numero di emazie presenti in un campione di urine, colore, aspetto del campione e positività del test su strip.** Allo stesso campione sono state aggiunte quantità incrementali di sangue, dallo 0.0002% allo 0.1%, per una concentrazione di emazia per  $\mu$ L da 10 a 5000. Il rettangolo blu indica la parte delle strips dedicata al test per il sangue. Mentre alterazioni della torbidità sono presenti già con 500 emazie/ $\mu$ L, le alterazioni del colore sono evidenti solo a concentrazioni maggiori. Il test chimico dimostra invece una positività già per un numero di emazie pari a 10/ $\mu$ L.

## 7. BILIRUBINA E UROBILINOGENO

Questi dosaggi forniscono naturalmente un'informazione sulla funzionalità epatica.

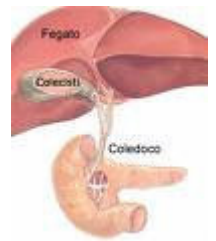
I meccanismi con cui bilirubina e urobilinogeno possono aumentare e comparire nelle urine sono 3:

- **Iperafflusso**: produzione per emolisi intravascolare di pigmenti biliari in quantità maggiore rispetto a quelli metabolizzati dal fegato (ittero pre-epatico o emolitico).
- **Danno epatocellulare** (ittero epatico).
- **Ostacolo al deflusso biliare** per cui la bile viene riassorbita dal fegato (ittero ostruttivo o post-epatico).

Nell'ittero pre-epatico aumenta sia la bilirubina indiretta (per l'emolisi), sia la bilirubina diretta (il fegato deve aumentarne la produzione per far fronte all'aumento dell'indiretta nell'emolisi). Questo provoca la comparsa di urobilinogeno nel sangue e in quantità maggiori nelle urine.

Nell'ittero epatocellulare possono essere alterati la capacità di glucuronazione della bilirubina, con aumento della bilirubina indiretta nel sangue, la capacità di trasportare la bilirubina coniugata (diretta), che quindi si accumula e aumenta nel sangue e nelle urine, o la capacità di riescrezione dell'urobilinogeno, con suo aumento nel sangue e nelle urine.

Nell'ittero ostruttivo si ha un reflusso della bilirubina diretta nel fegato e nel sangue e quindi nelle urine. In questo caso non si forma urobilinogeno, assente nel sangue e nelle urine.



### BILIRUBINA

<b>Obiettivo e razionale del test:</b> valutazione dell'iperbilirubinemia secondaria a emolisi o disfunzione epatica	
<b>Sensibilità:</b> 0.4-0.8 mg/dL	
<b>Falsi positivi:</b>	sostanze coloranti rosse Farmaci: fenotiazina, clorpromazina, fenazopirina Indacano (fermentazione batterica intestinale)
<b>Falsi negativi:</b>	ossidazione bilubina a biliverdina Ac ascorbico Nitriti aumentati

### UROBILINOGENO

<b>Obiettivo e razionale del test:</b> valutazione dell'iperbilirubinemia secondaria a emolisi o disfunzione epatica .Il test misura anche la concentrazione di porfobilinogeno	
<b>Sensibilità:</b> 0.2-0.4 mg/dL	
<b>Falsi positivi:</b>	tutte le sostanze positive alla reazione di Erlich: sulfamidici, PAS, Procaina, metildopa Coloranti azoici Notrofurantoina riboflavina ac paraminobenzoico
<b>Falsi negativi:</b>	ossidazione a urobilina Formalina Nitriti > 5 mg/dL

## 8. NITRITI



E' un dosaggio abbastanza affidabile per la diagnosi di **infezioni renali con batteriuria**, in particolare quelle da E.Coli, che è in grado di ridurre i nitrati a nitriti. Il test non è comunque altamente specifico e possono esserci numerosi falsi positivi dovuti a farmaci o a conversioni nitrato → nitrito in vitro.

## 9. ESTERASI LEUCOCITARIE

Sono enzimi presenti nei granulociti, e come l'emoglobina per le emazie, vanno correlati alla presenza nel sedimento di globuli bianchi. E' comunque un **buon test per determinare la presenza di leucociti nelle urine** (risultati positivi per un numero di leucociti superiore a 10/μl), ma dà anche falsi positivi in caso di batteriuria, ematuria o sostanze ossidanti.





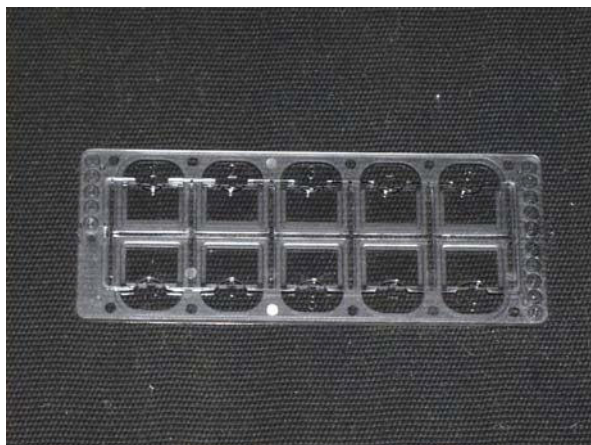
# ESAME DEL SEDIMENTO URINARIO

## RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Valgono le stesse regole generali elencate nella “raccolta e conservazione delle urine”.

## STANDARDIZZAZIONE

- Il volume di partenza deve essere di 12 ml
- La centrifugazione va fatta a 450g per 5 minuti.
- Attraverso una micropipetta si risospende una quantità standardizzata del precipitato in un volume standard.
- Si depone una goccia di urina (che diffonde per capillarità) nella camera di lettura.
- Si analizza al microscopio con ingrandimento crescente da 10x a 40x. Il microscopio può essere a sfondo luminoso o a contrasto di fase; in alcuni casi può essere opportuna una colorazione sopravitale per distinguere i vari elementi.



**Materiale necessario per eseguire l'esame del sedimento urinario.** Nella diapositiva superiore si vede una provetta graduata, una micropipetta per risospendere una quantità standardizzata del precipitato, una camera di lettura, che, in maggiore ingrandimento è riportata nella parte inferiore della figura. Una volta risospeso il precipitato in un volume standard, si depone una goccia di urina nella sede semicircolare del vetrino di lettura. L'urina per capillarità riempie tutta l'area di conteggio a volume standardizzato di forma quadrata. Il vetrino può accogliere 10 sedimenti minori diversi.

## *Valori di riferimento per il sedimento urinario*

Componente	Numero	Campo
Emazie	0-2	HPF
Leucociti	0-5	HPF
Cilindri ialini	0-2	LPF
Cellule epiteliali squamose	rare	LPF
Cellule epiteliali di transizione	poche	HPF
Cellule renali tubulari	rare	HPF
Batteri	assenti	HPF
Miceti	negativo	HPF
Cristalli anormali	assenti	LPF

## **ERITROCITI**

Normalmente sono presenti circa 10 eritrociti per  $\mu\text{l}$ . Bisogna valutare sia il numero che la morfologia degli eritrociti presenti.

### **NUMERO**

Gli eritrociti possono essere lievemente aumentati (microematuria) in diversi casi (fumo, esercizio fisico, microtraumi); la vera e propria ematuria ha numerose cause:

- **Malattie extrarenali** (ipertensione, infezioni, neoplasie, farmaci)
- **Malattie renali**
- **Malattie delle vie urinarie** (calcolosi, cistiti ecc.)

### **MORFOLOGIA**

Dipende molto dall'ambiente urinario in cui gli eritrociti vengono a contatto, cioè dalla tonicità delle urine: se le urine sono

**-isotoniche** con il plasma, l'eritrocita mantiene le sue caratteristiche

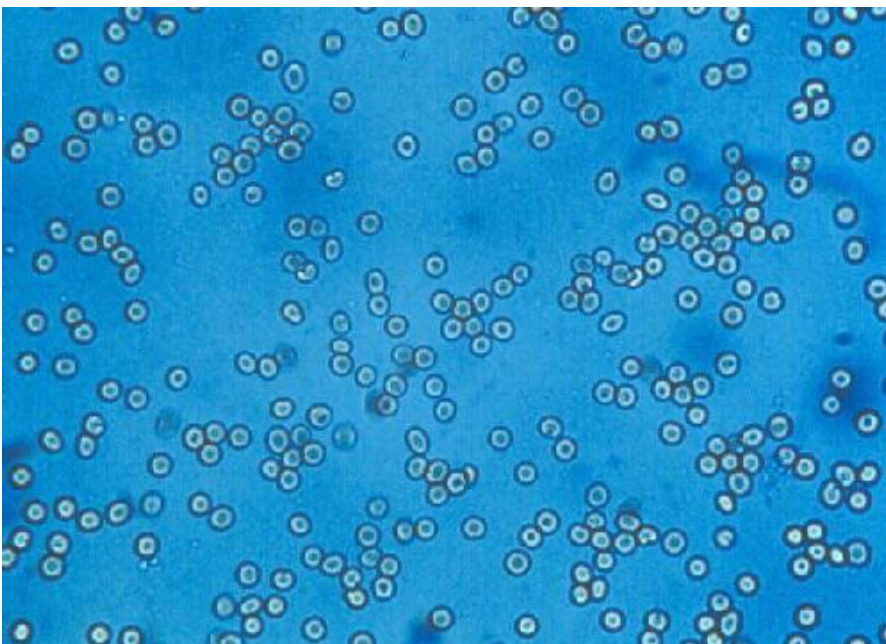
**-ipotoniche** rispetto al plasma, l'eritrocita si gonfia e si lisa (spesso si vedono le cosiddette "cellule fantasma"  $\rightarrow$  formate dalle sole membrane eritrocitarie)

**-ipertoniche** rispetto al plasma, l'eritrocita si raggrinzisce e assume aspetto "a spicole" (emazia crenata).

**Generalmente** un numero superiore di emazie dismorfiche indica una patologia renale, mentre una maggioranza di eritrociti non alterati morfologicamente indica un sanguinamento delle basse vie.



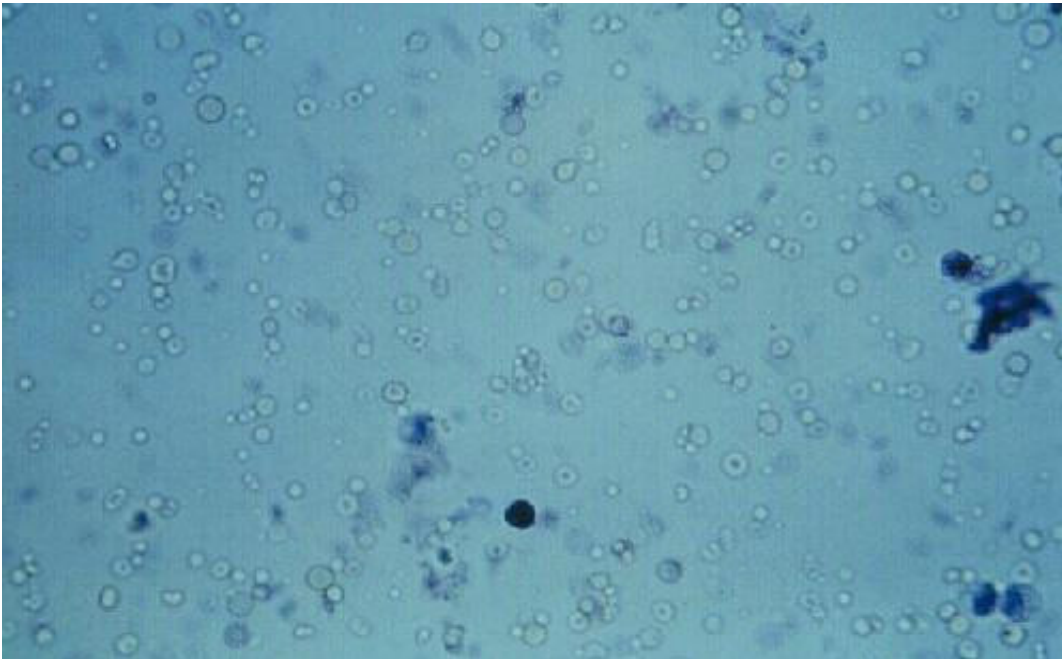
**EFFETTO DELL'OSMOLARITA' SULLA MORFOLOGIA DELLE EMAZIE**



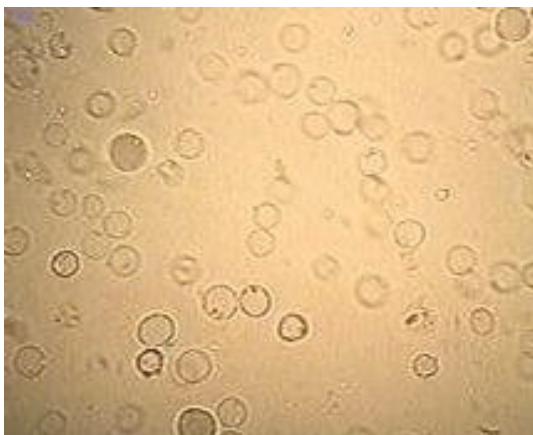
**EMATURIA ISOMORFICA**



**EMATURIA MISTA, CON EMAZIE ISOMORFICHE, DISMORFICHE E CRENATE**



**EMATURIA CON EMAZIE FORTEMENTE DISMORFICHE**



**EMATURIA MISTA CON GR DISMORFICI, RIGNOFIATI PER URINE IPOTONICHE**



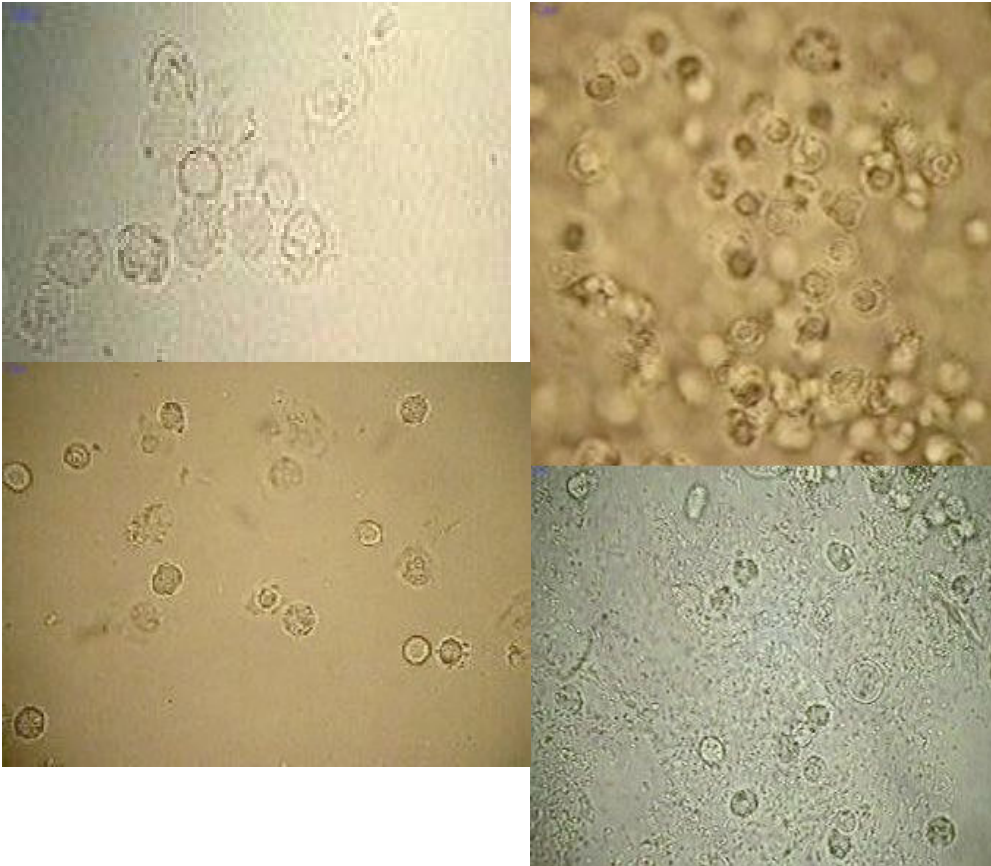
## LEUCOCITI

L'escrezione oraria normale di leucociti nell'uomo e nella donna è rispettivamente di 30.000 e 100.000. **Più di 20 leucociti per campo sono un segno patologico.**

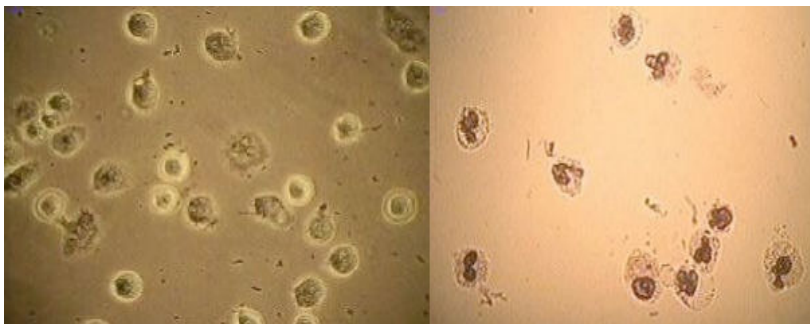
Leucocitaria si osserva nelle pielonefriti, nelle glomerulonefrite, nella TBC renale, nei tumori renali, vescicale e prostatici e nelle infezioni.

I più comuni elementi sono i **neutrofil**, che esistono in due forme, una "matura" (old), e una "recente", di maggiori dimensioni, con citoplasma granulato e animato da movimenti (glitter cells).

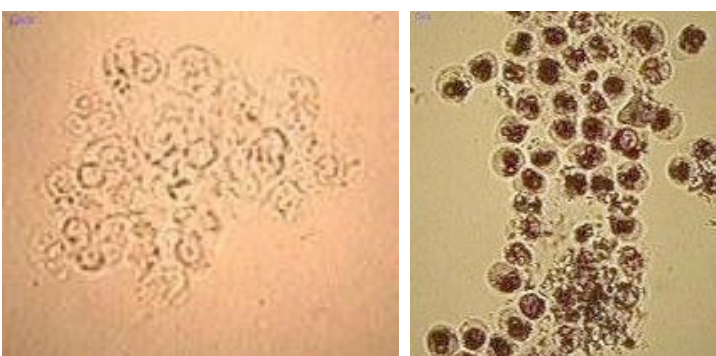
Il **pus** è formato invece da neutrofil in degenerazione che aderiscono tra loro.



LEUCOCITI A FRESCO



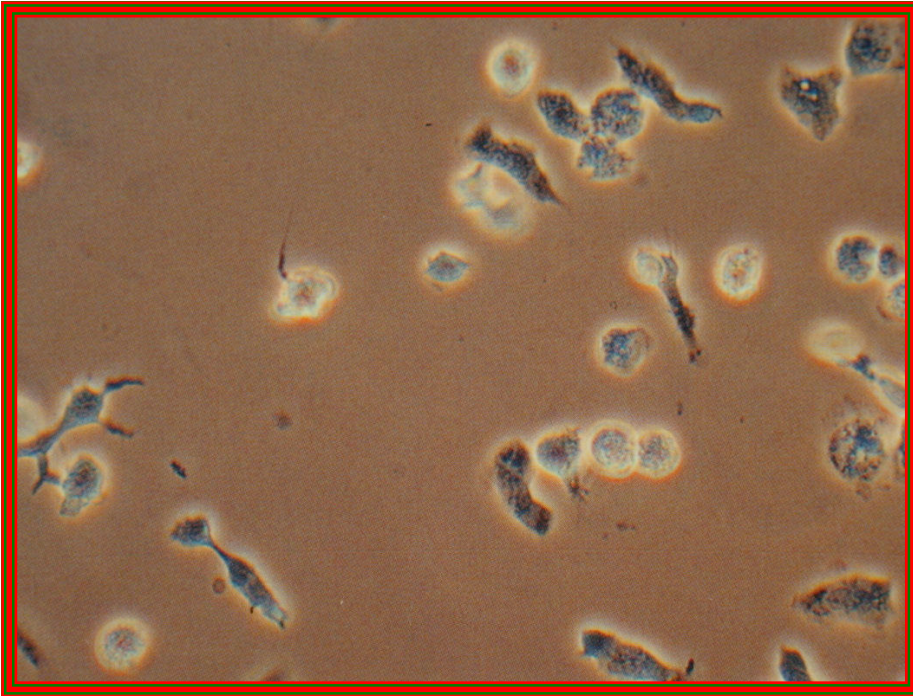
LEUCOCITI IN CONTRASTO DI FASE (SX) E COLORATI CON BLU DI TOLUIDINA (DX)



PUS A FRESCO (SX) E COLORATO CON BLU DI TOLUIDINA (DX)

## ISTIOCITI (MACROFAGI)

Possono comparire in infezioni, nella sindrome nefrosica, o in iperlipidemia.

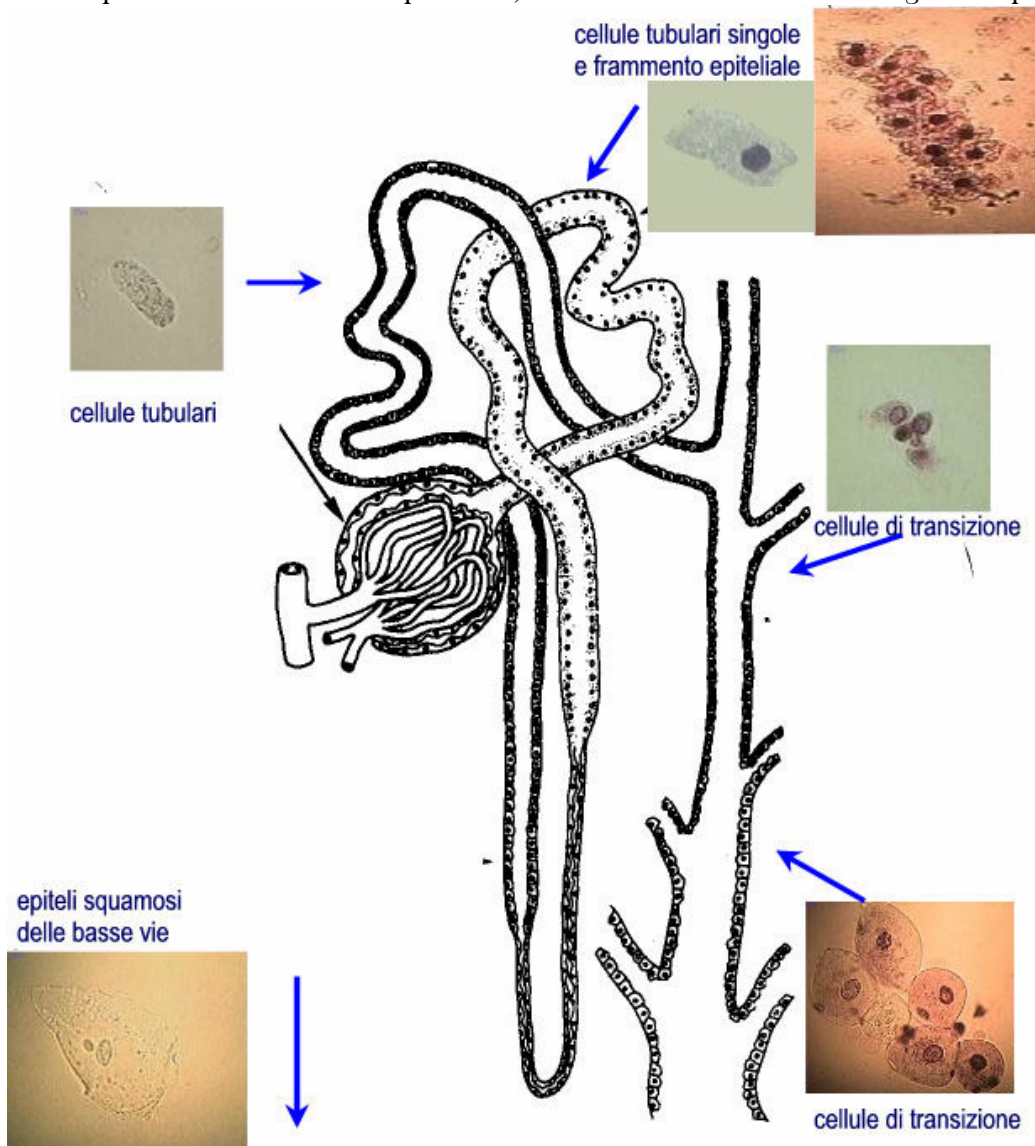


Possono contenere particelle ingerite (oval fat bodies)



## CELLULE EPITELIALI

Gli epitelii delle vie renali man mano che invecchiano si desquamano; l'operatore esperto sa distinguere il tipo di cellula e il distretto da cui proviene. Quando un fattore patogeno attacca il tessuto però oltre alle cellule superficiali, si troveranno anche cellule degli strati più profondi.



### CELLULE TUBULARI

Possono essere identificate cellule dei tubuli prossimali, distali e dotti collettori. Cellule provenienti dai **tubuli** sono frequenti nei casi di necrosi tubulare acuta o glomerulonefrite con danno tubulare associato. Cellule dei **dotti** sono frequenti in forme di nefrosclerosi, di necrosi tubulare o ischemia renale grave.

Le cellule dei tubuli sono **difficili da riconoscere a fresco** perché simili ai leucociti. La colorazione di **Papanicolau** (blu di toluidina) le rende meglio riconoscibili.

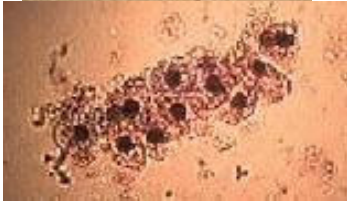
Una forma particolare di cellule tubulari renali sono i corpi ovali lipidici ("**oval fat bodies**"), che indicano inevitabilmente patologie gravi.



CELLULE DEL DOTTO COLLETTORE E ALCUNI LEUCOCITI



**CELLULE DEL DOTTO COLLETTORE**



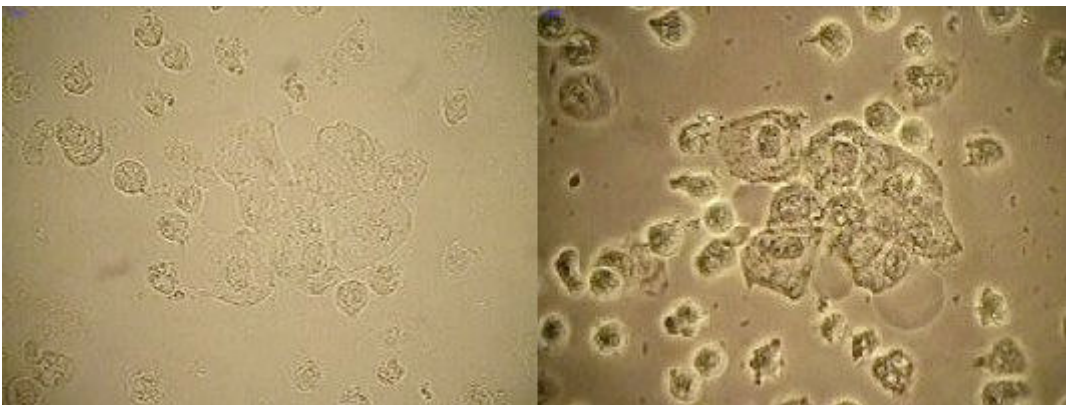
**FRAMMENTO DI EPITELIO TUBULARE**



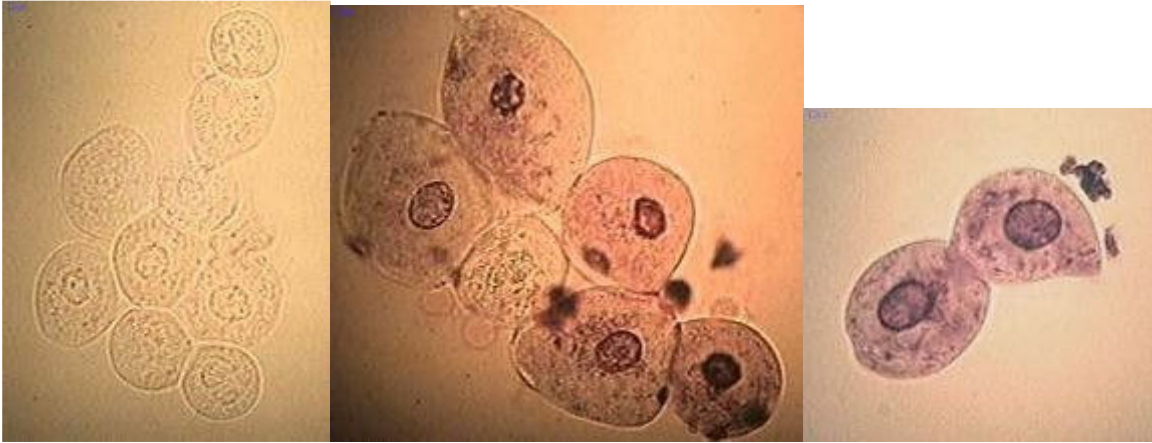
**CORPI OVALI LIPIDICI**

### **CELLULE DI TRANSIZIONE**

L'epitelio di transizione è un epitelio stratificato, in cui le cellule più profonde sono arrotondate e quelle più superficiali appiattite. Le dimensioni sono di 4-6 volte il GR



**CELLULE DI TRANSIZIONE IN FRAMMENTO DI TESSUTO, A DX IN CONTRASTO DI FASE**

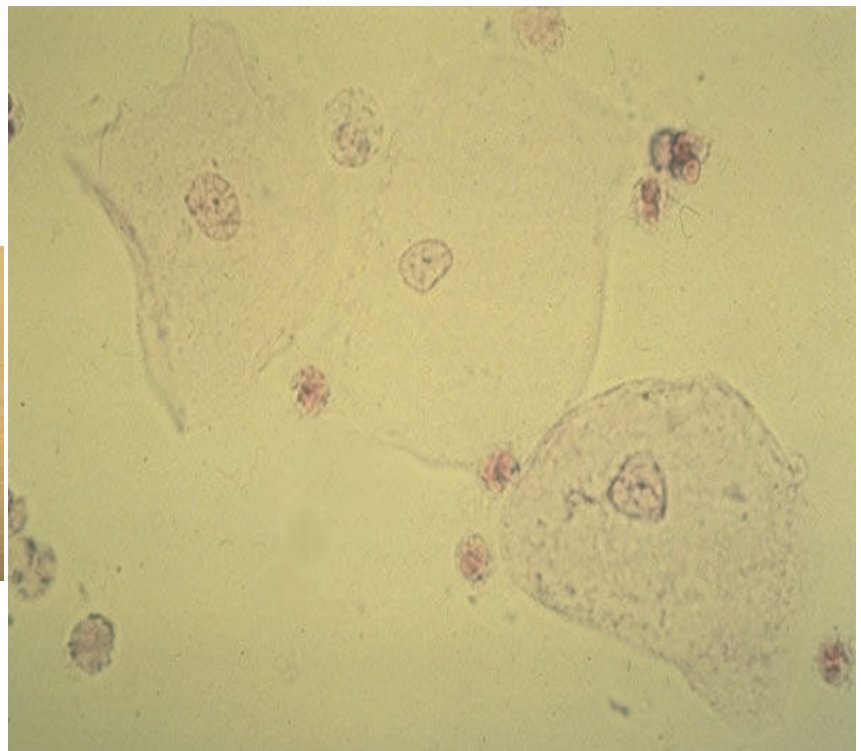


**CELLULE DI TRANSIZIONE IN FRAMMENTO DI TESSUTO, A SX A FRESCO, A DX IN BLU DI TOLUIDINA**

### **CELLULE EPITELIALI SQUAMOSE**

Sono frequenti e di **scarso significato clinico**. Sono cellule grandi con nucleo delle dimensioni di un GR, hanno forma poligonale, talvolta sono raggruppate. Originano **dal tratto distale dell'uretra e dell'epitelio vaginale**.

### **CELLULE EPITELIALI SQUAMOSE**

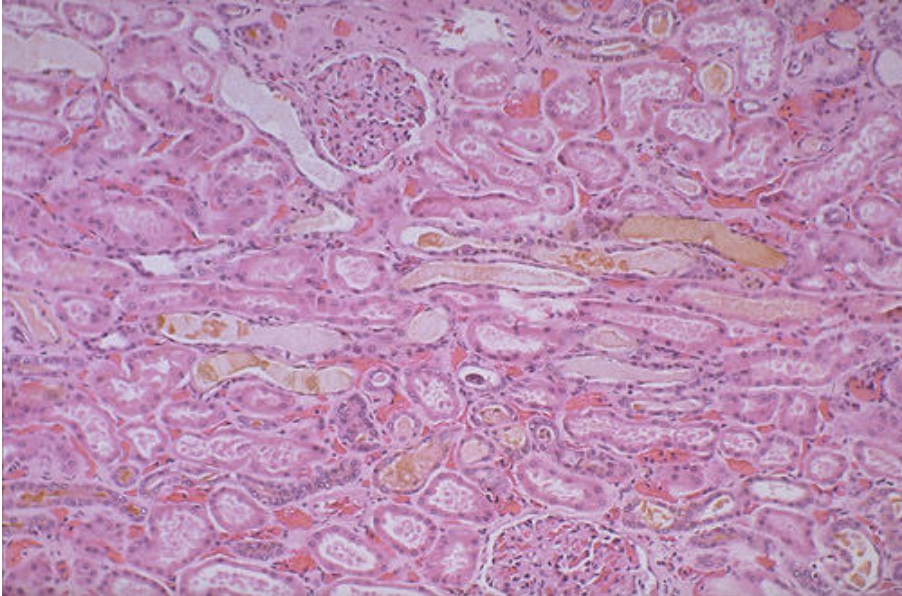




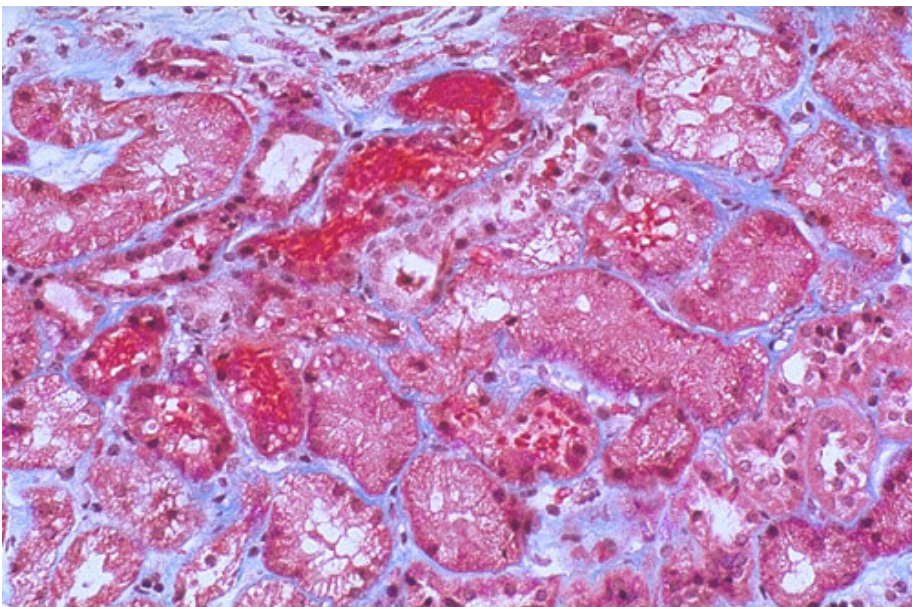
## CILINDRI

I cilindri si formano molto raramente nelle urine delle persone sane.

Essi si formano nei tubuli e nella loro formazione riveste una grande importanza la **proteina di Tamm-Horsfall** che, in condizioni patologiche quali la proteinuria o la stasi urinaria, provoca la formazione di una rete fibrillare che intrappola le cellule, i cristalli e i detriti nel lume; si ha in questo modo la formazione del **cilindro**, che quindi si stacca e va a finire nelle urine.



**PREPARATO ISTOLOGICO DI TESSUTO RENALE; SONO RICONOSCIBILI 2 ANSE GLOMERULARI. AL CENTRO SI OSSERVANO TUBULI RENALI RIGONFIATI E RIPIENI DI UNA SOSTANZA BIANCA (PROTEINE) CHE FORMERA' POI IL CILINDRO.**



**PREPARATO ISTOLOGICO DI TESSUTO RENALE; SI NOTA L'ACCUMULO DI GLOBULI ROSSI NEI TUBULI. IN QUESTO CASO SI FORMERANNO CILINDRI EMATICI**

### ***I DIVERSI TIPI DI CILINDRI***



#### **CILINDRI DI EMAZIE**

Si possono osservare nelle glomerulonefriti con ematuria e proteinuria.



#### **CILINDRI LEUCOCITARI**

Poiché i leucociti penetrano dall'interstizio nel lume, si avranno i cilindri leucocitari nelle pielonefriti interstiziali, ma anche nelle gravi nefropatie tubulari.



#### **CILINDRI IALINI**

Sono costituiti da proteine e sono quelli con significato diagnostico meno grave (compaiono in esercizio muscolare, febbre e in tutte le malattie renali).



### CILINDRI GRANULOSI

Compaiono nelle malattie glomerulari, tubulari e nelle pielonefriti interstiziali. I granuli sono formati da detriti di emazie o da cristalli.



### CILINDRI CEREI

Compaiono negli stadi più avanzati dell'insufficienza renale cronica.



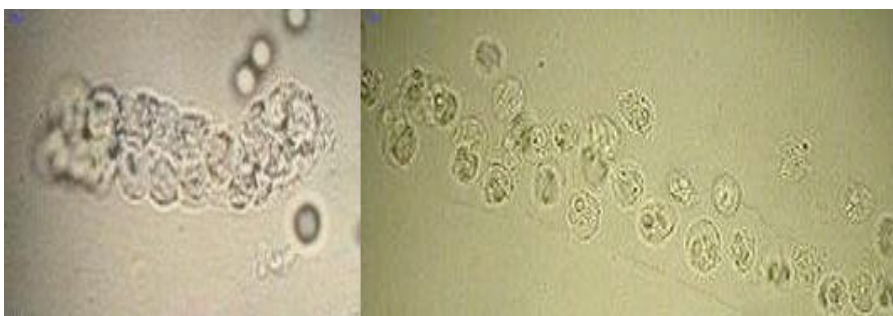
CILINDRI IALINI



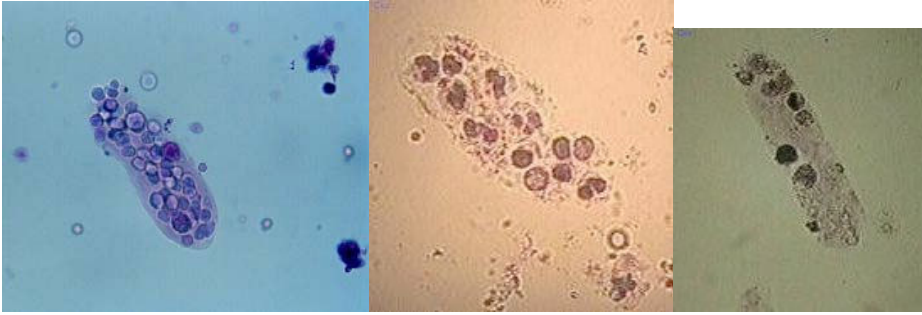
CILINDRI DI EMAZIE



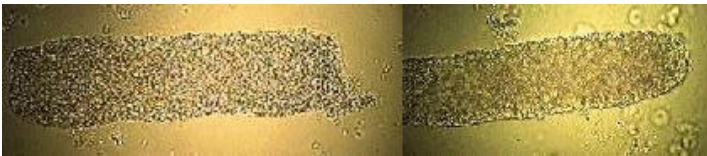
CILINDRI DI CELLULE TUBULARI



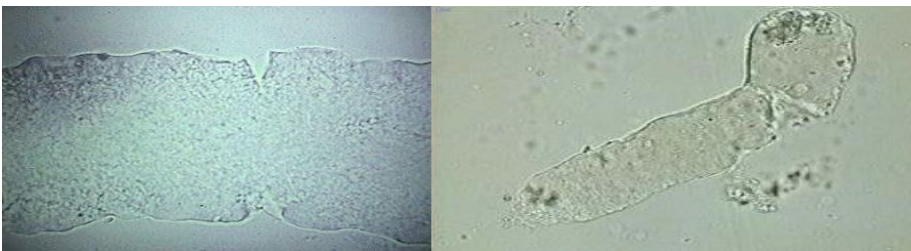




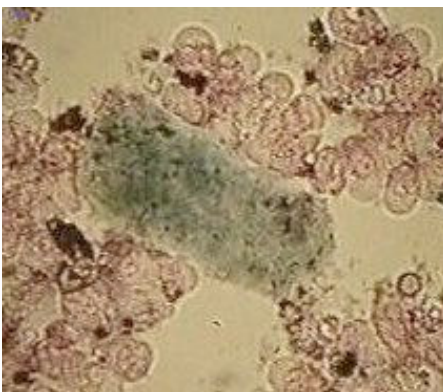
**CILINDRI LEUCOCITARI**



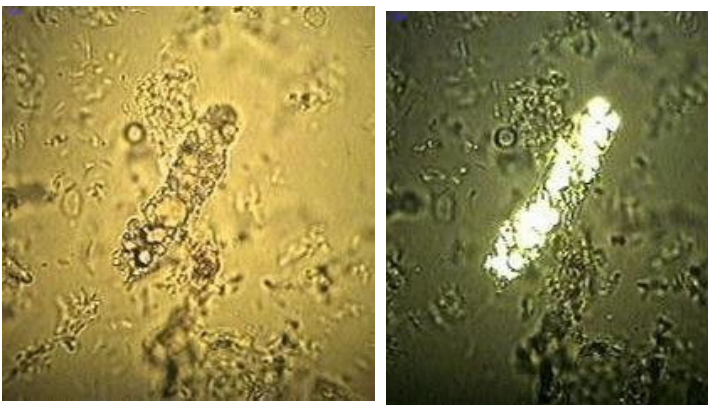
**CILINDRI GRANULOSI**



**CILINDRI CEREI**



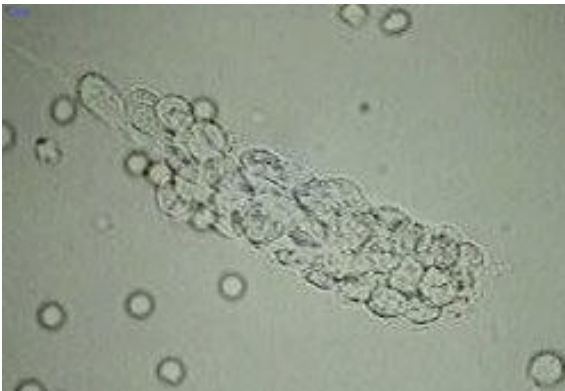
**CILINDRO BATTERICO**



**CILINDRO LIPIDICO**



**CILINDRO IALINO CON CRISTALLI**

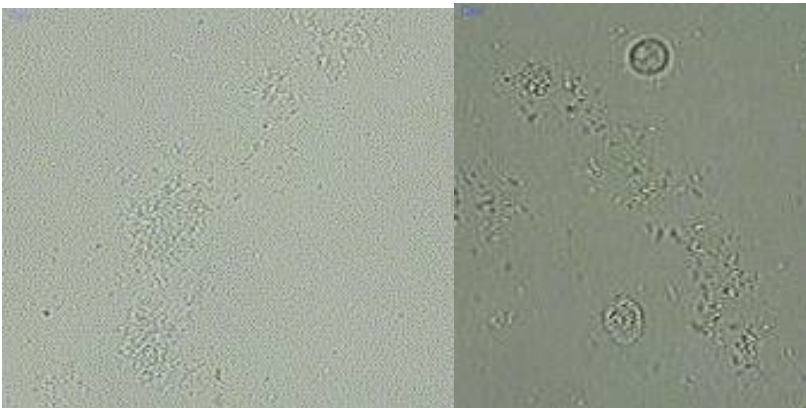


**PSEUDOCILINDRI**

### **BATTERI**

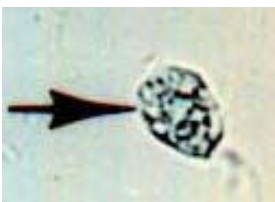
La batteriuria ha significato solo se riscontrata nell'urina fresca. Generalmente si colora con il Gram una quantità di urina non centrifugata. Per assumere pieno significato comunque questo reperto deve essere sostanziato da una coltura.

### **BATTERURIA**



### **FUNGI E PARASSITI**

Il fungo più frequente è Candida. Tra i parassiti possono ricercarsi Trichomonas, uova di Schistosomi e amebe.



**TRICHOMONAS VAGINALIS**

## CRISTALLI

Normalmente il significato clinico dei cristalli è abbastanza scarso, anche perché in molti casi si tratta di artefatti dovuti al cambiamento fisico-chimico delle urine.

La cristalluria inoltre, se abbondante, può essere un problema per la lettura delle cellule nel sedimento urinario.

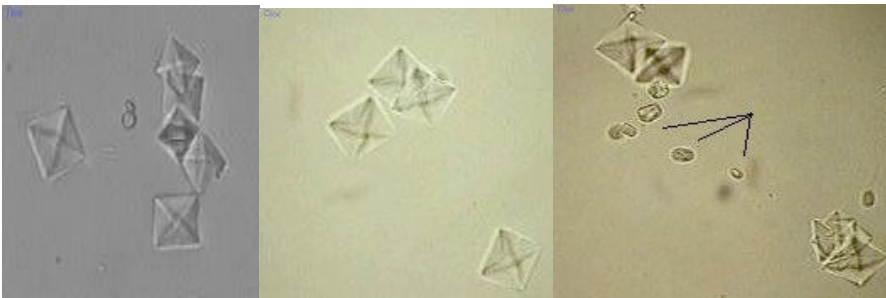
Il meccanismo della formazione di cristalli è basato sul superamento della soglia di solubilità (precipitazione), quindi la loro presenza è più frequente in urine altamente concentrate e ad alto PM.

E' frequente la comparsa di cristalli formati da metaboliti di farmaci, ma non mancano patologie (calcolosi, epatopatie e malattie metaboliche) associate alla comparsa di cristalli.

### ➤ CRISTALLI DI OSSALATO DI CALCIO

Sono normalmente presenti nelle urine acide. Hanno forma ottaedrica descritta come “a busta di lettera” (calcio diidrato). L'altra forma caratteristica è quella ovoidale (calcio monoidrato).

Hanno scarso significato clinico; possono esserci in seguito a ingestione di grosse quantità di acido ossalico (es. spinaci) o in seguito ad alte dosi di vitamina C.



**CRISTALLI DI OSSALATO DI CALCIO CON LA CARATTERISTICA FORMA A BUSTA DI LETTERA (LE FRECCE INDICANO LE FORME CON CALCIO MONOIDRATO, OVOIDALI)**

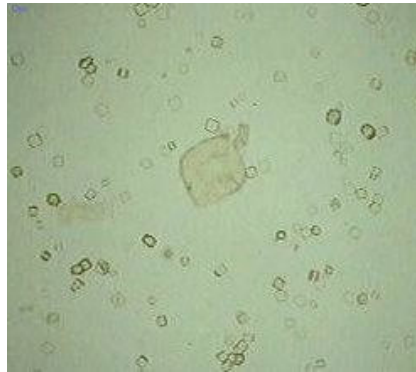
### ➤ CRISTALLI DI ACIDO URICO

Gli urati amorfi si presentano come una polvere giallastra senza aspetto cristallino, che tuttavia precipita formando il cosiddetto **sedimento laterizio**. Nelle forme cristalline gli urati sono invece piuttosto **polimorfi** (romboidali, a botte, prismatici, laminati ecc.). Sono notevolmente aumentati se aumenta l'escrezione di acido urico (e ciò avviene nella gotta, nelle leucemie, nelle neoplasie).

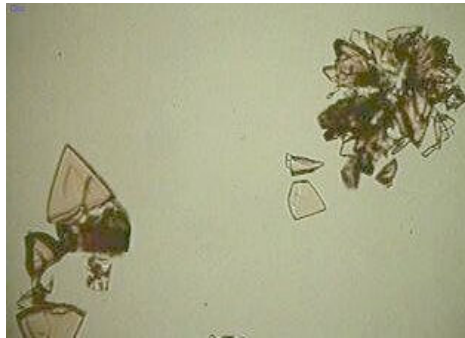
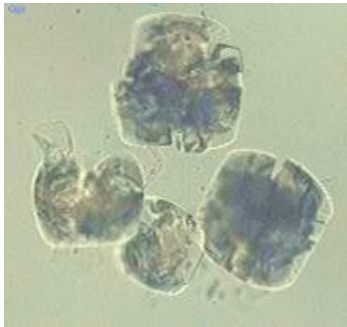


**URATI AMORFI (SEDIMENTO LATERIZIO)**





**CRISTALLI DI ACIDO URICO  
(MOLTO POLIMORFI)**



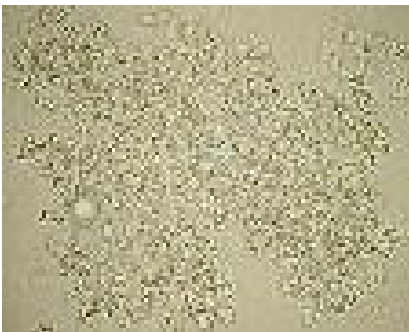
### ➤ **CRISTALLI DI FOSFATO**

Si osservano nelle urine alcaline ed hanno scarso rilievo clinico.

I fosfati amorfi sono causa comune di intorbidimento delle urine

La forma caratteristica dei cristalli di fosfato triplo è quella a “coperchio di bara”.

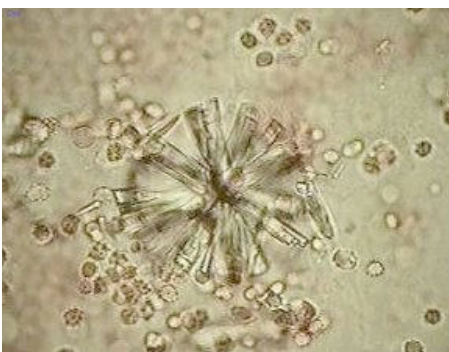
I cristalli di fosfato di calcio hanno invece forma prismatica, o meglio “a rosetta”.



**FOSFATI AMORFI**



**FOSFATI A COPERCHIO DI BARA**



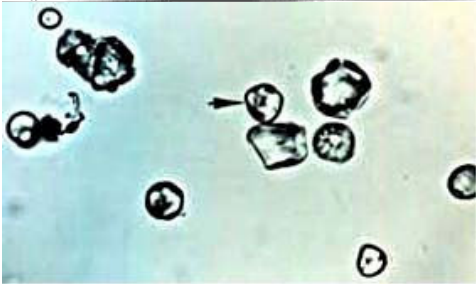
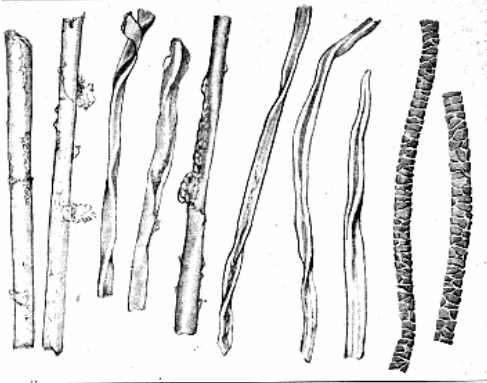
**FOSFATI A ROSETTA**

### ➤ CRISTALLI DI METABOLITI

Cristalli di tirosina e di leucina indicano epatopatie gravi, quelli di cisteina indicano la presenza di calcoli.

### ➤ ARTEFATTI

I più frequenti contaminanti originano da contaminazione fecale: fibre vegetali o muscolari non digerite, fibre di tessuti, granuli di amido, gocce lipidiche da lubrificanti di cateteri o da creme vaginali.



## APPROFONDIMENTO: TABELLA CALCOLI RENALI

Tabella 19.28 Tipi di calcoli renali

Composizione	Caratteristiche diagnostiche
Cistina	Marcato aumento dell'escrezione di cistina nelle 24 ore La cromatografia indica un'aminoaciduria anomala
Fosfato di magnesio e ammonio (struvite)	Infezioni urinarie croniche o ricorrenti Se di grandi dimensioni causano deformazione dei calici e del bacinetto renale
Acido urico	Uricemia elevata nel 40-50% dei pazienti Aumento dell'escrezione di acido urico nelle 24 ore Di solito il pH urinario è mantenuto stabilmente a valori acidi
Ossalato e fosfato di calcio	Calciuria delle 24 ore aumentata, specie in presenza di un elevato apporto alimentare di calcio (>1000 mg/die) In genere aumento dell'escrezione di ossalato nelle 24 ore In genere aumento dell'escrezione di acido urico nelle 24 ore Elevata sintesi di 1,25-diidrossi vitamina D <sub>3</sub> Frequente iperparatiroidismo Calcemia e fosforemia variabili



## APPROFONDIMENTO: AMMICOACIDI E SEROTONINA

L'escrezione urinaria di amminoacidi è, in condizioni normali, modesta (meno di 200mg di azoto nelle 24 ore) e riconducibile a un apporto alimentare che eccede la capacità di riassorbimento del rene (valori soglia).

Amminoacidi specifici in eccesso presenti nelle urine possono essere dovuti a 2 diversi meccanismi: difetti enzimatici e difetti dei sistemi di trasporto dei tubuli renali.

### TEST AL CLORURO FERRICO

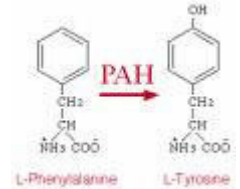
Molti amminoacidi reagiscono con il cloruro ferrico dando origine a colorazioni caratteristiche, ma non è un test specifico per un determinato amminoacido → le diagnosi definitive richiedono l'identificazione qualitativa e quantitativa dei singoli amminoacidi...

### FENILCHETONURIA

Ha un'incidenza di 1 su 20000 nati vivi e deve essere trattata molto precocemente. La mutazione riguarda il gene della **fenilalanina idrossilasi** → la fenilalanina non può essere convertita in tirosina e si ha conversione in acido fenilpiruvico, che danneggia gravemente le cellule del SNC.



Anche se la diagnosi definitiva dipende dai dosaggi sierici ed enzimatici, la **ricerca dell'acido fenilpiruvico** nelle urine (strip) costituisce un buon test di screening da effettuare qualche settimana dopo la nascita. Il **test di Guthrie** è comunque il test definitivo per la fenilchetonuria, e si basa sulla crescita di un ceppo batterico dipendente dalla fenilalanina (dimostra la presenza di alti livelli di amminoacido nel sangue).



### CISTINURIA



Ha un'incidenza di 1 su 7000 nati vivi ed è dovuta a un difetto di riassorbimento della cisteina da parte del tubulo prossimale. La cisteina, presente in grande quantità nell'urina, precipita e forma **calcoli**.

Nella cistinuria il difetto di trasporto può riguardare anche altri amminoacidi (lisina, arginino, ornitina).

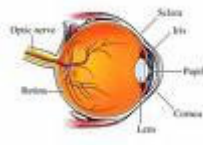
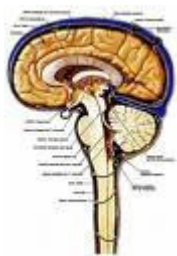
### OMOCISTINURIA

Deriva dalla **carenza dell'enzima cistationina β-sintasi**, che catalizza la trasformazione da cistationina a omocisteina e serina (nel metabolismo della metionina). Si ha quindi accumulo di metionina e omocisteina, con **gravi deficit mentali ed episodi tromboembolici**.

Sia cisteina che omocisteina possono essere messe in evidenza con il test al cianuro-nitroprussiato (si ha una caratteristica colorazione rosso porpora).

### CISTINOSI

Deriva da un errore congenito del metabolismo, associato ad **accumulo di cristalli di cisteina in molti tipi cellulari diversi** (occhi, reni, SRE). La conseguenza dell'interessamento renale è la **sindrome di Fanconi**, caratterizzata da difetti fosforo, glucosio e



di riassorbimento di amminoacidi, potassio, acqua → può progredire verso una IRC.

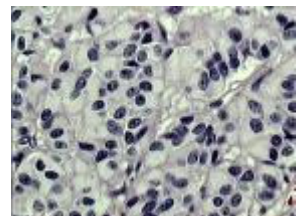
**Deficit nel riassorbimento di potassio fosforo glucosio acqua**

### METABOLITI DELLA SEROTONINA

La serotonina, amina vasoattiva e neurotrasmettitore, è prodotta, oltre che dal SNC, dal sistema APUD; è trasportata in circolo dalle piastrine ed è degradata nel fegato. Una delle patologie in cui la serotonina aumenta notevolmente è quella del **tumore carcinoidale**: le cellule di questo tumore producono grosse quantità di serotonina e la riversano direttamente in circolo, dove la sostanza provoca broncospasma e vasodilatazione (sindrome da carcinoidale).

Uno dei prodotti di degradazione della serotonina è l'**acido 5-idrossi-indolacetico (HIAA)**.

La diagnosi del carcinoidale si basa proprio su questo parametro nelle urine (nei soggetti normali è 2-9mg/24h, in quelli affetti dal carcinoidale arriva a 50-500mg/24h).



<b>Fertile:</b> capace di concepimento
<b>Sterile:</b> incapace di concepimento
<b>Infertile:</b> incapace di concepimento dopo almeno un anno di rapporti regolari

Le cause di infertilità possono riguardare:	
• Fattori femminili	35%
• Fattori maschili	30%
• Ambedue	20%
• Inspiegata	15%

**Cause di infertilità maschile possono essere varicocele, malattie dei tubuli seminiferi, malattie dei dotti escretori, malattie endocrine, disfunzioni sessuali (impotenza, eiaculazione retrograda, inadeguatezza della tecnica del rapporto sessuale), cause idiopatiche (ignote).**

**Cause di infertilità femminile possono essere alterazioni dell'ovulazione, alterazioni del tratto genitale, cause idiopatiche.**

**Il medico deve valutare fundamentalmente tre fattori:**

1. Il liquido seminale
2. L'ovulazione
3. Le vie genitali femminili

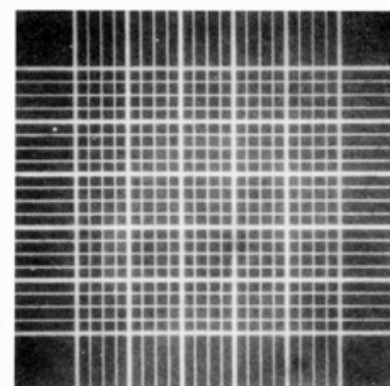
## **I. ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE E DEGLI SPERMATOZOI**

Innanzitutto è necessario un periodo di astinenza di almeno 3-5 giorni; la raccolta avviene per masturbazione e l'analisi in laboratorio deve essere svolta entro 1 ora.

Bisogna innanzitutto valutare **l'aspetto dell'eiaculato**: il **colore** normale è avorio opalescente; un colore chiaro e acquoso indica una riduzione della componente gametica, un colore lattescente una prevalenza di secrezione prostatica, un colore giallo potrebbe indicare una infezione del tratto genitale. **Il volume** dell'eiaculato normale è di 0,5-6 ml. **La viscosità** dà una prima idea sul quantitativo della componente nemaspermica. **Il PH** normale è leggermente basico (7,2-8); è ridotto in caso di infezioni. Altro esame importante sull'aspetto è la **fluidificazione** (o liquefazione), che avviene normalmente tra i 10 e i 60 minuti a temperatura di 35°C; un coagulo che non si dissolve è invece patologico (può essere ostacolata la motilità degli spermatozoi).

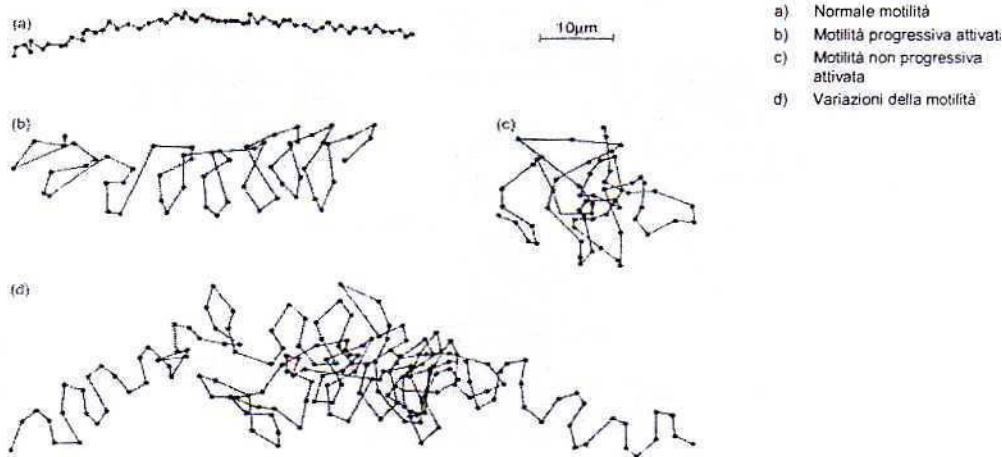
Bisogna quindi procedere alla **conta degli spermatozoi** nella camera di Makler o nell'emocitometro di Neubauer, che è più preciso → dopo diluizione, il campione viene trasferito nelle camere di conta dell'emocitometro, che è posto per 5 minuti in ambiente umido; in questo tempo le cellule sedimentano e possono essere contate con microscopio a contrasto di fase. È importante effettuare diverse conte sullo stesso campione e su campioni diversi dello stesso paziente ed eseguire una media.

La griglia centrale dell'emocitometro di Neubauer contiene 25 quadrati in cui si devono contare gli spermatozoi



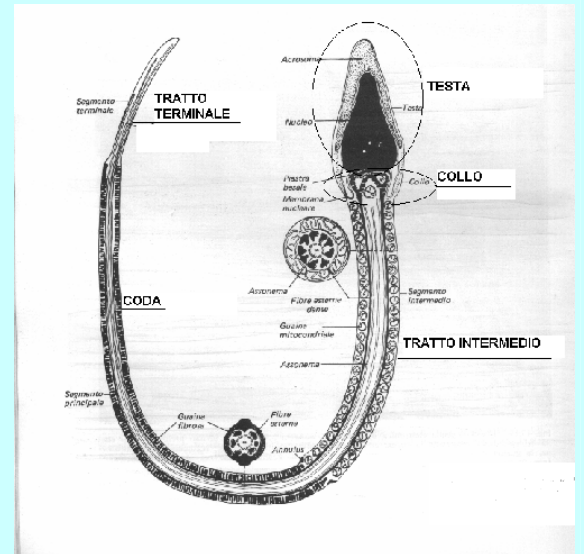
Il numero normale di spermatozoi è di **20-200 milioni/ml**.

Altro esame fondamentale è quello della **motilità nemespermica**. Il sistema **CASA** (computer assisted semen analysis) e il sistema **SIAS** (superimposed image analysis system) permettono una buona valutazione dei gradi di motilità (rapida, progressiva, non progressiva, immobilità) e del tipo (rettilinea, discinetica, agitata). Nei soggetti normali a 1h dall'eiaculato il 50% degli spermatozoi dovrebbe essere mobile (lenti e rapidi) e il 25% dovrebbero essere rapidi.



E' chiaro che bisogna valutare anche la **morfologia degli spermatozoi\***, cioè la lunghezza della testa, del collo, del segmento intermedio, del segmento principale e di quello terminale. Possono esserci diversi tipi di alterazioni morfologiche (come in ogni esame citologico ci vuole esperienza nel riconoscerle); esempi sono la testa amorfa, la testa affusolata, testa a punta ecc.

\* Uno spermatozoo maturo ha una testa e una coda o flagello ed è lungo 60µm. La testa ha il materiale genetico rivestito da uno strato detto acrosoma, ricco di enzimi idrolitici. La coda può essere suddivisa in un collo, un segmento intermedio, un segmento principale e un segmento terminale. I principali componenti del flagello sono l'assonema, costituito da MT a disposizione 9+2 e nove fibre esterne raccolte attorno all'assonema. Inoltre, a livello del segmento intermedio, si trovano moltissimi mitocondri. Il collo contiene il centriolo da cui originano i MT. Nel segmento principale, tra le fibre esterne e la membrana cellulare, si interpone una guaina fibrosa. Nel segmento terminale, più sottile, scompaiono le nove fibre esterne.



**TERMINOLOGIA ALTERAZIONI DEL LIQUIDO SEMINALE :OMS (1992).**

Termine	significato
<b>Normozoospermia</b>	<b>Valori normali</b>
<b>Oligozoospermia</b>	Concentrazione nemespermica < 20x10 <sup>6</sup>
<b>Astenozoospermia</b>	< 50% spermatozoi con motilità progressiva rapida e lenta (a+b)
	< 25% con motilità progressiva rapida
<b>Teratozoospermia</b>	< 40% di spermatozoi con morfologia normale
<b>Oligoasteno-teratozoospermia</b>	Anomalie di tutte e tre le variabili
<b>Azoospermia</b>	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato
<b>Aspermia</b>	Assenza di eiaculazione



Lo **studio biochimico del plasma seminale** si basa sugli indici di funzionalità delle varie ghiandole annessi alle vie genitali maschili

- Indici di funzionalità prostatica → fosfatasi acida, acido citrico, zinco
- Indici di funzionalità vescicole seminali → fruttosio
- Indici di funzionalità epididimo → glicerofosforilcolina, carnitina,  $\alpha$ -glicosidasi
- Indici di funzionalità del testicolo → transferrina, inibina
- Indici di funzionalità g. bulbouretrali → mucoproteine, IgA

Lo **studio biochimico dello spermatozoo** si basa sui seguenti parametri:

-ATP nemaspermico, carnitina, isozima LDH-X, consumo di ossigeno, potenziale di perossidazione lipidica.

Uno **studio immunologico** importante per capire se nel siero, nel plasma seminale o nel muco cervicale siano presenti anticorpi anti-spermatozoi è detto **Immunobead Test** → Gli immunobeads sono sferule microscopiche di poliacrilammide rivestite di anticorpi anti-immunoglobuline (Ig) umane sulla loro superficie. Esse attaccano gli spermatozoi che hanno tali anticorpi sulla loro superficie.

Infine, non meno importanti, i **test di vitalità e di funzionalità nemaspermica** → Tra questi ci sono...

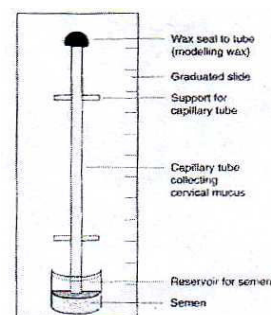
- Lo **swelling test** valuta la percentuale di spermatozoi che, incubati in soluzione ipotonica, si rigonfiano e muoiono.
- L'**esame di reazione acrosomiale** valuta gli enzimi idrolitici dell'acrosoma.
- Lo **studio della cromatina nemaspermica**
- Il **test di migrazione in muco cervicale bovino in vitro**. → si immerge l'estremo di un capillare pieno di muco cervicale in una provetta contenente lo sperma; dopo 30 minuti a 37°C si valuta la distanza di migrazione degli spermatozoi.

Per quanto riguarda i **test di interazione spermatozoo-ovocita** si usano:

-**Hamster test** (test di penetrazione in ovociti di criceto): si induce superovulazione nel criceto, si raccolgono e si trattano le uova alle quali è rimossa la zona pellucida, e quindi si incubano le uova con gli spermatozoi. Dopo 3 ore si valuta la percentuale di spermatozoi che sono penetrati negli ovociti (test positivo se > 10%).



-**Kremer test**: Test che valuta la compatibilità del liquido seminale con il muco cervicale della partner (Kremer semplice) od anche di una donatrice (Kremer crociato). Il muco cervicale, posto in un capillare, viene messo a contatto con il liquido seminale, quindi al microscopio valutata la migrazione degli spermatozoi nel muco.



-**Post coital test**: studia in vivo l'interazione tra spermatozoi e muco cervicale, e si effettua nel periodo preovulatorio. 8 ore dopo un rapporto (è assolutamente vietato lavarsi dopo il rapporto) si preleva il muco cervicale e si analizza soprattutto la motilità degli spermatozoi:

• Eccellente	> 15 %	spermatozoi con moto rettilineo
• Buono	>5 < 15 %	spermatozoi con moto rettilineo
• Discreto	>1 < 5 %	spermatozoi con moto rettilineo
• Scarso		spermatozoi con moto non rettilineo
• Negativo		spermatozoi immobili o assenti

## 2. L'OVULAZIONE

### ORMONI

Bisogna dosare l'**LH**, l'**FSH** e l'**estradiolo** nella fase follicolare, il **progesterone** nella fase luteinica, e, se il ciclo è irregolare o inovulatorio, anche altri ormoni quali TSH, prolattina e testosterone.

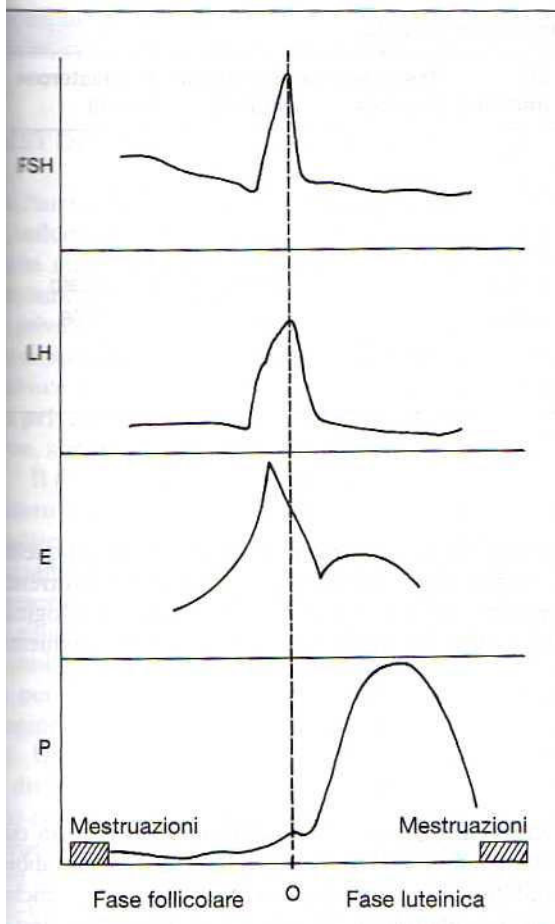


Tabella 17.1 Concentrazioni di riferimento degli ormoni nel siero

	Prolattina (ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosterone (ng/ml)	Estradiolo (ng/dl)	Progesterone (ng/dl)
Bambini	1-20	5-10	5-10	0,12-0,16	<2	
Maschi adulti	1-20	10-15	5-20	3,9-7,9	1,6-2	<100
Femmine in età fertile	1-25			0,25-0,67		
Fase follicolare		5-25	5-25		1,8-2,4	37-57
Fase ovulatoria		20-30	40-80		16,6-23,2	Aumentato
Fase luteinica		5-25	5-25		6,3-7,3	332-1198
Femmine dopo la menopausa	1-20	40-250	>75	0,21-0,37		10-22

### TEMPERATURA

La temperatura si abbassa al momento dell'ovulazione, a cui segue un brusco rialzo termico nelle successive 48 ore.

### STUDIO DEL MUCO CERVICALE

Bisogna valutare la consistenza, la filanza, l'elasticità, la cristallizzazione ecc...

### BIOPSIA ENDOMETRIO

E' invasiva ma permette di valutare le modificazioni morfologiche dell'utero nei vari stadi del ciclo.

### VALUTAZIONE DEL DIAMETRO FOLLICOLARE



# INFEZIONI DEI GENITALI

## VAGINA – CERVICITI E VAGINITI

### ECOSISTEMA DELLA VAGINA

Uno dei maggiori fattori che influenzano la flora vaginale è l'età, ovvero lo stato ormonale della donna → la flora microbica della vagina dipende infatti soprattutto dalla presenza nella mucosa del glicogeno, la cui presenza è a sua volta dipendente dagli ormoni estrogeni. Il glicogeno influenza questo ecosistema perché, per l'azione dei lattobacilli sull'acido lattico, con conseguente acidificazione del PH (4,8-5,7) e conseguente inibizione della flora microbica patogena, che predilige un ambiente neutro.

**NEL NEONATO** la vagina è sterile per le prime 12-24 ore.

**PH ACIDO**

**LA FLORA INIZIALE** è rappresentata da Streptococchi e Stafilococchi, che in 2-3 giorni vengono sostituiti dai lattobacilli, e, contemporaneamente è dimostrabile la presenza di glicogeno conseguentemente all'azione degli estrogeni materni ancora in circolo. Rapidamente però questa situazione cambia (gli estrogeni vengono escreti con le urine e, il glicogeno e i lattobacilli non sono presenti → fino alla pubertà c'è una flora mista di Streptococchi, Stafilococchi e Difteroidi.

**PH ALCALINO**

**ALLA PUBERTÀ** vengono secreti gli estrogeni, il glicogeno si deposita nuovamente nell'epitelio e ricompaiono i lattobacilli come flora dominante sulle altre specie.

**PH ACIDO**

**ALLA MENOPAUSA** si ritorna, per il decadimento della secrezione estrogenica, alla condizione della flora pre-puberale.

**PH ALCALINO**

*E' anche importante dire però che la distribuzione della flora non è uniforme in tutta la vagina, ma varia dal fornice posteriore alle altre sedi vaginali.*

### CERVICITI

La cervice è costituita da epitelio cilindrico ed è quindi **più esposta a infezioni rispetto alla vagina**, che ha epitelio pavimentoso stratificato. Le cause principali di cervicite sono:

### NEISSERIA GONORRHOEAE

La diagnosi si basa sul riscontro dei diplococchi Gram-negativi, integrato con l'esame colturale → diagnosi corretta nel 90% dei casi.

**Prelievo:** tampone di legno ricoperto di cotone, strisciato sulla cervice e mucosa rettale o uretra.

**N. 2 strisci su vetrini:** colorazione con Gram o Bleu di metilene.

**Semina in terreno di trasporto:** Thayer-Martin modificato (MTM + CO<sub>2</sub>) quando la semina nel terreno di coltura non possa essere effettuata immediatamente.

**Identificazione delle colonie:** a) Gram e Test dell'ossidasi b) Test dei carboidrati, anticorpi fluorescenti, tecniche sierologiche, Bactec.



## CLAMIDIA TRACHOMATIS

La diagnosi può essere effettuata microscopicamente (strisci colorati con Giemsa, che evidenzia inclusioni citoplasmatiche nelle cellule, che corrispondono ai batteri), ma la diagnosi deve essere confermata con immunofluorescenza e tests sierologici.

### Esame diretto:

- Preparati per striscio con rotazione del tampone sul vetrino.
- Osservazione dopo colorazione con Giemsa.
- Immunofluorescenza (IF).

### Esame colturale:

- Semina in colture cellulari in vitro.
- Inoculazione in uova embrionate di pollo.
- Immunofluorescenza o altri metodi sierologici di identificazione o metodo immunoenzimatico

### Diagnosi sierologica:

- Fissazione del complemento (FC).
- Immunofluorescenza indiretta (IFI).



## HERPES SIMPLEX 2



Può essere responsabile di una cervicite acuta che può non essere accompagnata da lesioni esterne e quindi rimanere sconosciuta. Tale infezione può progredire fino alla necrosi.

La **diagnosi è citologica**, con colorazione Papanicolau (che evidenzia inclusioni nelle cellule), e **deve essere confermata da immunofluorescenza**. La **diagnosi sierologica è inutile**, per la presenza di anticorpi già prima dell'inizio della lesione.

## VAGINITI

### CANDIDA ALBICANS

È un patogeno opportunisto la cui infezione è favorita da stress, immunodepressione e variazione del tasso di estrogeni.

**Es. Macroscopico:** essudato biancastro, granuloso, c.d. "a ricotta".

**Es. Microscopico:** a fresco e colorazione di M.G. Giemsa. Numerose blastospore = vaginite probabile. Blastospore + filamenti = vaginite molto probabile.

**Es. Culturale:** Sabouraud + (penicillina, streptomina, cloramfenicolo).

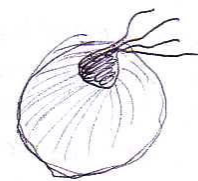
**Diagnosi sierologica:** agglutinazione, emoagglutinazione, IFI (immunofluorescenza), anticorpi precipitanti.

## TRICHOMONAS VAGINALIS

Il protozoo, trasmesso per contatto sessuale o per contagio attraverso biancheria infetta, sottrae il glicogeno alle cellule epiteliali impedendo ai lattobacilli di trasformarlo in acido lattico, con conseguente innalzamento del PH (5,5-6), condizione ideale per lo sviluppo del parassita.

### TRICHOMONAS VAGINALIS

La DIAGNOSI SI BASA SULL'OSSERVAZIONE A FRESCO DI SECRETO URETRALE O VAGINALE, NELQUALE SI EVIDENZIA IL PROTOZOO CHE HA 4 FLAGELLI ANTERIORI E UNA MEMBRANA ONDULANTE. L'INFEZIONE DA SCARSO NUMERO DEL PARASSITA PUO' ESSERE MESSA IN EVIDENZA DOPO AMPLIFICAZIONE DELLA CARICA PARASSITARIA IN TERRENI DI COLTURA AXENICI, E I PARASSITI POSSONO ESSERE MESSI IN EVIDENZA CON ANTICORPI MONOCLONALI MARCATI CON FLUORESCINA.





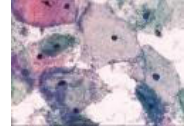
## ALTRE VAGINITI

Vaginiti possono essere legate ad agenti specifici quali M. Tuberculosis, Salmonella, Enterobacteriaceae, Ureaplasma.

Altri tipi di vaginiti, che fino a poco tempo fa venivano dette “aspecifiche”, sono state correlate al microrganismo **GARDENELLA**, Gram-incerto che clinicamente si manifesta con scarsa secrezione vaginale, modesta irritazione e un caratteristico odore di pesce.

L'**esame microscopico** evidenzia i coccobacilli gram-incerti in grande quantità con aspetto cosiddetto “a sale e pepe” in quanto tendono a “punteggiare” le cellule epiteliali.

L'**esame colturale** è svolto sul terreno di Casman a 37°C con atmosfera CO<sub>2</sub> al 10%.



## RIEPILOGO: DIAGNOSI DI VAGINITI

Bisognerebbe eseguire almeno tre tamponi



- Prelievo effettuato dal terzo posteriore della vagina o cervice in caso di cervicitì.
- **TAMPONI VAGINALI O CERVICALI (N. 3).**
  - 1° - Si effettuano due strisci su vetrino per esame microscopico previa colorazione di Gram e Giemsa.
  - 2° - Si stempera in 1 o 2 ml di soluzione fisiologica, per ricerca microscopica a fresco di Trichomonas e Candida.
  - 3° - Si inocula in terreno di trasporto per esame colturale atto alla ricerca di schizomiceti e miceti.

## PROSTATA

Il liquido prostatico possiede proprietà antibatteriche che normalmente impediscono la colonizzazione della ghiandola.

### PROSTATITE ACUTA

È sostenuta prevalentemente da **Enterobacteriaceae**. Già l'esame microscopico del secreto uretrale può indirizzare verso una diagnosi, che deve comunque essere accertata dall'esame colturale.

### PROSTATITE CRONICA →



Meares e Stamey hanno proposto una tecnica per giungere alla diagnosi eziologica attraverso una determinazione quantitativa dei batteri eventualmente presenti nella prostata.

Poiché i batteri che normalmente colonizzano l'uretra possono contaminare il secreto prostatico da massaggio, è necessario eseguire colture quantitative (CB) da diversi campioni, ovvero:

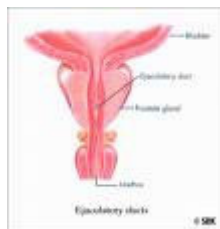
- 1° urina uretrale, ovvero il primo getto della minzione (conteggio batteri N. 1 = CB1)
- 2° urina da mitto intermedio (CB2)
- 3° secrezione prostatica dopo massaggio (SPM)
- 4° urina raccolta dopo il massaggio (CB3).

Se è presente batteriuria sarà opportuno somministrare per 2 o 3 giorni ampicillina o nitrofurantoina per sterilizzare le urine senza interferire nella carica batterica prostatica.

Quando sia presente una prostatite cronica il numero dei batteri in SPM sarà maggiore di quello in CB1 e CB2 di almeno 10 volte. Se non è possibile ottenere SPM, la diagnosi può essere ugualmente posta con CB3.

I microrganismi più frequentemente in causa appartengono anche per la forma cronica alle *Enterobacteriaceae* ed in particolare a *E. coli* (in circa l'80% dei casi), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus mirabilis*. Più raramente si riscontrano *Enterococchi*, e *Stafilococchi (aureus ed epidermidis)*, *Trichomonas vaginalis*.

All'esame colturale è opportuno associare sempre anche l'esame microscopico del secreto prostatico, per evidenziare sia la presenza di leucociti polimorfonucleati o di altre cellule, sia l'eventuale flora batterica da valutare poi in rapporto all'esame colturale.



## URETRA

Una notevole quantità di microrganismi si trova normalmente nella parte distale dell'uretra di soggetti sani. I principali sono *Staphylococcus epidermidis*, Enterococchi, Enterobacteriaceae, Neisserie, Corynebatteri, Micoplasmi, Candide ecc.

Sia nell'uomo che nella donna si riscontrano due tipi di uretriti, gonococciche e non gonococciche.

- **Gonococciche:** sono caratterizzate da abbondante essudato cremoso giallastro, tipico di *Neisseria Gonorrhoeae* e *Trichomonas*
- **Non gonococciche:** Stafilococchi, Enterococchi, Enterobacteriaceae, *Ureaplasma*, Clamidio

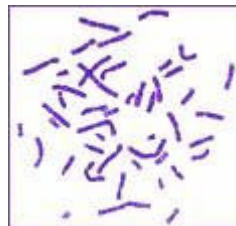
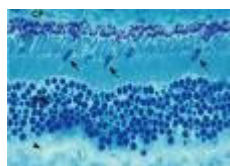
### a) Prelievo

Il materiale va prelevato al primo mattino prima della minzione e della toilette. Il prelievo va eseguito con ansa di platino oppure raccolto con due campioni sterili, di cui uno in terreno di trasporto e uno strisciato su vetrino.



### b) Esame microscopico

Gli strisci devono essere almeno 3, e colorati con Blu di metilene, Gram e Giemsa. Inoltre è opportuno preparare un vetrino per l'esame a fresco per ricercare *Trichomonas*.



+



### c) Esame colturale

L'indagine è indirizzata principalmente all'isolamento del gonococco (semina in Thayer-Martin in CO<sub>2</sub> al 5%, o agar-sangue, o agar-sale mannite).

Se la coltura non lo evidenzia, e non si sono evidenziati batteri, miceti o protozoi specifici, si deve porre l'ipotesi di Clamidio o Micoplasmi, la cui ricerca è però effettuata solo in laboratori specializzati → la diagnosi si pone per esclusione e si somministrano tetracicline per 14 giorni → sono tossiche per questi 2 microrganismi.

# INFEZIONI DELL'APPARATO RESPIRATORIO

## OROFARINGE: FARINGITI

Il cavo orale normalmente alberga **molte specie batteriche** (Streptococchi, Neisseria, Stafilococchi, Lactobacillus, Corynebacterium, Clostridium, Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Nocardia e praticamente tutti i microrganismi implicati nella patologia umana).

La patologia più ricorrente nel cavo orale è quella della **faringe**



### **EZIOLOGIA DELLE FARINGITI**

- Elevata incidenza, più del 50% è da attribuirsi ad agenti virali: Virus influenzale e parainfluenzale, Adenovirus, ecc.
- Minore incidenza è riferibile a batteri patogeni o potenzialmente patogeni: *N. meningitidis*, *C. diphtheriae*, *H. influenzae*, ecc.
- Il ruolo più importante nelle infezioni della orofaringe è svolto dallo Streptococco  $\beta$ -emolitico (*S. pyogenes*), nel 40% di faringite acuta e tonsillite.

### **La ricerca deve essere finalizzata a:**

1. Isolamento dello Streptococco  $\beta$ -emolitico;
2. Isolamento di microrganismi patogeni legati ad una specifica sintomatologia: *C. diphtheriae*, *N. meningitidis*, *B. pertussis*, miceti;
3. Isolamento di microrganismi potenzialmente patogeni in soggetti con sintomatologia non specifica, o soggetti sani o immunodepressi a rischio;
4. Isolamento di microrganismi patogeni a scopo epidemiologico preventivo in particolari categorie di lavoratori o di soggetti che vivono in comunità.

## STREPTOCOCCUS PYOGENES

Cocchi Gram-positivi, disposti in coppie o catenelle. Immobili, asporigeni, alcuni capsulati.

Aerobi-anaerobi facoltativi (con preferenza in anaerobiosi) Catalasi-negativi  
Ossidasi-negativi  $\beta$ -emolitico.

### FATTORI DI VIRULENZA

#### ✘ Capsula

E' costituita da acido ialuronico; non è immunogena. Protegge il microrganismo dalla fagocitosi.

#### ✘ Proteina M

Complessata ad acidi lipoteicoici, forma delle estroflessioni della parete cellulare, le "fibrille", che sono antigeniche e permettono l'adesione alle mucose. Azione antifagocitaria.

#### ✘ Streptochinasi (A e B)

- Lisi i coaguli del sangue
- Facilita la diffusione dei batteri nei tessuti.

#### ✘ DNasi

Depolimerizzano il DNA libero presente nel materiale purulento → riduzione della viscosità      facilita così, la diffusione dei batteri.

#### ✘ Ialuronidasi

Depolimerizza l'acido ialuronico

#### ✘ Esotossine pirogene

Agiscono come superantigeni, interagendo con macrofagi, linfociti T con rilascio di IL-1, IL-2 e IL-6, TNF-alfa; queste citochine mediano una varietà di importanti effetti, inclusi shock e collasso caratteristici di pazienti con malattie streptococciche gravi.

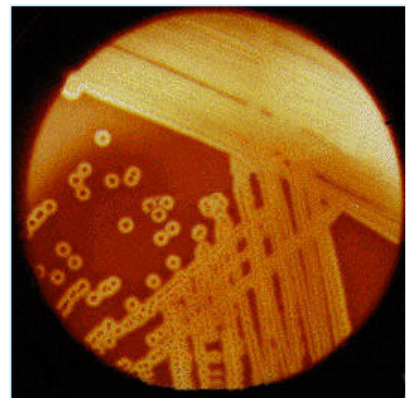
Sono responsabili anche dell'eritema della scarlattina.

#### ✘ Streptolisina S e Streptolisina O

Sono emolisine in grado di lisare eritrociti, leucociti e piastrine; possono anche stimolare il rilascio di enzimi lisosomiali.

Streptolisina S: ossigeno-stabile, non immunogena.

Streptolisina O: ossigeno-labile, immunogena.





## PRELIEVO – CONSERVAZIONE – COLTURA

Si dovrà usare un **abbassalingua** che consenta di evidenziare le aree tonsillari e faringea. Il prelievo dell'essudato faringeo si effettua con un **tampone monouso** che può essere di cotone, rayon o dacron e di arginato di calcio, e che deve essere strisciato con forza e movimento di rotazione sulle tonsille e nel retrofaringe. Se è presente del **materiale purulento** si può effettuare l'asportazione con spatole, cucchiari chirurgici o pinze.

Il materiale deve essere inoculato subito in terreni di coltura di trasporto o conservato a 4°C.

L'isolamento si effettua in **agar-sangue Columbia CNA**. L'incubazione per 24-48 ore a 37°C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 10%.

## SIGNIFICATO CLINICO DELL'ISOLAMENTO

Il semplice isolamento dello Streptococco beta emolitico non ha un grande significato diagnostico se non è convalidato da un altro dato, e cioè la **RISPOSTA ANTICORPALE**: i principali anticorpi prodotti contro lo streptococco sono:

**ASO** (anti streptolisine)

**ADN-B** (anti DNasi)

**ANAD** (anti nicotinamideadeninucleotidasi)

**AH** (anti ialuronidasi)

**ASK** (anti streptochinasi)

**A-CHO** (anti polisaccaride C)

Questi stessi anticorpi possono essere inoltre **indici di patologie specifiche** da streptococco beta emolitico (es. ANAD è caratteristico della GN post-streptococcica, A-CHO della febbre reumatica, ADN-B delle infezioni cutanee, gli altri della faringite), e soprattutto è importante in questo senso monitorarli nel tempo:

Tab. 15. Indagini sierologiche nelle infezioni streptococciche

Sede di infezione	Periodo di malattia						
	Settimane				Mesi		
	1	2	3	4	2-3-4	5-6	>6
Oro-faringe	ASO	ASO	ASO	AH			
	AH	AH	AH	ASK			
	ASK	ASK	ASK				
Oro-faringe + ARF	ASO	ASO	ASO	ASO	A-CHO	A-CHO	
	AH	AH	AH	AH	AH	AH	
	ASK	ASK	ASK	ASK	ASK	ASK	
Oro-faringe + AGN		ANAD	ANAD	ANAD	ANAD		
	ASO	ASO	ASO				
	AH-ASK	AH-ASK	AH-ASK				
Cute	ADN-B	ADN-B	ADN-B				
Cute + AGN		ADN-B	ADN-B	ADN-B			

## MICROORGANISMI LEGATI A SINTOMATOLOGIA SPECIFICA

### CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

*Bacilli Gram-positivi Non sporigeni*

*Immobili Anaerobi facoltativi Catalasi-positivi*

**Virulenza:** tossina proteica termolabile costituita da 2 subunità.

La subunità B riconosce e lega i recettori della cellula bersaglio permettendo alla sub-unità A di entrare nella cellula e di inibire la sintesi proteica; Il gene "tox" che codifica per la tossina è introdotto nei ceppi di *C. diphtheriae* da un fago lisogeno;

**L'infezione orofaringea (difterite):** caratterizzata dalla presenza di una **pseudomembrana** costituita da tessuto necrotico, leucociti e batteri.

**Prelievo:** prelevare la pseudomembrana o, se assente, l'essudato faringeo.

**Esame batterioscopico diretto**

- Colorazione di Neisser-Gins, di Albert

**Esame colturale**

- Terreno di Loeffler a 37°C per 12h

- Terreno di Pergola a 37°C per 24h



# NEISSERIA MENINGITIDIS

## Virulenza:

- ✓ **Capsula:** sono stati identificati 13 sierotipi capsulari.
- ✓ **Pili:** il ruolo dei pili nella patogenesi della malattia è meno importante di quello rivestito dai pili in *N. gonorrhoeae*;
- ✓ **Lipopolisaccaride:** Endotossina;
- ✓ **Proteine di membrana esterna:** coinvolte nell'attacco e nell'invasione delle cellule epiteliali.

## Epidemiologia:

Si trasmette mediante **aerosol infetto**; più colpiti sono i bambini e pazienti con **deficit nella sequenza terminale del complemento**. La presenza nel cavo oro-faringeo può rappresentare:

- la sede primaria di una **possibile diffusione setticemica e di meningite cerebro-spinale**;
- l'individuazione dei "portatori sani" in caso di epidemie.

## Esame microscopico

- Colorazione di Gram

## Esame colturale

- Agar Thayer-Martin + VCN (vancomicina, colistina, nistatina)  
Incubare 24-48 ore a 37°C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 10%.

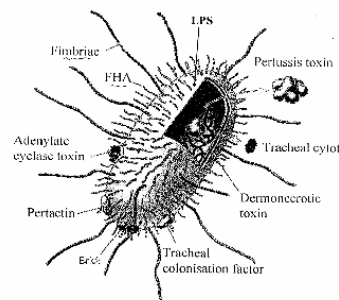


# BORDATELLA PERTUSSIS

Agente eziologico della pertosse (tosse convulsa)

Cocco-bacillo Gram-negativo, immobile, aerobio, capsulato con pili.

*Bordetella pertussis*



Alison Weiss, ASM News, 1997

Fattori di virulenza	Effetti biologici
<b>Adesine</b>	
<b>Emoagglutinina filamentosa</b>	Si lega ai glicolipidi solfati sulle membrane delle cellule ciliate; lega il CR3 sulla superficie dei polimorfonucleati e dà inizio alla fagocitosi (fagocitosi = necessaria per la sopravvivenza intracellulare del batterio → protezione dall'immunità anticorpale)
<b>Tossina della pertosse</b>	La subunità S2 si lega ai glicolipidi sulla superficie delle cellule ciliate dell'epitelio respiratorio; la subunità S3 si lega ai gangliosidi sulla superficie dei fagociti
<b>Pili</b>	Si legano alle cellule di mammifero. Ruolo ignoto nella malattia
<b>Pertactina</b>	Si lega alle cellule di mammifero. Ruolo ignoto nella malattia
<b>Tossine</b>	
<b>Tossina della pertosse</b>	La subunità S1 ADP-riosila la proteina Gi delle cellule dell'ospite, causando una mancanza di regolazione dell'adenilato ciclasi; la tossina inibisce il killing dei fagociti e la migrazione dei monociti
<b>Tossina adenilato ciclasica</b>	Aumenta il livello intracellulare di adenilato ciclasi e inibisce il killing dei fagociti e la migrazione dei monociti
<b>Citotossina tracheale</b>	Un frammento di peptidoglicano che uccide le cellule ciliate dell'epitelio respiratorio e stimola il rilascio dell'interleuchina-1 (febbre)
<b>Lipopolisaccaride</b>	Il ruolo nella malattia non è noto.

- Il batterio sopravvive all'interno dei leucociti
- Elude la risposta anticorpale umorale
- La sopravvivenza intracellulare consente lo stato di portatore

**Tossina della pertosse:** classica tossina A-B:

→ subunità S1: attività adenosina difosfato-ribosilante nei confronti della proteina G associata ad adenilato ciclasi: l'adenilato ciclasi non viene regolata: livello di cAMP non controllato → 1) aumento delle secrezioni respiratorie 2) secrezione di muco (*azione simile è svolta dalla tossina adenilato ciclasica*)

→ subunità S2: si lega ad un glicolipide presente sulle cellule del tratto respiratorio

→ subunità S3: si lega ai recettori sui fagociti → aumento di CR3 sulla superficie → ulteriore fagocitosi del batterio

**Pertosse.**

Trasmissione: gocce di aerosol

**Prelievo:** porre una piastra aperta con terreno di coltura a 10 cm dalla bocca del paziente e farlo tossire.

**Esame colturale:** Terreno Bordet-Gengou: Agar-patata + sangue al 20% + Antibiotici.



Candida albicans è più frequente mentre specie appartenenti al genere

**Prelievo:** tampone ruotato sulle tonsille e retrofaringe.

**Esame microscopico:** Colorazione di Gram

**Esame colturale:** Terreno Sabouraud o Mycosel. Incubazione a 37°C per 48 ore.

## ALTRI MICRORGANISMI POTENZIALMENTE PATOGENI

Stafilococchi, Enterobacteriaceae, Pseudomonas, ecc.

**Prelievo:** tampone ruotato sulle tonsille e retrofaringe.

**Esame microscopico:** Colorazione di Gram

**Esame colturale** Terreni selettivi: Agar sangue, MSA, ecc., 24-48h a 37°C

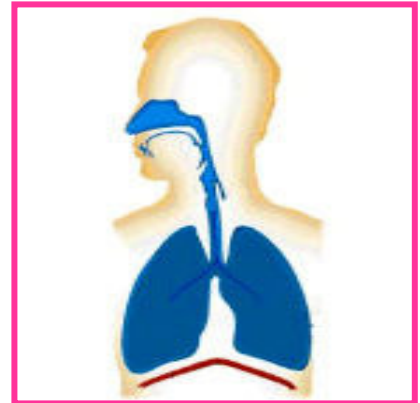
## INFEZIONI DEL TRATTO RESPIRATORIO INFERIORE

### Infezioni acute

- Bronchite acuta
- Bronchiolite acuta
- Polmonite

### Infezioni croniche

- Bronchite cronica
- Infezioni specifiche come tubercolosi e aspergillosi
- Ascesso polmonare



La **bronchiolite** è la più comune infezione acuta delle basse vie respiratorie che colpisce i bambini nella prima infanzia ed in particolare nel primo anno di vita; è caratterizzata da una bronco-ostruzione dovuta, nella maggior parte dei casi, al **virus respiratorio sinciziale** (50%), ma che può essere dovuta anche ad altri germi come le **clamidie**, responsabili di una forma piuttosto grave che colpisce i bambini nei primi 3 mesi di vita; altri virus (**adenovirus**, **virus parainfluenzali**, **enterovirus** e **virus influenzali**) sono stati associati a questa patologia sebbene in percentuale molto bassa.

Si definisce **polmonite** l'insieme di tutti i processi infettivi acuti a sede polmonare caratterizzati da **essudazione endoalveolare**, **peribronchiale** ed **interstiziale**, aventi diversa eziologia (batterica, micotica e virale).

### Polmoniti acquisite in comunità

Sono quelle polmoniti acquisite a domicilio; durante la vita comune di tutti i giorni, da persone non istituzionalizzate.

#### Principali agenti eziologici

- *Streptococcus pneumoniae* (30-50%)
- *Mycoplasma pneumoniae* (10-20%)
- *Chlamydia pneumoniae* (10%)
- *Staphylococcus aureus* (infanzia) (5-10%)
- *Klebsiella pneumoniae* (<10%)
- *Streptococcus pyogenes* (5%)



### Polmoniti nosocomiali

Sono acquisite nella maggior parte dei casi da pazienti ricoverati per altri motivi, e in minima parte da personale medico o infermieristico.

#### Principali agenti eziologici

- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Proteus spp.*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Serratia marcescens*



Per una corretta diagnosi di infezione delle basse vie respiratorie è opportuno procedere all'esame dell'espettorato, che non va confuso con l'escreato (che comprende anche saliva e secrezioni nasali e paranasali)  
La modalità di prelievo più corretta sarebbe teoricamente quella "asettica" effettuata direttamente in trachea o nei bronchi (**espettorato**), ma spesso queste manovre possono essere pericolose per il paziente quindi spesso si procede all'analisi meno rischiosa (anche se meno corretta) dell'escreato...

# ESPETTORATO

## Metodi di prelievo

### Broncoaspirato

Si ottiene in corso di broncoscopia, mediante l'uso di un broncoscopio a doppio canale che consenta l'introduzione di un catetere sterile.

### Aspirato transtracheale

Aspirazione mediante puntura transtracheale, esente da rischi di contaminazione. Si ricorre a tale prelievo in presenza di gravi manifestazioni polmonari, infezioni sostenute da batteri anaerobi, insensibili a precedenti trattamenti terapeutici.

### Tessuto polmonare

Prelievo bioptico in corso di intervento chirurgico.

### Essudato pleurico

Ottenuto mediante toracentesi (diagnosi di pleurite).

### Escreato

Effettuato al mattino in quantità di 1-3ml in contenitori sterili monouso che devono essere conservati a temperatura ambiente per non più di 1 ora. E' anche necessario in questo caso però effettuare **lavaggio in soluzione fisiologica, fluidificazione ed omogeneizzazione** per una corretta indagine microbiologica.

## Aspetto macroscopico dell'espettorato

<b>Salivare</b>	campione non idoneo
<b>Mucoso</b>	senza pus, probabile eziologia non batterica
<b>Purulento</b>	eziologia batterica
<b>Emoftoico</b>	quando assume una colorazione per presenza di sangue
<b>La presenza di flora anaerobica conferisce un caratteristico odore fetido.</b>	

## Analisi microscopica dell'espettorato

Deve essere analizzata la flora microbica (colorazione Gram) e soprattutto bisogna fare un esame citologico, valutando i vari elementi sia qualitativamente che quantitativamente...

- Se il numero di leucociti è maggiore rispetto alle cellule epiteliali di sfaldamento delle alte vie: il microorganismo isolato è responsabile di una infezione delle basse vie (campione idoneo).
- Se si osservano più di 10 cellule epiteliali di sfaldamento: il materiale proviene dal cavo orale e quindi contaminato (campione non idoneo).

### Criteria per valutare la qualità dell'espettorato (100 ingrand.) (da Barlett-Medical Microbiology)

<b>Neutrofili/campo:</b>	10-25	+1
<b>Neutrofili/campo:</b>	>25	+2
<b>Muco:</b>		+1
<b>Cell. epiteliali pavimentose/campo:</b>	10-25	-1
<b>Cell. Epiteliali pavimentose/campo:</b>	>25	-2

Se la somma è zero o meno di zero, il materiale deve essere considerato non idoneo per contaminazione orofaringea

## Esame colturale

E' necessario utilizzare **diversi terreni** (in genere almeno 8), considerando che i vari organismi che possono essere responsabili di polmonite sono molti e molto diversi tra loro. Molto importante è anche valutare il **numero di batteri**: come limite discriminativo tra acquisizione e superinfezione è stata proposta la concentrazione di  $10^8$  batteri/ml.

### TERRENI DI ISOLAMENTO

Agar triptosio	Agar sangue (*)	Agar sangue azide	Agar sangue mannite	Mycosel (**)	Agar per anaerobi o tioglicolato	Hektoen	Agar cioccolato
----------------	-----------------	-------------------	---------------------	--------------	----------------------------------	---------	-----------------



# BATTERI CHE CAUSANO POLMONITE

## STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE (alfa emolitico)

Sono batteri alfa emolitici, esigenti da un punto di vista nutrizionale e fermentanti.

I ceppi virulenti di *S. Pneumoniae* sono coperti da una capsula di polisaccaridi complessi.

*S. pneumoniae* colonizza l'orofaringe ma in situazioni particolari può colonizzare i polmoni, i seni paranasali e l'orecchio medio.

La colonizzazione è favorita da **adesine**, **proteasi di IgA secretorie** e una **pneumolisina** che lega il colesterolo della cellula ospite e crea dei pori. Questa attività può distruggere cellule epiteliali ciliate.

Altro fattore importante per la diffusione è la fosforilcolina, che si lega a recettori di diverse cellule (endoteliali, leucociti, polmonari e delle meningi → i batteri possono penetrare in queste cellule, meccanismo che li protegge dalla fagocitosi).

La colonizzazione è più caratteristica dei bambini e degli anziani (bassi livelli di protezione anticorpale) che negli adulti ed è frequentemente associata a una precedente infezione respiratoria virale (influenza, morbillo). La trasmissione è diretta (aerosol), ma conta molto lo stato immunitario)

**POLMONITE** i batteri si moltiplicano negli spazi alveolari. Gli eritrociti fuoriescono dai capillari congestionati e si accumulano negli alveoli. La febbre può arrivare a 41°C. Si ha espettorato striato di sangue e dolore al torace. Si guarisce se sottoposti a un'adeguata terapia. La mortalità è del 5%.

**SINUSITE ED OTITE MEDIA** Infiltrazione di polimorfonucleati nei seni o nell'orecchio medio

**MENINGITE** In seguito a batteriemia l'infezione può diffondersi alle meningi, che spesso causa danni neurologici e morte.

**BATTERIEMIA** Si verifica nel 25-30% dei pazienti con polmonite e può danneggiare le valvole cardiache.

Il terreno di crescita ideale è agar-sangue addizionato con **gentamicina**.

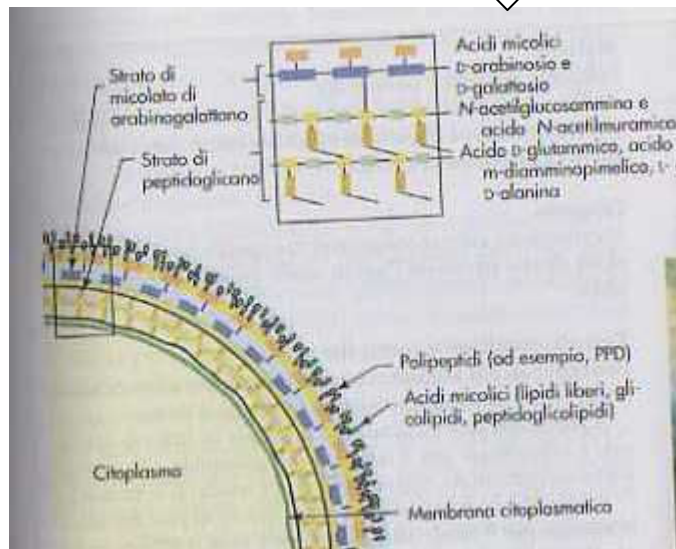
L'esame microscopico si basa sulla colorazione di Gram e sulla successiva **reazione di "quellung"** (reazione di rigonfiamento), in cui anticorpi anticapsulari vengono mescolati con i batteri e poi vengono esaminati al microscopio → un aumento di rifrangenza indica una reazione positiva.

## MICOBATTERI: TUBERCOLOSI

I micobatteri sono bacilli **acido-resistenti**, grandi fino a 10 micron, aerobi, immobili e non sporigeni.



Non possono essere decolorati con acidi.



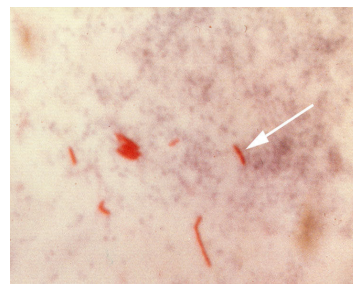
I micobatteri possiedono un parete cellulare complessa e ricca di lipidi.

All'esterno della membrana cellulare sono presenti uno strato di peptidoglicano legato covalentemente a uno strato di arabinogalattano (arabinosio e galattosio) a loro volta legati covalentemente a uno strato più esterno di acidi micolici e peptidi (detti PPD che sta per derivati proteici purificati)

*M. tuberculosis* è l'agente eziologico della tubercolosi che negli ultimi anni, per una serie di concomitanti circostanze di rilievo epidemiologico (immigrati, aumento delle patologie causa di immunodepressione, ecc.) deve essere considerata una patologia "riemergente". La tubercolosi è caratterizzata dalla formazione di granulomi (denso infiltrato di cellule mononucleate che

circonda macrofagi e cellule giganti multinucleate → cellule di Langerhans) nei tessuti infetti e da un'accentuata ipersensibilità cellulo-mediata.

## COLORAZIONE DI ZIEHL NEELSEN





## Legionella Pneumophila

Gram-negativo che ha come habitat ideale ogni riserva d'acqua naturale o artificiale (può replicarsi nelle amebe acquatiche). Agente eziologico della febbre di Pontiac e della febbre dei legionari (più grave). E' acquisito per inalazione di aerosol infetto. Si replica nei macrofagi alveolari inibendo la fagocitosi.

**Legionella cresce lentamente (5-10 giorni) in terreni artificiali in atmosfera CO2 al 5%.**

## Coxiella burnetii

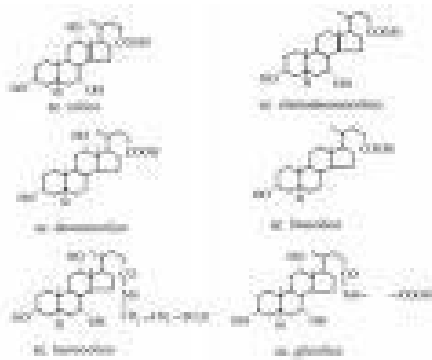
E' responsabile della febbre Q. Il vettore in generale non c'è (si trasmette per aerosol contaminato) ma le zecche possono trasmetterla. I serbatoi sono gli erbivori.

Le infezioni possono avere decorso acuto o cronico: nella forma acuta si hanno febbre, brividi, cefalea, mialgia, e polmonite interstiziale. La forma cronica porta a endocardite, che porta generalmente all'exitus.

La diagnosi diretta è poco usata perché comporta dei rischi e scarse garanzie nei risultati.

La diagnosi indiretta si basa sui classici test di fissazione del complemento e di immunofluorescenza, ma soprattutto sul **test di Weil-Felix** → nel siero di pazienti con rickettsiosi sono presenti agglutinine contro alcuni tipi del batterio Proteus; si pone a contatto il siero del paziente con sospensioni di Proteus e si valuta l'agglutinazione.

## MYCOPLASMA PNEUMONIAE



SONO I PIÙ PICCOLI BATTERI: SONO GLI UNICI BATTERI SPROVVISTI DI PARETE CELLULARE E AVENTI UNA MEMBRANA CONTENETE

**STEROLI.** SONO FILAMENTOSI CON DIAMETRO PICCOLISSIMO: 0,1-0,3 MICRON (SI CREDEVA ADDIRITTURA IN PASSATO CHE FOSSERO VIRUS. SONO ANAEROBI FACOLTATIVI.

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<b>Prelievo:</b>	espettorato
<b>Esame culturale:</b>	aspetto granuloso, forma emisferica, manca la porzione centrale approfondita ("uovo fritto"), attività β-emolitica. Mycotrym 37°C per 7 giorni.
<b>Esame sierologico:</b>	ricerca di anticorpi anti- <i>M. pneumoniae</i> che sono molto diffusi nei soggetti sani pertanto sono necessari 2 campioni per verificare la variazione di titolo (7-10 giorni di distanza). IFA o ELISA

M. PNEUMONIAE E' UN PATOGENO EXTRACELLULARE CHE ADERISCE ALL'EPITELIO RESPIRATORIO ATTRAVERSO UN'ADESINA DETTA PI, CHE ADERISCE ALLE CIGLIA E CREA **CILIOSTASI** → CIÒ INTERFERISCE CON LA **CLEARANCE** DELLE VIE RESPIRATORIE. INOLTRE È ANCHE UN SUPERANTIGENE. SI HA UNA TOSSE PERSISTENTE.

LE **POLMONITI** CAUSATE DA QUESTO PATOGENO SONO **UBIQUITARIE** E COLPISCE SOPRATTUTTO BAMBINI E GIOVANI IN ETÀ SCOLARE. COMPLICANZE SECONDARIE SONO L'OTITE MEDIA, L'ERITEMA MULTIFORME (SINDROME DI STEVENS- JOHNSON), ANEMIA EMOLITICA, MIOCARDITE, SINTOMI NEUROLOGICI.

# CHLAMYDIACEAE

La famiglia delle Chlamydiaceae è divisa in due generi, Chlamydia e Chlamydophila. Possiedono una **membrana interna e una esterna**, sono quindi simili ai gram-negativi. SONO TUTTAVIA SPROVVISTI DELLO STRATO DI PEPTIDOGLICANO.

Le Chlamydiaceae esistono in due forme morfologiche distinte: un piccolo **corpo elementare (CE)** infettante (300-400 nm) e un **corpo reticolato (CR)** non infettante.

Il CE da un punto di vista funzionale è molto simile a una spora (forme resistenti, tuttavia infettanti “a differenza delle spore”). La CR è la forma replicativa della Clamidia. Una differenza importante tra CE e CR è che il primo ha molti ponti disolfuro tra le proteine di superficie (molto forte il legame della parete), il secondo non li ha (è più fragile ma sono comunque protette avendo collocazione intracellulare).

Il ciclo comprende un attacco ai microvilli delle cellule sensibili (CE), la penetrazione in un fagosoma ove avviene il ciclo replicativo (CR) e la successiva riorganizzazione in CE.

## Chlamydophila pneumoniae

E' un'infezione che è stata isolata inizialmente a Taiwan e che si trasmette attraverso le secrezioni respiratorie. Causa bronchite, polmonite e sinusite. La maggior parte delle infezioni è asintomatica, ma possono esserci tosse persistente e malessere.

## Chlamydophila psittaci

E' l'agente eziologico della **psittacosi, la cosiddetta febbre dei pappagalli**. In realtà un nome più appropriato è quello di **ornitosi** in quanto tutti gli uccelli possono fungere da potenziali serbatoi e non solo i pappagalli. Il batterio si trasmette per inalazione e colpisce il SRE, quindi soprattutto fegato e milza. Il polmone e altri organi vengono colpiti in seguito a diffusione ematica, e si manifesta necrosi focale dei vari tessuti colpiti. In casi più gravi può esser colpito il SNC.

Sono particolarmente a rischio veterinari, lavoratori degli zoo, lavoratori di negozi animali. Il contagio interumano è molto molto raro.

Queste infezioni possono essere trattate efficacemente con tetracicline.



**La diagnosi di Clamidie può essere diretta, con l'isolamento del batterio in colture cellulari, o indiretta, con la ricerca di anticorpi tramite il test di fissazione del complemento**

## Batteri anaerobi

Cocchi Gram-positivi	Peptococcus spp., Peptostreptococcus spp., Ruminococcus spp., Sarcina spp.
Cocchi Gram-negativi	Veillonella spp., Megasphaera spp., Acidaminococcus spp.
Bacilli Gram-positivi, asporigeni, non ramificati	Lactobacillus spp., Eubacterium spp.
Bacilli Gram-positivi, asporigeni, ramificati	Propionibacterium spp., Actinomyces spp., Bifidobacterium spp., Arachnia spp.
Bacilli Gram-positivi, sporigeni	Clostridium spp.
Bastoncini Gram-negativi	Bacterioides spp., Fusobacterium spp.

## Anaerobi

Sono saprofiti ma diventano patogeni in particolari condizioni: ascesso e gangrena polmonare, bronchiectasie, polmonite secondaria a processi ostruttivi.

<b><u>Prelievo:</u></b>	aspirato transtracheale
<b><u>Esame macroscopico:</u></b>	odore fetido, produzione di gas
<b><u>Esame microscopico:</u></b>	colorazione di Gram
<b><u>Esame colturale:</u></b>	Schaedler Anaerobe Agar Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar in anaerobiosi (10% CO <sub>2</sub> per 48-72h)

## MICETI

Polmoniti micotiche interessano per lo più soggetti immunodepressi o defedati: *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*

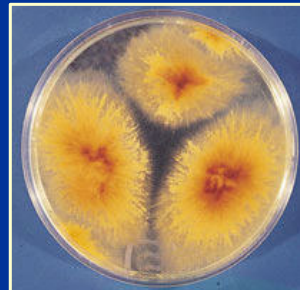
**Prelievo:** espettorato

**Esame microscopico**

- Colorazione di Gram

**Esame colturale**

- Terreno: Sabouraud o Mycosel  
Incubazione a 37°C per 48 ore.



## INFEZIONI DEL SANGUE ED EMOCOLTURA

Il sangue è normalmente sterile. Tuttavia nel corso di diverse patologie infettive può esserci batteriemia, il cui sintomo più caratteristico è la cosiddetta “febbre di natura da determinarsi” che dura per oltre tre settimane. Per la diagnosi eziologica delle forme infettive l’indagine microbiologica principale è l’emocoltura, che va eseguita ogni volta che si sospetti una batteriemia.

### INDICAZIONI CLINICHE

- Nelle sepsi in cui è presente brivido, febbre, aumento frequenza cardiaca
- Sepsi neonati o soggetti immunodepressi con scarsi sintomi specifici
- Passaggio in circolo di batteri nel corso di polmoniti, meningiti, endocarditi, ascessi profondi (fegato, milza), ecc.
- Febbre tifoide, brucellosi, leptospirosi
- In seguito a manovre endoscopiche o estrazioni dentarie
- Pazienti con neoplasie

### Numero e ritmo dei prelievi

Non è standard ma **dipende dalla situazione**:

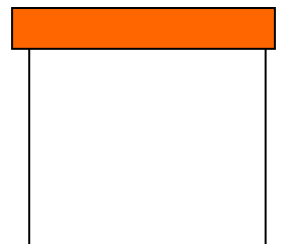
- In caso di pericolo di vita si procede immediatamente al prelievo di 2 campioni del volume di minimo 10 ml.
- In casi meno gravi si eseguono 3-4 prelievi nelle 24 ore e, poiché la febbre segue di circa un’ora la fase di batteriemia, è importante fare il prelievo ai primi segni di aumento della temperatura.
- Nei casi di sospetta batteriemia intermittente in più giorni, si eseguono emocolture in occasione dei rialzi febbrili
- Nei casi in cui è già stato iniziato un trattamento antimicrobico bisogna eseguire non meno di 6 emocolture in 48 ore, prelevando campioni prima della somministrazione dell’antibiotico



### Modalità di prelievo

La **cute rappresenta la maggior fonte di contaminazione** esogena dell’emocoltura, ed è quindi necessario attuare un’accurata disinfezione. Innanzi tutto non bisogna palpare la vena con le dita, ma, se necessario, con guanti sterili. La zona del prelievo deve essere quindi detersa e sgrassata con alcol etilico, quindi disinfettata con alcol iodato al 2%, e successivamente detersa nuovamente con alcol etilico, per evitare che il disinfettante penetri nell’ago e svolga azione antibatterica sulle colture.

Per il prelievo di sangue destinato all’emocoltura sono impiegati:



- “Transfer set” sterili costituiti da un tubicino di plastica corredato alle 2 estremità da due aghi, attraverso cui è possibile la semina diretta del sangue proveniente dalla vena del paziente nel flacone contenente il terreno di coltura.
- “Bottiglie tipo vacutainer” sotto vuoto complete di terreno di coltura.
- “Siringhe di plastica sterili” con cui il sangue è seminato attraverso il tappo di gomma nel flacone contenente il terreno di coltura.

**Gli anticoagulanti** impiegati per le emocolture sono il Sodio Polianethol Sulfonato (SPS) e il Sodio Amilo Solfato (SAS), che, oltre a inibire l'emocoagulazione, hanno azione neutralizzante nei confronti del potere battericida del sangue.

### **Terreni di coltura**

I terreni di coltura devono permettere la crescita di **tutti i possibili agenti di batteriemia**, compresi quelli con particolari richieste nutrizionali. I terreni più usati sono “Brain Heart Infusion”, “Columbia Broth”, “Thiol Broth”, “Tioglycollate Medium”, “Trypticase Soy Broth” ecc.

**I terreni di coltura possono essere allestiti in forma monofasica (liquida) o bifasica (liquida e solida).**

Nel primo caso il flacone contiene un “brodo nutritivo”; nel secondo, oltre al “brodo nutritivo”, è presente agar.

#### **I terreni solidi si distinguono in:**

- **non selettivi** favoriscono la crescita della maggior parte dei microrganismi
- **selettivi** con aggiunta di sostanze che favoriscono la crescita di determinate specie e ne inibiscono la crescita di altre (es MSA)
- **elettivi** favoriscono lo sviluppo di una specie o di un gruppo di specie affini ma non impediscono lo sviluppo di altri batteri (es. Loffler)
- **arricchiti** Con aggiunta di una o più sostanze nutritive. Sono utilizzati per i batteri più esigenti (brodo selenite)
- **differenziali** Contengono sostanze che permettono di differenziare le specie microbiche in base a specifici comportamenti biochimici (es. Kliger)
- **selettivi e differenziali** es. Mac Conkey
- **di mantenimento** Permettono il mantenimento per un periodo più lungo dei microrganismi
- **di trasporto** Non contengono carattere nutrizionale, ma rendono possibile il trasporto di un campione



### **Incubazione**

**I risultati migliori si ottengono incubando un flacone in aerobiosi e uno in anaerobiosi.** L'atmosfera dei flaconi in commercio a chiusura ermetica è CO<sub>2</sub> al 10% → dopo la semina del sangue uno dei due flaconi viene ventilato con aria sterile facendo passare l'aria attraverso un ago sterile (aerobiosi); l'altro flacone viene lasciato chiuso. I flaconi sono quindi posti a incubare in termostato a 37°C per almeno 7 giorni.



## Esame delle colture

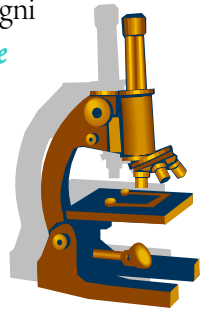
L'esame delle colture va effettuato ogni giorno, evitando accuratamente ogni agitazione e osservando ogni tipo di variazione (intorbidamento, variazioni di colore, emolisi, bolle di gas ecc.) nel terreno. *Se l'esame ispettivo delle colture è positivo*, si allestiranno immediatamente esami microscopici e sottocolture.

L'esame microscopico principale è sicuramente la colorazione di Gram, ma anche la colorazione di Ziehl-Neelsen è importante (per i batteri acido resistenti).

Le sottocolture dei flaconi in aerobiosi vengono eseguite su piastre di agar-cioccolato a 37°C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 10%.

Le sottocolture dei flaconi in anaerobiosi vengono eseguite su piastre di agar-sangue in doppio, cioè una in aerobiosi e un in anaerobiosi.

*Se l'esame ispettivo delle colture è negativo*, si allestiranno sottocolture per almeno 20 giorni.



## Interpretazione dei risultati

Si basa essenzialmente su tre fattori: la ripetitività dell'isolamento, il tipo di microorganismo, e la produzione di anticorpi specifici.

### 1. RIPETITIVITA' DELL'ISOLAMENTO

E' importante per evitare di riportare dei falsi positivi (per aumentare la sensibilità della coltura).

### 2. TIPO DI MICROGRANISMO

Agenti patogeni	Caratteristiche cliniche particolari delle sepsi
<i>Streptococcus di gruppo A</i>	Eritema puntiforme, lingua, pallore periorale
<i>Streptococcus di gruppo B</i>	Sepsi neonatali
<i>Streptococcus di gruppo D</i>	Nelle giovani donne e negli uomini anziani dopo interventi sull'apparato genito-urinario
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Presenza di polmonite lobare; a volte ittero; dopo splenectomia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lesioni cutanee, esantema eritematoso
<i>Staphylococcus albus</i>	Protesi cardiache e valvola di Spitz-Holter
<i>Escherichia coli</i>	Infezioni urinarie, biliari, peritoneali, shock
<i>Ps. aeruginosa</i>	Ustioni, leucemie, Ecthyma gangrenosum
<i>Bacteroides</i>	Recente intervento chirurgico addominale. Pus maleodorante
<i>N. meningitidis</i>	Petecchie, shock, meningite
<i>S. typhi</i>	Roseola, disordini intestinali, dati epidemiologici
<i>Br. melitensis</i>	Artromialgie, sudorazioni, dati epidemiologici
<i>Leptospira</i>	Cefalea, febbre, mialgie, alterazioni epatiche (con o senza ittero) e renali, emorragie
<i>Listeria monocytogenes</i>	Febbre durante il terzo trimestre di gravidanza. Ascessi o granulomi disseminati nel neonato o dell'adulto. Infezioni focali (cute, occhio, linfonodi, ossa, endocardio)
<i>Legionella pneumophila</i>	Mialgie, cefalea, brividi, dolori toracici, diarrea o vomito; stato confusionale
<i>Rickettsiae: Coxiella burnetii</i> (febbre Q)	Improvviso attacco febbrile, intensa sudorazione, mialgie, anoressia, intensa cefalea frontale, tosse secca
<i>Rickettsia prowazekii</i> (tifo esantematico)	Febbre con stato confusionale, tipiche emorragie cutanee (petecchie)

## REAZIONI NEI TERRENI AGARIZZATI

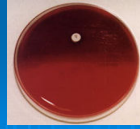
### Emolisi su agar sangue

Capacità che alcuni batteri hanno di lisare i globuli rossi.

➤ **Alfa-emolitici:** emolisi parziale per trasformazione della emoglobina in un derivato metaemoglobina-simile che si ossida dando un prodotto biliverdina-simile

Streptococchi  $\alpha$ -emolitici o viridanti

*Str. viridans*



➤ **Beta-emolitici:** emolisi completa, con alone trasparente attorno alla colonia per lisi dei globuli rossi (*S. pyogenes* detto streptococco  $\beta$ -emolitico)

*Str. pyogenes*



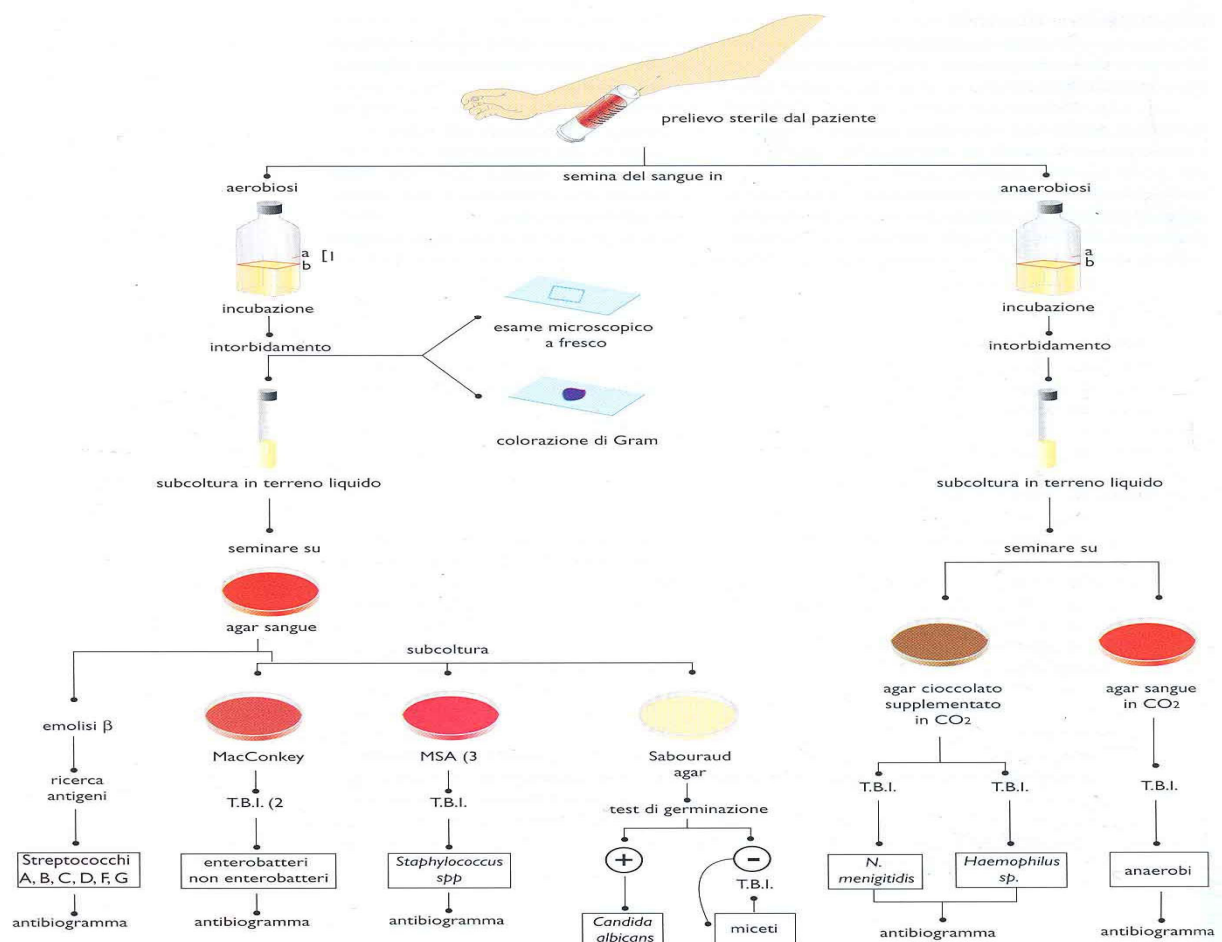
➤ **Gamma-emolitici:** nessun cambiamento nel terreno intorno alle colonie per assenza di lisi dei globuli rossi (detti streptococchi  $\gamma$ -emolitici o anemolitici)

Oltre all'emolisi possono essere altre le caratteristiche di riconoscimento dei batteri; ad esempio diversi batteri si distinguono in base alla capacità di fermentare il lattosio (es. E.Coli, Salmonella, Shigella, Proteus, Pseudomonas ecc.); alcuni batteri producono dei pigmenti (*S. aureus* produce un pigmento dorato, mentre *Pseudomonas* produce un pigmento verde, la piocianina; in alcuni batteri può essere evidenziata la mobilità ecc.

## 3. ANTICORPI SPECIFICI

E' una dimostrazione poco usata e si basa sul movimento specifico di un anticorpo verso il microorganismo isolato. Può essere determinante in casi dubbi.

## SCHEMA RIASSUNTIVO DELL'EMOCOLTURA



# INFEZIONI DELLE VIE URINARIE

## VIE URINARIE

FLORA MICROBICA NORMALE ♂
Staphylococcus epidermidis, difteroidi, E.Coli.

FLORA MICROBICA NORMALE ♀
Lattobacilli, E.Coli, altre enterobacteriaceae, Staphylococcus epidermidis, altri aerobi e anaerobi

**CAUSE PREDISPONENTI L'INFEZIONE:** Le cause predisponenti possono essere fisiologiche o patologiche. Tra quelle *fisiologiche* ci sono il sesso e la gravidanza (nella donna le variazioni di PH possono favorire determinate infezioni, mentre in gravidanza gli ureteri sono parzialmente ostruiti dall'utero gravido → può esserci stasi urinaria con ristagno batterico e moltiplicazione). Tra le cause *patologiche* sono da ricordare le alterazioni anatomico-funzionali che determinano un'ostruzione al flusso urinario, il cateterismo e la caduta delle difese immunitarie.

## LABORATORIO DELLE INFEZIONI URINARIE:

**Il tempo utile di raccolta** del campione dall'ultima minzione varia dalle 3 alle 6 ore, con una media standard di 5 ore. E' importante che ogni Laboratorio mantenga fisso questo tempo per ottenere risultati riproducibili e confrontabili.

**La modalità di raccolta** del campione può essere diversa:

- **Cateterismo vescicale:** tecnica ormai abbandonata perché è stata accertata la contaminazione di microrganismi esogeni attraverso il catetere stesso.
- **Puntura sovrapubica:** si esegue accurata rasatura, disinfezione cutanea e si punge la vescica con ago, 2-3 cm al di sopra della sinfisi pubica. Quando l'urina comincia a defluire si innesta una siringa. Si fa quindi urinare il paziente per evitare contaminazione batterica lungo il tragitto dell'ago.
- **Sacchetto di plastica adesivo:** è il metodo d'elezione per i bambini; dopo accurato lavaggio della regione perineale e sovrapubica e disinfezione, le stesse superfici vengono asciugate e si applica un apposito sacchetto sterile di plastica. Per facilitare la raccolta si può far uso di diuretici.
- **Mitto intermedio:** E' la tecnica più praticata; dopo accurato lavaggio del glande o del meato uretrale, viene raccolto il flusso intermedio della minzione, scartando il primo getto che può essere contaminato dalla normale flora microbica.

**I contenitori** devono essere sterili, in plastica, monouso, a bocca larga e muniti di chiusura ermetica.

**Il tempo utile per l'esame** è 30 minuti a temperatura ambiente, 6 ore se l'urina viene mantenuta a +4°C, 24 ore a +4°C previa aggiunta di acido borico all'1,8%.

**BATTERIURIA**: per batteriuria significativa si intende la presenza di batteri nelle urine in quantità superiore a quella normalmente riscontrata come indice di contaminazione uretrale; il limite universalmente accettato è  **$10^5$  batteri/ml**.

Normalmente la maggior parte delle urine di soggetti sani sono sterili, o contengono numero scarsissimo di microrganismi. Ciò è dovuto almeno in parte al flusso urinario che elimina gli eventuali microrganismi prima che possano moltiplicarsi in misura esponenziale; oltre a questo ci sono naturalmente le difese immunitarie dell'ospite.

**LEUCOCITURIA (PIURIA)**: non sempre una piuria accompagna una batteriuria e viceversa. Il numero dei leucociti può essere contato in un determinato periodo di tempo (leucometria/oraria) oppure in una unità di misura del campione (leucometria/volume). I valori normali sono rispettivamente 200.000-400.000 e 6-10 leucociti/ $\mu$ l.

**DIAGNOSI, METODI DIRETTI E INDIRETTI**: i metodi diretti si avvalgono dell'osservazione microscopica a fresco o previa colorazione oppure di metodi colturali. I metodi indiretti utilizzano invece le proprietà metaboliche dei microrganismi per risalire alla loro presenza.

#### METODI DIRETTI

- ⓐ **Microscopio**: si pratica il conteggio in camera di Burker, meglio se in contrasto di fase.
- ⓐ **Coltura classica**: si parla di "coltura agar-germi", considerato il metodo di elezione; si inocula 1 ml di diluizione di urina in piastra di Pेत्रi con terreno di agar-tiptosio. Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore si contano le colonie e si risale alla carica batterica espressa in numero/ml.
- ⓐ **Coltura semplificata o dip-slide**: consta di un vetrino porta oggetti ricoperto su entrambi i lati da due o più tipi di terreni solidi di coltura; da una parte l'agar nutritivo consente la moltiplicazione di batteri patogeni, dall'altra ci sono terreni selettivi per le Enterobacteriaceae. Il vetrino viene immerso brevemente nell'urina e incubato a 37°C per 18-24 ore.

#### METODI INDIRETTI

Sono fondamentalmente test di screening (spesso anche in commercio); un esempio sono le cartine per l'esame chimico delle urine (es. test dei nitriti → vedi esame delle urine).

#### DIAGNOSI DI SEDE DELL'INFEZIONE

- ⓐ **Test enzimatici**: in caso di interessamento del parenchima renale, il tasso di escrezione urinaria di alcuni enzimi è proporzionale al danno (enzimi come indicatori di sofferenza tessutale). Alcuni di questi enzimi sono la LD5 (5° isoenzima), la malico deidrogenasi (MDH), la fosfatasi alcalina (ALP), il lisozima, l'N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasi (NAG).
- ⓐ **Ricerca di anticorpi circolanti**.
- ⓐ **Complessi batteri-anticorpi nelle urine (test di Thomas)**: naturalmente si fa uso dell'immunofluorescenza (anticorpi marcati anti-Ig umane)
- ⓐ **Test "ex juvantibus"**: si somministrano 3g di amoxicillina. Se l'infezione non si risolve è molto probabile che riguardi le alte vie.

## POTERE ANTIBATTERICO RESIDUO (PAR)

E' utile sapere che in un paziente con esame colturale negativo in cui si sospetta però un'infezione, è opportuno procedere all'accertamento dell'attività antibatterica dell'urina, che ci consente di rilevare una recente somministrazione di chemioantibiotici anche quando ciò non può essere desunti dall'anamnesi.

Il PAR test si effettua utilizzando stipti di b. termofili, sensibili agli antibiotici di uso comune; una piccola quantità del campione biologico viene posta su piastra di agar-germi a incubare per alcune ore a **58°C**. Poiché a questa temperatura i più importanti fattori naturali di difesa vengono inibiti, mentre non viene modificata l'attività antibatterica degli antibiotici, la presenza di questi ultimi sarà evidenziata da una inibizione della crescita batterica.

## INFEZIONI PIU' FREQUENTI

### ENTEROBACTERIACEAE

Possono riguardare le vie urinarie E.Coli, Proteus, Enterobacter, Klebsiella.

### ESCHERICHIA COLI

Questo batterio può determinare un'infezione delle vie urinarie **attraverso tre vie**: ascendente, linfatica, ematica.

La via ascendente è più frequente nella donna, per la brevità dell'uretra.

La via linfatica è rara.

Le infezioni ematogene originano soprattutto dall'intestino.

La classificazione di E.Coli si basa su **tre antigeni**: O, H, K (antigene capsulare). Altri fattori di virulenza importanti sono **le fimbrie** e soprattutto **le endotossine** (v. infezioni intestinali).

### PROTEUS MIRABILIS

Spesso si riscontra in infezioni miste. La via di infezione più frequente è quella ascendente. La sua patogenicità è legata soprattutto all'**ureasi**, che scinde l'urea in CO<sub>2</sub> e ione ammonio, con formazione di calcoli di fosfato triplo e lisi dei globuli bianchi.

### KLEBSIELLA ED ENTEROBACTER

Queste infezioni ricorrono soprattutto in pazienti ospedalizzati per lunghi periodi e trattati con antibiotici.

### PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Colpisce le vie urinarie di pazienti con **cateteri urinari** e trattati con antibiotici. Ha anch'esso (come proteus) attività alcalinizzante che favorisce la formazione di calcoli.

### ENTEROCOCCHI

Infezioni di tipo ascendente in **pazienti ospedalizzati** e trattati con antibiotici.



## STREPTOCOCCHI

Gli streptococchi di tipo A (beta emolitici), di cui il più importante è **streptococco pyogenes**, sono responsabili della glomerulonefrite acuta (in questo caso però il batterio non si troverà nelle urine perché la glomerulonefrite è **post-streptococcica** ed è dovuta a **precipitazione di immunocomplessi**).

## STAFILOCOCCI

**Stafilococcus aureus**, grazie ai numerosissimi fattori di virulenza (coagulasi, emolisina, DNAsi, ialuronidasi, lipasi, tossine ecc. causa numerose infezioni, ma non sono frequenti le infezioni alle vie urinarie.

**Stafilococcus epidermidis** non ha invece tutti questi fattori di virulenza, ma può essere più spesso responsabile di infezioni delle vie urinarie, quali cistiti, ascessi renali, nefriti.

## CANDIDA

E' **raramente** causa di infezioni delle vie urinarie; quando avviene, la sede principale è la **vescica**.

## FORME L

Nei casi di infezione cronica recidivante con reperti batteriologici negativi, è consigliabile la ricerca delle "forme L", microrganismi polimorfi e scarsamente colorabili, resistenti a molti antibiotici ma labili agli insulti osmotici. Le forme L **derivano da microrganismi intatti che hanno perso la parete**, ma che possono anche esprimere fattori di virulenza.

## MICOBATTERI

Sono batteri immobili, asporigeni, aerobi, acido-alcol resistenti. La crescita nel terreno di coltura è lento (la diagnosi richiede almeno 20-25 giorni). Oltre a mycobacterium tuberculosis, recentemente è stata costruita una classificazione dei cosiddetti micobatteri atipici, che possono anche trovarsi nelle urine:

Gruppo	Nome	Specie rinvenute nelle urine	Sviluppo a 37 °C	Sviluppo a 25 °C	Pigmento	Rilievi
I	Fotocromogeni	<i>M. Kansasii</i>	Lento	Lento	Giallo	Produzione di pigmento dopo la esposizione alla luce
II	Scotocromogeni	<i>M. scrofulaceum</i> (sin. <i>Marinum</i> )	Lento	Assente	Giallo arancio	Produzione di pigmento sia alla luce che allo scuro
III	Non cromogeni	<i>M. avium</i> <i>xenopi</i> intracellulare	Lento	Assente	Assente	Differenziabili da <i>M. Tuberculosis</i> per le minori dimensioni, per la resistenza alla isoniazide; sono catalasi positivi
IV	Saprofiti	<i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. borstelense</i>	Rapido**	Rapido	Assente	—

\*\* Per sviluppo rapido si intende la comparsa di colonie visibili ad occhio nudo dopo 5-7 giorni di incubazione.

\* Da Runyon, semplificata.

*Il terreno di coltura ideale per la crescita (e quindi la visualizzazione) dei micobatteri è il **terreno di Middlebrook** (oleic, acid alumin agar) con incubazione ad un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%. La **colorazione di Ziehl-Neelsen** consente di escludere i micobatteri atipici (acido ma non alcol resistenti) e quindi di visualizzare *M.tuberculosis*.*

# SISTEMA ENDOCRINO

## CAPITOLO 16

### RIPASSO SUI MECCANISMI D'AZIONE DEGLI ORMONI

Gli ormoni hanno **4** diversi meccanismi d'azione:

- **ACTH, FSH, LH, TSH, hCG, paratormone, glucagone e catecolamine**, non essendo in grado di attraversare la membrana cellulare (sono polari), devono interagire con i recettori e attivare la cascata della trasduzione del segnale mediata dal secondo messaggero **cAMP**. In questi due casi gli ormoni si legano a recettori che interagiscono con **proteine G**, la cui attivazione dipende dall'aver legato o meno GTP (attive) o GDP (inattive). Il legame dell'ormone con il recettore permette il legame del GTP sulla proteina G, che, attivata, distacca la sua porzione  $\alpha$ . Quest'ultima attiva l'enzima **adenilato ciclasi**, che produce cAMP. Questo secondo messaggero, nel citoplasma, attiva una serie di **chinasi cAMP dipendenti**, che vanno ad agire su molti processi cellulari. E' importante ricordare che la [cAMP] è regolata dall'enzima **fosfodiesterasi**, che lo riconverte in AMP.
- **I fattori di rilascio ipotalamici e l'ADH** agiscono con n meccanismo simile, legandosi a un recettore che interagisce con una proteina G, ma attivando l'enzima **fosfolipasi C**, che genera i secondi messaggeri **inositolo trifosfato e diacilglicerolo**. Quest'ultimo determina il rilascio del **calcio**, che legandosi alla calmodulina, attiva la **proteinchinasi C**.
- **L'insulina** stimola direttamente, legandosi al suo recettore, **l'attività tirosinchinasica** dello stesso.
- **Gli ormoni steroidei e quelli tiroidei** possono attraversare la membrana e si legano, **nel citoplasma**, a una molecola recettoriale che li trasporta nel nucleo, dove il complesso **attiva direttamente la trascrizione** di geni.

### ORMONI DELL'IPOFISI ANTERIORE

L'ipofisi anteriore è la parte ghiandolare vera e propria (adenipofisi), e produce le tropine (ACTH, FSH, LH, TSH), l'ormone della crescita e la prolattina. E' **controllata dai fattori di rilascio e di inibizione ipotalamici attraverso il circolo vascolare portale ipotalamico-ipofisario**.

Nell'ipofisi anteriore ci sono **3 tipi di cellule**:

1. **Acidofile, PAS-negative**, che producono peptidi: GH e prolattina
2. **Basofile, PAS-positive**, che producono glicoproteine (TSH, LH e FSH, che hanno la catena alfa comune e la catena beta che li differenzia)
3. **Cromofobe**, che producono (secondo alcuni testi, secondo altri no) ACTH.

In realtà l'ACTH deriva dal taglio proteolitico della **POMC** (pro-opiomelanocortina), da cui derivano anche l'MSH, le lipotropine e le endorfine, analgesici naturali.

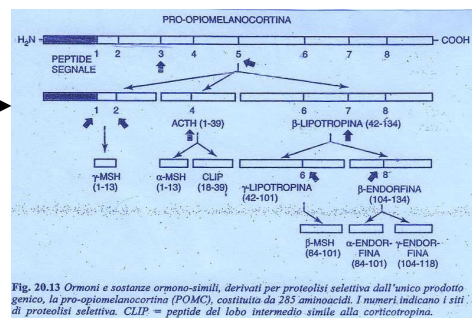


Fig. 20.13 Ormoni e sostanze ormono-simili, derivati per proteolisi selettiva dall'unico prodotto genico, la pro-opiomelanocortina (POMC), costituita da 283 aminoacidi. I numeri indicano i siti di proteolisi selettiva. CLIP = peptide del lobo intermedio simile alla corticotropina.

### GH: ORMONE DELLA CRESCITA

#### Effetti metabolici

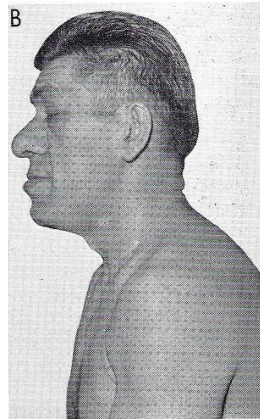
Il GH stimola la sintesi dell'RNA, incrementando la sintesi proteica e l'anabolismo. In realtà il suo effetto non è diretto ma mediato da fattori epatici detti **somatomedine**, anche denominate fattori di crescita simil-insulinici (IGF), tra cui la più conosciuta è la somatomedine C. Questi fattori determinano la **crescita della cartilagine** a livello delle giunzioni ossee tra epifisi e diafisi, la **mobilizzazione degli acidi grassi** dal tessuto adiposo alle cellule muscolari, l'aumento della **glicemia**, il **trasporto degli aminoacidi**.

#### Secrezione

La secrezione del GH è di tipo **pulsatile**, con picchi durante il sonno e durante lo sforzo fisico, ma anche in condizione di ipoglicemia. Nell'adulto le concentrazioni sieriche basali sono di **7ng/ml**.

### Stati di carenza e di eccesso

I bambini con grave deficit di GH sono affetti da **nanismo** ipofisario. L'eccesso di GH durante la fase di crescita provoca il **gigantismo** ipofisario. Nell'adulto stati di eccesso portano all'**acromegalia**, in cui si ha un ispessimento delle ossa, con organi interni, scheletro e miocardio ipertrofici.



### Esami di laboratorio

Esistono test di dosaggio che potremmo definire “statici” e “dinamici”.

I metodi usati nei **test statici** sono innanzi tutto la determinazione e il dosaggio del GH nel siero (campioni prelevati al mattino e a digiuno) con le tecniche radioimmunologica e immunochemioluminescente. Ma il dosaggio dei livelli sierici basali può trarre in inganno, spesso perché i livelli circolanti di ormone possono essere molto bassi o addirittura non dosabili, e indurre quindi a una diagnosi errata.

Molto più utili sono i **test dinamici**, che si basano sull'indurre stati di ipoglicemia e iperglicemia per valutare la risposta dinamica del GH. La somministrazione di insulina provoca ipoglicemia, e questo dovrebbe far aumentare i livelli plasmatici di GH: vengono fatti prelievi ematici al tempo 0 e poi dopo 15,30,45,60,90 e 120 minuti. Una persona normale dovrebbe incrementare, in questo arco di tempo, i livelli di GH di almeno 5-7ng/ml oltre i valori di base. L'altro test dinamico si basa sull'indurre iperglicemia. Un paziente normale avrà un abbassamento di valori di GH nel tempo, mentre un paziente acromegalico avrà valori sempre alti, che superano i 10ng/ml.

## **PROLATTINA**

### Effetti metabolici

Stimola la crescita della ghiandola mammaria e la **produzione di latte** (attraverso la stimolazione della trascrizione dei geni della lattalbumina e della caseina), la **steroidogenesi** gonadica e surrenalica e il metabolismo (in misura molto minore) dei carboidrati e dei lipidi.



### Secrezione

La secrezione di prolattina, controllata da un fattore di inibizione ipotalamico (**PIF**), aumenta **durante la gravidanza**, in seguito a stimolazione estrogenica, e nella suzione (stimolazione dei capezzoli). **Negli uomini e nelle donne non gravide** la secrezione è pulsatile con picchi durante il sonno, lo stress, l'ipoglicemia. I valori medi sono circa **5ng/100ml** nell'uomo e **8ng/100ml** nella donna.

### Esami di laboratorio

Il dosaggio di prolattina è utilizzato nella valutazione clinica della **galattorrea** e dell'**amenorrea** (rispettivamente secrezione profusa e secrezione molto scarsa di latte;) e nella diagnosi di **adenomi acidofili** dell'ipofisi, nei quali il valore più spesso alterato è proprio quello della prolattina. Alti livelli di prolattina nell'uomo sono spesso associati a **impotenza**.

## ORMONI DELL'IPOFISI POSTERIORE

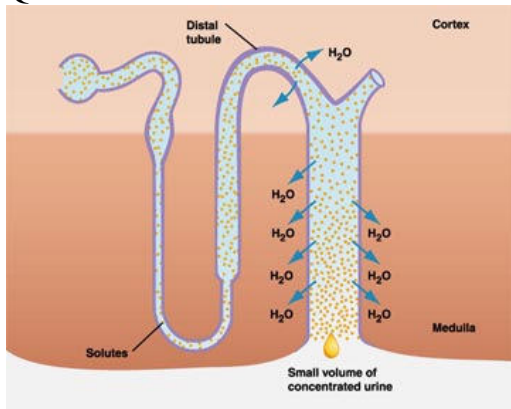
L'ipotalamo sintetizza nei nuclei sopraottico e paraventricolare la **vasopressina (ADH)** e l'**ossitocina**, ormoni che vengono trasportati come gocce di neurosecreto (**gocce di Hering**) lungo i neuriti del peduncolo ipofisario, che collega l'ipotalamo all'ipofisi posteriore (neuroipofisi). Entrambi gli ormoni sono **nonapeptidi**.

### ADH

#### Effetti metabolici

Quando aumenta l'osmolarità del LEC alcune cellule OSMOCETTRICI dell'ipotalamo anteriore, nei nuclei sopraottico o paraventricolare riducono il loro volume; ciò ne provoca l'eccitazione e inviano impulsi all'ipofisi posteriore; ciò stimola il rilascio di ADH (accumulato sotto forma di neurosecreto); l'ADH entra in circolo dove aumenta la permeabilità nei dotti distali e collettori e midollari → maggior riassorbimento di acqua.

Quando l'osmolarità del LEC diminuisce il processo è inverso.



#### Secrezione

L'ADH viene sintetizzato per circa 5/6 nel nucleo sopraottico e per circa 1/6 in quello paraventricolare. Viene accumulato in gocce di neurosecreto nei fasci che dall'ipotalamo vanno all'ipofisi, e quando i nuclei dell'ipotalamo vengono stimolati da variazioni di osmolarità si eccitano e l'eccitazione si propaga in questi fasci, fino al rilascio di calcio, che permette il rilascio delle vescicole. **La concentrazione media normale nel siero è 1,5 - 6 pg/ml.**

Una seconda regione importante per la secrezione di ADH (e quindi nel controllo dell'osmolarità) è la regione anteroventrale del terzo ventricolo, regione **A3V3**. Qui si trovano due strutture importanti: superiormente l'organo subfornicale, inferiormente l'organo vascolare della lamina terminalis; tra questi due nuclei è compreso il nucleo preottico mediano; nella regione A3V3 si trovano **osmocettori**, che reagiscono a variazioni dell'osmolarità inviando segnali al nucleo sopraottico regolandone l'eccitazione e la secrezione di ADH. E' importante dire che questa zona è vascolarizzata da vasi che non presentano la barriera emato-encefalica, cosicché i soluti in questa zona possono filtrare come in ogni altro distretto (possono rilevare variazioni di osmolarità).

*La secrezione di ADH può essere inoltre influenzata da riflessi cardiovascolari in rapporto a riduzioni della pressione arteriosa e/o del volume ematico: riflesso barocettivo arterioso e riflessi cardiopolmonari, per cui segnali che arrivano da arco aortico, seno carotideo, atri cardiaci, viaggiando attraverso i nervi vago e glossofaringeo arrivano nel tratto solitario e da qui si inviano segnali ai nuclei ipotalamici, in modo che un calo di pressione arteriosa e/o di volume ematico aumentano la secrezione di ADH.*

*Altri fattori che possono influire sulla secrezione di ADH sono sostanze o situazioni: la nausea, la morfina e la nicotina sono potenti stimolatori di ADH; l'alcool ne è invece un potente inibitore.*

**N.B.** Naturalmente l'ADH da solo non basta a riassorbire l'acqua, ma sono necessari anche i **meccanismi controcorrente** che creano il gradiente nell'interstizio renale per il potenziale riassorbimento di acqua (l'ADH non fa altro che aumentare la permeabilità all'acqua da parte delle cellule del tubulo distale e collettore).

Altro meccanismo fondamentale regolato sempre dall'area A3V3 è il **meccanismo della sete**, necessario e complementare a quello dell'ADH.

### **Patologie ed esami di laboratorio: diabete insipido e sindrome da inappropriata secrezione**



Nella condizione del **diabete insipido** la diuresi giornaliera è superiore ai 3 litri (ma può essere molto superiore). In questi soggetti l'ADH può addirittura non essere misurabile in laboratorio, e la compensazione dell'acqua persa nelle urine può avvenire solo attraverso il **meccanismo della sete** → i pazienti bevono grosse quantità di acqua.

#### **Test di concentrazione**

Per effettuare questo test il paziente non deve bere per l'intera notte → in un individuo sano che non beve per l'intera notte l'osmolalità sierica è mantenuta relativamente costante (grazie proprio all'ADH), mentre l'osmolalità urinaria sarà aumentata (fino a circa 800mOsm/Kg); in carenza di ADH, al contrario, l'osmolalità delle urine si mantiene bassa, mentre quella sierica aumenta notevolmente. Durante l'effettuazione di questo test è necessario sorvegliare i pazienti, sia per controllare che non assumano liquidi, sia per controllare che i pazienti non vadano incontro a collasso da disidratazione. Una ulteriore informazione, soprattutto sul tipo di diabete insipido, si ha nel somministrare al paziente ADH esogeno → in situazioni di deficit primitivo di ADH il paziente risponderà con urine più concentrate, mentre se il difetto è a livello renale la situazione non cambierà.

Nella **sindrome da inappropriata secrezione di ADH** (SIADH), che è praticamente l'opposto del diabete insipido) si avrà una bassa osmolalità del siero e un'alta osmolalità delle urine, per eccessiva produzione di ADH o di molecole con effetto simile che non provengono dall'ipofisi.

#### **Test di carico idrico**

Si somministrano 1000ml di acqua e si raccolgono successivamente campioni di urine e di sangue ogni ora per cinque minuti. La normale risposta al test prevede una diuresi di 600ml o più nelle 4 ore successive al carico, e un'osmolalità urinaria assai minore di quella sierica (< 180 mOsm/Kg). Nei pazienti con SIADH l'osmolalità sierica si riduce, ma l'osmolalità urinaria è sempre più elevata di quella sierica.

#### **Determinazione dell'ADH**

E' una procedura complessa e generalmente non richiesta. E' effettuata con metodica radioimmunologica. Per consentire un'adeguata interpretazione dei risultati ogni richiesta di dosaggio dovrebbe essere accompagnata dalla valutazione dell'osmolalità sierica, per rapportare i due valori.

### **PANIPOPITUITARISMO**

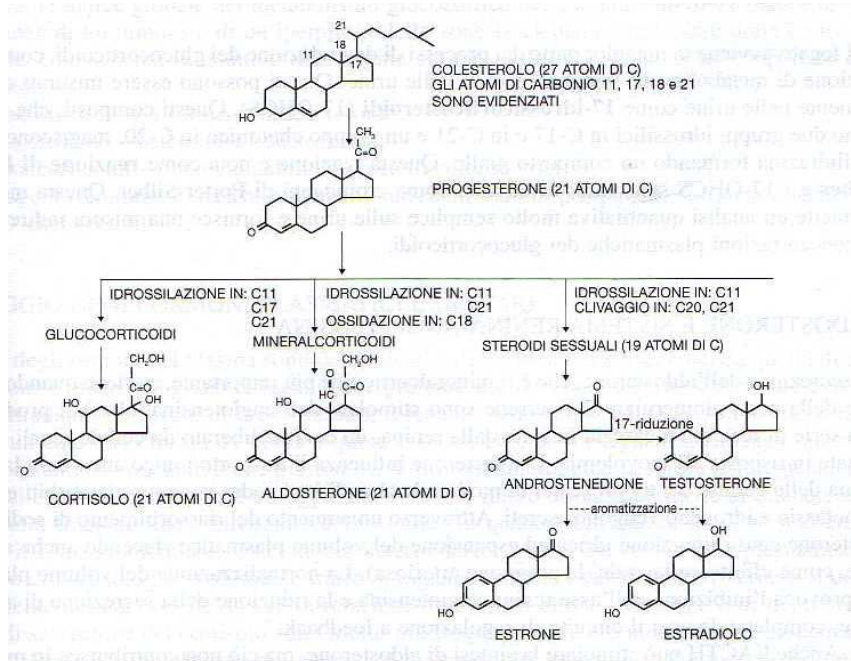
Con questo termine (*che è impossibile da pronunciare*), si indica un'insufficienza ipofisaria globale, spesso dovuta a un tumore o a patologie dell'ipotalamo che si manifestano con un iposecrezione ipofisaria.

**Un test utile per valutare la funzionalità dell'asse ipotalamico-ipofisario** si effettua provocando ipoglicemia con somministrazione di insulina, e aspettando un aumento di cortisolo fino a 20µg/dl. Questo dovrebbe normalmente accadere in quanto l'ipoglicemia stimola non solo il GH, ma anche l'ACTH. In ogni caso, qualunque disfunzione di una ghiandola controllata dall'ipofisi deve sempre far almeno ipotizzare una patologia ipofisaria.



## GHIANDOLA SURRENALE

2 porzioni distinte. La **corticale**, suddivisa in zona glomerulare (15%), fascicolata (75%) e reticolare (10%), produce rispettivamente mineralcorticoidi (aldosterone), glicocorticoidi (cortisolo) e androgeni (con funzione ancora non chiara in quanto non vengono secreti per stimolazione di gonadotropine ma di ACTH). La **midollare** produce in seguito a stimolazione simpatica adrenalina e noradrenalina.



## GLICOCORTICOIDI

### Secrezione

Stress



CRH ipotalamico



ACTH → **Cortisolo** (mobilitazione aminoacidi, glucosio, acidi grassi)  
funzione antinfiammatoria



Il principale tra i glicocorticoidi è il **cortisolo**, che per il 90% circola legato a proteine (soprattutto **transcortina**, ma anche albumina). Nel fegato avviene la degradazione dei glicocorticoidi che vengono eliminati **nelle urine**, dove possono essere misurati collettivamente come **17-idrossicorticosteroidi**, che reagiscono con la fenilidrazina formando un **composto giallo** (reazione di Porter-Silber).

## MINERALCORTICOIDI

### Secrezione

Iповolemia e ipotensione

Renina (cellule iuxtaglomerulari)

Angiotensina II

### Aldosterone

→ **Riassorbimento di sodio (attivazione della pompa sodio/potassio) nei tubuli distali e collettori, ritenzione idrica conseguente ed espansione del volume plasmatico. Escrezione di potassio. Escrezione di H<sup>+</sup> (scambio Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>)**

## ANDROGENI

E' importante solo dire che i loro cataboliti nelle urine sono composti a 19 atomi di C detti **17-chetosteroidi (17-KS)**, gli stessi cataboliti che provengono dagli androgeni testicolari (quindi nel maschio i 17-KS urinari saranno la somma di quelli testicolari e surrenalici, mentre nella donna e nel bambino la misura indicherà solo l'attività surrenalica).

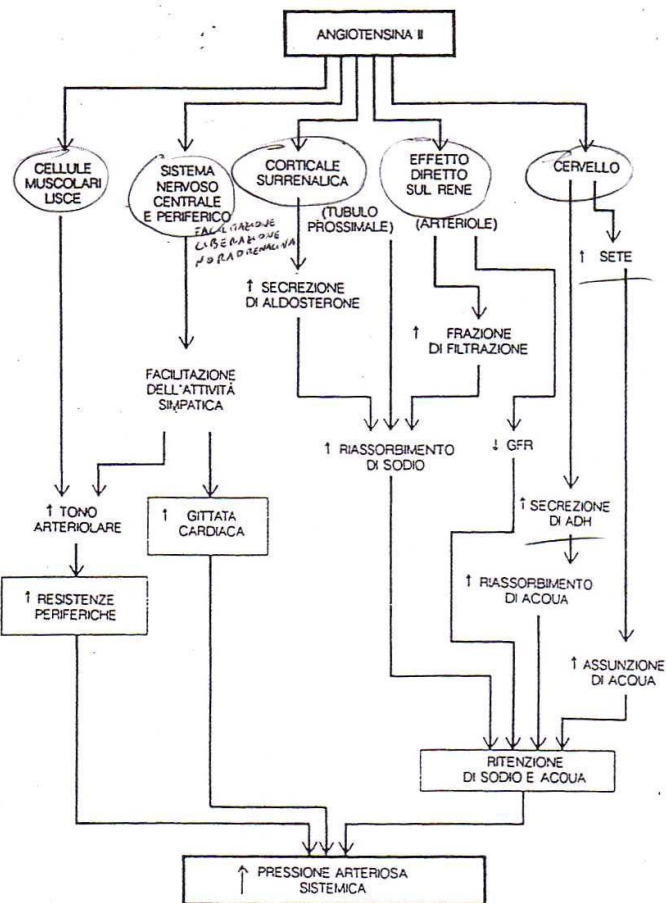
### Dosaggi

Il dosaggio di cortisolo libero isolato nell'urina permette di ottenere una stima del cortisolo libero circolante, in quanto questo è l'unico che può attraversare la membrana di filtrazione glomerulare, ma un solo valore nel corso delle 24 ore non ha senso (il cortisolo è secreto a picchi → bisogna prendere più rilevazioni).

Tutti gli ormoni prodotti dalla surrenale sono misurabili con il **RIA** (su sangue e urine) o con metodiche immunoenzimatiche. I valori normali sono questi:

Tabella 16.5 Ormoni surrenalici e loro metaboliti

Ormone o metabolita	Intervallo di riferimento
Cortisolo plasmatico	
ore 8:00	9-24 µg/dl
ore 16:00	3-12 µg/dl
Cortisolo libero urinario	20-100 µg nelle 24 ore
Aldosterone plasmatico	1-5 ng/dl (paziente supino; normale apporto di Na <sup>+</sup> e di K <sup>+</sup> )
Aldosterone urinario	2-10 µg nelle 24 ore (normale apporto di Na <sup>+</sup> e di K <sup>+</sup> )
17-idrossicorticoidi urinari	2-10 mg nelle 24 ore
17-chetosteroidi urinari	
Uomo	7-25 mg nelle 24 ore
Donna	4-15 mg nelle 24 ore



### Funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

Sono disponibili **2 test**.

Nel **test di soppressione con desametasone** si aspetta la riduzione della produzione di ACTH all'aumento dei corticosteroidi e, successivamente, che si abbia una riduzione nell'escrezione dei metaboliti steroidei: il desametasone è un potente glicocorticoide che non influenza significativamente l'escrezione di 17-OHCS urinari. Viene innanzi tutto determinato il valore base di escrezione dei 17-OHCS urinari; quindi si somministrano al paziente 0,5 mg per os di desametasone ogni 6 ore per 2 giorni. Essendo un forte inibitore di ACTH, in questo periodo la corticotropina dovrebbe abbassarsi e con essa gli 17-OHCS urinari (che come già detto non sono influenzati dalla sostanza somministrata). Se la secrezione di 17-OHCS urinari non si abbassa, potrebbe esserci una iperproduzione di ACTH o una attività ipersecretorica autonoma del surrene. Lo stesso test può essere ripetuto con dosi più alti di desametasone → se un paziente non risponde a dosi più alte (2mg) di desametasone è probabile che il paziente abbia una sindrome di Cushing o una neoplasia surrenalica.

Nel **test con metopirone**, l'ipofisi dovrebbe rispondere ai bassi livelli di cortisolemia con un notevole incremento dell'ACTH: il metopirone è un farmaco che inibisce a livello del surrene la produzione di corticosteroidi; viene somministrato a dosi di 550-750mg per os ogni 4 ore per 24 ore. Nei soggetti sani i bassi livelli di cortisolemia dovrebbero stimolare la produzione di ACTH, che, agendo sulla surrenale, dovrebbe far aumentare il numero di precursori dei corticosteroidi (quelli definitivi non si formano proprio per l'effetto del metopirone). I precursori possono essere rilevati nelle urine in quanto fanno parte dei 17-OHCS urinari, il cui dosaggio dovrebbe essere almeno doppio rispetto a quello effettuato prima del test. Questo test valuta quindi la capacità dell'ipofisi di secernere ACTH.



### Disfunzioni della corticale del surrene e altri test di laboratorio inerenti

#### Morbo di Cushing – Corticosteroidi in eccesso

Può essere dovuto a iperplasia o tumori dell'ipofisi (ACTH) e del surrene (corticosteroidi).

Le alterazioni metaboliche sono dovute sia all'eccesso di cortisolo (aumento glicemia, ipotrofia muscolare dovuta a eccessiva mobilitazione degli aminoacidi, distribuzione anomala del tessuto adiposo sul tronco per errata mobilitazione degli acidi grassi) che di aldosterone (ipertensione, eccessivo potassio nelle urine).

I reperti di laboratorio indicano che i **livelli di cortisolo** sono più alti sia nelle urine (reperto principale) che nel sangue, come sono più alti anche i 17-OHCS urinari. Per determinare la causa del morbo (ipofisi o surrene) è importante svolgere i **test sull'asse HPA** precedentemente descritti → entrambe le prove sono negative in caso di carcinoma o neoplasia surrenalica, mentre in presenza di un'iperattività ipofisaria sia ha una certa risposta nel test con desametasone ad alte dosi.

Anche i **17-OHCS urinari** e i **17-KS urinari** possono fornire una valutazione: sono entrambi aumentati quando vi è un'eccessiva stimolazione con ACTH, mentre in presenza di patologie del surrene gli androgeni (e quindi i 17-KS) restano relativamente stabili.



**Addison's disease:**

**Morbo di Addison – Difetto di corticosteroidi**

Possibili cause dell'Addison sono la distruzione surrenalica che avviene nella tubercolosi, la presenza di auto-anticorpi, tumori e amiloidosi, oltre che la somministrazione cronica di farmaci.

E' caratterizzato da grave debolezza, perdita di peso e di forza muscolare, iposodiemia e iperpotassiemia, ipotensione e disturbi gastrointestinali. Si ha spesso una pigmentazione bronzea della cute (dovuta al fatto che ACTH e MSH sono prodotti insieme → ricorda la POMC).

Il **cortisolo** è più basso nel sangue e nelle urine. Bisogna quindi procedere alla **valutazione dell'asse HPA**. Se l'ACTH ha risposte normali, allora la patologia è del surrene; se l'ACTH non risponde, allora la patologia è dell'ipofisi. Elevate concentrazioni sieriche di potassio ed elevate concentrazioni urinarie di sodio possono aiutare nella diagnosi. Un test ottimo per la valutazione del morbo di Addison è la **somministrazione intravenosa di ACTH esogeno**. Se la cortisolemia raggiunge in un ora livelli uguali o superiori a 10µg/dl, è possibile escludere l'insufficienza surrenalica. Se invece non c'è risposta alla dose di ACTH, lo stesso ACTH viene somministrato per 3-5 giorni (la ghiandola può essere divenuta ipoplastica per la carenza di ACTH) → se il trattamento non induce un aumento di 17-OHCS urinari, si può porre la diagnosi di insufficienza surrenalica. Al contrario, l'insufficienza può riguardare l'ipofisi.

**Iperaldosteronismo (sindrome di Conn)**

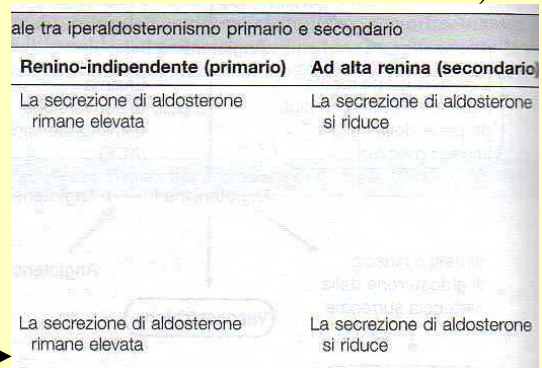
E' generalmente dovuto a un adenoma del surrene. O a iperproduzione di renina.

E' caratterizzato da ipertensione, ipersodiemia e ipopotassiemia, alcalosi

Un'eccessiva produzione di aldosterone può dimostrata verificando la **risposta allo spirinolattone**, un antagonista dell'aldosterone che porta a un forte incremento della potassemia e una riduzione della potassiuria a meno di 20mEq/24ore. Inoltre si può somministrare al paziente **per 4 giorni una dieta ipersodica**, e valutare → la persistenza di ipopotassemia e alcalosi indica una iperproduzione di aldosterone (deficit nel sistema renina angiotensina aldosterone). E' anche importante valutare **l'integrità del sistema renina angiotensina**, per valutare un eventuale **iperaldosteronismo secondario** (dovuto a alte concentrazioni di renina):

Somministrando ADH (aumento volemia) →

Somministrando mineralcorticoidi sintetici →



N.B. Il dosaggio della renina è basato sulla capacità di un campione di plasma di produrre angiotensina I durante un periodo di incubazione a 37°C. E' complesso e poco usato.



### Virilizzazione da cause surrenaliche

Possibili cause sono difetti enzimatici nella sintesi del cortisolo (produzione di intermedi con proprietà androgeniche) e neoplasie

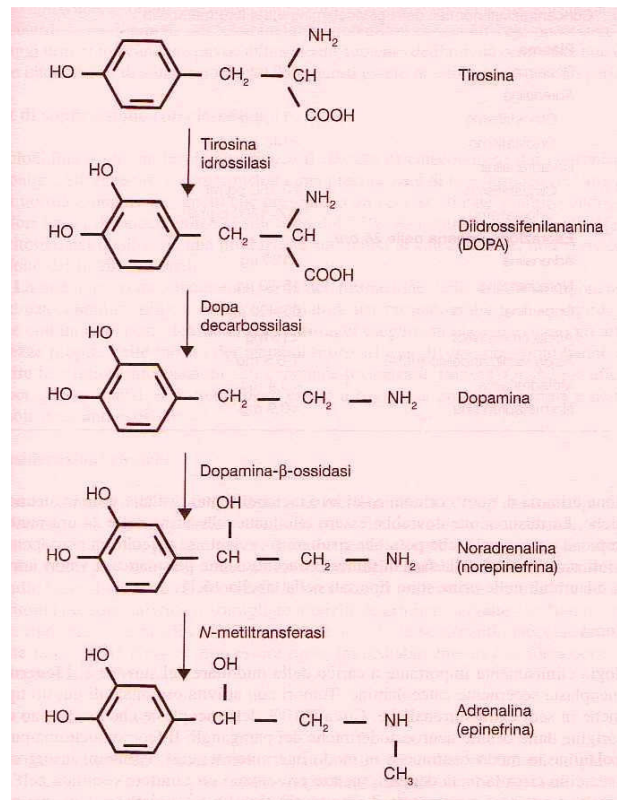
Comparsa di tratti maschili nei bambini prima della pubertà

Il principale reperto è l'alta concentrazione di **17-KS urinari e sierici**, e alte concentrazioni di ACTH circolante.

## MIDOLLARE DEL SURRENE

E', funzionalmente, come un grosso "ganglio di amplificazione del sistema nervoso ortosimpatico", in quanto, proprio per stimolazione diffusa del simpatico, secerne **adrenalina** (ormone del "fight or fly") e **noradrenalina**.

Le catecolamine possono essere misurate con dosaggi fluorimetrici, ma un'analisi più sensibile e specifica è effettuata con il frazionamento delle catecolamine mediante la cromatografia liquida ad alta pressione.



Concentrazioni normali delle catecolamine e dei loro metaboliti

Plasma	
Dopamina	<30 pg/ml
Adrenalina	
Clinostatismo	<110 pg/ml
Ortostatismo	<140 pg/ml
Noradrenalina	
Clinostatismo	70-750 pg/ml
Ortostatismo	200-1700 pg/ml
Escrezione urinaria nelle 24 ore	
Adrenalina	<120 µg
Noradrenalina	15-80 µg
Dopamina	65-400 µg
Acido omovanilico	<15 mg
Acido vanilmandelico (VMA)	1-6,5 mg
Metadrenalina	<0,4 mg
Normetadrenalina	<0,9 mg

## FEOCROMOCITOMA

E' l'unica patologia clinicamente importante a carico della midollare del surrene. E' una **neoplasia** secernente catecolamine, e la sua complicanza significativa è l'**ipertensione**. E' un tumore **operabile chirurgicamente**, ma è importante individuarlo nelle prime fasi.

La diagnosi si basa sulla dimostrazione dell'ipersecrezione di catecolamine. E' importante il regolare dosaggio degli ormoni (non basta un'unica rilevazione) soprattutto **dopo gli attacchi ipertensivi**, che portano a cefalea e tachicardia.

Il test principale è quello di **soppressione con clonidina**: è una sostanza che determina il rilascio di catecolamine dai gangli simpatici. Quando viene somministrata una piccola dose (0,3 mg per os) di clonidina, gli individui sani rispondono riducendo i valori basali di catecolamine del 25%, mentre pazienti affetti da feocromocitoma non hanno alcuna variazione di questo valore.



## INSULINA E DIABETE MELLITO

Il pancreas è costituito da due strutture istologiche, gli acini, che secernono succhi digestivi riversati poi nel tubo digerente, e le isole di Langerhans, del diametro da 0,3 mm e che secernono insulina (cellule beta), glucagone (cellule alfa) e somatostatina (cellule delta) e il Peptidi pancreatico (cellule PP).

## INSULINA (RIPASSO DI FISIOLOGIA)

### STRUTTURA ED EMIVITA

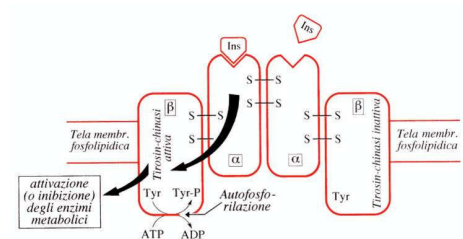
L'insulina è una proteina costituita da **due catene**, A e B, di 21 e 30 residui, unite da ponti disolfuro. Le molecole di insulina tendono ad aggregarsi in strutture esameriche contenenti **zinco**. E' sintetizzata come precursore inattivo:



L'insulina secreta nel sangue circola in forma libera ed ha un'emivita di circa 6 MINUTI, in quanto viene degradata dall'enzima insulinasi nel fegato

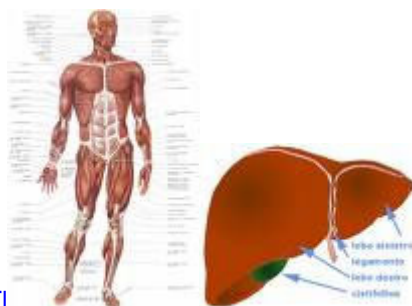
### I RECETTORI DELL'INSULINA

Il recettore dell'insulina è formato da 4 subunità, 2 alfa e 2 beta. Il legame dell'insulina alla subunità alfa fa sì che le subunità beta si fosforilano a vicenda (recettori con attività tirosin-chinasica) → vengono quindi fosforilate molte altre proteine ed enzimi:



1. Le cellule diventano più permeabili al glucosio (tranne i neuroni, che sono permeabili al glucosio anche senza insulina) → viene favorita l'integrazione della proteina che trasporta il glucosio con la membrana, o meglio la fusione di vescicole contenenti tale proteina con la membrana.
2. La membrana diviene inoltre + permeabile agli amminoacidi e agli ioni potassio, fosfato e magnesio
3. Si modifica l'attività di molti enzimi

### EFFETTI



#### .....SUI CARBOIDRATI

Subito dopo un pasto, il glucosio assorbito nel sangue provoca una rapida secrezione di insulina (v. dopo). Questa fa sì che il glucosio entri in grandi quantità nei **muscoli** e, se in muscoli non sono in attività fisica durante il periodo post-prandiale, si immagazzina sotto forma di glicogeno, che può essere impiegato se subentra un'attività fisica improvvisa. Ma il muscolo non è l'unico sito dove si localizza il glucosio: questo infatti viene per la maggior parte immagazzinato nel **fegato** sotto forma di glicogeno, per il controllo della glicemia.

In particolare l'insulina inattiva la **glicogeno fosforilasi** che scinde il glucosio in glicogeno, attiva l'**esochinasi** in modo da intrappolare il glucosio nella cellula, attiva la **glicogeno sintasi**.

La **gliconeogenesi** è inibita, e inoltre il glucosio in eccesso che non può essere trasformato in glicogeno viene convertito in acidi grassi che, sotto forma di trigliceridi, vengono trasportati nel tessuto adiposo

Durante l'intervallo tra i pasti l'insulina comincia a scendere e, grazie anche all'azione del glucagone, questi effetti mutano all'opposto e il glucosio è rilasciato nel sangue,

## .....SUI GRASSI

L'insulina è in generale un ormone anabolico (tranne che per il glucosio). Infatti favorisce la sintesi degli acidi grassi e la loro esterificazione in trigliceridi,

1. acidi grassi derivanti in primo luogo dal glucosio in eccesso (come hai già visto),
2. inoltre, essendo stimolato anche il ciclo di Krebs, vengono formate elevate quantità di citrato e isocitrato, potenti attivatori dell'acetilCoA carbossilasi → prima tappa sintesi acidi grassi.
3. L'insulina attiva le lipoproteinlipasi che convertono i trigliceridi in acidi grassi che possono essere quindi immagazzinati nelle cellule adipose
4. enzimi coinvolti nella degradazione dei lipidi (lipasi) vengono inibiti

## .....SULLE PROTEINE

Anche sulle proteine l'azione è anabolica in quanto promuove l'immagazzinamento degli amminoacidi dall'esterno all'interno della cellula, ha effetto diretto sui ribosomi (aumento della traduzione), inibisce il catabolismo proteico e può anche aumentare la trascrizione di determinate sequenze di DNA. E' QUINDI ESSENZIALE, COME L'STH, PER LA CRESCITA.

## CONTROLLO DELLA SECREZIONE DI INSULINA

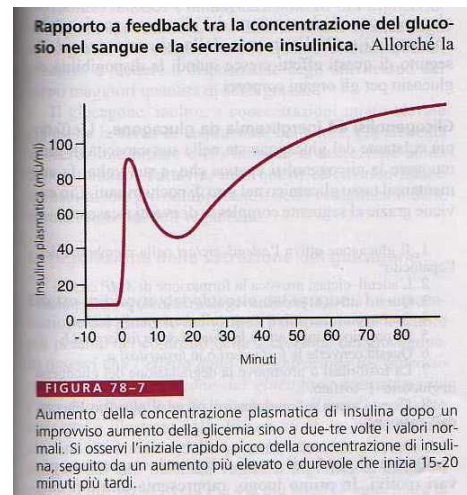
Il fattore principale è sicuramente la glicemia: a livelli normali di **glicemia** (80-90mg/100ml) A DIGIUNO la secrezione di insulina è minima: 0,3-0,6 ng/ml. Ma se la concentrazione del glucosio ematico sale, la secrezione aumenta di 2-3 volte in due fasi distinte:

1. Dopo 3-5 minuti l'insulina preformata viene liberata
2. Dopo circa 15 minuti altra insulina preformata viene liberata ma viene anche sintetizzata nuova insulina

Il glucosio stimola l'insulina attraverso una cascata del segnale attivante lo ione calcio.

**ALTRI FATTORI** importanti sono:

- Amminoacidi, attivatori meno potenti del glucosio
- Ormoni del sistema GEP che si liberano subito dopo un pasto e in un certo senso precedono il glucosio nell'attivazione di insulina
- Altri ormoni come STH, cortisolo e glucagone



## IL DIABETE MELLITO

*Il diabete mellito può essere di due tipi*

**TIPO 1 INSULINA DIPENDENTE (mancanza di insulina)**

**TIPO 2 INSULINA INDIPENDENTE (scarsa sensibilità dei tessuti all'insulina).**

Il **diabete di tipo 1** può essere dovuto a malattie virali, a malattie genetiche o autoimmuni.

Se l'insulina non è prodotta o è prodotta in quantità basse si avrà nel sangue una concentrazione maggiore di glucosio e di acidi grassi (NEFA). Questi ultimi vengono quindi metabolizzati in particelle lipoproteiche contenenti colesterolo e questo può portare ad aterosclerosi.

Inoltre si formano grandi quantità di corpi chetonici che possono portare a grave acidosi e coma, con morte del paziente.

Per quanto riguarda le proteine, in assenza di insulina vi è un marcatissimo catabolismo proteico con debolezza e alterazioni che coinvolgono tutti gli organi.

Per quanto riguarda la vera e propria glicemia alta (300-1200 mg/100ml) questa ha un effetto disidratante dovuto alla pressione osmotica aumentata del glucosio extracellulare che non riesce a diffondere all'interno. Si ha glicosuria, per cui il valore soglia è 180mg/100ml di glucosio nel sangue, si ha danneggiamento di molti tessuti (io meccanismi non sono ancora del tutto chiari).

Il **diabete di tipo 2** è caratterizzato è associato a svariate anomalie metaboliche e/o genetiche, e da livelli alti di insulina nel plasma (compensazione inutile). Spesso i pazienti affetti da questo male sono obesi, ma il perché non è del tutto chiaro. Spesso hanno meno **recettori**, in alcuni sono alterate le vie di traduzione del segnale

In realtà recentemente è stata proposta una nuova classificazione, in cui vengono considerati altri 2 tipi di diabete mellito: **uno è legato ad alterazioni** (dovute a cause diverse quali endocrinopatie, difetti genetici, infezioni ecc.) **della funzione delle cellule beta; l'altro è il diabete mellito gestazionale (DMG).**

### **DIABETE MELLITO GESTAZIONALE**

Normalmente, durante la gravidanza, vi è una fluttuazione della tolleranza al glucosio; circa il 4% delle donne in gravidanza sviluppano però una complicazione diabetica (DMG) e ritornano, dopo aver partorito, ad avere un controllo normale della glicemia.

Lo screening per il DMG, generalmente effettuato tra la 24<sup>a</sup> e la 28<sup>a</sup> settimana di gestazione, consiste nel misurare la glicemia dopo 1h da un carico orale di 50g di glucosio. Se la glicemia dopo 1h risulta più elevata di 140mg/dl, si dovrebbe effettuare un **test completo di tolleranza al glucosio**, che consiste nel somministrare 100g e nel misurare la glicemia ogni ora per 3 ore: se i valori sono superiori a questi

A digiuno	105mg/dl
Dopo 1h	190mg/dl
Dopo 2h	165mg/dl
Dopo 3h	145mg/dl

**...si pone la diagnosi di DMG.**

Il test di tolleranza al glucosio può essere influenzato da molti parametri e quindi è necessario che il paziente non sia costretto a letto o immobilizzato, che segua una dieta regolare con almeno 150g di carboidrati al giorno, che non assuma farmaci o contraccettivi, che non beva alcol nei giorni che precedono il test, che non fumi, non beva acqua e non mangi durante le 12 ore precedenti il test (per questo è un po' complicato ed è utilizzato, per la diagnosi di diabete mellito, solo da alcuni medici).



# CHETOACIDOSI E SINDROME IPEROSMOLARE NEL DIABETE

## CHETOACIDOSI

**I grassi bruciano al fuoco dei carboidrati:** l'acetilCoA entra nel ciclo di Krebs solo se è disponibile ossalacetato, che si forma nella prima reazione della gliconeogenesi → in condizioni di digiuno prolungato o stato diabetico l'ossalacetato viene convertito in glucosio (che è poco all'interno della cellula) e in queste condizioni l'acetilCoA viene deviato verso la formazione di acetoacetato, acetone e D-3-idrossibutirrato (**corpi chetonici**). I corpi chetonici sono importanti perché possono a loro volta riconvertirsi in acetilCoA, ed entrare nel ciclo di Krebs...ma in condizioni diabetiche un accumulo di corpi chetonici (che sono **acidi**) il PH può abbassarsi troppo.

Se questo accade viene stimolata la ventilazione, che tenta di compensare il PH basso con una diminuzione di CO<sub>2</sub> arteriosa. Ma, poiché la produzione di H<sup>+</sup> continua, l'acidosi si aggrava. Inoltre il **potassio** diviene meno concentrato a livello intracellulare e più concentrato a livello extracellulare (in quanto necessita di insulina per entrare nella cellula) → oltre a uno squilibrio acido-base si crea anche uno squilibrio idrico-salino per l'aumentata osmolarità extracellulare (l'acqua tende a uscire dalla cellula) e si ha **disidratazione cellulare**.

## SINDROME IPEROSMOLARE

Un'ulteriore disidratazione è dovuta all'elevato livello extracellulare di glucosio → la disidratazione cellulare può portare a una grave ipotensione e al coma diabetico.

## DIAGNOSI DI DIABETE

- presenza di sintomi obiettivi di diabete (come poliuria, polidipsia, perdita di peso, visione sfuocata) accompagnati da un dato casuale di laboratorio (ottenuto in un momento qualsiasi della giornata, indipendentemente dalla distanza dall'ultimo pasto) che indichi una glicemia  $\geq 200$  mg/dl;
- una determinazione della **glicemia a digiuno** (*fasting plasma glucose*, FPG) (digiuno di almeno 8 ore) che dia valori  $\geq 126$  mg/dl;
- **glicemia dopo 2 ore dall'ingestione di un carico orale di glucosio** (eseguito con 75 g di glucosio) (2hPG) con valori  $\geq 200$  mg/dl.

Si può porre diagnosi di diabete in presenza di uno qualsiasi di questi tre criteri; la diagnosi deve poi essere confermata con la verifica, in giorni successivi, dello stesso o di un altro criterio diagnostico.

È stato anche definito un intervallo di valori glicemici che, pur essendo più elevati dei limiti di normalità, non raggiungono la soglia prevista dai criteri per porre la diagnosi di diabete. Questa categoria intermedia ha valori di:

- **FPG** superiore ai valori normali\* (la FPG normale è  $< 110$  mg/dl) ma inferiore a 126 mg/dl;
- **2hPG** superiore ai valori normali\*\* (la 2hPG normale è  $< 140$  mg/dl) ma inferiore a 200 mg/dl.

### Si raccomanda un test di screening con la FPG a:

tutti i soggetti di almeno 45 anni di età; se la FPG è nella norma, ripetere l'analisi ogni 3 anni; tutti i soggetti a rischio, indipendentemente dall'età. Questi sono:

1. gli individui obesi;
2. coloro che hanno familiari di primo grado affetti da diabete;
3. coloro che appartengono a popolazioni ad alto rischio (per es. afro-americani, ispanici, asiatici ecc.);
4. le donne che hanno avuto figli con peso alla nascita superiore a 4 kg o che hanno avuto un diabete gestazionale;
5. gli individui ipertesi;
6. i soggetti che hanno una colesterolemia HDL inferiore o uguale a 35 mg/dl e/o una trigliceridemia superiore o uguale a 250 mg/dl;
7. coloro a cui sia già diagnosticata un'alterata tolleranza al glucosio o un'alterata glicemia a digiuno.

## CONTROLLI DI LABORATORIO DI UN PAZIENTE DIABETICO

### GLICOSURIA

E' il metodo utilizzato da più tempo per il controllo della glicemia (vedi esame urine)

### GLICEMIA

Si raccomanda ai pazienti diabetici di misurare la glicemia con strisce reattive che, dopo essere state bagnate con una goccia di sangue ottenuta per puntura del polpastrello di un dito, vengono lette in un apposito glicemometro portatile.

### EMOGLOBINA GLICOSILATA (HbA<sub>1c</sub>)

In iperglicemia l'emoglobina lega irreversibilmente sulla catena  $\beta$  una molecola di glucosio. In individui sani la percentuale di HbA<sub>1c</sub> è del 3-6%, mentre in pazienti diabetici è del 18-20%. Questo non altera le capacità dell'emoglobina, ma è un buon metodo di monitoraggio nei pazienti diabetici.

### FRUTTOSAMINA

Consiste nella misura delle proteine sieriche glicosilate, soprattutto l'albumina, alla quale il glucosio si lega similmente all'emoglobina. Poiché l'albumina ha vita media di 20 giorni, questo esame rileva l'iperglicemia delle ultime settimane (mentre l'emoglobina glicosilata riferisce l'andamento dell'iperglicemia in un periodo più lungo).

### GLICOSILAZIONE DEI TESSUTI

La retina, i vasi e il SN, con il ripetersi dell'iperglicemia prolungata, sembrano subire lo stesso processo di glicosilazione (e sembra che ciò causi danni strutturali e funzionali di varia natura → es. retinopatia diabetica). Anche per questo è importante fare esami di screening e monitorare i pazienti diabetici.

### IPOGLICEMIA

L'ipoglicemia dovrebbe essere diagnosticata quando i livelli plasmatici di glucosio sono inferiori a 50mg/dl.

### IPOGLICEMIA POST-PRANDIALE

Alcuni pazienti con disfunzioni gastroenteriche presentano un innalzamento rapido dei valori glicemici post-prandiali e ciò comporta un'esaltata secrezione di insulina, che a sua volta causa la brusca caduta della glicemia.

### IPOGLICEMIA A DIGIUNO

Alcuni tumori del pancreas possono causare ipoglicemia per eccessiva produzione di insulina (proliferazione cellule  $\beta$ ). L'ipoglicemia a digiuno può essere anche dovuta a patologie epatiche (difetti negli enzimi della gliconeogenesi)



# METABOLISMO DEL CALCIO E DEL FOSFORO

## FISIOLOGIA

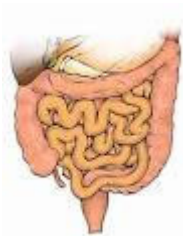
	<u><b>CALCIO</b></u>	<u><b>FOSFORO</b></u>
<u><b>FUNZIONE</b></u>	Frazione minerale dell'osso, eccitabilità neuromuscolari, coagulazione, secrezione ghiandole	Frazione minerale dell'osso, struttura acidi nucleici e fosfolipidi, sistema tampone dei fosfati (eq. Acido-base)
<u><b>DISTRIBUZIONE</b></u>	99% nell'osso (cristalli idrossiapatite) 0.9% nella cellula 0,1% nel LEC <b>9,4mg/dl plasma</b>	85% nell'osso 15% nella cellula 0,1% nel LEC (dove è presente soprattutto come sistema tampone $H_2PO_4^-$ e $HPO_4^{--}$ ) <b>4mg/dl plasma</b>
<u><b>TOTALE NEL CORPO</b></u>	Circa 1100g	Circa 500-800g
<u><b>ASSUNZIONE</b></u>	Circa 1000mg al giorno	Circa 1000mg al giorno

- Il calcio e il fosforo sono regolati a **3 livelli**: osseo, intestinale, renale.



A livello osseo esiste un turnover dovuto alla deposizione di nuova matrice da parte degli osteoblasti che diventano osteociti e al riassorbimento della matrice ossea da parte degli osteoclasti. Nell'osso i cristalli di idrossiapatite sono fondamentali per la resistenza alla tensione e alla compressione, in quanto si associano alle fibre collagene ossee dando loro stabilità (è importante ricordare che l'osso consta, oltre che di cellule, di una matrice organica contenente fibre collagene e sostanza fondamentale ricca di proteoglicani, e di sali e cristalli ossei intercalati in questa matrice).

Il rimodellamento continuo dell'osso è quindi fondamentale per mantenere la sua solidità e resistenza. **Questi processi possono essere regolati.**



A livello intestinale quasi tutto il calcio ingerito non è assorbito (90%), ma eliminato con le feci (ma **anche questo processo può essere regolato**), mentre il fosforo (anione) è assorbito quasi tutto.



A livello renale il calcio filtrato è riassorbito in diversi punti (tubulo prossimale, ansa di Henle, tubulo distale e collettore). Nei tubuli distali e collettori il riassorbimento è strettamente legato alla calcemia, quindi **anche questo è un processo regolato**. Il fosfato è una sostanza con soglia renale (1mM/litro).

- **2 ormoni e 1 vitamina** sono responsabili della regolazione dei livelli di questi 2 ioni

## PARATORMONE [PTH]

La secrezione di PTH nelle ghiandole paratiroidi è stimolata da bassa calcemia...

L'ormone, attivando i processi di osteolisi e attivando gli osteoclasti, mobilizza il calcio dall'osso verso il sangue. A livello renale, nei tubuli distali e collettori, aumenta il riassorbimento del calcio e l'escrezione di fosfato. A livello intestinale stimola indirettamente il riassorbimento del calcio da parte della vitamina D, in quanto stimola la sua idrossilazione nella forma di calcitriolo (forma attiva) a livello renale.

## VITAMINA D

E' prodotta nella cute per azione dei raggi solari sul 7-deidrocolesterolo. Deve subire 2 idrossilazioni, la prima a livello epatico (calcidiolo) e la seconda a livello renale (calcitriolo → forma attiva). Agisce soprattutto sull'intestino stimolando la trascrizione del gene della proteina trasportatrice del calcio degli enterociti. In misura minore stimola il riassorbimento del calcio a livello osseo e renale.

## CALCITONINA

E' prodotta dalle cellule C (o parafollicolari) della tiroide ed è stimolata da elevati valori di calcemia. Ha attività inibitoria sugli osteoclasti.

# LABORATORIO DEL CALCIO E DEL FOSFORO: INDICATORI DEL METABOLISMO MINERALE

## INDICATORI DI CALCIO E FOSFORO

Per la misurazione del **calcio** si preferiscono metodiche spettrofotometriche e colorimetriche. I livelli sierici del calcio comprendono sia quelli legati all'albumina, sia quelli legati ai citrati e fosfati, sia il calcio libero. In caso di ipoalbuminemia la correzione si basa sul fatto che dovrebbero essere diminuiti i valori di circa 1 mg/dl per ogni g/dl di riduzione dell'albumina. *Bisogna dire che molti anticoagulanti agiscono chelando il calcio → per la determinazione della calcemia non possono essere utilizzati campioni di plasma, a meno che non siano stati ottenuti da sangue eparinizzato.*

Il calcio ionizzato può essere misurato con elettrodi iono-selettivi che forniscono risultati espressi in milliEquivalenti o in milliMoli. *Il PH influenza notevolmente la proporzione tra calcio libero e legato → la frazione ionizzata aumenta al diminuire del PH. La stessa proporzione può essere alterata da tanti altri fattori (temperatura, proteine anormali, bilirubina, farmaci ecc.)*

Il **fosforo** viene misurato sotto forma di fosfati. *La fosfatemia è più alta nei bambini che negli adulti.*

E' raramente necessario misurare i livelli di calcio e fosforo **nelle urine**.

Tabella 16.18 Valori di riferimento per test correlati con il metabolismo del calcio

Determinazione	Valori di riferimento
<b>Siero</b>	
Ormone paratiroideo	(Vedi i valori di riferimento dei singoli laboratori)
PTH C-terminale / regione intermedia	
PTH N-terminale/PTH intatto	
Calcio	9-11 mg/dl o 4,5-5,5 mEq/l; 2,3-2,8 mmol/l
Fosforo inorganico	2,4-4,4 mg/dl
Fosfatasi alcalina	25-80 IU/l (adulti)
25-(OH)D <sub>3</sub>	20-30 ng/ml
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	2-5 ng/ml
<b>Urine</b>	
Calcio	50-250 mg/24 ore
Idrossiprolina	10-50 mg/24 ore (adulti)
cAMP	2-6 μmol/g creatinina/24 ore

## INDICATORI DEL METABOLISMO OSSEO

I markers sierici di **formazione** del tessuto osseo sono la **fosfatasi alcalina di origine ossea** e l'**osteocalcina** (l'osteocalcina viene sintetizzata nell'osso dagli osteoblasti ed è la principale proteina della matrice ossea. Presenta un'elevata affinità di legame per l'idrossiapatite). La **fosfatasi alcalina (ALP)** è un enzima associato alla deposizione ossea degli osteoblasti. *Il valore è maggiore normalmente nei bambini, e nei maschi rispetto alle femmine.*

I markers di **riassorbimento** osseo sono invece sostanze che si formano a causa del riassorbimento osteoclastico e che vengono escreti nelle urine: gli **N-telopeptidi (NTx)**, frammenti del collagene, e la **desossipiridinolina libera**, un legante del collagene osseo.

Inoltre è molto importante il dosaggio dell'**idrossiprolina**, aminoacido presente solo nel collagene, e i cui livelli plasmatici e urinari aumentano in presenza di un maggiore riassorbimento osseo. *E' anche vero però che l'idrossiprolina è molto più alta nei bambini che negli adulti, e che l'assunzione nella dieta di elevate quantità di carne può causare un suo aumento in assenza di patologie ossee.* Tutti questi campioni vengono dosati con metodiche immunologiche su campioni di urine.

## INDICATORI ORMONALI

Il **PTH** in circolo subisce diverse scissioni proteolitiche. L'emivita della molecola intatta è infatti di circa 10 minuti, mentre quella della porzione C-terminale è di 1-2 ore. E' meglio dosare comunque la molecola intatta perché la porzione C-terminale viene normalmente eliminata dal rene e, in caso di insufficienza renale, un valore alto può far pensare erroneamente a una patologia del metabolismo minerale. Il PTH agisce attraverso il meccanismo dell'**cAMP**, e questa molecola viene eliminata nelle urine; poiché i livelli urinari di questa molecola, espressi per  $\mu\text{moli}$  di cAMP per grammo di creatinina, variano assai poco durante l'esercizio, la dieta e la postura, possono risultare molto utili.

Il metabolita della **vitamina D** che si dosa più facilmente è il calcidiolo (25-idrossi-colecalciferolo), che può aumentare molto in seguito a prolungate esposizione ai raggi solari. La determinazione della vitamina D avviene per competizione del legame proteico previa estrazione dal siero.

Il dosaggio della **calcitonina** sierica è solitamente riservato alla valutazione del carcinoma midollare della tiroide, ma anche come test di screening per individuare neoplasie endocrine multiple (MEN). E' dosata con metodica radioimmunologica.

## PATOLOGIE DEL METABOLISMO MINERALE

### IPERCALCEMIA

Per ipercalcemia si intende calcio sierico costantemente superiore a 12,5mg/dl.

Nell'**iperparatiroidismo primario** si può osservare una produzione eccessiva di PTH; bisogna comunque osservare non tanto il PTH e il calcio separatamente, quanto i loro rapporti → nei soggetti sani il PTH deve essere basso quando il calcio è alto e viceversa. Se questo non accade si parla appunto di iperparatiroidismo primario. La più frequente causa di **iperparatiroidismo secondario** è l'insufficienza renale → se la funzionalità renale è ridotta vi sarà ritenzione di fosfati; se i fosfati sono tanti, si forma fosfato di calcio, che ha una bassa solubilità e precipita; ciò causa una riduzione del calcio e aumento di PTH.

L'iperparatiroidismo non costituisce però l'unica causa di ipercalcemia → **tumori** maligni, linfoma e altri tumori possono influenzare notevolmente i livelli di calcio (alcune neoplasie generano sostanze con azione agonista al PTH e alla vitamina D. Anche in alcune **osteopatie** la calcemia può essere elevata (più riassorbimento di deposizione).

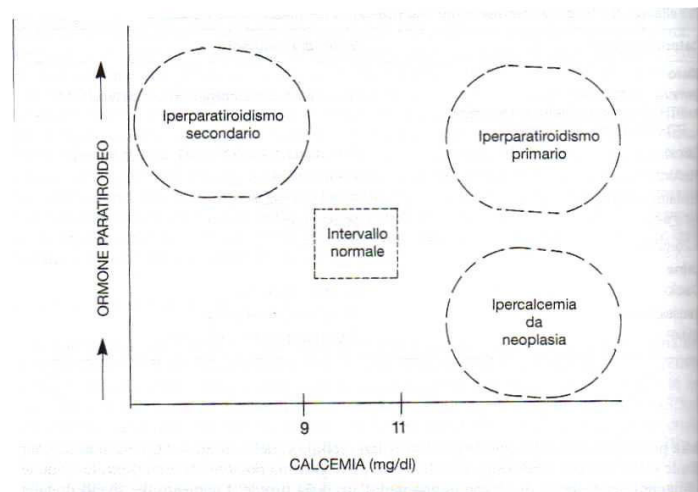


Figura 16.12 Rappresentazione grafica della relazione tra i livelli di calcio e di PTH in diverse condizioni. Nell'iperparatiroidismo primario l'aumento del PTH determina un aumento della calcemia. Nell'iperparatiroidismo secondario i valori patologicamente ridotti del calcio stimolano la secrezione di PTH. Nelle neoplasie maligne l'osteolisi o l'attività di altri ormoni possono determinare un'ipercalcemia indipendente dal PTH, che rimane soppresso.

### IPOCALCEMIA

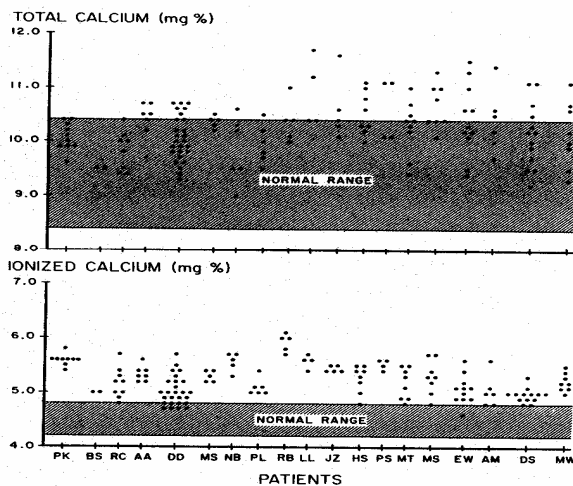
Per ipercalcemia si intende calcio sierico inferiore alla norma. L'ipocalcemia può essere dovuta a un deficit di vitamina D o di paratormone (ipoparatiroidismo), o a fenomeni gravi di malassorbimento.

Altro motivo può essere il cosiddetto psuedoipoparatiroidismo, una condizione rara caratterizzata da ridotta risposta tissutale al PTH.

### 5 PATOLOGIE IMPORTANTI E LORO EFFETTI SULL'OSSO

**IPERPARATIROIDISMO:** nelle forme più gravi il riassorbimento degli osteoclasti supera di molto la deposizione degli osteoblasti e l'osso può essere corroso quasi completamente. Le ossa decalcificate diventano fragili e sono molto più sensibili a fratture.





*Calcio totale e ionizzato in pazienti affetti da iperparatiroidismo primario (IPP)*

**IPOPARTIROIDISMO:** gli effetti sull'osso non sono così evidenti come nella precedente malattia → i segni più gravi sono a livello sistemico, soprattutto la tetania dei muscoli, con paralisi spastica dei muscoli respiratori e morte.

**RACHITISMO:** è determinato dalla carenza di vitamina D nei bambini che non sono quasi mai esposti alla luce solare e che non assumono le dovute quantità di vitamina D nella dieta. Nel rachitismo protratto, l'aumento compensatorio del PTH provoca un forte riassorbimento osseo, e l'osso è decalcificato, quindi molto debole.

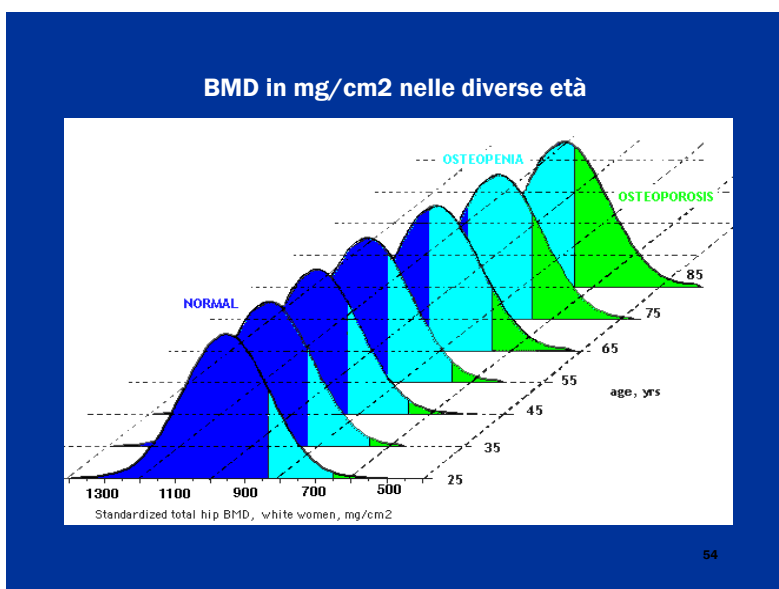
**OSTEOMALACIA:** è determinato dalla carenza di vitamina D nell'adulto. Anche in questa patologia c'è spesso una grave compromissione del tessuto osseo.

**OSTEOPOROSI:** è una patologia che si osserva nell'età senile e si differenzia dalle altre perché dipende da una diminuzione della matrice organica, piuttosto che dei Sali ossei. L'attività osteoblastica è infatti diminuita.

Possibili cause sono il "non uso" delle ossa, la malnutrizione, la carenza di vitamina C, la mancanza di estrogeni dopo la menopausa, la senilità.

**Esami di laboratorio per l'osteoporosi:**

Oltre all'analisi dei vari marcatori ossei precedentemente elencati, esami importanti per la valutazione dell'osteoporosi sono l'**istomorfometria** (procedura invasiva che comprende una biopsia ossea e la marcatura con tetraciclina, con successiva analisi della microarchitettura ossea e della funzionalità dinamica dell'osso) e la misurazione della **BMD (densità minerale ossea) con raggi X**.



**IPERFOSFATEMIA E IPOFOSFATEMIA**

L'**iperfosfatemia** può essere dovuta a una diminuita escrezione renale di fosfati, ad aumentato apporto di fosforo, a uso di purganti o clisteri contenenti fosfati e ad altre cause che determinano un aumentato carico extracellulare di fosfato, come, ad esempio, l'acidosi respiratoria o la chetoacidosi diabetica.

L'**ipofosfatemia** può anch'essa essere dovuta a insufficienza renale (aumento perdita fosfati), a un diminuito assorbimento intestinale (vomito, diarrea, carenza di vitamina D), o a diverse altre cause come l'alcalosi respiratoria o il trattamento con insulina nei diabetici.

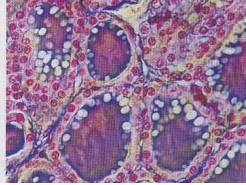




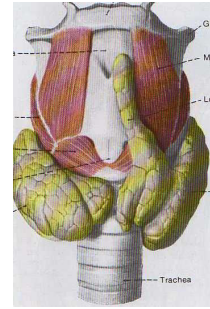
# LA TIROIDE

## BREVE RIPASSO DI ANATOMIA...

La tiroide è una ghiandola endocrina situata nel collo, davanti alla cartilagine tiroidea della laringe. Consta di due lobi uniti da una parte centrale della istmo. La tiroide presenta una struttura caratteristica, e cioè quella dei follicoli → strati unicellulari di tireociti circondano una cavità centrale dove è contenuto il colloide.

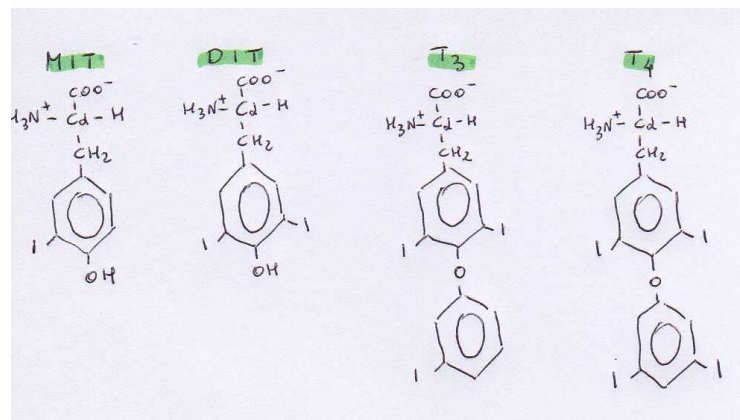


I **follicoli** si distinguono in macrofollicoli (inattivi, ma che possono diventare attivi) a cellule piatte e con colloide maggiore, e microfollicoli (metabolicamente attivi) formati da cellule più grandi e con minore quantità di colloide. Nell'interstizio tra i follicoli lo stroma include le cellule C, o parafollicolari, che producono calcitonina.



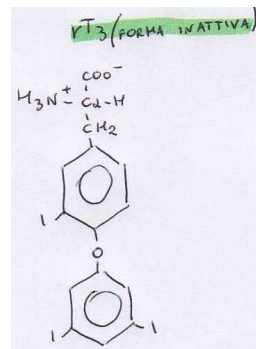
## BIOCHIMICA...

I tireociti producono la proteina tireoglobulina, che riversano nel colloide. Questa contiene molti **residui di tirosina**, che stanno alla base della produzione degli ormoni tiroidei. Oltre a questi residui di tirosina, l'altro fattore fondamentale è lo **iodio** (fabbisogno 1mg/settimana) che viene assorbito dai tireociti grazie all'azione di una speciale pompa. Nelle cellule follicolari lo iodio viene ossidato da una perossidasi, e nella forma ossidata è in grado di legarsi ai residui di tirosina della tireoglobulina, processo catalizzato



dall'enzima iodasi. Si formano così, all'interno della tireoglobulina, residui modificati di monoiodotirosina e diiodotirosina (MIT e DIT). Questi, a loro volta si uniscono tra loro a formare triiodotirosina (T3, MIT + DIT) e tetraiodotirosina o tiroxina (T4, DIT + DIT). A questo punto la molecola di tireoglobulina è degradata da enzimi secreti dagli stessi tireociti e i singoli residui (e con essi gli ormoni tiroidei appena formati) vengono riassorbiti.

La secrezione giornaliera è per il 93% di T4 e per il 7% di T3. T4, che ha maggiore affinità per le proteine leganti gli ormoni tiroidei, è però in realtà una forma che può essere definita di riserva, in quanto nei tessuti subisce un processo di deiodazione in T3, che è la forma attiva dell'ormone tiroideo, con affinità molto maggiore, rispetto a T4, per i recettori nucleari. E' però importante dire che solo il 30% della T4 viene convertita in T3, il resto è convertito nella forma inattiva, la reverse-T3, che non ha alcuna attività metabolica ed è la forma di eliminazione degli ormoni tiroidei.



## FISIOLOGIA...

L'azione degli ormoni tiroidei è svolta direttamente sul DNA. T3 **aumenta il metabolismo** dei mitocondri, il trasporto ionico, è fondamentale nell'accrescimento, esalta il metabolismo dei carboidrati, fa diminuire la concentrazione plasmatica di colesterolo, fosfolipidi e trigliceridi, fa diminuire il peso corporeo, aumenta l'attività del cuore, la frequenza della respirazione, la motilità del gastroenterico, l'attività del SNC e la contrazione muscolare, favorisce inoltre la secrezione delle altre ghiandole endocrine e le funzioni sessuali.

**La regolazione** degli ormoni tiroidei è a feedback → bassi livelli di T3 e T4 esaltano la secrezione del TSH. Il controllo del TSH è svolto inoltre dal TRH ipotalamico, un tripeptide la cui secrezione è aumentata in condizioni particolari quali il **freddo**.

## IMMUNODOSAGGI NELLA DIAGNOSTICA TIROIDEA

La quasi totalità dei dosaggi nella diagnostica tiroidea corrisponde al concetto di immunodosaggio:

- ❖ **Metodi radioimmunologici classici (RIA)**: sono basati sulla competizione di un **antigene freddo**, non marcato, con un **antigene caldo**, marcato, per il legame alle **Ig** specifiche. Se l'**antigene** da individuare è presente nel siero del paziente, esso spiazzava l'**antigene caldo** legato alle **Ig** e la radioattività legata all'anticorpo **diminuisce**. Dopo la **separazione** dell'**antigene** libero da quello legato... si misura la radioattività con appositi **contatori**.
- 4) **Metodi immunometrici (IMA)**: si utilizza la cosiddetta "tecnica sandwich", cioè vengono utilizzati due molecole marcate che legano due diversi epitopi della molecola da dosare. Vengono suddivisi in:
  - Dosaggi immunoradiometrici (IRMA), in cui un marcatore è radioattivo e l'altro è marcato con radioisotopi.
  - Dosaggi immunoenzimatici (EIA), in cui un marcatore è un enzima → il legame tra un anticorpo e il ligando marcato con l'enzima attiva l'enzima stesso, la cui attività catalitica può essere misurata.
- ❖ **Dosaggi immunofluorimetrici (IFMA)**: anche questi sistemi sono "a sandwich", in quanto si utilizza un primo anticorpo che cattura l'analita, e un secondo composto marcato che lega il complesso anticorpo-analita
- ❖ **Dosaggi immunochemiluminescenti (ICMA)**: si utilizza un anticorpo marcato con sostanza luminescente, come ad esempio l'arancio di acridina.

*Nonostante grazie a queste tecniche si siano fatti degli enormi passi avanti negli ultimi 20 anni, non bisogna mai dimenticare alcune cose....*

1. Accertarsi che i valori di riferimento riportati corrispondano al paziente in esame(età, sesso, provenienza)
2. Non confrontare mai, se non in maniera solo indicativa, valori ottenuti con tecniche diverse.
3. Usare estrema cautela nel confrontare dati ottenuti con la stessa tecnica e lo stesso metodo in laboratori diversi .
4. Nelle valutazioni di follow-up usare rigorosamente lo stesso metodo e lo stesso laboratorio.
5. Valutare sempre il rapporto tra soglie decisionali e coefficiente di variazione del metodo utilizzato.

## DETERMINAZIONE DEGLI ORMONI TOTALI (TT3, TT4)

T3 e T4 sono presenti nel plasma in due forme: in forma libera (FT) e in forma legata (TT) a proteine vettrici. T4 è legato per il 99,97% (60-75% alla TBG, 15% alla TTR/TBPA, 10% all'albumina). T3 è legato per il 99,7% alla TBG.

T3 è 10 volte inferiore a T4.

La distribuzione dei valori di riferimento degli ormoni tiroidei nella popolazione non è di tipo gaussiano, e inoltre sono significativamente dipendenti dal tipo di tecnica utilizzata.

I range di riferimento sono **TT4 4,5-12,6 µg/dl**      **TT3 80-180 ng/dl**

I valori di TT3 sono molto aumentati nel primo anno di vita, mentre quelli di TT4 non mostrano variazioni significative con l'età, ma piuttosto stagionali e circadiane, oltre che legate alla postura, ma la cui influenza è davvero minima.

### SIGNIFICATO CLINICO

Anche se di regola i valori elevati correlano con l'iperfunzione tiroidea e i valori diminuiti con l'ipofunzione tiroidea, ci sono due situazioni in cui questa correlazione può non essere rispettata: la prima è quando il rapporto tra ormone totale e frazione libera aumenta rispetto alla norma; la seconda è quando è alterato il rapporto tra T3 e T4, ad esempio in seguito ad aumentata produzione di T3 (**tireotossicosi da T3**), o per diminuzione della conversione di T4 in T3 nei tessuti, come avviene in malattie acute e croniche gravi o in seguito a somministrazione di farmaci (cortisonici).



## DETERMINAZIONE DEGLI ORMONI LIBERI (FT3, FT4)

È un test valido, sensibile e specifico per la diagnosi di stati di disfunzione tiroidea, ma soprattutto di alterazione del binding (trasporto) ormonale, che sono frequenti. Le strategie analitiche sono due: una **diretta**, per mezzo di immunodosaggi della frazione libera previa separazione fisica o immunochimica delle due frazioni, l'altra **indiretta**, attraverso l'analisi di diversi indici (in questo caso, più che di dosaggi, si parla di "stime").

I range di riferimento sono **FT4 0,7-1,8 ng/dl** **FT3 0,2-0,5 ng/dl**

### Analisi diretta

Mentre per T4 è stato possibile ottenere **anticorpi molto specifici**, questo non è ancora avvenuto per T3, che è inoltre meno concentrato di T4. La **separazione fisica** si ottiene attraverso dialisi o ultrafiltrazione. Un passo in più rispetto a questa tecnica è stato fatto applicando tecniche di separazione della parte libera da quella legata basate su **una reazione antigene/anticorpo**. Il principio base è quello dell'incubazione del campione con un anticorpo altamente specifico anti T4 o anti T3 in condizione di sequestrare una esigua quantità dell'ormone totale presente nel campione in modo da non perturbare l'equilibrio complessivo del sistema. I siti anticorpali non occupati sono inversamente proporzionali alla concentrazione dell'ormone libero e sono successivamente quantificati utilizzando il ligando marcato.

Un terzo approccio, più recente, è quello dei metodi ad **anticorpo marcato**. Si tratta di immunodosaggi competitivi che misurano l'ormone libero in base al tasso di occupazione dei siti di legame ormone-anticorpo, utilizzando complessi ormone-proteina legati a una fase solida e facendo competere l'ormone libero del campione e l'ormone o analogo legato alla fase solida con una quantità limitata di anticorpo marcato.

### Analisi indiretta

Nell'analisi indiretta (index tests) sono richiesti due diversi indici: innanzi tutto gli ormoni totali TT3 e TT4, e una valutazione della TBG.

A sua volta la TBG può essere valutata direttamente o indirettamente; l'analisi diretta ha però come svantaggi quelli di non considerare la frazione di ormone legata ad altre proteine, e di non considerare possibili alterazioni nella capacità legante della stessa TBG. Una misura indiretta della capacità legante delle proteine sieriche è la **THBR** (Thyroid hormone binding ratio), che si basa sulla valutazione di siti di captazione di T3 e T4 nel siero. In questo modo è possibile calcolare la FT4

$$FT4 = THBR \times TT4$$

Un altro metodo indiretto per la valutazione degli ormoni tiroidei liberi è quello della dialisi di equilibrio isotopica, basato sull'aggiunta al campione di un'aggiunta di tracciante di T3 e/o T4 marcati; il tracciante si equilibra con gli ormoni liberi o legati, quindi si procede alla dialisi, e la percentuale di ormone libero si basa sul rapporto tra il marker radioattivo nel dialisato e nel non dialisato.

### SIGNIFICATO CLINICO

Come già detto, il dosaggio degli ormoni liberi è molto importante nelle alterazioni del binding ormonale, come anomalie genetiche delle proteine leganti, alterazioni del binding dovute a farmaci, il cosiddetto "effetto eparina" (l'eparina aumenta le concentrazioni di FT3 e FT4), possibile presenza di autoanticorpi antiormoni.



## DETERMINAZIONE DEL TSH

Nel corso dei decenni le varie tecniche di immunodosaggio hanno migliorato notevolmente la sensibilità nel dosaggio del TSH

ANNI	DEFINIZIONE	LIMITE SENSIBILITÀ mU/L	SENSIBILITÀ FUNZIONALE mU/L	TECNOLOGIA
1965-1985	I generazione	1	1-	RIA
1985 -1990	II generazione	0.	0.1-	IRMA
1990-1995	III generazione	0.0	0.01-0.02	IMA
1995-	IV generazione	0.00	0.001-0.002	IMA

**Il range di valori oggi considerato normale è fissato tra 0,44 mU/l.**

La variazione più significativa è nei primi 3-4 giorni di vita, in cui il valore è molto alto. Nell'età adulta in genere il valore si mantiene abbastanza stabile, con ritmi stagionali e circadiani, con punte nel tardo pomeriggio.

### SIGNIFICATO CLINICO

In termini di valore **predittivo di ipo e ipertiroidismo**, il TSH è stato ampiamente studiato nelle popolazioni, ed è stato visto che una grossa percentuale di coloro che hanno un TSH > 2mU/l hanno una buona percentuale di probabilità di sviluppare ipotiroidismo; valori di TSH < 0,001mU/l sono invece correlati ad un iperfunzione tiroidea. **Bisogna comunque essere molto prudenti**, soprattutto nella diagnosi di ipotiroidismo, nell'uso del TSH come primo e unico test diagnostico. E' infatti stato provato che non tutti i pazienti affetti da ipotiroidismo hanno dei valori di TSH alterati!! Un altro contesto in cui la valutazione del TSH va fatta con grande cautela è **nei pazienti ospedalizzati** → spesso si hanno dei **falsi positivi** dovuti a situazioni di stress o a somministrazione di farmaci che possono alterare il valore del TSH in assenza di patologie tiroidee!! **E' piuttosto utile valutare il rapporto tra T4 e TSH (vedi oltre).**



## DETERMINAZIONE DI ANTICORPI ANTITIROIDEI

I fenomeni autoimmunitari sono molto importanti nelle patologie tiroidee (es. patologia tiroidea autoimmunitaria AITD). Tre sono gli autoanticorpi da analizzare: anticorpi antiperossidasi (TPOAb), anticorpi antitireoglobulina (TgAb) e anticorpi anti-recettore del TSH (TRAb). Molti sono comunque i progressi da fare sia nella specificità, sia soprattutto nella sensibilità del dosaggio di queste molecole.

### ANTICORPI ANTIPEROSSIDASI (anche detti anticorpi anti-microsomi)

La TPO è una proteina integrale di membrana presente in diverse isoforme.

La determinazione di anticorpi antiperossidasi rappresenta l'analisi più specifica per la diagnosi di una patologia tiroidea autoimmune → sono presenti nel 95% dei pazienti con **tiroidite di Hashimoto** (tiroidite linfocitaria) e anche nell'85% dei pazienti con **morbo di Basedow-Graves** (ipertiroidismo diffuso).

### ANTICORPI ANTITIREOGLOBULINA

Questi anticorpi possono essere espressi a bassi livelli anche in soggetti eutiroidei, ma vengono espressi ad alti livelli in soggetti affetti da **AITD** e da **DTC (carcinoma differenziato della tiroide)**.

## ANTICORPI ANTI-RECETTORE DEL TSH

Sono diversi nella struttura e nella funzione: alcuni non hanno effetto, alcuni sono stimolanti, altri inibenti nei confronti del recettore del TSH. Sono state identificate 4 classi:

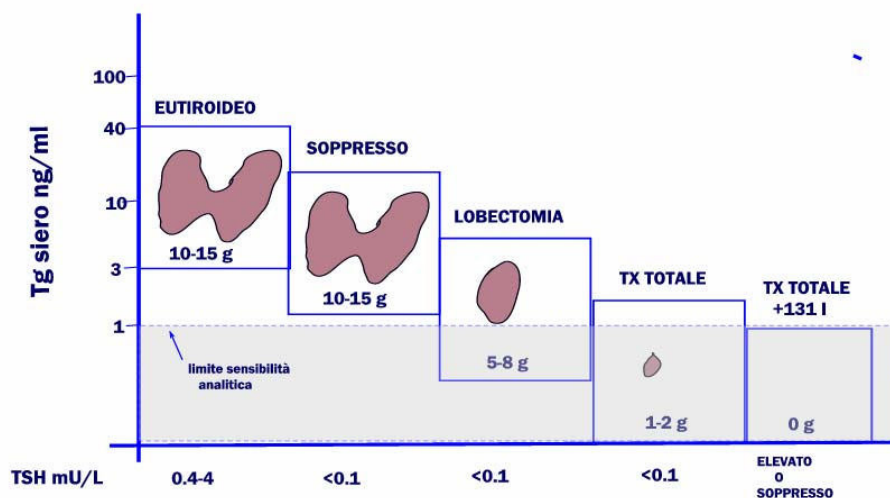
1.	TSAb	stimolanti il recettore
2.	TBAb	bloccanti lo stimolo del TSH
3.	TBII	bloccanti il legame del TSH
4.	TGI	stimolanti la crescita delle cellule tiroidee

Possono essere presenti, da sole o in combinazione, nella **tiroidite di Hashimoto** e nel **morbo di Basedow-Graves**.

Un test ottimo per la misurazione di queste Ig antitiroide è un saggio biologico che è stato messo a punto clonando linee cellulari che esprimono il recettore del TSH, e valutando la presenza di queste Ig misurando l'attività del recettore in termini di cAMP.

## DETERMINAZIONE DELLA TIREOGLOBULINA

Il dosaggio della tireoglobulina viene utilizzato principalmente per la diagnosi del **DTC (carcinoma differenziato della tiroide)**. Questo dosaggio è effettuato con tecniche RIA e IMA, ma possono esserci interferenze con gli anticorpi antitireoglobulina; per questo si raccomanda sempre, prima di tale dosaggio, di dosare i TgAb. Ultimamente si è iniziato a parlare, in merito a questo dosaggio, di PCR real time, ma le opinioni sono ancora contrastanti.



Il range di valori normali è di 3-40ng/ml in presenza di normale apporto iodico, ma questi valori possono variare notevolmente in relazione alla massa tiroidea e allo stimolo del TSH.

## DETERMINAZIONE DELLO IODIO URINARIO

Ha un fine soprattutto epidemiologico, per definire l'apporto iodico individuale e di una popolazione, ed eventualmente intervenire in caso di carenze. Il normale apporto iodico è di

90 µg/die nei bambini

150 µg/die negli adulti

200 µg/die nelle donne in gravidanza o in allattamento

La tecnica di dosaggio consiste nella valutazione della trasformazione dei composti iodati in iodio inorganico, che permette la reazione catalitica di Sandel-Kolthoff. I risultati devono essere valutati su un campione di urine nelle 24 ore.



## STIMOLAZIONE CON TRH

Sono oggi disponibili preparazioni purificate di TRH che rendono possibile un studio sull'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide → la stimolazione con TRH dovrebbe far alzare entro 15-30 minuti i livelli di TSH di 3-4 volte (con conseguente aumento di ormoni tiroidei), per poi tornare a valori base in 2-4 ore. Questo non avviene nell'ipopituitarismo e in condizioni in cui l'omeostasi tiroidea sia alterata.

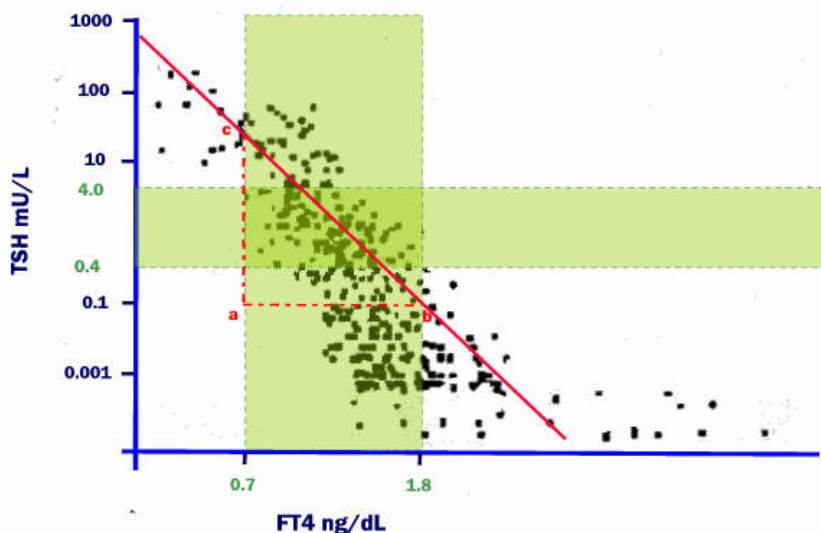
## IMPORTANZA DEL RAPPORTO TSH/FT4 NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE TIROIDEE

### Condizioni in cui è consigliato lo screening delle malattie tiroidee

Screening di massa	Neonato 2- 10 gg
Screening mirato	Donne > 50 aa
	Uomini > 60 aa
	Chirurgia pregressa collo/tiroide
	Irradiazione area cervicale
	Anamnesi familiare per malattie autoimmuni
	Presenza noduli o gozzo
	Terapia amiodarone o litio

Nella diagnosi di patologie tiroidee il primo valore da dosare è il TSH, e naturalmente questo valore va integrato nell'ipotesi diagnostica di tipo clinico (basata su segni e sintomi) effettuata dal medico; il TSH tuttavia non fornisce un valore assoluto e per questo è spesso importante anche dosare il T4 (TT4 e/o FT4). Se il dato ipotizzato del TSH è confermato, allora è opportuno un ulteriore controllo usando un metodo diverso (sempre sul TSH).

Molto importante è soprattutto valutare il rapporto TSH/FT4 → quando l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide è intatto esiste un rapporto log-lineare inverso tra TSH e FT4.

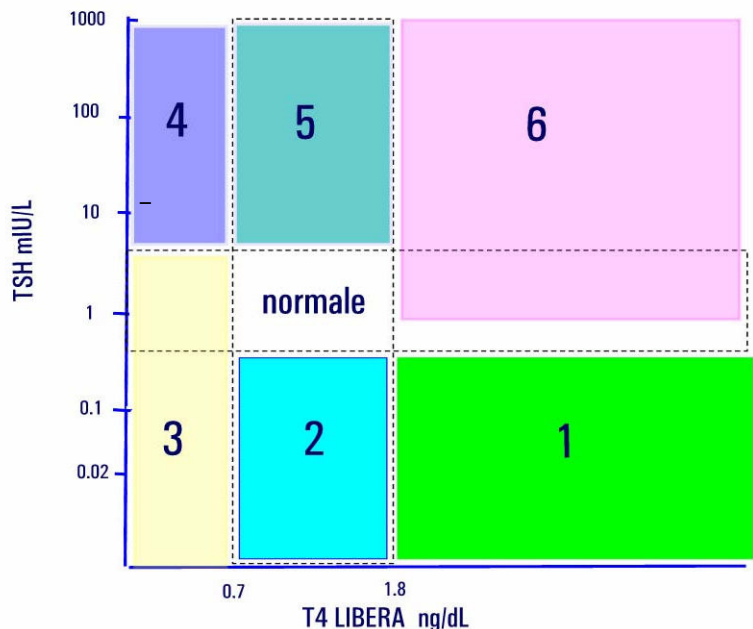


Il rapporto log -lineare tra i due parametri fa sì che piccole alterazioni nell'FT4 siano correlate con modificazioni di ben maggiore ampiezza dei valori del TSH.

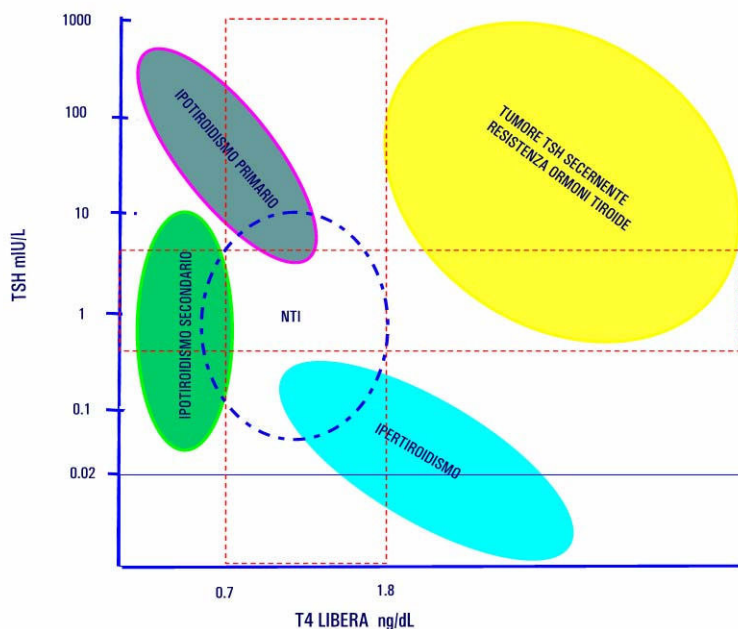
Il rapporto T4 TSH ha un **punto di equilibrio (setpoint)** determinato in maniera molto precisa e diverso nei diversi soggetti.

Nello stadio iniziale delle malattie tiroidee (iper e ipo) delle variazioni individuali dell'FT4 che potrebbero non venire riconosciute in quanto rientrano nella variabilità della popolazione, ma che alterano il setpoint individuale, vengono amplificate da variazioni di ben maggiore ampiezza del TSH; per questo motivo fisiopatologico il TSH è un marker di disfunzione tiroidea più sensibile e specifico e più precoce dell'FT4.

L'area entro cui varia il **setpoint** nella popolazione eutiroidica è quello delimitato (figura) dall'incrocio delle due fasce di riferimento, del TSH e del FT4. Anche all'interno di questa area, occorre ricordare che esiste una specificità individuale, caratteristica del rapporto TSH/FT4 e una correlazione significativa tra i due parametri. Questo caratteristico setpoint appare geneticamente determinato e ci sono indicazioni che, in condizioni di eutiroidismo, esso possa cambiare con l'età.



Si possono notare, attorno all'area normale, delle aree "non normali" con alterato rapporto TSH/FT4. Queste corrispondono orientativamente alle principali patologie tiroidee:

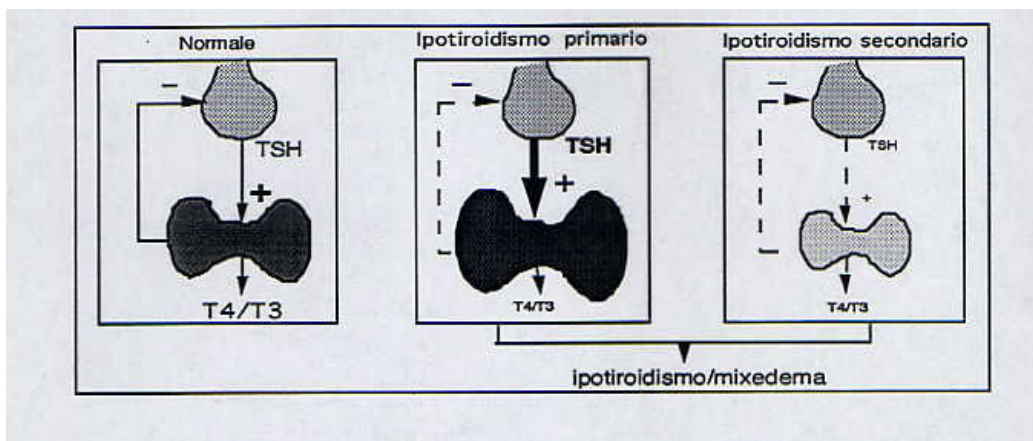


- In caso di un **aumento di TSH** associato a una **diminuzione di FT4**, l'ipotesi diagnostica sarà ovviamente di ipotiroidismo.
- In caso di un **aumento di TSH** associato a **FT4 normale**, l'ipotesi diagnostica sarà di ipotiroidismo subclinico.
- In caso di un **aumento di TSH** associato ad **aumento di FT4**, le ipotesi sono 2: resistenza al TSH e adenoma ipofisario TSH secernente.
- In caso di **TSH normale** associato a **FT4 aumentato**, probabilmente ci sono stati errori di rilevazione (rilievo molto infrequente).
- In caso di **TSH normale o lievemente diminuito** associato a **FT4 diminuito**, l'ipotesi è una patologia non tiroidea (NTI)
- In caso di una **diminuzione di TSH** associata a **FT4 normale**, l'ipotesi sarà di ipertiroidismo subclinico (frequente in anziani portatori di gozzo)
- In caso di una **diminuzione di TSH** associata a **FT4 aumentato**, l'ipotesi sarà ovviamente di ipertiroidismo.

**SONO COMUNQUE MOLTE LE CONDIZIONI CHE POSSONO ALTERARE IL RAPPORTO TSH/FT4; ALCUNI ESEMPI SONO LA PRESENZA DI AUTOANTICORPI CONTRO IL T4, LA PRESENZA DI PROTEINE ANORMALI LEGANTI IL T4, FARMACI, FATTORI TIREOSTIMOLANTI DIVERSI DAL TSH (ES. GONADOTROPINA CORIONICA), ALTERAZIONI DEL RECETTORE DEL TSH, MALATTIE GRAVI DI TIPO NEUROLOGICO, VARIAZIONI INDIVIDUALI DEL SETPOINT. E' QUINDI DOVEROSO TENERE CONTO DI QUESTE POSSIBILITÀ NELLA VALUTAZIONE DEL RAPPORTO TSH/FT4.**

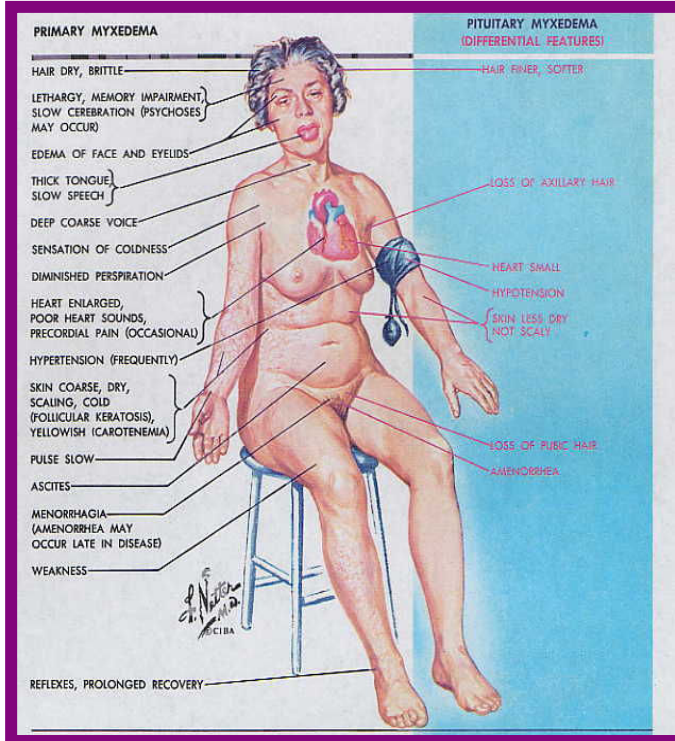
## ***IPOTIROIDISMO, MIXEDEMA, CRETINISMO E TCA***

E' una condizione caratterizzata da una diminuzione dell'attività secretoria della tiroide primitiva (associata ad una stimolazione compensatoria della secrezione del TSH) o secondaria (associata ad una ridotta attività funzionale ipofisaria).



### **CAUSE...**

<i><b>IPOTIROIDISMO PRIMARIO</b></i>	<i><b>IPOTIROIDISMO SECONDARIO</b></i>
Agenesia o disgenesia tiroide	Deficit di TSH
Difetti ormonogenesi	Deficit di TRH
Carenza iodica	Panipopituitarismo
Tiroidite autoimmune	Resistenza al TSH
Tiroidectomia	
Farmaci	



Il **MIXEDEMA** è invece la condizione clinica (segni/sintomi) dovuta carenza/mancanza degli effetti biologici delle iodotironine a livello dei vari organi e tessuti.

Il quadro clinico del mixedema comprende gonfiore del volto e della lingua, più lenta crescita dei capelli, pelle secca, cambiamento della voce, che si fa rauca, affaticabilità ed estrema sonnolenza, torpore muscolare, sensazione di freddo, diminuzione della frequenza cardiaca, aumento di peso, e nei casi più gravi un aspetto edematoso diffuso in tutto il corpo.

*E' importante dire che nell'ipotiroidismo primario (e non in quello secondario) si alzano i livelli ematici di colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi; inoltre nell'ipotiroidismo grave si innalza la concentrazione proteica nel liquor e ci sono alti livelli di CK e LD muscolari in circolo, che naturalmente possono essere ottimi parametri di laboratorio per favorire la diagnosi e per valutare l'efficacia della terapia.*

Un grave ipotiroidismo nella vita fetale, nell'infanzia o nella fanciullezza provoca il **CRETINISMO**, una condizione molto grave caratterizzata da insufficiente sviluppo e ritardo mentale.

#### **Approfondimento sulla Tiroidite Cronica Autoimmune (TCA)**

E' una patologia **molto comune** (dati autoptici fanno pensare che il 20-45% dei soggetti di entrambi i sessi presenti qualche grado di tiroidite focale). La presenza di titoli anticorpali aumenta con l'età.

Sono **2 le forme principali** e cioè:

- forma con gozzo (T. Hashimoto classica)
- forma atrofica (T. atrofica)

**La patogenesi** è ancora incerta ma si suppone che virus o batteri contenenti proteine simili a quelle dei tireociti possano indurre attivazione dei linfociti T nei confronti della tiroide (fenomeni di **cross-reattività**). La stimolazione dei CD4+ induce l'attivazione dei linfociti B, che producono anticorpi contro la tireoglobulina, le perossidasi e gli TSHr. Questo porta all'ipotiroidismo per distruzione dei tireociti o per inibizione delle loro funzioni.

**I fattori predisponenti** sono sia di tipo genetico (alcuni aplotipi HLA e anche alcune malattie quali la sindrome di Down, la sindrome di Turner e il morbo di Alzheimer sembrano essere predisponenti), sia di tipo ambientale (farmaci, elevato introito di iodio, cancro ed epatite C).

#### **Sindrome da disfunzione tiroidea secondaria nell'ammalato**

Malattie gravi possono indurre sintomi e causare alterazioni di laboratorio tali da far sospettare un ipotiroidismo (neoplasie, diabete, epatopatie, traumi, malattie cardiovascolari, insufficienza renale presentano spesso bassi livelli di T3 e T4). Questo accade per 2 motivi: in queste malattie diminuisce la capacità delle proteine plasmatiche di legare T3 e T4, e diminuisce la deiodazione periferica di T4 a T3, mentre è molto attiva la via che trasforma T4 nel prodotto inattivo rT3, che è il parametro più importante nella diagnosi.



## DIAGNOSTICA DELL'IPOTIROIDISMO

ESAME	CARATTERISTICHE ED INDICAZIONI
Scintigrafia tiroidea	Ridotta captazione dello I-131 e del Tc-99 (tecnecio) indica la riduzione del processo di ormonogenesi o la presenza di processi distruttivi
Ecografia tiroidea	Disomogeneità strutturale Riduzione del volume Gozzo nodulare Altre alterazioni aspecifiche
Esami di laboratorio: indici di flogosi	Esprimono una tiroidite acuta o subacuta (distruttiva)

## TERAPIA SOSTITUTIVA PER L'IPOTIROIDISMO

- **Terapia di scelta: L-tiroxina (Eutirox)**
- Circa 80% della L-T4 somministrata per os viene assorbita
- Emivita: circa 7 giorni
- La deiodazione periferica di T4 è fonte della produzione di T3 →  
Rispetto alle altre preparazioni di ormoni tiroidei, la natura di pro-ormone di T4 offre il vantaggio che il paziente regola da sé, fisiologicamente, la produzione di T3 (via deiodinasi)
- Disponibilità di prodotti commerciali standardizzati
- Gli effetti collaterali sono rarissimi
- Dose terapeutica:  
1.0-1.6 µg/kg (intervallo 50-200 µg/die). Possono essere opportune dosi più elevate.
- La dose iniziale può essere inferiore alla dose teorica, aggiustando poi ad intervalli regolari la stessa, fino a raggiungere la dose efficace

## VALUTARE L' EFFICACIA DELLA TERAPIA

- Misurazione degli ormoni tiroidei nel sangue: TSH, FT4, FT3
  - Il TSH rappresenta il marcatore ideale dell'efficacia della terapia.
  - I valori "normali", con gli attuali metodi, sono 0.35-4.5 uU/mL
  - L'obiettivo della terapia sostitutiva è quello di ripristinare valori "normali"
  - Riduzione di colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi nel sangue
- Valutazione funzionali d'organo: ECG, RX torace, ecc.
- Valutazione clinica:
  - Correzione dei segni e sintomi del mixedema
  - Utilità di punteggi e questionari, specialmente nelle forme subcliniche
  - Riduzione del volume del gozzo (es. T. Hashimoto) (valutazione clinica e/o ecografica)



## IPERTIROIDISMO

È una condizione caratterizzata da un aumento dell'attività secretoria della tiroide dovuta a iperfunzione di **aree nodulari circoscritte** (adenomi, gozzo nodulare), o a **iperfunzione dell'intera ghiandola** (morbo di Basedow-Graves o gozzo tossico diffuso).

I sintomi e segni sono: eccitazione nervosa, tremore, perdita di peso, debolezza muscolare, intolleranza al caldo e ipersudorazione, fibrillazione atriale, esoftalmo.



## DIAGNOSI

Naturalmente vanno valutati i segni e sintomi correlati ai dati di laboratorio.

Nell'ipertiroidismo T3 e T4 sono aumentati, il TSH è diminuito, la captazione dello iodio  $^{131}$  è aumentata. Si hanno inoltre riduzioni dei livelli ematici di colesterolo e trigliceridi. Un tipo particolare di ipertiroidismo è la **tireotossicosi**, in cui i livelli di TSH e T4 possono essere normali, ma i livelli di T3 sono di molto aumentati.

## TERAPIA

Il trattamento più comune dell'ipertiroidismo è quello chirurgico. Altri trattamenti sono la somministrazione di antitiroidei e iodio radioattivo.

## APPROFONDIMENTO: GOZZO E NODULI TIROIDEI

**Il gozzo** è una condizione di ipertrofia tiroidea che può essere presente in patologie tiroidee completamente opposte, quali ipotiroidismo e ipertiroidismo, neoplasie, carenza o eccesso di iodio. Questo perché le cellule del gozzo possono essere metabolicamente attive e quindi produrre ormoni in eccesso, o andare incontro a processi degenerativi (gozzi colloidali, fibrosi, cistici ecc.), e quindi non produrre affatto ormoni tiroidei. Nella maggior parte dei casi il gozzo (endemico in particolari aree come le Ande o le Alpi svizzere) è dovuto a carenza di iodio → in questa situazione si forma il **gozzo endemico colloide**, in cui la carenza di iodio porta a diminuzione di T3 e T4 e conseguente aumento di TSH, che provoca un'eccessiva produzione nei follicoli di tireoglobulina → la ghiandola si ingrossa sempre di più. L'esempio più importante di gozzo nell'ipertiroidismo è invece il **gozzo tossico diffuso** (morbo di Basedow-Graves), in cui la ghiandola è iperplastica e la secrezione ormonale è aumentata, spesso a causa di sostanze o anticorpi in grado di mimare l'azione del TSH, o in seguito a tumore della tiroide.

**I noduli tiroidei** possono essere a loro volta noduli ipofunzionanti (noduli cosiddetti freddi) o iperfunzionanti (noduli caldi). La differenza può essere messa in evidenza attraverso scintigrafia (i noduli caldi captano lo iodio radioattivo, mentre quelli freddi non lo captano). Un'ottima prova per valutare la citologia del nodulo è la Thyroid FNA (fine needle aspiration) (biopsia del nodulo tramite agoaspirato).

## Alterazioni del sistema immunitario

### Immunodeficienze

Consistono in **deficit** di uno o più componenti del sistema immunitario, e si distinguono in:

- > **Congenite** si manifestano precocemente nel **neonato** dopo la scomparsa della immunità della madre, e possono interessare le **Ig** e la **funzione linfocitaria** o entrambe le funzioni o il **sistema del complemento**
- > **Acquisite** che si hanno per **sostituzione** delle cellule normali del midollo con **cellule leucemiche** o **perdita di cellule di midollo** in seguito a terapie **immunosoppressive** o in seguito ad infezioni virali (AIDS)

### Immunosoppressione e Immunostimolazione

**Immunosoppressione** -> è un **effetto collaterale** delle chemioterapie per distruggere cellule cancerose ed è utilizzata nei **trapianti d'organo** per prevenire il rigetto. Sono utilizzati *antimetaboliti, steroidi, globulina antitumorale e antibiotici.*

**Immunostimolazione** -> è la base di **strategie terapeutiche** fondate sulla stimolazione o ricostituzione della **risposta immune** contro **antigeni** di cellule tumorali stimolando i linfociti con una o più **sostanze modulatorie del SI** come la **IL-2**

### Autoimmunità

Il sistema immunitario può produrre **Ig** contro **antigeni del self** scatenando gravi fenomeni di **autoimmunità** e provocando **gravi** danno ad organi bersaglio. Esempio di malattie autoimmuni sono

- > **LES** caratterizzato da **grave danno glomerulare** per deposizione di complessi immuni e per l'attivazione del **Complemento** nei confronti dei tessuti.
- > **Connettiviti, l'artrite reumatoide, e malattie organo specifiche.**

### Allergia e Ipersensibilità

La stimolazione di individui con **allergeni** come pollini, polveri, pelo di animali, provoca una **stimolazione eccessiva del SI**. Gli allergeni si legano su **IgE** specifiche legate ai recettori sui **mastociti** e sui **basofili** determinandone la **degranulazione** e il rilascio della **istamina ed eparina** e degli altri mediatori chimici della **risposta allergica**. Malattie legate ad ipersensibilità sono l'**asma, rinite allergica** e la **febbre da fieno**.

## Tecniche Diagnostiche in Immunologia

### Punto di equivalenza antigene-anticorpo

Le metodiche per la identificazione di composti mediante **Ig** richiede non solo che la **Ig** sia specifico per l'**antigene** ma anche che la **concentrazione dell'antigene** sia vicina a quella necessaria per saturare i siti di legame dell'**Ig** → **punto di equivalenza**, di modo che **antigene ed Ig** possano formare grandi strutture **molecolari reticolari (immunocomplessi)** che precipitano e rendono **torbida** la soluzione.

### Nefelometria

Utile per **quantificazioni rapide ed attendibili** di singole proteine sieriche.

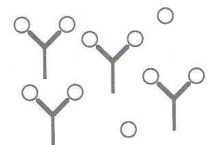
Misura la **torbidità** raggiunta in una soluzione quando gli **antigeni** ed le **Ig** raggiungono il **punto di equivalenza**.

L'apparecchio misura il **tempo** di comparsa della torbidità piuttosto che il grado di torbidità finale.

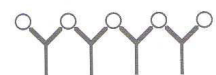
Formazione dei complessi antigene-anticorpo



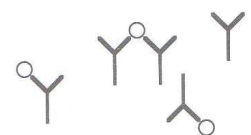
Eccesso di antigene  
Soluzione poco torbida



Zona di equivalenza  
Soluzione molto torbida  
Precipitazione



Eccesso di anticorpo  
Soluzione poco torbida

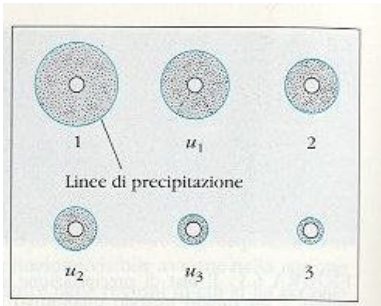


### Immuodiffusione ed Immunodiffusione Radiale (RID)

Si utilizza un mezzo semisolido come l'agarosio, in cui antigeni e Ig possono diffondere liberamente

**Immunodiffusione** → Soluzioni di **antigene** e di **Ig** si pongono in **pozzetti** scavati su **agar** stratificato su un vetrino, si lasciano **diffondere** per 24-48 h e poi si osserva se i complessi **antigene-Ig** hanno formato una **banda di precipitazione**. Si possono così identificare sia **antigeni** che **Ig** ignoti utilizzando Ig e antigeni come reagenti rispettivamente. E' anche detta **tecnica della Doppia diffusione**, in quanto sia **antigene** che **anticorpo** **diffondono nel mezzo**

Se si pongono gli **antigeni** in pozzetti intorno ad un pozzetto **centrale** con l'**Ig** e si determina dalla intersezione delle **bande di precipitazione** se gli **antigeni** sono identici o No.



**RID** → L'**Ig** (reagente) è sciolto nell'**agar** in cui poi vengono ricavati pozzetti contenenti l'antigene il quale diffonde nell'agar e viene in contatto con l'**Ig**. In vicinanza al pozzetto, l'**antigene** è in **eccesso** rispetto alla **Ig** ma continuando la migrazione si raggiungerà il **punto di equivalenza** in una zona ad **anello** intorno al pozzetto, ove si formerà una **banda di precipitazione ad anello**. La **[antigene]** è proporzionale all'**area dell'anello**. Il tempo di esecuzione della tecnica è di **48h**, troppo lungo per essere pratico.

### ControImmunoElettroforesi ed Rocket ImmunoElettroforesi di Laurell (RIE)

**ControImmunoElettroforesi** → gli **antigeni** da esaminare (*campione*) e le **Ig** (*reagente*) sono posti in **pozzetti adiacenti** nella piastra di agar. Il **PH** della soluzione tampone è fissato in modo tale che gli **antigeni** abbiano carica **positiva** mentre le **Ig** carica **negativa** di modo che alla elettroforesi migrino le **une vs le altre**. Dopo la corsa, si lascia riposare la piastra per permettere il legame tra **antigeni** e **Ig** e quindi la precipitazione dei complessi.

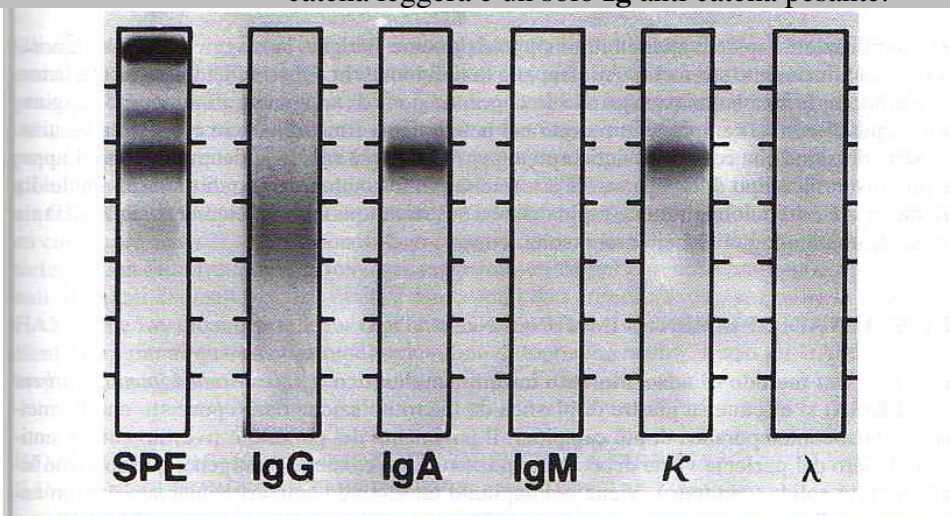
**RIE** → il *campione* è seminato su **gel agarosio** contenente **[anticorpo]** uniformi e sottoposto ad **elettroforesi**. Migrando, l'**antigene** formerà un **arco di precipitazione** la cui area è proporzionale alla **[antigene]**. Confrontando le altezze degli archi con la concentrazione di composti noti si può costruire una **curva di taratura**.

### Immunolettroforesi ed Immunofissazione

Queste tecniche sono importanti per caratterizzare **Ig monoclonali** in malattie come il **mieloma multiplo**.

**Immunolettroforesi** → dopo la **elettroforesi** dei campioni su gel viene aggiunto l'**antisiero** e si fa riposare la piastra per una notte.

**Immunofissazione** → si ha sempre **elettroforesi** dei campioni in gel, ma su **diverse corsie** e, dopo la migrazione ogni corsia viene ricoperta con antisiero monospecifico **anti-IgA**, **anti-IgM**, **anti-κ** e **anti-λ**. Se sono presenti **Ig policlonali**, allora i precipitati sono **diffusi**, altrimenti si forma un precipitato con un solo tipo di **Ig** anti catena leggera e un solo **Ig** anti catena pesante.



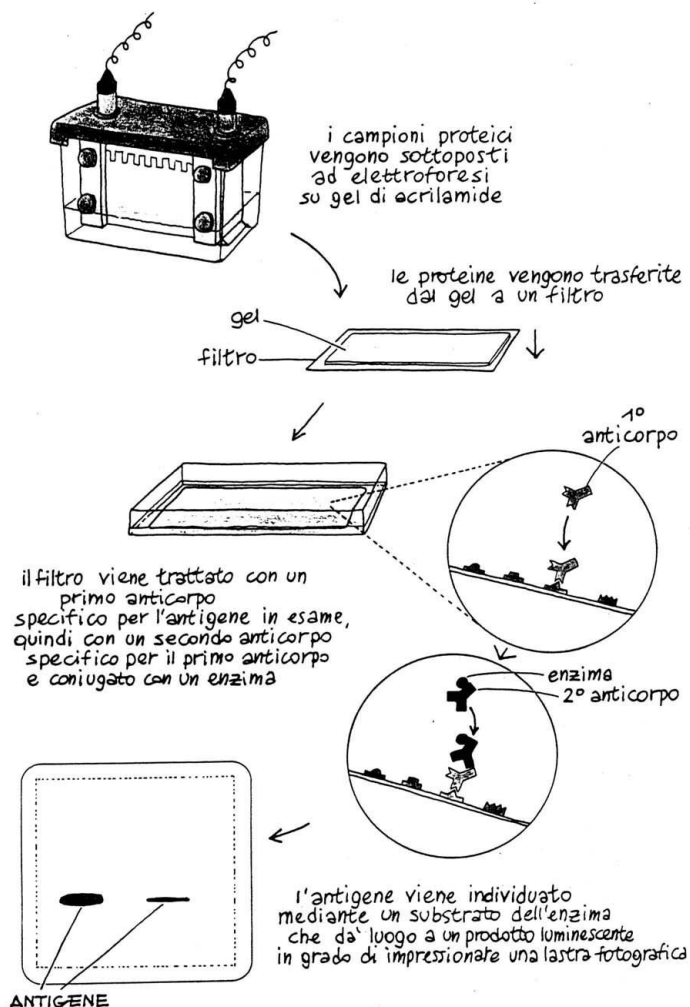
**Figura 7.5** Immunofissazione dopo elettroforesi delle proteine sieriche. Il siero del paziente è stato depositato su ogni striscia e sottoposto a elettroforesi; nel campione SPE tutte le proteine sieriche sono state fissate in ambiente acido; le altre strisce sono state ricoperte con anticorpi contro le singole catene pesanti ( $\gamma$ -IgG,  $\alpha$ -IgA,  $\mu$ -IgM) o leggere ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) delle immunoglobuline. Questo campione evidenzia una banda monoclonale di IgA- $\kappa$  e IgG policlonali normali.



## Western Blot

Gli **antigeni** proteici sono separati con **elettroforesi** in gel di poliacrilammide e quindi **trasferiti** su una membrana di **nylon** sulla quale assumono la **stessa posizione** che sulla piastra. La membrana viene tagliata in strisce che sono **incubate** col **siero** diluito del paziente. Se esso contiene una **Ig** contro uno degli **antigeni** sul nylon allora esso si legherà all'**antigene**. Le strisce vengono **lavate** e poi incubate con **Ig anti-Ig umane** coniugate con un enzima, come la **fosfatasi alcalina**. Dopo un **2° lavaggio** i campioni vengono immersi con una **soluzione** contenente il **substrato** dell'enzima. Sulla membrana di nylon, al termine, si osserva una **banda colorata** nel punto in le **Ig** del paziente hanno legato l'**antigene**.

### LA TECNICA DEL WESTERN BLOT



## Agglutinazione al Lattice

E' un metodo rapido che può essere eseguito al letto del paziente.

In questa tecnica, la **Ig** (*reagente*) è legata a **particelle di lattice** a formare una emulsione omogenea.

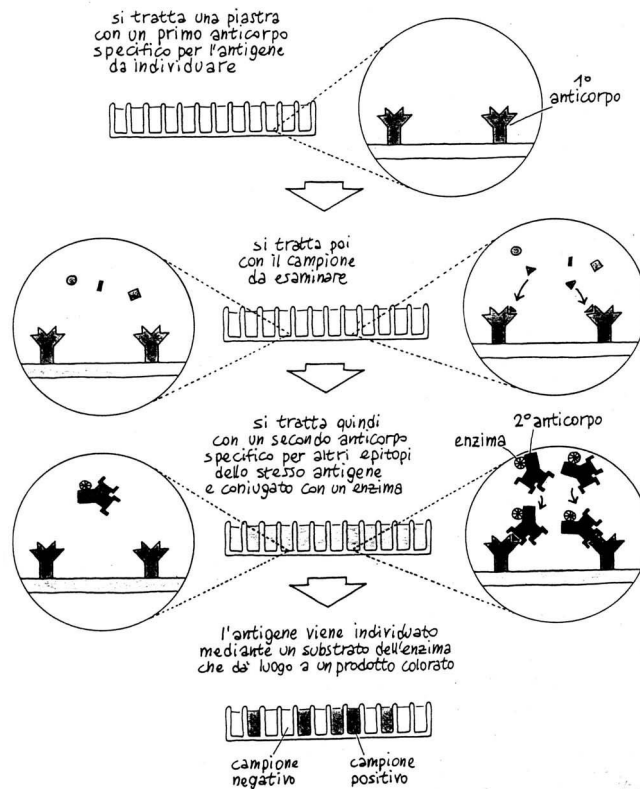
Se nel campione da esaminare è presente l'**antigene** specifico, allora si formano complessi con le **Ig** adsorbite sul lattice a formare **aggregati** → **agglutinazione a lattice** facilmente distinguibili dal **controllo negativo**. E' una tecnica resa possibile dalla presenza di grandi quantità di **Ig monoclonali**.

## Metodo di adsorbimento immunoenzimatico (ELISA)

Importante per rilevare proteine presenti nel plasma a **basse concentrazioni**.

Si effettua su **piastre da microtitolazione** con **96** pozzetti, nelle quali il pavimento dei pozzetti è rivestito con le **Ig**. Il siero del paziente viene deposto nei pozzetti, se contiene l'antigene da *esaminare* esso viene **catturato dalle Ig**. Viene poi aggiunto un **2° anticorpo** marcato con un enzima specifico per lo stesso **antigene**. Dopo che la piastra viene sottoposta a **lavaggio**, viene aggiunto il **substrato dell'enzima** e in caso di **positività** si osserva una **reazione colorimetrica** quantificata dallo **spettrofotometro** (la **intensità** di colorazione è **direttamente proporzionale** alla [antigene])

## LA TECNICA DELL' E.L.I.S.A.



### Dosaggi radioimmunologici (RIA) ed Immunoenzimatici (EIA)

Sono tecniche riservate a misurare **dosaggi molto bassi di analiti** (ormoni, vitamine, farmaci)

**RIA** → è basato sulla **competizione** di un **antigene freddo**, non marcato, con un **antigene caldo**, marcato, per il legame alle **Ig** specifiche. Se l'**antigene** da individuare è presente nel siero del paziente, esso spiazza l'**antigene caldo** legato alle **Ig** e la radioattività legata all'anticorpo **diminuisce**. Dopo la **separazione** dell'**antigene** libero da quello legato... si misura la radioattività con appositi **contatori**.

**EIA** → per la **diversa** reattività dell'enzima marcato nei confronti di **antigeni** in forma legata rispetto ad **antigene** in forma libera, **non è necessario** il processo di **separazione della RIA**. La fase di rivelazione è eseguita da un **processo automatizzato**. Si completa in **pochi minuti**.



### Anticorpi anti-topo umani



Le **Ig** usate in molti saggi immunologici sono **Ig monoclonali** e vengono sintetizzate da **ibridomi di topo**.

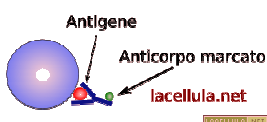
Le **Ig** di origine **murina** vengono talvolta **iniettate** nell'uomo a scopo **terapeutico** e in questi pazienti si può sviluppare una risposta **anticorpale** contro le **Ig murine**. Tuttavia, **Ig anti-Ig topo** umani (**HAMA**) sono prodotti per **ragioni ignote** nel plasma di individui non sottoposti a terapia, quindi **saggi immunologici** con risultati inattesi devono suggerire la presenza di **HAMA** che invalidano il referto.

### ImmunoIstochimica, immunofluorescenza diretta ed indiretta

**Immunoistochimica** → si usa per determinare la presenza di **antigeni** in **biopsie** tissutali ottenute da **tumori** o altre masse. Le sezioni del tessuto, **fissate** su vetrini, sono **incubate** con **Ig** marcate con un enzima e **specifiche per l'antigene**. Lavate le **Ig** non legate, il vetrino è incubato col **substrato** dell'enzima. Il **prodotto della reazione** precipita nei siti ove è presente l'**antigene** e può essere visualizzato al **microscopio**.

**IF diretta** → prevede l'**incubazione** di un campione bioptico con **Ig** anti-umane marcate con **fluoresceina** per rilevare la presenza di **Ig** depositate nei tessuti. Serve un **microscopio a fluorescenza**.

**IF indiretta** → in questa si ricercano nel siero del paziente **Ig** contro **antigeni** presenti in **cellule** o **tessuti** montati su vetrino. E' importante nella **diagnostica degli autoanticorpi**.

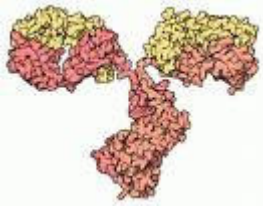




## Dosaggi Immunologici Specifici

### Immunoglobuline del Siero

→ vedi anche capitolo sulle patologie dei leucociti



Sono disponibili **molteplici metodiche** per misurare i livelli di **Ig** nel siero.

**Elettroforesi** delle proteine sieriche fornisce una misura della **quantità totale** di **gammaglobuline**. E' importante per seguire la **progressione** di certe malattie come il **mieloma**, in cui la quantità di **Ig monoclonali** nel siero è indice di **attività della malattia** e anche per la diagnosi di **immunodeficienze** dove valori estremamente **bassi** di **Ig** sono caratteristici di **agammaglobulinemia**.

Si può anche mettere in evidenza il **deficit selettivo** di una sola classe di **Ig**. La determinazione quantitativa delle **Ig** è utile anche per **seguire nel tempo** aumenti di modesta entità in pazienti con **malattie autoimmuni** come il **LES** o l'**artrite reumatoide**. →

**Immunolettroforesi** o **immunofissazione** sono importanti per la **valutazione qualitativa delle Ig** presenti in elevate concentrazioni come la definizione della natura **monoclonale** o **policlonale** o la rilevazione della possibile predominanza di una classe di **Ig** sulle altre (*IgA, IgM, IgG*)

La **misurazione delle crioglobuline** (**Ig** che precipitano a freddo producendo **aggregati** che possono ostruire piccoli **capillari** nelle regioni periferiche e più fredde del circolo) si attua prelevando un **campione di sangue**, centrifugando a caldo e ponendo il siero in frigorifero finché si forma il **precipitato**. Si ottiene il **valore %** del **precipitato** sedimentato **rispetto al Volume totale del siero** → **criocrito** (analogo all'ematocrito)

La **misurazione della proteina di Bence-Jones** (consistente nella escrezione di **catene leggere** delle **Ig** nelle urine quando la **produzione** di **Ig** non è controllata, e in grado di **danneggiare** le cellule dei **tubuli renali**) si attua col **metodo del riscaldamento**, osservando la formazione di precipitato nel siero riscaldato a **56°C** e sua **scomparsa** all'ulteriore **aumento** della **temperatura**

La **diagnosi di amiloidosi** (dovuta a precipitazione nei tessuti di **complessi proteici insolubili** derivati dalla **proteolisi parziale** delle **catene leggere** delle **Ig**) si attua su tessuto **biptico** con tecniche **citologiche**.

### Complessi Immuni

La presenza di **complessi immuni circolanti (CIC)** è significativa di **varie malattie** (*glomerulonefrite LES, epatite virale cronica, vasculite*). La risposta patologica degli CIC è determinata da...

-> **attivazione chemiotassi** ed **infiltrazione cellulare**

-> **liberazione di enzimi proteolitici** a livello di *cuore, polmoni, reni, membrana sinoviale ecc.*

I **CIC** possono essere valutati come materiale **crioprecipitabile** mantenendo il siero a **1-4°C**, ma solo in presenza di grandi quantità di **CIC**. Altri **2 sistemi** valutano la presenza di **CIC** anche a basse concentrazioni...

→ nel **legame al C1q** (*C1q binding*) si aggiunge **C1q** marcato con isotopi radioattivi al siero e se ci sono **CIC** il **C1q** si legherà alla porzione **Fc** delle **Ig** dei **CIC** che saranno marcati con il composto radioattivo in modo **proporzionale** al numero di siti **Fc** sulle **Ig** (normalmente la **%** deve essere < al **15%**)

→ il 2° metodo è basato sulle **cellule Raji** derivate da un **linfoma di Burkitt**. Queste hanno i **recettori** sulla membrana per la **frazione del Complemento (C3)**, che entrano a far parte dei **CIC**. Le cellule **Raji** sono **incubate** col siero così i **CIC** (se presenti) si legano alle cellule mediante il **complemento**. Le cellule sono lavate ed **incubate** con **Ig anti-Ig umane radiomarcate** che si legano ai **CIC** sulla superficie delle cellule. Viene poi **misurata la radioattività**.

## Complemento nel Siero

L'integrità del sistema complementare può essere esplorata utilizzando un saggio emolitico detto **CH50**. **Campioni** diluiti di siero sono messi a contatto con eritrociti (*di Montone*) **sensibilizzati** con **Ig** specifiche. Il **complemento** nel siero determinerà una **emolisi** rilevabile allo **spettrofotometro** come **Hb** liberata dai **GR**. Questo **test** si effettua in tutte quelle condizioni in cui sia sospettata una **ridotta** funzionalità del **Complemento**. Oggi l'uso del **CH50** è stato **soppiantato** dai più moderni saggi di tipo immunologico, metodi rigorosamente **standardizzati** e **stabili nel tempo**.

Le frazioni più di **frequente** misurate nel siero sono **C3 (75-175mg/dl)** e **C4 (15-45mg/dl)** che sono quelli **più facilmente** misurabili in quanto **più abbondanti**. Sistemi di dosaggio più sofisticati sono in grado di determinare → **C1q – C2 – C3 – C4 – C4b – C5 – C6 – fattore B – C1 INH**.

## Immunità Cellulare

Può essere valutata la funzionalità della **immunità cellulare** con test **in vivo** oppure con test **in vitro** su linfociti estratti dal paziente.

-> i **test cutanei** usano **estratti** di microrganismi (*batteri, virus, funghi*) **inoculati** per via intradermica. Se la **immunità cellulare** dell'individuo è **normale**, si forma una area **arrossata** ed **indurita** intorno al punto di inoculo. Se invece **non** si ha risposta ad antigeni **comuni** allora il paziente è detto **anergico** ed è suscettibile ad infezioni di **agenti opportunisti**.

-> è possibile **separare i linfociti del sangue mediante centrifugazione con gradiente di densità** i **linfociti** isolati vengono stimolati con **fitoemoagglutinina (PHA)**. Se si ha attivazione, si svolge successivamente l'**incorporazione di timidina radioattiva** nel DNA delle cellule proliferanti.

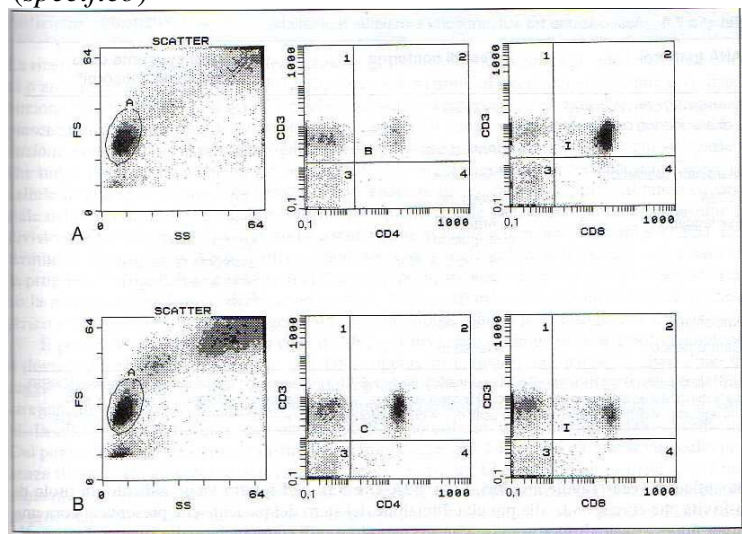
-> una **variante** del metodo è utilizzata nella **coltura mista linfocitaria** per vagliare la compatibilità tra **donatore** e **ricevente** nei trapianti (*soprattutto di midollo*). I **linfociti** dell'**uno** e dell'**altro** isolati vengono mischiati insieme per vagliare la **reattività** degli **antigeni** linfocitari del donatore con i **linfociti** del ricevente. Valori **bassi** = **buona** compatibilità

## Marcatori di Superficie Linfocitari

I marcatori di sup. dei linfociti sono **antigeni** che svolgono **specifiche funzioni** e li caratterizzano in sottogruppi. Una tecnica per individuare i vari **markers** linfocitari è la **citometria a flusso** :

-> una **tecnica di separazione cellulare che utilizza Ig specifiche per i vari antigeni** espressi sulla membrana dei **linfociti**. Le cellule vengono classificate a seconda della **dimensione**, della **complessità intracellulare** e poi della **intensità di fluorescenza** delle **Ig** applicate ai **markers di superficie**.

I markers dei linfociti sono -> **cellule T** --> **CD2 – CD3 (specifico)**  
-> **cellule NK** --> **CD2 – CD56 (specifico)**  
-> **cellule TH** --> **CD4 (specifico)**  
-> **cellule CTL** --> **CD8 (specifico)**  
-> **cellule B** --> **CD19 (specifico)**



**Figura 7.6** Scattergrammi da citometria a flusso a tre colori per i marcatori linfocitari di superficie. I riquadri a sinistra evidenziano il riconoscimento dei linfociti (racchiusi all'interno della linea A) sulla base alle dimensioni (*forward scatter*, FS) e della granularità (*side scatter*, SS). I riquadri al centro mostrano i linfociti marcati con CD3 (marker di cellule T) e CD4 (T helper). I punti compresi nel quadrato 2 rappresentano cellule con sufficienti antigeni di superficie da essere classificate come T CD4-positivo. I riquadri a destra mostrano linfociti marcati con CD3 e CD8 (cellule T suppressor); i punti nel quadrato 2 rappresentano le cellule CD8-positive. Nei tre riquadri in alto (A) è riportato l'esempio di un paziente affetto da AIDS che presenta una notevole diminuzione dei linfociti CD4 e un rapporto CD4/CD8 pari a 0,17. L'esempio illustrato nei tre riquadri in basso (B) si riferisce a un individuo normale, con un rapporto CD4/CD8 di 1,53.

### Tipizzazione tissutale

La **tipizzazione HLA** si effettua utilizzando **antisieri** specifici per i singoli antigeni HLA. Il **legame** della **Ig** allo specifico **antigene** di membrana comporta la **morte** della cellula se alla soluzione viene aggiunto del **complemento**. Questo test è anche chiamato **test di microtossicità**.

### Autoanticorpi - parte generale -

La ricerca degli **autoanticorpi** può venire effettuata con le normali metodiche.

> la **immunofluorescenza indiretta** prevede la **pre-incubazione** del siero del paziente con materiale tissutale **montato su vetrino**. Dopo si ha il **lavaggio** del vetrino che allontana le **Ig** non legate, e successivamente si pone il vetrino in incubazione con **Ig anti-Ig umane** marcate con **fluoresceina** che evidenzia gli **autoanticorpi** legati agli **antigeni** tissutali. L'esame al microscopio è effettuato con **luce ultravioletta**.

Questo metodo è usato per la ricerca degli **anticorpi anti-nucleo (ANA)**

-> i metodi di **doppia diffusione in gel di agarosio** o di **ControImmunoElettroforesi in agarosio** permettono di evidenziare la reattività della preparazione con gli **antigeni nucleari estraibili (ENA)**

I test per ANA ed ENA identificano autoanticorpi diretti contro **antigeni** presenti in tutte le cellule dell'organismo

### Autoanticorpi antinucleo

La ricerca di **Ig anti-nucleo** permette di identificare **Ig** contro il **DNA**, contro gli **istoni**, contro gli **antigeni nucleolari solubili**. La fluorescenza assume **pattern** singolari all'interno dei nuclei, che consistono in

-> una **distribuzione omogenea** significa che ogni nucleo è marcato in modo uniforme e tutti i nuclei presentano lo stesso grado di marcatura, e ciò si ha in presenza di **Ig anti-DNA** o **anti-Istone**. Il titolo di un ANA positivo omogeneo è correlato alla **progressione del LES**. In caso di ANA positivo, si può usare un test **ELISA** (per distinguere tra **Ig anti-dna** o **anti-istone**) che usa, come **antigene**, del **DNA-purificato**. Il **LES** con **Ig anti-istoni** potrebbe essere indotto da farmaci e quindi **reversibile**, la presenza di **Ig anti-DNA** è indice di **LES idiopatico**.

Gli **Ig anti-DNA** possono anche essere distinti in :

-> **Ig specifiche per la molecola nativa o a doppia elica** (n-DNA o ds-DNA). La presenza di **Ig** contro **ds-DNA** è considerata  **clinicamente significativa**, e sono spesso correlati alla **gravità della glomerulonefrite** nel LES.

-> **Ig specifiche per la molecola denaturata o a singola elica** (ss-DNA). La presenza di **Ig** contro **ss-DNA** non è né **sensibile** e né **specifico** di attività di malattia.

-> un **pattern punteggiato** è caratterizzato da **zone negative** non fluorescenti nel nucleo, in corrispondenza dei **nucleoli**. Le **Ig** in questo tipo di positività sono dirette contro **antigeni nucleari solubili** o **estraibili ENA** e sono l'**antigene Sm** e le **RNP (ribonucleoproteine)**. Alti livelli di **antigene Sm** suggeriscono la presenza di **LES**, mentre alti livelli di **RNP** sono tipici delle **connettiviti miste**.

-> una **variante del pattern punteggiato** si ha in presenza di **Ig** contro l'**antigene nucleare delle cellule proliferanti (PCNA)**. Le cellule proliferanti presentano la più alta **intensità di colorazione**.

-> il **pattern anti-nucleolare** è complementare a quello punteggiato in quanto la fluorescenza si ha nelle **regioni negative** del **pattern punteggiato**. Le **Ig** sono dirette contro l'**RNA del nucleolo**, specifico della **sclerodermia**.

-> il **pattern anticentromerico** è costituito da piccoli **punti fluorescenti** distribuiti in modo uniforme nel nucleo nelle **cellule in interfase**, mentre in quelle in metafase sono **allineati lungo i cromosomi**.

Con il **test per gli ANA** possono anche essere messi in evidenza **autoanticorpi** con specificità assoluta per l'**antigene** ma **privi di correlazione** con qualche **malattia**.

-> le **Ig** contro l'**apparato del fuso**, contro il **Golgi**, contro i **centrioli**, contro i **ribosomi** e contro altri **organelli subcellulari**. Importanti sono :

-> l'**anticorpo anti-muscolo liscio ASMA**, messo in evidenza col test per gli ANA

-> l'**anticorpo anti-mitocondrio AMA**, sempre messo in evidenza col test per gli ANA

-> il **fattore reumatoide**, un **autoanticorpo** che reagisce con altre **Ig (sopr. IgG)** per formare **complessi immuni**.

### Anticorpi anti-fosfolipidi

Gli **APA** sono individuati con il **metodo ELISA**; reagiscono formando un **complesso** con una **glicoproteina sierica normale** e i **fosfolipidi** e determinano l'insorgere di **trombosi** e **aborti spontanei ricorrenti** nei soggetti affetti dalla **sindrome da Ig anti-fosfolipidi**. Sono **Ig acquisiti**, possono comparire in associazione con **malattie sistemiche autoimmuni** o anche **da soli**.

### Anticorpi organo-specifici

In pazienti con malattie localizzate in un **particolare organo**, si possono mettere in evidenza **Ig** contro gli **antigeni** di quel particolare **organo** -> **Ig organo-specifiche**. Accanto ad **auto-Ig** che reagiscono col tessuto colpito, possono essere presenti anche **auto-Ig** che reagiscono con altri tessuti. Nella **tiroidite di Hashimoto**, possono essere presenti **Ig** che reagiscono contro le cellule parietali della **mucosa gastrica**.

## Prove Allergologiche

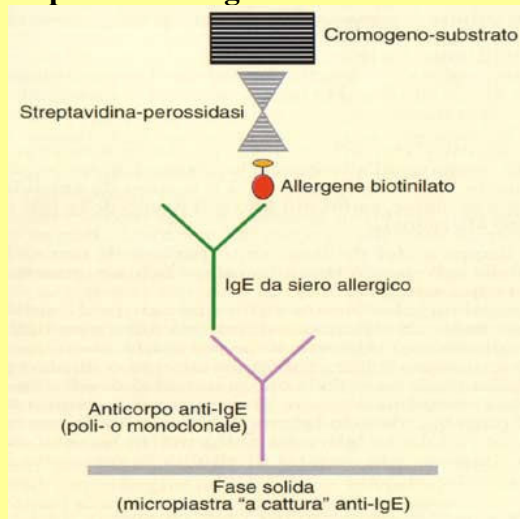
I test per risalire all'**allergene** responsabile della **allergopatia** nel paziente comprendono :

→ **test cutanei** in cui ogni potenziale **allergene** è applicato sulla cute mediante **scarificazione**.  
se nella sede di applicazione compare rossore e indurimento → **test positivo**.



Questa è una tecnica **fastidiosa** e **limitata** (non si possono avere troppe applicazioni contemporaneamente di diversi allergeni) → sono state sviluppate **altre metodiche**, basate sulla ricerca di **IgE**.

→ **ricerca di IgE nel siero**. Gli individui allergici hanno [**IgE**] nel siero più elevate dei soggetti **normali** per cui sono disponibili **saggi immunologici** su fase solida che dimostrano la **presenza di IgE** contro una **batteria di allergeni**.



Gli allergeni sono **legati a microsferi** e incubati col **siero del paziente**. Se ci sono **IgE** specifiche esse si **legano alle microsferi**. Segue una fase di **lavaggio** e una ulteriore incubazione del campione con **Ig anti-IgE** marcate (radiazioni o enzimi) dopo di che si procede ad un altro lavaggio e alla **misurazione della marcatura**.

Questi saggi sono chiamati -> **RAST (RadioAllergoSorbent Test)**

Prima di effettuare questi test specifici per individuare un allergene *procedendo alla cieca*, è utile sottoporre il paziente ad una **dettagliata anamnesi** per individuare a quale classe di allergeni appartenga quello **responsabile della patologia del paziente**.



# DOPING

## INTRODUZIONE

L'uomo ha sempre cercato di aumentare le proprie forze in modo artificiale.

In **tempi antichi** si faceva uso di sostanze vegetali contenute in alcune piante o funghi particolari.

Attualmente i progressi della moderna farmacologia hanno permesso all'uomo di mettere a punto sostanze estremamente attive per curare malattie talora gravi; alcuni di questi farmaci in qualche circostanza hanno un effetto molto positivo sulle prestazioni fisiche e motorie dei soggetti sani, ma...

Deve essere noto a tutti che l'assunzione di farmaci per aumentare la prestazione è un atto **grave contro la morale sportiva** → contravviene al principio che **ciascuno deve gareggiare secondo le proprie capacità, acquisite attraverso i sacrifici imposti da un corretto allenamento e da un adatto stile di vita.**

L'inosservanza di tali norme è punita con **sanzioni molto severe**, ma soprattutto deve essere soprattutto noto che l'uso di sostanze farmacologiche può determinare un **grave danno alla salute** in tempi più o meno brevi.



## DEFINIZIONE E SOSTANZE PROIBITE

La definizione di doping secondo la **LEGGE 14 dicembre 2000, n°376 (art. 1)** del Ministero della Salute è la seguente: **Costituiscono doping la somministrazione o l'assunzione di farmaci o di sostanze biologicamente o farmacologicamente attive e l'adozione o la sottoposizione a pratiche mediche non giustificate da condizioni patologiche ed idonee a modificare le condizioni psichiche o biologiche dell'organismo al fine di alterare le prestazioni agonistiche degli atleti.**

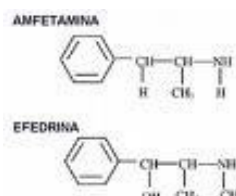
LISTA STABILITA DALLA WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA):

1. *Stimolanti*
2. *Narcotici*
3. *Agenti anabolizzanti*
4. *Diuretici*
5. *Ormoni peptidici mimetici e analoghi*
6. *Doping ematico*
7. *Manipolazioni farmacologiche, chimiche e fisiche*
8. *Alcool*
9. *Cannabinoidi*
10. *Anestetici locali*
11. *Corticosteroidi*
12. *Beta-bloccanti*
13. *Integratori*
14. *Doping genetico*

### 1. Stimolanti

Essi comprendono vari tipi di farmaci che **incrementano la vigilanza, riducono la fatica**, il senso di fame e possono aumentare la competitività e l'aggressività. Il loro uso può produrre una diminuzione della capacità di autocontrollo che potrebbe portare a situazioni di pericolo sia per se stessi che per gli altri.

**L'amfetamina** e le sostanze affini sono stati i farmaci più utilizzati e che hanno prodotto i maggiori danni tra i praticanti le attività sportive, essendo state responsabili di vari casi di **morte di atleti.**







Altre sostanze stimolanti sono **Pefedrina** e le sostanze affini, presenti in numerosi decongestionanti nasali.

La **caffaina** è contenuta in numerose bevande di uso quotidiano: caffè, the, coca cola, prodotti di erboristeria come il guaranà.



Rientrano tra gli stimolanti anche la **cocaina** e i **beta2-agonisti** (farmaci antiastmatici), questi ultimi utilizzati in ambito sportivo per il loro effetto di stimoli sulla ventilazione oltre che sull'attività contrattile del cuore.



**Effetti:** stimolazione sul SNC con aumento dell'attenzione, della competitività, riduzione della sensazione di fatica. Aumento della frequenza cardiaca, riduzione del senso di fame.

**Effetti avversi:** tossicomania, aggressività, insonnia, psicosi. Nel sistema cardiocircolatorio provocano gravi danni con rischio di infarto e arresto cardiaco.

## 2. Narcotici



Le sostanze che appartengono a questa classe, rappresentate dalla **morfina** e dai suoi analoghi chimici (**oppiacei**) e dall'**eroina**, vengono usate come **analgesici molto forti**.

**Ormai vengono poco utilizzate** sia in campo medico che sportivo poiché il loro effetto analgesico può essere raggiunto anche da altri farmaci ad es. anestetici locali che non presentano gli stessi effetti collaterali.

**Effetti:** interferenza della percezione del dolore con aumento della tollerabilità allo stesso.

**Effetti avversi:** alterazione dell'umore, psicosi, nausea vomito, broncospasmo e depressione della funzione respiratoria.

## 3. Agenti anabolizzanti

Si intendono quelle sostanze che agiscono stimolando i processi costruttivi ed il ricambio delle proteine in particolare. La loro azione si esplica aumentando la **maturazione ossea e lo sviluppo delle masse muscolari**.

Rientrano tra gli agenti anabolizzanti gli **androgeni**, ormoni sessuali maschili il cui prototipo è il **testosterone**, gli **steroidi anabolizzanti**, farmaci derivati dal testosterone ed **alcuni beta2agonisti**.

In ambito sportivo tutti questi farmaci sono stati utilizzati nel tentativo di incrementare la massa e la forza muscolare in concomitanza con allenamenti specifici e con un aumento dell'apporto proteico alimentare, sia di migliorare la competitività aumentando l'aggressività.

**Effetti avversi:**

**Nei maschi:** atrofia testicolare, oligospermia, alterazione della funzione epatica con possibilità di tumori.

**Nelle femmine:** soppressione delle mestruazioni, virilizzazione (crescita di peli, abbassamento della voce, atrofia delle ghiandole mammaria), danni irreversibili all'apparato riproduttore.

**Nei giovani:** blocco della crescita con precoce saldatura delle cartilagini di accrescimento delle ossa lunghe. Effetti notevoli sono anche a carico del SNC, con danni sulla personalità del soggetto (stati depressivi, psicosi).



#### 4. Diuretici

Si definiscono diuretici quei farmaci che determinano un **aumento della produzione renale di urina** (**es. ACE inibitori**).

Gli **sportivi** utilizzano i diuretici per **due ragioni**:

- 1) ridurre il peso rapidamente in alcuni sport ad es. il pugilato dove si viene divisi in categorie di peso.
- 2) aumentare la velocità di eliminazione, tramite l'urina, delle sostanze dopanti assunte o ridurre la loro concentrazione nelle urine nel tentativo di nasconderle.



L'eccessiva perdita di liquidi però può portare gli sportivi a gravi rischi e a conseguenze pericolose (**disidratazione, collasso**) poiché durante l'attività fisica inevitabilmente già si perde una grande quantità di liquidi con la sudorazione.

#### 5. Ormoni peptidici mimetici e analoghi

Non bisogna confondersi con gli ormoni steroidei di cui abbiamo parlato, anche se gli **effetti** ricercati dagli atleti che li usano sono gli stessi, cioè **anabolizzanti**.

**Gonadotropine ipofisarie e corionica (FSH e LH, hCG)** e quelle ormai prodotte in laboratorio favoriscono il rilascio degli ormoni anabolizzanti e di testosterone; vengono prodotte in gran quantità dalle donne durante la gravidanza e risultano necessarie per il suo normale compimento.

**Effetti avversi:** vedi anabolizzanti.

**ACTH** agisce stimolando le ghiandole surrenali a produrre a sua volta tutti gli ormoni corticosteroidi (cortisolo e adrenalina) che aumentano le prestazioni fisiche e le risposte agli stress.

**Effetti avversi:** gastrite, ulcera, tendenza al diabete, insonnia cefalee, miopatie e osteoporosi  
**GH** è prodotto dall'ipofisi, è fondamentale nell'accrescimento del bambino, il suo utilizzo da adulto stimola il metabolismo proteico, effetto ricercato in ambito sportivo.

**Effetti avversi:** tale utilizzo determina gravi danni sia a carico dello scheletro sia a carico degli organi interni e l'alterazione del metabolismo.

**Eritropoietina** è un ormone prodotto dai reni, esplica la sua funzione a livello del midollo osseo promovendo la produzione dei globuli rossi. Viene utilizzato per curare le anemie e in alcuni casi durante le convalescenze post-operatorie, per ristabilire le normali condizioni di salute. Il suo abuso in ambito sportivo avviene poiché si ricerca di avere **più globuli rossi che portano ossigeno ai muscoli**.

**Effetti avversi:** cambiando la composizione del sangue, aumenta la sua viscosità provocando gravi danni al sistema cardiaco che diviene insufficiente e a livello dei vasi dove si possono formare dei trombi.

#### 6. Doping ematico

Questa metodologia di doping si attua mediante somministrazione ad un atleta di sangue o di prodotti ematici affini contenente globuli rossi o altri trasportatori di ossigeno.

**Effetti:** l'atleta aumenta così i propri globuli rossi e avrà un maggior apporto di ossigeno nei tessuti muscolari.

**Effetti avversi:** L'eccessivo aumento dell'ematocrito comporta un notevole rischio di ipertensione, insufficienza cardiaca da sovraccarico e trombosi.



## 7. Manipolazioni farmacologiche, chimiche e fisiche

Sostanze e metodi che possono alterare l'integrità e quindi la validità dei campioni di urine. Rientrano fra questi la **cateterizzazione**, la sostituzione o alterazione delle urine mediante altri farmaci o sostanze chimiche.

## 8. Alcool

**Effetti:** rimozione di ansia e tensione nervosa, aumento della sicurezza di sé .

**Effetti avversi:** depressione dell'attività del sistema nervoso. Alterazione della coordinazione.



## 9. Cannabinoidi

Con il termine cannabinoidi si intende una serie di sostanze, circa 60, contenute nella canapa indiana le cui principali forme di utilizzo sono **marijuana** e **hashish**. In ambito medico queste sostanze sono utilizzate per **combattere la nausea ed il vomito indotti dalla terapia antitumorale** e per il rilassamento nei trattamenti psicoanalitici.

**Effetti:** aumento del senso di benessere, euforia psicologica.

**Effetti avversi:** riduzione della forza muscolare e della capacità di concentrazione, aumento della frequenza cardiaca, ridotte capacità coordinative.



## 10. Anestetici locali

Il loro uso è consentito solo quando esista una giustificazione medica (**es. Benzidamina**)

**Effetti:** Blocco della generazione e conduzione dell'impulso nervoso e quindi del dolore.

**Effetti avversi:** Irrequietezza, tremori, convulsioni se le dosi sono elevate, collasso cardiovascolare, reazioni allergiche.

## 11. Corticosteroidi

I corticosteroidi naturali o di sintesi in laboratorio sono prevalentemente usati come farmaci **anti-infiammatori** e analgesici.

**Effetti:** effetto euforizzante, azione anti-infiammatoria, capacità di resistere a stimoli nocivi.

**Effetti avversi:** aumento della pressione cardiaca, iperglicemia, ulcera gastrica, alterazione degli elettroliti della membrana cellulari.

## 12. Beta-bloccanti

Vengono utilizzati nel trattamento delle ipertensioni e di altre problematiche cardiache riducendo l'attività del cuore. Gli atleti non le utilizzano per aumentare le prestazioni, ma in alcuni sport come il  **tiro a segno** , vengono usate per **ridurre i tremori** delle mani e la frequenza cardiaca.

**Effetti:** riduzione delle funzioni cardiache, riduzione della pressione arteriosa, riduzione del tremore e dell'ansia.

**Effetti avversi:** riduzione delle funzioni cardiache in soggetti bradicardici con possibili **arresti cardiaci**, senso di fatica, ipoglicemia.



### 13. Integratori o ergogeni

Bisogna innanzi dire che una buona condizione fisica dipende da una buona nutrizione. Gli integratori sono qualcosa di diverso rispetto al cibo e ai farmaci; sulla maggior parte degli integratori non ci sono ancora informazioni sicure, e il loro impiego razionale nel curare le malattie è discutibile e incerto. Gli ergogeni possono agire in diversi sistemi:

- Energetici**: esempi sono bevande di fruttosio, maltodestrine, trigliceridi a catena media
- Supplementazione proteica**: aminoacidi ramificati (BCAA)
- Reintegrazione delle perdite elettrolitiche**: sodio, cloro, potassio, magnesio
- Bioregolazione**: esempi sono le vitamine
- Metabolismo**: L-carnitina, Coenzima Q10, inosina, colina, creatina, fitocomplessi boro, cromo...



La **creatina** è una sostanza naturale presente nella carne e nel pesce e prodotta dall'organismo che aumenta la forza muscolare, brucia i grassi e ritarda la fatica, ma ha come effetti collaterali l'aumento di peso, nausea, diarrea, crampi e alterazioni renali

I **fitocomplessi** sono prodotti contenenti erbe che hanno possibili effetti collaterali nocivi per la salute; esempi di erbe potenzialmente pericolose sono il ginseng, il guaranà, l'efedra.

Per molti di questi prodotti ancora non esiste una regolamentazione nelle gare sportive.

### 14. Doping genetico

Costruire in laboratorio un muscolo con particolari caratteristiche non è più una novità ("topi Schwarzenegger"). La terapia genica può essere naturalmente positiva per curare patologie muscolari, ma questo problema con tutta probabilità nei prossimi anni interesserà anche il doping.



## ALTRE COSE IMPORTANTI DA SAPERE SUL DOPING

Non tutte le sostanze sono considerate dopanti per tutti gli sport; alcune sono considerate dopanti solo per alcuni sport, altre sono vietate, senza prescrizione medica per un valido motivo di salute, dentro e fuori la competizione (es. eritropoietina). Altri sono vietati solo nella competizione sportiva, ma sono comunque pericolosi (es. alcuni stimolanti).

E' anche importante considerare la dose della sostanza, che, come ogni sostanza, ha un certo valore soglia che ne determina la tossicità. (es. la caffeina al di sopra dei 250mg diventa tossica)

Recentemente è stato applicato un contrassegno di divieto sulle confezioni di prodotti farmaceutici contenenti **SOSTANZE VIETATE** per **DOPING** :



e riportano la seguente avvertenza:

“per chi svolge attività sportiva: l'uso del farmaco senza necessità terapeutica costituisce doping e può determinare comunque positività ai test antidoping”