

ANALISI CHIMICO-CLINICHE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Farmacia
a.a. 2022/2023

Docente: Filippo PRENCIPE

filippo.prencipe@units.it

DSCF, ed. C11, secondo piano, studio 273

Materiale del corso

MOODLE

- 047FA - ANALISI CHIMICO CLINICHE 2022
- PW: PSSWACC2022

Contenuti

- Esame chimico-clinico:
 - variabilità preanalitica
 - variabilità analitica
 - variabilità biologica e valori di riferimento
- Metodi di separazione delle sostanze:
 - evaporazione, dialisi, centrifugazione, filtrazione, estrazione con solvente, cromatografia, elettroforesi.
- Tecniche analitiche:
 - spettroscopia molecolare (UV-VIS, spettroscopia di riflettanza, luminescenza, turbidimetria, nefelometria), spettrometria di massa, determinazione dell'attività enzimatica, tecniche immunologiche, tecniche per la diagnosi molecolare, tecniche elettrochimiche.
- Autoanalisi

Prerequisiti

Concetti base di

- Biologia: cellula, membrane biologiche, basi di genetica, etc
- Chimica: atomo, molecola, polarità, gruppi funzionali, etc
- Biochimica: proteine (enzimi, Ab), acidi nucleici, ecc.
- Anatomia
- Fisiologia
- Patologia

Obiettivi del corso

1. **Conoscenza e capacità di comprensione:** al termine del corso lo studente dovrà aver acquisito le conoscenze di base sulle tecniche e strumentazioni impiegate nelle analisi chimico-cliniche
2. **Capacità di applicare conoscenza e comprensione:** al termine del corso lo studente dovrà essere in grado di applicare le conoscenze acquisite al punto 1 ad esempi pratici di analisi chimico-cliniche e di riconoscerne pregi e limiti
3. **Autonomia di giudizio:** al termine del corso lo studente dovrà essere in grado di riconoscere pregi e difetti delle varie tecniche analitiche viste nel corso e di proporre soluzioni per migliorare un'analisi utilizzando una tecnica piuttosto che un'altra
4. **Abilità comunicative:** al termine del corso lo studente dovrà essere in grado di esporre chiaramente i concetti di cui al punto 1 e 2
5. **Capacità di apprendimento:** al termine del corso, grazie alle conoscenze di base acquisite, lo studente dovrà essere in grado di approfondire autonomamente argomenti inerenti le analisi chimico-cliniche.

Modalità d'esame

- Prova orale
- Si può suddividere il programma in quattro macroargomenti

- Esame chimico-clinico
- Metodi di separazione
- Tecniche analitiche
- Autoanalisi

durante la prova orale sarà posta una domanda per ciascun argomento collegandosi alla parte di autoanalisi.

- Lo studente dovrà anche essere in grado di correlare le tecniche di separazione e analitiche ad ***esempi di analisi viste durante il corso***.

Testi

- Spandrio Luigi
PRINCIPI E TECNICHE IN CHIMICA CLINICA
Ed. Piccin
- David S. Hage, James D. Carr
CHIMICA ANALITICA E ANALISI QUANTITATIVA
Ed. Piccin
- Giorgio Federici
MEDICINA DI LABORATORIO
Ed. McGraw-Hill

Slides ed eventuale Materiale didattico aggiuntivo fornito tramite la piattaforma Moodle.

ESAMI CHIMICO-CLINICI

Dato un campione biologico di un paziente, un esame chimico-clinico ricava dati qualitativi e/o quantitativi su determinati costituenti o analiti mediante l'applicazione di metodi chimici, fisici e biologici, che consentono al medico di ottenere informazioni a scopo preventivo, diagnostico, prognostico, terapeutico e riabilitativo.

ESAMI CHIMICO-CLINICI

Utile per:

- Scopi diagnostici
- Scopi prognostici
- Diagnosi d'urgenza
- Valutazione dello stato generale di salute (prevenzione)
- Valutazione di patologie allo stato sub-clinico
- Controllo di un trattamento farmacologico o valutazione della posologia
- Ripetizione di esami con valori *border-line*
- Funzione medico-legale
- Attività di ricerca

ESAMI CHIMICO-CLINICI

FASE PREANALITICA

- informazione e preparazione del paziente
- raccolta dei campioni biologici
- trattamento e conservazione dei campioni biologici
- trasporto dei campioni biologici

FASE ANALITICA

- esecuzione analisi
- controlli di qualità

FASE POSTANALITICA

- conservazione dei campioni biologici
- sistema raccolta risultati
- stampa risultati
- controllo e firma dei risultati
- disponibilità per i quesiti dei pazienti
- valutazione clinica dei risultati



32-75% degli errori
avvengono in questa fase

CAMPIONE



ANALISI

DATO ANALITICO

CONFRONTO CON I
VALORI DI
RIFERIMENTO

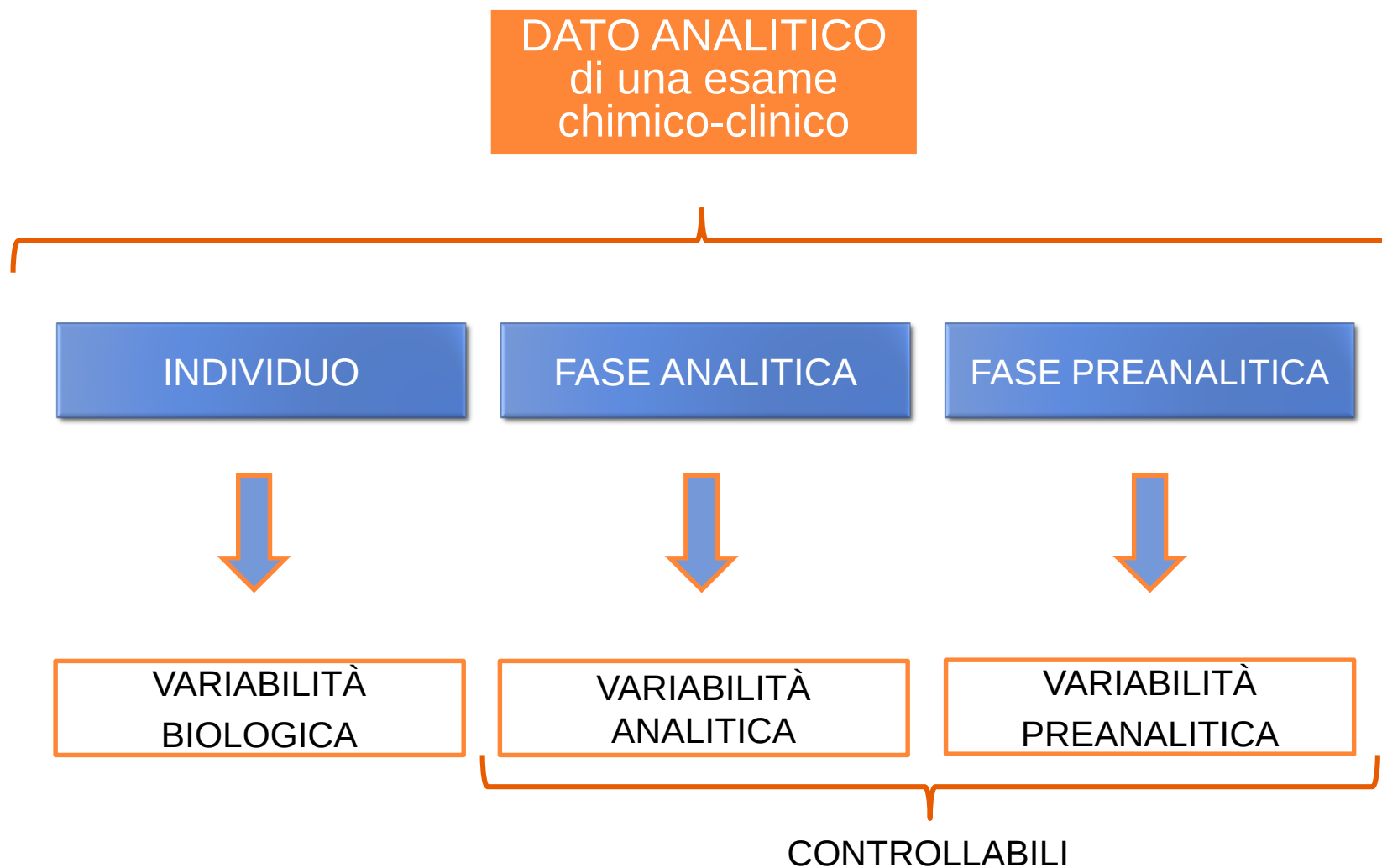


VALORE
NORMALE



VALORE
ANOMALO

Dato analitico



VARIABILITÀ PREANALITICA

Variabilità preanalitica

- La fase preanalitica coinvolge diversi operatori
- Servono procedure precise per la raccolta e successiva manipolazione del campione per garantire:
 - ✓ Integrità chimica
 - ✓ Integrità biologica
 - ✓ Integrità morfologica

del campione che contribuiranno alla correttezza del risultato analitico finale.

Fasi preanalitiche

1. Compilazione della ricetta medica
2. Preparazione del paziente
3. Raccolta del campione
4. Trasporto e spedizione
5. Accettazione dei materiali e verifica della loro idoneità
6. Eventuali pretrattamenti o trattamenti specifici
7. Smistamento ai settori analitici
8. Eventuale conservazione

Sigle

5 HIAA	Acido 5 idrossi-indol-acetico
1,25(OH) ₂ D	Vitamina D (1,25 diidrossicolecalciferolo)
25-OH-D ₂	Vitamina D (25 idrossicolecalciferolo)
5 HT	5 idrossi-triptamina o Serotonina
17-OH-P	17 idrossiprogesterone
5NT	5 nucleotidasi
ACT	Ormone adrenocorticotropo
ADH	Ormone antidiuretico
AFP	Alfa fetoproteina
ALA	Acido delta amino-levulinico
ANA	Anticorpi antinucleo
ANF	Fattore natriuretico atriale
Anti-TG	Anticorpi anti-tireoglobulina
Anti-TPO	Anticorpi anti-tireoperossidasi
aPTT	Tempo di protrombina attivata
AT	Antitrombina
BAL	Lavaggio broncoalveolare
β HCG	Gonadotropina corionica umana
BTG	β-tromboglobulina
C-ANCA	Anticorpi anticitoplasma PMN
CD	Classe di differenziazione dei linfociti
CEA	Antigene carcinoembrionario
CK o CPK	Creatinfosfochinasi
CL	Chimiluminescenza
CMI	Concentrazione minima inibente
CO	Monossido di carbonio
CO ₂ totale	Bicarbonati

CS	Complessi solubili
CTAD	Citrato-teofilina-adenosina-dipiridamolo
DHA	Deidroepiandrosterone
DHEA-S	Ddeidrieandrosterone solfato
DHT	Di-idro-testosterone
DOC	Desossicorticosterone-11
E1	Estrone
E2	Estradiolo
E3	Estriolo
EDTA	Etilene-diamino-tetra-acetile
EF	Elettroforesi
EIA	Enzyme immunoassay

ENA	Anticorpi anti-antigene nucleare solubile
ES	Electrosyneresi
FIA	Fluorescent immunoassay
FP4	Fattore 4 piastrinico
FSH	Ormone follicolostimolante
FT3	Triiodotironina libera
FT4	Tiroxina libera
G6PDH	Glucoso 6 fosfato deidrogenasi
GT	Gamma-glutamyl-transferasi
GH	Ormone della crescita
GOT/AST	Aspartato amino-transferasi
GPT/ALT	Alanina aminotransferasi
h CT	Calcitonina o tirocalcitonina
HA	Emoagglutinazione
HAI	Emoagglutinazione indiretta
HbA1c	Emoglobina glicosilata
HDL	Lipoproteine ad alta densità
HIV	Virus dell'immunodeficienza umana
HLP	Ormone lattogeno placentare

hTG	Tireoglobulina
HVA	Acido omovanillico
IEP	Immuno-elettroforesi
IF	Immunofluorescenza
IFI	Immunofluorescenza indiretta
IFIX	Immunofissazione
IFN	Interferone
Ig	Immunoglobulina
IHA	Inibizione dell'emoagglutinazione
TBG	Proteina legante la tiroxina
IL	Interleuchina
IL-2R	Recettore interleuchina 2
IL-2Rs	Recettore solubile dell'IL2
INR	International normalized ratio
LAP	Leucina aminotransferasi
LCR	Liquido cefalorachidiano
LDH	Latticodeidrogenasi
LLP	Lipoproteina lipasi
LH	Ormone luteinizzante

LAC	Lupus anticoagulant
MCA	Mucin-like carcinoma associated antigen
NEFA	Acidi grassi non esterificati
NSE	Enolasi specifica dei neuroni
P-ANCA	Anticorpi anti-citoplasma (periferico) PMN
PAP	Fosfatasi acida prostatica
PCT	Pro-calcitonina
PC	Proteina C
PCR	Proteina C reattiva
PDF	Prodotti di degradazione della fibrina
PK	Piruvato kinasi
PRL	Prolattina
PSA	Antigene prostatico
PS	Proteina S
PTH intatto	Paratormone
PTH RP	Peptide rilasciante il paratormone
PTT	Tempo di protrombina
RBP	Proteina legante il retinolo
RF	Fattore reumatoide
RNP	Anticorpi anti-ribonucleoproteine
R-PCA	Resistenza alla proteina C attivata
SBP	Sex binding protein
SCC	Carcinoma a cellule squamose
SLT	Shigella-like toxin
SMC	Somatomedina C
SOD	Superossido dismutasi
TATI	Tumor-associated trypsin inhibitor
TCA	Tempo di cefalina attivata
TBG	Globulina legante la tiroxina
TCT	Tirocalcitonina
TG	Tireoglobulina
TQ	Tempo di Quick
TT	Tempo di trombina
TPA	Alanina amino-transferasi
TPO	Tioperossidasi
TPS	Polipeptide tissutale specifico
TRAK	Anticorpi anti-recettore del TSH
TSH	Ormone stimolante la tiroide
VIP	Peptide vasoattivo intestinale
VMA	Acido vanilmandelico

2. PREPARAZIONE DEL PAZIENTE

FATTORI CHE INFLUENZANO I RISULTATI DI LABORATORIO

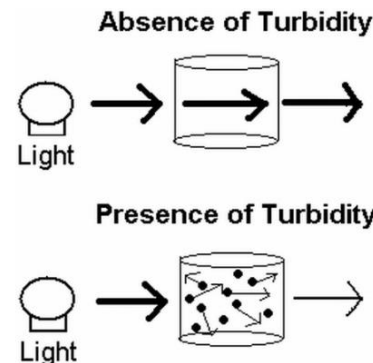
- Dieta e digiuno
- Postura, riposo fisico e altre condizioni
- Ritmi cronobiologici
- Assunzione di medicinali

Digiuno

- Normalmente basta un periodo di 6-8 h
- L'assunzione di cibo causa:
 - Aumento della glicemia post-prandiale
 - ↓ Potassiemia e fosforemia durante la metabolizzazione del glucosio
 - Lipemia elevata per diverse ore dopo il pasto (metodi colorimetrici)



Lipemia



Dieta

Esempi di analisi influenzate dalla dieta

- **Prove di tolleranza al carico glucidico:** equilibrato apporto glucidico per alcuni giorni

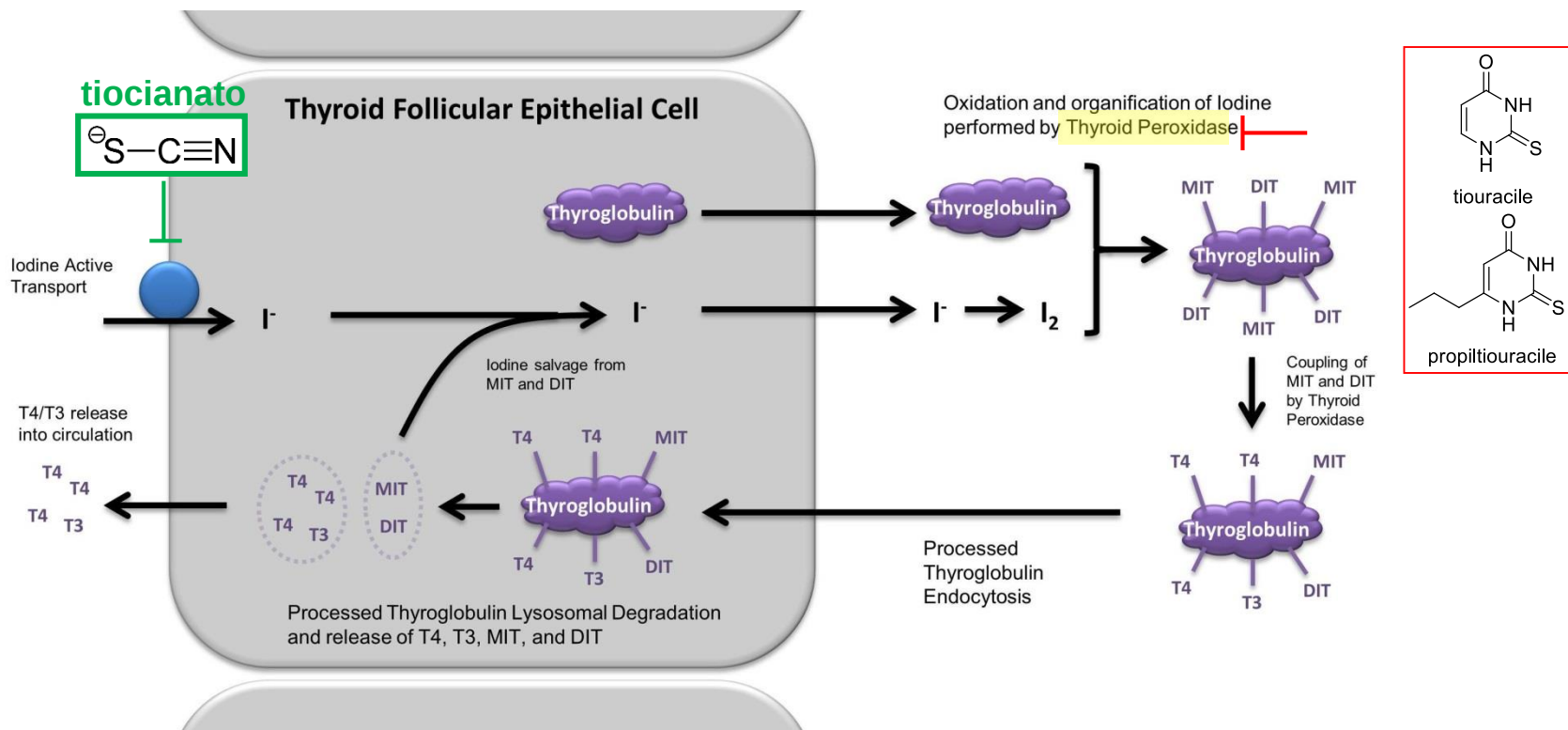
	Valori normali	Diabete	IGT
Digiuno	< 110 mg/dL	> 126 mg/dL	110-126 mg/dL
2h dopo la somm. di Glu	< 140 mg/dL	> 200 mg/dL	140-200 mg/dL

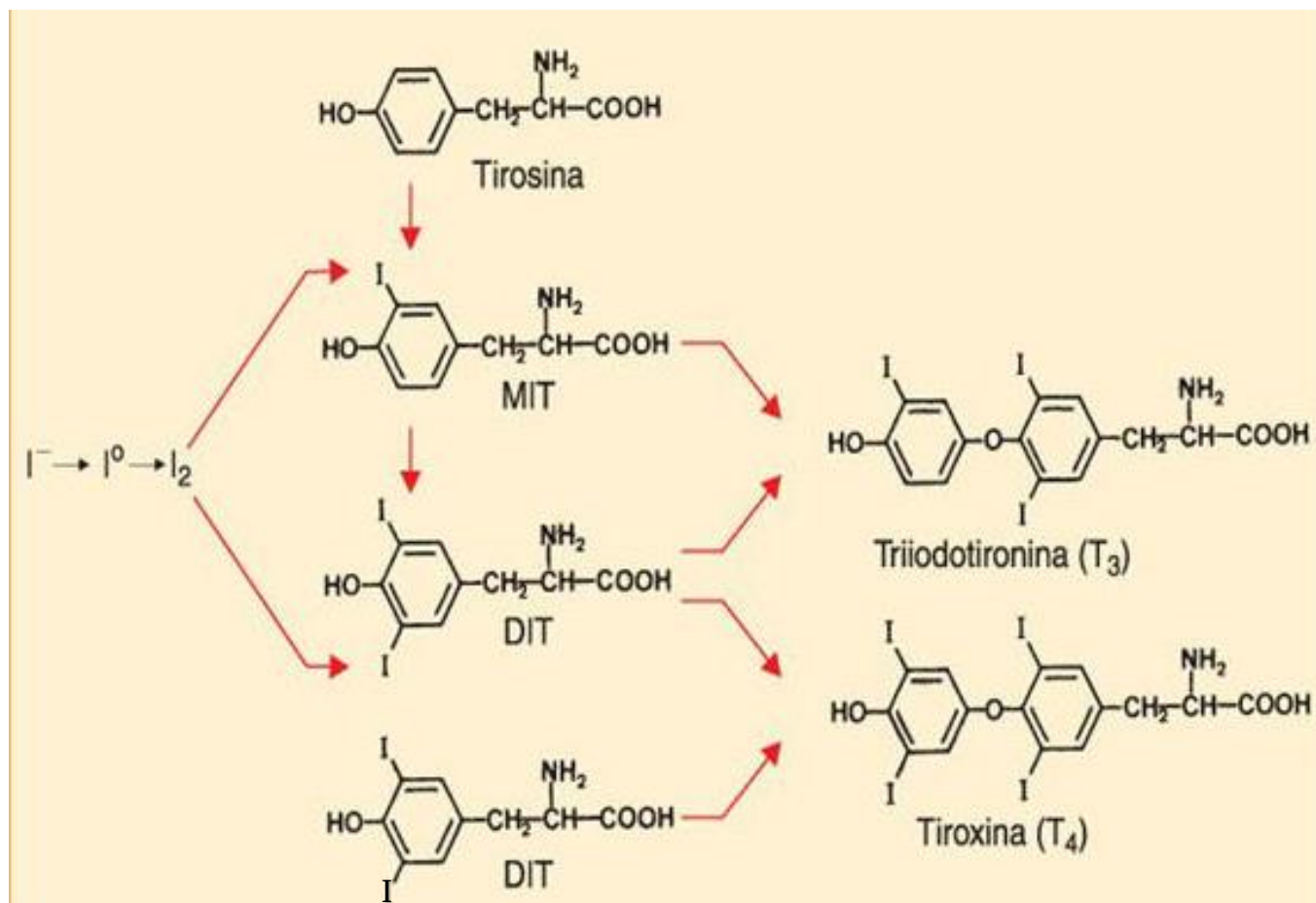
IGT: *Impaired Glucose Tolerance*, ridotta tolleranza al glucosio

Dieta

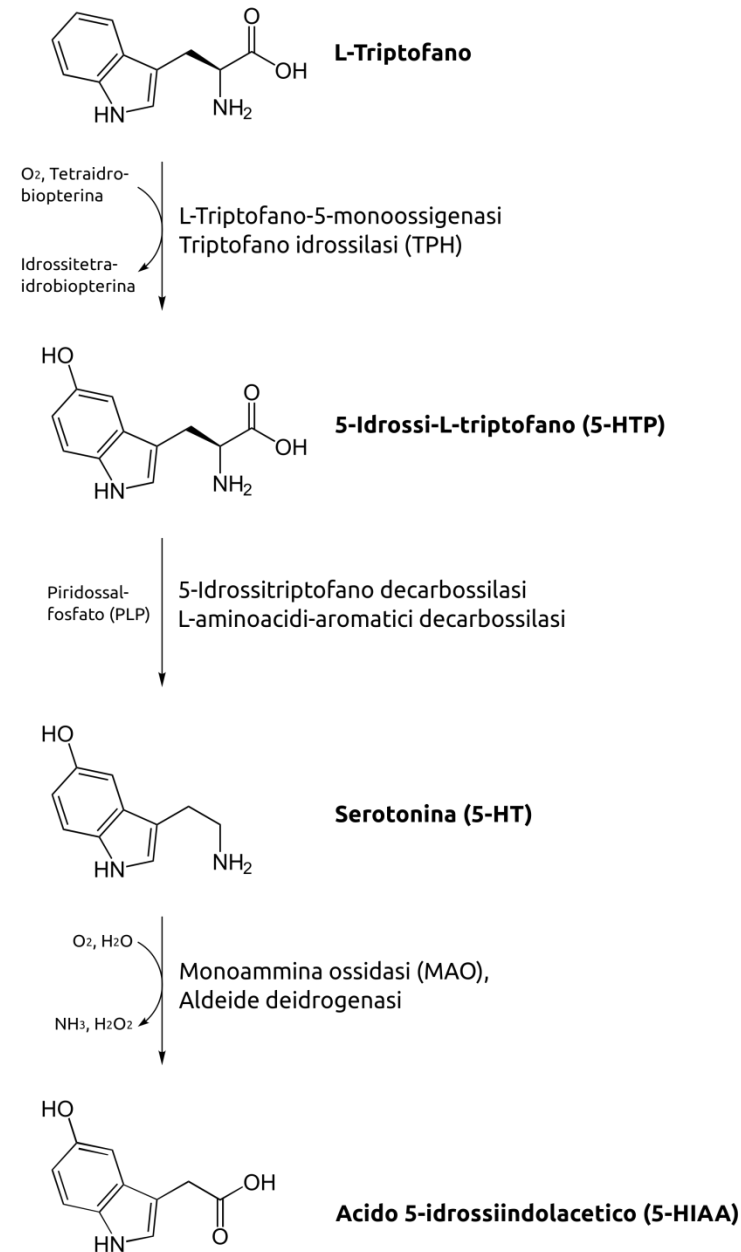
- **Livello dei trigliceridi**: influenzato sia dal digiuno che dalla dieta
- **Azotemia**: influenzata da una dieta ricca in proteine
- **Determinazione del metabolismo basale**: dieta con contenuto scarso o normale di proteine per almeno 3 giorni prima

- **Ormoni tiroidei:** alimenti con tiocianati o composti simili al tiouracile abbassano gli ormoni tiroidei



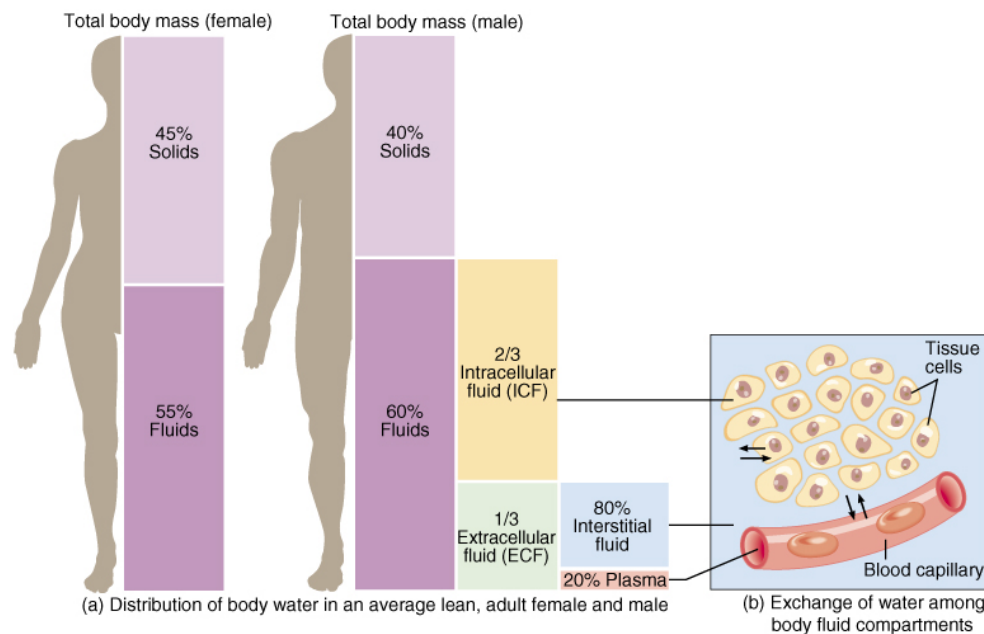


- **5-HIAA** (ac. 5-idrossiindolacetico): la sua concentrazione nelle urine è utile per diagnosticare tumori neuroendocrini. Banane, ananas e pomodori contengono serotonina/triptofano per cui aumenta il 5-HIAA escreto con le urine.



Postura, attività fisica e altre condizioni

- Postura: in posizione ortostatica il volume plasmatico diminuisce di circa il 10% ed aumenta quello del liquido interstiziale



Postura, attività fisica e altre condizioni

- Postura: in posizione ortostatica il volume plasmatico diminuisce di circa il 10% ed aumenta quello del liquido interstiziale



Increase when changing from lying down to sitting up	Parameter
Up to 10 %	♦ Haemoglobin
	Leukocytes
	♦ Total calcium
	Aspartate amino transferase
	Alkaline phosphatase
	Thyroxin
	Immunglobulin G and A
	Albumin
	♦ Total protein
	Cholesterol
	♦ Triglycerides
Between 10 and 20 %	Haematocrit
	Cholesterol
	HDL-cholesterol
	Apolipoprotein
	Erythrocytes
More than 50 %	Adrenaline
	Renin
	Noradrenaline

Postura, attività fisica e altre condizioni

- Postura
- Gravidanza
- Immobilizzazione
- Esercizio fisico
- Stress, emozione
- Aumento dei metaboliti endogeni

Ritmi cronobiologici

- Sono note le variazioni ritmiche nel tempo di alcuni costituenti biochimici
- I ritmi più diffusi sono quelli circadiani (sonno-veglia; temperatura corporea):
 - sangue: ACTH, cortisolo, VES, gonadotropine, sideremia, calcemia, serotonina.
 - urine: varia l'escrezione urinaria di catecolamine, Na^+ , K^+
- Ritmo infradiano: variazioni stagionali di colesterolo (concentrazioni maggiori d'inverno)

RITMO CIRCADIANO ACTH/cortisolo



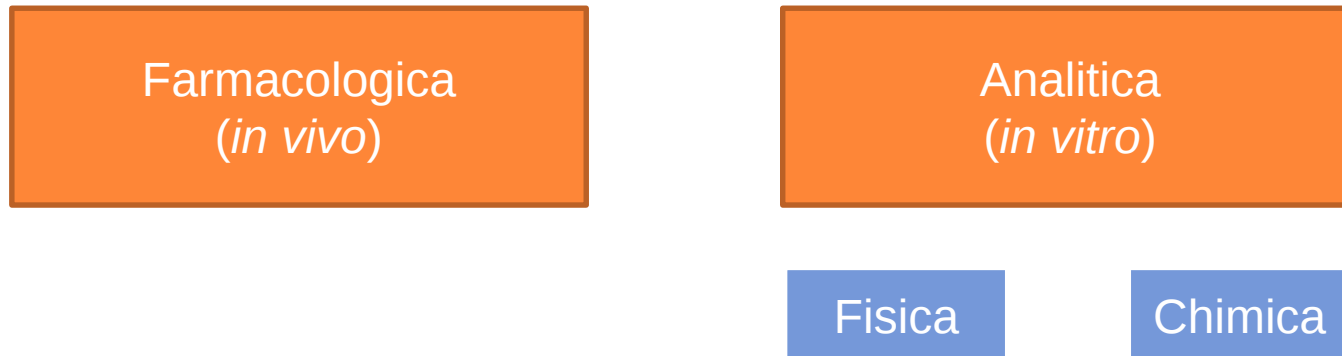
- Variazione circadiana di alcuni analiti:

ANALITA	CONCENTRAZIONE MINIMA	CONCENTRAZIONE MASSIMA
EMOGLOBINA	NOTTE (h 22-24)	MATTINO/POMERIGGIO (h 6-18)
FERRO	NOTTE (h 2-4)	POMERIGGIO (h 14-18)
FOSFORO	MATTINO (h 8-12)	NOTTE (h 2-4)
SODIO	POMERIGGIO (h 12-16)	NOTTE (h 4-6)
POTASSIO	SERA (h 23-1)	POMERIGGIO (h 14-16)
ALDOSTERONE	POMERIGGIO (h 12-14)	NOTTE (h 2-4)
RENINA	MATTINO (h 10-12)	NOTTE (h 0-6)
CORTISOLO	NOTTE (h 21-3)	MATTINO (h 5-8)
ACTH	NOTTE (h 0-4)	MATTINO (h 6-10)
ADRENALINA	NOTTE (h 2-5)	MATTINO (h 9-12)
NORADRENALINA	NOTTE (h 2-5)	MATTINO (h 9-12)
TSH	MATTINO (h 7-13)	SERA/NOTTE (h 20-2)
T4	NOTTE (h 23-3)	MATTINO (h 8-12)
TESTOSTERONE	NOTTE (h 20-24)	SERA (h 21-23)
PROLATTINA	MATTINO (h 10-12)	MATTINO (h 5-7)
GH	NOTTE/GIORNO (h 1-21)	SERA (h 21-23)

Assunzione di farmaci

Problemi nell'interpretazione soprattutto quando non si può interrompere la somministrazione.

Tipi di interferenza:



Interferenza farmacologica (*in vivo*)

- Può essere dovuta all'**azione farmacologica** stessa del farmaco o ad un'azione immunologica o tossicologica
- Se tale farmaco è usato per ottenere proprio quell'effetto l'interferenza è attesa
- Spesso sono modificazioni metaboliche che rientrano negli **effetti collaterali** e possono essere anche poco note

DIURETICI, ALCUNI STEROIDI: alterano la concentrazione degli elettroliti

CONTRACCETTIVI ORALI: aumento della concentrazione del glucosio, insulina, ormone della crescita, cortisolo, tiroxina, fattori della coagulazione, colesterolo e diminuzione dell'antitrombina III

MORFINA E METILDOPA: aumentano il tasso delle catecolamine nel sangue

VITAMINA K: aumenta la sintesi epatica di protrombina

VITAMINA D: modifica la calcemia

INDUZIONE/INIBIZIONE DI ENZIMI: es. i barbiturici aumentano il metabolismo epatico del metopirone e stimolano la sintesi della glucoroniltransferasi epatica modificando la velocità di escrezione di bilirubina e quindi del suo tasso ematico

Interferenza analitica (*in vitro*)

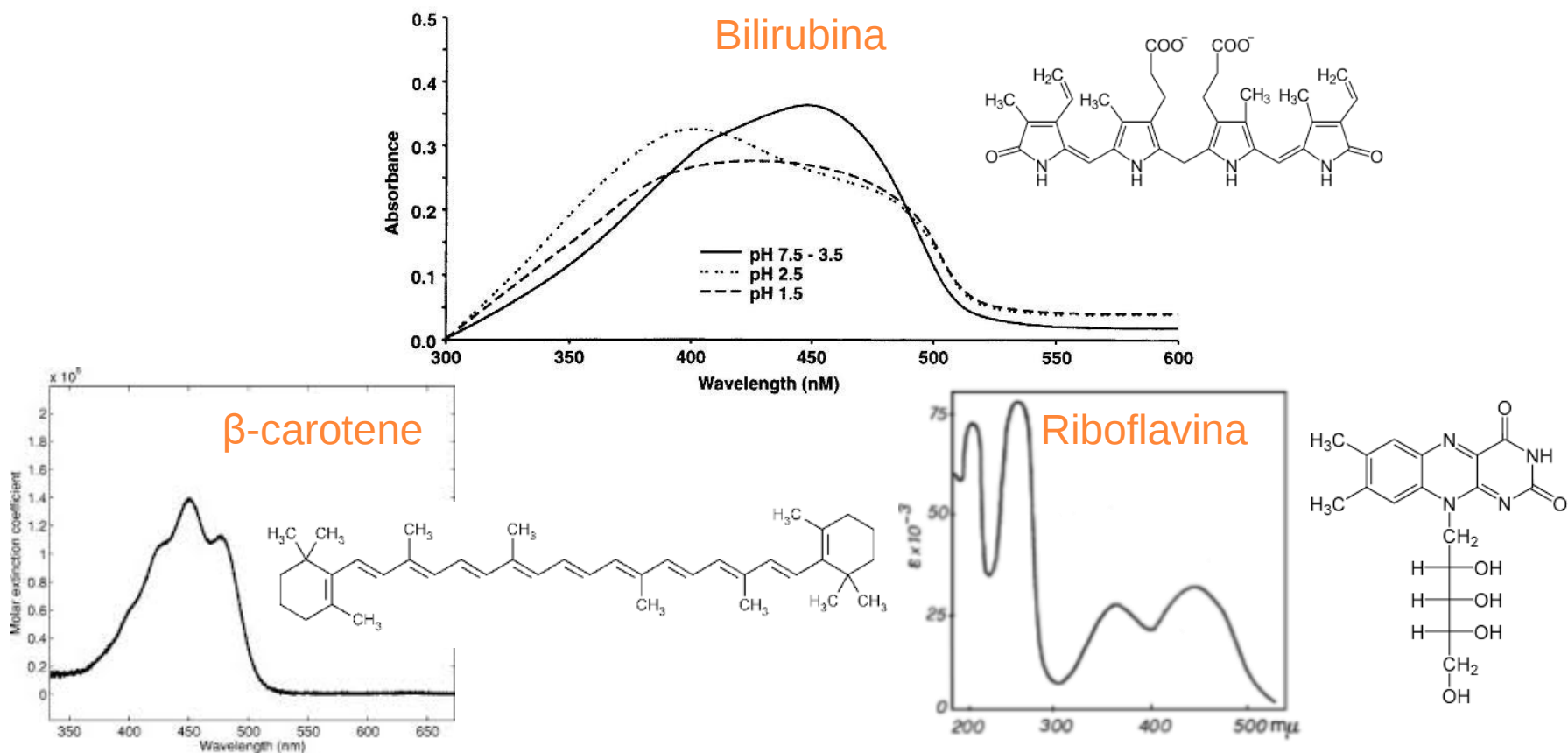
È un'interferenza con il metodo analitico, quindi *in vitro*.

È la più diffusa e può dare risultati falsamente positivi o negativi.

- Interferenze di tipo fisico:
 - Fotometriche (assorbimento, fluorescenza, torbidità)
- Interferenze di tipo chimico:
 - Alterazioni nella reazione chimica

Interferenza fisica

- Misura diretta della bilirubina: β -carotene e vitamina B2 (riboflavina) vengono assorbiti nel tratto intestinale alterandone la misura diretta



Interferenza chimica

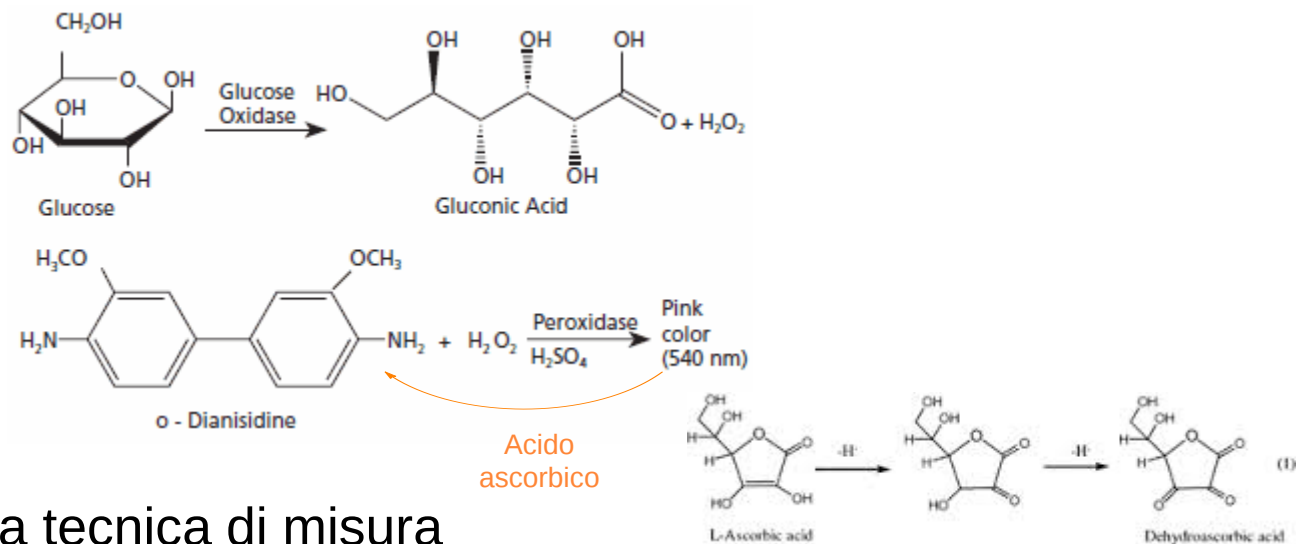
- Meccanismi:

- Interazione con l'analita

Acido acetilsalicilico nella determinazione dell'albumina con il verde di bromocresolo

- Interazione con i reagenti

Acido ascorbico sul saggio enzimatico del glucosio (urine)



- Interazione nella tecnica di misura

Spironolattone nel dosaggio fluorimetrico del cortisolo

3. RACCOLTA DEI MATERIALI BIOLOGICI

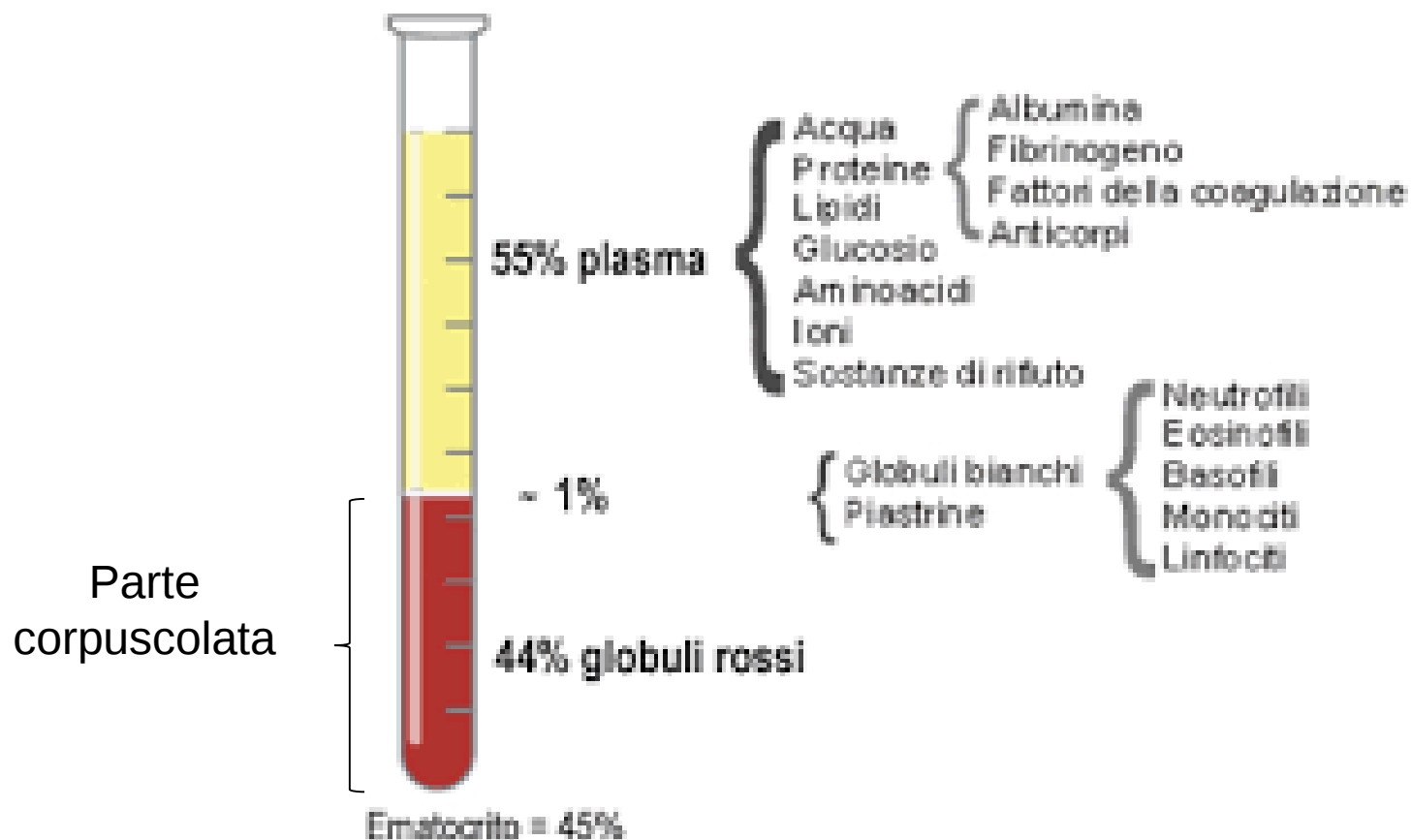
PRELIEVO DI SANGUE

VENOSO

CAPILLARE

ARTERIOSO

Sangue



PRELIEVO DI SANGUE

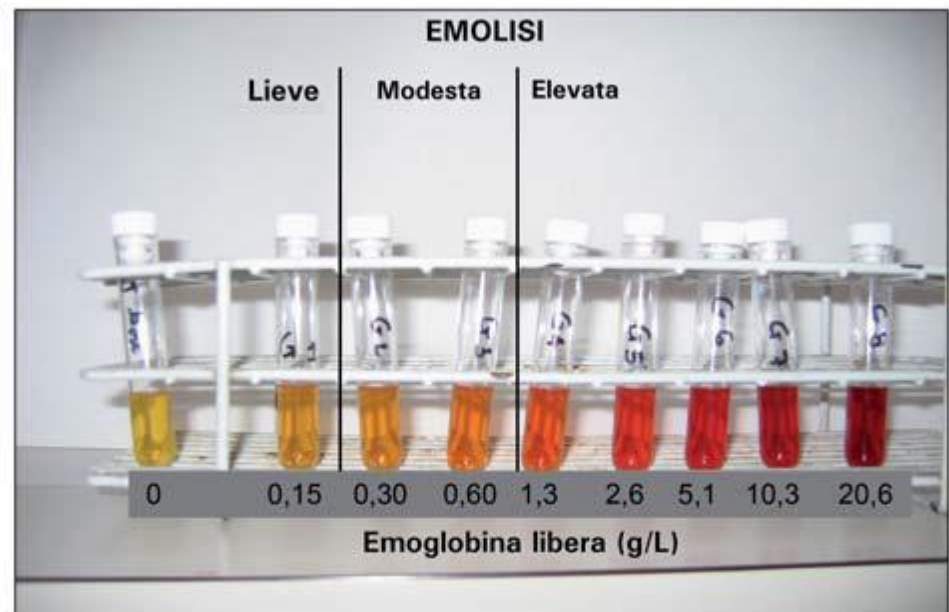
VENOSO, CAPILLARE O ARTERIOSO

EMOLISI

Danneggiamento della struttura lipoproteica della membrana degli eritrociti per cui le sostanze in essi contenute passano nel plasma o siero (Hb).

Cause di emolisi:

- Osmotica o chimica
- Meccanica
- Fisica
- Biologica



Patologie responsabili di o associate ad anemia emolitica

Patologie ereditarie

- Difetti nella sintesi emoglobinica
 - Talassemia
 - Anemia falciforme
- Difetti della membrana eritrocitaria
 - Sferocitosi e ellittocitosi ereditarie
 - Emoglobinuria parossistica notturna (PNH)
- Difetti del metabolismo eritrocitario
- Deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi e piruvato chinasi

Patologie acquisite

- Patologie immuno-mediate
 - Mycoplasma pneumoniae*
 - Anemia emolitica autoimmune
 - Patologie autoimmunitarie (ad es., lupus eritematoso sistemico, leucemia linfatica cronica)
- Ipersplenismo
- Ustioni e traumi
- Infezioni
 - Malaria
 - Clostridi
- Danneggiamento "meccanico" in circolo
 - Coagulazione intravascolare disseminata (CID)
 - Sindrome emolitico-uremica
 - Porpora trombotica trombocitopenica (TTP)
 - Valvole cardiache
 - Sindrome HELLP ("hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets")
- Trasfusione incongrua
- Farmaci, tossine e altre cause meno frequenti

Cause principali di emolisi in vitro

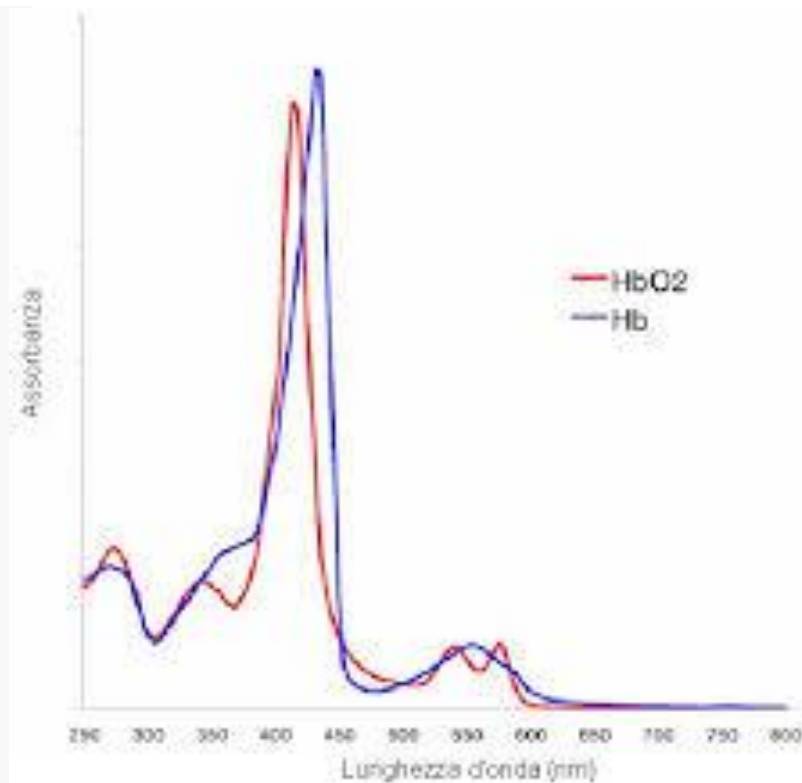
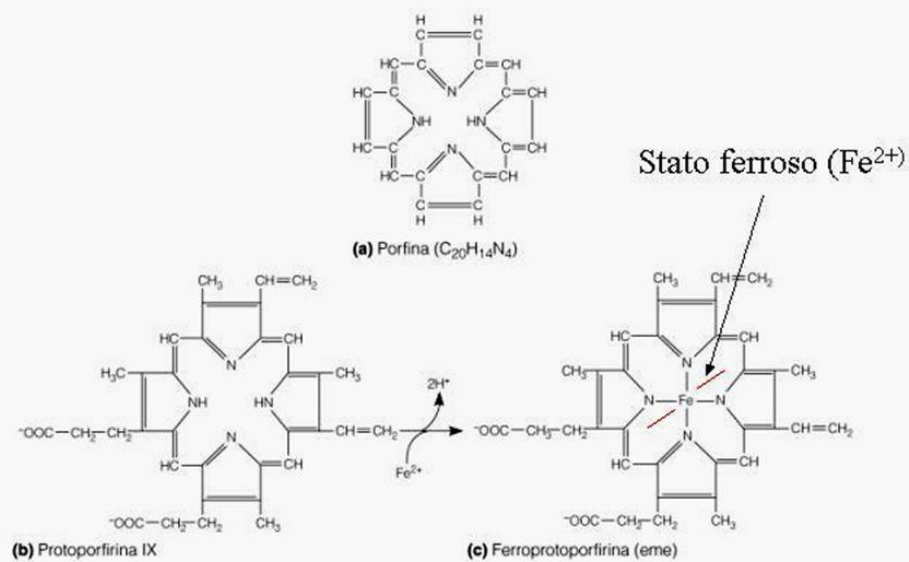
- Dipendenti dal paziente
 - Vene fragili
 - Vene di difficile localizzazione
 - Prelievo in sede di ematoma
- Dipendenti dall'operatore
 - Esperienza
 - Tentativi di prelievo non riusciti
 - Trapassamento della vena
 - Perdita della vena durante il prelievo
- Dispositivo utilizzato per il prelievo
 - Uso di cateteri venosi o aghi a farfalla
 - Utilizzo di aghi di calibro ridotto (ad es., <23 Gauge)
 - Imperfetta rimozione della soluzione antisettica dalla cute
 - Utilizzo prolungato del laccio emostatico
 - Raccolta del sangue in contenitori inadeguati
 - Inappropriato riempimento (insufficiente o eccessivo) della provetta
 - Trasferimento del sangue da siringa a provetta
- Trattamento del campione immediatamente dopo il prelievo
 - Agitazione eccessiva o inadeguata
 - Miscelazione inadeguata con l'anticoagulante
- Trasporto del campione
 - Sistema di trasporto (sistemi pneumatici, corrieri)
 - Condizioni di trasporto (traumi meccanici, durata, temperatura e umidità)
- Trattamento del campione immediatamente prima dell'analisi
 - Ritardo di centrifugazione
 - Condizioni di centrifugazione (velocità, tempo, temperatura)
 - Inefficiente separazione di plasma o siero dagli elementi corpuscolati
 - Risospensione del campione dopo centrifugazione
- Conservazione del campione
 - Ricentrifugazione
 - Condizioni di conservazione (temperatura e durata)

Interferenza analitica: effetto di una sostanza presente in un sistema analitico che causa la deviazione del valore misurato dal valore vero

Tipi di interferenza da emolisi:

- Chimica
- Spettrale
- Additiva
- Diluizione

Analita	Globulo rosso mM	Plasma mM
Glucosio mg/dL	74.0	90.0
Azoto non proteico mg/dL	40.0	8.0
Acido urico mg/dL	2.5	4.6
Colesterolo totale mg/dL	139	194
Colesterolo esteri mg/dL	0	129
Na ⁺ mmol/L	16	140
K ⁺ mmol/L	100	4.4
Cl ⁻ mmol/L	52	104
HCO ₃ ⁻ mmol/L	19	26
LDH mU/mL	58,000	360
GOT(AST) mU/mL	500	25



PRELIEVO DI SANGUE

VENOSO, CAPILLARE O ARTERIOSO

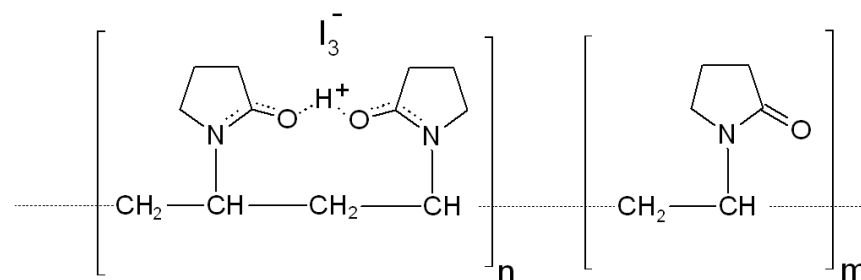
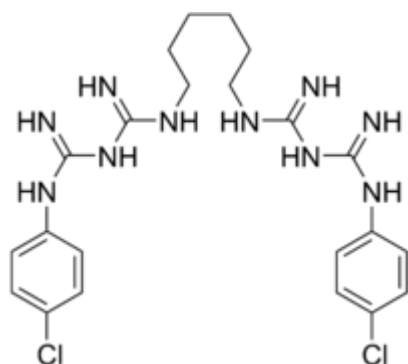
- Disinfezione. Sostanze efficaci che non diano interferenza.
- Strumenti per il prelievo. Lancette, aghi, siringhe, cannule, cateteri, provette, sistemi siringa-contenitore a circuito chiuso sotto vuoto.
 - Sterili
 - Chimicamente inerti
 - Efficienti nella penetrazione



PRELIEVO DI SANGUE

VENOSO, CAPILLARE O ARTERIOSO

- Disinfezione. Sostanze efficaci che non diano interferenza.
 - Alcool etilico (alcolemia) o isopropilico al 70%
 - Clorexidina 0,5% in soluzione alcolica (o ancor meglio 2%)
 - Iodopovidone al 10% in soluzione acquosa

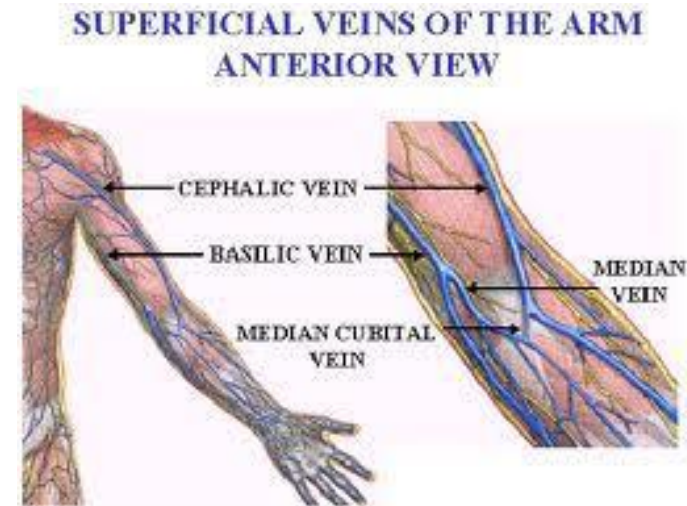


Prelievo di sangue venoso

PROCEDURA

Vena cubitale

- Laccio emostatico
- Disinfezione della cute
- Effettuare la puntura
- Inserire la provetta sotto vuoto nella camicia
- Quantità idonea
- Ordine delle provette
- Anticoagulante: mescolare
- Emostasi, cerotto
- Provette nel contenitore



Prelievo di sangue capillare

- Lobo dell'orecchio o dal polpastrello
- Neonati (<1 anno): calcagno (caldo)
- Frizionare con del cotone imbevuto di disinfettante fino a quando la parte diviene calda
- Pungere con una lancetta di acciaio
- Scartare la prima goccia e raccogliere quello che defluisce successivamente
- L'iperemizzazione consente di ottenere sangue «arterializzato», che viene impiegato anche per la l'emogasanalisi (EGA)



Prelievo sangue arterioso

- Arteria radiale (circolazione ematica alternativa grazie alla arteria ulnare), brachiale, femorale
- Si disinfetta
- La siringa si riempie velocemente
- Dopo l'estrazione dell'ago applicare un idonea pressione per almeno 5 minuti per evitare la trombizzazione del vaso
- Miscelare capovolgendo e ruotando per sciogliere l'eparina (eliminazione bolle d'aria)
- Emogasanalisi



Emogasanalizzatore

Per le misurazioni di pH, di $p\text{CO}_2$ e di $p\text{O}_2$ nel sangue arterioso (o capillare) prelevato, si utilizza un sistema di rilevazione composto da tre elettrodi specifici provvisti di membrane permeabili rispettivamente agli ioni idrogeno, all'anidride carbonica ed all'ossigeno; gli elettrodi sono posti in un vano termostato a 37°C ove viene veicolato il sangue.

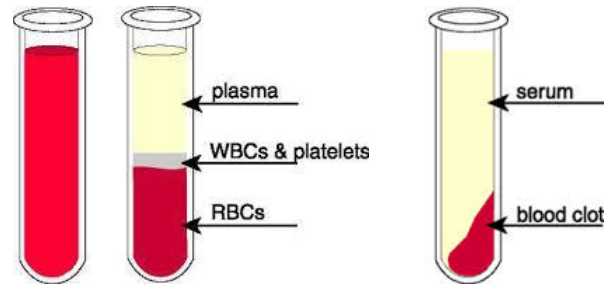


Tecnica potenziometrica: pH e $p\text{CO}_2$ (misura del potenziale generato)

Tecnica amperometrica: $p\text{O}_2$ (misura della corrente sviluppata)

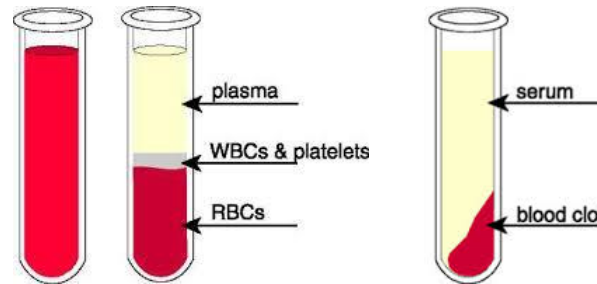
Tipologia di campione di sangue

- Sangue intero
- Plasma
- Siero



Tipologia di campione di sangue

- Sangue intero
- Plasma
- Siero



La scelta è legata alla natura dell'analisi da svolgere.

- Sangue intero: per analisi biochimiche solo quando la conc. endoeritrocitaria è analoga a quella del plasma. Utilizzato per le analisi ematologiche (sangue in quanto tessuto).
- Analisi ematochimiche: indifferente siero/plasma
- Plasma: emolisi minore ($K^+ < 10\%$ rispetto al siero), alcuni enzimi liberati dalle piastrine durante il processo coagulativo sono in maggiore quantità nel siero (fosfatasi acida, lattato deidrogenasi)

Volume del campione di sangue

- Dipende dal tipo di determinazione
- Dipende dalla disponibilità di campione (bambini → tecniche microanalitiche)
- Campioni con anticoagulante: prelievo congruente alla quantità di anticoagulante
- Emogasanalisi: provetta completamente piena, completa esclusione delle bolle d'aria

Identificazione del campione

- Applicazione delle etichette prima del prelievo
- Etichette inasportabili
- Indicazioni necessarie all'identificazione del paziente e dell'esame

Anticoagulanti

- Solubilità e mescolamento
- Anticoagulante universale non esiste.
- **Eparina**: anticoagulante naturale come sale di Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ . Attività antitrombinica. Interferisce poco nelle determinazioni biochimiche e può essere utilizzato anche per indagini ematologiche non morfologiche. Costo elevato, azione breve, colorazione bluastra negli strisci di sangue trattati con colorazioni panottiche.
- **Ossalato** (di Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+): complessi con ioni calcio. $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1-2 mg/mL, conc. superiori danno emolisi; $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.1M viene utilizzato per ricerche emocoagulative in rapporto 1:10.
- **Citrato** (di Na^+): complessa gli ioni calcio. Anticoagulante di scelta per gli studi di coagulazione e VES. Soluzione 0.106 M in rapporto 1:10 col sangue.
- **EDTA** (acido etilendiamminotetracetico, sale bi-, tri-potassico o bisodico): è un chelante del calcio. Ottimo, adatto anche per esami ematologici in quanto mantiene inalterate le componenti cellulari. I sali di potassio sono più solubili.

Glicostatici

- **Fluoruro** (di Na^+ o K^+ più solubile): compete con il calcio plasmatico, anticoagulante debole, efficace a 6-10 mg/mL ma produce emolisi e scambi osmotici. Solitamente accoppiato all'EDTA a 2mg/mL come glicostatico (inibisce enzimi della glicolisi).
- **Iodoacetato** (sale sodico): 2mg/mL, conservante per inibire gli enzimi della glicolisi eritrocitaria.

Anticoagulante	Conc.	Test indicati	Test in cui Interferisce
Litio eparina	~0.20 mg/mL	Sodio e potassio, bicarbonati, cloruri	Ammoniaca, calcio, colesterolo, CK, fosfato in., G6-PDH, α -GT, α -HBDH, insulina, NEFA
Sodio eparina	~0.20 mg/mL	Es. emocromocitometrico (in alternativa all'EDTA), resistenza globulare, emoglobine patologiche, enzimi plasmatici (esclusi i controindicati)	Sodio e gli stessi della litio eparina
EDTA, sale bisodico o bipotassico	~1 mg/mL	Es. emocromocitometrico , emoglobine patologiche, fibrinogeno	Calcio, colesterolo, CO ₂ , CK, ferro, LAP, potassio, proteine tot., tempo di protrombina, sodio, VES
Fluoruro (antiglicolitico)	~2 mg/mL	glucosio	Ammoniaca, amilasi, calcio, cloruri, colesterolo, CO ₂ , fosfatasi acida-alcalina, potassio, sodio, urea (enzim.), VES
Citrato di sodio tribasico	Emoc: 0.38% VES: 0.76%	Tempo di protrombina (PT), PTT, TT, fibrinogeno, tromboelastogramma	Calcio, colesterolo, fosfatasi acida-alcalina, fosfato in., magnesio, NEFA, sodio, trigliceridi
Ossalato di potassio	~1-2 mg/mL	Alcuni test di emocoagulazione , fibrinogeno (in alternativa al citrato)	Ammoniaca, calcio, colesterolo, CO ₂ , fosfatasi acida-alcalina, fosfato in., α -HBDH, insulina, LDH, PTT, sodio-potassio, urea, VES

PICC

Peripherally Inserted Central Catheter:

- Antibiotici, chemioterapici, alimentazione parenterale
- Prelievi solo:
 - situazioni di emergenza (accesso rapido ad una vena di grosso calibro)
 - paziente con scarso patrimonio venoso

Raccolta delle urine

- Semplice e di scarso disturbo per il paziente (*compliance*)
- Il contenitore deve essere pulito o sterile (urinocoltura)
- **Esame estemporaneo completo delle urine:**
 - Prima minzione mattutina, mitto intermedio
 - Detergere accuratamente i genitali esterni
 - Invio rapido al laboratorio per evitare modificazioni morfologiche dei componenti del sedimento, crescita di germi e alcalinizzazione
 - Urocoltura: raccogliere direttamente nel recipiente sterile
 - Evitare il cateterismo
- Per taluni componenti biochimici: **urine delle 24h**. Vanno scartate le urine della prima minzione, si segna l'ora e poi si raccolgono per 24 h nello stesso recipiente. Conservare in luogo fresco e al buio. Aggiunta di conservanti (salvo per dosaggi biologici)

Raccolta delle urine

Urine delle 24 h:

- Acido Urico, Acido Citrico, , Beta 2 Microglobulina, Calcio, Cloro, Creatinina e Creatinina Clearance, Fosforo, Magnesio, Microalbuminuria, Osmolarità, Potassio, Proteina di Bence Jones, Proteine Totali, Sodio, Urea.
- Raccolta urine delle 24 ore con conservanti:
 - Raccolta con HCl: Cortisolo, Serotonina, Acido 5-idrossiindoloacetico, Acido omovanillico, Acido vanilmandelico, Adrenalina-Noradrenalina, Dopamina, Metanefrine e Normetanefrine, Ossalati.
 - Raccolta con Carbonato di Sodio: Porfirine (tenere il contenitore al riparo della luce).

Raccolta della saliva

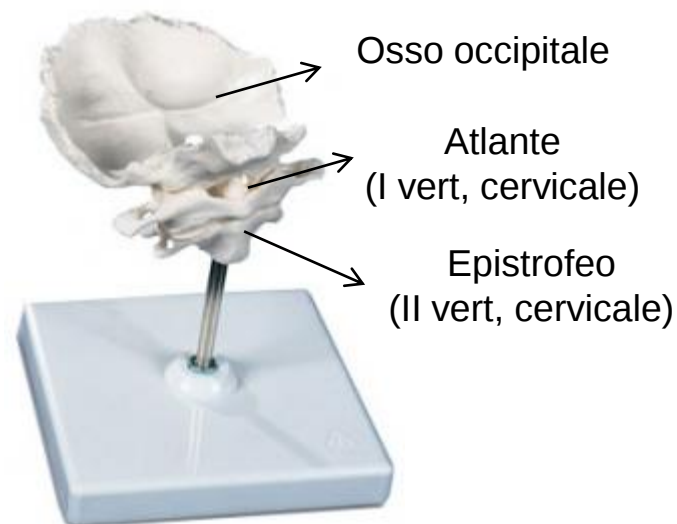
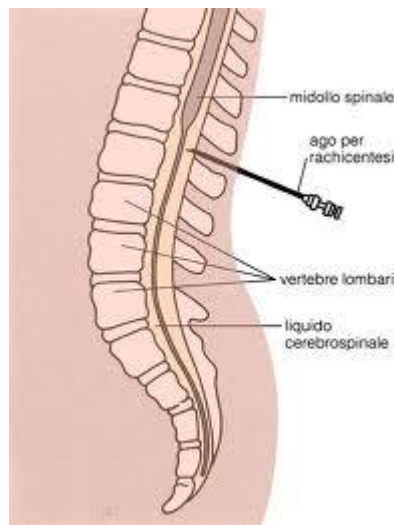
- Miscela di secrezioni delle ghiandole parotide, sottomascellare, sublinguale e salivare minore
- Ultrafiltrato plasmatico: 99.4% acqua, proteine (mucina, lisozima, immunoglobuline, albumina), batteri, leucociti, cellule epiteliali.
- pH 6.2-7.4
- La maggior parte delle droghe d'abuso e farmaci diffondono nel fluido orale per trasferimento passivo dal torrente circolatorio (concentrazione salivare correla con quella ematica)
- Analisi delle droghe e farmaci entro 1-24 h dall'assunzione
- THC (poco idrosolubile) non diffonde dal sangue alla saliva
- Campione: 10 mL di fluido in circa 30 minuti (attendere 10 minuti dall'ingestione di cibo/farmaci)

Raccolta delle feci

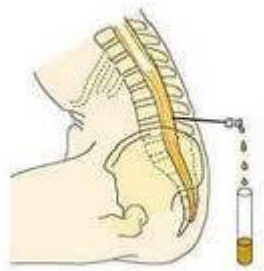
- Sono determinanti la preparazione, la collaborazione del paziente e l'invio dei campioni al laboratorio
- Contenitore: qualsiasi basta che sia pulito
- A seconda del metodo analitico: dieta specifica nei giorni precedenti per evitare falsi positivi
- Provette con spatolina e terreno di trasporto per gli esami colturali (conservazione in frigo)
- Per le parassitosi da protozoi patogeni (ameba, giardia), spesso basta un'analisi macroscopica per individuare proglottidi di platelminti, nematelminti a cui segue l'esame microscopico

Prelievo liquor cefalorachidiano (LCR) (rachicentesi)

- Il liquor riempie tutti gli spazi liberi dell'encefalo e del midollo spinale all'interno della dura madre: 70% ultrafiltrato del plasma e trasporto attivo (BEE); 30% liquido interstiziale del cervello e midollo spinale
- Adulto: max 160 mL
- Neonato: 40-60 mL
- Prelievo: spazio intervertebrale compreso tra la 4°-5° vertebra lombare (raro fra l'atlante e l'osso occipitale)



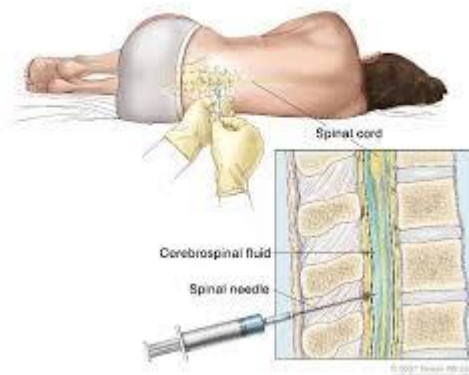
• Posizione



Posizione seduta
Busto flesso in avanti

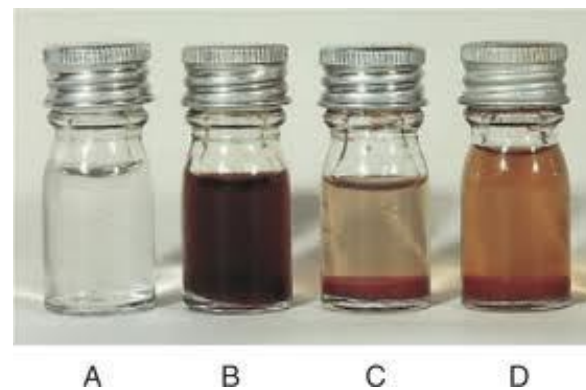


Maggior pressione liquorale



Decubito laterale,
arti inferiori flessi sull'addome

- Il liquor è incolore: aspetto «acqua di roccia». Se colorato potrebbe essere contaminato da sangue (trauma o emorragia subaracnoidea). Se torbido può essere dovuto alla presenza di leucociti, eritrociti, microrganismi, coaguli di fibrina.
- Campione diviso in più provette
- Invio in laboratorio entro 1 ora, T amb
- Esame chimico e citologico: 3-4 mL
- Max prelevabile 15-20 mL



È il liquido biologico principalmente utilizzato per la diagnosi di:

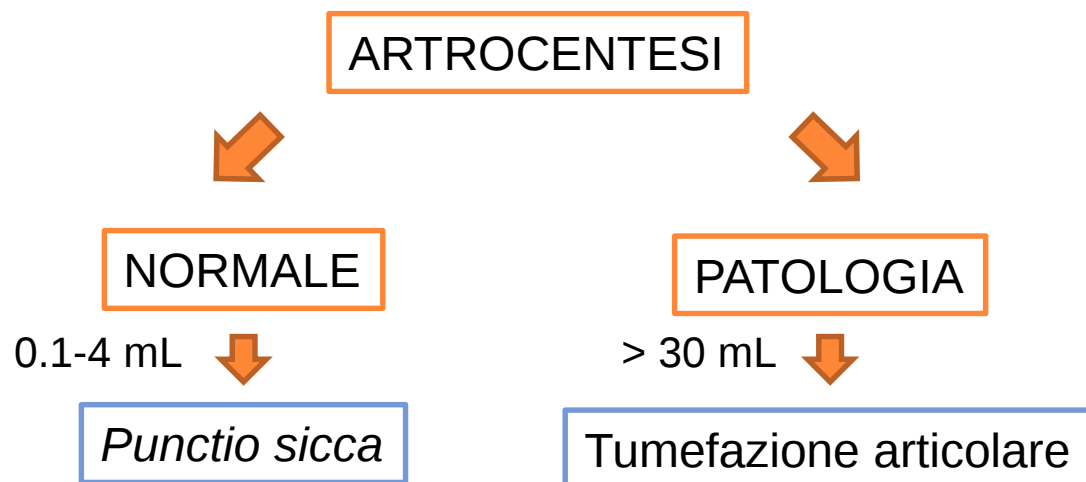
- Meningite (batterica, virale o micobatterica: neurosifilide, neuroborelliosi e neurotubercolosi)
- Sclerosi multipla (profilo oligoclonale delle IgG) ed altre patologie autoimmuni
- Emorragia subaracnoidea
- Tumori

Altri esami che si possono eseguire sono:

- La misura della pressione del liquor
- Esame microscopico per identificare le cellule presenti (aumento dei leucociti → infiammazione, trauma, tumori)
- Valutazione delle proteine presenti: la concentrazione di albumina e IgG rispetto alla concentrazione plasmatica dà informazioni sulla permeabilità della BEE. Mentre il profilo elettroforetico può evidenziare particolari patologie (Sclerosi multipla, tumori cerebrali, meningiti).

Prelievo liquido sinoviale (artrocentesi)

- Liquido sinoviale: riempie la cavità articolare. È un ultrafiltrato plasmatico chiaro, viscoso per l'alta concentrazione di acido ialuronico.
- Ha due funzioni:
 - Lubrifica l'articolazione
 - Porta nutrimento alla cartilagine che non è vascolarizzata

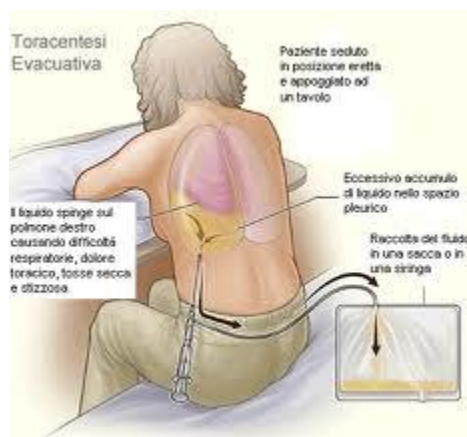


- Modalità di prelievo: Aspirazione con siringa
- Scopo diagnostico: studio delle caratteristiche fisiche, chimiche, citologiche, immunologiche e microbiologiche . Contenitori con l'anticoagulante opportuno.
- Scopo terapeutico
- Gotta: per evidenziare cristalli di acido urico. In questo caso non ci devono essere additivi nella provetta perchè renderebbero impossibile la ricerca dei cristalli.

Prelievo dei liquidi di versamento delle cavità sierose (pleurica, pericardica e peritoneale)

- Fisiologicamente le cavità sierose contengono quantità minime di fluido (tipo siero) che funge da lubrificante.
- In condizioni patologiche degli organi endocavitari o delle sierose stesse, la quantità di fluido intracavitario aumenta (versamento) e le caratteristiche chimico-fisiche e citologiche cambiano
- Prelievo: funzione terapeutica e/o diagnostica. Per le analisi complete occorrono 50 mL (provette diverse con anticoagulante)

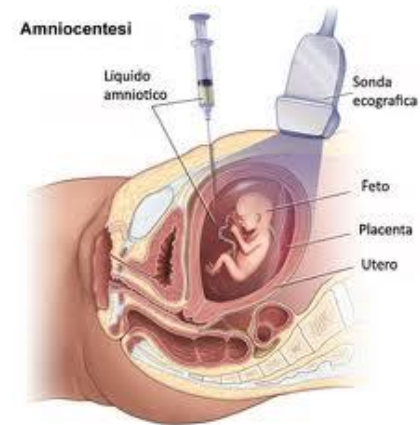
-Toracentesi
-Pericardiocentesi
-Paracentesi



Prelievo del liquido amniotico (amniocentesi)

Lo studio del liquido amniotico permette di:

- Valutare la funzionalità e la maturità degli organi e apparati fetali
- Rivelare malformazioni fetali
- Accertare malattie genetiche o cromosomiche



Prelievo: puntura transaddominale del sacco amniotico e aspirazione in siringa (dopo 12° sett. o prima sotto controllo ecografico). Non si impiegano anticoagulanti.

Aspetto: lievemente opalescente, colore citrino

Contenitori: dosaggio bilirubina → contenitori scuri
studi sulle cellule → contenitori sterili e
materiale plastico per evitare che le cellule aderiscano
alle pareti di vetro e non siano recuperabili



Prelievo del succo gastrico

- Effettuato per valutare ipercloridria (ulcere, sindrome di Zollinger-Ellison o gastrinoma), ipocloridria o dopo una vagotomia
- L'analisi del succo gastrico permette di verificare la capacità funzionale dello stomaco sia in condizioni basali che dopo adeguati stimoli e di ricercare eventuali componenti patologici come il sangue e l'acido lattico.
- Raramente vengono eseguite ricerche di tipo batteriologico e citologico, queste ultime hanno particolare importanza per la diagnosi del carcinoma dello stomaco.
- L'aspetto ed il colore non a digiuno non hanno alcuna importanza essendo condizionati dalla presenza di residui alimentari.
- A digiuno: incolore o citrigno, torbido, filante, pH→1.2-2.5

Prelievo del succo gastrico

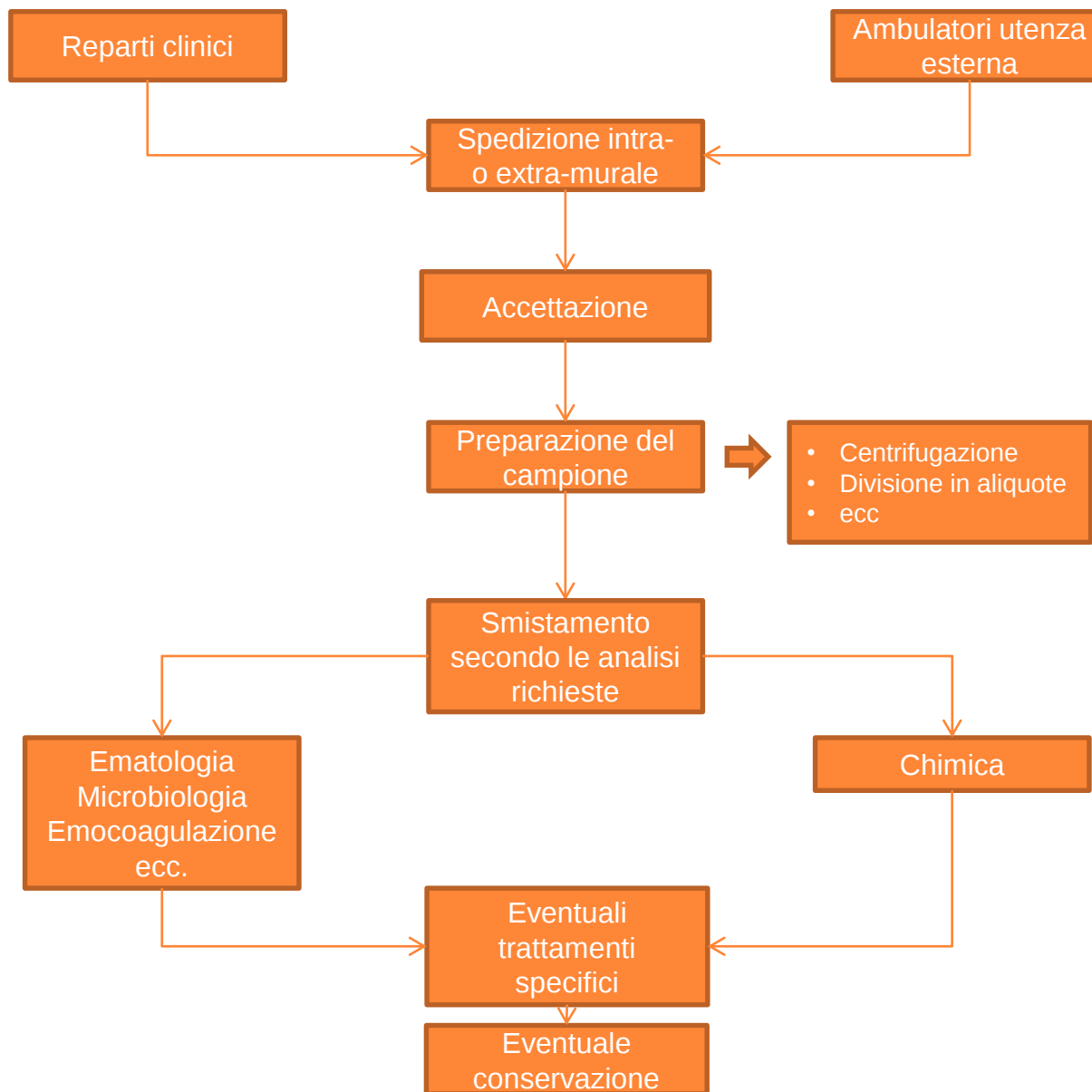
Procedura

- 24h prima del prelievo sospensione di qualsiasi farmaco
- 12h digiuno
- Si introduce il sondino nasogastrico nella narice fino a che raggiunge l'antro gastrico
- Mediante siringa si aspira il succo gastrico: se esce fluido biliare si è nel duodeno → si ritira la sonda fino allo stomaco
- Per valutare la secrezione gastrica basale: per 4 volte ogni 15 minuti e si misura volume e acidità titolabile di ciascuno
- Poi, eseguita la stimolazione col farmaco desiderato (es. pentagastrina) si ripete di nuovo (per 4 volte ogni 15 minuti)

Raccolta della matrice cheratinica

- Capelli: crescita di 0.8-1.4 cm/mese, memoria degli xenobiotici presenti nell'organismo al momento della crescita del pelo
- Si può risalire alla frequenza delle assunzioni e al periodo di assunzione (mesi, anni), anche se non precisamente
- Le sostanze si legano alla matrice cheratinica attraverso il flusso ematico ma anche per esposizione esterna
- Capelli scuri fissano le sostanze più dei capelli chiari
- Capelli decolorati, tinti o con permanente: struttura cheratinica alterata, danneggiata
- Capelli corti: peli pubici e ascellari

4. TRASPORTO DEL MATERIALE BIOLOGICO



Trasporto intramurale

- In un ospedale di solito il trasferimento avviene ad opera di infermieri o di personale incaricato
- Provette e contenitori in appositi alloggiamenti divisi per paziente o per settore analitico finale (tipo cassette con vari alloggiamenti)
- Le cassette devono essere comunque lavabili, sterilizzabili, robuste, maneggevoli e tali da garantire eventualmente la protezione da alte T

Trasporto extramurale

- Problema ulteriore sulla tipologia e natura dei contenitori, materiali e imballaggi coibentati, modalità di spedizione, ecc.
- Contenitori di idonee dimensioni, infrangibili, tappi a tenuta sicura (propilene, polietilene con tappi a vite o a baionetta)
- Evitare le vibrazioni durante il trasporto
- Idonea temperatura di conservazione
- Misure precauzionali: materiale radioattivo, materiale infetto

5. ACCETTAZIONE DEI MATERIALI E VERIFICA DELLA LORO IDONEITÀ

Accettazione dei materiali e verifica di idoneità

Verifica dell'adozione di tutte le misure previste nella fase preanalitica

Criteri di non accettabilità:

- Identificazione assente o incompleta
- Mancanza di informazioni necessarie per eseguire il test
- Contenitore inidoneo o non integro
- Prelievo non corretto
- Quantità non sufficiente
- Rapporto sangue/anticoagulante scorretto
- Mancata aggiunta del conservante
- Presenza di coaguli, emolisi
- Conservazione a temperatura non corretta
- Esposizione alla luce solare diretta
- Congelamenti/scongelamenti ripetuti

6. EVENTUALI PRETRATTAMENTI SIERATURA E/O CENTRIFUGAZIONE

Sieratura e centrifugazione

Campione di
SANGUE

↓ coagulazione

- Tempo di coagulazione +

5' Tamb
Trombina

15' Tamb
Attivatori
coagulazione

30' Tamb
Contenitore
vetro

Tamb
Contenitore
plastica

Frigorifero

- Resa in siero +

↓ centrifugazione (entro 1 h)
15' 2000 rpm

↓ separazione

Campione di
SIERO



Plasma

Campione di
SANGUE



centrifugazione
10' 3000 rpm



separazione

Campione di
PLASMA

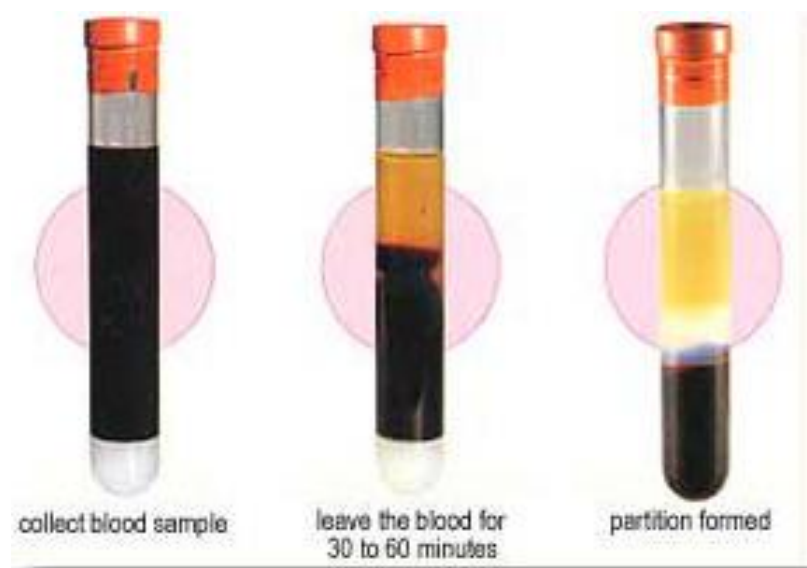


Sono presenti
anche i fattori di
coagulazione



Centrifugazione e separazione

- Contenitori tappati durante la centrifugazione. In ogni fase se il campione serve per analisi di sostanze volatili, ossidabili o microbiologiche
- Separazione: pipette monouso in plastica; evitare di smuovere il sedimento
- La separazione del siero può essere facilitata impiegando provette contenenti materiale con densità intermedia
- Contenitori e materiali inerti
- Condizioni standardizzate (T, luce, ecc.)
- Campioni iperlipemici: impediscono la corretta valutazione di molti parametri (K, Ca, dosaggi RIA) → ultracentrifugazione/agenti chiarificanti

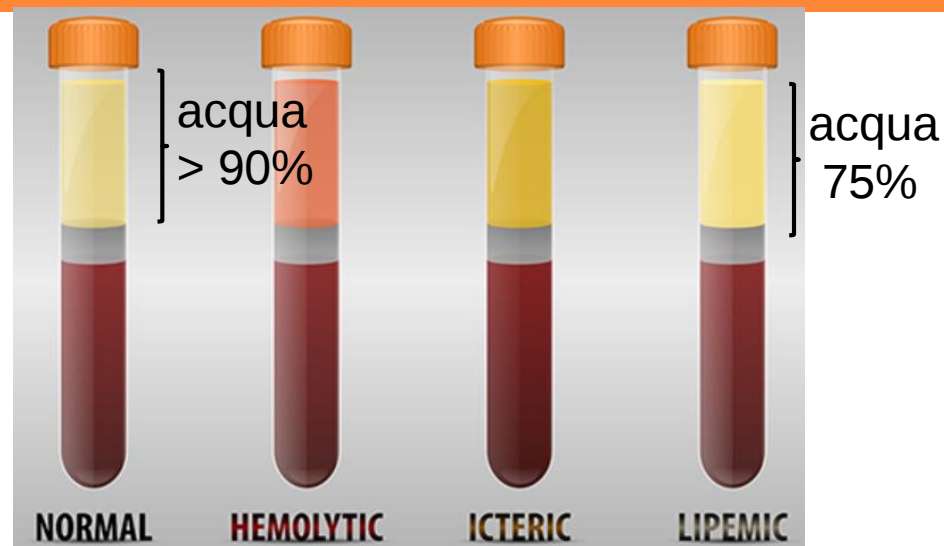


Siero iperlipemico



chiarificante





Diluizione con 1 mL

Plasma normale 1 mL



Analita solo in acqua subisce una diluizione
0.9 mL acqua iniziali → 1.9 mL acqua finali

$$NaVa = NbVb$$

$$1 \cdot 0.9 = x \cdot 1.9 \quad x = 0.9/1.9 = \mathbf{0.47}$$

Diluizione con 1 mL

Plasma normale 1 mL



Analita solo in acqua subisce una diluizione
0.75 mL acqua iniziali → 1.75 mL acqua finali

$$NaVa = NbVb$$

$$1 \cdot 0.75 = x \cdot 1.75 \quad x = 0.75/1.75 = \mathbf{0.43}$$

Problema solo per analiti che si distribuiscono solo nella fase acquosa e che usano diluizioni per la loro determinazione

7. SMISTAMENTO AI SETTORI ANALITICI

Smistamento dei campioni

Modalità varie

Far pervenire il campione alla stazione corrispondente:

- Il più rapidamente possibile
- In quantità sufficiente
- In modo ordinato (portaprovette o in conformità con le singole esigenze strumentali)
- Materiali distribuiti nel contenitore originale o in provette figlie con etichette separate (preparate precedentemente)
- Priorità per i campioni dove l'esecuzione dell'analisi deve essere immediata
- In tale fase può essere inclusa la conservazione di aliquote di campioni

9. CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Fra il momento della raccolta del materiale biologico e l'esecuzione dell'analisi non devono esserci variazioni nella composizione/proprietà del campione



Idealmente un campione dovrebbe essere analizzato immediatamente dopo il suo prelievo



In realtà un laboratorio è equipaggiato per eseguire immediatamente solo esami urgenti

Negli altri casi ci sono tempi di attesa più o meno lunghi



NECESSITÀ DELLA CONSERVAZIONE

Motivi che richiedono la conservazione del campione

- Carico e organizzazione del lavoro analitico
- Disfunzioni strumentali occasionali
- Ripetizioni di analisi che hanno dato risultati imprecisi o inaccurati per motivi tecnici
- Ripetizione di test con risultati contrastanti dal punto di vista fisiopatologico
- Esecuzione di analisi non richieste dal clinico a conferma di altri test o a completamento di un'ipotesi diagnostica
- Esecuzione contemporanea e in un'unica seduta analitica di test su campioni prelevati a tempi diversi per studi longitudinali (ridurre l'imprecisione analitica)

Cause di alterazione del campione

- Alterazioni di tipo fisico (tempi lunghi)
- Alterazioni di tipo chimico-fisico (tempi medio-rapidi),
- Alterazioni di tipo biochimico (tempi rapidi)
- Alterazioni di tipo biometabolico (tempi rapidi)

Chiaramente le varie alterazioni si sovrappongono, interagiscono.

Alterazioni di tipo fisico

Riguardano cambiamenti tra fasi diverse e coinvolgono fenomeni di:

- Evaporazione
- Solubilità
- Adsorbimento
- Desorbimento
- Diffusione

Evaporazione

- Alterazioni di concentrazione proporzionali per tutti gli analiti → alterazione dell'accuratezza
- Fattori:
 - T_{amb}
 - Flusso d'aria
 - Geometria del contenitore e % di riempimento
 - Modalità operativa dello strumento (coperchi, tappi perforabili)
- Casi particolari delle sostanze volatili: si perde analita

Solubilità

- Sangue: proteine stabilizzatrici
- Urine: il semplice passaggio alla Tamb o al frigorifero (24h), o il pH diverso del contenitore, possono ridurre la solubilità dei componenti provocandone la ppt (calcio fosfato, calcio ossalato, acido urico, metaboliti di farmaci).

Risolubilizzazione:

- pH 1-2 per l'ossalato di calcio
- pH<5 fosfati di calcio
- pH>7 acido urico

Adsorbimento e/o Desorbimento

Adsorbimento dell'analita alle pareti del contenitore e/o cessione di materiale inquinante da parte di contenitori, tappi, strumenti usati nel prelievo.

Sono maggiormente coinvolti:

- Oligominerali
- Cationi



Metalli in tracce

Dipende da:

- Natura dell'analita
- Temperatura
- pH
- Tempo di contatto
- Natura del contenitore



Vetro
borosilicato

Vetro di
sodio

Quarzo
artificiale

Polietilene

Polipropilene

Teflon

Metalli in tracce

Nella loro determinazione è importante evitare :

- Polvere, sporcizia, disinfettanti, cosmetici sui tessuti da cui si preleva
- Evitare che l'oligoelemento sia presente nel materiale usato per il prelievo, nel contenitore (desorbimento)
- Presenza dell'oligoelemento nei reagenti
- Adsorbimento da parte del contenitore

Diffusione

Si può manifestare nei seguenti casi:

- Siero o plasma conservati col coagulo/eritrociti
- Congelamento: crea un forte gradiente → mescolamento

Alterazioni di tipo chimico-fisico

Provocano cambiamenti nella composizione o struttura dei costituenti biochimici:

- Effetto fotochimico
- Denaturazione, aggregazione

Effetto fotochimico

Le radiazioni UV della luce solare interagiscono con particolari strutture chimiche alterandone la struttura stessa



Struttura non più evidenziabile con lo stesso metodo analitico

Tali trasformazioni sono influenzate da:

- pH
- Presenza di sostanze riducenti o ossidanti nel mezzo
- Tempo di esposizione alle radiazioni
- Intensità delle radiazioni (dirette, diffuse)

Elenco di alcuni analiti soggetti a fotolisi:

Biliribuna

Urobilinogeno

Uroporfirina

Coproporfirina

Aciso Vanilmandelico

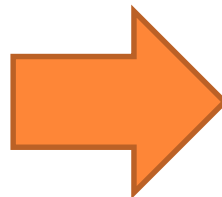
β -carotene

Riboflavina (B₂)

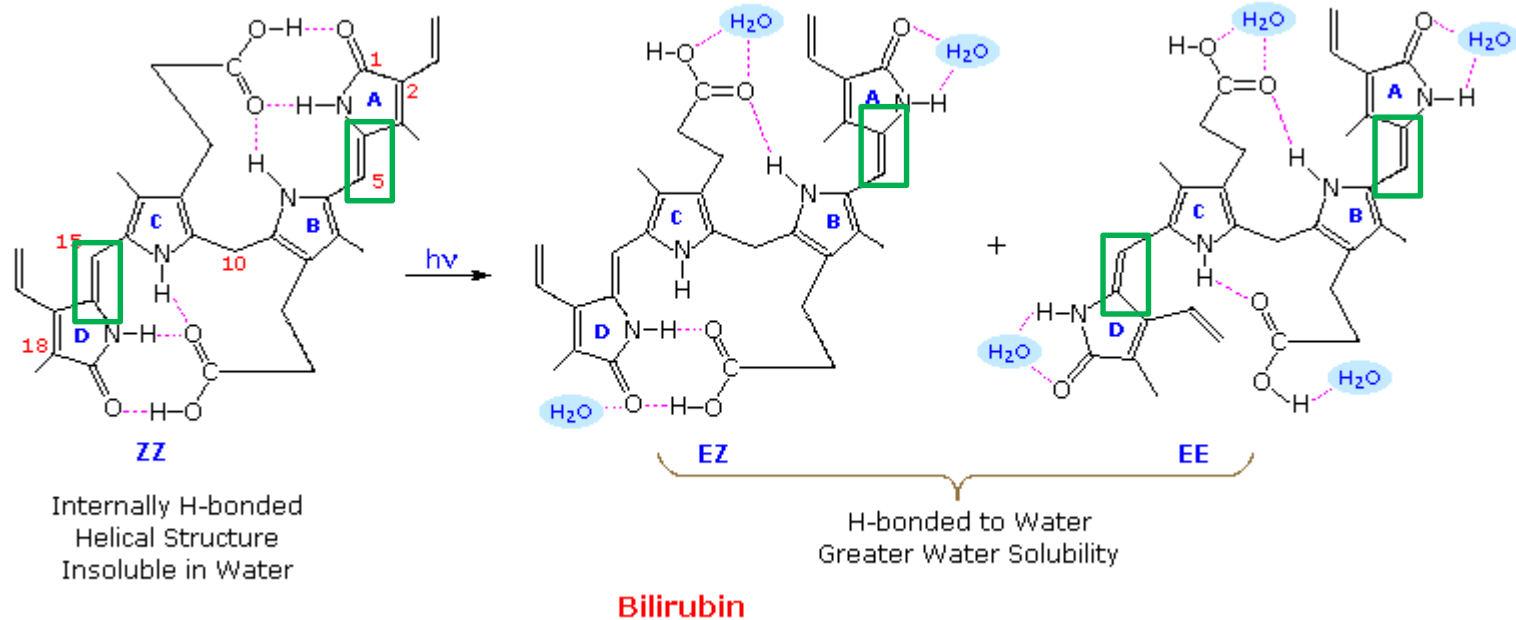
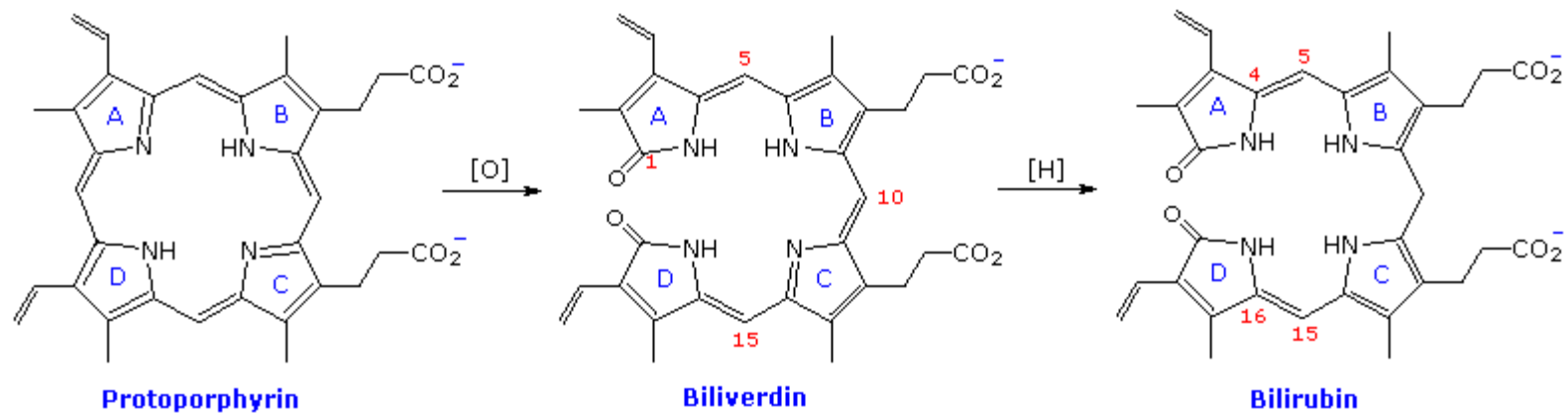
Vitamina A

Vitamina B₆

Vitamina B₁₂



**Conservare il
materiale al buio
evitando la luce
solare diretta**



Denaturazione

Alterazioni steriche o strutturali dei siti attivi di molecole complesse, alterandone le proprietà biochimiche

Richiede bassa
energia



Si verifica facilmente

Dipende da:

- Tempo
- Temperatura
- pH
- Composizione della matrice biologica (accelerata da sostanze ossidanti, ritardata da sostanze donatrici di gruppi tiolici)

Soluzioni:

- Idonea refrigerazione
- Modificazione pH
- Aggiunta di conservanti

Aggregazione

Può verificarsi *in vitro* a carico di molecole complesse come le proteine (legami a bassa energia)



Alterazione della costante di diffusione, dei siti antigenici o di legame



Misura quantitativa errata (tecniche di immunodiffusione radiale, immunologiche, binding)

Alterazioni biochimiche o biometaboliche

In vivo

Sistema di regolazione omeostatica
Compartimentalizzazione e gradienti
mantenuti dai sistemi energetici



Dopo
prelievo

Mancano i sistemi di regolazione (sistemi energetici)
Mutano le condizioni ambientali (T, aria, contenitore)



Modificazione della concentrazione di sostanze
che possiedono uno stato metabolico dinamico

AUMENTO conc
H⁺, acido lattico, acido
piruvico, NH₄⁺, ADP, AMP



DIMINUZIONE conc
Glucosio, ATP

RISULTATI ANALITICI PRIVI DI SIGNIFICATO

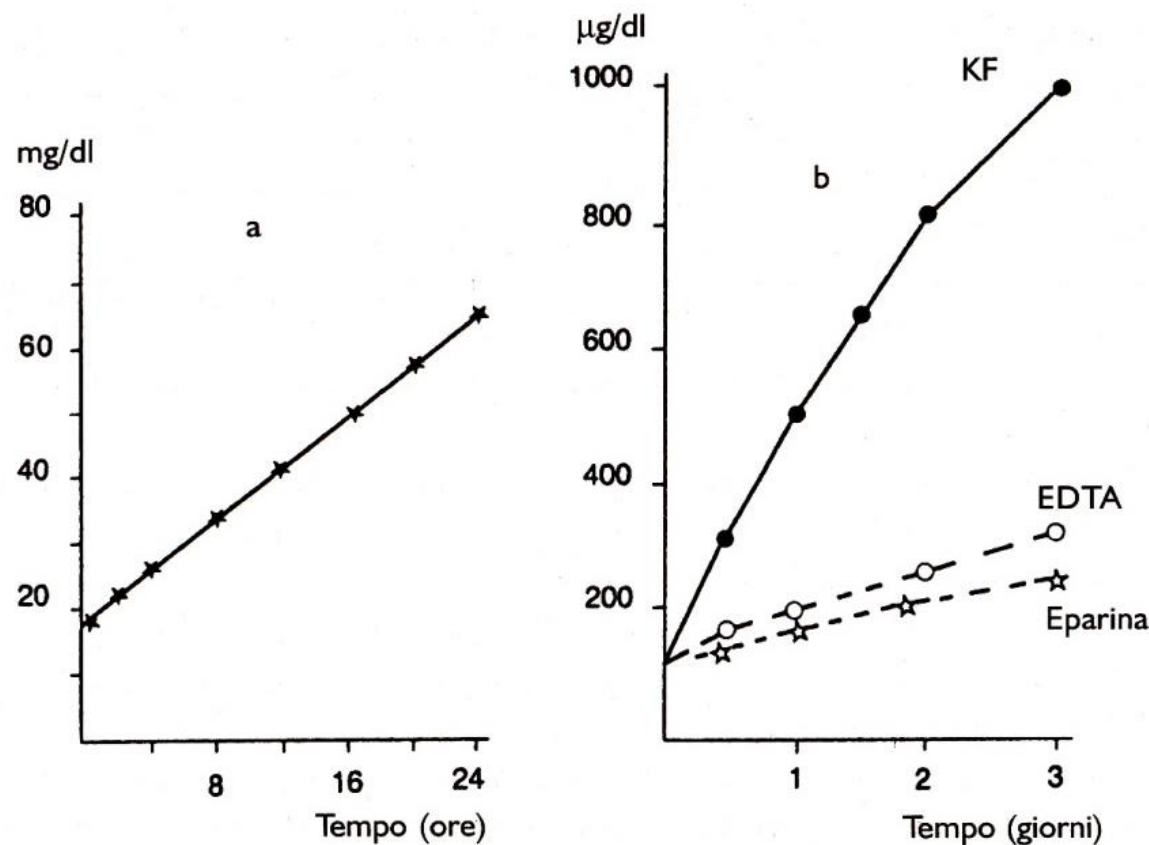


Figura 3.2 – **a.** variazione nel tempo della concentrazione dell'acido lattico a temperatura ambiente; **b.** variazione nel tempo della concentrazione plasmatica dell'ammoniaca a temperatura ambiente in presenza di EDTA, di KF e di eparina come anticoagulanti. Un modo standardizzato di procedere può essere il seguente: prelievo in EDTA o eparina seguito da immediato raffreddamento in acqua e ghiaccio e invio al laboratorio; misura entro un'ora, oppure centrifugazione, separazione del plasma e congelamento a -20°C .

METODI DI CONSERVAZIONE

- La rapida separazione del siero/plasma dalla parte corpuscolata riduce certe interferenze metaboliche (glucosio, acido lattico, ammonio, rilascio di analiti dalle cellule)
- Bilirubina, colesterolo, trigliceridi, acido urico, ALP, GGT non subiscono alterazione nei sieri non separati per almeno 48h a T 4-30°C

Provvedimenti per migliorare la conservazione:

- Raffreddamento
- Buio
- Liofilizzazione
- Modificazione del pH
- Aggiunta di conservanti

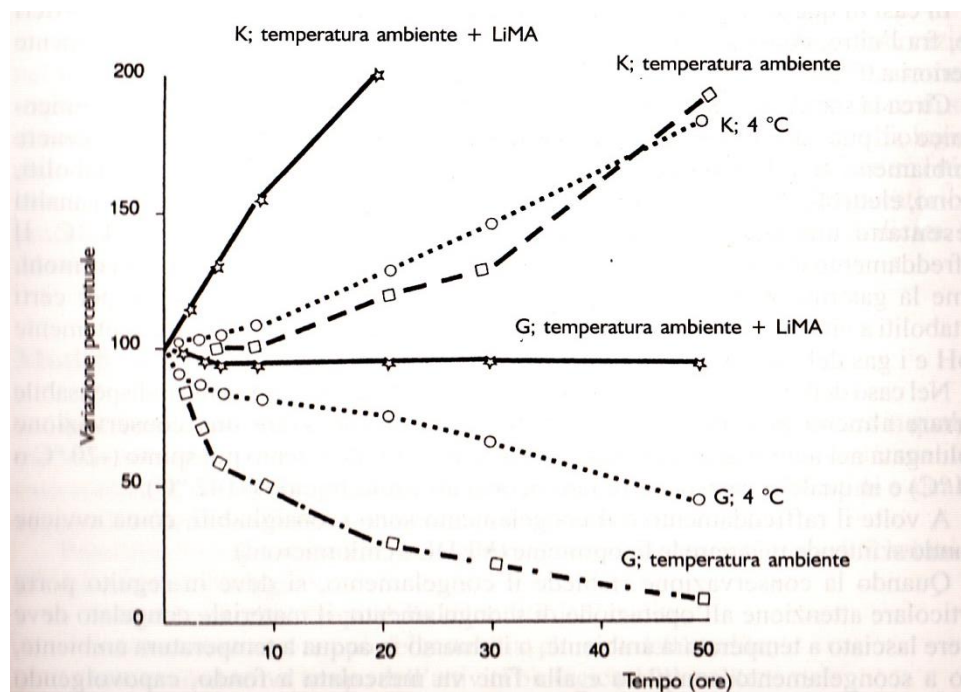


Figura 3.3 – Variazione nel tempo della concentrazione del potassio (k) e del glucosio (g) nel plasma non separato dalla parte corpuscolata, e conservato in diverse condizioni di temperatura rispettivamente in assenza o in presenza di litio monoiodoacetato (LiMA).

Raffreddamento del materiale biologico

- Il raffreddamento dalla T_{amb} a 0°C riduce di 5-10 volte la velocità delle reazioni
- Volume ridotto di campione e superficie ampia $\rightarrow$ miscela acqua-ghiaccio $\rightarrow$ abbassa velocemente la T
- Conservazione per tempi lunghi o volumi maggiori $\rightarrow$ frigorifero (T anche $< 0^{\circ}\text{C}$)

Stabilità dei costituenti sierici o plasmatici:

- T_{amb} , 4h: non ci sono cambiamenti significativi di metaboliti, enzimi, elettroliti e minerali. A 4°C sono stabili per 24h.
- Gastrina, renina, insulina, ammine pressogene, ammoniaca, acido lattico $\rightarrow$ raffreddamento immediato in acqua e ghiaccio
- Per assicurare la conservazione nel tempo: $-20/-70^{\circ}\text{C}$ a volte anche -150°C
- Lipoproteine (VLDL, chilomicroni) $\rightarrow$ Raffreddamento/congelamento sconsigliato

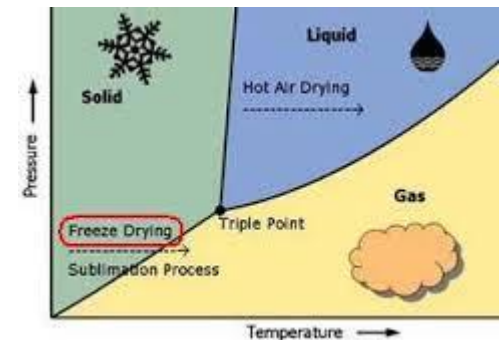
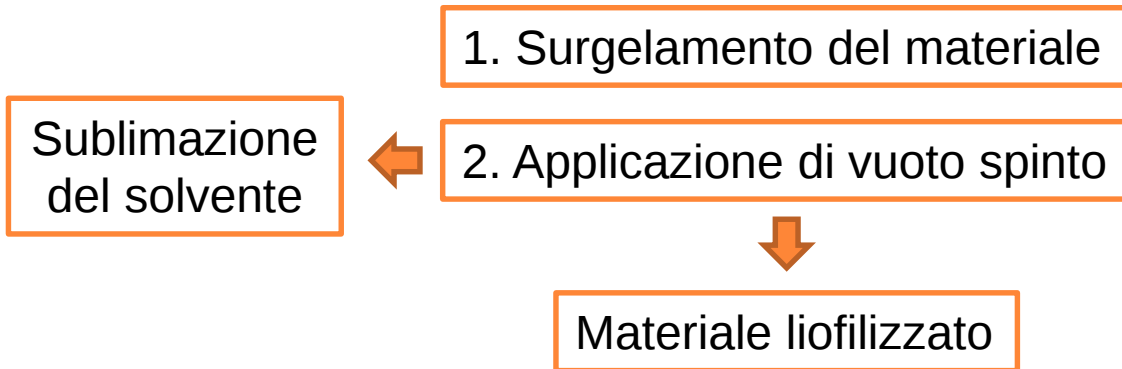
Scongelamento

- Il materiale congelato deve essere posto a Tamb (o in acqua a Tamb) fino a scongelamento completo
- Mescolare, capovolgendo delicatamente e ripetutamente
- Lo scongelamento a bagnomaria a 37°C permette di preservare il materiale proteico in maniera ottimale
- Non ricongelare il materiale scongelato

Conservazione al buio

- Precauzioni per le sostanze biologiche soggette a effetto fotochimico:
 - Evitare l'esposizione alla luce solare diretta
 - Avvolgere il contenitore con carta nera o stagnola
 - Per conservazioni di ore o giorni mantenere il campione al buio

Liofilizzazione



- Tecnica efficiente per la conservazione nel tempo
- Diffusa a livello industriale (sieri di controllo, farmaci)
- Potenzialmente utile per conservare materiali biologici nativi anche per il laboratorio

↓

Procedimento lungo, apparecchiatura dedicata

↓

Raramente impiegato

Modificazione del pH

- Aggiunta di soluzioni acide o alcaline, oppure soluzioni tampone
- Effetti utili derivanti dalla modificazione del pH:
 - Mantenimento nel tempo della solubilità dell'analita (urine)
 - Mantenimento nel tempo della stabilità chimica dell'analita
 - Mantenimento nel tempo dell'attività biologica dell'analita
- L'acidificazione/alcalinizzazione del siero deve essere eseguita con cautela per evitare denaturazione, ppt o aumenti di concentrazione di qualche analita *in vitro*

Urine: sostanze endogene o esogene poco solubili a pH fisiologico e destinate a ppt nel tempo

Tabella 3.6 Raccomandazioni per la conservazione e stabilizzazione delle urine per le indagini biochimiche più comuni.

Analita	Conservante o stabilizzante	Stabilità massima alle temperature indicate	
Sodio	4 °C o mertiolato ¹ o acido borico ² o timolo ³	4 °C	7 giorni
Potassio	4 °C o mertiolato o acido borico o timolo	4 °C	7 giorni
Osmolalita	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	1 giorno
Urea	4 °C o mertiolato o acido borico o timolo	4 °C	2-3 giorni
Creatinina	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	2-3 giorni
Calcio	50 ml di HCl ⁴ 3 mol/l	4 °C	7 giorni
Fosfati	50 ml di HCl 3 mol/l	4 °C	7 giorni
Urati	15 ml di NaOH 2 mol/l	Temp amb.	5 giorni
Proteine totali	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	2-3 giorni
Glucosio	4 °C o mertiolato o acido	4 °C	7 giorni
Cloruri	4 °C o mertiolato o acido borico o timolo	4 °C	7 giorni
Ossalati	50 ml HCl 3 mol/l	-20 °C	7 giorni
Acido 5-HIA	50 ml HCl 3 mol/l	-20 °C	7 giorni
Acido VM	50 ml HCl 3 mol/l	-20 °C	7 giorni
Amilasi	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	

¹ Sodio mertiolato: 150 mg per contenitore

² Acido borico: 27 g per contenitore.

³ Timolo: 1 cristallo per contenitore.

⁴ HCl 3 mol/l: diluire l'acido cloridrico concentrato 1:4 con H₂O.

Porfirine



- Siero: fosfatasi acida prostatica aumenta la sua stabilità nel tempo a pH5 (citrato monosodico 10mg/mL di sangue)

Aggiunta di sostanze chimiche

- Glucosio: se non si può separare immediatamente il siero/plasma si possono usare sostanze ***glicostatiche***



La concentrazione di glicostatico non deve inibire anche gli enzimi utilizzati nel sistema analitico

Il blocco della glicolisi provoca esaurimento di ATP

- I batteriostatici hanno un importante effetto conservante



URINE

Timolo
Acido Borico
Thimerosal (sodio-etilmercurio-tiosalicilato)
Acido benzoico
Clorexidina gluconato (battericida)



SANGUE

Antibiotici
(streptomicina 1 mg/10mL)

Sistemi complessi di conservazione

Delle volte è necessario impiegare sistemi misti per conservare il materiale biologico:

- Deproteinizzazione/raffreddamento: acido lattico e acido piruvico
- Glicostatici/raffreddamento: glucosio
- Alcalinizzazione/buio/raffreddamento: porfirine urinarie
- Modificazione pH/raffreddamento: fosfatasi acida
- Inibitori proteasi: processi fibrinolitici
- Buio/raffreddamento: bilirubina

Tabella 3.7 Cause di variazioni preanalitiche e possibili rimedi.

Fase della variazione	Meccanismi	Fattori	Rimedi
Raccolta del materiale	Contaminazione	Provette Aghi Tappi	Usare materiale controllato e standardizzato
	Metabolismo	Additivi Anticoagulanti Deproteinizzanti	Aggiungere gli inibitori metabolici adatti e raffreddare a temperatura adeguata
Trasporto	Emolisi	Vibrazioni Temperatura	Evitare vibrazioni e congelamento
	Inattivazione	Esposizione alla luce Temperatura Stabilizzanti	Evitare riscaldamento ed esposizione alla luce. Aggiungere stabilizzanti
Separazione	Coagulazione	Centrifugazione Tempo Temperatura	Centrifugare 5-15 min. a 1000-1200 g Separare siero o plasma entro 1 h Evitare riscaldamento
	Separazione	Separatori Filtri Distributori di campioni	Usare separatori controllati — Controllare l'identificazione dei campioni
Distribuzione	Confusione	Identificazione Volume	Etichettare i sottocampioni —
	Precipitazione o flottazione	Solubilità Peso specifico	Mescolare il campione —
Conservazione	Evaporazione	Superficie del contenitore Umidità Tempo	Usare contenitori profondi e stretti Tenere tappati i campioni Evitare contatti d'aria
	Precipitazione	Temperatura Solubilità	Modificare il pH e controllare la temperatura
	Adsorbimento	Contenitori	Usare i contenitori di materiale adatto

VARIABILITÀ ANALITICA

Metodo analitico

Ciascuna grandezza di un determinato sistema ha un certo valore, detto *valore vero*, solitamente ignoto; lo scopo della misura è quello di ottenere un valore, detto *valore analitico*, che rappresenti una stima il più possibile fedele al *valore vero*.

Descrizione del metodo analitico

- Riferimenti bibliografici essenziali
- Principio del metodo (reazione chimica, principio chimico-fisico)
- Reagenti e soluzioni (conc., preparazione, conservazione)
- Procedimenti (dettagliati, tempi di attesa)
- Calcolo dei risultati (significato di eventuali costanti impiegate)
- Limiti dei valori normali (sesso, età, ore prelievo, ecc.)
- Commenti

Attendibilità

È la qualità che caratterizza, in senso globale, un metodo (risultato) analitico. Viene determinata da diversi fattori detti *criteri di attendibilità*:

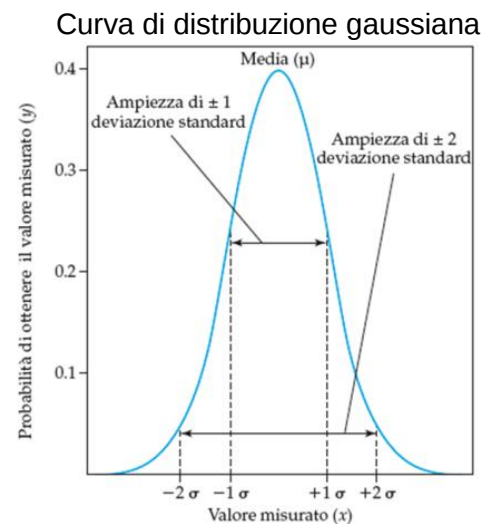
- Precisione
- Accuratezza
- Specificità
- Sensibilità analitica e limite di rivelabilità

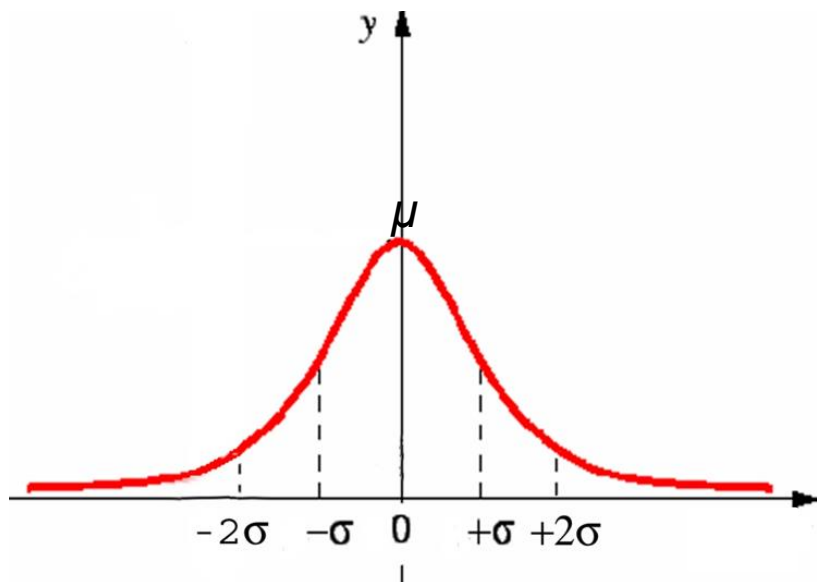
Precisione

Concordanza fra i risultati di una serie di distinte misure ottenute con lo stesso metodo su porzioni di uno stesso campione (repliche)

I risultati analitici ottenuti sulle repliche sono soggetti ad **errori casuali** che ne comportano una distribuzione gaussiana

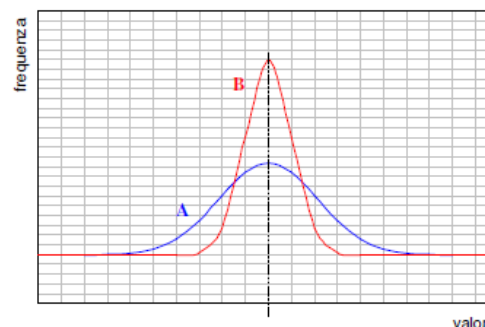
L'imprecisione si può misurare quantitativamente con il valore di **deviazione standard (s)** calcolata sui risultati di una serie di misure sullo stesso campione





deviazione standard del campione (s) è un indicatore della imprecisione della misura

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$



Il 68,3% dei dati di una popolazione ricade nell'intervallo $\pm \sigma$
 Il 95,5% dei dati di una popolazione ricade nell'intervallo $\pm 2\sigma$
 e il 99,7% nell'intervallo $\pm 3\sigma$

Limiti fiduciali

Per un risultato isolato, ottenuto con un metodo di cui si sia preventivamente calcolata la deviazione standard su almeno 25 dati sperimentali, i limiti fiduciali sono rappresentati da $\bar{x} \pm 2s$.

Limite entro i quali si può avere fiducia che sia compreso il valore vero dell'analisi (95.5%).

Errore casuale

- Sono errori per principio inevitabili, di piccola entità, compiuti senza che l'operatore se ne possa rendere conto
- Natura e causa non sono individuabili
- Si deve a questi errori il fatto che ripetendo numerose volte un'analisi sul medesimo campione si ottengono valori sempre un po' differenti tra loro, distribuiti attorno ad un valore medio
- Imputabili all'analista ed alle condizioni operative

Coefficiente di variazione

Generalmente l'entità degli errori casuali aumenta con l'aumentare della concentrazione del campione

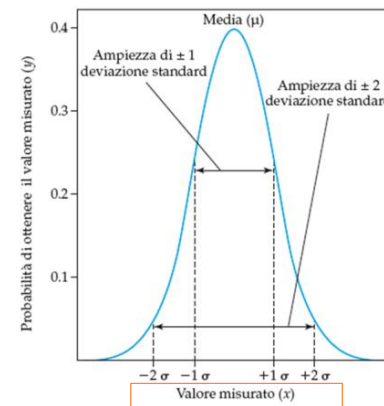


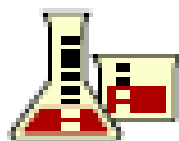
s non è valida in senso assoluto come espressione dell'imprecisione
(possiede un'unità di misura)



s espressa in percentuale al valore medio (CV) rispecchia più fedelmente l'imprecisione del metodo analitico
(valore percentuale adimensionale)

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$



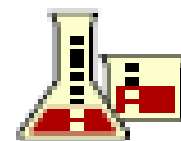


Analyte: Glucose

Method: Hexokinase

Standard deviation = 4.8

Mean = 120



Analyte: Glucose

Method: Glucose oxidase

Standard deviation = 4.0

Mean = 100

Which method is more precise ?

Calculate the CV to see:

$$CV (\%) = \frac{\text{Standard Deviation}}{\text{Mean}} \times 100$$

$$\frac{4.8 \text{ (SD)}}{120 \text{ (Mean)}} \times 100 = 0.04\% \text{ (CV)}$$

$$\frac{4.0 \text{ (SD)}}{100 \text{ (Mean)}} \times 100 = 0.04\% \text{ (CV)}$$

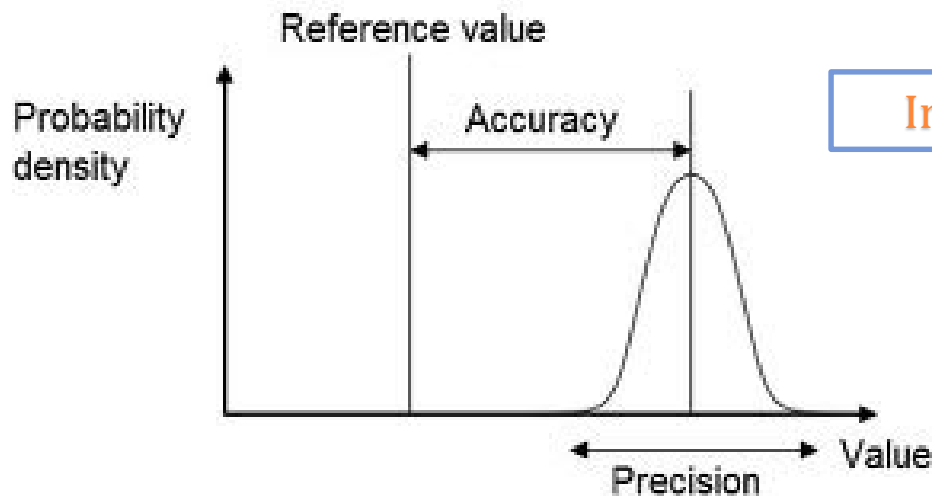
Il concetto di precisione introduce anche quello di:

- **Ripetibilità** (precisione entro la serie), misura della deviazione dei risultati dal valore medio, ottenuta dallo stesso tecnico in un'unica serie analitica, senza cambiare reattivi o apparecchi.
- **Riproducibilità**, misura della deviazione dei risultati dal valore medio, ottenuta nel corso di settimane, mesi, anche da tecnici diversi, con lotti di reagenti e soluzioni standard diversi (precisione tra le serie).

Accuratezza

Concordanza fra il valore medio trovato in repliche diverse di uno stesso campione e il valore vero.

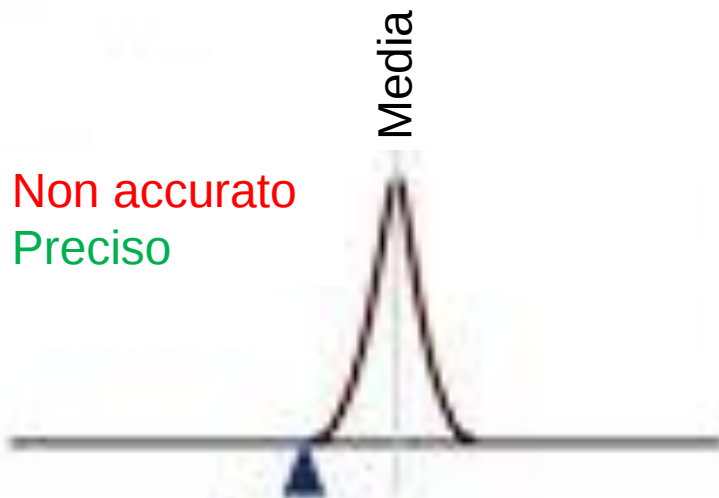
Inaccuratezza: differenza tra valore medio sperimentale (x) e valore vero (μ), mette in evidenza errori sistematici (detti bias)



$$\text{Inaccuratezza (errore assoluto)} = x - \mu$$

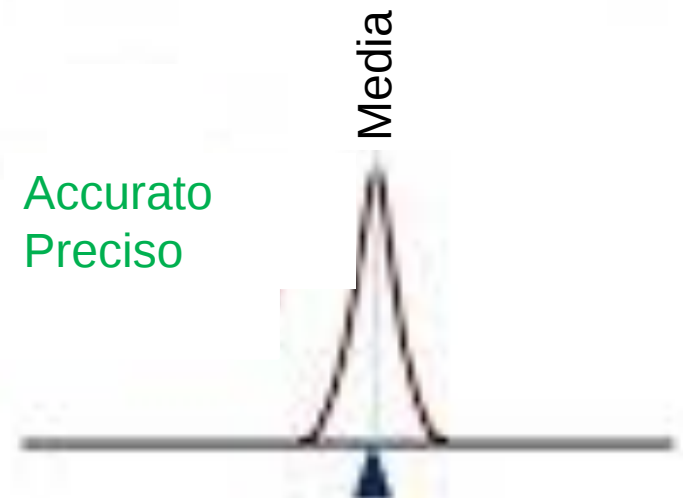


$$\text{errore relativo \%} = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$



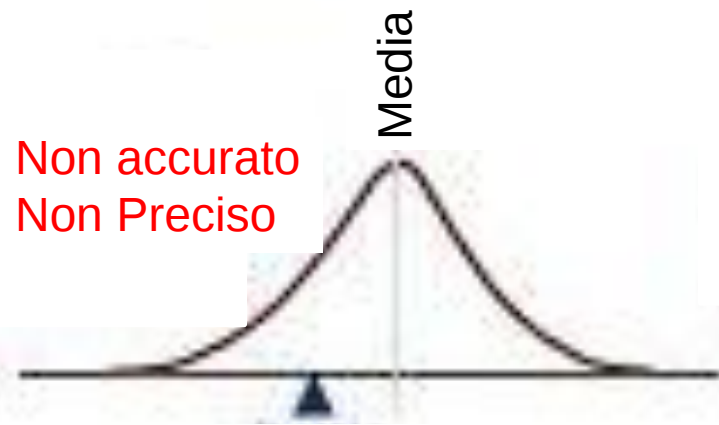
Non accurato
Preciso

Valore vero



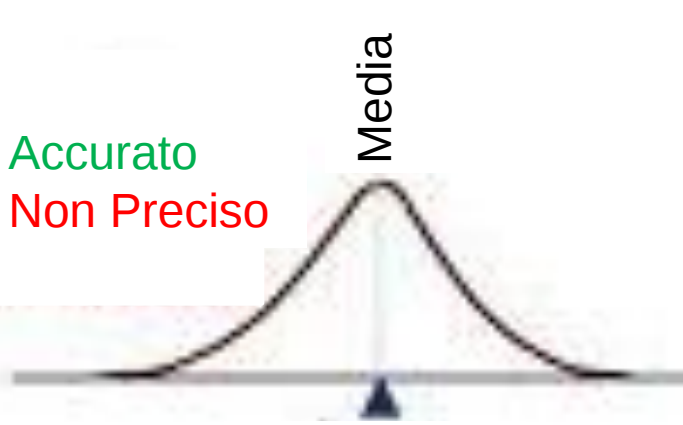
Accurato
Preciso

Valore vero



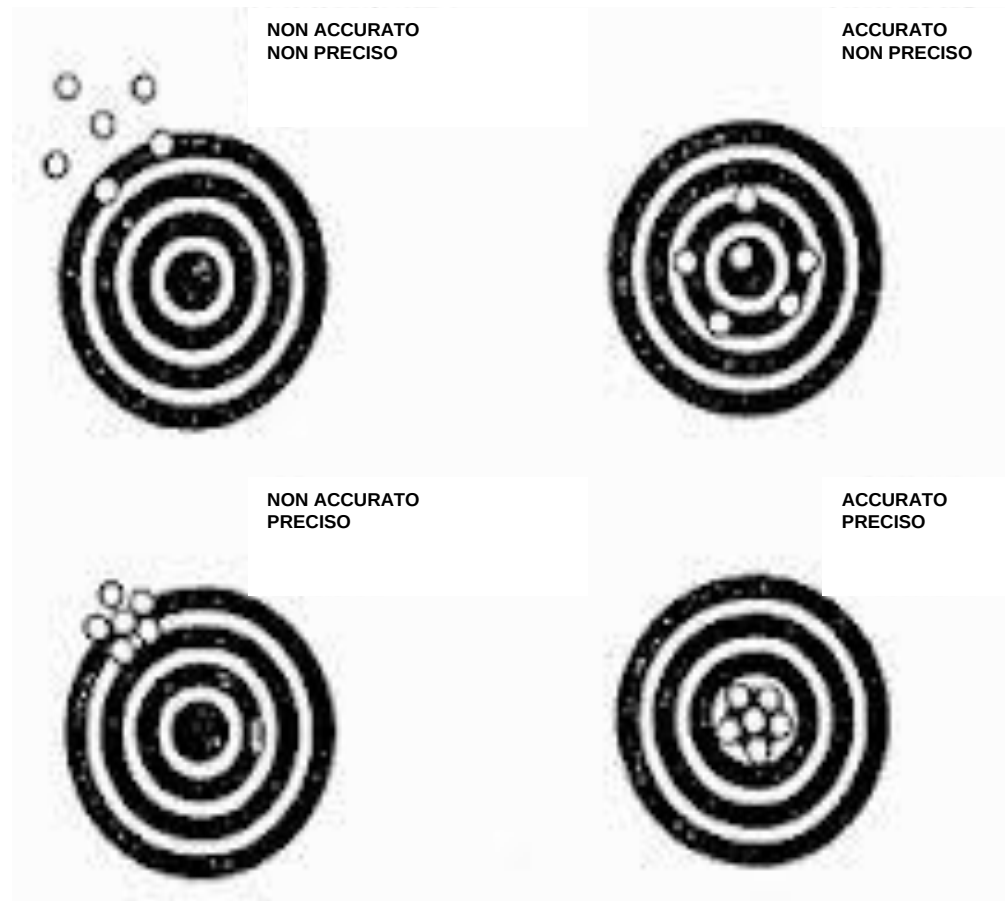
Non accurato
Non Preciso

Valore vero



Accurato
Non Preciso

Valore vero



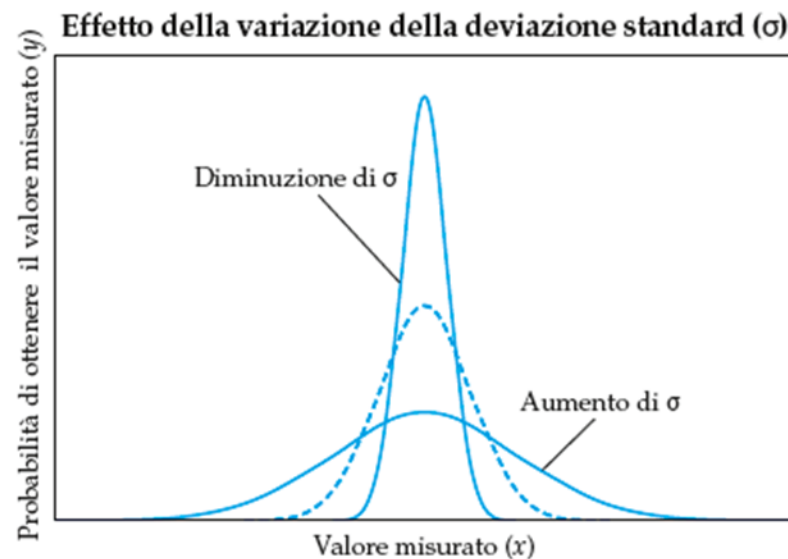
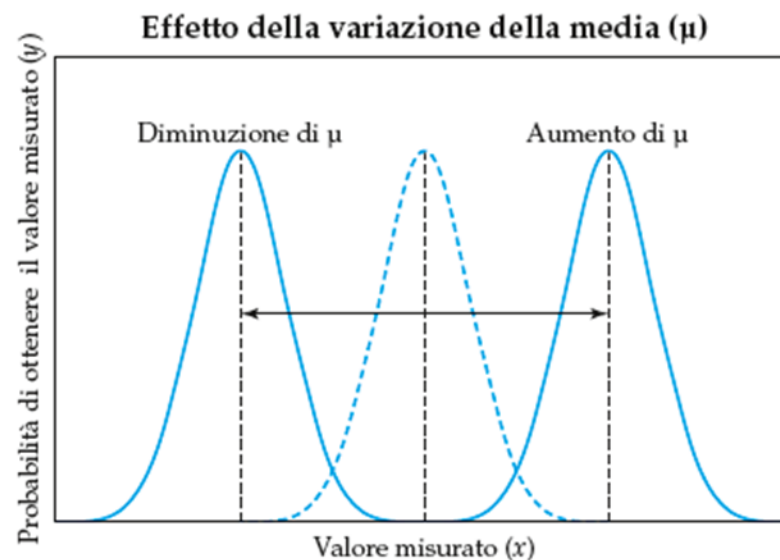


FIGURA 4.6 Effetti della variazione della media vera (μ) o della deviazione standard vera (σ) sulla forma e sulla posizione di una curva di distribuzione normale. In questi esempi, l'area totale sottesa da ciascuna delle curve è costante.

Errore sistematico (bias)

- Si ripetono tutte le volte che si effettua lo stesso tipo di analisi con lo stesso metodo
- Causa individuabile
- Si suddividono in:
 - Errori del metodo: può essere imputabile a poca sensibilità o specificità del metodo e quindi non eliminabile se non usando un altro metodo più sensibile e specifico.
 - Errori strumentali: dovuti a carenze delle apparecchiature (vetreria usata alla temperatura sbagliata, lancetta di apparecchio analogico distorta, apparecchio alimentato da batteria quasi scarica). Sono facilmente scopribili ed eliminabili con la calibrazione.
 - Errori dovuti all'operatore (lettura sbagliata del menisco, percezione erronea di un viraggio, attivazione lenta di un timer, reattivi impuri o errati). Causa è individuabile e minimizzabile.

Controllo dell'accuratezza (limiti accettabili di errore)

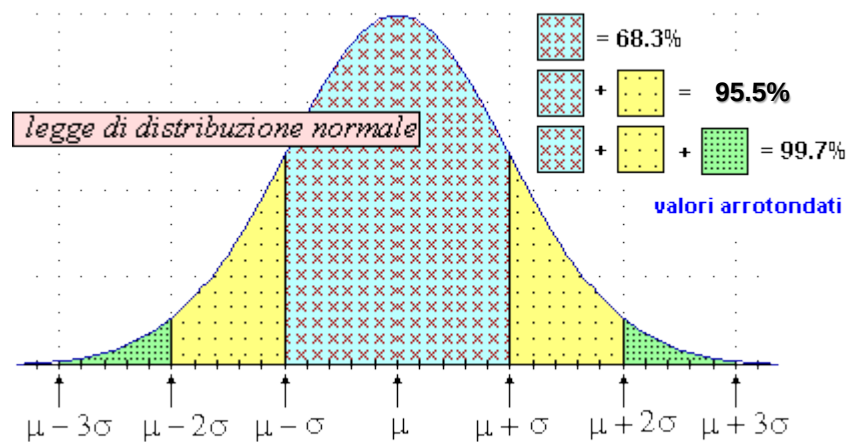
- Per controllare l'accuratezza si introducono in maniera casuale (singolo cieco) nella serie analitica, uno o più campioni a contenuto noto di analita (conc. sia normali che patologiche)
- Il discostamento del risultato della misura da quello teorico deve rientrare entro un certo limite collegato alla deviazione standard del metodo usato:

**LIMITI ACCETTABILI
DI ERRORE**

$$\frac{x - \mu}{\mu} \times 100 < 3CV$$

μ = valore teorico
 x = valore trovato

Controllo dell'accuratezza (limiti accettabili di errore)



**LIMITI ACCETTABILI
DI ERRORE**

$$\frac{x - \mu}{\mu} \times 100 < 3CV$$



Z SCORE

$$Z = \frac{x - \mu}{s}$$

deve essere inferiore a 3

Errori

- Casuali
- Sistematici
- Grossolani

Errori grossolani

- Possono essere accidentali
- Generalmente dovuti all'operatore
- Esempi: scambio di reattivi, vetreria del volume non corretto, errata selezione dei filtri o delle lunghezze d'onda, interpolazione errata sulla curva di taratura, errori di calcolo, ecc.
- Sono sbagli, facilmente evitabili ponendo maggiore attenzione

Specificità

È la proprietà del metodo di dosare solo ed interamente la sostanza studiata, senza subire interferenze positive o negative da parte di altre sostanze presenti nel materiale analizzato. Non ha un valore numerico.

Prove di specificità

- Prove di aggiunta che evidenziano eventuali fenomeni di interferenza da parte di sostanze estranee: ad una aliquota di materiale biologico si aggiungono quantità scalari note della sostanza da dosare, si analizza il materiale da solo e quello con le aggiunte. Per differenza, la quota di recupero dovrebbe risultare del 100% a qualsiasi concentrazione.
- Difficile data la complessità di composizione dei vari materiali biologici

Metodi per aumentare la specificità

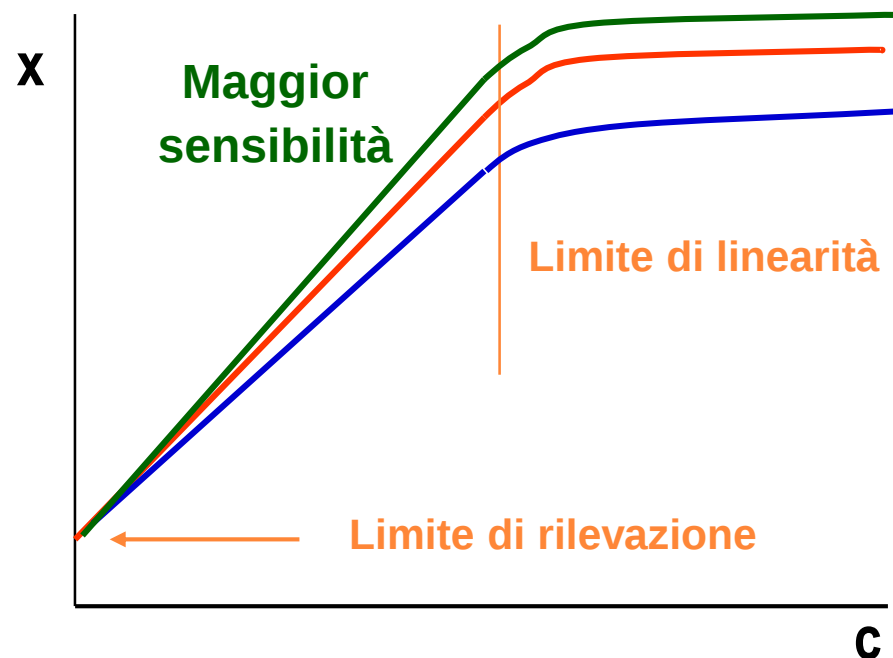
- Separazione preliminare (deproteinizzazione, estrazione, elettroforesi, cromatografia)
- Processi di selettività secondaria:
 - Selettività di particolari reazioni
 - Selettività di lettura del segnale (λ , tempo)
 - Metodi diretti a specificità elevata (metodi enzimatici, immunologici)
 - Tecniche separative e di misura intimamente accoppiate ad adatti rivelatori (GC-MS, HPLC-MS)

Sensibilità analitica e limite di rivelabilità

Sensibilità analitica: il più piccolo cambiamento di concentrazione che il metodo è in grado di rivelare

Limite di rivelabilità: la più piccola quantità di sostanza che il metodo riesce a dosare (distinguere dal bianco con un limite fiduciario del 95%).

Dal punto di vista pratico coincide con il doppio della deviazione standard del bianco



Altri parametri da valutare per l'attendibilità del metodo:

- Stabilità dei reagenti: deve essere valutata a diverse condizioni di T, illuminazione e confezionamento
- Rapidità operativa: deve essere valutato il tempo necessario ad eseguire l'analisi sia quando l'analista è a conoscenza dell'arrivo del campione che quando non lo è, e valutare se la diversa rapidità influenza accuratezza e precisione
- Abilità tecnica: se precisione e accuratezza dipendono strettamente da una particolare abilità, questa deve essere dichiarata

CONTROLLO DI QUALITÀ NEL LABORATORIO

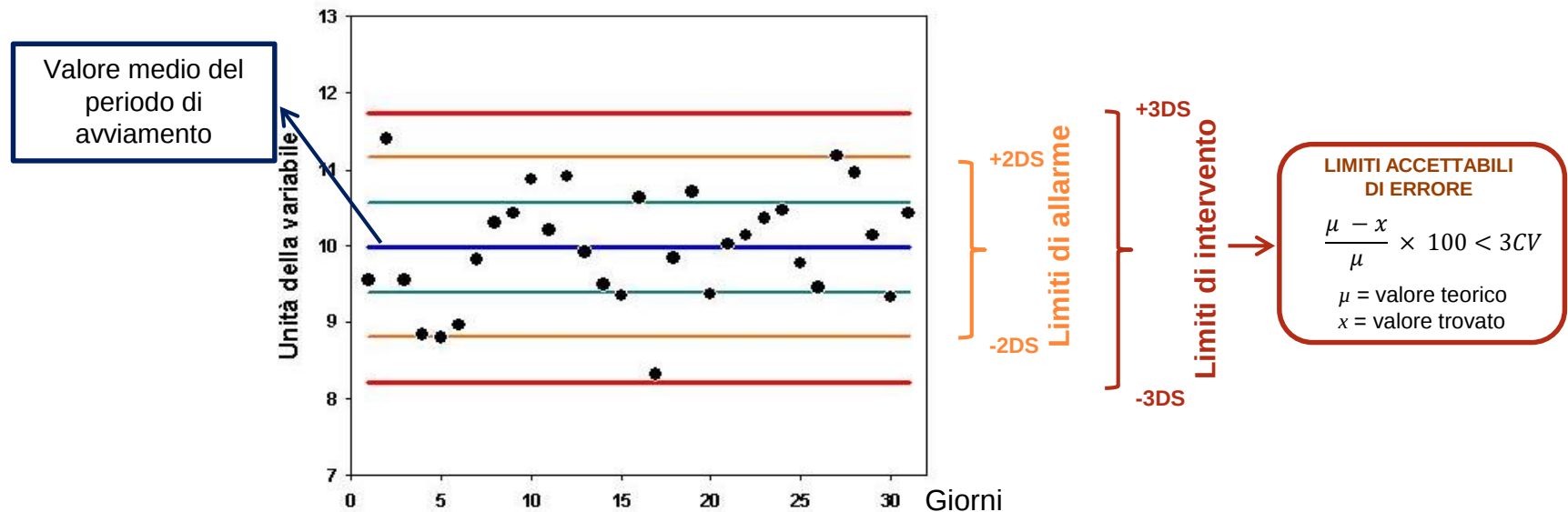
Il CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ è il sistema operativo che viene utilizzato per controllare l'attendibilità di un metodo analitico.

- Ha lo scopo di garantire nel tempo l'affidabilità del dato analitico
- Permette di scoprire eventuali variazioni nel tempo di errori casuali
- Evidenzia l'insorgere di errori sistematici
- Ogni laboratorio di analisi cliniche deve:
 - Usare giornalmente standard per la calibrazione degli strumenti analitici
 - Usare, almeno settimanalmente, materiale di controllo a titolo noto per il controllo dell'accuratezza dell'analisi da analizzare contestualmente ai campioni in esame (singolo cieco)
 - Allestire e aggiornare giornalmente delle carte di controllo
- Materiale di controllo: omogeneo, perfettamente stabile nel tempo, composizione fisica e chimica il più possibile vicina a quella dei campioni in esame e da essi indistinguibile

Carte di controllo

Metodo di Shewart-Levey-Jannings

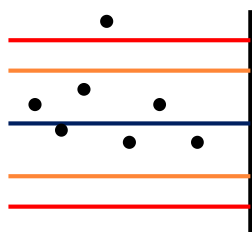
- Costruzione della carta di controllo: campione di controllo in ogni serie analitica giornaliera per 20 giorni, si calcola la media e la deviazione standard e si costruisce la carta di controllo



- Utilizzo della carta di controllo: riportando ogni giorno il valore del campione di controllo, sarà possibile apprezzare il grado di precisione (viene controllata la riproducibilità) e se ci sono anomalie, ossia se insorgono errori sistematici.

Metodo di Shewart-Levey-Jannings

METODO FUORI CONTROLLO



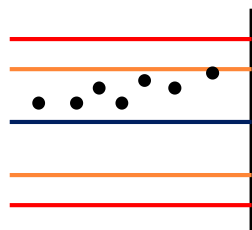
1 valore confermato fuori i limiti di intervento

Possibile causa

- imperizia dell'operatore
- tecnica analitica inadeguata
- procedura modificata

Decisioni da adottare

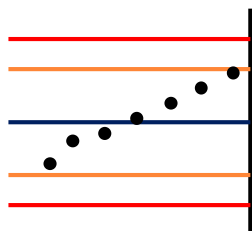
ripetere l'analisi e se il punto rientra all'interno del limite di controllo, proseguire, altrimenti interrompere, individuare e risolvere la causa



7 valori consecutivi inferiori/superiori al valore medio

- errata preparazione di reagenti e di soluzioni standard
- errata calibrazione del sistema di misura
- presenza di contaminante

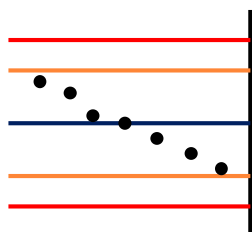
se l'ottavo punto cade dalla parte opposta rispetto alla Linea Media proseguire, altrimenti interrompere, individuare e risolvere la causa



7 valori consecutivi con trend positivo o negativo

- obsolescenza della soluzione standard o dei reagenti

se l'ottavo punto cambia l'ordine proseguire, altrimenti interrompere, individuare e risolvere la causa



CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO

Controllo interlaboratorio

Due diverse procedure:

1. Vengono fatti analizzare i materiali da un elevato numero di laboratori di riferimento e da questi dati si calcola la media e la deviazione standard
2. Vengono impiegati i valori ottenuti da tutti i partecipanti al controllo qualità e da questi si calcolano media e deviazione standard (per evitare s ampie di scartano poi i valori oltre $3s$ e si ricalcolano media e s)

Proficiency test → A tutti i laboratori viene inviato lo stesso campione, poi i risultati vengono inviati ad una sede centrale e poi si riceve la risposta (media, s , z -score).

Z-score

$$Z = \frac{x - \mu}{s}$$

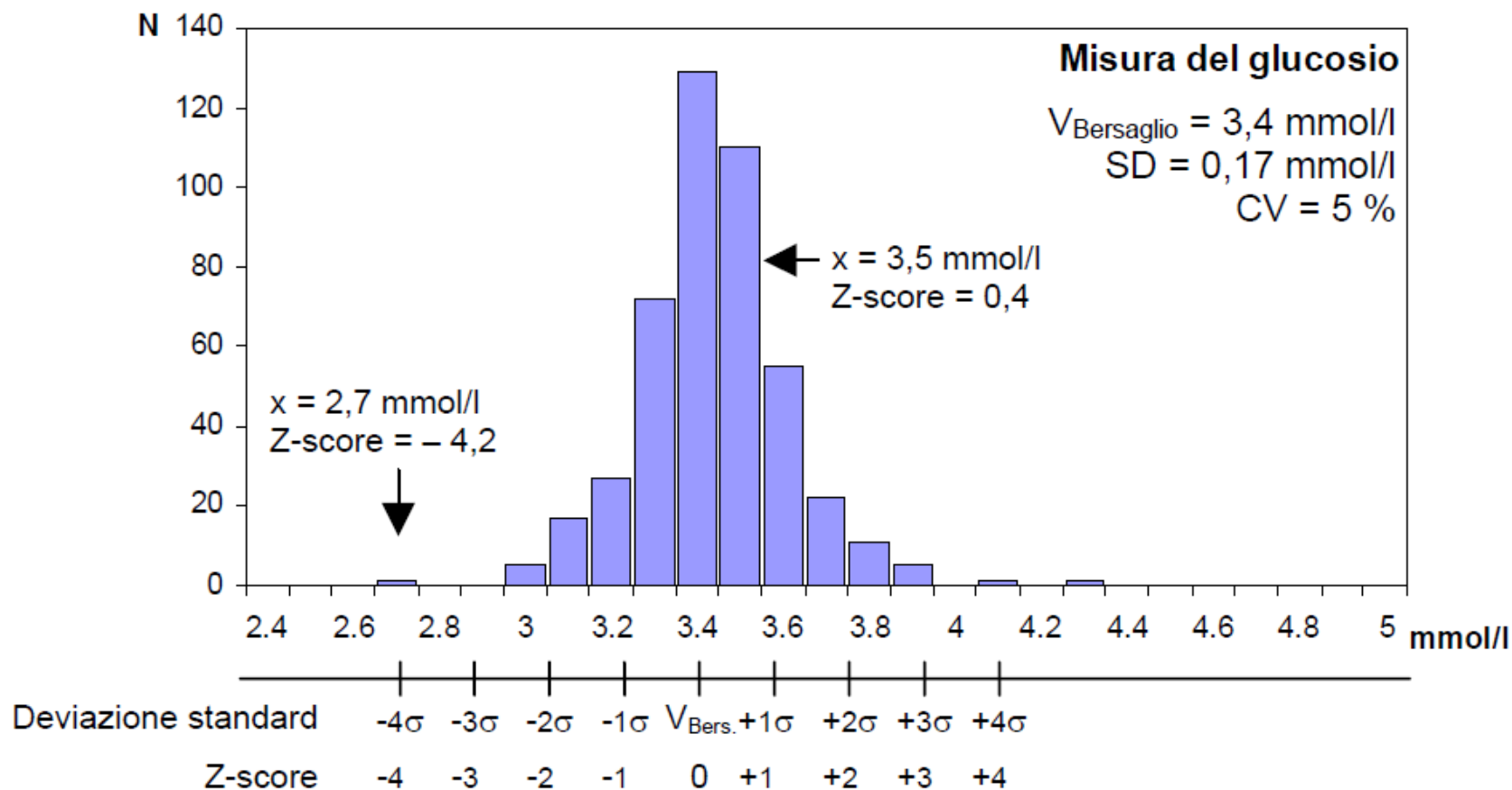
dove x = valore trovato

μ = valore di riferimento (teorico)

s = deviazione standard

μ e s valore di riferimento possono derivare dai risultati dei partecipanti o essere stabiliti dall'organizzatore del PT

- $-2 < z < +2$ è accettabile
- $2 < |z| < 3$ il laboratorio dovrebbe verificare il proprio operato
- $|z| > 3$ inaccettabile, sono necessarie verifiche ed azioni correttive



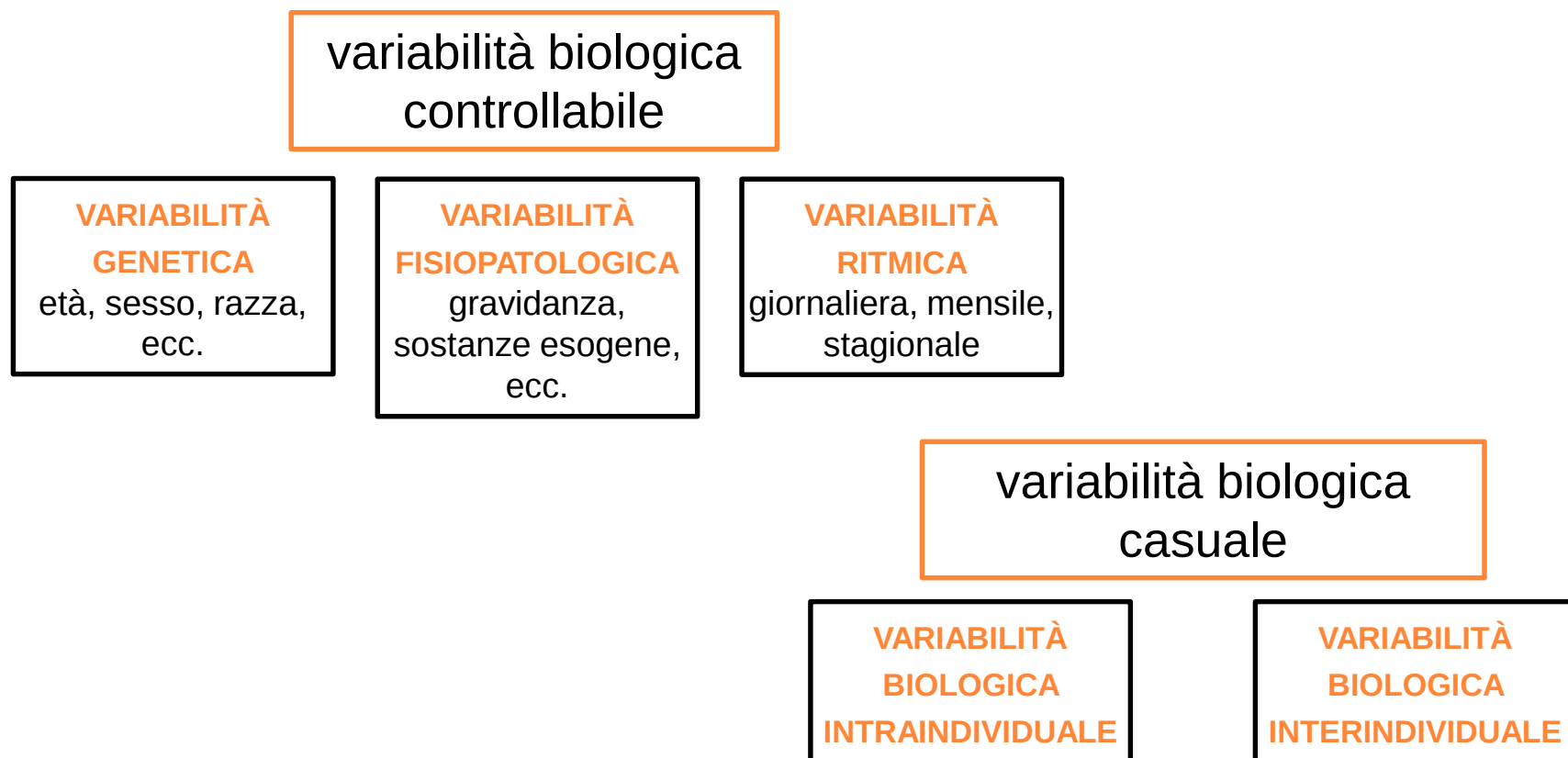
la probabilità di trovare un valore che dista più di 3 deviazioni standard è solo dello 0,13%

VARIABILITÀ BIOLOGICA E VALORI DI RIFERIMENTO

Un dato analitico su un individuo non è influenzato solo da variabilità preanalitica e analitica ma è influenzato soprattutto dalla **VARIABILITÀ BIOLOGICA**

Variabilità biologica

La variabilità biologica dei componenti esaminati in medicina di laboratorio (analiti) può essere distinta in:



Variabilità biologica intraindividuale

- Il valore di una grandezza biologica è il risultato di un delicato equilibrio dinamico che tende a mantenerlo ad un valore fisso detto punto omeostatico
- L'ampiezza dell'oscillazione del valore di una grandezza in un individuo attorno al punto omeostatico viene definita variabilità biologica intraindividuale (CV_I)
- La CV_I assieme alla variabilità analitica (CV_A), contribuisce alla variabilità complessiva dell'analita nell'individuo

Variabilità biologica interindividuale

- Il punto omeostatico varia da individuo ad individuo, tale differenza viene espressa dalla variabilità biologica interindividuale (CV_G)

Entrambe vengono calcolate con opportuni protocolli sperimentali e adeguati metodi statistici

Misura della variabilità biologica intraindividuale in un soggetto

- Si raccolgono una serie di campioni del materiale biologico opportuno, in condizioni basali, per un periodo di tempo adeguato (settimane), prelevati in maniera standardizzata
- Analisi in duplicato di tutti i campioni (analisi in un'unica seduta → conservazione adeguata)
- La variabilità totale (s_T) della misura dei campioni è uguale alla somma della variabilità analitica e della variabilità biologica intraindividuale:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

$$\Rightarrow \textcircled{s_T} = \sqrt{s_A^2 + s_I^2} \quad \rightarrow \quad \boxed{CV_T = \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2}}$$

quindi nota la CV_A e la CV_T si può ricavare la CV_I

- Dalle differenze fra i campioni analizzati in duplicato si può risalire all'imprecisione analitica:

$$s_A = \sqrt{\frac{\sum (d)^2}{2n}}$$

che si può esprimere come CV_A

- Calcolando la CV_I per un gruppo omogeneo di persone, si può anche risalire alla variabilità interindividuale CV_G
- In questo caso s_T sarà calcolata tenendo conto dei dati di ogni singola serie di tutti gli individui appartenenti al gruppo:

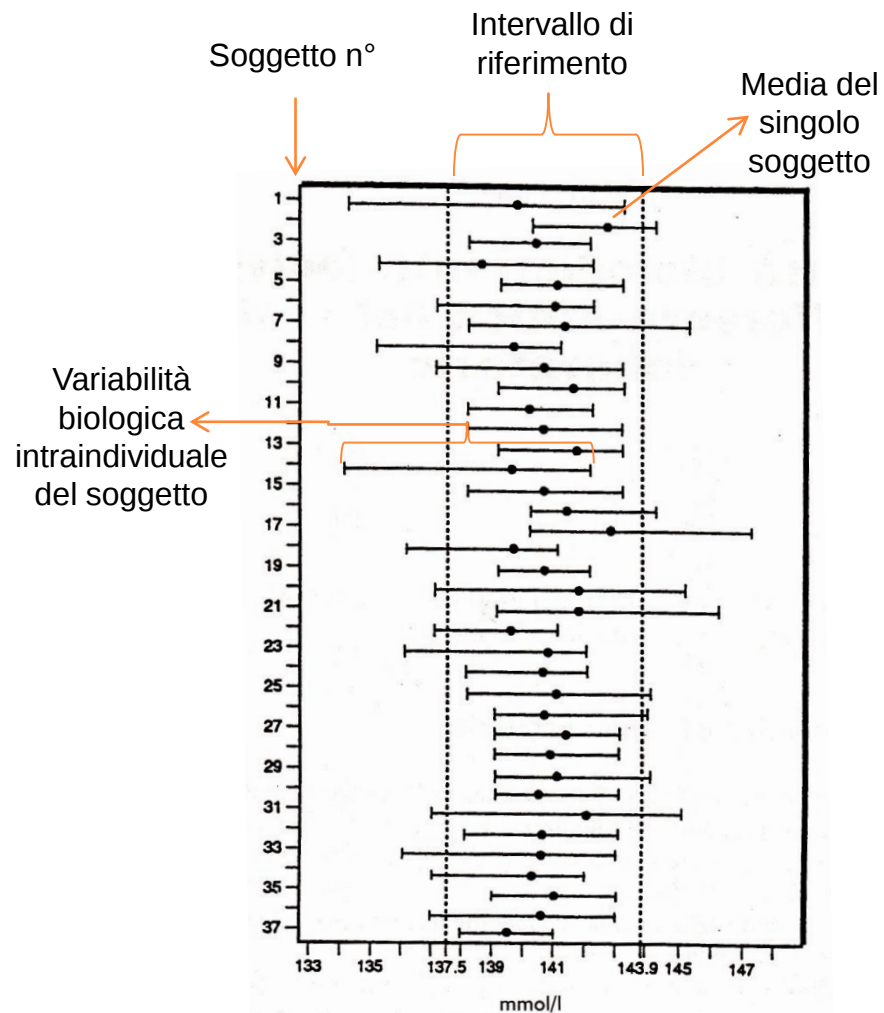
$$s_T = \sqrt{s_A^2 + s_I^2 + s_G^2} \quad \rightarrow \quad CV_T = \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2 + CV_G^2}$$

quindi noti CV_A , CV_T e CV_I si può ricavare la CV_G

Tabella 7.1 Variazione biologica: variazioni medie intraindividuali e interindividuali di alcuni costituenti del plasma, espressi come coefficienti di variazione [CV = (DS x 100)/media]

analiti	Variazione	
	Intraindividuale	Interindividuale
Sodio	0.7	0.6
Potassio	5.1	4.4
Calcio (totale)	1.7	2.2
Magnesio	2.2	5.9
Fosfato	7.8	9.4
Bicarbonato	4.6	3.0
Urea	13.6	16.9
Creatinina	4.6	10.6
Acido urico	8.6	13.4
Glucosio	6.2	6.4
Bilirubina (totale)	25.1	35.2
Colesterolo	5.5	14.8
Trigliceridi	27.3	52.2
Proteine totali	2.7	3.7
Albumina	3.1	3.3
Fosfatasi alcalina	6.7	25.4
Aspartato-aminotransferasi	16.3	20.4
g-glutamilttransferasi	34.7	86.7
Creatina-chinasi	71.6	67.7

Fonti diverse. Da: Fraser CG. Interpretation of Clinical Laboratory Data. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986, per gentile concessione.



Variabilità intraindividuale della
concentrazione sierica del sodio

Valori di riferimento

VALORI DI RIFERIMENTO: valori del parametro chimico-clinico calcolato nella popolazione di riferimento

Quando un'analisi viene richiesta a scopo diagnostico, il risultato analitico deve essere confrontato con i valori di riferimento per quell'analita.



Se il dato analitico deve essere confrontato ad un intervallo di riferimento risulta chiara l'importanza di mantenere il dato il più fedele al suo valore vero, cioè ridurre l'inaccuratezza. Se invece il proposito dell'analisi è il monitoraggio di un analita, saranno richieste delle analisi consecutive sullo stesso soggetto e quindi andrà minimizzata l'imprecisione.

Quindi introdurre delle specifiche di qualità (obiettivi analitici) per imprecisione e inaccuratezza (bias) ha una importantissima utilità pratica.

OBIETTIVI ANALITICI

Imprecisione analitica

CV_A , è importante nei processi di **monitoraggio**.

$$CV_A < 0.5CV_I$$

Inaccuratezza analitica

Errore relativo è importante nella **diagnosi**.

espresso come

$$\frac{\mu - x}{\mu} \times 100$$

$$Er\% < 0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

Variabilità
biologica totale
della popolazione

Errore totale analitico

$$ET_A = Er + (1.65 \cdot CV_A)$$

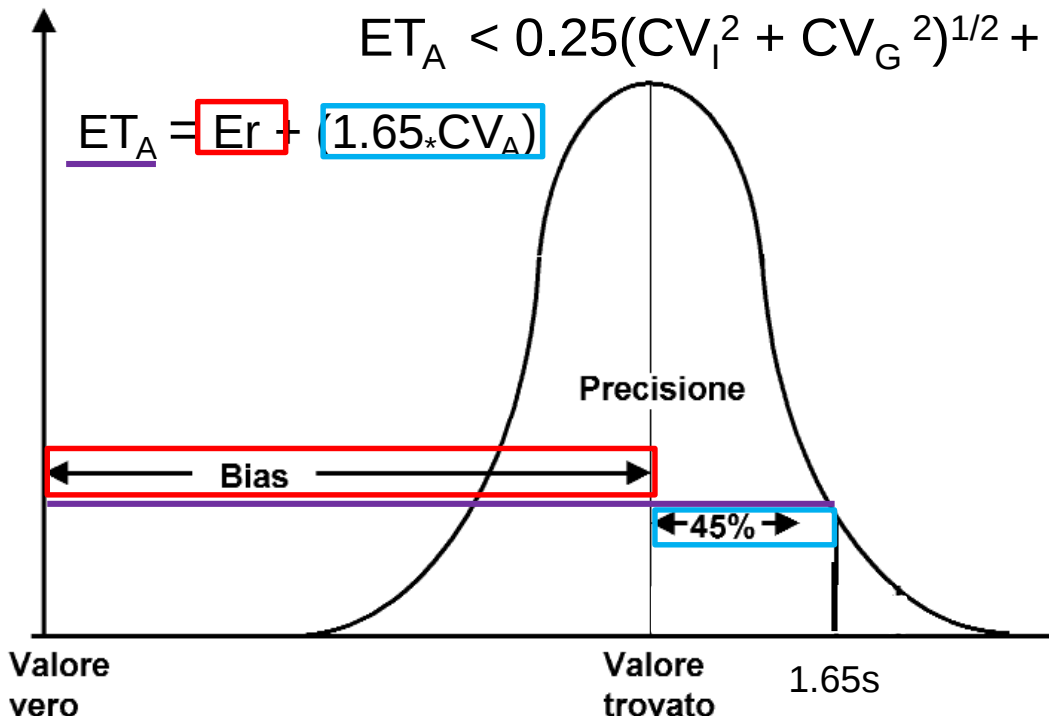
il fattore 1.65 garantisce la possibilità di rivelare l'intervallo entro il quale c'è il 90% di probabilità che ricada il valore vero della grandezza ($\bar{x} \pm 1.65s = 90\%$)

Il **massimo errore tollerabile** sarà quindi:

$$ET_A = 0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2} + 1.65(0.5CV_I)$$

per cui si ha che ET_A deve essere:

$$ET_A < 0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2} + 1.65(0.5CV_I)$$



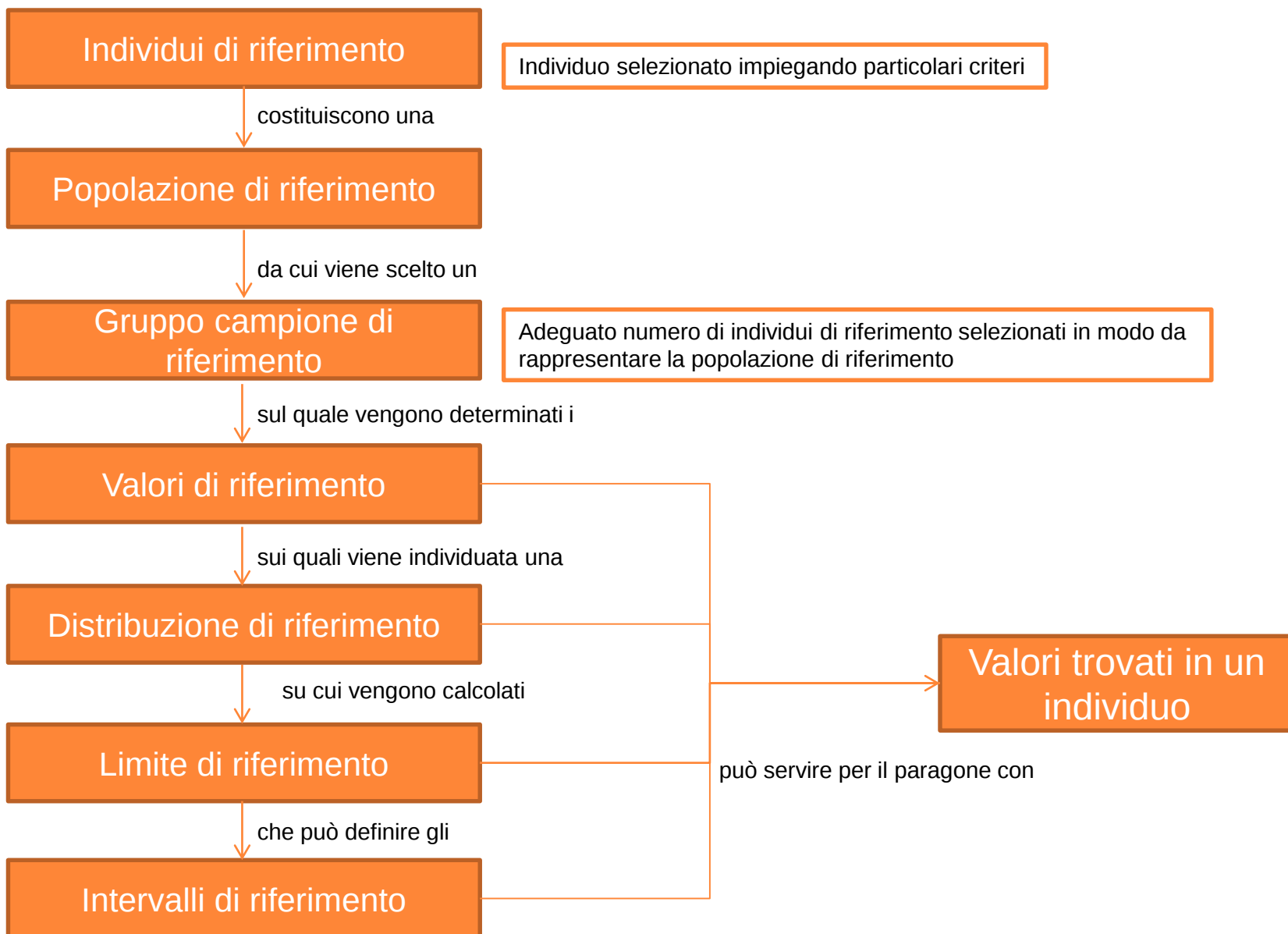
Obiettivi analitici per alcuni componenti

Componente	CVa %	bias %	Eta %
Alanina amminotransferasi	13,6	10,7	33,2
Albumina	1,4	1,1	3,4
Aspartato amminotransferasi	3,7	6,5	12,6
Bicarbonato	7,2	6,2	18,1
Bilirubina totale	2,3	1,6	5,4
Calcio totale	11,3	9,8	28,4
Cloruro	0,9	0,7	2,2
Colesterolo totale	0,7	0,5	1,6
Creatina chinasi	2,7	4,1	8,6
Creatinina	16,7	11,8	39,2
Digossina	2,2	2,8	6,4
Fosfatasi acida	3,8	3,9	10,2
Fosfatasi alcalina	15,9	8,9	35,1
Fosfato Glucosio	4,5	2,3	9,7
gamma-Glutammiltransferasi	3,4	6,4	12,0
IgA	4,0	3,1	9,7
IgG	2,2	1,95	0,5
IgM	7,4	9,1	21,3
Lattato deidrogenasi	2,2	8,4	12,0
Litio	1,9	5,0	8,1
Magnesio	2,3	8,4	12,2
Potassio	3,9	4,1	10,5
Proteine totali	3,6	4,2	10,1
Sodio	1,1	1,6	3,4
Tireotropina	2,4	1,6	5,6
Tiroxina Transferrina	1,4	1,5	3,8
Trigliceridi	0,3	0,2	0,7
Triiodotironina	8,1	8,9	22,3
Urato	3,4	4,1	9,7
Urea	2,4	2,3	6,2

Valori di riferimento

- Come i risultati di un'analisi chimico-clinica anche i valori di riferimento sono prevalentemente influenzati dalla variabilità biologica
- Risulta quindi evidente che per alcuni costituenti sarà necessario avere valori di riferimento diversi per uomo e donna, oppure in base all'età o anche tra pazienti ambulatoriali o degenti

Valori di riferimento



Distribuzione dei valori di riferimento e determinazione degli intervalli di riferimento

- Si definisce come **intervallo di riferimento** l'ampiezza dell'intervallo nella quale rientra il **95.5%** dei valori del parametro biochimico misurato sul gruppo campione di riferimento
- La distribuzione di frequenza dei valori di riferimento può presentarsi:
 1. Distribuzione approssimativamente gaussiana
 2. Distribuzione a campana asimmetrica (deviata a dx o sx)
 3. Distribuzione irregolare
- Intervalli di riferimento:
 1. $M \pm 2s$ (valori sospetti tra $\pm 2s$ e $\pm 3s$)
 2. Spesso la distribuzione è log-normale
 3. Si applica il metodo dei percentili

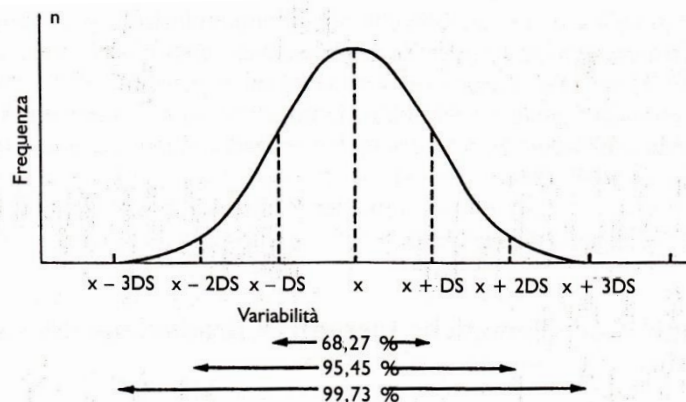


Figura 6.2 – Distribuzione di frequenza normale della variabile x ; forma teorica della curva di Gauss e indicazione dei valori di integrazione corrispondenti rispettivamente a media ± 1 deviazione standard, media ± 2 deviazioni standard, media ± 3 deviazioni standard. x = media; DS = deviazione standard.

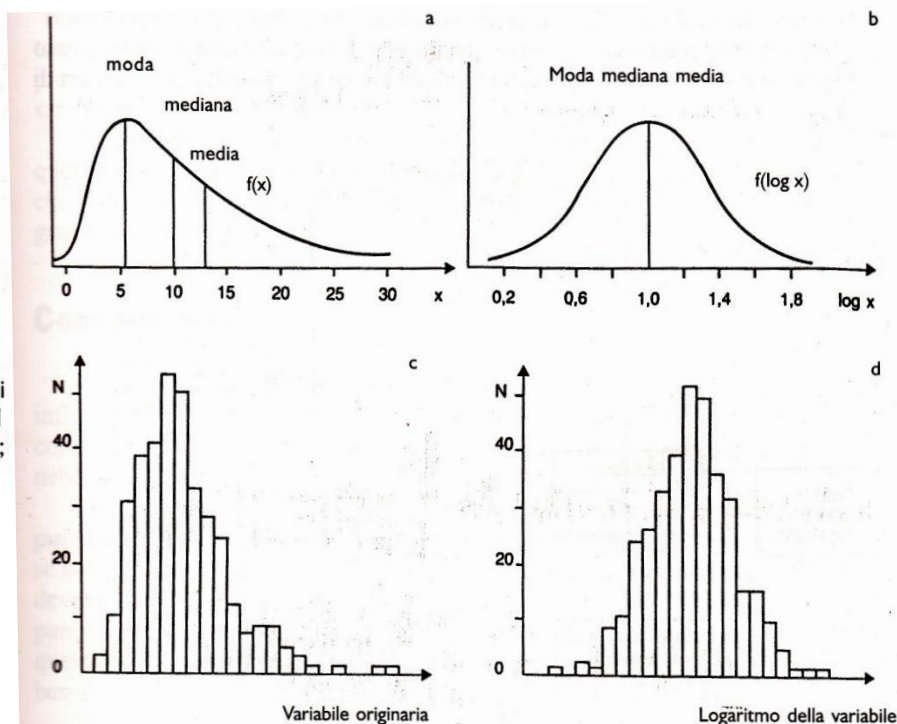
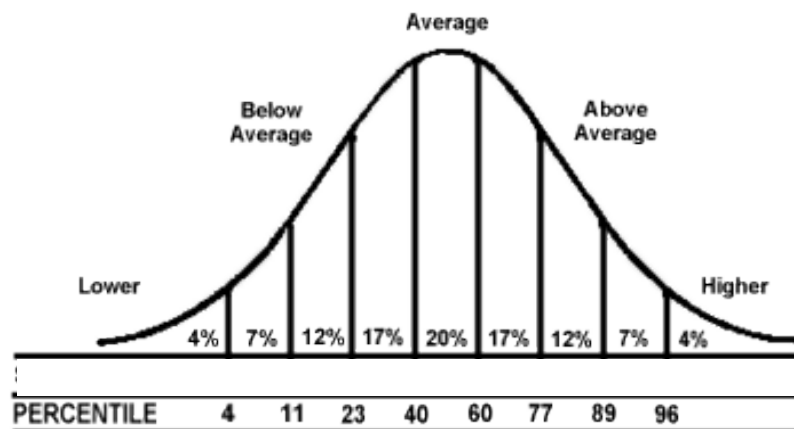
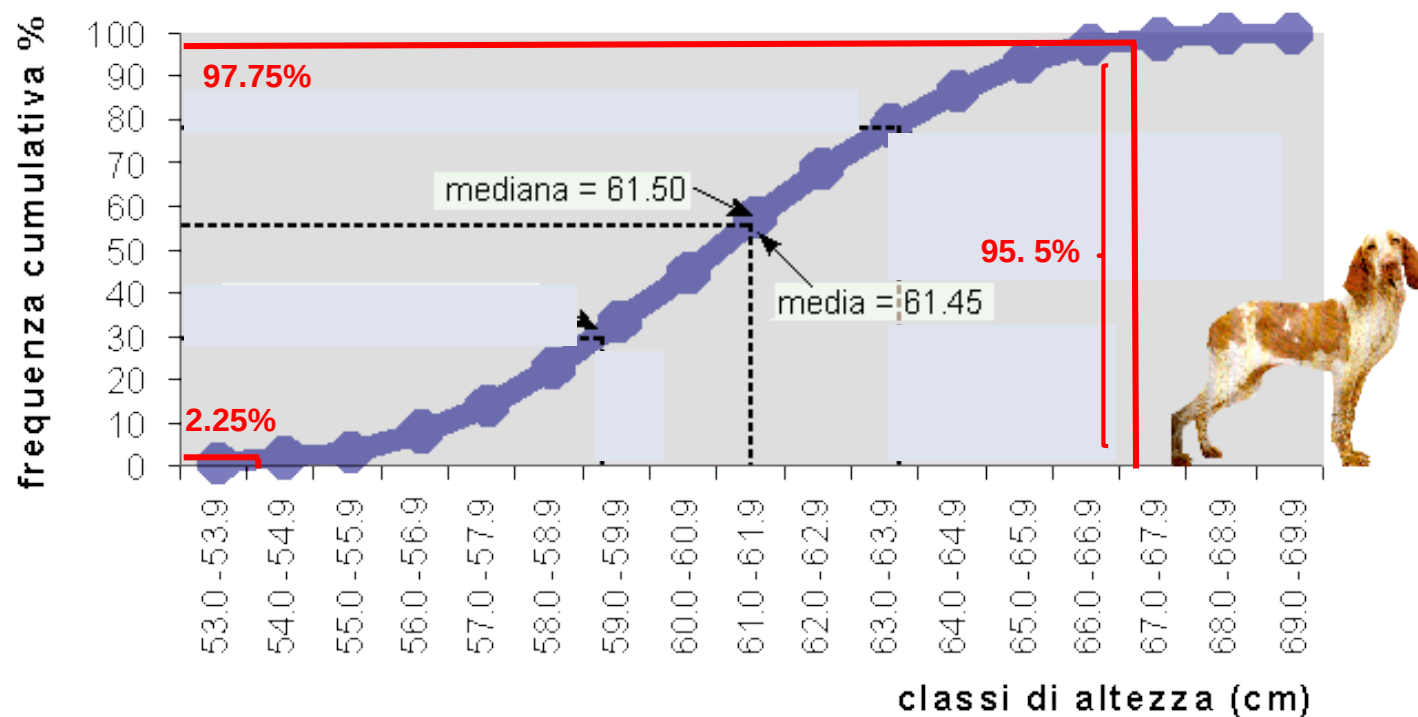
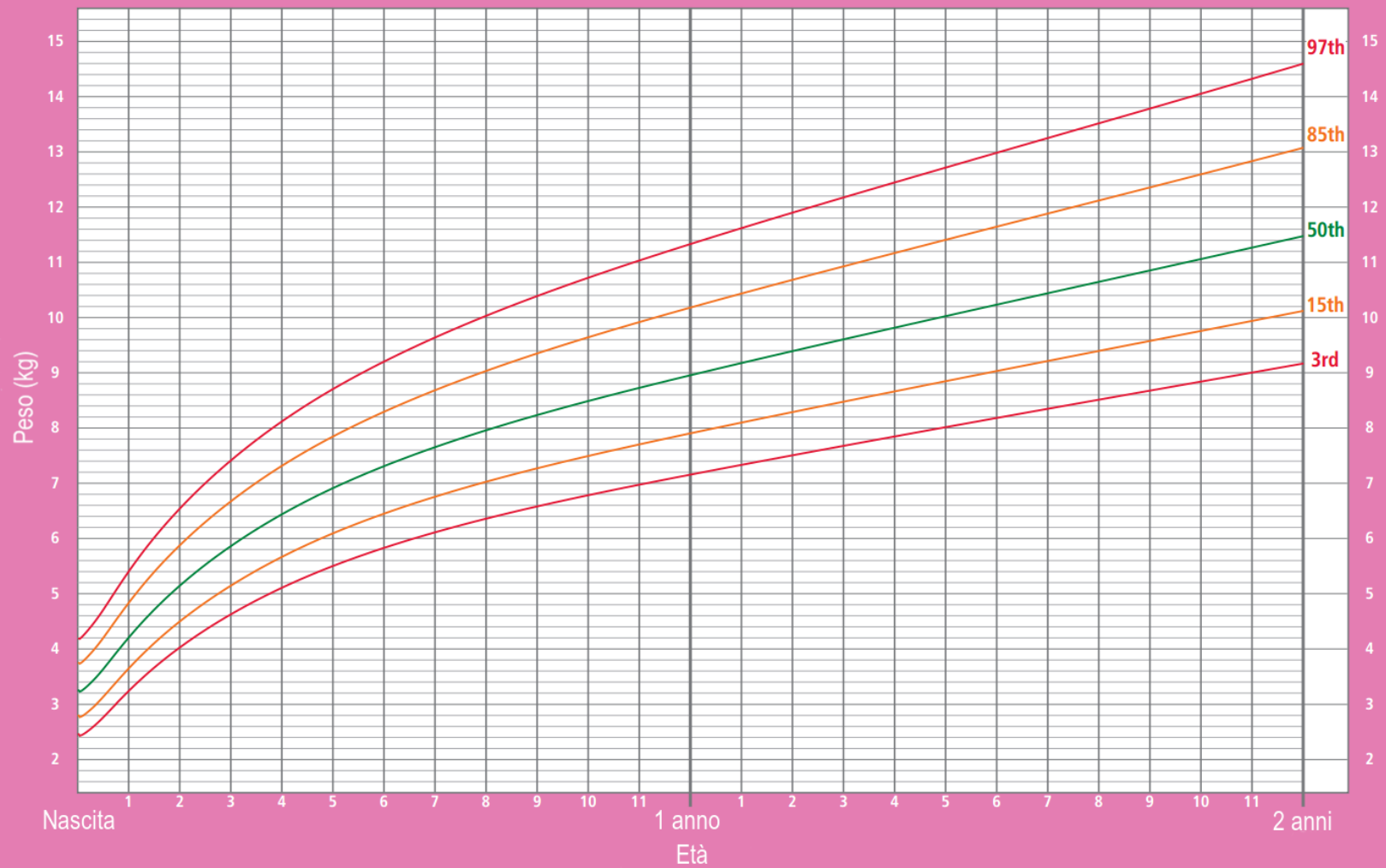


Figura 6.3 – a. Distribuzione log-gaussiana teorica; b. stessa in forma trasformata; l'ascissa logaritmica riconduce la distribuzione precedente alla forma gaussiana; c. distribuzione, sotto forma di istogramma, dei valori di un analita in una popolazione apparentemente sana (350 casi): da notare l'asimmetria positiva della distribuzione; d. la stessa distribuzione dopo trasformazione logaritmica della variabile: in questo caso la distribuzione risulta assimilabile ad una gaussiana e pertanto i valori di riferimento potranno venire calcolati utilizzando l'intervallo ottenuto dalla media ± 2 DS.

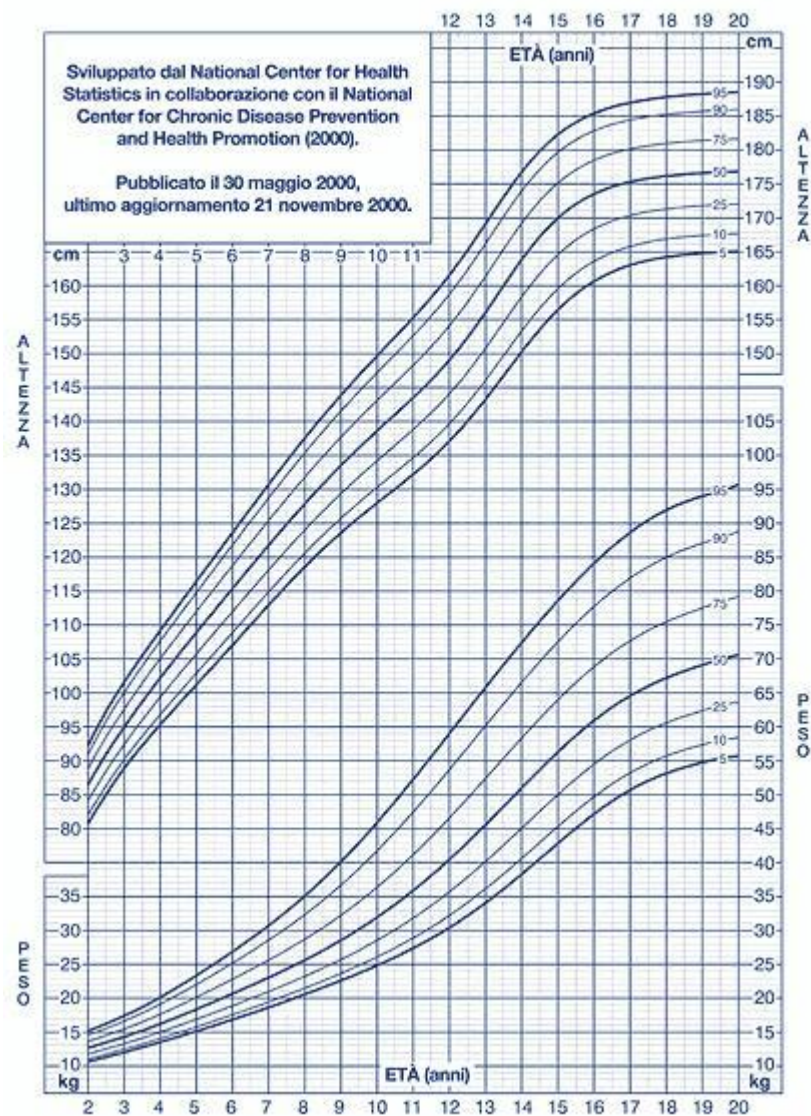
Altezza al garrese di 659 esemplari di cani *Bracco Italiano*: frequenze percentuali cumulative





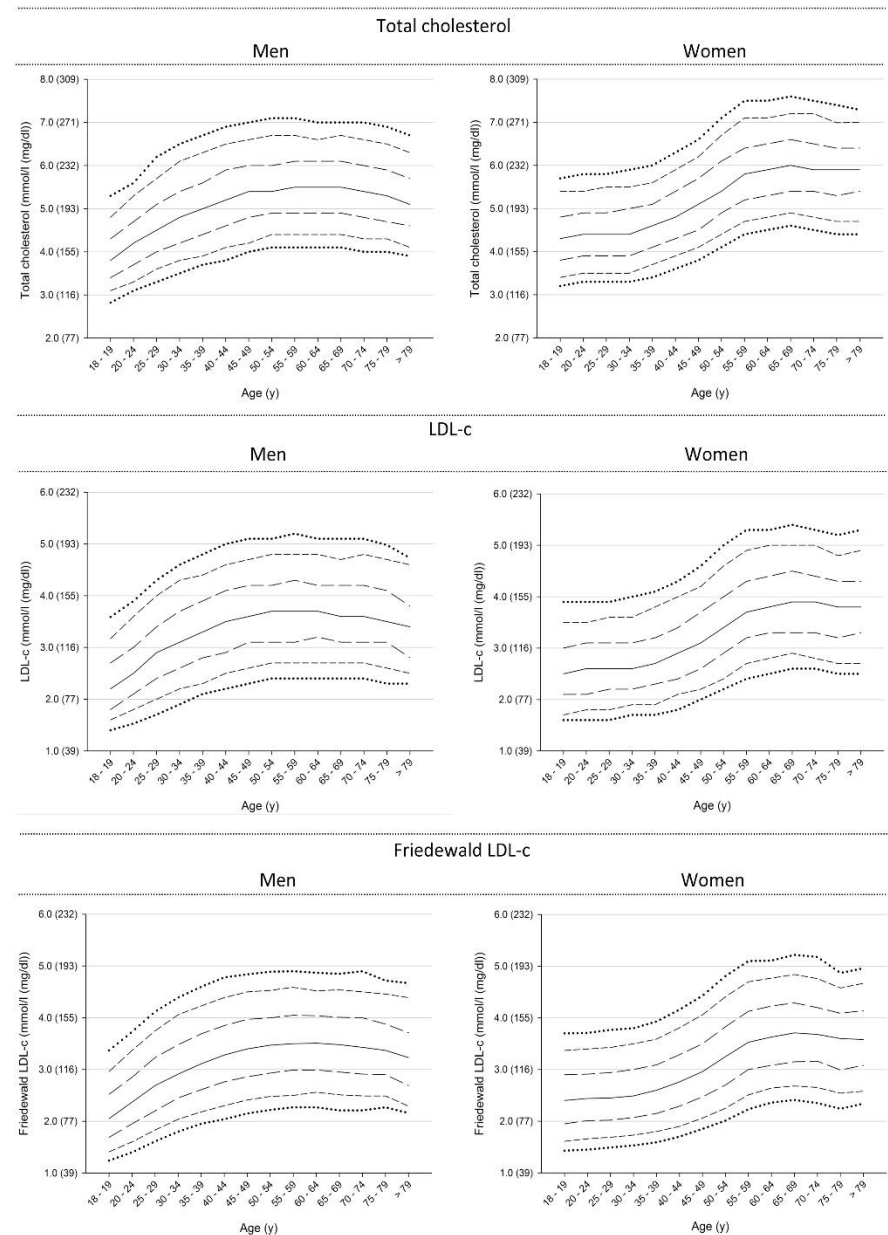
Ulteriore applicazione dei percentili

Da 2 a 20 anni: Maschi
Percentili altezza/età e peso/età

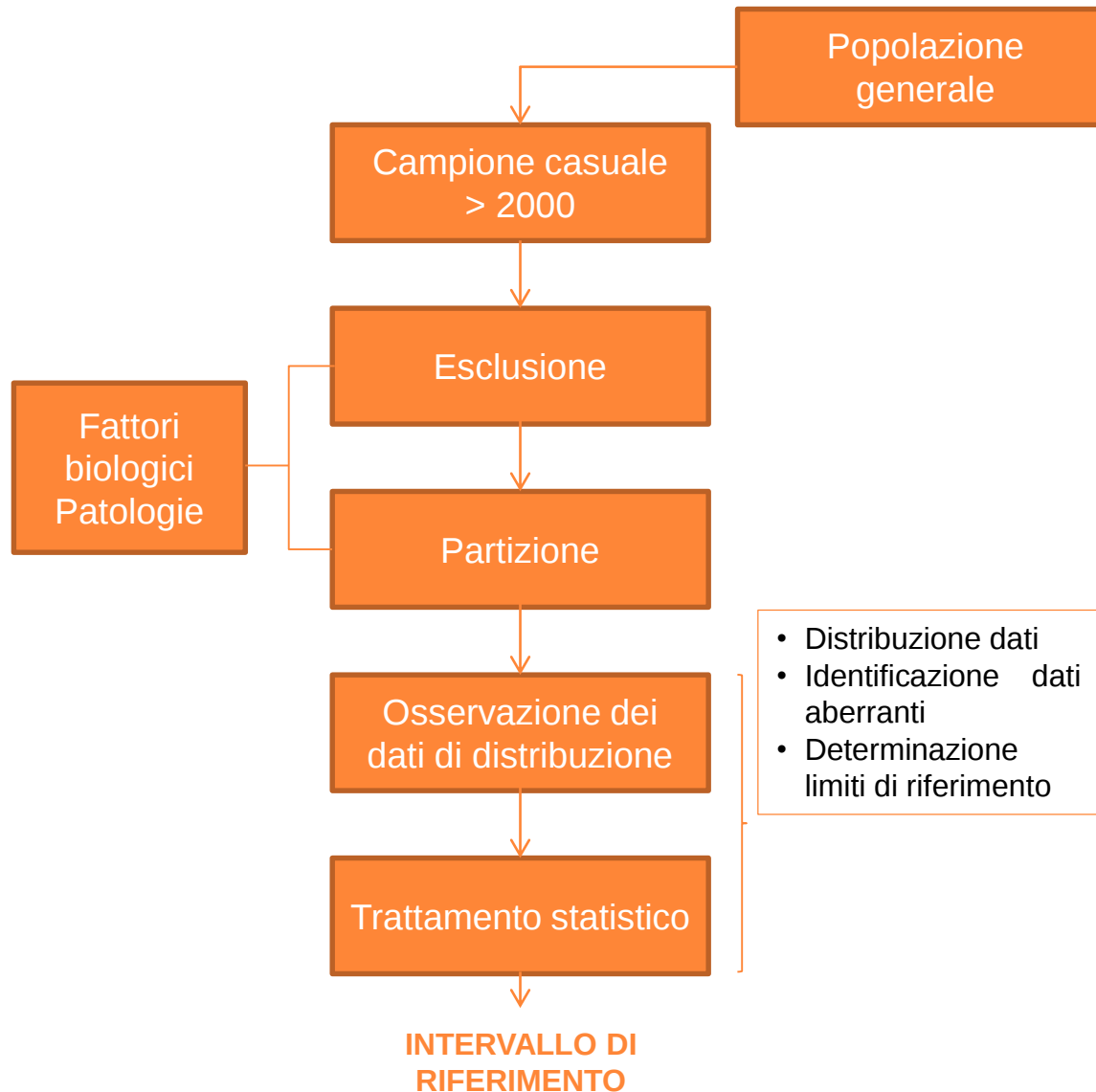


Relations between age and levels of total cholesterol, LDL-C, and calculated LDL-C in men and women. The 5th, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th and 95th age-specific percentile curves for total cholesterol, LDL-C, and calculated LDL-C (using Friedewald formula) in men (left) and women (right). LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

<https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.05.007>



Metodi di produzione dei valori di riferimento



Metodi di produzione dei valori di riferimento

Metodi diretti: analisi fatte ad hoc per la produzione dei valori

- *A priori*: criteri di esclusione applicati prima della raccolta del campione
- *A posteriori*: criteri di esclusione applicati dopo la raccolta del campione

Metodo indiretto: si usano dati già presenti in database (minor controllo variabilità analitica e preanalitica). Necessario per gruppi particolari: anziani, bambini

**General Health Questionnaire for Donors for
Verification of Reference Range Study**

ALL INFORMATION IS STRICTLY CONFIDENTIAL AND IS FOR USE WHEN
DIAGNOSING ILLNESS AMONG MEMBERS OF YOUR COMMUNITY.

Subject ID# _____ Sample ID# _____

Name: _____ Phone: _____

Contact Address: _____

Age _____ Sex: (M) (F) Race: _____

Height: _____ Weight: _____

Occupation: _____

Physician Name: _____

1.	Do you consider yourself to be healthy?	(Y)	(N)
2.	Do you exercise regularly? If yes, how often? (hours per week) _____ And degree of activity (light) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (vigorous)	(Y)	(N)
3.	Have you been sick recently? If yes, when? _____ Describe illness: _____	(Y)	(N)
4.	Are you taking any prescribed medication? If yes, what? _____	(Y)	(N)
5.	Do you have high blood pressure?	(Y)	(N)
6.	Do you take vitamin supplements or herbal remedies? If yes, what? _____	(Y)	(N)
7.	Are you exposed to any hazardous chemicals in your job? If yes, what? _____	(Y)	(N)
8.	Do you use tobacco? If yes, what form? _____ How often? _____	(Y)	(N)

9.	Do you eat a special diet? If yes, please describe: _____	(Y)	(N)
10.	Do you drink alcoholic beverages? If yes, what form? _____ How often? _____	(Y)	(N)
11.	Are you currently under a doctor's care? If yes, why? _____	(Y)	(N)
12.	Are there inherited disorders in your family? If yes, please describe: _____	(Y)	(N)
13.	Have you taken any aspirin or any pain relievers recently? If yes, what? _____ When? _____	(Y)	(N)
14.	Have you taken any cold or allergy medicine recently? If yes, what? _____ When? _____	(Y)	(N)
15.	Have you taken any antacids or stomach medicine recently? If yes, what? _____ When? _____	(Y)	(N)
16.	Are you taking diet pills?		
FOR WOMEN:			
1.	Are you still menstruating? If yes, first day of your last period? _____ If no, are you on hormone replacement therapy? _____	(Y)	(N)
2.	Are you breast-feeding?	(Y)	(N)
3.	Are you pregnant? If yes, what is your due date? _____		
4.	Are you on oral or implant contraceptives?		

Your signature below means that you voluntarily agree to participate in this research study.

Signature _____

Date _____

Differenza Critica

Quando si confrontano due risultati ottenuti in tempi diversi sullo stesso paziente contano:

- Variabilità analitica
- Variabilità biologica estrinseca da cause esogene o endogene
- Variabilità intraindividuale

DIFFERENZA CRITICA: la più piccola differenza tra due risultati consecutivi di un parametro in un singolo paziente che indica un cambiamento significativo di quel parametro (significativa al 95%).

Variabilità totale

$$dcr = 2.77s_T = 1.96\sqrt{s_{T1}^2 + s_{T2}^2}$$

Probabilità del 95% che la differenza non è dovuta ad una variabilità casuale nei risultati

$$2.77 = 1.96\sqrt{2}$$

S_{T1} è la deviazione standard della analisi 1 (somma della S_a ed S_i), mentre S_{T2} è la deviazione standard dell'analisi 2 (somma della $S_a + S_i$) per cui in realtà essendo lo stesso soggetto le due S_T sono uguali e diventa $2 \cdot S_T$



- Ogni differenza fra due valori successivi nello stesso paziente che superi la dcr, può essere attribuito con buona probabilità ad una modificazione fisiopatologica
- Conoscendo quindi variabilità analitica e biologica intraindividuale si possono calcolare le dcr, oppure esistono dei monogrammi a scala semilogaritmica in cui interpolare i dati.

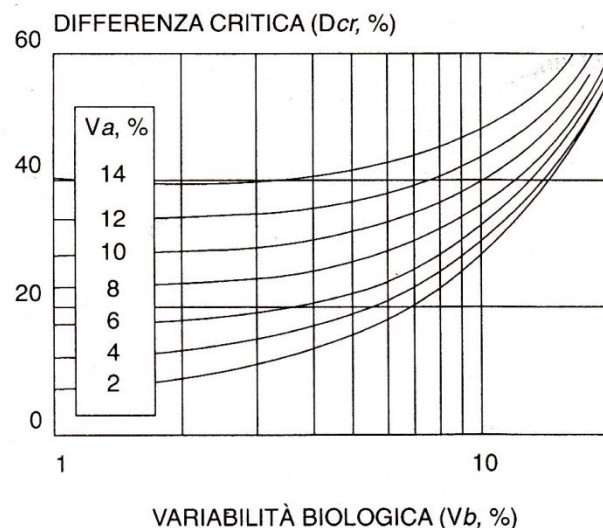


Figura 7.2 – Valori della differenza critica in funzione della variabilità biologica, per differenti valori della variabilità analitica (Va).

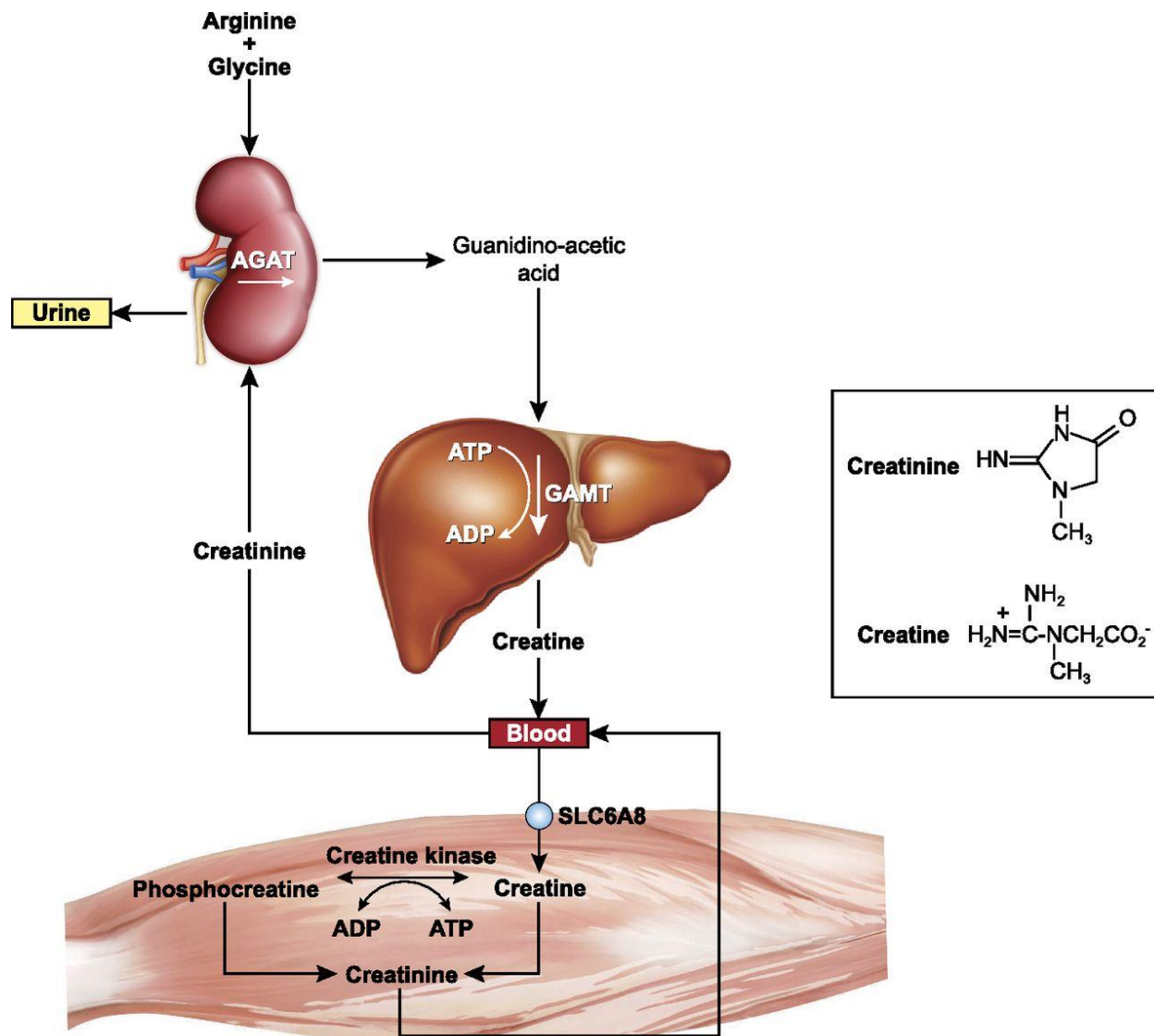
Analita	Livello	Unità	dcr	
			Variazione assoluta	%
Sodio	140	mmol/l	6	4
Potassio	4,2	mmol/l	0,6	14
Calcio (totale)	2,4	mmol/l	0,19	8
Magnesio	1,0	mmol/l	0,4	40
Fosfato	1,2	mmol/l	0,3	25
Bicarbonato	26	mmol/l	4	15
Urea	5,0	mmol/l	2,1	42
Creatinina	60	mmol/l	21	35
Acido urico	0,26	mmol/l	0,07	3
Glucosio	4,6	mmol/l	1,6	35
Bilirubina (totale)	10	mmol/l	10	100
Colesterolo	5,8	mmol/l	1,6	27
Trigliceridi	1,2	mmol/l	0,9	75
Proteine totali	75	g/l	6	8
Albumina	40	g/l	5	13
Fosfatasi alcalina	60	UI/l	22	37
Aspartato-aminotransferasi	20	UI/l	13	65
g-glutamilttransferasi	40	UI/l	40	100

Da: Fraser CG. Interpretation of Clinical Laboratory Data. Oxford:

Creatininemia

Intervallo di riferimento 60-110 mmol /L

Un aumento da 75 a 105 (variazione assoluta 30, cioè 40%) indica una riduzione di funzionalità renale anche se entro i limiti. La variazione è > alla dcr (variazione assoluta 21, cioè 35%)



Performance diagnostica di un esame

- I vari test da laboratorio hanno un'accuratezza di diagnosi diversa tra loro di cui il medico deve tenere conto quando prescrive un test
- Per descrivere la performance di un esame di laboratorio si utilizzano dei parametri che sono:
 - Prevalenza
 - Sensibilità diagnostica
 - Specificità diagnostica
 - Valore predittivo

Prevalenza

Indica il numero di individui che presentano la malattia diagnosticata dal test diviso il numero di individui da testare

Sensibilità diagnostica

È l'incidenza percentuale di risposte positive che si ottengono applicando il test ai pazienti affetti dalla patologia evidenziabile dal test stesso (positività del test)

	Malattia presente	Malattia assente
Test positivo	Veri positivi (VP)	Falsi positivi (FP)
Test negativo	Falsi negativi (FN)	Veri negativi (VN)

$$\text{sensibilità} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100 \rightarrow \text{Tutti i soggetti malati}$$

Specificità diagnostica

È l'incidenza percentuale di risposte negative che si ottengono applicando il test ai pazienti non affetti dalla patologia evidenziabile dal test stesso

	Malattia presente	Malattia assente
Test positivo	Veri positivi (VP)	Falsi positivi (FP)
Test negativo	Falsi negativi (FN)	Veri negativi (VN)

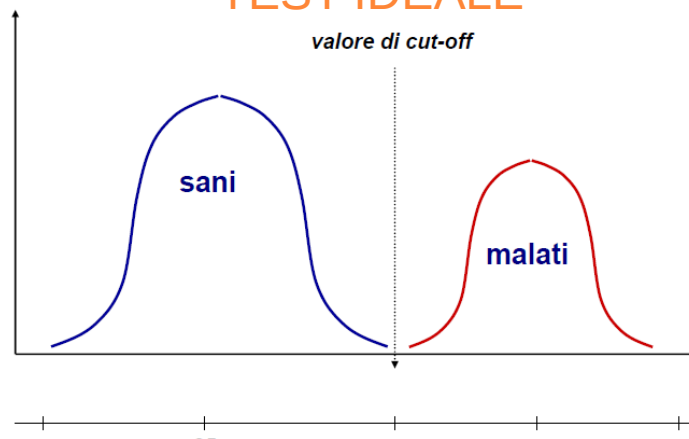
$$\text{specificità} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

→ Tutti i soggetti sani

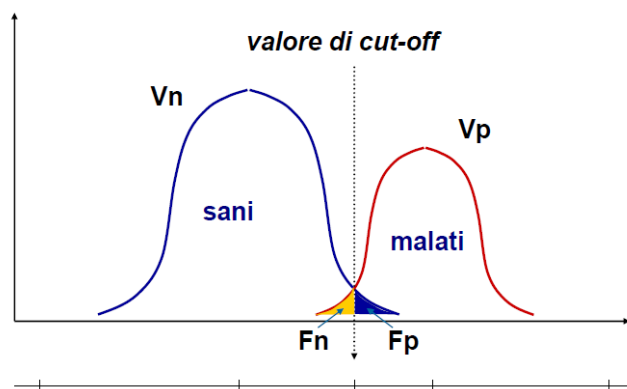
$$\text{sensibilità} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{specificità} = \frac{VN}{VN + FP}$$

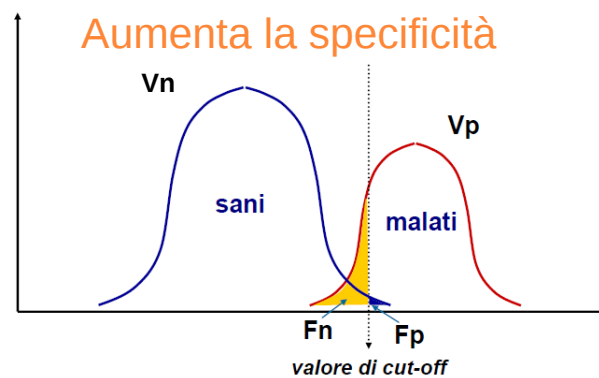
TEST IDEALE



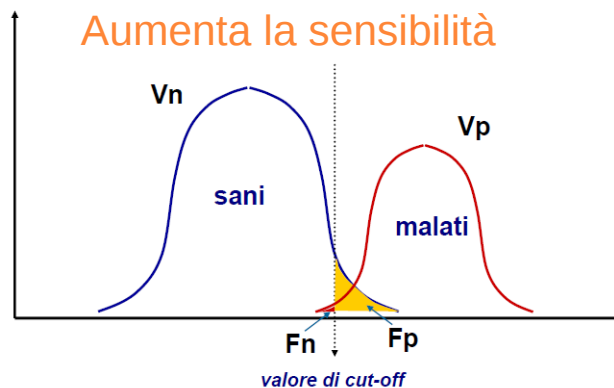
TEST REALE



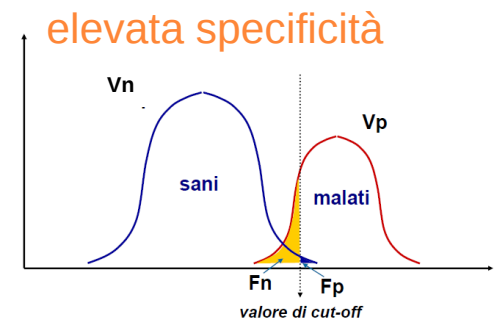
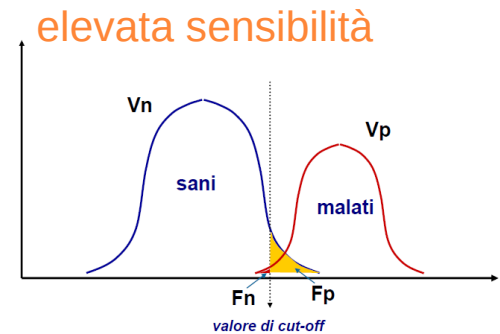
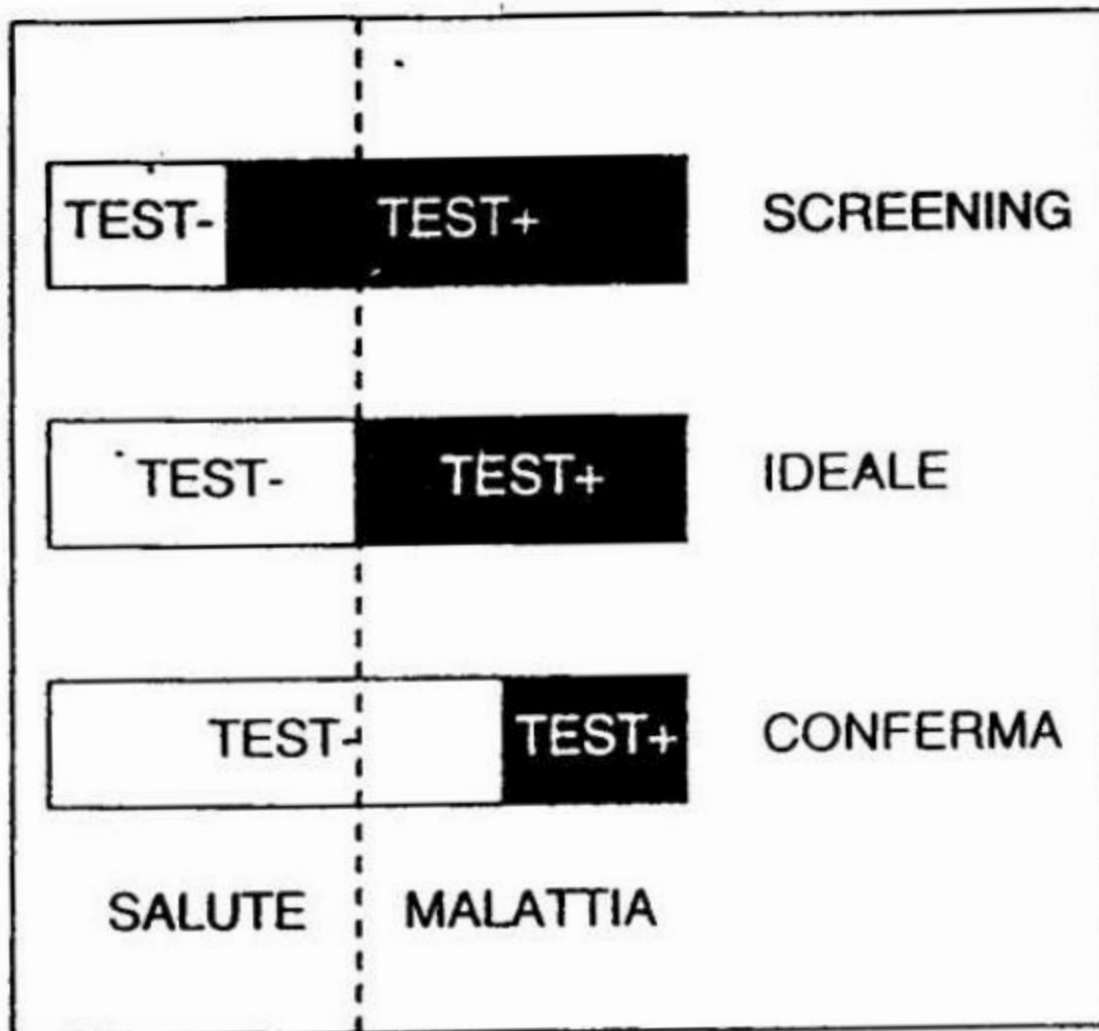
Aumenta la specificità



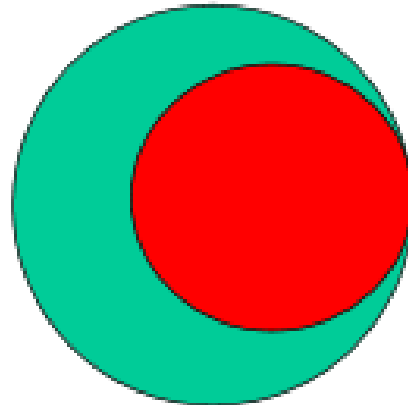
Aumenta la sensibilità



Disporre di test a diversa sensibilità e specificità ne permette un uso differenziato in base allo scopo del test

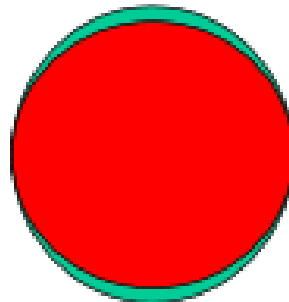


Test +



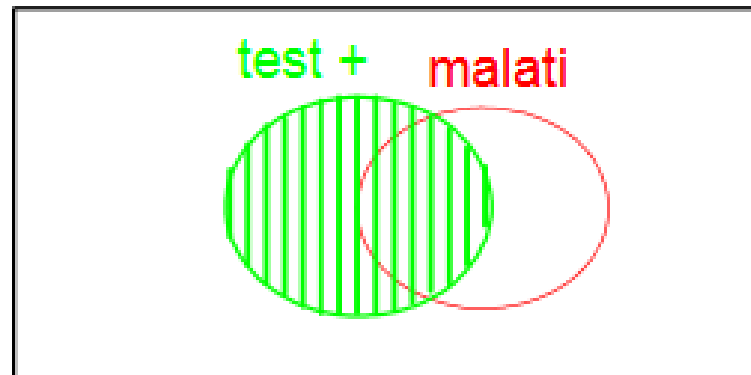
**Malattia
infettiva**

Screening:
Eliminazione dei FN
ALTA sensibilità

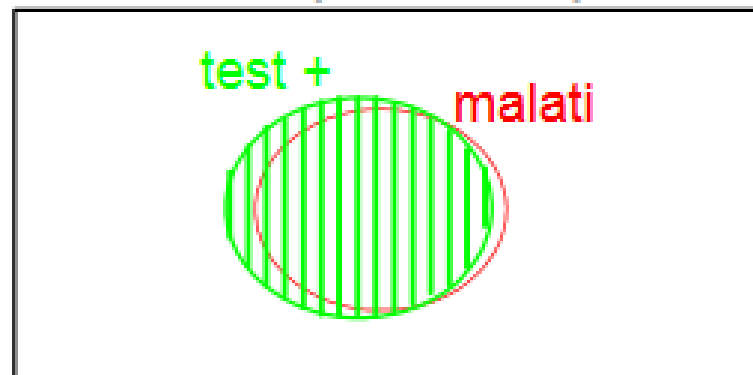


Conferma per
eliminare i FP

sangue occulto nelle feci



colonscopia + biopsia



Valore predittivo

È il dato più importante in quanto combina la prevalenza della malattia nella popolazione con la sensibilità e la specificità del test.

Valore predittivo positivo (VPP): indica la probabilità che il soggetto abbia la malattia quando il test risulta positivo

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

Valore predittivo negativo: indica la probabilità che il soggetto sia sano quando il test risulta negativo

$$\text{VNP} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}}$$

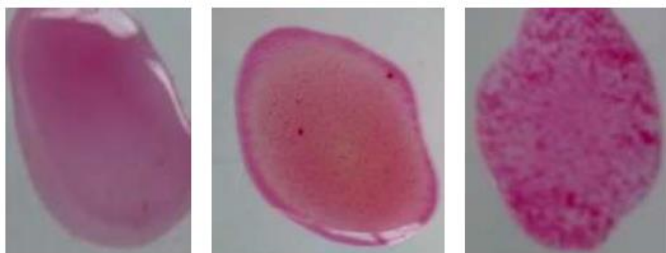


Figure 1. Rose Bengal plate test showing agglutinations. From left No agglutination, Moderate agglutinations, Strong agglutinations.

Rosa bengala test (Brucellosi)

con $Se=0.620$ e $Sp=0.995$

Area 1 $p = 0.1(10\%)$

	M+	M-
T+	1860	135
T-	1140	26865

Tot=3000 Tot=27000 → Tot=30000

$$VPP = \frac{1860}{(1860 + 135)} = 0.932$$

Area 2 $p = 0.01 (1\%)$

	M+	M-
T+	186	149
T-	114	29552

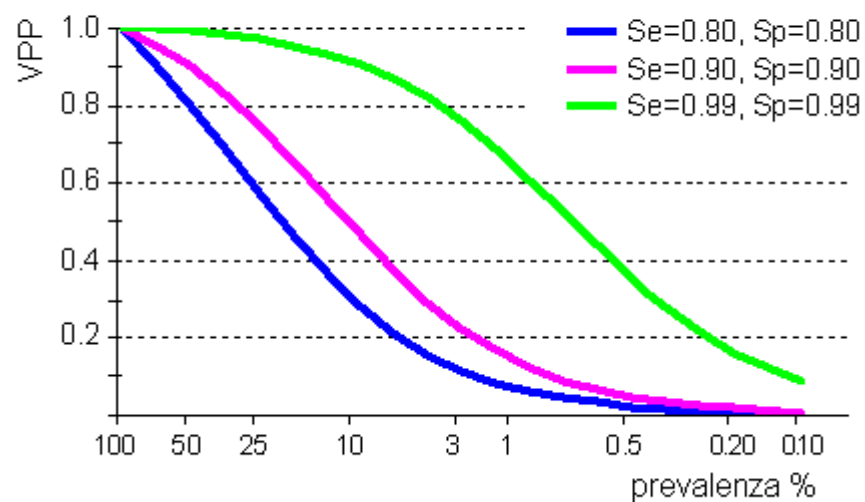
$$VPP = \frac{186}{(186 + 149)} = 0.556$$

Area 3 $p = 0.001 (0.1\%)$

	M+	M-
T+	19	150
T-	11	2890

$$VPP = \frac{19}{(19 + 150)} = 0.110$$

Valore predittivo positivo (VPP) in rapporto alla sensibilità e specificità del test ed alla prevalenza della malattia



Livelli decisionali

- Valori particolari di un dato parametro che il medico, in base a conoscenze fisiopatologiche e cliniche, reputa decisionali dal punto di vista diagnostico/terapeutico (non coincidono necessariamente con i valori di riferimento)

Calcemia

Intervallo di riferimento: 9-10.6 mg/dL

1° livello decisionale: 7mg/dL, rischio di tetania ipocalcémica

2° livello decisionale: 11mg/dL, limite inferiore del *range* di valori riscontrabili con l'**iper**paratiroidismo

3° livello decisionale: 13.5 mg/dL, livello inferiore compatibile con coma ipercalcémico

REFERTAZIONE

Refertazione

Deve contenere indicazioni precise relative a:

1. Sistema (nome e cognome del paziente)
2. Sottosistema, il materiale sottoposto all'analisi

Espettorato	Ex
Eritrociti	Er
Feci	F
Leucociti	Lc
Liquor	LCR
Plasma	P
Piastrine	Pr
Sangue	Sg arterioso (a); venoso (v); capillare (c)
Siero	S
Urine	U 24 ore (d)

3. Componente, indicato con denominazione non equivoca, normalizzata (colesterolo, glucosio, urea, ecc.)

4. Unità di misura espressa:

- Concentrazione di massa
- Concentrazione di sostanza
- Attività
- Scale di rapporto (enzimi)

Nome dell'analisi	Abbreviazione (v. nota 2)	Unità proposta (v. nota 3)
U-N-ACETIL-beta-D-GLUCOSAMINIDASI	NAG	U/L
S-ALANINA AMMINOTRANSFERASI	ALT	U/L
S-ALDOLASI	ALS	U/L
S-alfa-AMILASI	AMY	U/L
U-alfa-AMILASI	AMY	U/L
S-ASPARTATO AMMINOTRANSFERASI	AST	U/L
F-CHIMOTRIPSINA	CHY	kU/kg
S-COLINESTERASI	CHE	kU/L
S-COLINESTERASI, actrel, in presenza di dibucaina (metodo... e condizioni)	CHE	1
S-CREATINA CHINASI	CPK	U/L
S-FOSFATASI ACIDA	ACP	U/L
S-FOSFATASI ACIDA PROSTATICA	PAP	U/L
S-FOSFATASI ALCALINA	ALP	U/L
U-alfa-GLUCOSIDASI	AGS	U/L
S-GLUCOSIO-FOSFATO ISOMERASI	GPI	U/L
S-GLUTAMMATO DEIDROGENASI	GLD	U/L
S-gamma-GLUTAMMILTRANSFERASI	GGT	U/L
S-IDROSSIBUTIRRATO DEIDROGENASI	HBD	U/L
S-LATTATO DEIDROGENASI	LAD	U/L
S-LEUCINAMMINO PEPTIDASI	LAP	U/L
S-LIPASI	TGL	U/L
S-MURAMIDASI	MUR	mg/L
U-URAMIDASI	MUR	mg/L
S-5-NUCLEOTIDASI	NTD	U/L
S-ORNITINA CARBAMILTRANSFERASI	OCT	U/L
S-SORBITOLO DEIDROGENASI	SOD	U/L

Sottosistema- componente	Unità tradizionali					
	Unità S.I. (nuove)		Unità tradizionali (vecchie)		Fattori di conversione	
	Valore numerico	Unità	Valore numerico	Unità	Nuove → vecchie	Vecchie → nuove
S Bilirubina totale	18,0	mmol/L	1,05	mg/dL	0,0585	17,1
S Calcio totale (Ca)	2,39	mmol/L	9,55	mg/dL	4,00	0,250
P Cloruro (Cl)	105	mmol/L	105	mEq/L	1	1
dU Cloruro (Cl)	155	mmol/L	155	mEq/24 h	1	1
S Colesterolo HDL	1,42	mmol/L	55	mg/dL	38,6	0,0259
S Colesterolo totale	4,79	mmol/L	185	mg/dL	38,6	0,0259
dU Coproporfirine	229	mmol/L	150	mg/24 h	0,655	1,527
S Creatinina	84	mmol/L	0,95	mg/dl	0,0113	88,4
dU Creatinina	12,8	mmol/L	1,45	g/24 h	0,113	8,84
Sg Emoglobina	155	g/L	15,5	g/dL	0,1	10
Sg Eritrociti S	4,85	10 ¹² /L	4,85	mil/mm ³	1	1
S Ferro legato alla transferrina (Fe)	22,4	mmol/L	125	mg/dL	5,58	0,179
P Fibrinogeno (340.000)	10,3	mmol/L	350	mg/dL	34,01	0,0294
P Fosfato Inorganico (P)	1,45	mmol/L	4,50	mg/dL	3,10	0,323
dU Fosfato (P)	11,3	mmol/L	350	mg/dL	30,96	0,0323
P Glucosio	5,27	mmol/L	95	mg/dl	18,02	0,0555
Sg Piombo totale (Pb)	1,45	mmol/L	18,9	mg/dL	20,72	0,04826
P Potassio (K)	4,5	mmol/L	4,5	mEq/L	1	1
dU Potassio (K)	55	mmol/L	55	mEq/24 h	1	1
S Proteine	72,5	g/L	7,25	g/dL	0,1	10
U Proteine	1,5	g/L	1,5	g/L	1	1
dU Proteine	1,5	g	1,5	g/24 h	1	1
R Rame totale (Cu)	15,7	mmol/L	100	mg/dL	6,36	0,157
P Sodio (Na)	145	mmol/L	145	mEq/L	1	1
S Tiroxina (T, 776,9)	135	mmol/L	10,5	mgdl	12,87	0,0777
S Transferrina (74.000)	33,8	mmol/L	250	mg/dL	7,41	0,135
S Trigliceridi (Trioleina 885,4)	1,07	mmol/L	95	mg/dL	88,5	0,0113
S Urato	327	mmol/L	5,5	mg/dL	0,0168	59,5
dU Urato	3,87	mmol	0,650	g/24 h	0,168	5,95
P Urea	5,8	mmol/L	35	mg/dL	6,02	0,166
dU Urea	166	mmol	10	g/24 h	0,0602	16,6
dU Uroporfirine (830,9)	18	mmol/L	15	mg/24 h	0,831	1.203

5. Valore numerico del risultato, cifre adeguate alla sensibilità e precisione del metodo. Arrotondamenti.
6. Intervallo di riferimento. Per sesso, età e in caso anche con la specificazione temporale.

Altre segnalazioni utili nel referto:

- Evidenziazione immediata dei risultati analitici fuori dall'intervallo di riferimento
- Rappresentazione grafica di valori analitici dello stesso paziente in tempi diversi per prove funzionali
- Informazioni utili per la diagnosi statistica (devono essere note le distribuzioni dei dati nelle varie malattie e la prevalenza delle medesime nella popolazione studiata) con suggerimenti di test per una diagnosi differenziale

N. codice	Sistema-COMPONENTE (a), grandezza misurata (precisazioni)	Valore numerico	Unità	Intervallo di riferimento
	EMOGASANALISI e pH:			
	aSg-DIOSSIDO DI CARBONIO, pspar (gas eql. 37 °C - metodo ...)		kPa	4,5 ÷ 6,1
	aSg-OSSIGENO (O ₂), pspar (gas eql. 37 °C - metodo ...)		kPa	11,3 ÷ 14,0
	(aSg) P-IDROGENO (H ⁺), pH (condizioni e metodo)		1	7,35 ÷ 7,45
	URINA			
	(Esame chimico fisico e microscopico)			
	U-ASPETTO, arb.			
	U-COLORE, arb.			
	U-REAZIONE (pH), arb.			
	U-DENSITÀ RELATIVA, dnrel. (U 20 °C/H ₂ O 20 °C)		1	1.005 ÷ 1.030
	U-BILIRUBINA, arb. (unità ...)		arb.	—
	U-CHETONI, arb. (unità ...)		arb.	—
	U-EMOGLOBINA, arb. (unità ...)		arb.	—
	U-GLUCOSIO, arb. (unità ...)		arb.	—
	U-GLUCOSIO, est. (metodo ...)		mmol/L	<0.5
	U-PROTEINE, arb. (metodo ...)		arb.	—
	U-UROBILINOGENO, arb. (unità ...)		arb.	—
	U-SEDIMENTO:			
	(U) Sed-CELLULE EPITELIALI, arb. (unità ...)		arb.	—
	(U) Sed-CILINDRI, arb. (unità ...)		arb.	—
	(U) Sed-CRISTALLI, arb. (unità ...)		arb.	—
	FOSFATO			—
	OSSALATO ecc.			—
	(U) Sed-ERITROCITI, arb. (unità ...)		arb.	—
	(U) Sed-LEUCOCITI, arb. (unità ...)		arb.	—
	(U) Sed-MUCO, arb. (unità ...)		arb.	—



OSPEDALE FVG

DIPARTIMENTO SERVIZI DIAGNOSTICI
U.O. LABORATORIO DI ANALISI CHIMICO-CLINICHE

Indirizzo
Telefono, fax, mail
Direttore: Tizio

Cognome e Nome: **FAC SIMILE - REFERTO**
Data di Nascita: 01/04/1980 Sesso: **M**
Luogo di nascita:
Codice fiscale:
Indirizzo:
Richiedente: **POLIAMBULATORIO CAIO**
Diuresi dichiarata nelle 24 ore : 1000 mL

Data prelievo: **21/06/2012**
Codice Prelievo: **000/0011**
Data Referto: **12/06/2012**

Determinazione	Risultato	Unità	Limiti di riferimento
METABOLITI SIERICI E URINARI			
P-Lattato	1,00	mmol/L	0,62 - 2,35
P-Ammonio	80	µg/dL	25 - 94
S-Bilirubina totale	1,80	mg/dL	Fino a 1,20
S-Bilirubina esterificata	0,40	mg/dL	Fino a 0,30
S-Bilirubina non esterificata	1,40	mg/dL	Fino a 0,90
S-Urato	3,0	mg/dL	Maschi: 2,5 - 7,0 Femmine: 2,4 - 5,7
U-Urato	60	mg/dL	15 - 80 nelle 24 ore: 250 - 900 mg
S-Urea	20	mg/dL	10 - 50
U-Urea	2000	mg/dL	1000 - 3500 nelle 24 ore: 10 - 35 g
S-Creatinina	1,00	mg/dL	Adulti M: 0,70 - 1,20 F: 0,60 - 0,95 Bambini: <1 anno: 0,15 - 0,40 1-3 anni: 0,20 - 0,35 3-7 anni: 0,25 - 0,45 7-11 anni: 0,35 - 0,60 >11 anni: 0,45 - 0,75 Neonati: 0,30 - 0,90
U-Creatinina	70	mg/dL	60 - 180 nelle 24 ore: 600 - 2000 mg

Plausibilità del referto

- Concordanza tra più dati analitici per quanto riguarda una eventuale condizione fisiopatologica o un certo sospetto diagnostico:
 - Risultato numerico inatteso ma possibile
 - Risultato inatteso e incompatibile con la sopravvivenza del paziente

In tal caso vanno vagliati possibili cause di errore preanalitico e poi va contattato il medico curante.