

# 4. LE AUTOANALISI IN FARMACIA

---

## La farmacia dei servizi

([http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=3609&area=farmaci&menu=dfarm](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3609&area=farmaci&menu=dfarm))

Il D.lgs 153/09 esplicita e amplia i servizi svolti dalle farmacie e qui rientrano anche le prestazioni analitiche di prima istanza, che come specificato nel decreto del 16 Dicembre 2010 sono:

«Test che in via ordinaria sono gestibili direttamente dai pazienti in funzione di autocontrollo a domicilio ovvero in caso di condizioni di fragilità o di non completa autosufficienza, possono essere utilizzati mediante il supporto di un operatore sanitario, presso le farmacie territoriali pubbliche e private.»

Quindi non apparecchi che prevedano il prelievo di sangue mediante siringhe.

# La farmacia dei servizi

([http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=3609&area=farmaci&menu=dfarm](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3609&area=farmaci&menu=dfarm))

## Prestazioni analitiche di prima istanza:

- Test per glicemia, colesterolo, trigliceridi
- Test per la misurazione in tempo reale dell'emoglobina, emoglobina glicata, creatinina, transaminasi, ematocrito
- Test per la misurazione dei componenti delle urine (acido ascorbico, chetoni, urobilinogeno e bilirubina, leucociti, nitriti, pH, sangue, proteine ed esterasi leucocitaria)
- Test ovulazione, gravidanza, menopausa
- Test colon-retto per la rilevazione del sangue occulto delle feci

# La farmacia dei servizi

([http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=3609&area=farmaci&menu=dfarm](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3609&area=farmaci&menu=dfarm))

## Servizi di secondo livello erogabili con dispositivi strumentali

Sono utilizzabili in farmacia i seguenti dispositivi strumentali:

- dispositivi per la misurazione con modalità non invasiva della pressione arteriosa;
- dispositivi per la misurazione della capacità polmonare tramite auto - spirometria;
- dispositivi per la misurazione con modalità non invasiva della saturazione percentuale dell'ossigeno;
- dispositivi per il monitoraggio con modalità non invasive della pressione arteriosa e dell'attività cardiaca in collegamento funzionale con i centri di cardiologia accreditati dalle Regioni sulla base di specifici requisiti tecnici, professionali e strutturali;
- dispositivi per consentire l'effettuazione di elettrocardiogrammi con modalità di tele cardiologia da effettuarsi in collegamento con centri di cardiologia accreditati dalle Regioni sulla base di specifici requisiti tecnici, professionali e strutturali.

- Per l'effettuazione delle prestazioni e l'assistenza ai pazienti devono essere utilizzati spazi dedicati e separati dagli altri ambienti.
- Il farmacista ha inoltre l'obbligo di esporre nei locali della farmacia, in modo chiaro e leggibile, l'indicazione delle tipologie di prestazioni analitiche disponibili agli utenti.
- Le apparecchiature devono essere verificate e calibrate periodicamente, al fine di poterne garantire l'affidabilità, l'efficienza e la sicurezza di funzionamento.
- Per garantire l'affidabilità dei risultati analitici, inoltre, il personale addetto all'impiego delle apparecchiature, o al supporto ed eventuale assistenza al paziente che fruisce di tali servizi, deve essere adeguatamente formato ed aggiornato.
- I rifiuti generati dall'esecuzione dei test di autoanalisi eseguiti in farmacia sono qualificati come rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo e, come tali, devono seguire i seguenti adempimenti

# POINT OF CARE TESTING (PoCT)

Analisi medica svolta in prossimità del sito di cura ed assistenza del paziente, deve avere le seguenti caratteristiche:

- **Affordable** – economico
- **Sensitive** – minimi falsi negativi
- **Specific** – minimi falsi positivi
- **User-friendly** – minimi passaggi per effettuare il test
- **Rapid** – minimo tempo per test
- **Equipment-free** –attrezzatura semplice
- **Delivered** – consegna dei risultati

# PoCT in farmacia

Strumenti che lavorano per spettroscopia a riflettanza (dry chemistry)

- Refletron Roche
- Cholestech LDX
- Samsung LABGEO PTS10 ??

Strumenti che lavorano per spettroscopia UV-VIS (fase liquida)

Strumenti basati su centrifugazione e microfluidica:

- Cobas b 101: profilo lipidico completo (colesterolo, trigliceridi, HDL, LDL → determinazione enzimatica/UV-VIS) ed emoglobina glicata (HbA1c → immunochimica/UV-VIS)



# Reflotron (Roche)

Spettroscopia a riflettanza



Informazioni nella barra magnetica:

- Parametro da analizzare
- Tempo di preincubazione e durata della fase di reazione
- Lunghezza d'onda da utilizzare
- Numero di misurazioni e intervalli
- Istruzioni per il calcolo dei risultati
- Fattori di conversione delle unità di misura
- Altri controlli

Campione 30  $\mu$ L





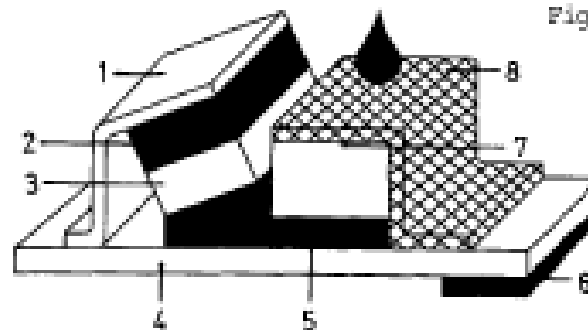
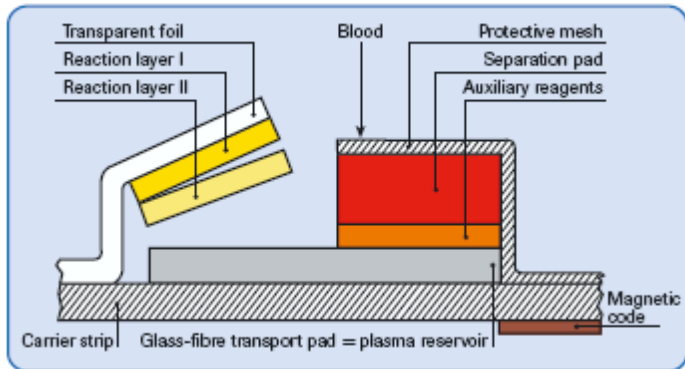
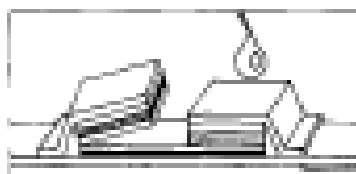


Fig. 2: Basic construction principle of reagent carrier

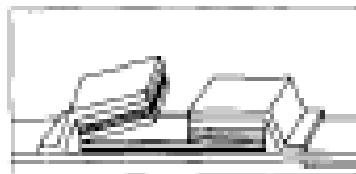
- 1 transparent protective layer
- 2 Indicator layer
- 3 Reagent layer
- 4 Support
- 5 Plasma reservoir
- 6 Magnetic tape
- 7 Plasma separation layer
- 8 Protective layer

ci sono delle fibre che permettono solo al plasma di diffondere nelle zone reattive.

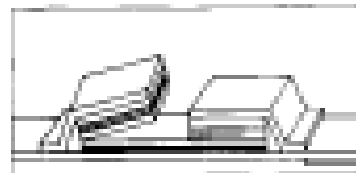
How the test proceeds:



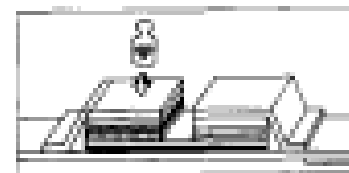
- Apply blood sample



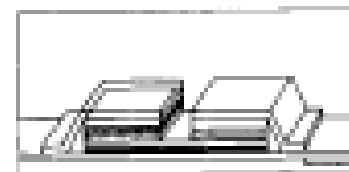
- Blood penetrates separation zone and plasma diffuses into reservoir



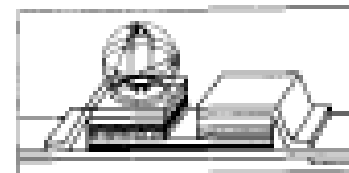
- Ready for reaction to start



- Reaction started by downward pressure pushing reaction zone into plasma reservoir



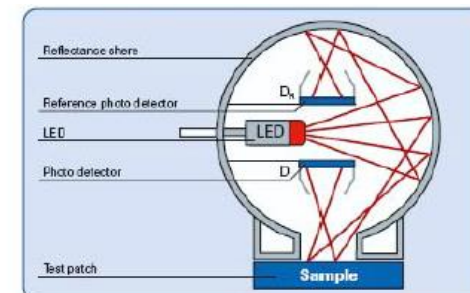
- Reaction product diffuses into indicator zone producing indicator colour



- Colour intensity is measured by optical system

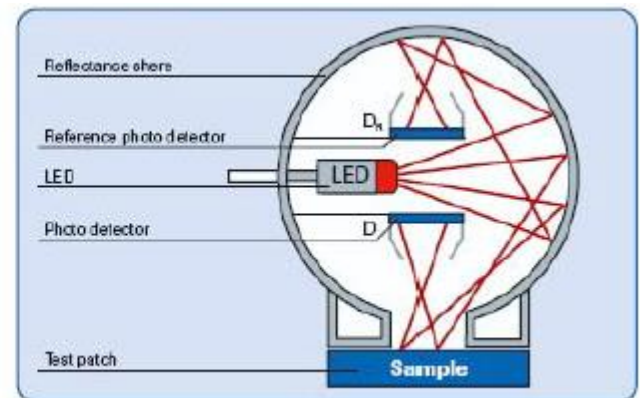


Figure 5 Schematic diagram of the Ulbricht's sphere

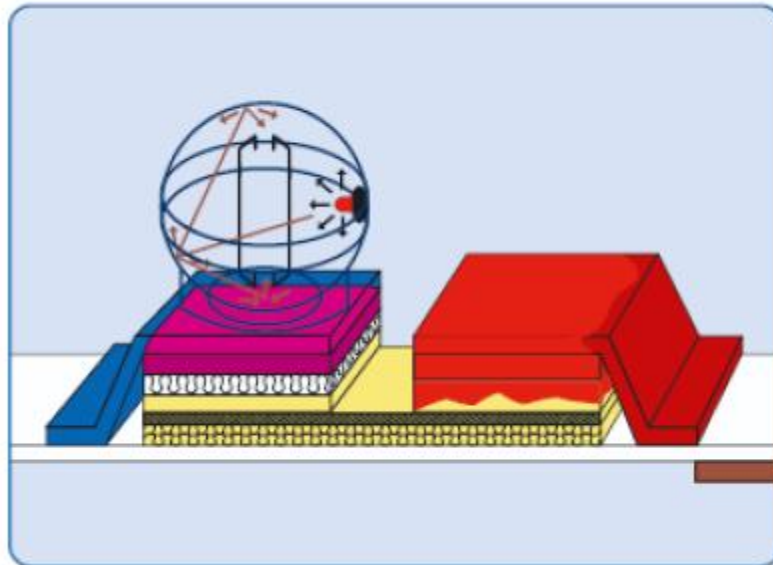


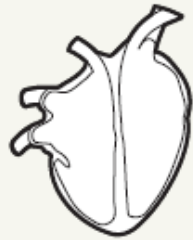


**Figure 5**  
Schematic diagram of the  
Ulbricht's sphere



**Figure 7**  
Measurement -  
schematic





### Muscle diseases

- CK

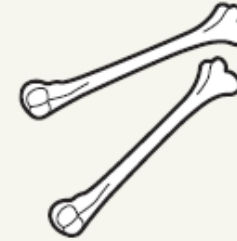


### Pancreatitis

- Pancr. amylase
- Amylase

### Diabetes

- Glucose
- Triglycerides
- HDL cholesterol
- Creatinine



### Bone diseases

- Alk. phosphatase



### Lipid metabolism disorders

- Cholesterol
- Triglycerides
- HDL cholesterol
- Glucose
- LDL cholesterol (calculated using the Friedwald equation)



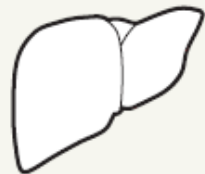
### Renal diseases

- Urea
- Creatinine
- Hemoglobin
- Uric acid
- K<sup>+</sup>



### Anemia

- Hemoglobin
- Bilirubin



### Liver diseases

- GOT, GPT, GGT
- Bilirubin
- Alk. phosphatase



### Gout

- Uric acid
- Urea
- Creatinine
- Glucose
- Cholesterol
- Triglycerides

Tutti di natura enzimatica

Test	Test principle	Wavelength
<b>Glucose</b>	$\beta\text{-D-glucose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{glucose oxidase}} \text{D-gluconolactone} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + \text{indicator} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{blue-green dye} + 2 \text{H}_2\text{O}$ <p>Indicator: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</p>	642 nm
<b>Cholesterol</b>	$\text{cholesterol ester} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{cholesterol esterase}} \text{cholesterol} + \text{RCOOH}$ $\text{cholesterol} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{cholesterol oxidase}} \text{cholestenone} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{indicator} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{dye} + \text{H}_2\text{O}$ <p>Indicator: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</p>	642 nm
<b>HDL cholesterol</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Precipitation of chylomicrons, VLDL and LDL with dextran sulphate/Mg<sup>2+</sup></li> <li>2. Determination of HDL cholesterol</li> </ol> $\text{cholesterol ester} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{cholesterol esterase}} \text{cholesterol} + \text{RCOOH}$ $\text{cholesterol} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{cholesterol oxidase}} \text{cholestenone} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{indicator} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{dye} + \text{H}_2\text{O}$ <p>Indicator: 4-(4-dimethylaminophenyl)-5-methyl-2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)imidazole dihydrochloride</p>	642 nm

Test	Test principle	Wavelength
<b>Triglycerides</b>	$\text{triglycerides} + 3 \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{esterase}} \text{glycerol} + 3 \text{RCOOH}$ $\text{glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{glycerol kinase}} \text{glycerol-3-phosphate} + \text{ADP}$ $\text{glycerol-3-phosphate} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{glycerol phosphate oxidase}} \text{dihydroxyacetone phosphate} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{indicator} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{dye} + \text{H}_2\text{O}$ <p>Indicator: 4-(4-dimethylaminophenyl)-5-methyl-2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)imidazole dihydrochloride</p>	642 nm
<b>Bilirubin</b>	$\text{Bilirubin} + 2\text{-methoxy-nitrophenyldiazoniumtetrafluoroborate} \longrightarrow \text{azobilirubin}$ <p>Indirect bilirubin is released by means of dyphilline</p>	567 nm
<b>Creatinine</b>	$\text{creatinine} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{creatinine iminohydrolase}} \text{N-methylhydantoin} + \text{NH}_3$ $\text{N-methylhydantoin} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{N-methylhydantoinase}} \text{N-carbamoylsarcosine} + \text{ADP} + \text{P}_i$ $\text{N-carbamoylsarcosine} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{carbamoylsarcosine hydrolase}} \text{sarcosine} + \text{CO}_2 + \text{NH}_3$ $\text{sarcosine} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{sarcosine oxidase}} \text{glycine} + \text{HCHO} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{indicator} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{dye} + \text{H}_2\text{O}$ <p>Indicator: 2-(3,5-di-<i>tert</i>-butyl-4-hydroxyphenyl)-4-(5)-(9-julolidino)-5-(4)-methyl-(1H)-imidazole</p>	642 nm
<b>Haemoglobin</b>	$\text{haemoglobin} + \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] \xrightarrow{\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}} \text{methaemoglobin}$	567 nm

Test	Test principle	Wavelength
<b>Alkaline Phosphatase</b>	o-cresolphthalein phosphate + methylglucamine $\xrightarrow{\text{ALP}}$ o-cresolphthalein + methylglucamine phosphat	567 nm
<b>Amylase</b>	indolyl- $\alpha$ , D-maltoheptaoside $\xrightarrow{\alpha\text{-amylase}/\alpha\text{-glucosidase}}$ indoxyl + glucose indoxyl + 2-methoxy-4-morpholinophenyldiazoniumtetrachlorozinkate $\longrightarrow$ purple dye	567 nm
<b>Pancreatic Amylase</b>	1. Inhibition of salivary amylase with monoclonal antibodies indolyl- $\alpha$ , D-maltoheptaoside $\xrightarrow{\alpha\text{-amylase}/\alpha\text{-glucosidase}}$ indoxyl + glucose indoxyl + 2-methoxy-4-morpholinophenyldiazoniumtetrachlorozinkate $\longrightarrow$ purple dye	567 nm
<b>CK</b>	creatine phosphate + ADP $\xrightarrow{\text{CK}}$ creatine + ATP glycerol + ATP $\xrightarrow{\text{glycerol kinase}}$ glycerol-3-phosphate + ADP glycerol-3-phosphate + O <sub>2</sub> $\xrightarrow{\text{glycerol phosphate oxikase}}$ dihydroxyacetone phosphate + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + indicator $\xrightarrow{\text{peroxidase}}$ indicator (ox.) + H <sub>2</sub> O Indicator: 2-(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyphenyl)-4-(5)-(9-julolidino)-5-(4)-methyl-(1H)-imidazole	642 nm
<b><math>\gamma</math>-GT</b>	glycylglycin + $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-1,4-phenylene diamine $\xrightarrow{\gamma\text{-GT}}$ $\gamma$ -glutamylglycyl-glycine + 3-carboxy-1,4-phenylene diamine 3-carboxy-1,4-phenylene diamine + N-methylantranilic acid + 6 [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-</sup> $\longrightarrow$ dye + 6 [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup>	642 nm

CK-MM CK-MB CK-BB  
↑ Danno miocardico

**GOT (AST)**

$\alpha$ -ketoglutarate + alanine sulphinate  $\xrightarrow{\text{GOT}}$  glutamate + pyruvate +  $\text{SO}_3^{2-}$  567 nm

pyruvate +  $\text{PO}_4^{3-}$  +  $\text{O}_2$  +  $\text{H}_2\text{O}$   $\xrightarrow{\text{pyruvate oxidase}}$  acetylphosphate +  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $\text{CO}_2$

$\text{H}_2\text{O}_2$  + indicator (red.)  $\xrightarrow{\text{peroxidase}}$  indicator (ox.) +  $\text{H}_2\text{O}$

Indicator: 4-(4-dimethylaminophenyl)-5-methyl-2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)imidazole dihydrochloride

**GPT (ALT)**

$\alpha$ -ketoglutarate + alanine  $\xrightarrow{\text{GPT}}$  glutamate + pyruvate 567 nm

pyruvate +  $\text{PO}_4^{3-}$  +  $\text{O}_2$  +  $\text{H}_2\text{O}$   $\xrightarrow{\text{pyruvate oxidase}}$  acetylphosphate +  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $\text{CO}_2$

$\text{H}_2\text{O}_2$  + indicator (red.)  $\xrightarrow{\text{peroxidase}}$  indicator (ox.) +  $\text{H}_2\text{O}$

Indicator: 4-(4-dimethylaminophenyl)-5-methyl-2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)imidazole dihydrochloride



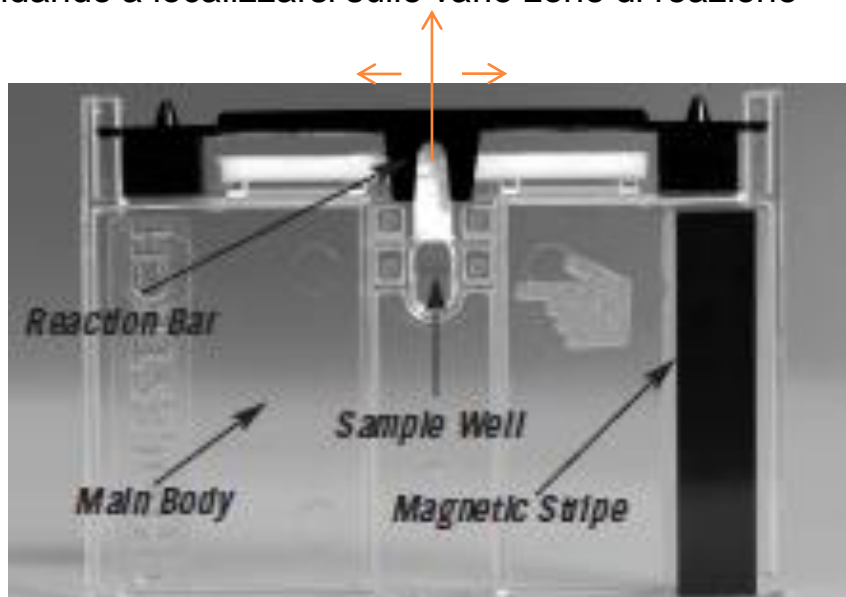
# Colestech LDX

- L'analizzatore combina i metodi enzimatici alla tecnologia su fase solida.
- Possiede un sistema in grado di separare direttamente il plasma dalla parte corpuscolata

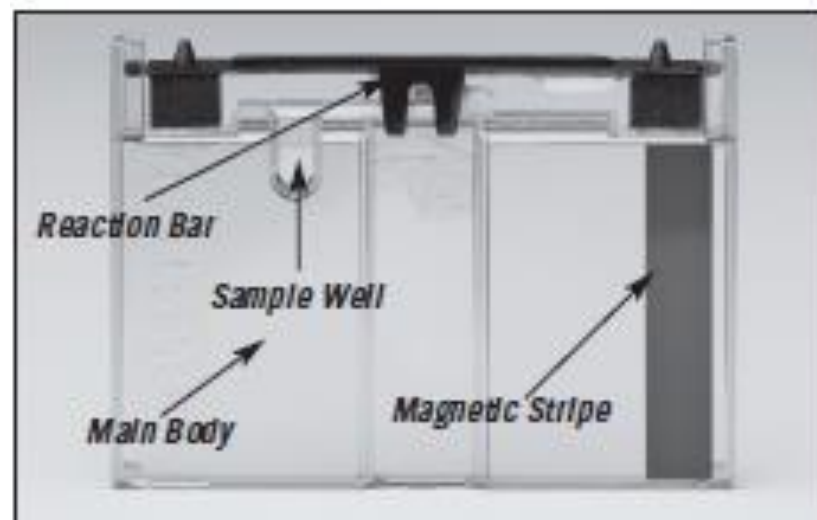


- Il corpo principale della cassetta contiene un pozzetto dove va caricato il campione di sangue
- La barra magnetica dà le indicazioni allo strumento di che test si tratta quindi di come deve procedere e di come deve interpretare le gradazioni di colore che si andranno a sviluppare (info sulle calibrazioni ecc.)

Dopo che il plasma viene separato dalla parte corpuscolata, esso può diffondere a destra o sinistra andando a localizzarsi sulle varie zone di reazione

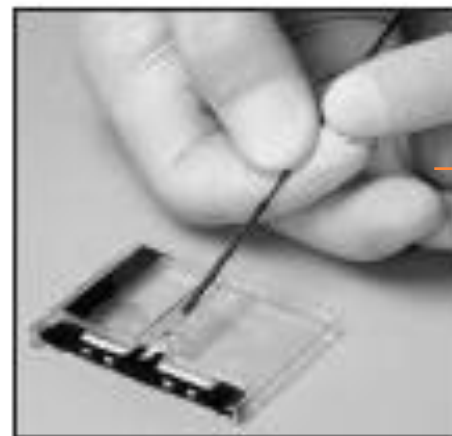


Lipidi (trigliceridi, colesterolo, HDL-C, Lp(a)), glucosio, ALT, AST



hs-CRP

Controllo qualità  
Calibrazione



Il sangue del capillare deve essere caricato immediatamente onde evitare la coagulazione del sangue



Tenere il capillare orizzontalmente o leggermente inclinato verso il basso. Mettere in contatto il capillare con il sangue (non con la pelle) e si riempie il capillare fino al segno di riempimento. Evitare bolle d'aria e riempirlo in meno di 10 secondi.

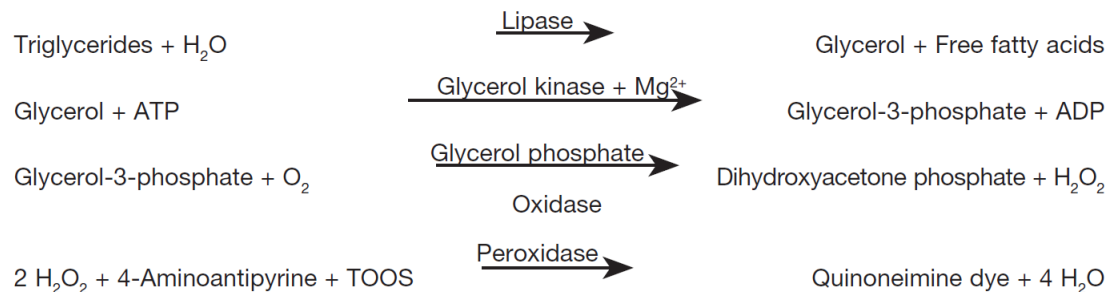
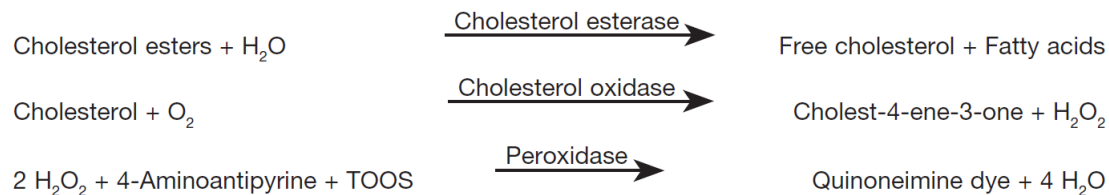
Suggestion	Reason
Perform a deep and firm puncture.	An adequate puncture is crucial to obtaining a free-flowing drop of blood.
Keep the patient's hand below the level of his or her heart.	This will improve the blood flow.
Hold the capillary tube horizontally or at a slightly descending angle to the drop of blood.	This will make the capillary tube fill faster.
Fill the capillary in less than 10 seconds.	This will ensure proper mixing of blood and anticoagulant, which prevents clotting.
Dispense blood from the capillary tube in less than five minutes.	After five minutes, the blood may begin to clot in the capillary tube.
If blood stops flowing, wipe finger firmly with gauze.	You can improve blood flow by reopening the puncture.



- Profilo lipidico (rischio cardiovascolare):
  - Colesterolo totale
  - Trigliceridi (TC)
  - HDL-C
  - LDL-C (per calcolo dai precedenti)
  - Non-HDL-C (calcolato dal colesterolo totale meno HDL-C)
  - TC/HDL-C
- Glucosio

## Principio del metodo:

Una parte del plasma fluisce verso destra dove ci sono i siti di reazione per il colesterolo e per i trigliceridi. Una parte di plasma fluisce verso sinistra dove LDL ed HDL vengono precipitate con destrano solfato/Mg<sup>2+</sup>. Il filtrato contiene HDL e si può quantificare il colesterolo



# PoCT in farmacia

- Samsung LABGEO PT10S

Profilo Epatico: AST, ALT, ALP, GGT, TBIL, DBIL, ALB, TP, GLU

Profilo Lipidico: GLU, CHOL, TG, HDL (LDL)

Profilo Biochimico: AST, ALT, GGT, TBIL, BUN, CREA, AMY, CHOL, GLU

Profilo Biochimico9: AST, ALT, GGT, GLU, CREA, CHOL, TG, HDL (LDL)

Emoglobina GLICATA



# PoCT in farmacia

- Samsung LABGEO PT10S

**Table 1. Analytical methods available for the Samsung LABGEO PT10**

Analyte	Unit	Test method
Albumin	g/dL	Dye binding-BCP
Aspartate aminotransferase	U/L	Enzymatic, colorimetric
Alanine aminotransferase	U/L	Enzymatic, colorimetric
Alkaline phosphatase	U/L	JSCC-EAE method
$\gamma$ -Glutamyl transpeptidase	U/L	$\gamma$ -Glutamyl-carboxy-nitroanilide (IFCC, 37°C)
Glucose	mg/dL	Glucose dehydrogenase, colorimetric
Total bilirubin	mg/dL	Enzymatic bilirubin oxidase
Direct bilirubin	mg/dL	Enzymatic bilirubin oxidase
Total protein	g/dL	Biuret method
Cholesterol	mg/dL	Enzymatic
Triglyceride	mg/dL	Enzymatic (colorimetric) without glycerol blank and without sample blank
High-density lipoprotein	mg/dL	Direct
Low-density lipoprotein	mg/dL	Calculated*
Blood urea nitrogen	mg/dL	Urease-bromocresol green
Creatinine	mg/dL	Enzymatic
Amylase	U/L	G2-CNP
Hemoglobin A1c	%	Latex agglutination

Abbreviations: BCP, bromocresol purple; JSCC-EAE, Japanese Society of Clinical Chemistry-ethylaminoethanol; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry; G2-CNP, maltoside 2-chloro-4-nitrophenol.

# PoCT in farmacia

- Samsung LABGEO PT10S

La cartuccia possiede una zona di iniezione e una di rilevamento.

L'unità di iniezione contiene della fibra di vetro che filtra i globuli rossi.

Il resto poi si muove verso l'unità di rivelamento dove sono essiccati i reagenti

Avviene lo sviluppo di colore e la sua lettura

Basta un campione di 70  $\mu$ l di sangue

Bastano 7 minuti per avere

La cartuccia per HbAc1 da anche un valore calcolato di eAG (estimated average glucose) secondo una formula.





# Glucometri

- Riflettometrici
- Elettrochimici
- Errori da evitare durante l'autocontrollo:
  - Parte ottica sporca (riflettanza)
  - Pila scarica
  - Strisce reattive scadute o mal conservate
  - Quantità di sangue
- Inaccuratezza: si accetta un massimo del  $\pm 20\%$  rispetto al dato di laboratorio
- Imprecisione: si accetta un massimo del 5%



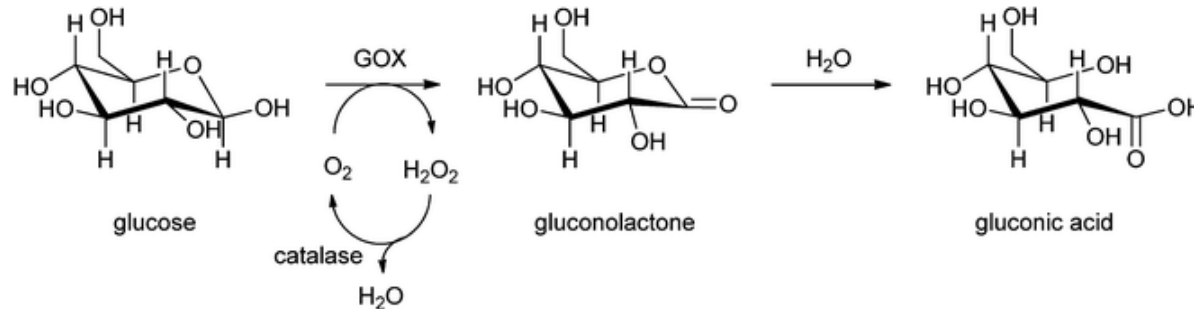
# Colesterolo/trigliceridi



→ Sensore elettrochimico

} Sensore riflettometrico

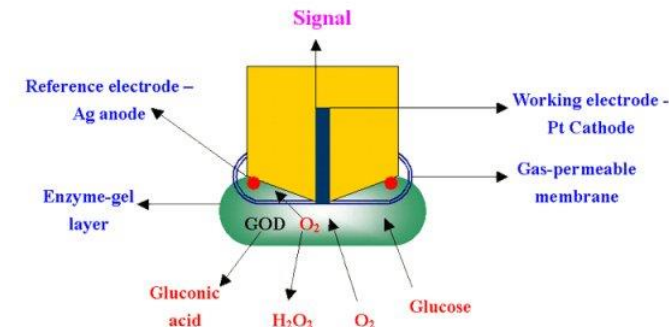
# Misura del glucosio nel sangue



Misurare la  $\downarrow$   $\text{O}_2$



Sensore di Clark



## GLICEMIA

- Condizioni normali: 70-90 mg/dL (120-130 mg/dL dopo pasto)
- **IPERGLICEMIA:** Diabete. Porta a complicazioni a lungo-termine come retinopatia, nefropatia, neuropatia, e malattie cardiovascolari. Le complicazioni si possono minimizzare: dieta, esercizio fisico, terapia farmacologica e monitoraggio glicemia.
- **IPOGLICEMIA** (glicemia < 50 mg/dL) possono portare a coma ipoglicemico.
  - Ipoglicemia da tumori secernenti insulina, ipoglicemie neonatali da iperinsulinismo congenito, ipoglicemie indotte o iatrogene da insulina o solfaniluree.

# Strisce reattive per le analisi delle urine



Leucociti  
 Nitriti  
 Urobilinogeno  
 Proteine (albumina)  
 pH  
 Sangue  
 Peso specifico  
 Chetoni (acido acetoacetico)  
 Bilirubina  
 Glucosio  
 Acido ascorbico



# Urine

- **Quantità:** 1200-1500 mL/24h. Aumenta in caso di diabete mellito ed insipido e in malattie del tubulo renale. Diminuisce in caso di disidratazione, vomito, diarrea, nefrosclerosi, shock.
- **Colore:** giallo paglierino. Ma può assumere altre colorazioni:
  - Giallo carico: stati febbrili
  - Giallo marsala: malattie epatiche con ittero
  - Da rosso chiaro a rosso scuro: Hb o mioglobina
  - Marrone (lavatura di carne): ematuria
- **Aspetto:** limpido. Sono torbide in presenza di muco, leucociti, globuli rossi, cellule epiteliali.

- **Peso specifico/densità:** 1005-1015 g/L. varia in rapporto alla capacità del rene di mantenere l'omeostasi dei liquidi e degli elettroliti (concentrazione del campione).

Reagente: variazione dal blu-verde al verde-giallo, per valori da 1000 a 1030 (pH 6).  
Urine a pH>8 danno valori leggermente inferiori.


Urine a pH<6 danno valori leggermente superiori. Alla scala dei colori indicata corrispondono diversi valori di peso specifico.

- **pH:** 5.5-6.5. Alimentazione, farmaci, disturbi metabolici e infezioni delle vie urinarie sono cause di alterazione del pH.

Reagente: indicatore in grado di discriminare valori di pH tra 5 e 9.

↓pH: acidosi, diabete (corpi chetonici)  
↑pH: infezioni batteriche (ureasi -> ammoniaca), farmaci antiepilettici, campione vecchio



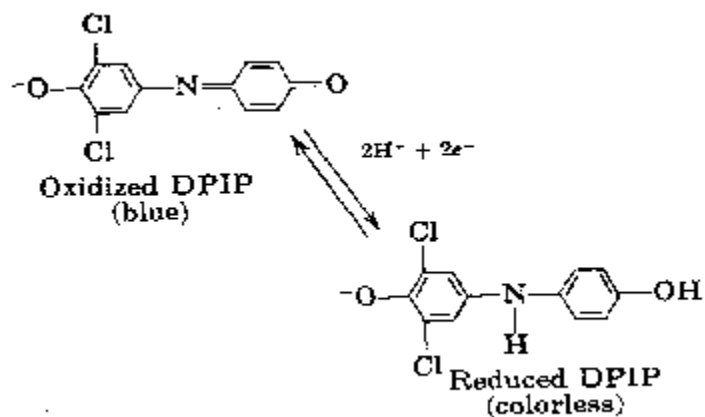
Produttore o Distributore	Indicatore di pH	Intervallo di misura (unità pH e risoluzione)
Bayer	rosso di metile e blu di bromotimolo	5,0-8,5 (risol. 0,5) 
Arkray	verde di bromocresolo e blu di bromoxilenolo	4,5-9,0 (risol. 0,5)
Roche	rosso di metile, fenolftaleina e blu di bromotimolo	5,0-9,0 (risol. 0,5)

- **Acido ascorbico:** vitamina C.

Può dare interferenza nella determinazione di: glucosio, sangue, bilirubina, nitriti, leucociti ed urobilinogeno.

Si basa sulla decolorazione del reattivo di Tillman.

La presenza di 5-10 mg/dL di acido ascorbico porta al viraggio dal grigio-blu all'arancione.



0,3% p/p 2,6-diclorofenolindofenolo; 99,7%  
p/p tampone e sostanze non reattive



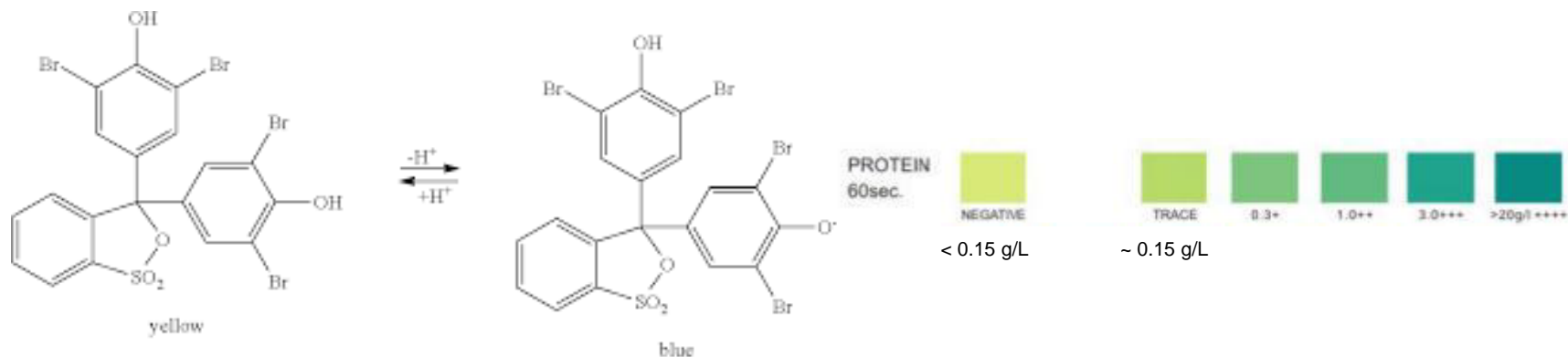
I risultati si leggono dopo 30 sec.

- **Proteine:** 40-200 mg/die. Proteinuria: 0.1-0.3 g/L

Aumentano in: stati febbrili, infezioni, nefrosi, sforzi fisici, malattie renali, gravidanza, emopatie.

Test: si basa sul principio dell'errore proteico di un indicatore di pH, ed è particolarmente reattivo all'albumina.

La parte reattiva è imbevuta di un indicatore di pH mantenuto in forma cationica a pH 3 (colore giallo per il tetrabromofenolo). In presenza di proteine i gruppi amminici portano l'indicatore nella sua forma anionica (blu).



Soggetti sani: assenza di proteine nelle urine. Possono dare falsi positivi: pH>9, peso specifico elevato, assunzione di farmaci contenenti chinino, raccogliatore delle urine inquinato con disinfettanti a base di ammonio quaternario.

- **Sangue:** il sangue occulto nelle urine indica patologie dell'apparato urogenitale e renale. Il sangue non è visibile se c'è microematuria (test chimici o microscopio).

In presenza di idroperossidi organici e cromogeni, l'emoglobina e la mioglobina catalizzano la reazione perossidasi dando una colorazione verde.

Colorazione omogenea: Hb o mioglobina.

Colorazione puntiforme: globuli rossi.

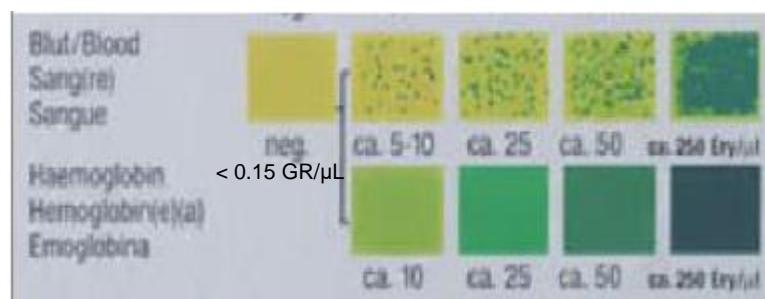
Interferenza da acido ascorbico quasi eliminata (falso negativo).

Falsi positivi: detergenti a base di perossido, ossidasi microbiche per infezioni del tratto urogenitale.

La quantità di eritrociti accertati sul sedimento potrebbe essere inferiore a quanto rilevato dalla striscia reattiva, in quanto il primo non rivela le cellule già lisate del sedimento.

Scala: GR/ $\mu$ L.

4% p/p 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB); 6% p/p Cumene idroperossido;  
90% p/p tampone e sostanze non reattive

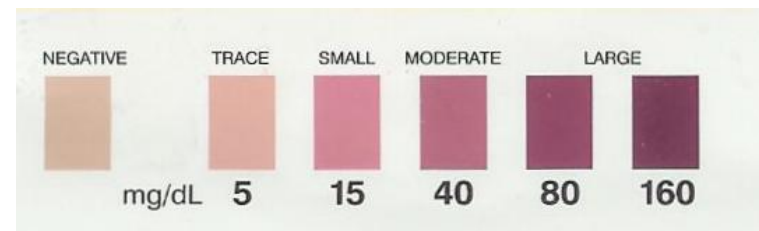
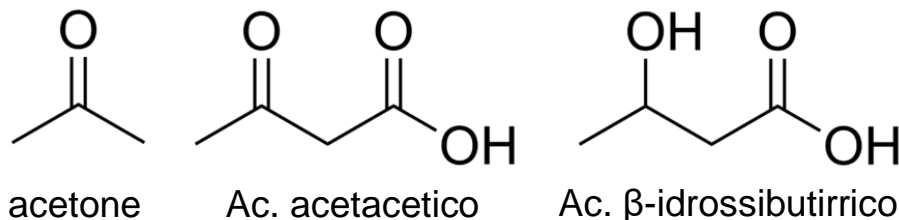




- **Glucosio:** test necessario per la diagnosi e la cura di disordini metabolici dei carboidrati, diabete, iperglicemia. Reazione: glucosio ossidasi/perossidasi. Falsi positivi: detergenti a base di perossidi.



- **Corpi chetonici:** compaiono in condizioni di squilibrio metabolico (diabete) e di stress fisiologico (digiuno, gravidanza, stati febbrili dei bambini, esercizio fisico frequente e molto faticoso), o in altre condizioni che influenzano il metabolismo dei carboidrati (anoressia).



Test di Legal (sodio nitroprussiato):



- **Bilirubina:** disordini epatici e biliari. In condizioni normali non è riscontrabile nelle urine. Compare nelle urine quando la concentrazione plasmatica (di bilirubina coniugata) supera i 2 mg/dL.

In ambiente fortemente acido, la bilirubina reagisce con sali di diazonio (2,4-dicloroanilina sale di diazonio) per dare un colorante azoico rosso. Il pH dell'urina non influenza la reazione.

Il test rileva concentrazioni di bilirubina > 0.5 mg/dL.

Falsi negativi o valori attenuati: esposizione a raggi solari, elevate concentrazioni di vitamina C o nitriti.

Aumento della colorazione: elevate conc. di urobilinogeno

Il test va eseguito immediatamente e vanno evitati i raggi solari per evitare la degradazione della bilirubina. Se si lascia molto tempo a reagire la bilirubina si può anche ossidare a biliverdina (non reattiva con i sali di diazonio).

Utile associare il risultato del test con quello dell'urobilinogeno.



Analita nelle urine	Paziente sano	Emolisi	Malattia epatica	Ostruzione biliare
Bilirubina	-	-	+ o -	+
Urobilinogeno	Normale	↑	↑	↓ o -

- **Urobilinogeno**: disordini epatici e patologie emolitiche. Gli intervalli di riferimento nelle urine sono 0.1-1.8 mg/dL. Conc. > 2 mg/dL sono considerate patologiche.

L'urobilinogeno reagisce con sali di diazonio (4-metossibenzene-diazonium-tetrafluoroborato) per dare un colorante azoico rosso. Il pH dell'urina non influenza la reazione. Oppure utilizzano la reazione di Ehrlich con dimetilamminobenzaldeide per dare un composto arancione.

Il test rileva concentrazioni di urobilinogeno a partire da 1-2 mg/dL.

Falsi negativi o valori attenuati: esposizione a raggi solari, formaldeide.

Falsi positivi: rape rosse e metaboliti di farmaci che a pH basso danno colorazione (fenazopiridina, coloranti azoici, ac. 4-amminobenzoico).

Test da eseguire sulle urine fresche altrimenti l'aria lo ossida a urobilina.

Utile l'associazione del test con quello della bilirubina.



Analita nelle urine	Paziente sano	Emolisi	Malattia epatica	Ostruzione biliare
Bilirubina	-	-	+ o -	+
Urobilinogeno	Normale	↑	↑	↓ o -

- **Leucociti:** infiammazioni renali o dell'apparato urogenitale (cistiti, pieliti, uretriti, prostatiti) ma anche calcoli renali e tumori. In condizioni normali i leucociti nelle urine sono assenti.

Cause non patologiche: disidratazione, febbre, stress.

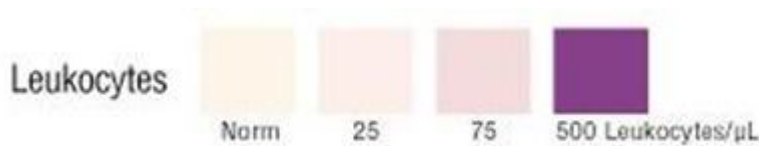
Le esterasi dei granulociti scindono un aa esterificato con un derivato idrossipirazolico liberando il derivato idrossipirazolico che è in grado di reagire con un sale di diazonio per dare una colorazione viola. Urine molto colorate (nitrofurantoina) possono influire sulla colorazione della zona reattiva.

Valori attenuati: glucosio, acido ossalico, prodotti contenenti cefalexina, cefalotina, o tetraciclina possono ridurre la reattività.

Falsi positivi: urine venute a contatto con le secrezioni vaginali.

Il test rileva concentrazioni a partire da 10-20 leucociti/ $\mu$ L.

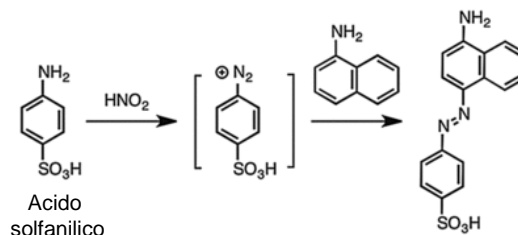
La quantità di leucociti accertati sul sedimento potrebbe essere inferiore a quanto rilevato dalla striscia reattiva, in quanto il primo non rivela le cellule già lisate del sedimento.



- **Nitriti:** infezione batterica dell'apparato urogenitale.

Il test si basa sulla reazione di Griess: il nitrito reagisce in ambiente acido con la sulfanilammide formando un diazocomposto che, per reazione con naftilammina (naftilendiammina o idrossibenzochinolina), forma un azocolorante (rosa).

Qualsiasi colorazione rosa è da considerarsi come risultato positivo ( $\geq 10^5$  germi/mL).



Falsi negativi: ritenzione troppo breve di urina nella vescica, infezione da batteri senza nitrato reductasi, terapia antibiotica, dieta povera di nitrati, forte diuresi, elevata conc. Di acido ascorbico.

Falsi positivi: urine stantie (nitrito da contaminazione secondaria), coloranti nelle urine (rape rosse, piridine).

Il test rileva concentrazioni di nitriti a partire da 0.05-0.1 mg/dL.



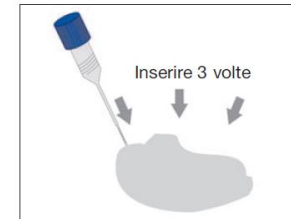
# Sangue occulto nelle feci (FOB, fecal occult blood)

- Il cancro intestinale è il più diffuso in Europa
- La presenza di sangue occulto nelle feci permette di diagnosticare tempestivamente il cancro intestinale, diminuendo il tasso di mortalità
- In presenza di tumori, ma anche: polipi, coliti, diverticoliti e fessurazioni del colon e retto, il passaggio delle feci può essere sufficiente a provocare il sanguinamento (vasi sottili e delicati)
- La presenza di sangue può non essere visibile nelle feci
- Il FOB basato su Ab utilizza Ab anti-Hb umana:
  - Non risente dell'alimentazione
  - Limite di rivelabilità: 50 ng/mL di Hb (2 µg/g feci)
  - Non prelevare campioni in caso di: mestruazioni nè 3 giorni prima e/o dopo, emorragie da stipsi, emorroidi sanguinanti, assunzione di farmaci per via rettale. **FALSI POSITIVI**
  - Alcool, farmaci quali antinfiammatori, aspirina e corticosteroidi possono causare emorragie del tratto digestivo dando **FALSI POSITIVI**, pertanto meglio sospenderli per 48h

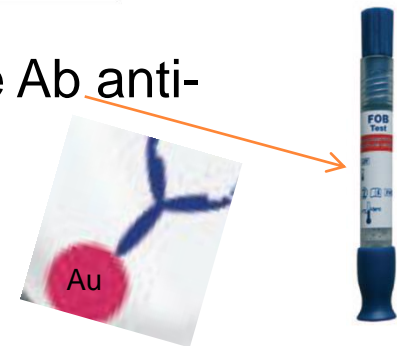


# Sangue occulto nelle feci (FOB, fecal occult blood)

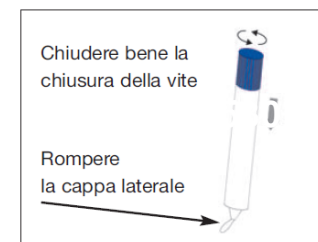
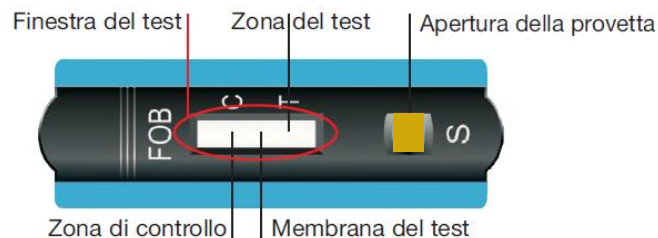
Campionamento feci con apposita spatola



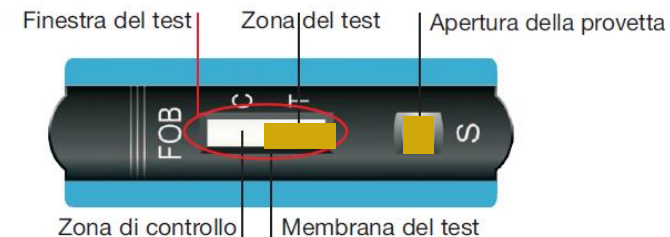
Immersione della spatola nella soluzione contenente Ab anti-Hb marcati con oro colloidale



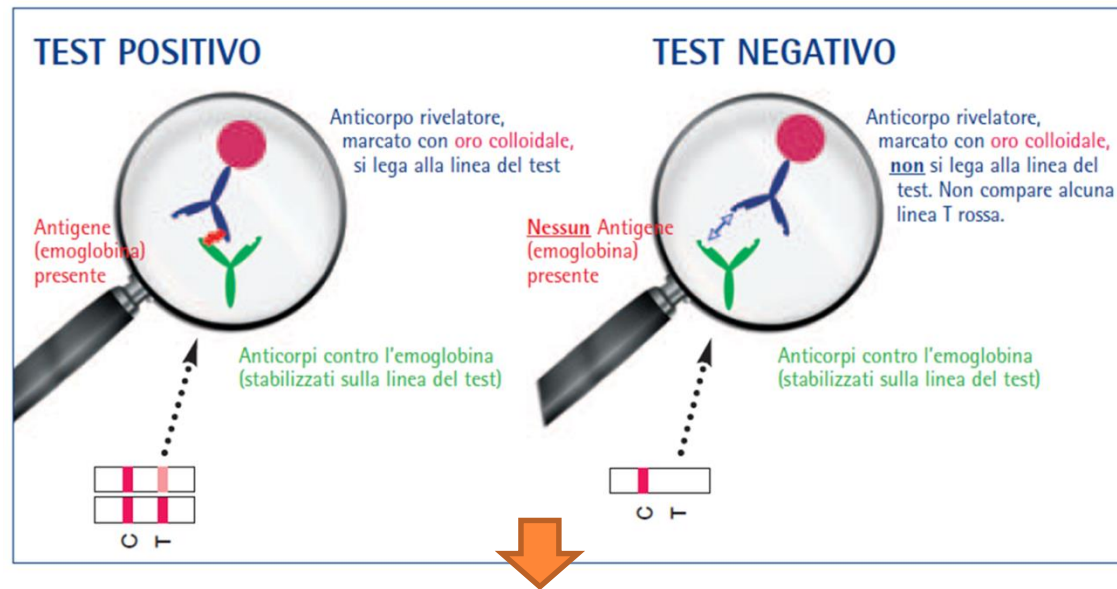
Mescolamento della soluzione e semina di 3 gocce di soluzione nella zona S



La soluzione (contenente Ab anti-Hb umana e/o Hb umana) migra nella membrana verso la zona test (T)



La zona test (T) contiene un altro Ab anti-Hb umana (per un epitopo diverso) ancorato alla membrana



La soluzione dalla zona test continua a migrare raggiungendo la zona di controllo (C)

La zona C contiene un Ab ancorato alla membrana che riconosce l'Ab anti-Hb umana

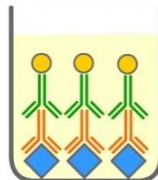
Il campione contiene sempre l'Ab anti-Hb umana e si forma sempre una striscia rossa nella zona C dovuta alla presenza dell'oro colloidale sull'Ab anti-Hb umana  
Se non compare o è stata seminata una quantità insufficiente di campione o il test non è stato eseguito correttamente: TEST NON VALIDO.



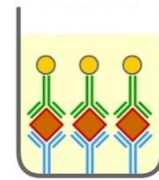
# Helicobacter pylori

- L'infezione della mucosa gastrica da *Helicobacter pylori* determina la comparsa di IgM e IgG nel siero ma anche di IgA locali.
- L'*Helicobacter pylori* è fortemente associato a gastriti croniche, ulcera duodenale ed ulcera gastrica. Inoltre, recenti studi epidemiologici hanno evidenziato che le gastriti da *Helicobacter pylori* sono un fattore di rischio per il carcinoma gastrico.
- La ricerca delle Ig nel siero presenta la limitazione che queste rimangono elevate fino a circa tre anni dopo il debellamento dell'infezione.
- Un test positivo quindi non indica se l'infezione è ancora in atto.
- Il test negativo dà però una ragionevole certezza che il paziente non è portatore dell'infezione.
- Più indicato come test è quindi la ricerca degli Ag specifici di *Helicobacter pylori* (HpSA) nelle feci, sia come diagnosi che a conferma dell'eradicazione dopo la terapia.

test sul siero: IgM, IgG, IgA  
Metodo indiretto



test sulle feci : HpSA  
Metodo Sandwich

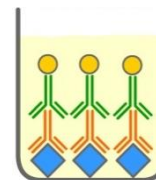


# Celiachia

- I meccanismi patogenetici di tale patologia non sono ancora completamente chiari. L'intolleranza alla gliadina innescherebbe una risposta autoimmune, evidenziata dalla presenza nel siero degli EMA diretti contro proteine reticolari non collageniche della lamina propria. La gliadina e la glutenina sono le due proteine componenti principali del glutine.
- Il glutine è presente nel grano, orzo, segale e molti altri cereali.
- **Anticorpi antigliadina (AGA) ed anticorpi antiendomizio (EMA)** vengono utilizzati nello screening della malattia celiaca.
- Il principale antigene degli EMA è la **transglutaminasi tissutale**, un enzima citoplasmatico calcio-dipendente che catalizza reazioni di cross-linking proteico e che ha la gliadina come substrato preferenziale.
- Quindi nella malattia c'è autoreazione contro componenti endogene della mucosa intestinale

# Test per la celiachia

Metodo indiretto

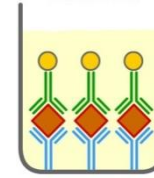


- Ricerca Ab anti-IgA e anti-IgG anti-transglutaminasi nel sangue umano: la presenza di anche solo uno dei due Ab indica un'elevata probabilità di malattia celiaca
- Durante una dieta priva di glutine sia i sintomi che gli Ab tendono a diminuire. Entro 6 settimane gli Ab non sono più determinabili
- Richiede una goccia di sangue (10  $\mu$ L)



# Menopausa

Metodo sandwich



- L'**ormone follicolo stimolante (FSH)** è una gonadotropina secreta dall'ipofisi sia nelle donne che nell'uomo. Nelle donne stimola la crescita e la maturazione dei follicoli durante il ciclo mestruale. I suoi livelli variano durante il ciclo mestruale in risposta alle variazioni di estradiolo e progesterone.
- Quando si sta per instaurare la menopausa, la funzione ovarica diminuisce e diminuisce l'escrezione di estradiolo e i livelli di FSH aumentano per mancanza del feedback negativo sull'ipotalamo.
- L'FSH è presente nelle urine dove la sua concentrazione riflette quella plasmatica. Donna non in menopausa: picco massimo di 25 mUI/mL. Donna che si avvicina alla menopausa: picco massimo di 110 mUI/mL fino ad arrivare a 500 mUI/mL.
- Il test si basa su un saggio sandwich per valutare la presenza di **FSH**.

- Zona R: anticorpo monoclonale murino anti-FSH coniugato a oro colloidale ed è presente anche una quantità precisa di una IgG di asino coniugata ad oro colloidale.
- Zona test: anticorpi di cattura policlonali di capra anti-FSH
- Zona controllo: anticorpi di cattura di capra anti-IgG di asino.
- Quando l'urina inizia a percorrere la striscia FSH si lega all'Ab anti-FSH coniugato. Il complesso Ab coniugato/FSH e l'IgG di asino migrano per capillarità fino a raggiungere la zona test
- Nella zona test si forma il sandwich: Ab-coniugato/FSH/Ab di cattura e si sviluppa un colore rosso
- Nella zona controllo si forma: IgG di asino/Ab anti-asino e si sviluppa un colore che dipende dalla quantità di IgG di asino presente che è in una concentrazione tale da dare la stessa colorazione che darebbero 25 mUI/mL di FSH (fisiologico di donna fertile).

- Quindi la positività si ha solo nel caso di una colorazione della linea T più intensa della linea C.



Positive



Positive, second test should be performed



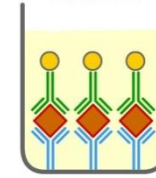
Negative



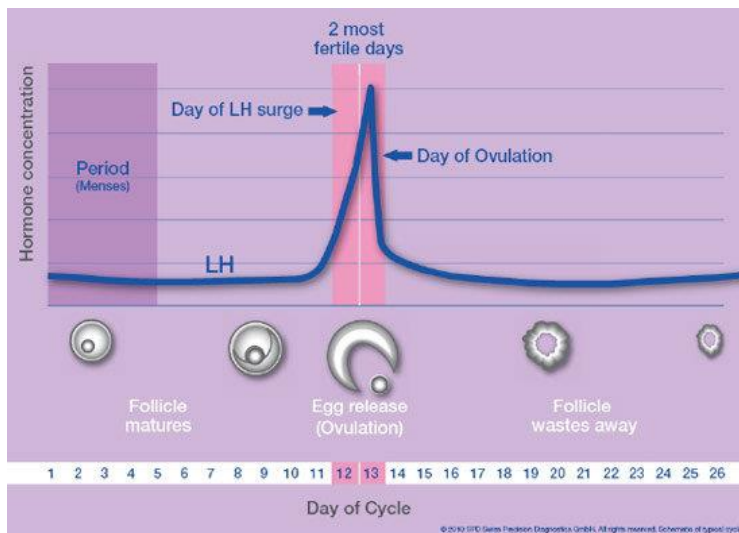
Invalid

# Test di ovulazione

Metodo sandwich



- I test di ovulazione rilevano nell'urina la presenza dell'**ormone luteinizzante (LH)**: prodotto lungo tutto l'arco del ciclo mestruale, la sua concentrazione aumenta nelle 24-36 h precedenti all'ovulazione. Rilasciato dall'ipofisi, l'LH è l'ormone che dà l'avvio all'attività ovarica, perciò un risultato positivo del test annuncia un picco ovulatorio che avrà luogo entro le successive 24-48 h.
- Saggio che utilizza Ab anti-LH
- Campione: Urina



Picco LH assente



Picco LH presente  
Periodo di fertilità

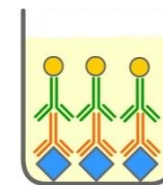


# Autotest di screening dell'HIV



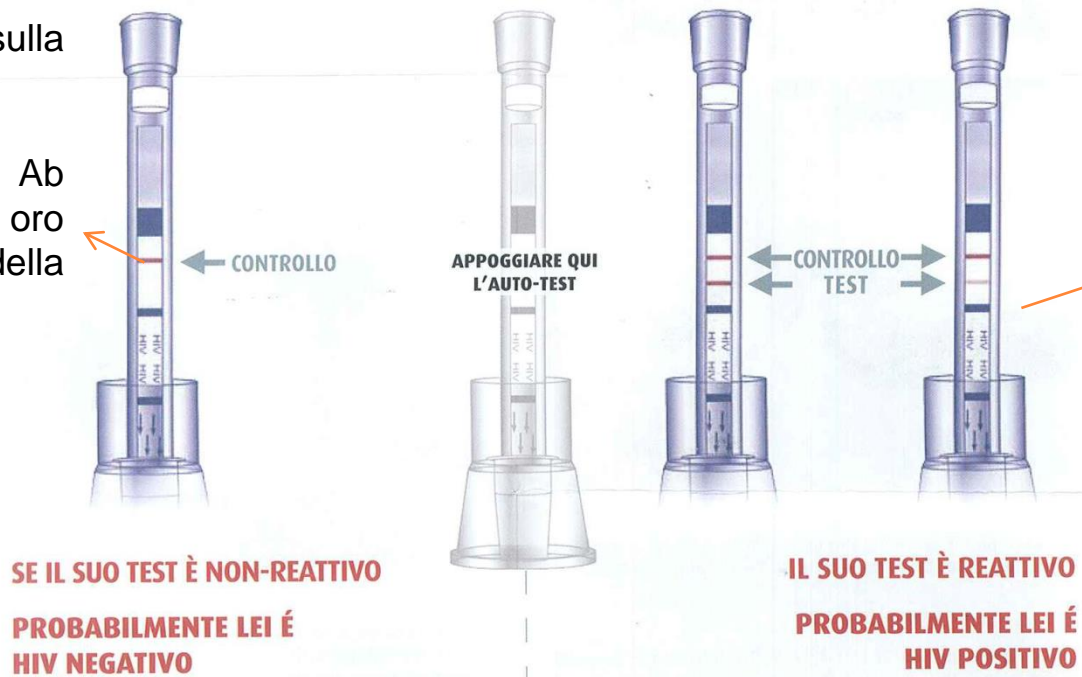
- Scopo: arginare il fenomeno delle diagnosi tardive.
- Si stima che tra le 6.500 e le 18mila persone vivano con Hiv non diagnosticato.
- Il 74,5% dei sieropositivi arriva a scoprire il contagio ad un passo dall'Aids conclamato. E questo significa minare in modo forse irreparabile il proprio sistema immunitario e maggiore possibilità di contagiare le persone sane.
- Metodo immunocromatografico
- “Periodo finestra”, è necessario aspettare 90 giorni dal presunto contagio alla produzione di anticorpi che segnalano la presenza del virus nell'organismo.
- Vendita solo ai maggiorenni assieme a materiale informativo

Metodo  
indiretto



- Tipo di prelievo : 2,5 microlitri di sangue capillare
- Ricerca la presenza di **anticorpi anti-HIV-1 e/o anti-HIV-2**
- Sensibilità: Il 100% dei soggetti sieropositivi ha ottenuto un risultato corretto con questo test
- Specificità: Il 99,8% dei soggetti sieronegativi ha ottenuto un risultato corretto con questo test.
- Interferenze: non sono state rilevate interferenze significative potenzialmente in grado di influire sul risultato del test nell'esame dei campioni contenenti sostanze o affetti da patologie.

Proteina A sulla  
membrana +  
Ab del campione +  
Proteine leganti gli Ab  
conjugate con oro  
colloidale della  
soluzione



**SE IL SUO TEST È NON-REATTIVO**

**PROBABILMENTE LEI É  
HIV NEGATIVO**

**IL SUO TEST È REATTIVO**

**PROBABILMENTE LEI É  
HIV POSITIVO**

Ag HIV1/2 adesi sulla  
membrana +  
Ab anti-HIV del  
campione +  
Proteine leganti gli Ab  
conjugate con oro  
colloidale della  
soluzione



# THE END

RICORDATE DI COMPILARE IL QUESTIONARIO ON-LINE PER GLI STUDENTI