

Comprende versione

ebook



Chimica analitica clinica

Cristian D'Ovidio

Ugo de Grazia

Paola Lanuti

Marcello Locatelli

Marco Marchisio

Giuseppe M. Merone

Enrica Rosato

Fabio Savini

Angela Tartaglia

Accedi ai contenuti digitali

Espandi le tue risorse

un libro che **non pesa**
e si **adatta** alle dimensioni
del **tuo lettore!**



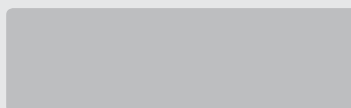
COLLEGATI AL SITO
EDISESUNIVERSITA.IT

ACCEDI AL
MATERIALE DIDATTICO

SEGUI LE
ISTRUZIONI

Utilizza il codice personale contenuto nel riquadro per registrarti al sito **edisesuniversita.it** e accedere ai contenuti digitali.

Scopri il tuo **codice personale** grattando delicatamente la superficie



Il volume NON può essere venduto, né restituito, se il codice personale risulta visibile.
L'**accesso ai contenuti digitali** sarà consentito **per 18 mesi**.

Per attivare i **servizi riservati**, collegati al sito **edisesuniversita.it** e segui queste semplici istruzioni

Se sei registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- inserisci email e password
- inserisci le ultime 4 cifre del codice ISBN, riportato in basso a destra sul retro di copertina
- inserisci il tuo **codice personale** per essere reindirizzato automaticamente all'area riservata

Se non sei già registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- registrati al sito o autenticali tramite facebook
- attendi l'email di conferma per perfezionare la registrazione
- torna sul sito **edisesuniversita.it** e segui la procedura già descritta per *utenti registrati*





I contenuti digitali sono accessibili dalla propria **area riservata** secondo la procedura indicata nel frontespizio.

Dalla sezione **materiali e servizi** della tua area riservata potrai accedere all'**Ebook**, ovvero la versione digitale del testo in formato epub, standard dinamico che organizza il flusso di testo in base al dispositivo sul quale viene visualizzato. Fruibile mediante l'applicazione gratuita BookShelf, consente una visualizzazione ottimale su lettori e-reader, tablet, smartphone, iphone, desktop, Android, Apple e Kindle Fire.

L'accesso ai contenuti digitali sarà consentito per **18 mesi**.

CHIMICA ANALITICA CLINICA

Cristian D'Ovidio
Ugo de Grazia
Paola Lanuti
Marcello Locatelli
Marco Marchisio
Giuseppe Maria Merone
Enrica Rosato
Fabio Savini
Angela Tartaglia



Chimica analitica clinica

C. D'Ovidio, U. de Grazia, P. Lanuti, M. Locatelli, M. Marchisio,

G.M. Merone, E. Rosato, F. Savini, A. Tartaglia

Copyright © 2021, EdiSES Edizioni S.r.l. – Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
2025 2024 2023 2022 2021

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata

A norma di legge è vietata la riproduzione, anche parziale, del presente volume o di parte di esso con qualsiasi mezzo.

L'Editore

L'Editore ha effettuato quanto in suo potere per richiedere il permesso di riproduzione del materiale di cui non è titolare del copyright e resta comunque a disposizione di tutti gli eventuali aventi diritto

Progetto grafico e fotocomposizione:

ProMedia Studio di A. Leano

Stampato presso:

PrintSprint S.r.l – Napoli

Per conto della

EdiSES Edizioni S.r.l. – Piazza Dante, 89 – Napoli

www.edisesuniversita.it

assistenza.edises.it

ISBN 978 883 623 0662

I curatori, l'editore e tutti coloro in qualche modo coinvolti nella preparazione o pubblicazione di quest'opera hanno posato ai lettori che vorranno inviarci le loro segnalazioni e/o suggerimenti migliorativi sulla piattaforma assistenza.edises.it

Autori

CRISTIAN D'OVIDIO

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

UGO DE GRAZIA

Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico Carlo Besta - Milano

PAOLA LANUTI

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

MARCELLO LOCATELLI

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

MARCO MARCHISIO

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

GIUSEPPE MARIA MERONE

Ospedale Civile della ASL di Pescara

ENRICA ROSATO

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

FABIO SAVINI

Ospedale Civile della ASL di Pescara

ANGELA TARTAGLIA

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

Foreword

Both clinical chemistry and analytical chemistry are two distinct and independent subdisciplines of the broader field of Chemistry. Over the last couple of decades, both the disciplines have grown substantially and trespassed each other's domain to a great extent. As a result, any new book of clinical chemistry covers a large number of topics that are designed for analytical chemists interested in clinical chemistry laboratories.

The reality in the field have catalyzed the emergence of a new career track of clinical analytical chemist. However, as of now, there is no text book or reference book available that may adequately train students of the emerging career track. Professor Marcello Locatelli and his colleagues have undertaken this challenging task to develop study material "Clinical Analytical Chemistry" with a clear focus to cater the new career track. The strong track record of teaching and involvement in the cutting edge research in the broader field of analytical and bioanalytical chemistry of Professor Marcello Locatelli and his team have uniquely qualified for this daunting task and their expertise have been genuinely reflected throughout the book. This book is indeed the first comprehensive reference/text book that recognizes the role and importance of analytical chemists in the modern clinical chemistry laboratories. The contents of the book are designed in a systematic way so that the graduate students of analytical chemistry, pharmacy, medicine would find all necessary information in a single book. The book may be considered as the bible of the field as it covers almost everything an analytical chemist needs to know to succeed in his/her career in a clinical chemistry laboratory. The book will also help scientists or researchers in the field who desperately need a quick reference book to refresh their knowledge in clinical analytical chemistry.

I hope this unique text/reference book would establish itself, once published, as a new milestone in the field of clinical analytical chemistry.

Abuzar Kabir, Ph.D.
Visiting Research Assistant Professor,
International Forensic Research Institute
Department of Chemistry and Biochemistry
Florida International University

Prefazione

Al giorno d'oggi la Chimica è sempre più presente in tutti i settori produttivi, nei percorsi formativi in ambito Clinico e Medico e nella vita quotidiana di tutti noi. In particolare la Chimica Analitica riesce a fornire risposte concrete ai problemi legati ai processi ed alla produzione, trovando applicazione in settori che vanno dal controllo qualità, alle analisi ambientali, all'analisi dei materiali e delle loro interazioni fino alle analisi forensi e tossicologiche. L'utilizzo dei concetti e degli strumenti della Chimica Analitica viene applicato notevolmente in ambito clinico. Negli ultimi decenni sia la Chimica Clinica che la Chimica Analitica sono state considerate due sotto-discipline distinte e indipendenti del più ampio campo della Chimica, ma recentemente si è sempre più consolidata la convinzione che sia più corretto parlare di Chimica Analitica Clinica per indicare quella disciplina scientifica che sviluppa ed applica dei metodi, strumenti e strategie, proprie della Chimica Analitica, per ottenere informazioni sulla composizione e natura nello spazio e nel tempo di campioni biologici di interesse clinico, oltre a valutare in modo critico i risultati analitici ottenuti alla luce di specifiche patologie e/o funzionalità di organi e tessuti.

Risulta chiaro quindi come tale disciplina sia estremamente attuale ed importante per chiunque si cimenti in laboratorio nelle analisi cliniche e come, applicando l'eleganza, la riproducibilità e le potenzialità dei metodi analitici, sia possibile ottenere informazioni di fondamentale importanza nella salvaguardia della salute, nella valutazione critica di protocolli clinici e nella valutazione oggettiva di parametri misurabili. Se a quanto visto ora si aggiunge da una parte il continuo progresso tecnologico ed incremento delle potenzialità delle tecniche analitiche, e dall'altro la maggiore conoscenza dei processi fisiologici e biochimici, risulta ancor più evidente come tale disciplina rivesta un ruolo sempre più importante in ambito medico. La realtà sul campo ha catalizzato quindi l'emergere di un nuovo percorso professionale di Chimico Analitico Clinico, che sia in grado di maneggiare con sicurezza i concetti e gli strumenti della Chimica Analitica, ma sia in grado anche di "parlare" lo stesso linguaggio dei medici, costituendo un valore aggiunto nella pratica di laboratorio: questa deve quindi passare attraverso un'appropriata determinazione ed una corretta interpretazione dei test.

Al momento non sono disponibili libri di riferimento che possano formare adeguatamente gli studenti nel loro percorso verso questa figura emergente, ed in tal senso qualsiasi nuovo libro di Chimica Analitica Clinica deve necessariamente ricoprire un gran numero di argomenti progettati per i Chimici Analitici interessati ai laboratori Clinici. Gli Autori hanno intrapreso l'impegnativo compito di sviluppare il presente testo con il chiaro obiettivo di cercare di soddisfare tale esigenza. La solida esperienza dei vari Autori nei differenti settori interessati dalla Chimica Analitica Clinica, unita alla loro esperienza di insegnamento e di ricerca all'avanguardia in tali ambiti, ha permesso di sviluppare il presente testo rivolto agli studenti dei percorsi di studio in Farmacia, CTF, Medicina, Tecniche di Laboratorio Biomedico e Scuole di Specializzazione in Biochimica Clinica.

Gli Autori
Ottobre 2021

Indice generale

Forward	v	3.3	Tipi di distribuzione	27
Prefazione	vii	3.4	Target analitici	28
		3.5	Efficienza diagnostica	31
Capitolo 1		3.6	Controllo qualità	37
Grandezze ed unità di misura		3.6.1	Controllo qualità intralaboratorio	37
1.1 Cifre significative	1	3.6.2	Materiali di controllo	40
1.2 Fattori di conversione e unità di misura	4	3.6.3	Carte di controllo intralaboratorio	41
		3.6.4	Controllo qualità interlaboratorio	48
Capitolo 2				
Metodi analitici e variabilità analitica in ambito clinico		Capitolo 4	Prelievo e conservazione dei campioni biologici	
2.1 Linee guida e parametri di validazione di un metodo	7	4.1	Matrici convenzionali, non convenzionali e surrogate	51
2.2 Errori nelle analisi	8	4.2	Campionamento invasivo e non invasivo	53
2.3 Accuratezza (precisione ed esattezza)	12	4.3	Sangue	53
2.4 t-student	12	4.3.1	Prelievo	57
2.5 t-test come confronto tra valore noto e valore sperimentale	14	4.3.2	Anticoagulanti	59
2.6 t-test come confronto di 2 medie (e di 2 metodi)	14	4.3.3	Emolisi	60
2.7 F-test o confronto della precisione	15	4.4	Urina	61
2.8 Q-test o test degli outliers	16	4.4.1	Prelievo	62
2.9 Retta dei minimi quadrati e statistica correlata al trattamento del dato quantitativo	16	4.5	Feci	64
2.10 Test <i>Lack of Fit</i> (LoF)	19	4.5.1	Prelievo	65
2.11 Uso della regressione lineare per confrontare due metodi	19	4.6	Saliva	66
2.12 Come aumentare la specificità e la sensibilità	20	4.6.1	Prelievo	67
2.13 Come assicurare accuratezza nelle analisi cliniche	20	4.7	Bile	70
Capitolo 3		4.7.1	Prelievo	71
Il risultato nel laboratorio chimico-clinico		4.8	Liquido sinoviale	71
3.1 Quando un test è positivo	23	4.8.1	Prelievo	72
3.2 Valori di riferimento	23	4.9	Liquido amniotico	73
		4.9.1	Prelievo	73
		4.10	Liquido seminale	73
		4.10.1	Prelievo	74
		4.11	Fluidi gastrici	75
		4.11.1	Prelievo	76
		4.12	Fluidi cerebrospinali	76
		4.12.1	Prelievo	77
		4.13	Versamenti cavitari	77

4.13.1	Prelievo	78	5.10.2	Leucemia mieloide acuta	120
4.14	Tessuti	78	5.10.3	Leucemia linfoblastica acuta	122
4.14.1	Prelievo	79	5.10.4	Leucemie ibride	123
4.15	Cellule	81	5.10.5	Leucemia cronica	123
4.15.1	Prelievo	81	5.10.6	Leucemia linfoblastica cronica B	125
4.16	Capelli	82	5.10.7	Leucemia linfatica cronica (B-CLL)	125
4.16.1	Prelievo	83	5.10.8	Leucemia linfatica cronica a prolinfociti (B-PLL)	125
4.17	Umor vitreo	83	5.10.9	Linfoma linfoplasmatico (LPL)	126
4.17.1	Prelievo	83	5.10.10	Linfoma della zona marginale (MBCL, MZL, SLVL, SMZL)	126
4.18	Conservazione e trasporto dei campioni biologici	84	5.10.11	Leucemia a cellule capellute (HCL)	126
4.19	Conservazione e trasporto dei campioni biologici in ambito forense – catena di custodia	85	5.10.12	Mieloma multiplo (MM) e Leucemia plasmacellulare (PCL)	126
Capitolo 5			5.10.13	Linfoma follicolare (FL)	127
Analisi del sangue			5.10.14	Linfoma a cellule mantellari (MCL)	127
5.1	Esame emocromocitometrico	89	5.10.15	Linfoma diffuso a grandi cellule (DLBCL)	127
5.2	Ematocrito	94	5.10.16	Linfoma di Burkitt (BL)	127
5.3	Emoglobina	96	5.10.17	Leucemia linfoblastica cronica T ed NK	127
5.4	Citometria a flusso	97	5.11	Elettroliti	128
5.5	Equilibrio acido-base	104	Capitolo 6		
5.6	Stato di ossigenazione, saturazione emoglobinica e strumentazione	107	Analisi delle urine		
5.7	Velocità di eritrosedimentazione	107	6.1	Generalità, caratteristiche chimico fisiche	131
5.8	Test di coagulazione	108	6.2	Analisi mediante strisce reattive	133
5.9	Immunoematologia	109	6.3	Esame microscopico del sedimento	137
5.9.1	L'antigene CD7	111	6.4	Analisi delle urine per la ricerca di sostanze d'abuso	138
5.9.2	L'antigene CD2	111	Capitolo 7		
5.9.3	L'antigene CD5	111	Analisi enzimatica		
5.9.4	L'antigene CD1a	112	7.1	Proteine e loro importanza biologica	141
5.9.5	L'antigene CD4	112	7.2	Enzimi e loro classificazione	146
5.9.6	L'antigene CD8	113	7.3	Enzimi di interesse clinico	150
5.9.7	L'antigene CD3	113	7.4	Cinetica enzimatica ed analisi quantitativa	151
5.9.8	Maturazione dei linfociti B (maturazione midollare)	114	7.5	Effetto dei parametri sulla velocità di reazione	157
5.9.9	L'antigene CD34	114	7.6	Reazioni enzimatiche accoppiate	159
5.9.10	L'antigene CD19	115	7.7	Enzimi immobilizzati	160
5.9.11	L'antigene CD10 (o CALLA)	115	7.8	Tecniche di rivelazione mediante luminescenza, bioluminescenza e chemiluminescenza	162
5.9.12	L'antigene CD22	115			
5.9.13	L'antigene CD79	116			
5.9.14	Maturazione della linea mieloide	116			
5.9.15	Maturazione della linea granulocitaria	116			
5.9.16	Maturazione della linea monocitaria	116			
5.9.17	Maturazione della linea eritroide	117			
5.10	Leucemie	118			
5.10.1	Leucemia acuta	119			

Capitolo 8**Diagnostica molecolare**

8.1	DNA e stabilità del DNA	165
8.2	Diagnostica molecolare	168
8.2.1	Elettroforesi	168
8.2.2	Southern blotting	169
8.2.3	Reazioni di ibridazione su filtro o membrana	171
8.2.4	Reazione di ibridazione in soluzione	171
8.2.5	Reazioni di ibridazione in situ	171
8.2.6	Marcatura diretta ed indiretta	172
8.2.7	Molecular beacons	173
8.2.8	Branched DNA	174
8.3	PCR, cinetica, rivelazione	174
8.3.1	Enzimi di restrizione	174
8.3.2	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	175
8.3.3	Cinetica della PCR	177
8.3.4	Rivelazione applicata alla PCR	178
8.3.5	PCR quantitativa	178
8.3.6	Scelta del target della reazione PCR	180
8.3.7	Trattamento del campione per analisi PCR	181
8.4	Applicazioni della PCR in ambito diagnostico	181
8.5	Microarrays, loro produzione e applicazioni	182
8.5.1	Microarrays	182
8.5.2	Tecnologie per la produzione di Microarrays	183

Capitolo 9**Tecniche di analisi strumentali applicate in ambito clinico**

9.1	Spettroscopia	185
9.2	Spettrofluorimetria	191
9.3	Turbidimetria e nefelometria	193
9.4	Assorbimento atomico	195
9.5	HPLC	197
9.6	Elettroforesi (zonale, IEF, 2D, capillare)	203
9.6.1	Elettroforesi zonale	204
9.6.2	Isoelettrofocalizzazione (IEF)	207
9.6.3	Elettroforesi bidimensionale (2D)	208
9.6.4	Elettroforesi capillare	209
9.7	Metodi immunometrici	209
9.7.1	Anticorpi, caratteristiche, produzione	209

9.7.2	Immunoprecipitazione	215
9.7.3	Traccianti	217
9.7.4	Metodi competitivi e non competitivi	218
9.7.5	Metodi eterogenei ed omogenei	220
9.8	Spettrometria di massa	220
9.8.1	Tecniche di ionizzazione	221
9.8.2	Analizzatori	224
9.8.3	Spettrometria di massa tandem (MS/MS)	227
9.8.4	Rivelatori	227
9.9	Tecniche ifenate	227
9.9.1	LC-MS e LC-MS/MS	228
9.9.2	GC-MS	229

Capitolo 10**Monitoraggio terapeutico dei farmaci**

10.1	Definizione, importanza in ambito clinico, finestra terapeutica	231
10.2	Strategie per il TDM	236
10.3	Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME)	237
10.3.1	Assorbimento e distribuzione	239
10.3.2	Metabolismo	241
10.3.3	Escrezione	242
10.4	Tecniche analitiche nel TDM	245
10.5	Farmacocinetica e farmacodinamica	247
10.6	Come calcolare le variabili farmacocinetiche	251
10.7	Fondamenti di farmacogenetica	255
10.7.1	Alcuni esempi	258
10.8	Monitoraggio terapeutico dei farmaci biologici	263
10.9	Conclusioni	265

Capitolo 11**Automazione nel laboratorio chimico-clinico**

11.1	Analizzatori automatici	267
11.2	Procedure analitiche nel laboratorio automatizzato	271
11.2.1	Identificazione campione	272
11.2.2	Reagenti	272
11.2.3	Cuvette e contenitori	273
11.2.4	Trasferimento dei fluidi	274
11.2.5	Miscelazione	274
11.2.6	Formati di analisi	276
11.2.7	Rivelazione	277
11.3	Automazione totale	277

Capitolo 12**Sistemi portatili per la diagnostica e telemedicina**

12.1	Concetto di point-of-care-testing POCT	279
12.2	Diffusione e problematiche dei POCT	280
12.2.1	Lateral flow immunoassays (LFIA)	281
12.2.2	Biosensori	282
12.2.3	Sistemi basati su cartucce "usa e getta"	286
12.3	Concetto di telemedicina (e-health) e fascicolo sanitario elettronico	287

Capitolo 13**Correlazione risultati analisi e funzionalità di organi e tessuti**

13.1	Proteine	290
13.2	Carboidrati	300
13.3	Lipidi e lipoproteine	303
13.4	Composti azotati non proteici	305
13.5	Sistema renale	308
13.6	Sistema epatico	314

Capitolo 14**Rapporti di prova e interpretazione dei risultati analitici chimico-clinici**

14.1	Nomenclatura usata nei rapporti di prova dei risultati analitici in ambito clinico	319
14.2	Struttura di un rapporto analitico	322
14.3	Armonizzazione e codici LOINC	325
14.3.1	Uso di LOINC secondo il DPCM sul FSE	326
14.3.2	Struttura di un codice LOINC	326

APPENDICI

Appendice 1	Tavola periodica degli elementi	331
Appendice 2	Abbreviazioni comuni	332
Appendice 3	Costanti fisiche	335
Appendice 4	Valori critici per test statistici	336
Appendice 5	Costanti di ionizzazione di acidi deboli	338
Appendice 6	Costanti di ionizzazione di basi deboli	340
Appendice 7	Proprietà fisiche dei composti organici	341
Appendice 8	Valori di pK_a di sostanze organiche	348
Appendice 9	Derivazioni delle equazioni cinetiche	350
Appendice 10	Tabelle spettroscopiche	354
Appendice 11	La derivazione della legge di Beer	366
	Indice analitico	369



4

Prelievo e conservazione dei campioni biologici

4.1 Matrici convenzionali, non convenzionali e surrogate

In Chimica Analitica si parla di “matrice” riferendosi a tutti quei composti presenti nel campione escluso l’analita/i, ossia la molecola/e che si vuole determinare dal punto di vista quali-quantitativo. Con il termine “matrice” si comprende tutta una serie di tipologie a seconda dell’ambito di applicazione e dell’analita che si vuole quantificare, anche se tutte rappresentano il reale ostacolo al processo di analisi, in quanto il composto di interesse deve essere prima “estratto” e “purificato” da tutti gli altri componenti per poter procedere poi all’analisi strumentale.

A seconda dell’ambito applicativo, le matrici possono essere di origine biologica (sangue, urina, feci, saliva, bile, liquido sinoviale, liquido amniotico, liquido seminale, fluido gastrico, fluido cerebrospinale, versamenti cavitari, tessuti, cellule, capelli, umor vitreo), ambientale (acque reflue, acque di falda, suolo), vegetale (foglie, radici, corteccia). Ognuna di queste matrici, a prescindere dall’ambito applicativo, rappresenta “un caso a parte”, ogni tipologia di analisi è differente dalle altre e può presentare problematiche differenti anche a parità di matrice ma cambiando l’analita di interesse.

Generalmente le matrici biologiche sono analizzate soprattutto in ambito clinico, forense, tossicologico e possono essere suddivise in base a diversi “parametri”.

La prima classificazione che vedremo in questo paragrafo viene effettuata mediante la “convenzionalità” della matrice e dell’analisi chimico-clinica che si deve portare a termine.

In particolare si possono distinguere:

- matrici *convenzionali*: plasma, siero, urine, feci;
- matrici *non convenzionali*: saliva, bulbo pilifero, umor vitreo, formazioni cheratiniche, sudore;
- matrici *surrogate* o *simulate*.

Tale classificazione viene fatta fondamentalmente in base alla frequenza con la quale la specifica matrice viene analizzata in ambito chimico-clinico, anche se nella "guida" alla scelta della matrice e la tipologia di campione da analizzare gioca un ruolo fondamentale l'*ampiezza* dell'intervallo cronologico (o *finestra temporale*) che si vuole coprire nell'indagine.

Nel caso di prelievi ematici la "*finestra temporale*" risulta essere abbastanza ristretta e dipende dall'emivita dell'analita, dai processi metabolici, dallo stato clinico del soggetto.

Nel caso in cui si voglia "*ampliare*" la finestra temporale, si può ricorrere all'analisi in campioni di urina, permettendo di sapere se c'è stata esposizione all'analita, senza però dare informazioni inerenti allo stato attuale, in quanto in tale matrice si trovano generalmente i prodotti risultanti dal processo di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME).

Se si desidera ampliare ulteriormente tale intervallo si può fare ricorso all'analisi delle formazioni pilifere (o di matrici cheratiniche) che permettono di ottenere informazioni di tipo "*storico*", soprattutto quando si tratta di analisi tossicologiche o la necessità di informazioni inerenti l'uso di sostanze pregresso e più o meno continuato.

Considerando che tutta la strumentazione chimico-clinica per poter essere utilizzata necessita di essere calibrata, le metodiche validate e i batch di analisi devono essere controllati mediante i campioni per il controllo qualità (QC), si capisce come sia di fondamentale importanza avere a disposizione delle matrici "*bianche*" da poter utilizzare durante queste procedure. Per "*matrice bianca*" si intende una matrice, analoga a quella del campione reale che verrà poi analizzato, senza la presenza delle molecole di interesse, al fine di ottenere un metodo ed un modello di analisi che risponda quanto più possibile al reale campione incognito che si dovrà poi analizzare con tale metodica, oltre ad avere un controllo più puntuale e preciso dello stato dello strumento durante il batch di analisi. A complicare la situazione, durante il processo di validazione si considera non solo la matrice bianca derivante da un singolo "lotto" o donatore, ma si valuta anche quella che viene definita variabilità *intra-matrice*. Tale fenomeno trova riscontro nel fatto che la stessa tipologia di matrice biologica può variare di composizione percentuale generale, anche se di poco, da un "donatore" ad un altro, portando a dover valutare dal punto di vista analitico l'eventuale presenza di interferenti (o di "*effetto matrice*" se le analisi prevedono l'uso della spettrometria di massa).

Se tale tipologia di matrice bianca non è disponibile, si può ricorrere alle cosiddette "*matrici surrogate*" o "*matrici simulate*", ossia matrici biologiche prodotte *ad-hoc*. Conoscendo la composizione della reale matrice biologica, questa può, in linea di principio, essere riprodotta artificialmente in laboratorio senza la presenza dell'analita di interesse ed essere usata come alternativa per il processo di validazione, calibrazione e controllo qualità della procedura. In questo contesto, un esempio di matrice surrogata può essere rappresentato dal fluido gastrico simulato o il fluido intestinale simulato, le cui composizioni sono riportate nella **tabella 4.1**.

Qualora anche questa via non fosse percorribile, sarà possibile comunque applicare il metodo previa verifica di parametri quali la linearità e l'intervallo di linearità

TABELLA 4.1 *Composizione del fluido gastrico simulato e del fluido intestinale simulato*

Composto	Fluido gastrico simulato	Fluido intestinale simulato
Cloruro di sodio	34.2 mM	—
Fosfato di sodio monobasico anidro	—	50 mM
Acido cloridrico	84 mM	—
Idrossido di sodio	—	25 mM
Pepsina	2560 U/mL	—
Pancreatina	—	250 U/mL
Sali biliari	—	5 mM
pH	1.2	6.8

su campioni a concentrazione nota in solvente (o fase mobile), mentre per verificare parametri quali precisione (ripetibilità, precisione intermedia, riproducibilità), esattezza, LOD e LOQ, si dovrà operare in matrice (non bianca) fortificata con il composto di interesse e sottraendo poi il segnale relativo al valore endogeno prima dell'intero processo di elaborazione del dato.

4.2 Campionamento invasivo e non invasivo

Quanto visto finora deve essere integrato con una seconda possibile classificazione delle matrici biologiche in base all'invasività o meno del prelievo del campione biologico e si basa fundamentalmente sul maggiore rischio per la salute del paziente che si corre procedendo con quella determinata metodica.

Sulla base di queste indicazioni, si possono quindi ritrovare matrici derivanti da processi di campionamento:

- *invasivi*: liquor cefalorachidiano, biopsia cerebrale, prelievo di sangue;
- *non invasivi*: urine, feci, capelli, saliva, unghie.

In linea di principio e quando si può attuare senza avere una riduzione dell'informazione chimico-clinica, si tende a favorire l'esame che richiede il prelievo meno invasivo; quelli più invasivi sono considerati solo nel caso in cui il processo può essere sopportato senza grossi rischi, oppure se le condizioni del soggetto fanno supporre ad una patologia tanto grave da rendere accettabile il rischio di comprometterne ulteriormente la salute pur di ottenere un campione che permetta un'analisi più precisa ed esatta.

Vediamo ora le varie matrici dei campioni che si possono ritrovare in un laboratorio di chimica-clinica, prendendo in considerazione la funzione, la composizione generale, le finalità del prelievo, il campionamento (e i relativi dispositivi).

4.3 Sangue

Il sangue rappresenta circa l'8% del peso corporeo complessivo e svolge funzioni a livello fisiologico quali:

- respiratoria (trasporto di ossigeno e anidride carbonica);
- trasporto (nutrienti e prodotti del metabolismo, farmaci, ormoni);
- difensiva (attraverso i leucociti e le immunoglobuline);

- omeostatica (partecipa al controllo di parametri fondamentali quali temperatura e pH).

Il sangue rappresenta sicuramente la matrice principale delle analisi effettuate in ambito chimico-clinico in quanto è un fluido in circolo e che entra in contatto con la maggior parte dei sistemi ed organi e per questo è considerato il fluido biologico più rappresentativo dell'intero stato di salute dell'organismo. Principalmente la sua composizione può essere descritta come riportato in **tabella 4.2**.

Su tale matrice, in ambito chimico-clinico, vengono effettuate diverse tipologie di analisi, sia sulla componente corpuscolata che sul plasma. Generalmente tali indagini sono suddivise in "*panels*", ossia gruppi di analiti che vengono determinati per monitorare uno specifico elemento. In questo caso si possono distinguere i panel per:

- metabolismo di base;
- metabolismo complessivo;
- funzione epatica;
- epatite acuta;
- funzione renale;
- elettroliti;
- lipidi;
- gas nel sangue arterioso.

Ciascuno di questi presenta una serie di analiti specifici per determinare lo stato fisiologico e per la diagnosi in merito alla funzionalità di organi e sistemi.

Prima di procedere, è necessario sottolineare che con il termine "sangue" in realtà ci si riferisce a 3 differenti tipologie di matrice. Infatti il sangue viene distinto in sangue arterioso, venoso e capillare.

TABELLA 4.2 *Composizione del sangue*

	Percentuale	Componenti		Funzioni
Componente corpuscolata	45%	Eritrociti		Trasporto ossigeno
		Leucociti		Difensiva
		Piastrine		Coagulativa
Plasma	55%	Acqua (91%)		
		Elettroliti (1%)	Sodio, potassio, magnesio, calcio, cloruro, bicarbonato, fosfato	Controllo pH, bilancio osmotico, regolazione permeabilità delle membrane cellulari
		Proteine (7%)	Albumina	Bilancio osmotico
			Fibrinogeno	Coagulazione
			Globuline β	Trasporto
			Immunoglobuline A	Difensiva
		Altro (1%)	Nutrienti	
			Gas respirazione	
			Ormoni	
			Prodotti di scarto	

Il *sangue arterioso* viene prelevato da una arteria (femorale, brachiale o radiale) e presenta un profilo di ossigeno, anidride carbonica, glucosio e pH differente rispetto al sangue venoso. Il prelievo di norma è invasivo e per questo motivo è utilizzato solo per esami specifici quali la determinazione dei gas ematici e l'equilibrio acido-base.

Il *sangue venoso*, prelevato generalmente dalla vena cubitale, viene utilizzato per la maggior parte delle indagini chimico-cliniche. Particolare interesse riveste il sangue capillare, prelevato dal lobo dell'orecchio, dal polpastrello o dal calcagno dei neonati.

Il *sangue capillare* è una miscela di sangue arterioso, venoso e di liquido interstiziale e la sua importanza è data dal fatto che trova applicazione nelle analisi sui neonati, ma soprattutto perché, essendo di facile prelievo, rappresenta il campione principale utilizzato nei dispositivi portatili (vedi capitolo 12). Inoltre quando si parla di sangue nelle analisi in ambito chimico-clinico, si deve necessariamente fare un distinguo. Infatti viene prelevato il sangue, che poi viene processato per ottenere il siero o il plasma.

Il siero si ottiene da un prelievo di sangue senza uso di anticoagulanti ma lasciando il campione a riposo per 30-60 minuti (o usando agenti attivatori della coagulazione) e centrifugandolo a $2000-3000 \times g$. A seguito di centrifugazione si ottiene un corpo di fondo costituito dal coagulo di componenti cellulari in matrice di fibrina e il surnatante (siero). Il plasma si ricava sempre da un prelievo di sangue ma effettuato mediante l'utilizzo di anticoagulanti e che, dopo centrifugazione a $2000-3000 \times g$, si separa in eritrociti (corpo di fondo), leucociti e piastrine (deposito sul corpo di fondo) e plasma. Siero e plasma sono considerate 2 matrici equivalenti, anche se generalmente si preferisce analizzare il plasma in quanto è considerato un fluido biologico più "fisiologico" in quanto i fattori della coagulazione potrebbero alterare alcune componenti del siero (sottrae i fattori della coagulazione, le piastrine liberano enzimi durante la coagulazione e i campioni con diversi gradi di emolisi possono presentare maggiori concentrazioni di componenti intracellulari presenti negli eritrociti).

Prima di procedere con le procedure e i dispositivi per il prelievo di sangue, va ricordato come il processo di centrifugazione permetta un aumento di gravità rispetto alla gravità terrestre accelerando il processo di sedimentazione. La forza di gravità relativa a quella terrestre sviluppata artificialmente dalla centrifuga viene chiamata RCF (*Relative Centrifugal Force*) e viene indicata con il simbolo "g".

$$g = 1.118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2$$

In tale formula, g è la forza centrifuga relativa data dall'equazione, r = raggio dell'apparecchio in cm, N = velocità di rotazione in *rpm* (*rivoluzioni per minuto*). Quando si parla di centrifughe si deve tenere conto che il raggio di rotazione e la velocità di rotazione influiscono sulla RCF in base al nomogramma riportato in figura 4.1. In particolare nella figura viene riportato l'esempio di un rotore con raggio 50 mm che ruota a velocità di 40.000 rpm e che produce una RCF pari a $90'000 \times g$.

Inoltre quando si centrifugano dei campioni, si deve portare attenzione al bilanciamento della centrifuga, come riporta to in figura 4.2, al fine di evitare danni al rotore ed al sistema di rotazione che si ritroverebbe sbilanciato (rischiando di andare fuori asse).

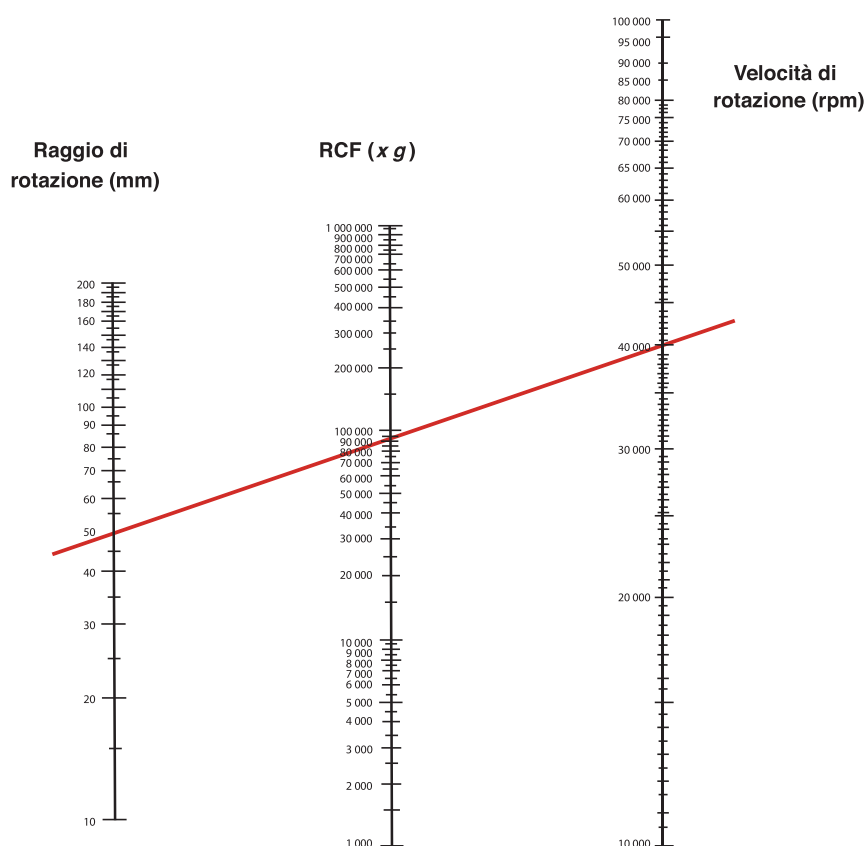


FIGURA 4.1 ▲ Nomogramma che permette di correlare rpm, RCF e raggio di rotazione.

La forza centrifuga eccessiva potrebbe causare emolisi nel campione di sangue, portando a possibili problemi in fase di analisi strumentale. Le moderne centrifughe possono essere dotate di rotori porta provette sia ad angolo fisso che basculante, oltre ad avere differenti adattatori per i vari formati delle provette. A loro volta le centrifughe possono essere sia da banco normali che refrigerate (nel caso che il campione contenga analiti termolabili).

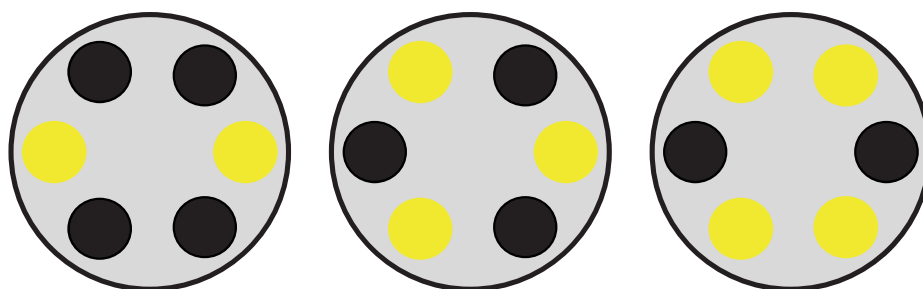


FIGURA 4.2 ▲ Bilanciamento di una centrifuga; in giallo sono indicate le posizioni occupate dalle provette (preventivamente pesate e bilanciate tra loro).



FIGURA 4.3 ▲ Sistema di prelievo Vacutainer®.

Da evidenziare che qualsiasi prelievo di sangue per scopi chimico-clinici (a meno di effettuare uno studio di farmacocinetica) viene effettuato nello stato basale, ossia di paziente a riposo, a digiuno da 6-8 ore, senza che il soggetto abbia assunto farmaci o sostanze che potrebbero interferire con i normali processi metabolici. Questo serve per poter ottenere dei risultati confrontabili con i valori di riferimento (così come esposto nel *paragrafo 3.2*).

4.3.1 Prelievo

Generalmente il prelievo di sangue venoso viene effettuato mediante dispositivi sterili che garantiscono sia la sicurezza dell'operatore che la correttezza e riproducibilità del processo. Attualmente vengono usate provette sotto vuoto contenenti additivi predosati (in base alle differenti analisi) e strumenti di prelievo usa e getta. Sicuramente i più utilizzati sono quelli prodotti dalla Vacutainer®, così come raffigurati nella *figura 4.3*.

All'interno di queste provette, gli additivi predosati possono essere: anticoagulanti, attivatori della coagulazione, inibitori enzimatici e agenti che facilitano la separazione di plasma o siero.

Discorso a parte riguarda i prelievi di sangue arterioso per misure relative ai gas disciolti. In questo caso si utilizzano siringhe che contengono generalmente eparina come agente anticoagulante ed inoltre sono in grado di isolare il campione dall'atmosfera esterna al fine di evitare contaminazione o variazione dei gas disciolti, come riportato in *figura 4.4*.

Discorso a parte è rappresentato dai dispositivi utilizzati per il prelievo di sangue capillare. Tali dispositivi, denominati "lancette", sono in grado di campionare piccoli volumi (meno di 1 mL), come mostrato in *figura 4.5*.

Va evidenziato che le provette per il prelievo del sangue presentano tappi di colorazione diversa in funzione del differente additivo eventualmente predosato presente al loro interno. Per capire le diverse funzioni, in *tabella 4.3* sono riportati i codici colore delle provette, che come vedremo di seguito sono fondamentali per procedere correttamente con le analisi strumentali quantitative.



FIGURA 4.4 ▲ Siringhe per prelievo di sangue arterioso per analisi di gas disciolti.



FIGURA 4.5 ▲ Lancette (a sinistra) e capillari (a destra) per il prelievo del sangue capillare.

L'ordine di prelievo non è casuale, ma deve seguire una determinata successione al fine di evitare di inquinare il campione successivo con additivi del prelievo precedente che potrebbero interferire con l'analisi quantitativa, in quanto il dispositivo di prelievo non viene sostituito. È noto che il citrato può interferire nella determinazione della fosfatasi alcalina, del calcio e del fosforo. L'EDTA (anticoagulante) può interferire con la determinazione della fosfatasi alcalina, del calcio, della creatin kinasi, del potassio, ferro e sodio.

Il corretto ordine di prelievo è riportato in tabella 4.4.

TABELLA 4.3 Codici colore e chiave di lettura delle principali provette per il prelievo del sangue

Prelievo	Colore		Additivo	Uso clinico/test
Raccolta siero	Rosso		—	Biochimica, TDM, immunologia
	Giallo		Gel (sterile)	Biochimica, TDM, immunologia
Raccolta sangue intero	Lavanda		EDTA	Ematologia, banca del sangue
	Nero		ESR	Sedimentazione
Raccolta plasma	Grigio		Fluoruro di sodio e ossalato di potassio	Glucosio
	Azzurro		Sodio citrato	Coagulazione
	Verde		Eparina (litio o sodio)	Chimica

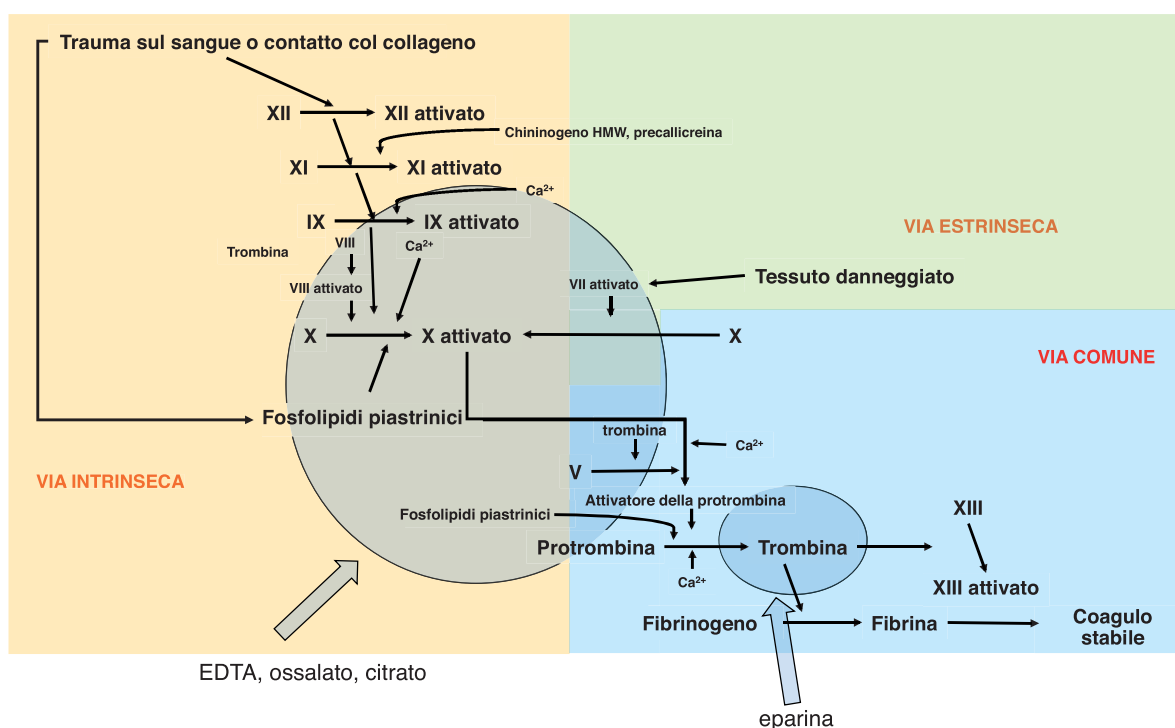
TABELLA 4.4 Ordine di prelievo del sangue in funzione del colore delle provette

Colore	Uso clinico/test	Razionale
Giallo	Provetta sterile	Minimizzare le possibili contaminazioni microbiche
Azzurro	Coagulazione	Evitare interferenti della coagulazione
Rosso	Biochimica, TDM, Immunologia	Prevenire contaminazione di additivi nelle provette successive
Verde	Chimica plasma	Eparina interferisce con coagulazione e con la raccolta del siero
Lavanda	Ematologia, Banca del sangue, Glucosio, Sedimentazione	Evitare problemi legati ad alti valori di calcio, potassio, sodio e ferro
Grigio		
Nero		

4.3.2 Anticoagulanti

In precedenza abbiamo fatto riferimento agli anticoagulanti, citando EDTA, ossalato, citrato ed eparina. Questi possono agire o sulla via intrinseca o sulla via comune della cascata coagulativa. In particolare, a seconda dell'anticoagulante utilizzato, sarà possibile monitorare una o l'altra via, come riportato in figura 4.6.

Altro fattore da considerare è il target clinico che si vuole determinare. È noto infatti che anticoagulanti quali eparina ed EDTA non possono essere usati (o per lo meno sono sconsigliati) per la determinazione del colesterolo, del calcio e cationi presenti nella formulazione e creatina kinasi. Il fluoruro è utilizzato nella determinazione del glucosio ma non per colesterolo, cloruri, CO₂ e calcio.


FIGURA 4.6 ▲ Descrizione delle vie di azione dei vari anticoagulanti.

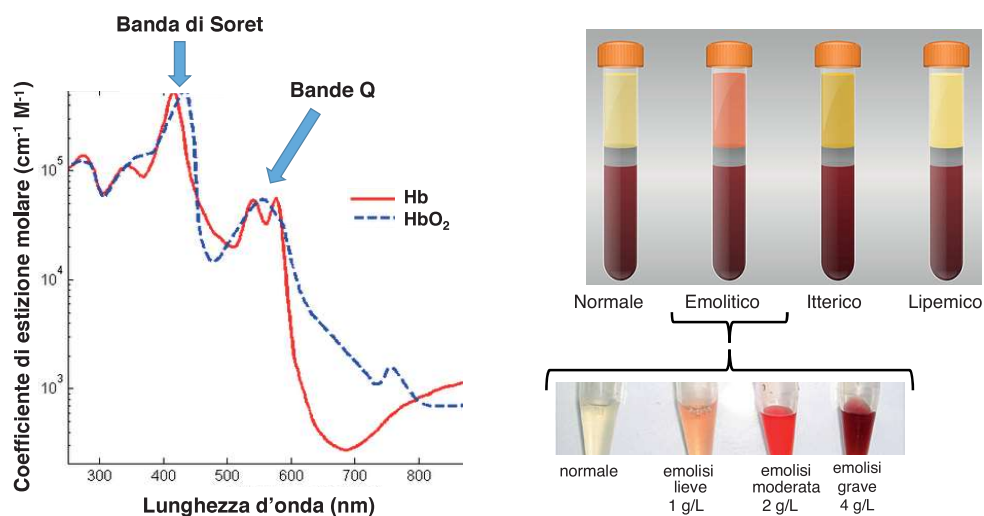


FIGURA 4.7 ▲ Descrizione dello spettro di assorbimento dell'emoglobina e dell'ossiemoglobina (a sinistra) e di come considerare un campione di plasma in base alla colorazione.

4.3.3 Emolisi

Il fenomeno di emolisi consiste nella lisi degli eritrociti ed è uno dei fenomeni che più spesso possono riscontrarsi in prelievi ematici. Rappresenta anche la principale fonte di errore in fase di analisi chimico-cliniche. L'effetto principale è la presenza di emoglobina nel campione di siero (o plasma). In particolare, l'emoglobina presenta uno spettro di assorbimento nella regione UV/Vis che comprende 2 forti bande, come evidenziato in **figura 4.7**.

Il fenomeno di emolisi può essere legato a differenti cause, in particolare possiamo avere emolisi chimica (o osmotica, nel momento in cui sono presenti aghi, siringhe o dispositivi contenenti acqua, alcool o disinfettanti), emolisi meccanica (derivante da stress meccanici da sforzi di taglio o da trazione subiti dagli eritrociti quali prelievo troppo veloce o processo di centrifugazione non corretto), emolisi fisica (il campione non viene conservato correttamente) ed emolisi da fattori biologici (quando è causata da patologie quali sferocitosi, deficit di enzimi eritrocitari, emolisine). Altri fattori che possono causare emolisi sono rappresentati da sbalzi termici, soprattutto se il campione viene sottoposto a temperature inferiori a quella di congelamento (si osserva una dilatazione del contenuto acquoso degli eritrociti e un conseguente aumento della trazione sulla membrana (o stroma), con aumento del rischio di rottura).

Il fenomeno può portare a diverse interferenze di tipo fisico, chimico o di alterazione dei valori biochimici. In particolare si osservano interferenze fisiche nel momento in cui l'emoglobina assorbe a 405 nm (banda di Soret) e provoca errori nelle determinazioni spettrofotometriche. In questo caso, da quando si osserva emolisi moderata (emoglobina a concentrazione pari a 2 g/L) il campione risulta essere inadatto per le analisi in ambito chimico-clinico.



Chimica analitica clinica

Accedi ai contenuti digitali > Espandi le tue risorse > con un libro che **non pesa** e si **adatta** alle dimensioni del tuo **lettore**



All'interno del volume il **codice personale** e le istruzioni per accedere ai contenuti digitali.
L'accesso alle risorse digitali è **gratuito** ma limitato a **18 mesi dalla attivazione del servizio**.

