

Comprende versione

ebook



Marcello Ciaccio • Giuseppe Lippi

Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio

III Edizione

Con il patrocinio di



Accedi ai contenuti digitali

Espandi le tue risorse

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



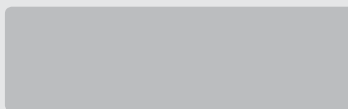
COLLEGATI AL SITO
EDISESUNIVERSITA.IT

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**.

Marcello Ciaccio • Giuseppe Lippi

Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio

III edizione



MARCELLO CIACCIO e GIUSEPPE LIPPI
Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio – III edizione
Copyright © 2020, EdiSES Università S.r.l. – Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
2024 2023 2022 2021 2020

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 tito-
lare del copyright e resta comunque a disposizione di tutti
gli eventuali aventi diritto*

Fotocomposizione:
Vincenzo Scasserra

Stampato presso la
Tipolitografia Sograte S.r.l.
Zona Ind. Regnano – Città di Castello (PG)

Per conto della
EdiSES Università S.r.l. – Piazza Dante, 89 – Napoli

www.edisesuniversita.it

ISBN 9788836230228

I curatori, l'editore e tutti coloro in qualche modo coinvolti nella preparazione o pubblicazione di quest'opera hanno posto il massimo impegno per garantire che le informazioni ivi contenute siano corrette, compatibilmente con le conoscenze disponibili al momento della stampa; essi, tuttavia, non possono essere ritenuti responsabili dei risultati dell'utilizzo di tali informazioni e restano a disposizione per integrare la citazione delle fonti, qualora incompleta o imprecisa.

Realizzare un libro è un'operazione complessa e, nonostante la cura e l'attenzione poste dagli autori e da tutti gli addetti coinvolti nella lavorazione dei testi, l'esperienza ci insegna che è praticamente impossibile pubblicare un volume privo di imprecisioni. Saremo grati ai lettori che vorranno inviarci le loro segnalazioni e/o suggerimenti migliorativi su assistenza.edises.it.

Presentazione

Nel mondo accademico sono stati pubblicati negli ultimi due decenni diversi trattati e manuali descrittivi dei principali aspetti del complesso disciplinare e culturale perseguiti dalla Medicina di Laboratorio e dalla Biochimica Clinica nel proprio iter scientifico e nell'importante attività in favore delle Scienze Mediche a livello Clinico.

In realtà, è solo da poco più di un ventennio che la Medicina di Laboratorio e le sue principali branche hanno ricevuto, come discipline a sé stanti, l'accesso ai curricula del Corso di Studio in Medicina e Chirurgia, nonché a quelli delle lauree triennali delle Scienze Sanitarie. Ciò a favore del personale che, giustamente, ormai anche in Italia viene formato nelle varie filiere di attività sanitaria che affiancano i Medici per la cura, l'assistenza e anche per gli aspetti preventivi della stessa Medicina.

Nonostante il fervore, anche in campo editoriale, di cui accennavo all'inizio, quando sono stato officiato dagli Autori/Coordinatori di questo nuovo volume, sono stato molto lieto di accettare la richiesta di presentarlo, in quanto sento una duplice motivazione di incitamento a svolgere questo privilegiato compito. La prima motivazione è stata dettata dal nome e dal valore professionale e accademico dei due Autori/Coordinatori, che conosco da anni, e con cui v'è ottima amicizia personale legata soprattutto a sentimenti di stima e di elevata considerazione accademica. L'attenzione è stata incrementata e avvalorata dal "parterre" veramente notevole degli altri Autori dei capitoli del libro, per la verità tutti validi Colleghi, nonché tutti esperti nel settore di studio e di attività, motivo per il quale sono stati coinvolti nella stesura dello stesso volume. La seconda motivazione, se possibile ancor più interessante, è dovuta alla validità del contenuto, in quanto forse, per lo meno a giudicare dalle mie conoscenze, si tratta di un volume che per la prima volta approccia con insistenza, prevalentemente, il problema della Medicina di Laboratorio con forti sottolineature dal punto di vista delle finalità medico-cliniche. Quest'ultime, infatti, rappresentano l'essenza finale del portato della Disciplina, o meglio dell'area disciplinare che essa è tenuta a svolgere nell'ambito della Medicina Clinica. In altre parole, e per essere più specifici e diretti su questa valutazione, il taglio che il manuale vuole dare non è tanto e non solo la descrizione delle metodologie analitiche che vengono quotidianamente adoperate nei laboratori *ad hoc* e non tanto e non solo la descrizione fisiopatologica dei vari tessuti e organi colpiti eventualmente da alterazioni morbose, ma soprattutto il diretto e più specifico legame o derivazione dei composti biologici individuati e/o dosati nei liquidi e tessuti dell'uomo con la possibilità di diagnosi, *follow-up* e terapia per la loro valenza nella decisione clinica susseguente.

Ecco, quindi, che specialmente se si aggiunge l'aspetto della prevenzione, si possono in diversi casi raggiungere finalità di ottimo valore clinico e quindi di grande valore aggiunto nel campo della terapia. Si fa qui riferimento sia alla prevenzione detta **secondaria**, data dalla diagnosi più precoce possibile – e qui si deve tener presente che, mentre nella diagnostica per immagini sono necessarie alcune centinaia di migliaia di cellule

alterate per poter discriminare il sano dal putativo ammalato con i metodi sempre più sensibili, in Medicina di Laboratorio il numero delle molecole rivelatrici di malattie potrebbe, e lo è in alcuni casi, essere rilevabile, ai fini discriminatori tra patologia e fisiologia, perfino attraverso l'analisi su *single cell*, oggi ormai alle frontiere delle tecnologie – sia alla prevenzione della **Medicina Predittiva** – dove il ritrovamento di *single one-base mutation* a livello di DNA della linea geminale può significare aumento di rischio del verificarsi di una patologia importante, per esempio un tumore, e che, attraverso le metodologie di ultima generazione, rende possibile, con elevatissimo grado di sensibilità analitica e di conseguenza sensibilità diagnostica, effettuare una procedura di *follow-up* preventivo che diminuisca fortemente il rischio di ritardo diagnostico, e addirittura consente procedure sia mediche sia chirurgiche dirette a prevenire l'insorgenza della stessa patologia.

La Medicina di Laboratorio è stata detta, forse un po' scherzosamente o forse anche con un po' di presunzione, l'unica branca della Medicina che svolge "il ruolo della Medicina Interna", oggi sempre più dotata di "complessivo sentore di obsolescenza" a causa della "invasività" della medicina specialistica suddivisa in tante branche che appaiono spesso come compartimenti stagni a volte poco comunicanti tra di loro. Solo la diagnostica a tutto campo nell'uomo, e in particolare la Medicina di Laboratorio, riesce a far visualizzare una Medicina più personalizzata, cioè tesa all'analisi complessiva della persona umana, che presenta a volte alterazioni patologiche non prevedibili con un semplice esame obiettivo o anche con una sintomatologia che interessa un certo organo o apparato. Manca cioè la visione olistica dell'individuo in fase di malattia non conclamata, che è l'unica a dare l'idea della vera Medicina personalizzata dell'individuo in esame e che, in svariate occasioni, proprio la Medicina di Laboratorio consente di offrire al medico curante.

Il volume non manca ovviamente di sottolineare in capitoli specifici gli elementi essenziali di metodologie operative e di sistematiche di laboratorio diagnostico, che devono essere presenti nell'operatività nonché nell'interpretazione dei dati di laboratorio per essere significativamente utili alla valutazione clinica.

Ogni lavoro eccellente, come è questo trattato di Ciaccio e Lippi, non può essere definito tale se colui che lo presenta non vi trova qualche pecca. Per evitare questo, mi permetto di rilevare che forse un maggiore approfondimento della Biologia Molecolare Clinica lo avrebbe arricchito di una parte un po' atipica ma indispensabile oggi per un laboratorio dedicato ad adiuvarne la clinica nel modo più moderno e attuale.

Auguro di tutto cuore a quest'opera un grande successo e un'ampia diffusione con la speranza altresì che, in aggiunta agli studenti del Corso di Studio, come ho accennato all'inizio, anche gli operatori sanitari, gli specializzandi e i Medici che vogliono aggiornarsi in questo ampio settore della Medicina abbiano la possibilità di leggere e, soprattutto, studiare i capitoli di questo volume. Questo permetterebbe loro di meglio aggiornarsi e attrezzarsi alle modernità delle conoscenze mediche nella tipologia della Diagnostica di Laboratorio, quelle conoscenze cioè che la ricerca scientifica ha portato anche in modo rilevante e concreto allo stesso tempo all'attenzione dei Colleghi impegnati nel lavoro clinico.

Francesco Salvatore

Professore Emerito di Biochimica Umana

Membro dell'Accademia delle Scienze (detta dei XL), Roma

Prefazione III edizione

Il notevole successo della prima e della seconda edizione del volume “Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio”, pubblicati recentemente, ed il continuo progresso della disciplina ci hanno indotti a redigere una terza edizione mantenendo l'impostazione delle precedenti. Ogni capitolo è, infatti, caratterizzato da un'introduzione, con cenni di biochimica e fisiopatologia, propedeutica per la piena comprensione degli aspetti biochimico-clinici dei vari argomenti trattati. In questa terza edizione, tutti i capitoli sono stati revisionati e, dove necessario, aggiornati in base alle ultime linee guida ed evidenze scientifiche, e nuovi importanti capitoli sono stati aggiunti.

Una novità estremamente interessante di questa edizione è la presenza, alla fine del testo, di una tabella in cui sono riportati i valori di riferimento e diagnostici dei principali parametri di laboratorio, in modo da fornire agli Studenti uno strumento che possa essere rapidamente consultato e facilitare la comprensione e lo studio della materia.

Questo testo, fin dalla sua prima edizione, è rivolto agli Studenti di Medicina e Chirurgia, delle Lauree Biomediche ed agli Specializzandi in Patologia Clinica e Biochimica Clinica che desiderano avere una conoscenza ampia, completa e approfondita della Biochimica Clinica e della Medicina di Laboratorio e che desiderano approfondire aspetti specifici del laboratorio clinico ed aggiornarsi sui progressi tecnologici e biotecnologici in ambito medico.

Un rinnovato ringraziamento alla Dottoressa Luisa Agnello che ha curato le bozze della terza edizione con immutato impegno e straordinaria passione.

*Marcello Ciaccio
Giuseppe Lippi*

Autori

Luisa AGNELLO

Ricercatore di Biochimica Clinica
Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare
Clinica e Medicina di Laboratorio, Dipartimento di
Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi
di Palermo

Gaetano BERNARDI

UO Patologia Clinica e Genetica Medica, Istituto Neu-
rologico Carlo Besta, Milano

Sergio BERNARDINI

Ordinario di Biochimica Clinica
UOC Laboratorio di Biochimica Clinica, Università de-
gli Studi di Roma "Tor Vergata"
Past President SIBioC – Medicina di Laboratorio

Giulia BIVONA

Ricercatore Biochimica Clinica
Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare
Clinica e Medicina di Laboratorio, Dipartimento di
Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi
di Palermo

Chiara BONAGURI

SS Diagnostica delle Malattie Autoimmuni, Laborato-
rio di Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedalie-
ro-Universitaria, Parma

Chiara BOVO

Direzione Sanitaria, Azienda Ospedaliera Universitaria
Integrata di Verona

Federica BRAGA

Centro di Ricerca per la Riferibilità Metrologica in Me-
dicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi
di Milano

Sabrina BUORO

UOSC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera
Papa Giovanni XXIII, Bergamo

Anna CALDINI

Laboratorio Generale, Dipartimento Aziendale Inte-
grato dei Servizi, Azienda Ospedaliero-Universitaria
Careggi, Firenze

Ettore CAPOLUONGO

Ordinario di Biochimica Clinica
Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie
Mediche, Università degli Studi "Federico II" di Napoli

Paolo CARRARO

Laboratorio Analisi, Azienda ULSS12 Veneziana, Mestre

Giuseppe CASTALDO

Ordinario di Scienze Tecniche di Medicina di Laboratorio
Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie
Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II"
e CEINGE – Biotecnologie avanzate, Napoli
Past President SIBioC - Medicina di Laboratorio

Ferruccio CERIOTTI

Laboratorio analisi, Dipartimento Servizi e Medicina
Preventiva, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano
Past President SIBioC - Medicina di Laboratorio

Gianfranco CERVELLIN

Dipartimento interaziendale di Emergenza-urgenza
dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

Marcello CIACCIO (Coordinatore)

Ordinario di Biochimica Clinica
Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare
Clinica e Medicina di Laboratorio, Dipartimento di
Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata,
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi
di Palermo, Dipartimento e UOC di Medicina di La-
boratorio del Policlinico Universitario di Palermo
Past President SIBioC - Medicina di Laboratorio

Aldo CLERICO

Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

Carlo CORBETTA

Laboratorio di Riferimento Regionale per lo Screening
Neonatale, Ospedale dei Bambini "V. Buzzi" – ASST
Fatebenefratelli Sacco, Milano

Elisa DANESE

Ricercatore di Biochimica Clinica
Sezione di Biochimica Clinica, Scuola di Medicina e
Chirurgia, Università degli Studi di Verona

Valeria D'ARGENIO

Ricercatore di Biochimica Clinica
Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie
Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II"
e CEINGE – Biotecnologie Avanzate, Napoli

Carlo DIONISI VICI

UOC Patologia Metabolica – Dipartimento Pedia-
trie Specialistiche Ospedale Pediatrico Bambino Gesù
IRCCS, Roma

Aline S.C. FABRICIO

Istituto Oncologico Veneto IOV – IRCCS Padova

Massimo FRANCHINI

Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusio-
nale, Azienda Ospedaliera Carlo Poma, Mantova

Gianluca GESSONI

Primario Servizio di Medicina Trasfusionale della ULSS
12 Veneziana
Direttore Dipartimento InterAziendale di Medicina
Trasfusionale della Provincia di Venezia, Ospedale
dell'Angelo

Massimo GION

Centro e Programma Regionale Biomarcatori Diagno-
stici, Prognostici e Predittivi, AULSS3 Serenissima,
Ospedale Santi Giovanni e Paolo, Venezia

Maria Stella GRAZIANI

Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona

Gian Cesare GUIDI

Emerito di Biochimica Clinica
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi
di Verona

Ilenia INFUSINO

UOC Patologia Clinica, Ospedale "Luigi Sacco" – Polo
Universitario, ASST Fatebenefratelli Sacco, Milano

Giuseppe LIPPI (Coordinatore)

Ordinario di Biochimica Clinica
Sezione di Biochimica Clinica
Scuola di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi
di Verona
Segretario della European Federation of Clinical Che-
mistry and Laboratory Medicine (EFLM)

Bruna LO SASSO

Ricercatore di Biochimica Clinica
Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare
Clinica e Medicina di Laboratorio, Dipartimento di
Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi
di Palermo

Raffaele LODI

Ordinario di Neuroradiologia
Dipartimento di Scienze Biomediche e NeuroMotorie,
Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Barbara LOMBARDO

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie
Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II"
e CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli

Fabio MANONI

Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura ULSS6 Euga-
nea, Ospedale Madre Teresa di Calcutta, Schiavonia (PD)

Camilla MATTIUZZI

Servizio Governance Clinica, Azienda Provinciale per i
Servizi Sanitari di Trento

Alessandra MELEGARI

Laboratorio di Patologia Clinica, Tossicologia e Dia-
gnostica avanzata, Ospedale Baggiovara, Modena

Martina MONTAGNANA

Associato di Biochimica Clinica
Sezione di Biochimica Clinica
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi
di Verona

Michele MUSSAP

Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Scienze Chi-
rurgiche, Università di Cagliari

Cosimo OTTOMANO

Synlab Italia, Monza

Franca PAGANI

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Fondazione
Poliambulanza Istituto Ospedaliero, Brescia

Mauro PANTEGHINI

Ordinario di Biochimica Clinica
UOC Patologia Clinica, Ospedale “Luigi Sacco”, Università degli Studi di Milano
Centro di Ricerca per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi di Milano

Lucio PASTORE

Ordinario di Biochimica Clinica
Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli “Federico II” e CEINGE – Biotecnologie Avanzate, Napoli

Mario PLEBANI

Ordinario di Biochimica Clinica
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Università degli Studi di Padova
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Padova
Past President SIBioC – Medicina di Laboratorio

Gian Luca SALVAGNO

Associato di Biochimica Clinica
Sezione di Biochimica Clinica
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona

Francesco SALVATORE

Emerito di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Napoli “Federico II”
CEINGE – Biotecnologie Avanzate, Napoli
Past President SIBioC - Medicina di Laboratorio

Giulia SANCESARIO

IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

Alda Tiziana SCACCHETTI

Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata “Medicina di laboratorio e Anatomia Patologica”, Ospedale Baggiovara, Modena

Claudia TESTA

Ricercatore di Biochimica Clinica
Dipartimento di Scienze Biomediche e NeuroMotorie, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Caterina TONON

Ordinario di Biochimica Clinica
Dipartimento di Scienze Biomediche e NeuroMotorie, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Tommaso TRENTI

Laboratorio di Patologia Clinica, Tossicologia e Diagnostica avanzata, Ospedale Baggiovara, Modena

Chiara TREVISIOL

Istituto Oncologico Veneto IOV – IRCCS Padova

Martina ZANINOTTO

Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Università degli Studi di Padova
Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Padova

Indice generale

CAPITOLO 1 • IL RUOLO DELLA MEDICINA DI LABORATORIO NEL CONTESTO CLINICO

1

Introduzione	1
Integrazione tra laboratorio e clinica.....	2
Appropriatezza in medicina di laboratorio	3
Medicina di precisione	4
LETTURE CONSIGLIATE	6

CAPITOLO 2 • IL PROCESSO DIAGNOSTICO DI LABORATORIO

7

Il processo diagnostico	7
Il processo diagnostico di laboratorio.....	8
L'informazione di laboratorio e il ragionamento diagnostico.....	10
Come migliorare il processo diagnostico di laboratorio.....	11
Indicatori di qualità e di esito.....	13
LETTURE CONSIGLIATE	14

CAPITOLO 3 • ELEMENTI DI ORGANIZZAZIONE DI LABORATORIO BIOMEDICO

16

I settori del laboratorio biomedico	16
Il collegamento informatico	19
Modelli organizzativi della rete dei laboratori.....	19
I ruoli e le mansioni del personale di laboratorio analisi.....	20

CAPITOLO 4 • LA QUALITÀ DEL RISULTATO DI LABORATORIO: FONTI DI VARIABILITÀ, MODALITÀ DI VALUTAZIONE E STIMA DEL LORO IMPATTO CLINICO

23

Fonti di variabilità del risultato.....	23
• Variabilità analitica: principali fonti di errore e loro definizione	23
• Variabilità biologica	25

Definizione delle specifiche delle prestazioni analitiche	27
• Modello basato sull'impatto sull' <i>outcome</i> clinico	27
• Modello basato sulla variabilità biologica dell'analisi	28
• Modello basato sullo stato dell'arte della misura	29
• Utilizzo delle APS e loro importanza nella valutazione e nella sorveglianza della qualità analitica	29
LETTURE CONSIGLIATE	31

CAPITOLO 5 • GENERALITÀ SUGLI ESAMI DI LABORATORIO E SUI BIOMARCATORI

32

Introduzione agli esami di laboratorio e ai biomarcatori	32
Le caratteristiche ideali di un biomarcatore	33
Possibili cause di aumento dei biomarcatori	37
Efficienza ed efficacia diagnostiche	38
Glossario utile.....	38
LETTURE CONSIGLIATE	39

CAPITOLO 6 • PRINCIPALI DETERMINAZIONI ENZIMATICHE E LORO IMPIEGO CLINICO

40

Introduzione	40
Fattori che influenzano la concentrazione plasmatica degli enzimi.....	40
• Rilascio degli enzimi dalle cellule	41
• Efflusso degli enzimi dalle cellule danneggiate	41
• Produzione alterata di enzimi	41
• Clearance degli enzimi.....	42
Scelta dei test enzimatici.....	42
Enzimi muscolari	42
• Creatin chinasi	42
Enzimi epatici.....	44
• Transaminasi	44
• Fosfatasi alcalina.....	45
• γ -glutammina transferasi	47

➤ Enzimi pancreatici	47
• Lipasi.....	47
• Amilasi (pancreatica).....	48
➤ Enzimi ossei.....	49
• Fosfatasi alcalina (isoforma ossea).....	49
• Fosfatasi acida (isoforma 5b tartrato-resistente).....	50
➤ Altri enzimi.....	50
• Lattato deidrogenasi.....	50
• Colinesterasi (pseudocolinesterasi)	51
LETTURE CONSIGLIATE	53

CAPITOLO 7 • FEGATO

55

➤ Itteri	55
• Metabolismo della bilirubina.....	55
• Classificazione degli itteri.....	57
• Diagnosi.....	60
➤ Epatite	62
• Epatite virale	62
• Epatite iatrogena	72
➤ Steatosi, fibrosi e cirrosi.....	74
• Steatosi epatica non alcolica.....	74
• Epatopatia alcolica	75
• Fibrosi.....	77
• Cirrosi.....	79
➤ Alcolismo	82
• Introduzione	82
• Metabolismo dell'etanolo.....	82
• Alterazioni cliniche correlate all'alcol.....	84
• Biomarcatori di alcolismo	84
➤ Neoplasie epatiche	86
LETTURE CONSIGLIATE	88

CAPITOLO 8 • DIAGNOSTICA PROTEICA

90

➤ Discrasie plasmacellulari.....	90
• Rilevanza clinica	90
• Tecnologia separativa.....	93
• Diagnostica di laboratorio	96
➤ Principali proteine sieriche di rilevanza clinica	99
• Albumina	99
• α 1-antitripsina	100
• Aptoglobina.....	100
• β 2-microglobulina	100
• Ceruloplasmina	101
• Sistema del complemento	101
• Fattore reumatoide	102
• Immunoglobuline.....	102
• Proteina C reattiva.....	103
• Transtiretina	103
LETTURE CONSIGLIATE	104

CAPITOLO 9 • BIOMARCATORI DELLO STATO NUTRIZIONALE

105

➤ Introduzione	105
➤ Malnutrizione	105
➤ Valutazione dello stato nutrizionale	107
• Biomarcatori dello stato nutrizionale.....	108
LETTURE CONSIGLIATE	110

CAPITOLO 10 • DISLIPIDEMIE

111

➤ Lipoproteine.....	111
• Chilomicroni e chilomicroni <i>remnants</i>	112
• VLDL e IDL.....	112
• LDL	112
• HDL	113
• Lp(a)	113
➤ Apolipoproteine	113
➤ Molecole coinvolte nel metabolismo delle lipoproteine	113
• Recettore delle LDL.....	113
• Recettore <i>scavenger</i> di classe B tipo 1 (SR-B1)	114
• Trasportatore di membrana ATP-dipendente A1 (ABCA1)	114
• Trasportatore di membrana ATP-dipendente G1 (ABCG1)	114
• Trasportatori di membrana ATP-dipendenti G5 e G8 (ABCG5/ABCG8)	115
• AcilCoA-colesterolo acil transferasi (ACAT)	115
• Lipoproteina lipasi (LPL)	115
• Lipasi epatica.....	115
• Lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT)	115
• Proteina di trasferimento degli esteri I colesterolo (CETP)	115
➤ Metabolismo delle lipoproteine e dei lipidi	115
• Via esogena del metabolismo lipidico	115
• Via endogena del metabolismo lipidico	116
• Trasporto inverso del colesterolo	117
➤ Classificazione delle dislipidemie	118
• Classificazione di Fredrickson.....	118
• Classificazione patogenetica.....	118
➤ Dislipidemie e rischio cardiovascolare	121
➤ Diagnosi delle dislipidemie.....	122
• Determinazione del profilo lipidico	123
• Diagnosi delle dislipidemie familiari	125
➤ Trattamento e terapia	127
• Modificazioni dello stile di vita per migliorare il profilo lipidico	127
• Terapia farmacologica.....	128
LETTURE CONSIGLIATE	129

CAPITOLO 11 • DIAGNOSTICA EMATOLOGICA

130

➤ Definizione di anemia.....	130
➤ Esame emocromocitometrico.....	131
• Misura dell'emoglobina.....	131
• Misura dell'ematocrito	131

• Conte cellulari	132
• Indici eritrocitari e misure di distribuzione.....	134
• Indici piastrinici e piastrinocrito	137
• Reticolociti e indici reticolocitari	138
• Conta differenziale dei leucociti (formula leucocitaria)	141
• Conta differenziale al microscopio	142
• Conta differenziale automatizzata.....	142
➤ Le principali forme di anemia	143
• Anemie microcitiche.....	143
• Anemie normocitiche.....	152
• Anemie macrocitiche	162
➤ Alterazioni delle piastrine.....	164
• Valutazione della funzione piastrinica <i>in vitro</i> con PFA-100.....	166
LETTURE CONSIGLIATE	167

CAPITOLO 12 • IMMUNOEMATOLOGIA 168

➤ Immunoematologia eritrocitaria	168
• Antigeni gruppo-ematici eritrocitari.....	168
• Anticorpi	170
• Reazione antigene-anticorpo in immunoematologia eritrocitaria	170
• Sistemi antigenici gruppo-ematici eritrocitari.....	171
➤ Elementi di immunoematologia granulocitaria e piastrinica.....	180
• Immunoematologia granulocitaria.....	180
• Immunoematologia piastrinica.....	180
➤ Aspetti analitici di immunoematologia eritrocitaria.....	181
• Determinazione del gruppo ABO.....	181
• Determinazione del tipo D e del fenotipo Rh	183
• Studio degli antigeni appartenenti ad altri sistemi gruppo-ematici eritrocitari.....	183
• Ricerca degli anticorpi anti-eritrocitari.....	184
• Test indiretto all'antiglobulina (test di Coombs indiretto)	184
• Test diretto all'antiglobulina (test di Coombs diretto)	186
• Applicazioni della biologia molecolare all'immunoematologia eritrocitaria	187
LETTURE CONSIGLIATE	188

CAPITOLO 13 • EMOSTASI 189

➤ Sistema vascolare.....	189
➤ Bilancio emostatico	190
➤ Fasi dell'emostasi.....	190
• Emostasi primaria	190
• Emostasi secondaria.....	194
• Fibrinolisi	198
➤ Disordini congeniti dei fattori della coagulazione	199
➤ Esami di laboratorio per lo studio dell'emostasi.....	200
• Campione biologico	201
• Tempo di protrombina (PT).....	202
• Tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT)	202
• Dosaggio del fibrinogeno (Fbg).....	203
• Tempo di trombina (TT).....	203
• Test di miscela	203

➤ Terapia anticoagulante	204
• Eparine e fondaparinux	204
• Inibitori della vitamina K (VKA)	205
• Inibitori diretti dei fattori II e X.....	205
• Terapia antiaggregante	205

CAPITOLO 14 • TROMBOFILIA 206

➤ Cause ereditarie ed acquisite di trombofilia	206
➤ <i>Screening</i> trombofilico.....	207
• Indicazioni per l'esecuzione dello <i>screening</i> trombofilico	207
➤ Diagnosi di laboratorio.....	207
➤ Fattori interferenti con lo <i>screening</i> trombofilico	209
LETTURE CONSIGLIATE	209

CAPITOLO 15 • RENE 210

➤ Malattia renale	210
• Malattia renale cronica (CKD)	211
• Danno renale acuto (AKI).....	212
• Nefropatia acuta da mezzo di contrasto.....	213
➤ Diagnostica di laboratorio delle malattie renali	214
• Esame standard dell'urina	215
• Azoto.....	216
• Urea.....	216
• Creatinina	217
• Stima del filtrato glomerulare mediante formule.....	219
• Proteine plasmatiche di basso peso molecolare.....	221
• Biomarcatori di lesione tubulo-interstiziale.....	222
• NGAL	223
• Proteinurie	223
• Albuminuria.....	225
LETTURE CONSIGLIATE	228

CAPITOLO 16 • ESAME CHIMICO-FISICO E MORFOLOGICO DELLE URINE (ECMU) 230

➤ Introduzione	230
➤ Fase pre-analitica.....	231
• Raccolta del campione.....	231
• Conservazione del campione	231
• Arrivo al laboratorio	232
➤ Fase analitica	232
• Ispezione visiva.....	232
• Esame chimico-fisico.....	233
• Conteggio e morfologia della componente corpuscolata.....	238
➤ Fase post-analitica.....	244
• Il referto dell'esame chimico-fisico e morfologico delle urine (ECMU)	245
LETTURE CONSIGLIATE	245

CAPITOLO 17 • DISORDINI IDRO-ELETTROLITICI 247

➤ Cenni di fisiopatologia	247
➤ Bilancio idrico	248
➤ Bilancio del sodio	249
• Iponatremia	250
• Ipernatremia	253
➤ Bilancio del potassio	255
• Ipokaliemia	256
• Iperkaliemia	258
LETTURE CONSIGLIATE	261

CAPITOLO 18 • EMOGASANALISI 262

➤ Introduzione	262
➤ Cenni di fisiopatologia	262
• Stato dell'ossigenazione	262
• Equilibrio acido-base	263
➤ Strumentazione	264
➤ Principali variabili misurate e calcolate	265
• pH	265
• $p\text{CO}_2$ e $p\text{O}_2$	265
• CO_2 concentrazione totale	265
• Bicarbonati	265
• Eccesso di basi	265
• Eccesso di basi nel sangue	265
• Emoglobina totale	265
• Frazioni dell'emoglobina	265
• Saturazione di ossigeno	266
• Tensione di ossigeno di semi-saturazione ($p50$)	266
➤ Fase pre-analitica	266
• Preparazione del paziente	266
• Materiali per il prelievo	266
• Sede del prelievo arterioso	266
• Trasporto e conservazione	268
➤ Analisi	268
➤ Validazione	269
➤ Controllo di qualità	269
➤ Referto	270
➤ Emogasanalisi in varie situazioni	270
• Pronto soccorso	270
• Sala operatoria	270
• Terapia intensiva e unità coronarica	270
• Valutazione pneumologica	270
• Trattamenti dialitici	270
➤ Interpretazione dei risultati	271
• Interpretazione classica	271
• Approccio quantitativo di Stewart	271
• Approccio clinico	272
➤ Gestione integrata del POCT	272
LETTURE CONSIGLIATE	273

CAPITOLO 19 • BIOMARCATORI CARDIACI 274

➤ Introduzione	274
➤ Biomarcatori di danno miocardico	276
• Caratteristiche biochimiche e funzione biologica delle troponine	276
• Rilevanza clinica della misura delle troponine	276
• Specifiche di qualità dei metodi di misura delle troponine	277
• Interpretazione clinica dei risultati ottenuti con i metodi a elevata sensibilità analitica	278
➤ Biomarcatori di funzionalità cardiaca	279
• Caratteristiche biochimiche e attività biologica dei peptidi natriuretici cardiaci	279
• Rilevanza clinica della misura dei peptidi natriuretici cardiaci	280
• Interpretazioni fisiopatologica e clinica delle variazioni dei livelli circolanti del BNP/NT-proBNP	280
➤ Biomarcatori di rimodellamento e fibrosi del miocardio	282
• Fibrosi cardiaca	283
• Biomarcatori di sintesi e degradazione del collagene	284
• Biomarcatori di fibrosi miocardica	285
➤ Biomarcatori "genetici" associati alle malattie cardiovascolari	287
LETTURE CONSIGLIATE	289

CAPITOLO 20 • BIOMARCATORI DI ICTUS 291

➤ Definizione di ictus	291
➤ Diagnosi e terapia	293
➤ Biomarcatori	293
• Lp-PLA2	294
• ADMA	294
• MMP-9	295
• $\text{S100-}\beta$	295
• Peptidi recettori dell'NMDA	295
• GFAP	295
• PARK7	295
• NDKA	295
LETTURE CONSIGLIATE	296

CAPITOLO 21 • SISTEMA ENDOCRINO 297**IPOFISI**

➤ Cenni di anatomia	297
➤ Adenoipofisi	297
• Ormone della crescita	298
• Prolattina	305
➤ Neuroipofisi	307
• Ormone antidiuretico e ossitocina	307
• Indagini di laboratorio	310
• Diagnosi e terapia	312

TIROIDE

➤ Cenni di anatomia.....	314
➤ Ormoni tiroidei	314
• Biosintesi e secrezione.....	314
• Regolazione della secrezione tiroidea e TSH	316
• Trasporto degli ormoni tiroidei.....	317
• Meccanismo d'azione degli ormoni tiroidei.....	317
➤ Indagini di laboratorio	318
• Dosaggio di TSH, FT4 e FT3	318
• Autoanticorpi.....	319
➤ Diagnosi e terapia.....	319
• Ipertiroidismo primitivo.....	320
• Ipotiroidismo primitivo.....	320
• Tiroiditi.....	320

PARATIROIDI

➤ Cenni di anatomia.....	321
➤ Paratormone (PTH).....	321
• Sintesi, secrezione, metabolismo e meccanismo d'azione.....	321
• Azioni biologiche	322
➤ Regolazione della calcemia e dell'omeostasi calcio-fosforo	323
• Peptide correlato al PTH	323
• Fosforo.....	324
• Ipercalcemia.....	324
• Ipocalcemia.....	325
➤ Indagini di laboratorio.....	327
• Calcemia.....	327
• Determinazione dell'albumina	327
• Valutazione della funzionalità renale.....	327
• Dosaggio del magnesio plasmatico	327
• Dosaggio del fosfato plasmatico o sierico.....	327
• Dosaggio del PTH.....	327
• Dosaggio della vitamina D	327
• Dosaggio della PTHrP	327

SURRENE

➤ Cenni di anatomia.....	328
➤ Ormoni della corticale del surrene.....	328
• Biochimica e trasporto	328
• Metabolismo.....	329
• Fisiologia.....	329
• Azioni biologiche	330
• Ipocorticosurrenalismo	330
• Ipercorticosurrenalismo	331
• Indagini di laboratorio	333
• Diagnosi e terapia	334
➤ Ormoni della midollare del surrene.....	339
• Feocromocitoma e paraganglioma.....	340
• Incidentaloma	343

TESTICOLO

➤ Cenni di anatomia.....	345
➤ Asse ipotalamo-ipofisi-gonade maschile.....	346

➤ Patologie del testicolo	347
• Ipogonadismo	347
• Ipogonadismo a insorgenza tardiva	348
➤ Indagini di laboratorio	348
• Dosaggio delle gonadotropine	348
• Dosaggio del testosterone	349
• Dosaggio dell'inibina B	349
• Dosaggio della prolattina.....	349
➤ Diagnosi e terapia	349
• Ipogonadismo	349
➤ Tumori germinali del testicolo	351

OVAIO

➤ Cenni di anatomia.....	352
➤ Fisiologia	352
• Asse ipotalamo-ipofisi-gonade femminile	352
• Sintesi e funzioni degli ormoni steroidei.....	353
• Sintesi e funzione degli ormoni proteici	354
➤ Patologie endocrine dell'ovaio	355
• Irsutismo e virilizzazione	355
• Amenorrea.....	355
➤ Indagini di laboratorio.....	357
• Indagini basali	357
• Indagini dinamiche.....	358
➤ Diagnosi e terapia.....	359
• Irsutismo.....	359
• Amenorrea primaria.....	359
• Amenorrea secondaria	360

LETTURE CONSIGLIATE	362
• IPOFISI	362
• TIROIDE	362
• PARATIROIDI.....	363
• SURRENE.....	363
• TESTICOLO.....	363
• OVAIO.....	364

**CAPITOLO 22 • DIABETE MELLITO:
DALLA DEFINIZIONE ALLA TERAPIA**

365

➤ Definizione	365
➤ Cenni storici	365
➤ Regolazione della glicemia	365
➤ Classificazione del diabete mellito	369
➤ Epidemiologia.....	369
➤eziopatogenesi.....	370
• Diabete di tipo 1.....	370
• Diabete di tipo 2	372
• Diabete gestazionale	373
• Altri tipi di diabete	374
➤ Diagnosi.....	374
➤ Complicanze.....	379
➤ Monitoraggio.....	379
➤ Terapia	380

LETTURE CONSIGLIATE	381
---------------------------	-----

CAPITOLO 23 • SINDROME METABOLICA 383

Definizione	383
Patogenesi.....	383
Diagnosi.....	384
Terapia.....	385
LETTURE CONSIGLIATE	386

CAPITOLO 24 • IPOGLICEMIA 387

Introduzione	387
Epidemiologia.....	387
Sintomi	388
Ipglicemia nel diabete.....	388
Ipglicemia in assenza di diabete	390
• Farmaci.....	390
• Malattie croniche e acute.....	391
• Deficit ormonali.....	391
• Tumori non insulari	391
• Iperinsulinismo endogeno.....	391
• Ipglicemia <i>factitia</i>	391
Diagnosi.....	391
LETTURE CONSIGLIATE	394

CAPITOLO 25 • IL LABORATORIO NELLA GRAVIDANZA 395

Esami in fase pre-concezionale.....	395
• Test di Coombs indiretto	395
• TORCH	396
• Emocromo e assetto emoglobinico.....	400
• Glicemia	400
• Pap test	400
Accertamento di gravidanza	400
Esami in gravidanza	401
Diabete gestazionale.....	403
Pre-eclampsia ed eclampsia.....	404
Screening prenatale per la sindrome di Down.....	406
LETTURE CONSIGLIATE	408

CAPITOLO 26 • MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE 409

Introduzione	409
Aspetti clinici	410
• Definizione ed eziologia.....	410
• Classificazione	410
Caratteristiche cliniche (principali e comuni).....	411
Terapia	411
Strategie di laboratorio per lo screening e la conferma diagnostica di MME.....	412
• Conferma diagnostica di sospetto clinico di MME	412
• Processo di screening neonatale	414
LETTURE CONSIGLIATE	420

CAPITOLO 27 • IPERFENILANINEMIE, TIROSINEMIE, GLICOGENOSI, IPERAMMONIEMIE 421

Iperfenilalaninemie	421
• Diagnosi e terapia	422
• Fenilchetonuria materna	423
Tirosinemie	423
Glicogenosi.....	424
• Diagnosi.....	425
Iperammoniemie	425
• Forma neonatale	426
• Forma infantile	426
• Forme della pubertà e dell'età adulta	426
LETTURE CONSIGLIATE	428

CAPITOLO 28 • MARCATORI CIRCOLANTI IN ONCOLOGIA: AMBITI DI APPLICAZIONE, CRITICITÀ E PROSPETTIVE 429

Marcatori in oncologia: un concetto in evoluzione.....	429
Limiti riconosciuti e approcci proposti per il miglioramento.....	431
Marcatori nel sangue e nel tessuto: ambiti di impiego e criticità....	432
Marcatori circolanti: quali utilizzare nella pratica clinica.....	435
• Screening di popolazione generale	436
• Sorveglianza di soggetti a maggior rischio	436
• Diagnosi differenziale in pazienti sintomatici	436
• Bilancio iniziale della neoplasia.....	437
• Valutazione postoperatoria.....	437
• Monitoraggio dopo la terapia con intenti di radicalità del tumore primitivo.....	437
• Monitoraggio della terapia nei pazienti con malattia avanzata o disseminata	437
• Metodi di misura	439
Le prospettive: marcatori associati a meccanismi biologici	439
LETTURE CONSIGLIATE	442

CAPITOLO 29 • BIOPSIA LIQUIDA 444

Introduzione	444
Cellule tumorali circolanti.....	445
• Tecnologie per l'isolamento delle CTC	445
• Caratterizzazione molecolare delle CTC	446
DNA tumorale circolante	447
• Tecnologie per l'isolamento del ctDNA.....	448
• Analisi mutazionale del ctDNA	448
Applicazione della biopsia liquida al carcinoma polmonare non a piccole cellule.....	449
Applicazione della biopsia liquida ad altre neoplasie	450
LETTURE CONSIGLIATE	451

CAPITOLO 30 • LIQUIDI BIOLOGICI 453

➤ Fisiopatologia	453
➤ Tipi di analisi.....	454
• Analisi macroscopica	454
• Esame citometrico	454
➤ Liquido pleurico.....	456
• Valutazione macroscopica e analisi cellulare	457
• Biochimica.....	458
➤ Liquido pericardico.....	458
• Valutazione macroscopica e analisi cellulare	459
• Biochimica.....	459
➤ Liquido ascitico o da versamento peritoneale	460
• Valutazione macroscopica e analisi cellulare	460
• Biochimica.....	461
➤ Liquido sinoviale.....	462
• Fisiopatologia	462
• Valutazione macroscopica, ricerca di cristalli e analisi cellulare.....	462
• Biochimica.....	463
➤ Liquido cefalorachidiano.....	465
• Valutazione macroscopica e analisi cellulare	466
• Biochimica.....	466
• Infettivologia.....	467
LETTURE CONSIGLIATE	468

CAPITOLO 31 • DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DELLE MALATTIE AUTOIMMUNI 470

➤ Introduzione	470
➤ Malattie reumatiche autoimmuni.....	471
➤ Il monitoraggio dei farmaci biologici	473
➤ Malattia celiaca	475
• La genetica nella diagnosi di celiachia: ruolo dell'HLA DQ2 e DQ8	475
• Biomarcatori e algoritmi per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia.....	477
➤ Malattie epatiche autoimmuni	479
• Epatite autoimmune	479
• Colangite biliare primitiva	480
• Colangite sclerosante primitiva	482
• Diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni epatiche	482
LETTURE CONSIGLIATE	483

CAPITOLO 32 • DIAGNOSTICA DI LABORATORIO NELLE MALATTIE ALLERGICHE 485

➤ Introduzione	485
➤ Scoperta delle immunoglobuline E.....	485
➤ Mastociti e basofili	485
➤ Allergeni.....	486

➤ Uso di allergeni ricombinanti in diagnostica allergologica	488
➤ Diagnostica allergologica <i>in vitro</i>	488
• Determinazione delle IgE totali.....	488
• Ricerca di IgE specifiche	489
➤ Diagnostica allergologica molecolare	489
• Metodiche analitiche utilizzate per la diagnostica molecolare	490
➤ Conclusioni	491
LETTURE CONSIGLIATE	492

CAPITOLO 33 • MARCATORI BIOCHIMICI DI RIMODELLAMENTO OSSEO 494

➤ Biochimica del tessuto osseo.....	494
➤ Marcatori di formazione ossea	495
• Fosfatasi alcalina ossea.....	495
• Osteocalcina	496
• Peptidi terminali del procollagene di tipo I	497
➤ Marcatori di riassorbimento osseo.....	497
• <i>Cross-links</i> del collagene	497
• Telopectidi ammino- e carbossi-terminale del collagene di tipo I.....	498
• Fosfatasi acida tartrato-resistente.....	499
➤ Nuovi marcatori.....	499
• RANK-RANKL-OPG.....	499
• Catepsina K.....	500
• Sclerostina	500
• Fattore di crescita dei fibroblasti (<i>Fibroblast-Growth Factor 23, FGF23</i>).....	501
• Determinanti genetici	502
➤ Fonti di variabilità dei marcatori di rimodellamento osseo.....	502
➤ Utilizzo clinico dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo.....	503
➤ Conclusioni.....	503
LETTURE CONSIGLIATE	505

CAPITOLO 34 • MALATTIA DI ALZHEIMER E ALTRE DEMENZE NEURODEGENERATIVE 506

➤ Introduzione	506
➤ Il liquido cefalorachidiano come fonte principale di biomarcatori	506
➤ La malattia di Alzheimer.....	507
➤ Le demenze frontotemporali e vascolari.....	508
➤ Le malattie da prioni.....	509
➤ La malattia di Parkinson e le sinucleinopatie	510
➤ Variabilità e standardizzazione dell'esame liquorale	510
LETTURE CONSIGLIATE	512

CAPITOLO 35 • BIOCHIMICA CLINICA IN VIVO 513

➤ Tecnica di spettroscopia di risonanza magnetica: principi di base	513
➤ Spettroscopia RM <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	515
• Strumentazione	515
• Specie nucleari rilevabili e corrispondenti vie metaboliche	516
• Applicazioni in cellule, tessuti (biopsie) ed estratti	517
➤ Spettroscopia RM del protone <i>in vivo</i>	519
• Contesto operativo	519
• Spettroscopia RM del protone	520
• Analisi qualitativa e quantitativa degli spettri del protone	520
• Metaboliti cerebrali	522
• Principali quadri di patologie neurologiche valutate con la ¹ H-MRS	524
• Altre applicazioni della spettroscopia del protone	528
➤ Spettroscopia RM del fosforo <i>in vivo</i>	530
• Muscolo scheletrico	530
• Preparazione e <i>set-up</i> del paziente	531
• Principali quadri di patologia muscolo-scheletrica valutati con ³¹ P-MRS	532
LETTURE CONSIGLIATE	534

CAPITOLO 36 • INDAGINI DI BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA 535

➤ Introduzione e applicazioni	535
• Tipologia di test e campione biologico	535
➤ Diagnosi di suscettibilità	536
• L'esempio della trombofilia	536
• L'esempio della farmacogenomica	537
• Un esempio di guida alla terapia in oncologia: il test <i>BRCA1/2</i>	537
➤ Diagnosi precoce	538
➤ Diagnosi di malattia	538
• L'esempio di una malattia autosomica recessiva: la fibrosi cistica	539
• L'esempio di malattie legate al cromosoma X: emofilia A e B	540
• Una criticità dei test molecolari: l'identificazione di nuove mutazioni	542
• Aspetti bioetici: le malattie a sviluppo tardivo	542
➤ Diagnosi di portatore	542
• Analisi a cascata	543
• <i>Screening</i> del portatore	543
➤ Diagnosi prenatale	543
• Diagnosi prenatale di malattie genetiche non ereditarie	543
• Diagnosi prenatale delle malattie genetiche ereditarie	544
• Diagnosi pre-impianto	545
➤ Stadiazione della malattia: l'esempio delle cellule tumorali circolanti	547
➤ Leucemia mieloide cronica, gene <i>BCR-ABL</i> e monitoraggio della malattia	547
LETTURE CONSIGLIATE	548

CAPITOLO 37 • BIOMARCATORI DI FLOGOSI 549

➤ Definizione di flogosi	549
➤ Proteine di fase acuta	550
• Proteina C reattiva	551
• Velocità di eritrosedimentazione	552
• Procalcitonina	553
• α -1 antitripsina	554
• β 2-microglobulina	554
• Fibrinogeno	554
• Proteina siero amiloide A	554
➤ Approccio diagnostico	555
LETTURE CONSIGLIATE	555

CAPITOLO 38 • BIOMARCATORI DI SEPSI 556

➤ Definizione di sepsi	556
➤ Epidemiologia della sepsi	558
➤ Ruolo del laboratorio nella sepsi	559
➤ Biomarcatori di sepsi	559
• Proteina C reattiva	560
• Procalcitonina	561
• Presepsina	562
• Adrenomedullina	562
LETTURE CONSIGLIATE	563

CAPITOLO 39 • MEDICINA DI LABORATORIO ED ESERCIZIO FISICO 565

➤ Effetti acuti della prestazione sportiva sui parametri di laboratorio	565
➤ Effetti a medio-lungo termine dell'attività fisica sui parametri di laboratorio	566
LETTURE CONSIGLIATE	568

CAPITOLO 40 • ESAMI PREOPERATORI 569

LETTURE CONSIGLIATE	572
---------------------------	-----

CAPITOLO 41 • IL LABORATORIO IN URGENZA/ EMERGENZA 573

➤ Introduzione	573
➤ Alterazione dello stato di coscienza	573
➤ Astenia	574
➤ Diatesi emorragica	575
➤ Dispnea	575
➤ Dolore addominale	576
➤ Dolore toracico	576
➤ Trauma maggiore o politrauma	576
➤ Ustioni	578
LETTURE CONSIGLIATE	580

**CAPITOLO 42 • APPLICAZIONI DELLE SCIENZE
"OMICHE" IN LABORATORIO**

581

➤ Introduzione alle scienze "omiche", definizioni e generalità ...	581
➤ Dal Progetto Genoma al Progetto 1000 genomi: applicazioni della genomica alla medicina di laboratorio	582
➤ Individuazione di alterazioni genomiche: il CGH-array	583
➤ Trascrittomica ed espressione genica	584
➤ Epigenomica e meccanismi di regolazione dell'espressione genica	585
➤ Metagenomica, analisi del microbioma e associazione a patologie umane	586
➤ Nutrigenomica e medicina della nutrizione	588
➤ Farmacogenomica e terapia personalizzata	588
LETTURE CONSIGLIATE	590

Capitolo 8

Maria Stella Graziani • Anna Caldini

DIAGNOSTICA PROTEICA

- Discrasie plasmacellulari
- Principali proteine sieriche di rilevanza clinica

La diagnostica proteica si occupa prevalentemente delle gammopatie monoclonali, condizioni caratterizzate dalla presenza in circolo o nelle urine di un'immunoglobulina monoclonale (o di una sua parte). In questo capitolo viene dapprima esaminata la rilevanza clinica della condizione, che spazia dalle forme clinicamente occulte, rappresentate dalla gammopatia monoclonale di significato indeterminato, alle forme nelle quali la condizione clinica è determinata dagli effetti dovuti alle peculiari caratteristiche dell'immunoglobulina monoclonale, alle neoplasie vere e proprie, quali il mieloma multiplo. Quindi sono descritte le tecniche di laboratorio che consentono la gestione dei pazienti con gammopatia monoclonale: l'elettroforesi proteica (sierica e urinaria), per la rilevazio-

ne e la quantificazione della componente monoclonale; la tipizzazione immunologica, per la definizione della classe e del tipo di immunoglobulina coinvolta; la misura delle catene leggere libere sieriche e delle immunoglobuline non coinvolte nella monoclonalità. Nella seconda parte viene introdotto l'altro ambito della diagnostica proteica, quello della misura immunochimica di alcune proteine sieriche di rilevanza clinica. Quelle prese in considerazione sono: albumina, α 1-antitripsina, aptoglobina, β 2-microglobulina, ceruloplasmina, complemento, fattore reumatoide, immunoglobuline, proteina C reattiva, transtiretina. Per ognuna di queste è presentata una sintesi delle caratteristiche fisico-chimiche e della funzione biologica nonché le indicazioni per la loro richiesta appropriata.



Discrasie plasmacellulari



Rilevanza clinica

Le discrasie plasmacellulari (o **gammopatie monoclonali [GM]**) sono disordini proliferativi plasmacellulari caratterizzati dalla produzione e secrezione di un'immunoglobulina (Ig) monoclonale, intera o una sua parte (**componente monoclonale [CM]**). Infatti, quando è presente un clone plasmacellulare in espansione, la singola Ig da questo prodotta può essere in quantità tale da raggiungere nel siero o nelle urine una concentrazione sufficientemente alta da essere rilevabile con tecniche adeguate, di norma elettroretiche (**Figura 8.1**).

La CM può quindi essere utilizzata come marcatore sierologico della condizione, a scopo diagnostico per la rilevazione del clone plasmacellulare, come an-

che durante il monitoraggio del paziente per valutare l'evoluzione della malattia. A differenza degli altri marcatori tumorali, le CM presentano un'estrema variabilità biochimica, sia perché ogni singola Ig monoclonale possiede una sequenza unica nella regione variabile, sia perché può essere costituita dall'Ig intera o da una sua parte e questo fa sì che l'intervallo di peso molecolare di una CM possa variare da ~24 kDa, nel caso delle catene leggere libere monomeriche, fino a ~900 kDa, per le IgM pentameriche. Inoltre, sebbene alcune discrasie plasmacellulari si presentino con concentrazioni sieriche di CM dell'ordine dei g/L, in altre condizioni la CM è presente in concentrazioni molto basse, o addirittura è virtualmente assente. Quindi, mentre la presenza di una CM nel siero o nelle urine di per sé definisce la condizione clinica di GM, l'assenza di CM dal tracciato elettroretico non è in grado di escluderla, perché esistono cloni plasmacellulari oligosecretori/non secretori che non

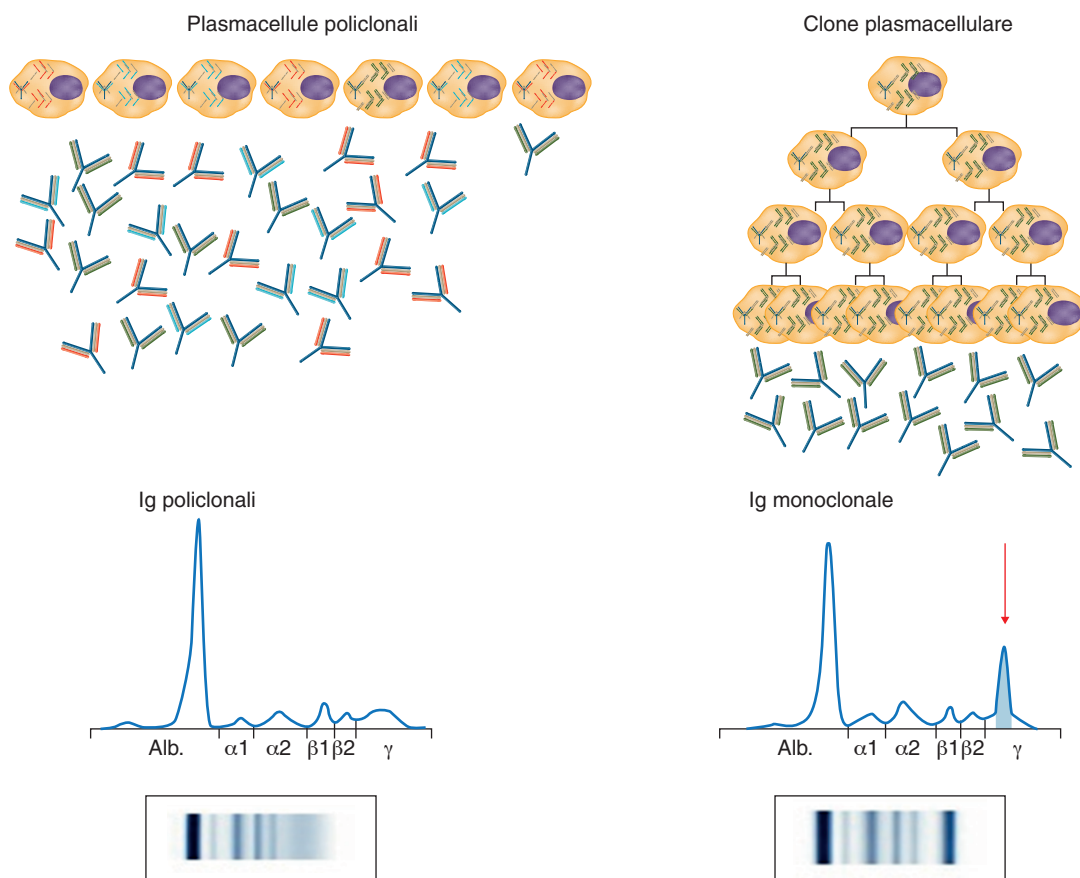


Figura 8.1: In condizioni normali, nel midollo osseo sono presenti solo plasmacellule policlonali, ognuna delle quali secerne la sua particolare immunoglobulina. La conseguente grande varietà di forme molecolari delle immunoglobuline porterà a una distribuzione gaussiana della zona γ del tracciato elettroforetico riportato in basso a sinistra. Quando invece un singolo clone si riproduce con un ritmo molto superiore al resto della popolazione plasmacellulare, la concentrazione dell'immunoglobulina da esso secreta può essere tale da risultare chiaramente visibile come una banda ristretta di migrazione come quella evidenziata sul tracciato elettroforetico in basso a destra.

producono CM in quantità sufficiente per poter essere visualizzate; oppure la visualizzazione non è possibile per problemi di tipo tecnico, come quando, per esempio, la CM viene mascherata da altre proteine che migrano nella sua stessa posizione. Le condizioni cliniche che possono essere associate alla presenza di una CM sono molteplici. In base al tipo di manifestazione clinica, le GM possono essere classificate come riportato nella **Tabella 8.1**.

Tra le forme clinicamente occulte, cioè quelle condizioni in cui la GM non è associata a manifestazioni cliniche, quella più frequentemente riscontrata è la **gammopatia monoclonale di significato indeterminato** (MGUS), termine coniato da Robert Kyle nel 1978. La MGUS viene definita come la presenza di una CM nel siero o nelle urine senza evidenza cli-

nica di mieloma multiplo, amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche, macroglobulinemia di Waldenström o altri disordini correlati. Dal punto di vista epidemiologico, la MGUS è una condizione tutt'altro che rara, la sua prevalenza aumenta con l'età, è maggiore nel sesso maschile e negli africani e afro-americani rispetto ai caucasici. Il **mieloma smoldering**, o asintomatico (SMM), è considerato una condizione intermedia tra la MGUS e il mieloma multiplo, in quanto possiede caratteristiche biochimiche e cellulari intermedie tra MGUS e mieloma multiplo senza però presentare la sintomatologia clinica di quest'ultimo. Sebbene asintomatiche, MGUS e mieloma *smoldering* sono considerate condizioni di "pre-malignità", in quanto è stato dimostrato che pressoché tutti i casi di mieloma multiplo sono

Tabella 8.1 Classificazione delle gammopatie monoclonali in base alle manifestazioni cliniche

Forme clinicamente manifeste dovute alla proliferazione del clone neoplastico
Mieloma multiplo (MM) e le sue varianti <ul style="list-style-type: none"> • Mieloma <i>smoldering</i> o asintomatico (SMM) • Mieloma non secernente (NSMM) • Mieloma a catene leggere (LCM) • Mieloma IgM
Malattie linfoproliferative <ul style="list-style-type: none"> • Macroglobulinemia di Waldenström • Malattie delle catene pesanti di tipo α, γ e μ • Linfoma non-Hodgkin • Leucemia linfatica cronica
Altre discrasie plasmacellulari <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia plasmacellulare • Plasmocitoma solitario midollare ed extramidollare
Forme clinicamente manifeste dovute agli effetti patologici delle CM
<ul style="list-style-type: none"> • Amiloidosi a catene leggere (AL) • Crioglobulinemia di tipo I e II • Malattie da deposizione di immunoglobuline monoclonali • Malattia cronica da crioprecipitazione • Malattia da deposizione di catene leggere • Sindrome di Fanconi acquisita dell'adulto
Forme clinicamente occulte
<ul style="list-style-type: none"> • Gammopatie monoclonali di significato indeterminato (MGUS) • Gammopatie monoclonali transitorie

preceduti da una delle due condizioni. Mentre la MGUS è associata ad un rischio di progressione verso patologie evolutive di circa l'1% l'anno, il rischio di progressione del mieloma *smoldering* è del 10% nei primi 5 anni dalla diagnosi, e scende progressivamente fino a raggiungere l'1% come la MGUS entro 15 anni. Molti dei soggetti affetti da MGUS e tutti quelli con mieloma *smoldering* necessitano di un continuo monitoraggio, per prevenire il danno d'organo, lesioni ossee e insufficienza renale. La più comune delle neoplasie plasmacellulari proliferanti è il **mieloma multiplo (MM)**, secondo tra le neoplasie ematologiche solo al linfoma non-Hodgkin. Nel 2015 in Italia sono stati osservati 18.545 casi, di cui 5643 nuove diagnosi. Il mieloma multiplo colpisce prevalentemente la popolazione anziana, con un'età media alla diagnosi di 69 anni, mentre si verifica assai raramente al di sotto dei 40 anni. Le cellule mielomatose risiedono nel midollo osseo, dove spesso prevalgono sugli altri tipi cellulari, causando le tipiche lesioni litiche del tessuto osseo. In queste forme neoplastiche con grossi cloni di plasmacellule secernenti in espansione, la clinica è dominata dagli effetti sistemici causati dall'espansione del clone

maligno, quali anemia, lesioni ossee, ipercalcemia, danno renale e infezioni. Malgrado il significativo aumento della sopravvivenza a 5 anni, passato dal 25% tra il 1975 e il 1977 al 43% tra il 2002 e il 2008, il mieloma multiplo è tuttora considerato una malattia a prognosi severa. Nelle forme non neoplastiche con cloni anche piccoli o molto piccoli, le manifestazioni cliniche possono essere dovute agli effetti biologici causati dalle particolari caratteristiche biochimiche della CM in questione. Questi possono andare da vasculiti e neuropatie, per effetto della particolare attività anticorpale della CM, al deficit funzionale cardiaco o renale, per effetto della deposizione della CM negli organi o tessuti. Tra queste, la patologia più frequentemente riscontrata è l'**amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche** (amiloidosi AL), caratterizzata da un clone plasmacellulare che produce catene leggere con anomalie conformazionali che causano proteotossicità sistemica con rapido deterioramento della funzione degli organi dove le fibrille di amiloide si depositano. In questo gruppo di patologie si trovano anche le **crioglobulinemie**. Le crioglobuline sono immunoglobuline che *in vitro* precipitano se sottoposte a temperature inferiori a 37 °C, ma che si ridissolvono se nuovamente portate a 37 °C. Nella classificazione di Brouet del 1974, che resta la più utilizzata, si distinguono tre tipi di crioglobulinemia sulla base della clonalità e della classe immunoglobulinica. Il tipo I consiste solamente di un'Ig monoclonale, abitualmente IgG o IgM. Il tipo II è una miscela di IgG policlonali e di un'IgM monoclonale, che ha attività reumatoide. Infine, nel tipo III sono presenti IgG e IgM policlonali. Il tipo II e il tipo III sono definiti crioglobulinemie miste. Le crioglobuline si associano ad un'espansione clonale di cellule B, sia nel contesto di disordini linfoproliferativi, sia in presenza di una stimolazione persistente del sistema immunitario innescata da un'infezione cronica o da una patologia autoimmune. Con il termine crioglobulinemia si fa riferimento alla presenza di crioglobuline nel siero, mentre si parla di malattia o **vasculite crioglobulinemica** per descrivere condizioni in cui sono presenti sintomi correlabili alla presenza di crioglobuline, in quanto molti soggetti con crioglobulinemia restano asintomatici. I due principali meccanismi patogenetici sono la precipitazione delle crioglobuline nel microcircolo e il processo infiammatorio mediato da immunocomplessi a livello vascolare. La prevalenza delle principali discrasie plasmacellulari, ricavata da

Tabella 8.2 Prevalenza delle diverse gammopatie monoclonali*

Patologia	Numero casi	%
Gammopatie monoclonali di significato indeterminato (MGUS)	23.629	59,1
Mieloma multiplo	6974	17,5
Amiloidosi a catene leggere (AL)	3781	9,5
Mieloma <i>smoldering</i>	1494	3,7
Disordini linfoproliferativi	1298	3,3
Macroglobulinemia di Waldenström	940	2,4
Plasmocitoma	774	1,9
Crioglobulinemia	379	0,9
Sindrome POEMS	217	0,5
Altre condizioni con prevalenza <0,5%	443	1,2

*Casistica della Mayo Clinic 1960-2008.

un'imponente casistica della Mayo Clinic, è riportata nella **Tabella 8.2**.

Tecnologia separativa

Le tecniche elettroforetiche sono al centro della diagnostica proteica, in quanto sono in grado di rilevare e caratterizzare le CM sieriche e urinarie.

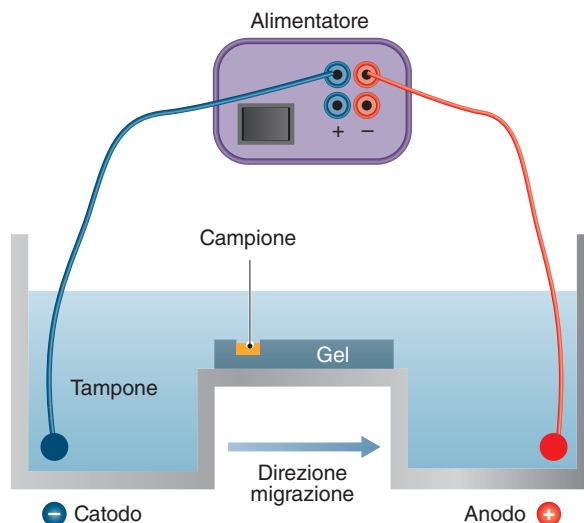
Elettroforesi proteica

L'elettroforesi è una tecnica separativa basata sulla diversa velocità di migrazione di particelle elettricamente cariche attraverso una soluzione e sotto l'influenza di un campo elettrico applicato. La velocità di migrazione di una proteina dipende, oltre che da numerosi fattori indipendenti, quali la natura del mezzo e la forza del campo elettrico applicato, anche dalla massa, dalla dimensione, dalla forma e dalla carica della particella stessa, cioè dalla sua mobilità elettroforetica μ , definita dalla seguente equazione:

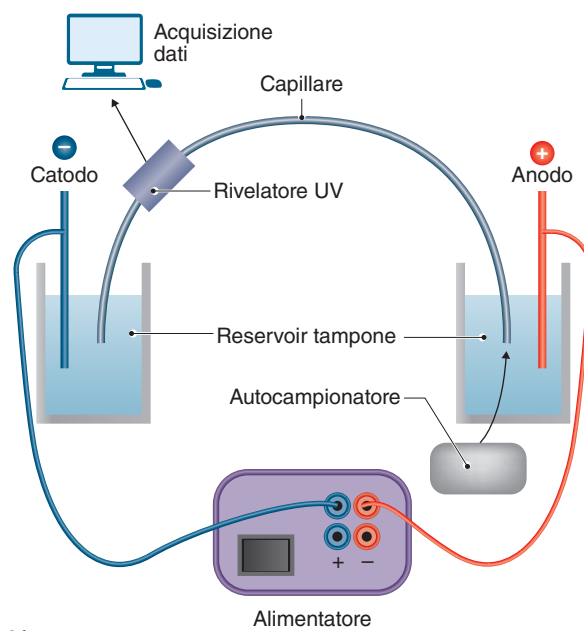
$$\mu = \frac{Q}{6\pi\eta r}$$

dove η è la viscosità del mezzo, Q il numero di cariche della particella e r il raggio ionico.

Una tecnica elettroforetica molto diffusa nell'ambito della diagnostica proteica è l'**elettroforesi zonale su supporto solido**, tipicamente gel d'agarosio (AGE), schematicamente rappresentata nella **Figura 8.2a**. Il supporto solido, imbevuto della soluzione elettrolitica (tampone), viene messo in connessione con i *reservoir* di quest'ultima, che sono a loro volta in contatto con gli elettrodi. Il campione da analizzare viene deposi-



a)



b)

Figura 8.2: Rappresentazione schematica di un apparato per elettroforesi su gel d'agarosio (a) e di uno strumento per elettroforesi capillare (b).

tato sulla superficie del gel e quindi, per mezzo di un generatore di corrente elettrica, viene applicata una differenza di potenziale tra gli elettrodi in grado di far migrare le particelle cariche presenti nel campione. Le proteine sono sostanze anfotere e quindi la loro carica elettrica netta varia in funzione del pH della soluzione in cui si trovano. Al pH alcalino abitualmente usato in questo tipo di separazione, la maggior parte delle proteine ha carica elettrica netta negativa e quindi mi-

gra, con una velocità proporzionale al rapporto carica/raggio, dal catodo verso l'anodo. Alla fine della migrazione il gel viene posto in una soluzione colorante contenente anche un fissativo che previene la diffusione delle proteine. Viene quindi effettuata la decolorazione per rimuovere l'eccesso di colorante dal gel, ma non dalle proteine fissate, che ora appariranno come bande distinte. Il gel viene infine seccato e sottoposto a scansione densitometrica. Il risultato finale è un grafico (tracciato elettroforetico) costituito da una serie di picchi corrispondenti alle frazioni proteiche separate. L'area delimitata da ciascun picco è proporzionale alla concentrazione di ciascuna frazione e viene espressa in percentuale (**Figura 8.3a**).

Molto utilizzata nel laboratorio clinico, per la sua elevata risoluzione e la possibilità di completa automazione del processo, è l'**elettroforesi capillare (CE)**, tecnologia separativa in cui la corsa elettroforetica avviene in fase liquida, all'interno di un capillare lungo e sottile di silice fusa, riempito di soluzione elettrolitica. La lunghezza dei capillari può variare da 20 a 100 cm e il diametro interno da 20 a 80 μm : quindi, per esempio, un capillare lungo 50 cm e con diametro interno di 50 μm avrà un volume di solo 1 μL . La separazione avviene in pochi minuti applicando un alto voltaggio (8-15 kV) e a temperatura controllata. Una rappresentazione schematica della CE è riportata nella **Figura 8.2b**. Al contrario di quanto avviene nell'AGE, la mobilità elettroforetica non è la forza prevalente in CE, in cui invece predomina il **flusso elettroendosmotico (FEO)**. Il FEO (**Figura 8.4**) è il risultato dell'interazione tra i gruppi negativi presenti sulla superficie interna del capillare e gli ioni positivi del tampone elettrolitico. Le molecole polari dell'acqua circondano gli ioni positivi del tampone e all'applicazione della corrente elettrica vengono da questi trascinate verso il catodo, generando così un potente flusso di solvente dall'anodo al catodo (in direzione quindi opposta alla migrazione elettroforetica), chiamato appunto **elettroendosmosi**. Le proteine presenti nel campione, che in base alla loro carica elettrica negativa si dovrebbero muovere verso l'anodo, pur separandosi in accordo alla loro mobilità elettroforetica, vengono trascinate dal FEO verso il catodo. La rivelazione avviene senza ausilio di coloranti, tramite misura dell'assorbanza intorno a 210 nm da parte di un detector UV posto alla fine del capillare, generando un elettroferogramma analogo a quello visto per l'AGE (**Figura 8.3b**). La posizione di migrazione delle principali proteine sieriche con entrambe le tecniche è indicata nella **Figura 8.3c**.

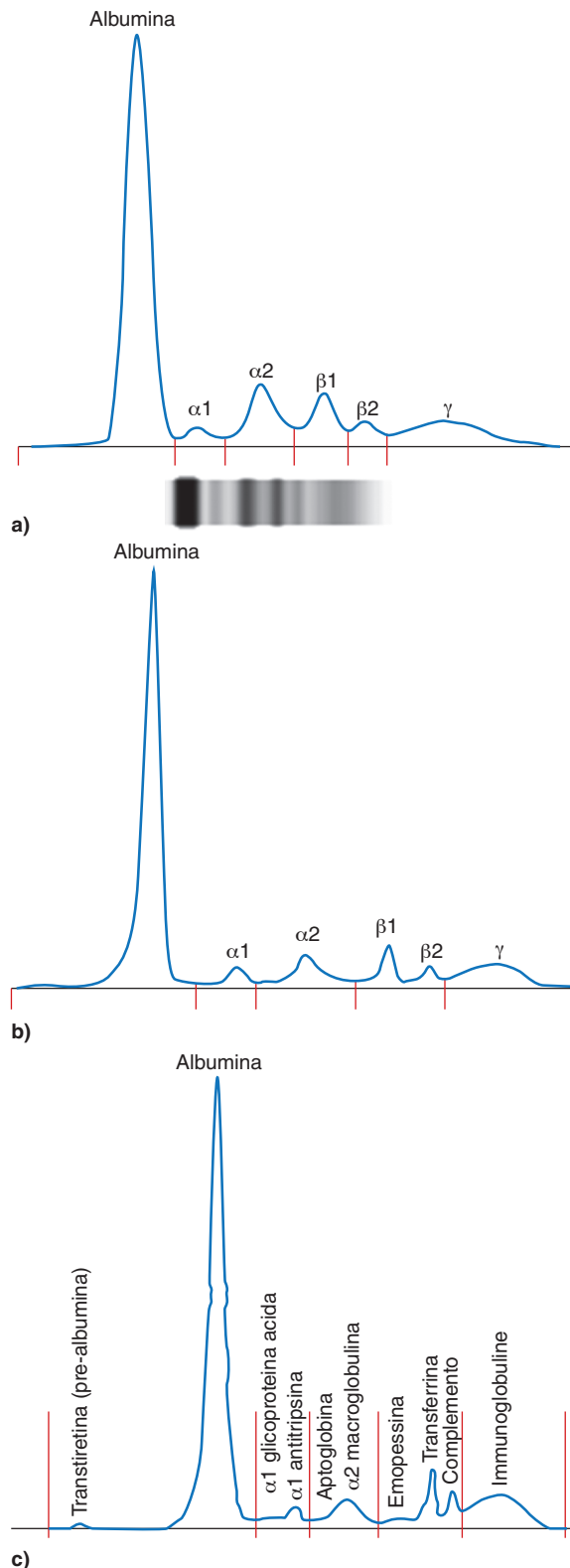


Figura 8.3: Tracciato di un'elettroforesi sieroproteica eseguita su gel d'agarosio (a) e in elettroforesi capillare (b). In c) sono indicate le posizioni di migrazione delle principali proteine sieriche.

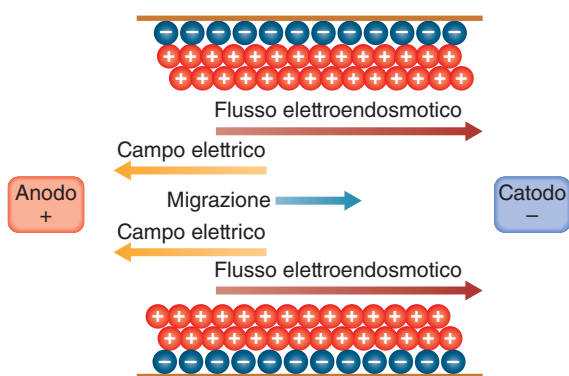


Figura 8.4: Illustrazione del principio alla base del flusso elettroendosmotico. Le cariche negative presenti sulla superficie interna del capillare attraggono gli ioni positivi della soluzione elettrolitica, che vengono a loro volta circondati dalle molecole polari del solvente. Sotto l'influenza del forte campo elettrico i cationi trascinano con sé le molecole d'acqua, generando un potente flusso che si oppone alla normale migrazione delle proteine in direzione anodica.

Tipizzazione immunologica

La conferma definitiva della presenza di una CM nel siero o nelle urine e la sua tipizzazione immunologica vengono effettuate mediante **immunofissazione elettroforetica (IFE)**, tipicamente su gel d'agarosio. Il primo passaggio di questa tecnica consiste in una corsa elettroforetica in corsie multiple, tipicamente sei, per ogni campione da testare. Successivamente sulla prima corsia viene stratificato un fissativo, mentre sulle altre vengono stratificati antisieri diretti verso le catene pesanti (anti- γ , - α e - μ) e leggere (- κ e - λ) delle Ig. Qualora si abbia reazione con una delle due catene leggere senza associazione a una delle tre catene pesanti, sarà necessario saggiare il campione anche con gli antisieri anti- δ ed - ϵ per escludere la presenza di una rara GM IgD o IgE. La reazione degli antisieri con le Ig presenti nel campione porterà alla formazione di un immunoprecipitato che rimarrà intrappolato nel gel. Successivamente, il gel verrà sottoposto a lavaggi, per rimuovere l'eccesso di antisiero e le proteine del campione che non hanno reagito con l'antisiero, e infine a colorazione. In questo modo sarà definita con certezza la clonalità della CM, che apparirà come una banda distinta, definendone nel contempo anche classe e tipo. Se invece si è in presenza di Ig policlonali, l'immunoprecipitato verrà visualizzato come una zona ampia e sfumata (**Figura 8.5**).

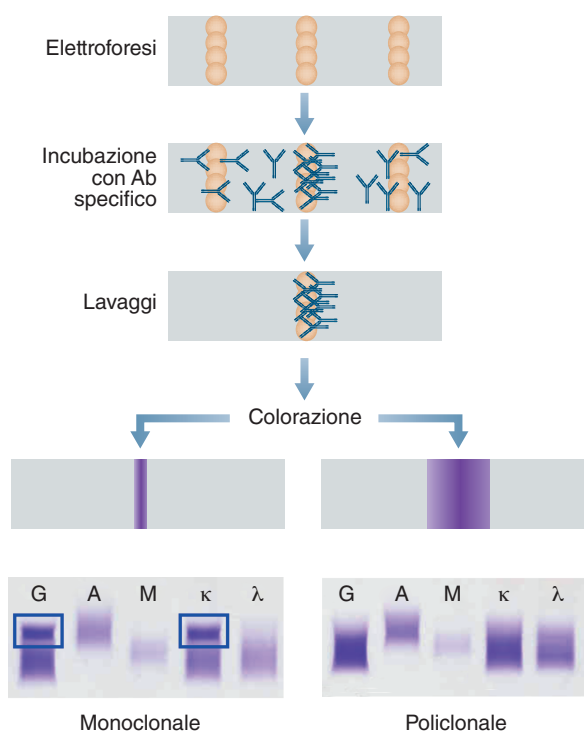


Figura 8.5: Principio della tecnica di immunofissazione elettroforetica. Il campione viene prima sottoposto a elettroforesi e quindi fatto reagire con gli antisieri specifici per le catene pesanti e leggere delle immunoglobuline. Dopo i lavaggi restano sul gel solo gli immunocomplessi formati in corrispondenza della banda di migrazione dell'immunoglobulina specifica. Dopo colorazione del gel, in assenza di componenti monoclonali, si osservano solo bande di migrazione ampie e sfumate come riportato nell'esempio in basso a destra. Quando invece è presente una componente monoclonale, questa viene evidenziata come una banda ristretta di migrazione in corrispondenza della catena pesante e leggera da cui è costituita. Questo consente non solo di confermarne la presenza, ma anche di definirne classe e tipo, come nell'esempio in basso a sinistra, in cui si evidenzia una componente monoclonale di tipo IgG κ .

Analogamente a quanto visto per l'elettroforesi, la CE può essere utilizzata anche per la tipizzazione immunologica delle CM, con una tecnica chiamata **immunosottrazione (ISE)**, anche detta immunotipizzazione o immunospiazzamento. Nell'ISE il campione viene sottoposto a elettroforesi in assenza e in presenza degli antisieri (anti- γ , - α , - μ , - κ e - λ). Gli immunocomplessi che si vengono così a formare migrano nel capillare a una velocità molto diversa rispetto al campione non trattato, risultando quindi in una riduzione del segnale in corrispondenza dell'Ig in esame. Confrontando i risultati delle diverse corse

con l'elettroferogramma di riferimento, cioè la corsa effettuata in assenza di antisiero, si può confermare la presenza di una CM ben visibile in CE e tipizzarla (**Figura 8.6**).

➡ Diagnostica di laboratorio

Elettroforesi sieroproteica

L'**elettroforesi delle sieroproteine (S-EF)** rappresenta l'esame di elezione per la rivelazione delle CM sieriche e per la loro quantificazione, essendo in grado di rilevare l'omogeneità molecolare della proteina. Le CM si evidenziano come una banda netta all'interno del tracciato elettroforetico e possono migrare in zone diverse dello stesso; nella **Figura 8.7** sono

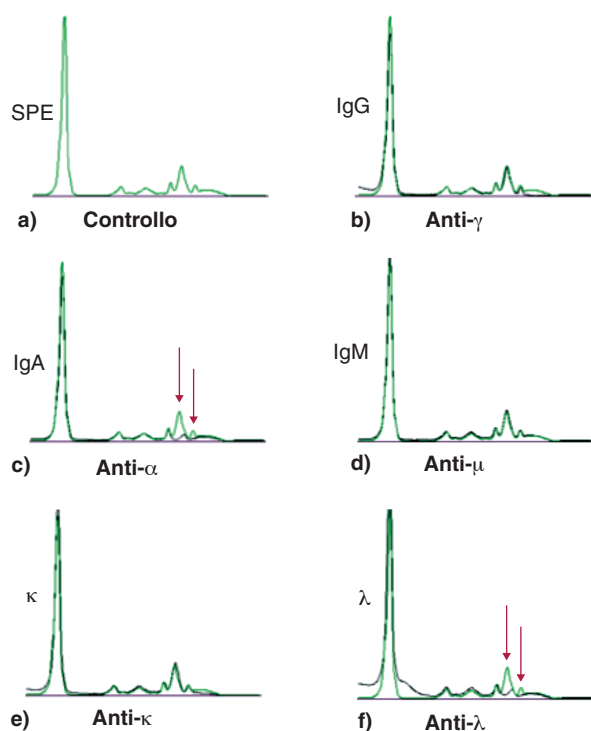


Figura 8.6: Esempio di tipizzazione immunologica eseguita in elettroforesi capillare. In a) è riportato il tracciato di riferimento, effettuato cioè in assenza di antisieri. In b-f) sono riportate le corse elettroforetiche eseguite dopo incubazione con gli antisieri anti- γ , - α , - μ , - κ e - λ , rispettivamente. La sovrapposizione dei singoli tracciati con il tracciato di riferimento consente di interpretare facilmente i risultati. Infatti, in c) e f) si possono notare due picchi che scompaiono dopo incubazione rispettivamente con gli antisieri anti- α e anti- λ . L'immunotipizzazione consente in questo caso di tipizzare una componente monoclonale IgA λ presente in forma sia monomerica sia dimerica.

mostrati alcuni esempi. Qualunque sia la tecnica prescelta (AGE o CE), è importante che il metodo adottato sia ad elevata risoluzione, raggiungendo una sensibilità <1 g/L, e che il personale addetto all'ispezione visiva dei tracciati sia specificamente formato e in possesso di un'adeguata esperienza. La S-EF viene effettuata sia a scopo di *screening*, per rilevare la presenza di una CM, sia durante il successivo inquadramento diagnostico e il monitoraggio dei pazienti con

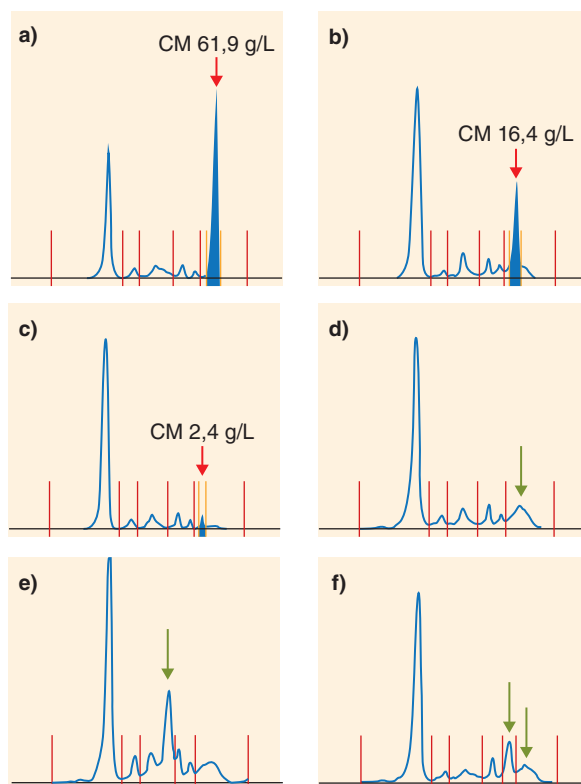


Figura 8.7: Esempi di tracciati elettroforetici che mostrano l'estrema variabilità di mobilità elettroforetica delle componenti monoclonali. In a), in b) e in c) sono mostrate tre componenti monoclonali in un ampio intervallo di concentrazione, che migrano in zona γ e che sono tutte quantificabili mediante scansione densitometrica in rapporto con le proteine totali sieriche. In d) è riportata una componente monoclonale in zona γ di lieve entità, che non può essere quantificata in quanto mal si distingue dalle restanti immunoglobuline policlonali molto ben rappresentate. In e) è mostrata una rara componente monoclonale che migra in zona α_2 , mentre in f) è rappresentata una componente monoclonale che migra in zona β_2 accompagnata da un'altra piccola banda in zona γ . In questi ultimi due casi, in e) e in f), la quantificazione per scansione densitometrica è sconsigliata in quanto le componenti monoclonali migrano insieme ad altre proteine sieriche e non sono da esse distinguibili.

GM. Serve inoltre nella quantificazione della CM, come pure per evidenziare alterazioni qualitative della CM rispetto ai quadri precedenti. Nel nostro Paese, la S-EF è un esame molto richiesto e per i più svariati motivi, anche se la motivazione essenziale per l'esecuzione di un'elettroforesi sieroproteica rimane quella della ricerca e del monitoraggio di una GM. Il riscontro di una CM è dunque un evento tutt'altro che raro nella pratica del laboratorio clinico, ponendo di conseguenza la necessità di una corretta gestione del paziente. In questo ambito, va sottolineato che la scelta degli esami da eseguire dipende dalle motivazioni della richiesta. Quando una S-EF viene richiesta per soggetti per i quali non sussiste alcun sospetto clinico di GM, è ragionevole che, in assenza di alterazioni del tracciato elettroforetico sierico, non si prosegua nelle indagini. In quest'ultimo caso, però, nel referto dovrebbe essere presente un commento specifico che indichi con chiarezza che la S-EF non evidenzia CM. Nel caso invece la S-EF rilevi un'alterazione, questa deve essere segnalata nel referto e indagata come sotto specificato.

Le principali frazioni proteiche che vengono separate in base alla loro diversa velocità di migrazione su gel nel caratteristico tracciato a "cinque bande" sono:

- albumina;
- α 1-globuline, che includono α 1-glicoproteina, α 1-lipoproteina, α 1-antitripsina, transcortina;
- α 2-globuline, che includono aptoglobina, ceruloplasmina, α 2-macroglobulina, eritropoietina, parte delle IgA;
- β 1-globuline, che includono emopessina, plasminogeno, transferrina, C3, β lipoproteine;
- β 2-globuline, che includono alcune frazioni del complemento, parte delle IgM;
- γ -globuline, che includono parte delle IgG, immunocomplessi, crioglobuline, postglobuline γ .

Tipizzazione delle CM

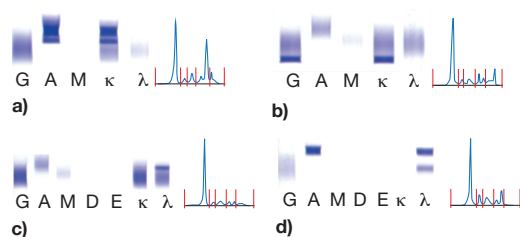
Ogni alterazione del tracciato elettroforetico (banda sopranumeraria, picco monoclonale, alterazione morfologica) deve essere approfondita per evidenziare la natura (immunoglobulinica o meno) dell'anomalia riscontrata. La tipizzazione (o caratterizzazione immunologica) della CM sierica o urinaria, effettuata tramite IFE o ISE, ha lo scopo di confermare la natura immunoglobulinica e la monoclonalità della banda evidenziata dalla S-EF. Consente anche l'attribuzione della catena pesante e leggera dell'Ig coinvolta. È inoltre in grado di mettere in evidenza anche CM

non rilevabili dal tracciato S-EF, perché di lieve entità o comigranti con altre proteine presenti fisiologicamente. Questa capacità è maggiormente attribuibile alla IFE, essendo questa una tecnica dotata di sensibilità più elevata rispetto alla ISE. L'**immunofissazione elettroforetica delle sieroproteine (S-IFE)** deve essere effettuata obbligatoriamente al primo riscontro elettroforetico di una CM (ma anche nel sospetto clinico o laboratoristico della presenza di una CM), in quanto il tipo di Ig coinvolta fornisce elementi utili ai fini sia diagnostici sia prognostici. La tipizzazione deve inoltre essere eseguita, durante il monitoraggio del paziente, tutte le volte che il tracciato S-EF mostri alterazioni qualitative della morfologia della CM rispetto ai precedenti e per confermare la scomparsa della CM per la definizione della risposta completa dopo trattamento nel mieloma multiplo. È importante che il metodo adottato per la S-IFE sia a elevata risoluzione e che il personale addetto alla sua interpretazione sia adeguatamente e specificamente formato. Alcuni esempi di tipizzazione sono presentati nella **Figura 8.8 (pannelli a-d)**.

Quantificazione della CM sierica

Il modo più corretto di misurare la CM sierica è per proporzione diretta con la concentrazione delle proteine totali sieriche, dopo delimitazione del picco monoclonale nel tracciato elettroforetico. L'accuratezza di questa modalità non è però ottimale in quanto influenzata in modo non trascurabile dall'operatore. Inoltre, le due tecniche separative disponibili (AGE e CE) presentano differenze non trascurabili. La misura immunochimica della CM è inaccurata e perciò non consigliabile in quanto soffre di alcune limitazioni, quali: la contemporanea misura, insieme all'Ig monoclonale, delle Ig policlonali, che possono essere significativamente rappresentate nel campione; l'assenza di parallelismo nel saggio immunologico tra lo standard policlonale usato per la calibrazione e le Ig monoclonali; la CM può presentare specificità antigeniche poco o mal riconosciute dall'antisiero policlonale. Questi problemi possono comportare sia sovrastime sia sottostime non trascurabili. È importante dunque che il singolo paziente sia monitorato, per quanto possibile, sempre con lo stesso metodo e che questo sia chiaramente indicato sul referto. La quantificazione della CM è un parametro cardine per la gestione del paziente con GM in quanto in tutte le malattie secernenti è un indice della massa tumorale. La quantificazione della CM è necessaria nella dia-

Immunofissazioni sieriche



Immunofissazioni urinarie

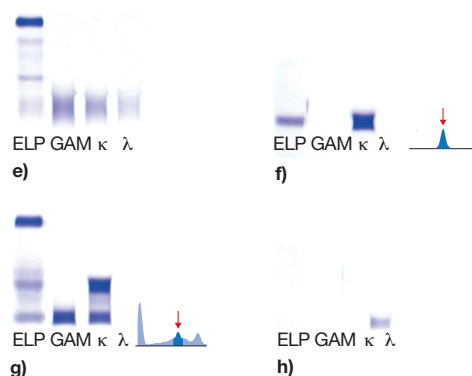


Figura 8.8: Esempi di immunofissazioni sieriche presentate con la corrispondente elettroforesi sierica (a-d). In a) si può osservare una componente monoclonale IgA κ costituita dal monomero che migra in posizione β2 e dal dimero che migra in zona γ. In b) è riportata una componente monoclonale IgG κ in posizione γ. In c) è presentata una componente monoclonale costituita dalle sole catene leggere λ, difficilmente identificabile sul tracciato elettroforetico, che ben illustra la maggiore sensibilità dell'immunofissazione nel rilevare le componenti monoclonali. Infine, in d) è rappresentata una componente monoclonale IgA λ in zona β2 accompagnata da un'altra componente monoclonale costituita da catene leggere libere λ in zona γ. Esempi di immunofissazioni urinarie (e-h) con accanto il tracciato elettroforetico urinario (ELP) in cui è stato utilizzato un antisiero trivalente per le catene pesanti γ, α e μ (GAM). Il campione riportato in e) è negativo per la presenza di proteina di Bence Jones (PBJ), in quanto sono presenti solo immunoglobuline policlonali in un contesto di proteinuria glomerulare. In f) è riportato un esempio di PBJ tipo κ in assenza di altre proteine, mentre in g) si osserva una PBJ tipo κ ben distinta dall'immunoglobulina monoclonale intera in un quadro di proteinuria glomerulare franca. In entrambi i casi, la PBJ è quantificabile densitometricamente come evidenziato dai tracciati densitometrici urinari corrispondenti. Infine in h) è mostrato un campione in cui la PBJ si evidenzia solo in presenza dell'antisiero anti-λ e non al tracciato elettroforetico, che dimostra ulteriormente la maggiore sensibilità dell'immunofissazione urinaria. In questo caso, la quantificazione non è possibile.

gnostica differenziale, nella stratificazione del rischio e nella valutazione della risposta alla terapia. Alcuni esempi di quantificazione delle CM sono presentati nella Figura 8.7.

Determinazione della proteina di Bence Jones

La **proteina di Bence Jones (PBJ)** è costituita dalle catene leggere libere monoclonali prodotte in eccesso dal clone plasmacellulare e presenti nelle urine. Per la ricerca della PBJ si utilizza l'**immunofissazione urinaria (U-IFE)**, in quanto questo è al momento l'unico metodo con il quale si possono accertare le due caratteristiche della PBJ, cioè la monoclonalità e l'assenza della catena pesante. Una volta accertata la sua presenza, la quantificazione della PBJ deve essere effettuata su un campione di urina temporizzato (24 ore) per scansione densitometrica del picco monoclonale del tracciato elettroforetico urinario in rapporto alle proteine totali urinarie. Anche per questa indagine, è importante che il metodo adottato sia a elevata risoluzione e sensibilità e che il personale addetto alla sua interpretazione abbia un'adeguata esperienza. La determinazione della PBJ è essenziale all'interno dello *screening* per discrasie plasmacellulari quando si sospetti un'amiloidosi AL o quando persista il sospetto clinico di GM e gli esami su siero siano negativi; inoltre, è uno degli esami da eseguire alla diagnosi di GM e nella verifica della risposta alla terapia nel mieloma multiplo e nell'amiloidosi AL. Alcuni esempi di determinazione della PBJ sono presentati nella **Figura 8.8** (pannelli e-h).

Misura delle catene leggere libere nel siero

Le catene leggere sono sintetizzate in eccesso rispetto alle catene pesanti all'interno della plasmacellula; quelle non assemblate a formare la molecola immunoglobulinica si ritrovano in circolo e costituiscono le **catene leggere libere (S-FLC)**. Nel 2001 è stato reso disponibile un metodo immunochimico per la loro misura nel siero che utilizza antisieri diretti contro epitopi che rimangono nascosti quando la proteina è legata alla catena pesante. Questa misura ha consentito, tra l'altro, di ottenere un parametro quantitativo utile sia alla diagnosi sia al monitoraggio delle condizioni in cui la CM è difficilmente evidenziabile e misurabile (amiloidosi AL, mieloma multiplo non secernente/oligosecernente). La misura delle S-FLC è prevista nello *screening* delle GM, nella diagnostica differenziale, nella stratificazione del rischio e nella valutazione della risposta

alla terapia, ed è un parametro che ha assunto negli anni rilevanza sempre maggiore nella gestione del paziente con GM.

Misura delle immunoglobuline nel siero

La misura delle Ig non coinvolte nell'espansione clonale ha lo scopo di verificare la presenza o meno di un'eventuale immunoparesi. La diminuzione della concentrazione sierica delle Ig policlonali segnala che il clone in espansione all'interno del midollo osseo è preponderante rispetto agli altri cloni sintetizzanti Ig. La misura va eseguita al primo riscontro di una CM e per l'inquadramento diagnostico. Nel caso che la CM si sovrapponga alla banda di altre proteine, come succede frequentemente nel caso di CM IgA che si sovrappongono alla transferrina o al C3, la sua quantificazione può essere eseguita con la misura immunochimica dell'Ig monoclonale. I metodi utilizzati per la misura delle immunoglobuline sono metodi immunochimici (nefelometrici o turbidimetrici).

Considerazioni conclusive

Il primo riscontro di una CM è tipicamente una situazione nella quale il laboratorio potrebbe procedere con esami a cascata per il corretto inquadramento del paziente. Qualora il laboratorio, per ragioni amministrative e/o regolatorie, non possa eseguire in autonomia gli esami necessari, questi devono essere suggeriti nel referto al clinico, il quale poi valuterà per il proseguimento delle indagini. Anche per le altre situazioni (diagnostica differenziale, stratificazione del rischio, monitoraggio della condizione e valutazione della risposta alla terapia), è necessaria una stretta interazione fra laboratorista e clinico, come del resto è sempre auspicabile anche in altri campi della diagnostica di laboratorio.

Nel sospetto di alcune patologie, come l'amiloidosi AL o la malattia da deposito di immunoglobuline monoclonali, è necessario associare all'elettroforesi sierica anche la misura delle catene leggere libere e l'immunofissazione del siero e delle urine.

Per la gestione del paziente con discrasia plasmacellulare sono state prodotte, e vengono continuamente aggiornate, linee guida e raccomandazioni nazionali e internazionali contenenti indicazioni per il corretto percorso clinico-laboratoristico da seguire per assicurare il migliore *outcome* del paziente. È oltremodo opportuno che i professionisti di laboratorio curino l'aggiornamento in questo campo che è in continua evoluzione.



Principali proteine sieriche di rilevanza clinica



Albumina

L'**albumina (ALB)** è una proteina non glicosilata con un PM di circa 66 kDa, sintetizzata dagli epatociti e con un'emivita di circa 20 giorni. Le principali funzioni dell'ALB sono: mantenere la pressione colloidosmotica, legare e trasportare numerose sostanze endogene ed esogene (ioni metallici, bilirubina, acidi grassi liberi, amminoacidi, ormoni steroidei e tiroidei, farmaci), costituire una riserva di amminoacidi per la sintesi proteica e un'azione antiossidante. La sintesi di ALB può diminuire a causa di un aumento della pressione oncotica nel fluido extracellulare del fegato o di una diminuita disponibilità di amminoacidi. Inoltre, l'ALB è una proteina di fase acuta negativa, in quanto la sua sintesi viene regolata negativamente dall'interleuchina 6 (IL-6).

I valori di riferimento nel plasma per gli adulti, secondo la standardizzazione internazionale IFCC (CRM 470), sono 35-52 g/L.

La misurazione dell'ALB sierica è impiegata nella valutazione degli stati disprotidemici, ma va tenuto presente che l'unica variazione clinicamente significativa è la sua diminuzione; la sua concentrazione plasmatica, infatti, può aumentare solo per emoconcentrazione. L'ipoalbuminemia può essere dovuta alle seguenti cause:

- diminuita sintesi (disfunzione epatica o dieta povera di proteine);
- alterata distribuzione tra il compartimento ematico e gli spazi extravascolari a causa di un aumento della permeabilità capillare, come in caso di shock settico;
- perdita nel "terzo spazio" in seguito a edema o ascite;
- perdita verso l'esterno, come nella sindrome nefrosica, nelle ustioni o nell'enteropatia essudativa;
- processo infiammatorio, dove la sintesi di ALB è diminuita in favore delle proteine della fase acuta;
- gravidanza, per aumento del volume plasmatico;
- rari disordini congeniti della sintesi albuminica.

Nella pratica clinica, la misura dell'ALB sierica è ampiamente utilizzata per la valutazione della funzionalità epatica e di situazioni di perdita proteica. Le motivazioni della richiesta dotate di maggiori evi-

denze sono: l'utilizzo nei pazienti emodializzati quale fattore di adeguatezza terapeutica; nei pazienti con mieloma multiplo per la stadiazione della malattia; nei pazienti candidati alla terapia sostitutiva con ALB umana per il calcolo della dose di ALB da somministrare e per il monitoraggio della terapia; quale fattore di rischio per insufficienza renale acuta (AKI) e di prognosi infausta dopo AKI.

α 1-antitripsina

L' **α 1-antitripsina (AAT)** è una glicoproteina monomerica che appartiene alla famiglia delle serpine (*SERine* *Protease* *INHibitor*). Il gene codificante (*SER-PINA1*, o *PI* [*Protease Inhibitor*]) è situato sul cromosoma 14. L'AAT inibisce una serie di serin-proteasi, ma il bersaglio principale è l'**elastasi neutrofila (NE)**, un enzima rilasciato dai neutrofili, responsabile della proteolisi di molti componenti della matrice extracellulare, tra cui l'elastina. Quando i neutrofili vengono attivati, la NE viene rilasciata nel tessuto polmonare, dove, se non inibita, svolge azione proteolitica.

I valori di riferimento dell'AAT nel plasma per gli adulti, secondo la standardizzazione internazionale IFCC (CRM 470), sono 0,9-2,0 g/L. Il deficit di AAT è un disordine autosomico recessivo che aumenta il rischio di sviluppare alcune patologie, tra le quali quelle di maggior rilievo sociale sono quella polmonare (broncopneumopatia cronica ostruttiva, enfisema) e quella epatica (fibrosi epatica, cirrosi, carcinoma epatico). La diagnosi del difetto genetico è appannaggio di centri specializzati. Nella popolazione generale, il reperto occasionale di una concentrazione plasmatica di AAT <1 g/L con misura immunometrica rende necessaria una conferma del dato tramite esami quantitativi e qualitativi presso laboratori specialistici. L'AAT migra nella zona α 1 della S-EF (Figura 8.3c); il reperto occasionale di uno sdoppiamento di questa zona (eterozigosi di AAT) o dell'assenza del picco delle α 1-globuline oppure di una percentuale della zona α 1 inferiore ai valori di riferimento deve essere seguito dalla misura immunometrica di AAT sul campione. Se la concentrazione plasmatica di AAT risulta al di sotto del limite inferiore di riferimento, si rende necessario un approfondimento diagnostico con esami qualitativi e test genetici presso laboratori specialistici. Le principali indicazioni per la richiesta sono: enfisema precoce, bronchiectasie senza eziologia evidente, epatopatia non altrimenti spiegabile, familiari di primo grado dei pazienti con deficit ac-

certato. Dal momento che AAT è una proteina di fase acuta, è consigliabile misurare contemporaneamente un marcatore di fase acuta, come la proteina C reattiva, per escludere un aumento di AAT legato a un fenomeno infiammatorio in corso che possa mascherare la presenza di un eventuale deficit.

Aptoglobina

L'**aptoglobina (APT)** è una glicoproteina sintetizzata nel fegato e composta da quattro catene polipeptidiche: due catene leggere α e due catene pesanti β . L'APT svolge un'azione antiossidante e di *scavenger* per l'emoglobina libera, rilasciata in seguito al *turnover* eritrocitario fisiologico o in seguito a processi emolitici.

I valori di riferimento nel plasma per gli adulti, secondo la standardizzazione internazionale IFCC (CRM 470), sono 0,3-2,0 g/L. La concentrazione plasmatica di APT si riduce rapidamente nel caso di emolisi intravasale, dato che l'emivita del complesso APT-emoglobina è di soli 8 minuti.

L'APT è una proteina di fase acuta: la sua sintesi nelle cellule epatiche aumenta per stimolo delle citochine proinfiammatorie. Di conseguenza, anche se concentrazioni plasmatiche diminuite di APT possiedono un elevato potere predittivo di emolisi intravasale, valori elevati si possono riscontrare nel corso di una risposta di fase acuta. Per una corretta valutazione, la sua misura dovrebbe quindi essere accompagnata da quella della proteina C reattiva. Dato che anche un'emolisi di grado lieve è sufficiente a saturare le concentrazioni fisiologiche di APT e a compensare gli eventuali incrementi dovuti alla flogosi, in caso di sospetto clinico è opportuno valutare la condizione associando la misura di lattato deidrogenasi (LDH) e bilirubina. Nel monitoraggio dell'emolisi intravasale, considerata la breve emivita del complesso APT-emoglobina, la misura di APT risulta poco utile. In condizioni di emolisi cronica, potrebbe avere un ruolo la misura dell'emopessina. Finché le concentrazioni di APT non rientrano nell'intervallo di misura, l'entità dell'emolisi è meglio valutata dalla determinazione di LDH e bilirubina.

β 2-microglobulina

La **β 2-microglobulina (B2M)** è una proteina di basso PM (12 kDa); appartiene al complesso maggiore

di istocompatibilità di classe I (MHC I o antigene di classe I), che è costituito da glicoproteine espresse sulla superficie di gran parte delle cellule nucleate. La forma solubile della molecola, presente in circolo, rappresenta il *turnover* delle cellule che esprimono MHC di classe I. La concentrazione plasmatica di B2M dipende sia dal *turnover* dei linfociti B, poiché questi presentano elevate concentrazioni di MHC di classe I, sia dalla velocità di filtrazione glomerulare, poiché il catabolismo della proteina è quasi interamente renale, in quanto la B2M passa liberamente il filtro glomerulare ed è riassorbita per oltre il 99% dal tubulo contorto prossimale. La sua concentrazione plasmatica è 1,2-2,5 mg/L; tali valori sono da ritenersi del tutto indicativi in quanto il parametro non è stato ancora incluso nella standardizzazione internazionale. Nel paziente uremico con insufficienza renale terminale, la B2M si accumula in circolo e tende a formare depositi di sostanza fibrillare (amiloidi) nei tessuti, dopo ~8 anni dall'inizio del trattamento dialitico. L'importanza del parametro nelle discrasie plasmacellulari è dovuta al fatto che la B2M riflette allo stesso tempo sia la massa tumorale sia la funzionalità renale. La B2M è un parametro raccomandato nella valutazione iniziale del paziente con GM in quanto è uno dei parametri utilizzati nella stadiazione del mieloma multiplo (insieme ad ALB). La misura della B2M nei pazienti dializzati è utile per valutare l'efficienza dell'emodialisi nella rimozione delle molecole a medio PM. La determinazione della B2M nell'urina è fortemente sconsigliata a causa della rapida degradazione della proteina a pH acido sia *in vivo* (in vescica) sia *in vitro* (nel contenitore di raccolta).



Ceruloplasmina

La **ceruloplasmina (CER)** è una glicoproteina composta da una singola catena polipeptidica con un PM di ~132 kDa. La CER è un enzima sintetizzato nel fegato che ossida il rame; lega circa il 95% del rame circolante e lo trasporta ai tessuti. La CER agisce sulla regolazione dello stato degli ioni del ferro e di altri ioni metallici, esercitando un'azione antiossidante in quanto inibisce l'ossidazione, catalizzata dagli ioni metallici, dei lipidi di membrana. I valori di riferimento nel plasma per gli adulti, secondo la standardizzazione internazionale IFCC (CRM 470), sono 0,2-6,0 g/L. Diminuzioni clinicamente significative della concentrazione plasmatica di CER sono presenti nel difetto di sintesi ereditario,

peraltro molto raro, o nei deficit secondari, quali quelli riscontrati nella malattia di Wilson (un difetto autosomico recessivo del metabolismo del rame). Essendo la CER una proteina di fase acuta, concentrazioni fisiologiche di CER si possono osservare in concomitanza di stati infiammatori, mascherando così il difetto di sintesi. Inoltre, poiché la sintesi della proteina è estrogeno-dipendente, concentrazioni elevate di CER si osservano in gravidanza e in corso di somministrazione di estrogeni in menopausa, rendendo la specificità diagnostica di questo esame piuttosto bassa e non consentendo di utilizzare la misura della proteina come esame di *screening* per la malattia di Wilson. Valori di CER <0,05 g/L sono fortemente indicativi per la diagnosi di malattia; occorre però tenere presente che concentrazioni all'interno dell'intervallo di riferimento non consentono di escludere la presenza di malattia di Wilson per le ragioni sopra esposte. Il valore diagnostico delle basse concentrazioni plasmatiche di CER aumenta sensibilmente quando si associa alla presenza degli anelli corneali di Kayser-Fleischer. In assenza di tale segno, come avviene comunemente nella manifestazione epatica della malattia, basse concentrazioni di CER non possono essere considerate diagnostiche perché potrebbero essere dovute ad altre patologie (epatiti autoimmuni, malattia celiaca); d'altra parte, essendo la CER una proteina di fase acuta positiva, in corso di flogosi le sue concentrazioni potrebbero rientrare nei limiti fisiologici. Considerato il basso valore predittivo della misura di CER, per la diagnosi di malattia di Wilson essa va associata alla misura del rame sierico e urinario.



Sistema del complemento

Il **sistema del complemento** è costituito dai fattori del complemento che circolano nel sangue in forma inattiva e dalle proteine di regolazione (inibitori, attivatori e recettori), dalla cui espressione il sistema è altamente regolato. Il sistema del complemento è una cascata multienzimatica ed è il maggior componente dell'immunità innata; svolge un ruolo cruciale nel *killing* microbico, nel controllo della formazione degli immunocomplessi, nella *clearance* delle cellule apoptotiche e nella modulazione dell'immunità acquisita. Le vie di attivazione del complemento sono:

- la via classica (fattori C1q-C1r-C1s, C4, C2), innescata principalmente dal complesso antigene-anticorpo;

- la via alternativa (fattori C3, B, D, P, H), innescata da lipopolisaccaridi e polisaccaridi di superficie di virus, batteri, miceti, parassiti, da antigeni *self* alterati di cellule tumorali;
- la via della lectina (fattori C4, C2), simile alla via classica, ma innescata dalla lectina legante il mannosio, che riconosce specificamente residui di mannosio e di altri zuccheri presenti sulle superfici batteriche e di altri patogeni.

Tutte le vie di attivazione del complemento confluiscono, attraverso il fattore C3, nella via terminale comune (fattori C3, C5, C6, C7, C8, C9), che culmina con la formazione del complesso di attacco litico alla membrana cellulare. La diminuzione delle proteine del complemento può essere dovuta a un deficit di sintesi geneticamente determinato o a consumo per attivazione del sistema, mentre l'incremento della loro concentrazione non riveste di per sé alcuna importanza clinica. Poiché il fattore C3 è il punto centrale in cui confluiscono le tre vie di attivazione e il C4 è un fattore fondamentale della via classica e della via della lectina, la misura di queste due proteine fornisce, con buona approssimazione, una valutazione dello stato di attivazione del sistema del complemento. I valori di riferimento nel plasma per gli adulti, secondo la standardizzazione internazionale IFCC (CRM 470), sono 0,9-1,8 g/L per C3 e 0,1-0,4 g/L per C4.

La richiesta della misura delle proteine del complemento risulta perciò appropriata nei pazienti con infezioni severe, ricorrenti, atipiche o non facilmente risolvibili, o con manifestazioni allergiche importanti (sospetta immunodeficienza congenita). È inoltre appropriata nel percorso diagnostico e di monitoraggio dei pazienti con malattie sostenute da immunocomplessi e nel percorso diagnostico dei pazienti con sospetto angioedema ereditario.



Fattore reumatoide

Il **fattore reumatoide (FR)** è un'immunoglobulina, per lo più di classe IgM, che reagisce con la porzione Fc delle IgG. Si tratta quindi di un vero e proprio autoanticorpo, la cui misurazione è indicata nell'artrite reumatoide e nelle malattie autoimmuni in genere. Un valore <20 UI/mL è da ritenersi normale; tuttavia, tale valore va considerato del tutto indicativo in quanto il parametro non è stato ancora incluso nella standardizzazione internazionale. La misura di FR è

poco specifica perché una sua positività può essere rilevata nella popolazione apparentemente sana (~5% degli individui), con una prevalenza che aumenta con l'età. Il FR (assieme agli anticorpi anti-peptidi citrullinati) è incluso nei criteri per la classificazione dell'artrite reumatoide, mentre non è dimostrata la sua utilità nel monitoraggio della terapia (che è assicurato dalla misura degli indicatori biochimici di fase acuta) o nella valutazione dell'attività della malattia. Nei pazienti con artrite reumatoide FR-negativi al riscontro, la misura di FR nei periodi successivi assume valore prognostico.



Immunoglobuline

Le **immunoglobuline (Ig)** sono un gruppo di proteine alquanto eterogeneo con funzione anticorpale, sintetizzate dalle plasmacellule. Sono glicoproteine tetrameriche costituite da due catene pesanti (H) di ~440 amminoacidi e due catene leggere (L) di ~220 amminoacidi, uguali a due a due. Le catene pesanti (γ , α , μ , δ , ϵ) e leggere (κ , λ) sono tenute assieme da ponti disolfuro intercatenari. Ciascuna catena è divisa in una regione costante e una variabile (ammino-terminale); su quest'ultima sono localizzate le sequenze amminoacidiche che concorrono alla formazione del sito di legame con l'antigene. Le IgG ($\gamma_2\kappa_2/\gamma_2\lambda_2$), con peso molecolare di ~150 kDa, sono monomeri presenti in circolo con la concentrazione più elevata e sono gli anticorpi circolanti della risposta secondaria. Le IgA, ($\alpha_2\kappa_2/\alpha_2\lambda_2$), con peso molecolare di ~160 kDa, sono anch'essi monomeri; questi anticorpi sono presenti come dimeri sulla superficie delle mucose soprattutto del tratto bronchiale e intestinale. Infine, le IgM ($\mu_2\kappa_2/\mu_2\lambda_2$)₅ sono pentameri a elevato peso molecolare (~970 kDa); sono gli anticorpi circolanti della risposta primaria. I valori di riferimento nel plasma per gli adulti, secondo la standardizzazione internazionale IFCC (CRM 470) sono: per le IgA 0,7-4,0 g/L, per le IgG 7,0-16,0 g/L e per le IgM 0,4-2,3 g/L.

Il ruolo della misura delle Ig nel percorso diagnostico delle discrasie plasmacellulari è descritto in precedenza, nel paragrafo "Discrasie plasmacellulari". L'aumento della sintesi delle Ig policlonali può essere originato da processi infettivi, infiammatori, autoimmuni o neoplastici. L'aumento della concentrazione plasmatica può quindi essere associato alle patologie più diverse, ma nella maggioranza dei casi si tratta di risposte non specifiche, che aggiungono poco o nulla alla diagnosi o alla gestione del paziente. L'utilità

maggiore della misura delle Ig è legata al percorso diagnostico delle immunodeficienze, all'interno del quale la misura delle Ig sieriche rappresenta uno dei parametri cardine. Il più frequente di questi è il deficit selettivo di IgA (circa 1/400). L'accertamento di un sospetto immunodeficit in pazienti con infezioni severe, ricorrenti o atipiche inizia pertanto tipicamente con la misura delle Ig sieriche. La misura delle IgA è fondamentale all'interno del percorso diagnostico per malattia celiaca, perché gli anticorpi specifici sono di tipo IgA.

Proteina C reattiva

La **proteina C reattiva (PCR)** ha un PM di 118 kDa e fa parte della famiglia delle pentraxine. La sua molecola è costituita da cinque protomeri contenenti 206 amminoacidi ciascuno, arrangiati con simmetria ciclica. Il gene della PCR è stato mappato sul cromosoma 1, ma non se ne conoscono mutazioni, cosa che depone a favore dell'ipotesi che sia essenziale per la vita. La sintesi da parte degli epatociti è sotto il controllo delle citochine proinfiammatorie, principalmente dell'IL-6. Al cessare dello stimolo da parte dell'IL-6, la produzione di PCR da parte degli epatociti si normalizza entro 2-4 ore; l'emivita ematica della proteina è di ~24 ore. Dal punto di vista funzionale, la PCR è capace di legare un ampio gruppo di sostanze esogene ed endogene, facilitandone l'eliminazione dal circolo sanguigno. La rimozione del complesso PCR/ligando avviene tramite l'attivazione di diversi sistemi biologici, come l'attivazione della via classica del complemento, il legame ai recettori dei fagociti e il legame al recettore linfocitario del frammento Fc delle IgG. La PCR è considerata il marcatore di infiammazione per eccellenza, in quanto la sua concentrazione aumenta in corso di infiammazione sia acuta sia cronica. Un valore <5 mg/L è considerato normale; tuttavia, tale valore è da ritenersi del tutto indicativo, in quanto il parametro non è stato ancora incluso nella standardizzazione internazionale. La concentrazione plasmatica riflette il grado di flogosi e la massa di tessuto interessato, in particolare nelle situazioni acute. Tuttavia, concentrazioni plasmatiche di PCR entro l'intervallo di riferimento non consentono di escludere uno stato infiammatorio lieve o localizzato nel quale l'entità della risposta di fase acuta sia modesta. Determinazioni seriate di PCR consentono di monitorare la progressione della malattia e la risposta alla terapia, mentre una determi-

nazione singola può essere poco informativa a causa dell'elevata variabilità biologica intraindividuale della proteina (Coefficiente di Variazione [CV] 26%) e della sua rapida cinetica. La misura di PCR è indicata nell'artrite reumatoide, al primo riscontro, per identificare i pazienti a rischio più elevato di progressione e per il monitoraggio della terapia. Nelle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (es. la malattia di Crohn) la dimostrazione di un quadro infiammatorio è un criterio primario per la diagnosi differenziale da altre patologie non infiammatorie (es. il colon irritabile), per la valutazione dell'attività della malattia e per il monitoraggio della terapia. La PCR deve inoltre essere misurata nei casi in cui, per la corretta interpretazione dei risultati di altri esami di laboratorio, si debba tenere conto dell'esistenza di un possibile stato flogistico (es. nella misura di AAT e CER).

È da tempo noto che l'infiammazione cronica svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo delle patologie cardiovascolari e la persistenza del fenomeno infiammatorio rappresenta un importante fattore prognostico e di stratificazione del rischio. La PCR misurata con metodi caratterizzati da elevata sensibilità analitica (limite di rilevabilità, ~0,3 mg/L) è il marcatore che meglio risponde ai requisiti di praticabilità e adattabilità alla misura in automazione; la PCR quindi può attualmente essere considerata il parametro di scelta in quest'ambito diagnostico.

Transtiretina

La **transtiretina (TTR)** (o prealbumina) è una proteina globulare non glicosilata con un PM di ~55 kDa. La TTR è un tetramero composto da quattro subunità identiche. Ogni monomero di TTR ha un sito di legame per la proteina legante il retinolo (RBP) e per gli ormoni tiroidei; il complesso TTR-RBP4 lega circa il 20% degli ormoni tiroidei circolanti. La TTR circolante viene sintetizzata dalle cellule parenchimali del fegato; piccole quantità di TTR sono prodotte anche dal plesso corioideo, dal pancreas e dalla retina. I valori di riferimento nel plasma per gli adulti, secondo la standardizzazione internazionale IFCC (CRM 470), sono 0,2-0,4 g/L.

La TTR è una proteina negativa di fase acuta che viene regolata negativamente dalle citochine proinfiammatorie: la sua concentrazione ematica diminuisce in corso di flogosi, analogamente a quanto avviene per l'albumina. La sua emivita è di circa 2,5 giorni. L'interesse per la misura di TTR risiede prevalentemente

mente all'interno della valutazione dello stato nutrizionale, come marcatore di malnutrizione. Tuttavia, la diminuzione della sua concentrazione plasmatica sembra più determinata dalla risposta infiammatoria che spesso è associata a queste condizioni, che

non all'effettivo stato nutrizionale. Di conseguenza, sensibilità e specificità della misura della TTR per la diagnosi di malnutrizione sono basse. Spesso, nella malnutrizione, il rapporto TTR/PCR, viene utilizzato quale marcatore prognostico.

LETTURE CONSIGLIATE

- Avvisati G (ed.). *Ematologia* di Mandelli. Padova: Piccin; 2014.
- Caldini A, Graziani MS, Basile U et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014; 38: 47-53.
- Graziani MS, Caldini A, Basile U et al. Indicazioni per la misura delle principali proteine sieriche. *Biochim Clin* 2012; 36: 244-67.
- Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med* 1978; 64: 814-26.
- Merlini G. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. *Biochim Clin* 2012; 36: 25-8.
- Ramos-Casals M, Stone JH, Cid MC et al. The cryoglobulinaemias. *Lancet* 2012; 379: 348-60.
- Rishi K, Wadhera RK, Phil M, Rajkumar SV. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review. *Mayo Clin Proc* 2010; 85: 933-42.
- Vernocchi A, Dolci A. Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2015; 39: 199-207.
- Weiss BM, Abadie J, Verma P et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009; 113: 5418-22.
- Willrich MAV, Katzmman JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 907-19.

Marcello Ciaccio • Giuseppe Lippi

Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio

Con il patrocinio di



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**.

