
BC

biochimica clinica

In questo numero:

MALATTIA DI VON WILLEBRAND
vedi pag. 12 e pag. 73

PRESEPSINA
vedi pag. 21 e pag. 68



SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di
International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)



EuroDEM 2020



SOCIETY to
IMPROVE
DIAGNOSIS in
MEDICINE



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SAVE THE DATE European Conference on Diagnostic Error



**JUNE 16TH – 17TH
PADOVA // ITALY**

**FEATURED SPEAKERS
INCLUDE:**

Lisa Sanders, Jonathan Ilgen, Walter Ricciardi,
Georgios Lyratzopoulos, Vincenzo Crupi, Giuseppe Banfi,
Lamberto Ballan, Marloes Nederhand, Mario Plebani, Giovannella Baggio,
Barbara Di Camillo, Hardeep Singh, Niek de Wit

Visit www.improvediagnosis.org/eurodem-2020/ for updates.



sommario



EDITORIALE

12

La diagnostica di laboratorio della malattia di von Willebrand è indispensabile per la corretta gestione terapeutica del paziente
M. Franchini

RASSEGNE

13

La valutazione della frammentazione del DNA spermatico nei soggetti infertili
F. Cariati, F. Borrillo, V. D'Argenio, R. Tomaiuolo

21

Applicazioni cliniche della presepsina come biomarcatore diagnostico d'infezione: rassegna e aggiornamenti
E. Galliera, L. Massaccesi, E. de Vecchi, G. Banfi, MM. Corsi Romanelli

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

28

Valutazione delle prestazioni analitiche dei conteggi cellulari in automazione su liquidi biologici mediante un programma di controllo di qualità dedicato
G. Napolitano, A. Caracciolo, S. Apassiti Esposito, G. Guerra, S. Buoro

36

Attività fisica e biomarcatori dello stress ossidativo nell'invecchiamento
B. Tomasello, M. Malaguamera, M. Renis, C. Di Giacomo

45

Vitamin D plasma level can affect nivolumab drug exposure in a cohort of patients with non-small-cell lung cancer
J. Cusato, C. Genova, C. Tomasello, P. Carrega, S. Ottonello, G. Pietra, M.C. Mingari, I. Cossu, E. Rijavec, A. Leggieri, G. Di Perri, M.G. Dal Bello, S. Coco, S. Boccardo, G. Ferlazzo, F. Grossi, A. D'Avolio

52

Pazienti diabetici di tipo 2, non in terapia insulinica e albumina glicata: una valutazione multidimensionale
L. Ferrario, F. Schettini, E. Foglia, A. Avogaro, C. Bellia, F. Bertuzzi, G. Bonetti, A. Ceriello, M. Ciaccio, M. Corsi Romanelli, E. Dozio, L. Falqui, A. Girelli, A. Nicolucci, G. Perseghin, M. Plebani, U. Valentini, M. Zaninotto, D. Croce

61

Application of array-Comparative Genomic Hybridization analysis in immune-virotherapy approach
A. Vitale, C. Capasso, E. Leggiero, M. Garofalo, L. Kuryk, M. Hirvinen, F. D'Alessio, C. Perrotta, F. Verdesca, A. Ranieri, F. Salvatore, L. Pastore, P. Buono, V. Cerullo, B. Lombardo

OPINIONI

68

Determinazione della presepsina: non solo diagnosi di sepsi
G. Bragato, MM. Mion, A. Padoan, M. Zaninotto, M. Plebani

DOCUMENTI

73

Raccomandazioni per la diagnosi di laboratorio della malattia di von Willebrand
B. Morelli, F. Stufano per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi

DOCUMENTI SIBioC

86

Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: raccomandazioni per la fase postanalitica del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica Apparato Urinario (GIAU)
F. Manoni, G. Gessoni, G.B. Fogazzi, M.G. Alessio, R. Ravasio, A. Caleffi, G. Gambaro, S. Secchiero, B. Pieretti, C. Ottomano, A. Liverani, C. Drago, F. Balboni, M.G. Epifani, G. Saccani, G. Di Rienzo, S. Valverde, G. Brunori, L. Gesualdo a nome del Gruppo Interdisciplinare Analisi delle Urine (GIAU)

sommario

LETTERE ALL'EDITORE

100

Utilizzo dei droni per il trasporto di campioni biologici e possibile impiego nella medicina di laboratorio: il progetto PHILOTEIA
M. D'Amora

103

Droni o laboratori clinici a chilometro zero?
M. Plebani

NOTIZIE SIBioC

106

Lab Tests Online Italia, oggi
M. Berardi, G. Messeri

108

In ricordo di Giorgio Federici
S. Bernardini

110

Il ricordo di un Maestro della Medicina di Laboratorio: Giorgio Federici
F. Salvatore

CASI CLINICI

e1

Il laboratorio nella diagnosi di deficit dell'ormone della crescita e nel monitoraggio dell'aderenza alla terapia sostitutiva
S. Dudiez, A. Macchiaroli, S. Giangiobbe, A. Angiolillo

e3

Approfondimenti necessari sul liquido cerebro spinale
A. Pocognoli, E. Berardinelli, F. Orecchioni, C. Piersimoni, M. Brugia, M. Moretti



Provider n. 790



CORSI FAD ECM SIBioC 2020

CORSO BASE DI COAGULAZIONE PARTE I: FISIOLOGIA DELL'EMOSTASI, METODOLOGIE DI INDAGINE, CONTROLLO DI QUALITÀ

Benedetto Morelli

18 crediti ECM

CORSO BASE DI COAGULAZIONE PARTE II: I TEST DI SCREENING DELL'EMOSTASI

Benedetto Morelli

18 crediti ECM

COME SI SCRIVE UN CONTRIBUTO SCIENTIFICO

Maria Stella Graziani

18 crediti ECM

VARIABILI PREANALITICHE IN MEDICINA DI LABORATORIO

Davide Giavarina, Graziella Bonetti

12 crediti ECM

***Altri corsi FAD ECM provider SIBioC
sono in fase di realizzazione***

Per info: www.sibioc.it

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

Rivista della Società Italiana di Biochimica Clinica
e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio
membro di

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

Biochimica Clinica è indicizzata in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) e ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)

Biochimica Clinica is indexed in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) and ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)

Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

Deputy Director

Martina Zaninotto

Associate Editors

Ferruccio Ceriotti
Davide Giavarina
Bruna Lo Sasso
Giampaolo Merlini
Martina Montagnana
Andrea Mosca
Paola Pezzati
Rossella Tomaiuolo
Matteo Vidali

International Advisory Board

Khosrow Adeli *Canada*
Sergio Bernardini *Italy*
Marcello Ciaccio *Italy*
Eleftherios Diamandis *Canada*
Philippe Gillery *France*
Kjell Grankvist *Sweden*
Hans Jacobs *The Netherlands*
Eric Kilpatrick *UK*
Magdalena Krintus *Poland*
Giuseppe Lippi *Italy*
Mario Plebani *Italy*
Sverre Sandberg *Norway*
Ana-Maria Simundic *Croatia*
Tommaso Trenti *Italy*
Cas Weykamp *The Netherlands*
Maria Willrich *USA*
Paul Yip *Canada*

Editorial Secretary

Arianna Lucini Paioni
biochimica.clinica@sibioc.it
Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
Tel. 0245498282
Fax 0245498199
www.bc.sibioc.it

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
www.biomedica.net

SIBioC Executive Board 2020-2021

Fiamma Balboni
Umberto Basile
Sergio Bernardini *Past President*
Ciriaco Carru
Giorgio Da Rin
Giuseppe Lippi
Martina Montagnana
Gavino Napolitano
Enza Pavanello
Laura Sciacovelli *Presidente*
Tommaso Trenti

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282



utilizza un Sistema di
Gestione Qualità Certificato
per l'attività di

Fornitura di
servizi per la progettazione,
realizzazione e distribuzione di prodotti editoriali

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

Abbonamento annuo
Euro 50 per Italia/Privati
Euro 75 per Italia/Enti
Euro 75 per Estero/Privati
Euro 90 per Estero/Enti

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

Spedizione in abbonamento postale
D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004
n. 46) art. 1, comma 1, LO/MI

Associato all'USPI
Unione Stampa
Periodica Italiana
Tiratura di questo
numero 2000 copie
2000 copies of this
issue have been printed
ISSN 0393-0564



L'utilizzo degli estratti dei lavori pubblicati è
consentito esclusivamente per uso personale
e non può essere in alcun modo esteso ad
altri impieghi (commerciali, pubblicitari, ecc).
La SIBioC - Medicina di Laboratorio si riserva
di perseguire eventuali utilizzi impropri.

Volume 44

Numero 1 - Marzo 2020

biochimica clinica

BC pubblica lavori concernenti, in senso lato, la *Biochimica Clinica* e la *Biologia Molecolare Clinica*. Sono considerati sia lavori scritti in lingua italiana sia in inglese.

A richiesta degli Autori o a giudizio dell'Editore i lavori sono pubblicati nelle Sezioni e Rubriche qui di seguito elencate:

- Rassegne
- Contributi Scientifici
- Opinioni
- Documenti
- Documenti SIBioC
- Casi clinici
- Lettere all'Editore

Formato delle diverse tipologie di articoli.

Tipo di Contributo	Abstract/N. parole	N. parole	Tabelle/Figure	N. riferimenti bibliografici
Rassegne	SI/250	6000	8	150
Contributi Scientifici	SI/250	3500	8	50
Opinioni	SI/250	3500	5	50
Documenti	SI/250	NA	NA	NA
Documenti SIBioC	SI/250	NA	NA	NA
Lettere all'Editore	NO	1200	2	12
Casi Clinici*	SI/150	1500	2	10

*devono essere accompagnati dall'articolo di approfondimento e da 6 domande a risposta multipla

I numeri indicati in tabella devono essere considerati valori massimi; NA, non applicabile.

Le norme che seguono devono essere obbligatoriamente osservate, pena la non accettazione degli elaborati.

Per elaborati destinati a sezioni diverse dai Contributi Scientifici non è necessaria la suddivisione nei capitoli sotto menzionati. I Contributi Scientifici richiedono obbligatoriamente un Abstract in lingua inglese strutturato in "Introduction, Methods, Results, Discussion".

PREPARAZIONE DEL MANOSCRITTO

I lavori sperimentali devono comprendere, nell'ordine, le seguenti parti.

Titolo: deve essere conciso ma esplicativo dei contenuti. In generale, non deve includere sigle o abbreviazioni.

Autore(i): nome e cognome per esteso, e corretta affiliazione.

Abstract (riassunto in inglese, massimo 250 parole): deve essere preceduto dal titolo in inglese, quando il lavoro è scritto in italiano.

Non è richiesto il Riassunto in italiano.

Parole chiave: indicare tre parole chiave, usando preferibilmente tra i termini MeSH (tradotti in Italiano se il testo è in Italiano)

Introduzione: breve descrizione dello scenario in cui il lavoro (la ricerca) si colloca con riferimenti alla letteratura rilevante, seguita da indicazione dello scopo del lavoro.

Metodi: descrivere in maniera esaustiva casistiche cliniche o di popolazione; reagenti chimici e biologici; kit diagnostici, calibratori, materiali di controllo; strumenti e sistemi analitici; metodi analitici; metodi statistici. Nel caso di utilizzo di reagenti e sistemi analitici commerciali di uso corrente è sufficiente indicare il principio del metodo e il sistema analitico commerciale impiegato. Nell'uso dei metodi statistici attenersi alle indicazioni riportate alla fine di queste Norme. Nel caso di utilizzo di casistiche cliniche e/o campioni biologici provenienti da soggetti umani è obbligatoriamente richiesta una dichiarazione (da inserire nel testo) che durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1964, emendata nel 2013 (*World Medical Association Declaration of Helsinki*) e, nel caso di utilizzo di campioni biologici appositamente raccolti, si è ottenuto un specifico Consenso Informato da ciascuno dei soggetti arruolati nello studio.

Risultati: devono essere riportati sinteticamente, con una sequenza logica che rifletta lo scopo del lavoro, con puntuali riferimenti all'iconografia allegata (tabelle e figure). I valori numerici risultanti dalle misurazioni devono essere sempre seguiti dalla corrispondente unità di misura. I risultati possono essere riportati in tabelle (quando è di prevalente importanza il dettaglio del numero o quando si tratta di osservazioni/descrizioni) oppure in figure/grafici (quando è di maggiore rilievo la valutazione rapida e di insieme o quando non è possibile altrimenti). Per il medesimo gruppo di dati utilizzare l'una o l'altra forma, **non entrambe**.

Tabelle: devono essere ordinate in righe e colonne; ciascuna colonna deve avere una chiara intestazione, includente le unità in cui sono espressi i valori numerici. Ciascuna tabella deve essere prodotta su una singola pagina separata dal testo: sulla pagina deve essere riportata, in testa alla tabella, la relativa didascalia preceduta dal numero di tabella. La didascalia deve essere succinta ma informativa, nel formato qui esemplificato: "*Tabella 1. Dati relativi ai differenti gruppi studiati*". Le tabelle devono essere numerate consecutivamente in cifre arabe, a partire da 1, nell'ordine di citazione nel testo.

Figure: devono essere in bianco e nero, di qualità grafica tale da consentirne la diretta riproduzione, tenendo conto dell'inevitabile riduzione. Le fotografie, anche se inviate a colori, saranno riprodotte in bianco e nero e devono quindi essere di ottima qualità. Nel caso di grafici di vario genere si ponga attenzione a una corretta rappresentazione e alla corretta espansione degli assi. E' raccomandata la composizione computerizzata, con un programma di grafica adeguato. Le figure devono essere numerate consecutivamente in cifre arabe, a partire da 1, secondo l'ordine di citazione nel testo. Ciascuna figura deve essere corredata da una didascalia: tutte le didascalie, precedute dal numero della rispettiva figura, devono essere riportate in ordine su un'unica pagina, separata dalle figure e inserita alla fine del testo del lavoro con il titolo "Didascalie delle figure".

Discussione: deve essere discusso il significato dei risultati conseguiti riguardo allo scopo del lavoro, ad ipotesi riportate in letteratura, ad ipotesi emesse, ad eventuali concordanze o discordanze con osservazioni precedenti. Riportare spunti di interpretazione clinica e/o analitica dei risultati. Terminare con una breve conclusione, con accenno al raggiungimento, o meno, dello scopo e all'eventuale significato pratico delle osservazioni effettuate.

Testo: nello stesso formato di Discussione

Le varie parti (vedi Ceriotti G, Ceriotti F, Franzini C. Come scrivere un articolo scientifico. *Biochim Clin* 2008;32:196-203) devono essere scritte in stile succinto ma non telegrafico, curando il linguaggio ed evitando le espressioni gergali e i vocaboli stranieri (se il testo è in italiano), quando non indispensabili, e i vari tentativi di italianizzarli.

Le abbreviazioni (escluso quelle di uso codificato e non-ambigue, elencate più avanti in queste Norme), devono essere riportate tra parentesi, dopo l'espressione per esteso, la prima volta che ciascuna di esse compare nel testo.

Le unità di misura devono essere corrette e in linea con il Sistema Internazionale di misura.

Per le unità di concentrazione (di massa, di sostanza, di attività, di numero), nel testo e nella iconografia, usare uniformemente il litro ("L") al denominatore. I valori numerici devono essere riportati con un numero uniforme di cifre rilevanti, consistente con la variabilità intrinseca delle misure; le cifre decimali devono essere staccate con la virgola (testo, tabelle e figure!) se l'articolo è in italiano e con il punto se l'articolo è in inglese.

Bibliografia: le voci bibliografiche devono essere numerate progressivamente secondo l'ordine di citazione nel testo, a cominciare da 1. Il numero di sequenza deve comparire nel testo (tra parentesi) dove appropriato. Le singole voci devono essere riportate secondo lo stile esemplificato qui sotto, facendo attenzione a una corretta punteggiatura.

1. Soper CPR, Bending MR, Barron JL. An automated enzymatic insulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:497-501.

- Barrati J, Ettalbi M. Thermostable insulinases from *A. ficcum*. In: Fusch A, ed. Insulin and insulin-containing crops. London: Elsevier Science Publisher, 1993:211-6.
 - Constantin E, Schnell A, eds. Mass spectrometry. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1991.
- Riportare per esteso tutti i nomi degli Autori di ciascun lavoro fino ad un massimo di tre. Se in numero maggiore di tre, riportare i primi tre seguiti da "et al."

Documenti ISO: ISO14971.2012 Medical devices: application of risk management to medical devices. International Organization for Standardization: Geneva 2012.

Documenti CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved guideline, 6th ed. CLSI document H3-A6. CLSI Wayne, PA, 2007.

Nel caso tra le voci bibliografiche venissero citati **siti web**, è necessario inserire la data (mese/anno) dell'ultima visita, come nell'esempio: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/index.htm> (ultimo accesso: dicembre 2012)

CASI CLINICI

Per i contenuti, fare riferimento all'Editoriale sull'argomento (Biochim Clin 2015;39:15-6)

Abstract: in inglese, massimo 150 parole. Deve essere preceduto dal titolo in lingua inglese.

Presentazione del caso clinico: massimo 500 parole. Questa sezione deve comprendere: una descrizione del caso con una chiara definizione del quesito clinico (diagnostico, prognostico, di monitoraggio); una breve descrizione degli accertamenti di laboratorio eseguiti; il percorso logico seguito per giungere alle conclusioni, con specifici riferimenti alla rilevanza clinica dei dati di laboratorio ottenuti.

Discussione del caso: massimo 1000 parole. Questa sezione deve comprendere: una succinta rassegna della patologia in questione; la descrizione degli aspetti di peculiarità del caso; un riferimento esplicito al ruolo svolto dagli esami di laboratorio.

Bibliografia: fino a un massimo di 10 voci bibliografiche.

Tabelle/Figure: non più di 2 in totale.

In ragione dell'utilizzo dei Casi Clinici per gli eventi formativi a distanza (FAD) SIBioC, verranno presi in considerazione solo contributi in italiano; è necessario inoltre allegare al manoscritto un articolo di approfondimento sull'argomento (ad esempio una rassegna), che sia liberamente scaricabile e possibilmente in italiano, e 6 domande a risposta multipla (4 opzioni), 3 relative al Caso Clinico e 3 relative all'articolo di approfondimento, da inserire nel questionario ECM.

INVIO ELETTRONICO DEL MANOSCRITTO

Si accettano solo lavori sottoposti in forma elettronica. Il materiale da pubblicare deve essere inviato come allegato(i) di e-mail alla Segretaria di Redazione. Per il testo utilizzare preferibilmente MS Word o altro programma compatibile. Utilizzare il carattere "Times New Roman", dimensione 12. Numerare tutte le pagine consecutivamente dalla prima (pagina 1); utilizzare pagine di formato A4, scrivere ad interlinea 1,5 con margini di 2,5 cm sui quattro lati. Non giustificare, evitando parti (titoli, sottotitoli) in carattere differente dal testo.

Avvertenza importante: Conservare copia di tutti i file inviati.

IMPAGINAZIONE

Testo e tabelle

Pagina 1. Riportare: a) Titolo; b) Autori nell'ordine prescelto, nome seguito dal cognome, ciascuno con il primo nome proprio per esteso; c) Affiliazione(i), con un numero progressivo in apice come riferimento al(agli) Autore(i), se presente più di un'affiliazione; d) Nome e indirizzo completo (incluso telefono, e-mail) dell'Autore a cui inviare la corrispondenza. Pagina 2. Abstract in lingua inglese.

Pagine 3 e successive (tutte numerate consecutivamente). Riportare nell'ordine: a) Introduzione; b) Metodi; c) Risultati; d) Discussione; e) Ringraziamenti; f) Bibliografia; g) Tabelle (una tabella per pagina, ciascuna con la sua didascalia); h) Didascalie delle figure (raggruppate in una unica pagina), precedute dal numero della figura nel formato: "Figura 1. ...". La suddivisione in Introduzione, Metodi, Risultati, Discussione attiene obbligatoriamente solo ai Contributi Scientifici

Figure

Comporre i grafici (es. con MS Power Point) con numeri e lettere (in carattere Arial) e con simboli dei punti sperimentali di sufficiente dimensione da essere chiaramente visibili dopo riduzione. Inviare ciascuna figura, senza didascalia o titolo, in un singolo file, denominato con il numero della figura (figura 1, figura 2, ecc.). Nel caso di più grafici che devono essere riuniti in una sola figura inviare ugualmente più file, denominati figura 1a, figura 1b, ecc. Inviare le figure più complesse (es. fotografie, grafici cromatografici, ecc.) sottoforma di file singoli, denominati con il numero della figura, in un formato adatto per la trasmissione elettronica (es. jpeg).

LETTERA DI ACCOMPAGNAMENTO

Redatta anch'essa in formato elettronico, deve riportare Titolo del manoscritto, Autori e loro affiliazione. Deve essere a firma dell'Autore corrispondente, di cui deve essere chiaramente indicato l'indirizzo, completo di telefono, ed e-mail. Deve essere anche specificato che tutti gli Autori e il Direttore dell'Istituzione di provenienza degli Autori sono d'accordo con la sottomissione dell'elaborato, del quale approvano i contenuti. In aggiunta, l'Autore può indicare in quale Sezione o Rubrica della rivista pubblicare il contributo e suggerire il nome di almeno 1 revisore. E' infine obbligatorio allegare il modulo del Conflitto di Interesse opportunamente compilato. Tale modulo è scaricabile dal sito della rivista (www.bc.sibioc.it)

REVISIONE ED ACCETTAZIONE

L'Editore di BC si riserva di accettare o meno i lavori inviati dopo consultazione di revisori esterni altamente qualificati. Modifiche di stile o di linguaggio nel testo o nell'iconografia possono essere introdotte direttamente nel corso della revisione editoriale e successivamente approvate dagli Autori.

ESTRATTI

Una volta pubblicato il lavoro, l'Autore corrispondente ne riceverà il file elettronico in .pdf, con l'implicito accordo che sarà sua responsabilità farne avere copia a eventuali coautori.

Di norma non sono inviati estratti cartacei dei lavori pubblicati. A pagamento possono tuttavia essere prodotti estratti da fornire su richiesta.

INDIRIZZO A CUI INVIARE GLI ELABORATI

e-mail: biochimica.clinica@sibioc.it

Redazione di Biochimica Clinica

Telefono 0245498282 int. 205

ABBREVIAZIONI

Le seguenti abbreviazioni possono essere usate nel testo senza la definizione per esteso:

ADP	AIDS	AMP	ANOVA	ATP	cAMP	cDNA	cGMP
CoA	CQI	CV	DEAE	DNA	DNase	DS	EDTA
EFLM	ELISA	F(ab') ₂	Fab	FAD	FADH ₂	Fc	HDL
HEPES	HIV	HLA	HPLC	IFCC	IgA	IgE	IgG
IgM	IRMA	LDL	MHC	miRNA	mRNA	NADH	NADPH
NADP ⁺	NAD ⁺	oligo(dT)	pH	pI	poly(A)	pK	PM
RIA	RNA	ROC	rpm	SIBioC	SE	t _{1/2}	Tris
U	UK	US	UV	VEQ	VLDL	WHO	

LINEE GUIDA PER LA VALUTAZIONE STATISTICA

Queste istruzioni hanno lo scopo di fornire raccomandazioni pratiche agli Autori che vogliono inviare un contributo scientifico a Biochimica Clinica; tuttavia esse non rappresentano un sostituto né delle istruzioni dettagliate necessarie per la progettazione di uno studio né di manuali di analisi statistica.

Per descrivere i risultati relativi a specifici disegni di studio (ad esempio studi clinici randomizzati controllati, studi osservazionali) si rimanda alle linee guida scaricabili dal sito dell'EQUATOR Network (1).

Ogni sezione di un articolo scientifico viene trattata separatamente qui di seguito.

Riassunto: la numerosità dei gruppi e i risultati principali dello studio (parametri stimati, confronti tra gruppi, associazioni) devono essere riportati utilizzando le statistiche descrittive più appropriate, media o mediana, deviazione standard (DS) o intervallo interquartile (IQR), intervallo di confidenza (IC95%) e valore p . È consigliabile inoltre riportare la dimensione dell'effetto grezzo o standardizzato (2).

Metodi: il principio base che deve guidare la stesura di questa sezione è quello di descrivere i metodi statistici utilizzati con sufficiente dettaglio da consentire ad un lettore esperto, in possesso dei dati originali, di verificare i risultati riportati dagli Autori. Devono quindi essere descritti: il disegno sperimentale, gli obiettivi primario e secondari (surrogati e/o intermedi), la selezione dei soggetti (criteri di inclusione ed esclusione), le procedure di randomizzazione e di occultamento/mascheramento (1). Il calcolo della dimensione campionaria deve essere fornito insieme agli elementi utilizzati per tale calcolo (errore alfa, potenza, effetto). I metodi utilizzati per trattare eventuali dati mancanti, censurati (ad esempio perché inferiori al limite di sensibilità di una metodica) o aberranti, devono essere indicati insieme al loro numero e/o percentuale. I test statistici devono essere descritti, insieme agli eventuali test utilizzati per verificare il rispetto delle assunzioni richieste (ad esempio omoschedasticità o uguaglianza delle varianze, normalità). Se i dati sono stati trasformati per normalizzare una distribuzione, è necessario riportare il tipo di trasformazione matematica applicata (ad esempio logaritmica, di potenza) e le procedure grafiche e/o statistiche formali utilizzate prima e dopo la trasformazione per valutare l'adattamento alla distribuzione gaussiana. Non è necessario riportare riferimenti bibliografici di metodi statistici, a meno che non siano inusuali. Occorre invece indicare sempre il software statistico utilizzato (nome, versione, dati del produttore).

Risultati: se non già riportato nei metodi, descrivere la dimensione campionaria totale e quella dei sottogruppi in cui è stata effettuata l'analisi statistica. È necessario, inoltre, riportare il numero di soggetti in ogni fase dello studio (soggetti inclusi, esclusi, randomizzati, assegnati ai vari trattamenti, persi) (1). Indicare numeratore e denominatore per le frequenze relative e/o percentuali e per i rapporti calcolati. Le frequenze relative devono essere riportate con 2 cifre significative (ad esempio 0,37; 0,026); le percentuali non devono essere espresse con più di un decimale e non devono essere utilizzate per piccoli campioni ($N < 10$). Se le osservazioni sono state suddivise in classi, occorre specificare chiaramente a quale classe appartengono il limite inferiore e superiore di ogni classe. Generalmente, le statistiche descrittive richiedono una cifra aggiuntiva rispetto a quelle utilizzate per i dati grezzi. Dati distribuiti normalmente devono essere descritti utilizzando media, DS e/o CV% ed espressi come media (DS) e non come "media \pm DS". Quando i dati non sono distribuiti normalmente, o la distribuzione è fortemente asimmetrica, occorre utilizzare la mediana e l'intervallo interquartile al posto di media e DS. Se è stata utilizzata una trasformazione matematica, i calcoli delle statistiche di sintesi devono essere effettuati sui dati trasformati e poi ritrasformati nella scala originale per la presentazione (è possibile ritrasformare la media e i limiti di un intervallo ma non la deviazione standard).

Utilizzare grafici a barre unicamente per rappresentare frequenze assolute, relative e/o percentuali ma non per medie, o altri indici di tendenza centrale. Preferire l'istogramma, il diagramma a scatola e baffi (boxplot) o il dotplot (quest'ultimo con piccole dimensioni campionarie, $N < 20$). Non utilizzare grafici tridimensionali.

Quando si confrontano due gruppi con il test t di Student, è necessario indicare media e DS per ogni gruppo, la differenza delle medie insieme all'intervallo di confidenza, i gradi di libertà, il valore del test ed il valore p . Può essere utile aggiungere una misura di dimensione dell'effetto standardizzato (ad esempio d di Cohen) (2).

Con più di 2 gruppi si utilizzerà il test ANOVA, indicando per ogni gruppo media e DS, i gradi di libertà, il valore del test ed il valore p globale. Se questo non è significativo, i confronti multipli non devono essere eseguiti. Se al contrario risulta significativo, per i relativi post-hoc test è necessario aggiustare per i confronti multipli (ad esempio correzione di Bonferroni, di Tukey).

Per i test di associazione (ad esempio test chi-quadrato, test esatto di Fisher) occorre identificare le variabili, riassumerle con le opportune statistiche descrittive, riportare i gradi di libertà, il valore del test ed il valore p . In presenza di violazione delle assunzioni del test chi-quadrato, deve essere utilizzato il test esatto di Fisher. Si consiglia inoltre di riportare una misura di dimensione dell'effetto (ad esempio ϕ o la V di Cramer) (2).

Per l'analisi di correlazione è necessario indicare il tipo di correlazione utilizzata (ad esempio Pearson o Spearman), il coefficiente di correlazione con il relativo intervallo di confidenza ed il test t (gradi di libertà, valore del test, e valore p). L'analisi di correlazione non deve essere utilizzata per la comparazione di metodi analitici. Preferire invece l'analisi di regressione (Deming o non parametrica di Passing-Bablok) e il diagramma di Bland-Altman (3-4).

Per l'analisi di regressione lineare semplice si riporteranno i dati del test ANOVA (gradi di libertà, valore del test e valore p), i parametri della retta di regressione (pendenza e intercetta) con i relativi intervalli di confidenza, ed il coefficiente di determinazione R^2 .

Per modelli statistici più complessi (ad esempio regressione multipla, modelli ANOVA) è necessario descrivere la verifica delle assunzioni, il valore p del modello e i parametri del modello in forma tabellare (stime dei parametri, intervalli di confidenza, valore p). Può essere utile, inoltre, riportare delle misure di dimensione dell'effetto (ad esempio omega-squared) (2).

In presenza di dati appaiati utilizzare i test opportuni. L'uso di test non parametrici deve essere giustificato tramite l'applicazione di procedure grafiche o test formali atti a valutare la distribuzione delle variabili in studio.

I valori di p devono essere sempre riportati per esteso (1 o 2 cifre significative). Evitare di descrivere i valori di p come $p < 0,05$ oppure $p > 0,05$ oppure NS (non significativo). Se i risultati sono estremamente significativi ed il valore di p calcolato è riportato dal software come $p = 0,000$, è accettabile l'uso di $p < 0,0005$ oppure $p < 0,001$. Gli intervalli di confidenza vanno indicati anche per i risultati non significativi. Se uno dei limiti dell'intervallo di confidenza è negativo, riportarli come "da X a Y".

Il livello di significatività statistica utilizzato convenzionalmente è $p < 0,05$. Se viene utilizzato un livello di significatività diverso, le ragioni di questa scelta devono essere chiaramente indicate nella sezione dei metodi statistici.

Discussione: la significatività statistica non deve essere equiparata all'importanza clinica; ugualmente la non significatività statistica non deve essere interpretata come nessuna differenza o nessun effetto. L'assenza di significatività statistica può infatti dipendere da una scarsa dimensione campionaria e quindi da una bassa potenza statistica. Inoltre, i differenti valori di p non devono essere confrontati tra i diversi test statistici. L'associazione tra variabili non deve essere interpretata come causale, senza ulteriori prove ed evidenze.

Approfondimenti: the SAMPL Guidelines (5).

Bibliografia

1. EQUATOR Network: <https://www.equator-network.org/> (ultimo accesso: Dicembre 2018).
2. Ialongo C. Understanding the effect size and its measures. *Biochimica Medica* 2016;26:150–63.
3. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;8476:307-10.
4. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R, per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "Statistica per il laboratorio. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
5. Lang TA, Altman DG. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: the "Statistical Analyses and Methods in the Published Literature" or the SAMPL Guidelines. *Int J Nurs Stud* 2015;52:5-9.

Milano, Marzo 2020

Cari Colleghi,

le patologie renali interessano un numero importante di soggetti; in Italia, le stime per la malattia renale cronica sono per un coinvolgimento di circa il 10% della popolazione, percentuale che aumenta di molto in presenza di diabete e/o ipertensione. La storia naturale della malattia è un declino progressivo della velocità di filtrazione glomerulare. Di grande rilevanza poi è il danno renale acuto che interessa circa il 10-15% dei pazienti ospedalizzati (e circa il 50% dei pazienti delle unità di terapia intensiva) con un tasso elevato di mortalità. La diagnosi precoce è strategica sia nella malattia acuta che in quella cronica. Nel primo caso consente un intervento terapeutico tempestivo evitando danni acuti all'organo e complicanze emodinamiche che spesso richiedono terapie intensive e possono reliquare in danni permanenti a lungo termine. Nel caso della malattia cronica, la diagnosi precoce di danno renale consente di rallentare l'evoluzione della malattia e delle sue complicanze, evitando o ritardando quanto più possibile l'uremia e la necessità di terapie sostitutive.

Poiché il danno renale è clinicamente silente nelle fasi precoci, il Laboratorio Clinico diventa di fondamentale importanza, fornendo elementi indispensabili nei diversi scenari clinici, che vanno dallo screening alla diagnosi, alla prognosi, al monitoraggio della terapia.

Esistono tuttavia altri aspetti delle malattie renali nelle quali il laboratorio riveste un ruolo chiave; a titolo di esempio possiamo ricordare il trapianto di rene e il paziente dializzato, la sindrome cardio-renale, il rene policistico, il mieloma renale. Nell'ultimo ventennio è stato fatto uno sforzo notevole da parte della comunità scientifica per individuare e testare nuovi biomarcatori dotati di maggiore sensibilità e specificità rispetto a quelli tradizionalmente in uso nella pratica assistenziale, come la creatinina, la proteinuria e la stima del filtrato con formule matematiche basate sulla creatinina plasmatica e sulla cistatina C (eGFR).

Tra i biomarcatori emergenti, alcuni sono stati valutati in numerosissimi studi clinici, soprattutto nella malattia renale acuta, come ad esempio NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin), TIMP-2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-2) e IGFBP7 (Insulin Growth Factor Binding Protein-7). Questi biomarcatori possono essere misurati con metodi affidabili nei laboratori clinici, anche se non sono ancora entrati diffusamente nella pratica assistenziale. Altri biomarcatori proposti dalla ricerca di base, come ad esempio suPAR (soluble urokinase plasminogen activator receptor), uEGF (urinary epidermal growth factor) e l'elastina richiedono valutazioni metodologiche e cliniche. Per tutti, esiste la necessità che le caratteristiche analitiche e di utilità clinica siano ben conosciute e accuratamente valutate.

Biochimica Clinica ritiene che tale tematica sia così rilevante per la professione da meritare una trattazione particolarmente approfondita; è stato così deciso di dedicare una monografia a questa diagnostica.

È infatti fondamentale che i laboratori (ma anche i clinici) siano informati non solo delle caratteristiche analitiche e diagnostiche dei vecchi e nuovi biomarcatori, ma anche delle possibili criticità correlate all'appropriatezza della richiesta, soprattutto focalizzata sulla conoscenza della finestra diagnostica del biomarcatore, e sull'interpretazione corretta dei risultati nella pratica clinica.

Chiediamo quindi a tutti coloro che hanno in corso esperienze o valutazioni da proporre sulle diverse tematiche coinvolte della monografia, di presentare i loro contributi allo scopo di condividerli con la comunità professionale italiana, concorrendo al chiarimento e possibilmente alla soluzione delle molte problematiche che questa diagnostica sta ponendo e porrà nel futuro.

Il termine per l'invio dei manoscritti è fissato per il 31 Dicembre 2020; questi saranno come sempre sottoposti all'esame da parte di revisori specializzati al fine di garantirne l'accettabilità scientifica.

Con i più cordiali saluti

Maria Stella Graziani
Editor in chief di Biochimica ClinicaMichele Mussap
Davide Giavarina
Guest Editors per la monografia

La diagnostica di laboratorio della malattia di von Willebrand è indispensabile per la corretta gestione terapeutica del paziente

Massimo Franchini

Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia, ASST Mantova

La malattia di von Willebrand (VWD) è la più comune delle malattie emorragiche congenite con una prevalenza riportata in studi epidemiologici fino all'1-2%, anche se i casi clinicamente rilevanti hanno una prevalenza dieci volte più bassa (1). La patologia ha usualmente una trasmissione autosomica dominante, ma può essere recessiva nelle forme più gravi. La VWD è causata da un difetto quantitativo e/o qualitativo del fattore von Willebrand (VWF), la glicoproteina multimerica sintetizzata dalle cellule endoteliali e dai megacariociti, che media l'adesione/agggregazione piastrinica e stabilizza il fattore VIII (FVIII) nella circolazione.

La corretta diagnosi di laboratorio della VWD è cruciale perché in base alla classificazione nei vari sottotipi (1, 2A, 2B, 2M, 2N e 3) viene deciso il destino terapeutico dei pazienti (utilizzo del farmaco sintetico desmopressina o dei concentrati plasma-derivati o ricombinanti di FVIII/VWF) (2-6). La diagnosi della VWD è un'evenienza tutt'altro che rara per il laboratorista, vista la prevalenza della malattia nella popolazione generale, tuttavia può risultare in alcuni casi alquanto complessa e difficoltosa (7,8). Un esempio paradigmatico è rappresentato dalla VWD di tipo 1, dove la penetranza incompleta e la variabile espressività dovuta a fattori ambientali (come ad esempio età, stress, gravidanza, farmaci) ed epigenetici (ad esempio i gruppi sanguigni ABO) contribuiscono a spiegare l'eterogeneità di questo fenotipo. E' ben nota infatti l'ampia sovrapposizione dei livelli plasmatici di VWF che si osserva tra i pazienti con forme lievi di VWD tipo 1 e i soggetti normali, determinando una bassa sensibilità degli esami di laboratorio nella VWD. Risulta pertanto fondamentale, ai fini di una diagnosi corretta, la stretta collaborazione tra lo specialista in Medicina di Laboratorio ed i clinici dei Centri Emofilia in modo da poter correlare strettamente il fenotipo clinico con i dati di laboratorio (9).

Gli aspetti diagnostici della VWD vengono analizzati nelle Raccomandazioni pubblicate dal Gruppo di Studio SIBioC Emostasi in questo numero di *Biochimica Clinica* (10). Questo documento, per la sua completezza e chiarezza, rappresenta un valido strumento utile per la pratica quotidiana per tutti i professionisti afferenti a laboratori sia specialistici che non specialistici. Buona lettura.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987;69:454-9.
2. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2004;351:683-94.
3. Mannucci PM. How I treat patients with von Willebrand disease. *Blood* 2001;97:1915-9.
4. Franchini M, Mannucci PM. Von Willebrand factor (Vonvendi): the first recombinant product licensed for the treatment of von Willebrand disease. *Expert Rev Hematol* 2016;9:825-30.
5. Favaloro EJ, Franchini M, Lippi G. Biological therapies for von Willebrand disease. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12:551-64.
6. Mannucci PM, Franchini M, Castaman G, et al, on behalf of the Italian Association of Hemophilia Centers. Evidence based recommendations on the treatment of von Willebrand disease in Italy. *Blood Transfus* 2009;7:117-26.
7. Favaloro EJ, Lillicrap D, Lazzari MA, et al. von Willebrand disease: laboratory aspects of diagnosis and treatment. *Haemophilia* 2004;10(Suppl. 4):164-8.
8. Franchini M. The platelet function analyzer (PFA-100): an update on its clinical use. *Clin Lab* 2005;51:367-72.
9. Mannucci PM, Franchini M. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2017;376:701.
10. Morelli B, Stufano F, per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi. Raccomandazioni per la diagnosi di laboratorio della malattia di Willenrand. *Biochim Clin* 2020;44:73-85.

Corrispondenza a: Massimo Franchini, Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia, ASST Mantova, E-mail massimo.franchini@asst-mantova.it

Ricevuto: 29.11.2019

Revisionato: 29.11.2019

Accettato: 02.12.2019

Pubblicato on-line: 01.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.011

La valutazione della frammentazione del DNA spermatico nei soggetti infertili

Federica Cariati¹, Francesca Borrillo^{2,3}, Valeria D'Argenio^{1,2,3}, Rossella Tomaiuolo^{1,3}

¹KronosDNA s.r.l., spin-off dell'Università Federico II, Napoli

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Napoli

³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

ABSTRACT

The laboratory assessment of sperm DNA fragmentation in infertile patients.

Over 15% of couples worldwide suffer from infertility and in 50% of cases a male factor is found. According to the World Health Organization, sperm analysis is the most appropriate test to assess male infertility. Since quite often, the conventional semen parameters are related to sperm DNA damage, the integration of this evaluation with sperm DNA fragmentation (SDF) could independently predict the sperm reproductive potential. Unfortunately, this analysis has not entered into routine clinical practice. The aim of this review is to discuss the importance of the SDF analysis and its clinical implication and to evaluate the extrinsic and intrinsic factors that affect the DNA fragmentation. In addition, principles and protocols of different methods used to evaluate and quantify the SDF are reviewed; advantages and disadvantages of different methods are reported.

INTRODUZIONE

L'infertilità maschile, riscontrata nel 7% della popolazione, è alla base del 50% dei casi d'infertilità di coppia (1). Sono note cause pre-testicolari (riconducibili a disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi), testicolari (patologie prevalentemente testicolari) e post-testicolari (ostruzioni urogenitali, vasectomia, fattori delle ghiandole accessorie) con possibili alterazioni della produzione, maturazione, vitalità e liberazione degli spermatozoi (2). Nel 30-40% dei casi, in cui la causa rimane inspiegata e quindi idiopatica, si presume che questa condizione sia determinata dalla coesistenza di fattori diversi o non ben identificabili, quali ad esempio danno da stress ossidativo, disturbi genetici o epigenetici e inquinamento ambientale (3).

Secondo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il principale esame diagnostico per valutare l'infertilità maschile è lo spermogramma che, convenzionalmente, comprende l'analisi del fluido seminale (colore, volume, pH e viscosità) e della parte corpuscolare (concentrazione, motilità, vitalità e morfologia degli spermatozoi) (4). Il riscontro di una o più alterazioni dei parametri che riguardano la concentrazione, la motilità e la morfologia degli spermatozoi in almeno uno spermogramma su due,

eseguito a distanza di 1 e 4 settimane, è suggestivo di infertilità maschile (5). Tra questi, sono considerati parametri particolarmente significativi l'oligospermia, l'astenospermia e la teratospermia. Nonostante queste importanti indicazioni, il potere predittivo dello spermogramma sull'esito riproduttivo è relativamente basso poiché non fornisce informazioni sulla funzionalità spermatica (6). Inoltre, i valori di riferimento dello spermogramma secondo linee guida del WHO sono determinati usando il 5° percentile come valore limite; questo potrebbe giustificare il fatto che nel 15% dell'infertilità maschile clinicamente conclamata non siano riscontrate alterazioni dello spermogramma (6). Pertanto, le indicazioni ottenute dallo spermogramma non devono essere considerate come parametro assoluto della fertilità maschile, ma devono essere rapportate al quadro clinico dell'individuo e soprattutto della coppia nel suo complesso (2).

Con lo scopo di integrare le informazioni ottenute negli ultimi anni dallo spermogramma, numerosi studi sono stati focalizzati sulla valutazione dell'integrità del DNA dello spermatozoo, compresa l'identificazione di parametri (e relativi valori soglia) che possano fungere da biomarcatori di integrità funzionale del DNA spermatico (7).

Corrispondenza a: Federica Cariati, Università Federico II di Napoli, E-mail federica.cariati@unina.it

Ricevuto: 11.10.2019

Revisionato: 14.11.2019

Accettato: 27.11.2019

Publicato on-line: 15.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.010

Danni al DNA dello spermatozoo sono associati ad esiti negativi sullo sviluppo embrionale, a poliabortività e ad un aumentato rischio di malattie genetiche nella prole (8-10). È importante ricordare che, durante la spermiogenesi, il DNA dello spermatozoo va incontro ad un fisiologico processo di frammentazione facilitando la riorganizzazione della cromatina; in seguito, l'intervento delle topoisomerasi ne permette la riparazione. Tuttavia, in condizioni patologiche (difetti della condensazione cromatinica, processi apoptotici e stress ossidativo) questo processo di riparazione potrebbe essere inefficace (11).

Partendo, quindi, dal presupposto che nel liquido seminale dei soggetti infertili è stata riscontrata una frammentazione del DNA spermatico (sperm DNA fragmentation, SDF) maggiore, rispetto a quella riscontrata nei soggetti fertili, la valutazione dell'integrità del genoma dello spermatozoo è stata proposta come parametro indipendente e aggiuntivo della qualità spermatica e del potenziale riproduttivo (12).

In soggetti normozoospermici e fertili, circa il 5-15% degli spermatozoi risulta avere il DNA frammentato rispetto ad un valore >30% nei soggetti con infertilità. In particolare, livelli di SDF compresi tra il 30% e il 40% sono associati negativamente con la qualità dello sperma e livelli di SDF >26% sembrano implicati nella poliabortività (13-15). Sulla base delle osservazioni che mettono in relazione l'integrità del DNA spermatico e gli esiti della gravidanza, la valutazione dell'SDF nell'iter diagnostico della coppia infertile sta assumendo una importanza sempre maggiore.

Scopo di questa rassegna è quello di analizzare e confrontare le metodiche attualmente in uso per la sua valutazione esaminando le cause più note del danno al DNA spermatico nonché i metodi utilizzati per determinarlo.

CAUSE INTRINSECHE ED ESTRINSECHE DI FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO

La SDF è stata attribuita ad una varietà di cause innescate da fattori intrinseci ed estrinseci di origine patologica, ambientale o riconducibili a stili di vita scorretti.

Fattori intrinseci

Un danno del DNA spermatico, che può coinvolgere uno o entrambi i filamenti, può avvenire durante la maturazione a livello testicolare o durante il transito post-testicolare (8).

Nella spermatogenesi possono essere identificate 3 fasi principali: la differenziazione delle cellule staminali spermatogoniali; le divisioni meiotiche per produrre spermatozoi aploidi; lo scambio istone-protamina a favore della motilità e della maturazione degli spermatozoi.

In ogni ciclo di spermatogenesi, fino al 75% delle cellule germinali che entrano in meiosi I viene rimosso per apoptosi, al fine di bilanciare il rapporto tra cellule di

Sertoli e cellule germinali (16-18). Tuttavia, alcune cellule germinali apoptotiche danneggiate sfuggono a questo processo, continuando a rimodellarsi e apparendo normali all'analisi morfologica dell'eiaculato (un processo denominato "apoptosi abortiva") (19).

Durante il transito nell'epididimo si verificano, invece, eventi di maturazione, tra cui l'attivazione dell'iperomotilità, la sostituzione degli istoni con le protamine e la formazione di ponti disolfuro protamina-protamina per ulteriore condensazione della cromatina. Mediante questo processo, grazie alla compattazione del genoma, si ottiene una struttura protetta; al contrario, a seguito di un deficit di protamina, il DNA è scarsamente condensato e vulnerabile al danno (20-23).

Un altro fattore che contribuisce al danno del DNA spermatico è lo stress ossidativo. Sebbene le specie reattive dell'ossigeno (ROS) siano essenziali per gli eventi di maturazione, i loro livelli sono ottimizzati dagli enzimi antiossidanti del plasma seminale e la rottura di questo equilibrio redox ottimale ha conseguenze deleterie per l'integrità della cromatina (24, 25). Nel 30-80% dei casi di infertilità maschile è stato identificato un livello significativo di stress ossidativo (26-28). La sovraesposizione innesca una cascata di segnali di stress ossidativo che guidano la cellula verso l'apoptosi, con conseguente danno al DNA (29, 30). Gli antiossidanti del liquido seminale, principalmente il superossido e la glutatione perossidasi, regolano questo stato redox (31,32). Gli spermatozoi sono particolarmente vulnerabili nella fase post-testicolare, a causa dell'incapacità di rimuovere il danno al DNA con i sistemi di riparazione o clearance apoptotica (33). Studi *in vivo* condotti su animali dimostrano che le regioni associate agli istoni sono attaccate preferenzialmente dal danno mediato da ROS (34).

Fattori estrinseci

I fattori esterni correlati con elevati livelli di danno al DNA spermatico e, quindi, al potenziale di fertilità maschile sono molteplici: i più ricorrenti sono lo stile di vita scorretto (obesità, fumo e alcol) e le cause ambientali (inquinamento, esposizione a radiazioni e a temperature elevate) (3, 35,36). Studi sperimentali e clinici hanno dimostrato che il consumo di alcol, il fumo di sigaretta e una dieta errata causano carenza di vitamine e di agenti antiossidanti, contribuendo all'aumento dei livelli di stress ossidativo (37, 38). Anche un eccessivo consumo di caffeina provoca l'aumento del livello di ROS attraverso la riduzione del rame (Cu^{++} in Cu^+); ed ancora, è stata riscontrata una correlazione tra fumo di sigaretta attivo con ridotta qualità seminale, aumento della frammentazione del DNA spermatico e alterazioni della membrana plasmatica dello spermatozoo (39,40). Recenti studi hanno dimostrato che fattori fisici, come le radiazioni elettromagnetiche a radiofrequenza e le alte temperature, possono colpire il sistema riproduttivo maschile direttamente causando un aumento della produzione di ROS o indirettamente, coinvolgendo il sistema endocrino, provocando uno

squilibrio ormonale (41).

È ormai noto che infezioni genito-urinarie, ad esempio da *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma* inducono la frammentazione del DNA degli spermatozoi; ne deriva quindi la necessità di eseguire un'attenta analisi microbiologica del liquido seminale e di ripeterla al termine di un'eventuale terapia (42). Inoltre, di recente interesse nell'ambito nella medicina della riproduzione, è l'infezione da papilloma virus (HPV). I soggetti affetti risultano avere un'alterazione della motilità degli spermatozoi e un'elevata frammentazione del DNA con esiti negativi sia in caso di concepimento naturale che in tecniche di fecondazione assistita (43,44). Garolla et al nel 2018 hanno pubblicato uno studio retrospettivo su circa 151 coppie infertili in cui era stata riscontrata infezione da HPV nel liquido seminale. 79 pazienti sottoposti al vaccino per HPV *versus* 72 non sottoposti a vaccino, monitorati nel tempo, hanno mostrato un miglioramento significativo di concepimento naturale e di bambini nati (45).

Le principali patologie a cui viene associata l'infertilità maschile sono diabete e cancro. Facendo riferimento alla frammentazione del DNA, è stato dimostrato che il diabete induce frammentazione del DNA nucleare e delezioni del DNA mitocondriale; studi *in vivo* su animali dimostrano che trattamenti chemioterapici hanno effetti chemiotossici sull'integrità cromatinica e sul profilo proteico della testa degli spermatozoi (46,47).

Tra le patologie più frequenti che interessano l'apparato riproduttivo in giovani pazienti, il varicocele è correlato con un aumento significativo della frammentazione del DNA spermatico (48).

Le principali conseguenze di queste alterazioni sull'esito riproduttivo sono la diminuzione della formazione di blastocisti e l'aumento dei tassi di abortività spontanea (46-48).

METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO

Per la determinazione della frammentazione del DNA spermatico sono stati messi a punto vari test basati su metodiche diverse. Alcuni esempi, citati in ordine di trattazione, sono: il terminal deoxyuridine nick end labeling assay, (TUNEL) e la sua variante l'in-situ nick translation; lo Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA); il Comet assay (single-cell gel electrophoresis, SCGE); lo Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test e il DNA breakage detection-fish (DBD-FISH) (49-54).

Ad oggi, i metodi più comunemente usati sono il TUNEL assay, il SCGE, l'SCD e l'SCSA, pertanto di questi sarà descritta la metodica di base, i vantaggi e gli svantaggi.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling

Il TUNEL assay è un metodo che misura direttamente il danno del DNA spermatico; si basa

sull'azione della deossinucleotidil transferasi (Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TdT) che incorpora nucleotidi (desossiridinatrifosfato, dUTPs) marcati a livello dei gruppi 3'-OH terminali resi accessibili dalla rottura del filamento del DNA (55). I nucleotidi che vengono legati dalla TdT sono evidenziabili poiché marcati con un tag identificabile in fluorescenza o enzimaticamente (nick end labelling).

Il metodo più comunemente usato per la marcatura dei nucleotidi è la coniugazione diretta con un colorante fluorescente (solitamente FITC); alternativamente si utilizzano marcatori fluorescenti, biotinilati, digossigenilati. La rilevazione avviene mediante microscopia a fluorescenza (valutazione qualitativa) oppure utilizzando i tag fluorescenti mediante citometria a flusso (valutazione quantitativa); gli spermatozoi con un segnale di maggiore intensità sono quelli in cui c'è stata una maggiore incorporazione di nucleotidi marcati in corrispondenza del DNA danneggiato (56).

Per questa metodica sono stati riportati diversi valori soglia rapportati allo stato di fertilità maschile ma resta ancora controversa la sensibilità e la specificità (55). Inoltre, sono stati pubblicati numerosi studi che riportano una correlazione negativa tra i valori di SDF superiori al 12% e il tasso di gravidanza (57-60).

I principali vantaggi sono: la possibilità di eseguire l'analisi su una piccola quantità di campione, poiché gli spermatozoi possono essere distinti l'uno dall'altro singolarmente e la possibilità di utilizzare microscopi già presenti in laboratorio. Tra gli svantaggi, bisogna segnalare che: il metodo presenta delle limitazioni nella valutazione degli spermatozoi immaturi, e che i risultati risentono di un'elevata variabilità intra-analitica e inter-laboratorio (61).

Sperm Chromatin Structure Assay

Sviluppata negli anni '70, l'SCSA fu la prima tecnica in grado di rilevare la frammentazione del DNA spermatico nell'uomo. Da allora ha subito alcune modifiche grazie alle quali è il test commerciale più comunemente utilizzato per indagare il danno del DNA e le anomalie della cromatina negli spermatozoi.

Il DNA di campioni, freschi o congelati, viene denaturato in condizioni lievemente acide; in questo modo è facilitata la denaturazione solo del DNA danneggiato. Successivamente, le cellule spermatiche vengono colorate con arancio acridina (AO), un fluorocromo metacromatico, specifico per gli acidi nucleici. Esso emette fluorescenza nel verde quando viene intercalato nella doppia elica del DNA e nel rosso quando viene legato all'esterno della singola elica di DNA. Dal rapporto fra la fluorescenza rossa (DNA danneggiato) sulla fluorescenza totale (DNA integro e DNA danneggiato), determinato con citometria a flusso o microscopia a fluorescenza, si ricava la quota del DNA frammentato, ossia il DNA Fragmentation Index (DFI) (62). In particolare, un DFI <30% correla con una buona integrità cromatinica, al contrario un DFI ≥30% correla con anomalie della struttura cromatinica (62). L'SCSA

determina anche la quota di spermatozoi immaturi con difetti nella transizione istone-protamina (HDS); quindi, un DFI $\geq 30\%$ e un HDS del 15% correlano con bassissime probabilità di riuscita della fecondazione *in vivo* (63-65). I vantaggi di questo test sono la capacità di analizzare rapidamente un numero statisticamente significativo di spermatozoi (circa 5 000 spermatozoi per campione), l'elevata riproducibilità e la possibilità di utilizzare campioni congelati (65-67). Gli svantaggi risiedono nei costi elevati, dovuti soprattutto alle apparecchiature richieste (66,68).

Comet Assay o test della cometa

Il test della cometa (single-cell gel electrophoresis, SCGE), introdotto per la prima volta nel 1984, viene così definito, poiché, in presenza di DNA frammentato, la cellula assume un'immagine somigliante a una cometa, in cui il DNA integro occupa la testa e i frammenti si posizionano a formare la coda. Di conseguenza, la scia della cometa sarà proporzionale al danno del DNA come lunghezza e come intensità di segnale (69). Questa tecnica, basata sulla diversa mobilità elettroforetica dei frammenti di DNA a seconda della loro dimensione, prevede l'elettroforesi degli spermatozoi inclusi su gel di agarosio e, grazie all'impiego di un colorante nucleare intercalante, la successiva visualizzazione con microscopio a fluorescenza (56). Il test eseguito in condizioni di pH neutro permette di evidenziare danni al doppio filamento di DNA, mentre in condizioni alcaline può rilevare sia i danni al singolo che al doppio filamento, così come i siti alcalino-labili (69). Il fatto che molti Autori ne riconoscano la significatività è sicuramente un elemento di vantaggio; inoltre, grazie al fatto che può essere effettuato su poche cellule, risulta particolarmente indicato nei pazienti oligospermici (70-72). Tuttavia, è richiesto personale specializzato per l'esecuzione di questo protocollo laborioso e non del tutto standardizzato.

Sperm Chromatin Dispersion Test

L'SCD è una tecnica basata sul fatto che, in seguito a denaturazione acida, la dispersione della cromatina crea un alone, la cui grandezza è inversamente proporzionale al danno del DNA dello spermatozoo (73). I campioni diluiti e adagiati su microgel di agarosio su vetrino, sono prima trattati con una soluzione acida per la denaturazione del DNA e poi con una soluzione lisante per rimuovere le proteine nucleari. Quindi, grazie al tipo d'intercalante, è possibile osservare gli spermatozoi in microscopia ottica in campo chiaro o in fluorescenza e, distinguere i "non frammentati" (presenza di un alone causato dalla cromatina dispersa) dai "frammentati" (presenza di un alone piccolo o totale assenza di alone); inoltre, gli spermatozoi che presentano il caratteristico alone a fantasma sono definiti "degradati". La percentuale di frammentazione del DNA spermatico di ciascun campione è determinata dalla somma degli spermatozoi frammentati e degradati rispetto al numero totale degli spermatozoi osservati, dopo aver osservato

almeno 100 spermatozoi. Questo è il metodo più comunemente usato nei laboratori poiché è semplice, veloce, economico, ha un'alta riproducibilità e non richiede strumenti complessi. Tuttavia, tra gli svantaggi bisogna riportare che quando il bordo periferico dell'alone presenta bassa densità di cromatina può talvolta non essere distinguibile; inoltre, non tutti gli aloni si trovano sullo stesso piano focale, il che può farne sottostimare la presenza; ed infine la coda dello spermatozoo non è sempre preservata, e quindi non è sempre distinguibile dalle altre cellule eventualmente presenti, che si configurano come contaminanti.

DISCUSSIONE

L'aspetto più importante da tener presente riguardo i metodi per la valutazione della frammentazione del DNA degli spermatozoi è la condizione di pH in cui si opera per rilevare il danno del DNA *in vitro*. I test in cui è prevista una fase di denaturazione iniziale (pH acido/alcalino) permettono di evidenziare siti acido/alcalini, mentre, quando questa fase non è prevista, si evidenziano danni nel singolo o nel doppio filamento di DNA. *In vivo*, il pH intracellulare di circa 7,0 dell'ovocita permette di riparare le rotture del DNA a singolo filamento o i siti acido/alcalini, ma non il danno del doppio filamento (11).

In particolare, TUNEL, (particolarmente nella sua variante *in situ-nick translation* che quantifica dUTP biotinilato intercalato nelle rotture del DNA a singolo filamento attraverso la DNA polimerasi) e il test della cometa a pH neutro effettuano la valutazione diretta dell'integrità del DNA spermatico, mentre, il saggio della struttura della cromatina spermatica (SCSA), il test della dispersione della cromatina spermatica (SCD) e il test della cometa a pH alcalino effettuano la valutazione indiretta.

Queste considerazioni metodologiche potrebbero, in parte, essere ricondotte ai risultati contrastanti ottenuti sulla correlazione tra esiti di gravidanza e frammentazione del DNA analizzata con metodiche diverse, com'è stato riscontrato per il TUNEL e l'SCSA (60-74). Difatti, le differenti metodiche misurano aspetti diversi del danno al DNA: mentre il TUNEL e il test della cometa a pH neutro rivelano il danno utilizzando reagenti che si legano al DNA danneggiato, l'SCSA, l'SCD e il test della cometa a pH alcalino valutano l'integrità cromatinica e la suscettibilità del DNA attraverso la denaturazione (Tabella 1) (69). Inoltre, è necessario ribadire che un fattore confondente potrebbe essere il campione di partenza utilizzato per l'analisi SDF ed in particolare spermatozoi analizzati da eiaculato oppure selezionati attraverso *swim up* o gradiente. È, infatti, noto come le diverse tecniche di selezione degli spermatozoi influenzano l'analisi della frammentazione del DNA spermatico. Nell'ottica di una valutazione oggettiva dei risultati è quindi necessario una standardizzazione della preparazione del campione di partenza (75).

La valutazione della frammentazione del DNA

Tabella 1

Metodi più comunemente utilizzati per la valutazione del danno al DNA negli spermatozoi.

	Denaturazione iniziale	Evidenza di danno al singolo filamento di DNA	Evidenza di danno al doppio filamento di DNA	Quantità del campione (numero di cellule)	Metodica di base	Strumentazione necessaria x rivelazione	Bibliografia
Tunel assay	X	✓*	✓*	2 x 10 ⁶	nick end labeling	microscopia, a fluorescenza/ citofluorimetria	55
Cometa a pH neutro	X	X	✓	0,5-10 × 10 ⁶	elettroforesi su singola cellula	microscopia a fluorescenza	51,69
Cometa a pH alcalino	✓	✓	✓	0,5-10 × 10 ⁶	elettroforesi su singola cellula	microscopia a fluorescenza	51,69
SCSA	✓	✓	✓	1-2 × 10 ⁶	colorazione con arancio di acridina	citofluorimetria/ microscopia a fluorescenza	62
SCD	✓	✓*	✓*	5-10 × 10 ⁶	decondensazione cromatinica	microscopia a campo chiaro	71

*, non è possibile distinguere se è il danno è al singolo o al doppio filamento.

potrebbe inquadrare il paziente a livello molecolare, tuttavia, a causa delle limitazioni descritte, l'utilizzo nella pratica clinica non è diffuso. Il Laboratorio di Medicina della Riproduzione, che già riveste un ruolo essenziale in molte fasi del percorso riproduttivo, in questo ambito può avere l'obiettivo di standardizzare i protocolli di analisi e di definire un valore decisionale univoco in grado di discriminare i diversi livelli di danno del DNA spermatico (75,76). Pur non essendo possibile trarre conclusioni definitive in merito al valore predittivo della frammentazione del DNA degli spermatozoi, da quanto si evince dalla letteratura recente, sembrerebbe che, in presenza di un elevato indice di frammentazione del DNA spermatico, i tassi di successo di gravidanza rimangono bassi mentre quelli di abortività sono elevati, anche ricorrendo a procedure di procreazione medicalmente assistita (14, 80-83).

La presenza di frammentazione del DNA degli spermatozoi potrebbe essere un importante incentivo per modificare lo stile di vita, poiché agenti fisici (radiazioni, calore, fumo di sigaretta, inquinanti atmosferici), agenti chimici (farmaci antitumorali), infezioni trasmesse sessualmente e fattori biologici (l'aumento dell'età maschile, indice di massa corporea elevato e diabete) sono noti per influenzare l'integrità del DNA spermatico (80,81).

CONCLUSIONI

Nonostante le numerose evidenze dell'impatto della frammentazione non-fisiologica del DNA sulla qualità degli spermatozoi, rimane controversa la valutazione dell'SDF nell'iter diagnostico della coppia infertile o dell'infertilità maschile (68). Nessuna tra le metodiche

oggi disponibili è in grado di differenziare le rotture del DNA patologiche (ossia, il DNA frammentato rilevante ai fini dell'esito riproduttivo), dalle rotture fisiologiche (ossia, quelle che avvengono durante il processo di condensazione cromatinica).

Oltre al fattore metodologico, il valore predittivo dei test di frammentazione del DNA spermatico dipende da una serie di fattori, alcuni relativi al danno stesso degli spermatozoi (ad esempio, percentuale di spermatozoi danneggiati, estensione del danno al DNA per spermatozoo, combinazione di frammentazione del DNA e danno nucleotidico) e altri legati alla capacità dell'ovocita di riparare il danno al DNA dello spermatozoo (l'ovocita può riparare i danni a singola elica mentre quelli a doppia elica sono irreversibili).

Una volta effettuata la standardizzazione dei protocolli e dei valori decisionali, i test di frammentazione del DNA potrebbero essere introdotti nella diagnostica dell'infertilità maschile, in quanto informativi di un ulteriore parametro non visibile con lo spermogramma.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci* 2015;8:191-6.
2. Cariati F, D'Argenio V, Tomaiuolo R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med* 2019;17:267.
3. Cariati F, D'Uonno N, Borrillo F, et al. Bisphenol A: an

- emerging threat to male fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17:6
4. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-93.
 5. Barratt CL, Mansell S, Beaton C, et al. Diagnostic tools in male infertility-the question of sperm dysfunction. *Asian J Androl* 2011;13:53-8.
 6. Chen X, Zhang W, LuoY, et al. Predictive value of semen parameters in vitro fertilisation pregnancy outcome. *Andrologia* 2009;41:111-7.
 7. Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl* 2010;12:99-103.
 8. Champroux A, Torres Carreira J, Gharagozloo P, et al. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl* 2016;26:7.
 9. Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, et al. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reprod Biomed Online* 2016;33:404-11.
 10. Zini A, Bielecki R, Phang D et al. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-7.
 11. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93:1027-36.
 12. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446-51.
 13. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2015;30:120-7.
 14. Simon L, Zini A, Dyachenko A. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017;19:80-90.
 15. Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2008;90:1229-31.
 16. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossary of molecular biology and clinical molecular biology. Part I: general terms. *Biochim Clin* 2019;43:90-105.
 17. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978;190:905-26.
 18. Rodriguez I, Ody C, Araki K, et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997;16:2262-70.
 19. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999;251:350-5.
 20. De Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 1995;18:487-95.
 21. Gong S, San Gabriel MC, Zini A, et al. Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men. *J Androl* 2012;33:1342-51.
 22. Simon L, Castillo J, Oliva R, et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:724-34.
 23. De lullis GN, Thomson LK, Mitchell LA, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;81:517-24.
 24. De Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 1995;18:487-95.
 25. Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum Reprod* 1999;14:2513-6.
 26. Agarwal A, Virk G, Ong C, et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1-17.
 27. Koppers AJ, De lullis GN, Finnie JM, et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3199-207.
 28. Lobascio AM, De Felici M, Anibaldi M, et al. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology* 2015;3:265-70.
 29. Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, et al. Phosphoinositide 3- kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011;436:687-98.
 30. Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function- in sickness and in health. *J Androl* 2012;33:1096-106.
 31. Bergamo P, Volpe MG, Lorenzetti S, et al. Human semen as an early, sensitive biomarker of highly polluted living environment in healthy men: A pilot biomonitoring study on trace elements in blood and semen and their relationship with sperm quality and RedOx status. *Reprod Toxicol* 2016;66:1-9.
 32. Alviggi C, Cariati F, Conforti A et al. The effect of FT500 Plus® on ovarian stimulation in PCOS women. *Reprod Toxicol* 2016;59:40-4.
 33. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature* 2004;432:48-52.
 34. Noblanc A, Damon Soubeyrand C, Karrich B, et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med* 2003;65:719-23.
 35. Bosco L, Notari T, Ruvolo G et al. Sperm DNA fragmentation: An early and reliable marker of air pollution. *Environ Toxicol Pharmacol* 2018;58:243-9.
 36. Radwan M, Jurewicz J, Merez-kot D, et al. Sperm DNA damage-the effect of stress and everyday life factors. *Int J Impot Res* 2016;28:148-54.
 37. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. In: *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*. ACS Symposium Series 2011:1-37.
 38. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, et al. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol* 2011;45:403-9.
 39. Azam S, Hadi N, Khan NU, et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monitor* 2003;9:325-30.
 40. Hamad M, Shelko N, Kartarius S, et al. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology* 2014;2:666-77.
 41. Boggia B, Carbone U, Farinara E, et al. Effects of working posture and exposure to traffic pollutants on sperm quality. *J Endocrinol Invest* 2009;32:430-4.
 42. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, et al. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection

- by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril* 2008;90:328-34.
43. Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E, et al. High-risk human papillomavirus in semen is associated with poor sperm progressive motility and a high sperm DNA fragmentation index in infertile men. *Hum Reprod* 2019;34:209-17.
 44. Garolla A, Engl B, Pizzol D, et al. Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril* 2016;105:65-72.
 45. Garolla A, De Toni L, Bottacin A, et al. Human Papillomavirus Prophylactic Vaccination improves reproductive outcome in infertile patients with HPV semen infection: a retrospective study. *Sci Rep* 2018;8:912.
 46. Agbaje I, Rogers D, McVicar C, et al. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007;22:1871-7.
 47. Maselli J, Hales BF, Chan P, Robaire B. Exposure to bleomycin, etoposide, and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol Reprod* 2012;86:166.
 48. Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21:986-93.
 49. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207:202-5.
 50. Gold R, Schmied M, Rothe G et al. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1023-30.
 51. Hughes C, Lewis S, McKelvey-Martin V, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996;2:613-9.
 52. Fernandez JL, Vazquez-Gundin F, Delgado A, et al. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res* 2000;453:77-82.
 53. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
 54. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
 55. Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:291-300.
 56. Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare. *Biochim Clin* 2019;43:435-48.
 57. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446-51.
 58. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602-7.
 59. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002;17:3122-8.
 60. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876-81.
 61. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, et al. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;14:746-57.
 62. Luchetti F, Canonico B, Biagiarelli L, et al. Indagini citofluorimetriche nella vitalità e morte cellulare. I. Necrosi, apoptosi e proliferazione cellulare. *Biochim Clin*, 2009;33:83-92.
 63. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
 64. Fraser L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol J Vet Sci* 2004;7:311-21.
 65. Spano M, Kolstad AH, Larsen SB, et al. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepius Hum Reprod* 1998;13:2495-505.
 66. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil* 2014;15:2-14.
 67. Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Christensen P. Variability and laboratory factors affecting the sperm chromatin structure assay in human semen. *J Androl* 2005;26:360-8.
 68. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84:833-42.
 69. Manesh KPS, Ashok A. A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab J Urol* 2018;16:65-76.
 70. Simon L, Murphy K, Shamsi MB et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014;29:2402-12.
 71. Donnelly ET, Steele EK, McClure N et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16:1191-9.
 72. Singh NP, McCoy MT, Tice RR et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
 73. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
 74. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174-9.
 75. Sá R, Cunha M, Rocha E, et al. Sperm DNA fragmentation is related to sperm morphological staining patterns. *Reprod Biomed Online* 2015;31:506-15.
 76. Tomaiuolo R, Panteghini M. Il laboratorio nella medicina della riproduzione. *Biochim Clin*, 2017;41:292-3.
 77. Cariati F, Savarese M, D'Argenio V, et al. The SEeMORE strategy: Single-tube electrophoresis analysis-based genotyping to detect monogenic diseases rapidly and effectively from conception until birth. *Clin Chem Lab Med* 2017;56:40-50.
 78. Tomaiuolo R, Fausto M, Elce A, et al. Enhanced frequency of CFTR gene variants in couples who are candidates for

- assisted reproductive technology treatment. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1289-93.
79. D'Argenio V, Nunziato M, D'Uonno N, et al. Indicazioni e limiti della diagnosi genetica preimpianto. *Biochim Clin* 2017;41:314-21.
 80. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009;30:219-29.
 81. Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, et al. Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2014;46:126-30.
 82. Gosálvez C, Lopez Fernandez C, Fernandez JL, et al. Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: Ten frequently asked questions. *J Reprod Biotechnol Fertil* 2015;4:1-16.
 83. Sivanarayana T, Rava Krishna T, Jaya Prakah G, et al. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *RMB* 2014;13:87-94.
 84. De Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, et al. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev Endocr Metab Disord* 2017;18:285.
 85. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil* 2010;13:189-93.

Applicazioni cliniche della presepsina come biomarcatore diagnostico d'infezione: rassegna e aggiornamenti

Emanuela Galliera¹, Luca Massaccesi², Elena de Vecchi³, Giuseppe Banfi³, Massimiliano M. Corsi Romanelli⁴

¹PhD, Department of Biomedical Sciences for Health, Università degli Studi di Milano, Italy; and IRCCS Orthopedic Institute Galeazzi, Milan, Italy

²Department of Biomedical Sciences for Health, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

³IRCCS Orthopedic Institute Galeazzi, Milan, Italy

⁴Department of Biomedical Sciences for Health, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy; and U.O.C. SMEL-1 Patologia Clinica IRCCS Policlinico San Donato, San Donato, Milan, Italy

Traduzione a cura di Diletta Onorato

Università degli Studi di Verona

ABSTRACT

Clinical application of presepsin as diagnostic biomarker of infection: overview and updates.

The appropriate identification of bacterial infection is the basis for effective treatment and control of infective disease. Among this context, an emerging biomarker of infection is presepsin (PSP), re-cently described as early marker of different infections. PSP secretion has been shown to be associated with monocyte phagocytosis and plasmatic levels of PSP increase in response to bacterial infection and decrease after antibiotic treatment, therefore it can be considered a marker of activation of immune cell response towards an invading pathogen. Different methods have been developed to measure PSP and this review will briefly describe the different clinical fields of application of PSP, ranging from intensive care to neonatal infection, to orthopedic and pulmonary infection as well as fungal infections and cardiovascular infections.

INTRODUZIONE

Le infezioni sono un problema importante nella pratica clinica. La corretta identificazione di un'infezione batterica è alla base di un efficace trattamento e controllo della malattia infettiva (1), ma il suo riconoscimento risulta spesso difficoltoso in quanto segni e sintomi si sovrappongono ad altri disordini infiammatori. L'approccio attuale per la diagnosi si basa su coltura microbiologica, metodi biochimici e tecniche molecolari, ma, se da un lato manca ancora un gold standard in quanto questi metodi mostrano importanti limiti di sensibilità e specificità, dall'altro la loro implementazione spesso necessita di tecnologie e apparecchiature costose, non sostenibili da tutti i laboratori di analisi (2). Pertanto, c'è una pressante

necessità di un marcatore che sia al tempo stesso economicamente conveniente, veloce, semplice, affidabile, specifico e sensibile per la diagnosi di infezione.

A questo riguardo, un marcatore emergente è la presepsina (PSP) recentemente descritto come un marcatore precoce di diverse infezioni (3, 4). PSP è una frazione della forma solubile del sottotipo CD14 (S-CD14-ST). Il CD14 appartiene alla famiglia dei *Toll-like receptor* (TLR) che riveste un ruolo importante nell'identificazione di ligandi di batteri gram positivi e negativi e che stimola la risposta infiammatoria. CD14 esiste in due forme: una ancorata alla membrana (mCD14) dei monociti/macrofagi, l'altra solubile (sCD14) presente nel plasma, dove è clivata dalla catepsina D in un frammento di 13kDa, denominato appunto PSP (5).

Questo articolo è la traduzione di Clinical application of presepsin as diagnostic biomarker of infection: overview and updates. Clin Chem Lab Med 2020;58:11-7 con l'autorizzazione dell'Editore. L'articolo originale è disponibile come materiale supplementare (1S). Clinical Chemistry and Laboratory Medicine non è responsabile della accuratezza della traduzione. In caso di citazione, riferirsi alla pubblicazione originale.

Ricevuto: 13.01.2020

Revisionato: 14.01.2020

Accettato: 15.01.2020

Publicato on-line: 01.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.020

Le concentrazioni plasmatiche di PSP hanno mostrato un incremento in risposta ad infezioni batteriche e una diminuzione dopo trattamento antibiotico, pertanto questa molecola può essere considerata un marcatore di attivazione della risposta immunitaria cellulare nei confronti dei patogeni. La secrezione di PSP è inoltre risultata associata con la fagocitosi dei monociti (6); ne consegue che potrebbe essere misurata anche in soggetti sani, non infetti. A tal fine è di importanza cruciale avere un metodo specifico e sensibile per misurare PSP, in modo da associare un aumento del valore soglia fisiologico alla presenza di un'infezione batterica, e l'entità di questo aumento all'intensità della risposta immunitaria, quindi alla severità dell'infezione.

Sono stati sviluppati diversi metodi per misurare PSP. Il primo è stato il classico *two step ELISA*, che misurava PSP in un intervallo compreso tra 3 e 150 ng/mL, ma mancava di accuratezza e richiedeva molto tempo. Thermo Fisher ha poi sviluppato un metodo rapido per misurare PSP, modificando l'ELISA dal metodo *two-step* ad uno *one-step* nel seguente modo:

- eliminando la diluizione del campione;
- utilizzando due nuovi anticorpi anti-PSP per aumentare la sensibilità (anticorpo monoclonale F1106-13-3 per legare l'anticorpo e anticorpo policlonale S68 per rilevarlo);
- modificando gli standard dal CD14 ricombinante (S286C) al PSP ricombinante. Come risultato di questi cambiamenti, la durata della misura è diminuita da 4 a 1,5 ore, e l'intervallo dinamico del *one-step assay* è sceso a 0,05-3,00 ng/mL (a differenza del 3-150 ng/mL del *two step ELISA*) (7).

Un passo ulteriore nella misura plasmatica di PSP è quello applicato allo strumento PATHFAST (Mitsubishi Chemical), un metodo nuovo, altamente sensibile e completamente automatizzato, basato sulla

chemiluminescenza (CLEIA) che fornisce in 17 minuti i risultati su 6 campioni (8).

PATHFAST è un sistema compatto per metodi immunometrici per laboratori clinici, ospedali e studi medici (può utilizzare anche la matrice sangue intero), disponibile ovunque siano richiesti risultati quantitativi veloci, che offre una qualità analitica confrontabile a quella richiesta per le strumentazioni adottate dai laboratori clinici.

Il principio del metodo è basato su una tecnologia CLEIA non competitiva combinata con tecnologia MAGTRATION (MAGTRATION è un sistema di separazione in cui le particelle magnetiche vengono lavate nel puntale della pipetta). La fosfatasi alcalina legata ad un anticorpo monoclonale anti-PSP e le particelle magnetiche rivestite di un altro anticorpo monoclonale anti-PSP si uniscono al campione. La PSP contenuta nel campione si lega agli anticorpi anti-PSP del saggio per formare un immunocomplesso tra la PSP, l'anticorpo marcato con l'enzima e l'anticorpo che riveste le particelle magnetiche. Dopo la rimozione dell'anticorpo marcato con l'enzima, non legato nell'immunocomplesso, viene aggiunto un substrato chemiluminescente. Segue un breve periodo di incubazione (circa 1 minuto), e l'intensità della luminescenza misurata è proporzionale alla concentrazione di PSP del campione. La concentrazione viene calcolata mediante una curva standard (curva master) periodicamente aggiornata con i calibratori a 2 livelli di concentrazione.

Essendo un marcatore emergente e potente di infezione e sepsi, la misura di PSP è stata impiegata recentemente in diversi ambiti clinici, come mostrato nella Figura 1, dalla terapia intensiva all'infezione fungina, come vedremo successivamente in questa rassegna e come riassunto nella Tabella 1.

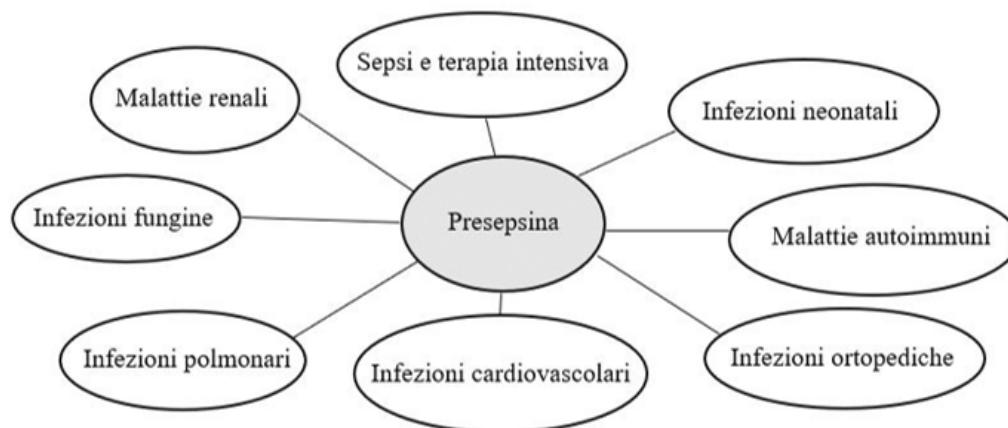


Figura 1

Applicazioni cliniche di presepsina come marcatore di infezione

Tabella 1

Riassunto degli studi sul valore prognostico e diagnostico di presepsina

Applicazioni cliniche di presepsina	Valore Diagnostico	Valore Prognostico	Bibliografia
Sepsi	Sì	Sì	(4, 5)
Terapia intensiva e dipartimenti di emergenza	Sì	Sì	(11, 12)
Unità intensiva pediatrica	Sì	Sì	(13-15)
Infezioni polmonari	Sì	Sì	(16-19)
Malattie autoimmuni	Sì	Da definire	(20-22)
Malattie renali	Sì	Da definire	(23, 24)
Infezioni cardiovascolari	Sì	Da definire	(25-27)
Infezioni protesi ortopediche	Sì	Sì	(3, 28)
Infezioni fungine	Sì	Da definire	(29, 30)

PSP NELLA SEPSI: DIPARTIMENTI DI EMERGENZA E TERAPIA INTENSIVA

La sepsi è stato il primo ambito clinico in cui PSP è stata studiata come biomarcatore. Infatti essendo causa di elevati tassi di mortalità e morbidità (31), la sepsi stessa è una delle sfide maggiori nei dipartimenti di emergenza e nella terapia intensiva (ICUs). Pertanto, una diagnosi precoce è cruciale per poter intervenire tempestivamente e migliorare la prognosi dei pazienti settici (31). Vari studi prospettici multicentrici hanno valutato PSP nella sepsi (31), mostrando che l'efficacia della determinazione di PSP dipende dal valore soglia usato. Quando il valore considerato era di 600 ng/mL, la sensibilità era del 70,3% e la specificità dell'81,3%, mentre utilizzando un valore di 864 ng/mL la sensibilità saliva a 71,4%, ma la specificità scendeva a 63,8% (11). Una recente meta-analisi ha stimato il valore diagnostico della PSP per la sepsi, indicando una complessiva sensibilità diagnostica di 83% e una specificità di 78%, con un valore di ROC pari a 88%. L'indice di probabilità positiva e negativa, considerati clinicamente significativi, erano rispettivamente di 3,9 e 0,21 (1). Dal momento che un indice di probabilità positiva è clinicamente accettabile quando raggiunge valori superiori a 10, PSP non può essere usata da sola come marcatore per la diagnosi di sepsi, ma deve essere associata al contesto clinico e ad altri marcatori, come la procalcitonina (PCT), per confermare la diagnosi (1, 12).

PSP IN TERAPIA INTENSIVA NEONATALE E SEPSI

La sepsi neonatale è una delle maggiori cause di mortalità e morbidità, soprattutto nei neonati pretermine. Poiché la malattia progredisce velocemente in shock settico e disfunzione multiorgano, una diagnosi precoce è un elemento critico per aumentare la sopravvivenza. Il gold standard per la diagnosi di sepsi è l'emocoltura, ma

richiede almeno 48-72 ore e fornisce ancora un numero non trascurabile di falsi negativi, in particolare all'esordio, quando la sensibilità dell'emocoltura è inferiore al 10% (13). Biomarcatori tradizionali come PCT e proteina C reattiva (PCR) sono inadeguati per la predizione accurata di sepsi neonatale (14); pertanto c'è ancora bisogno di un marcatore ottimale. È stato recentemente descritto che PSP presenta un'accuratezza diagnostica più elevata rispetto a PCR e PCT, in termini di AUC (area sottesa dalla curva), ed è quindi più sensibile nel rilevare la sepsi neonatale (15): questo suggerisce che PSP può essere un marcatore migliore nel rilevare la sepsi in fase di esordio nella popolazione neonatale ad alto rischio. Utilizzare un valore di riferimento affidabile nei neonati sani a termine rappresenta un aspetto fondamentale per avere un'adeguata accuratezza diagnostica. PSP non si è dimostrata influenzabile dalla maggior parte delle variabili che alterano PCT e PCR (32), suggerendo che può essere usata come marcatore efficace di sepsi neonatale.

PSP NELLE INFEZIONI POLMONARI

I batteri sono patogeni frequenti delle polmoniti da comunità (CAP), ma la loro identificazione da colture di sangue o escreato richiede diversi giorni e fornisce un numero non trascurabile di falsi negativi (33). A tal fine, i livelli plasmatici di PSP hanno dimostrato un buon valore diagnostico e prognostico per le CAP batteriche (BCAP) (16), essendo in grado di predire la mortalità in ICU di questi pazienti (17). In caso di tubercolosi polmonare attiva (APT) la diagnostica di base non è frequentemente disponibile, poiché la coltura del *Mycobacterium tuberculosis* richiede condizioni specifiche e tempi di isolamento molto lunghi. Pertanto, un marcatore precoce per il riconoscimento del *Mycobacterium tuberculosis* dagli altri batteri è

essenziale per una diagnosi precoce e una terapia adeguata. È stato recentemente descritto che PSP aumenta nei pazienti APTB, pertanto nella fase iniziale potrebbe essere d'aiuto nella diagnosi differenziale con BCAP. Lo sviluppo di polmonite è un aspetto problematico anche nel neonato intubato (18), in cui la raccolta di sangue è critica. A tal proposito, la misura di PSP nell'aspirato tracheale è stata recentemente ipotizzata come marcatore complementare nella diagnosi di esordio precoce di polmonite neonatale (19).

PSP NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

L'infezione è una complicanza critica delle malattie autoimmuni, come l'artrite reumatoide (AR), poiché i tradizionali marcatori di flogosi, come la PCR sono elevati sia durante l'infezione che nella fase acuta di AR, pertanto non possono essere utili per la diagnosi differenziale tra le due condizioni (34). Al contrario, PSP non è influenzata dall'attività dell'AR e nemmeno dalle basse dosi di corticosteroidi e metotrexate usate nell'AR; pertanto può essere un efficace marcatore diagnostico per infezioni batteriche in questi pazienti (20). In tali condizioni andrebbe rivolta un'attenzione particolare ai livelli basali, poiché PSP nei soggetti affetti da AR è più elevata che nei controlli sani (20). Diversamente, in altre malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (LES), PSP correla con l'attività della malattia (21). Pertanto, il suo uso come biomarcatore di infezione batterica non può essere applicato a tutte le malattie autoimmuni, ma solo a quelle in cui PSP non è influenzata dall'attività della malattia. Per superare questo problema, uno studio recente ha associato la misura di PSP in pazienti con LES all'espressione di CD64 sui neutrofili e a PCT, per differenziare le infezioni dall'attività della malattia (22).

PSP NELLE MALATTIE RENALI

Il livello plasmatico di PSP è influenzato dalla funzionalità renale. Dal momento che PSP è una proteina di 13kDa, può essere filtrata dal glomerulo e riassorbita all'interno delle cellule del tubulo prossimale. Pertanto, qualsiasi condizione che coinvolga la funzione di filtrazione glomerulare si riflette sui livelli plasmatici di PSP. Recenti evidenze hanno mostrato che PSP aumenta non appena la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) diminuisce, e i suoi livelli plasmatici sono correlati ai livelli di creatinina sierica nei pazienti ricoverati in ICU (23). In pazienti sottoposti a terapia emodialitica (HD) PSP ha mostrato elevate concentrazioni plasmatiche, rispetto a quelle osservate nella sepsi severa e nello shock settico, mentre nei pazienti non sottoposti ad emodialisi, i livelli plasmatici di PSP erano inversamente correlati con il GFR. Questi risultati suggeriscono che la valutazione di PSP in soggetti con insufficienza renale cronica (CKD) richiede un'attenzione particolare e la definizione di uno specifico valore decisionale. Nei pazienti critici, la sepsi è la causa più comune di insufficienza renale acuta (AKI); pertanto

vi è l'impellente necessità di un biomarcatore capace di identificarla nei pazienti affetti da AKI. Da un lato, PSP aumenta in condizione settiche, dall'altro, elevati livelli di PSP sono stati osservati nei soggetti con AKI non settici e il valore correla con la gravità dell'AKI (24). Tale evidenza, comunque, suggerisce che in pazienti con AKI severa, l'accuratezza diagnostica di PSP per la diagnosi di sepsi è inferiore a quella di PCT, e bisognerebbe quindi utilizzare un diverso valore decisionale per questa diagnosi quando si usano PCT e PSP nell'AKI severa.

PSP NELLE MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Prevedere le complicanze e la mortalità dopo un intervento cardiaco è un elemento importante per correggere tempestivamente queste condizioni. In tali casi, una delle possibilità è l'impiego di biomarcatori e di score prognostici per predire complicanze post-operatorie avverse, come infezioni e mortalità. Un recente studio longitudinale ha monitorato le concentrazioni di PSP nel periodo peri-operatorio in pazienti sottoposti ad intervento di bypass cardiopolmonare (CBP) per malattie cardiache acquisite (25). Differenze statisticamente significative nei livelli di PSP sono state osservate, in gruppi di pazienti con e senza infezione, usando gli score *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) e *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA). Questi risultati suggeriscono che l'impiego di biomarcatori di nuova generazione, come ad esempio PSP, permette di predire il rischio di complicanze infettive e la mortalità in pazienti cardiocirurgici, se utilizzati insieme agli score di severità della malattia. Analogamente, PSP sembra essere un marcatore prezioso quanto PCT e PCR nella valutazione delle complicanze infettive dopo trapianto di cuore (26).

Dal momento che la terapia con impianto di un dispositivo elettronico cardiovascolare (CIED) trova sempre maggiori indicazioni, oltre alla prevenzione e al trattamento delle sole aritmie cardiache, le infezioni degli impianti restano un problema considerevole. I pazienti che ricevono un trattamento con CIED sono ora più anziani ed hanno co-morbilità importanti, che li espongono a rischio di complicanze, inclusa l'infezione. La contaminazione del CIED autorizza la rimozione completa del dispositivo, poiché se lasciato in sede è associato ad un rischio inaccettabilmente elevato di recidiva e aumento di mortalità. Ciononostante, la diagnosi accurata di infezione di CIED rimane una grande sfida. L'uso di biomarcatori nella diagnosi di infezione del CIED è recente, ma in continuo miglioramento: PCT e PCR ad alta sensibilità hanno già mostrato un'importanza significativa, e PSP potrebbe essere un futuro potenziale marcatore (27).

PSP NELLE INFEZIONI DI PROTESI ARTICOLARE (PJI)

La PJI postoperatoria è la causa più comune del fallimento dell'intervento di artroplastica totale,

richiedendo un'operazione di revisione, tuttavia manca ancora un gold standard per la diagnosi e il trattamento successivo delle PJI (28, 35). PSP ha un maggior potenziale diagnostico rispetto a PCR e IL-6 nella diagnosi di PJI (28). Inoltre, PSP ha mostrato una buona capacità di predire la risoluzione dell'infezione, indicando che può essere uno strumento utile per la diagnosi e il monitoraggio di PJI, e può essere associata ad un pannello di nuovi marcatori infiammatori implicati nella risposta infiammatoria mediata da monociti e macrofagi come TLR2, OPN, CCR2 e SuPAR (3).

PSP NELLE INFEZIONI FUNGINE

Le infezioni fungine invasive sono una sfida che sta richiamando un crescente interesse negli ultimi anni. Statistiche recenti dimostrano che i miceti sono responsabili del 20% circa di tutti i casi di sepsi, con esiti fatali che possono raggiungere l'80% dei casi (29). Per questa ragione, una diagnosi precoce e precisa è fondamentale per un trattamento appropriato e tempestivo e per evitare un esito sfavorevole. I test micologici e le emocolture hanno limiti importanti che potrebbero essere superati da esami sierologici emergenti, una preziosa prospettiva per la diagnosi in pazienti con infezione fungina invasiva. A questo proposito, uno studio recente di Lippi et al. ha indicato che un aumento dei valori di PSP se rilevato insieme a piccole o assenti modifiche della concentrazione di PCT sarebbe suggestivo d'infezione fungina invasiva (10). Analogamente, Bamba e al. hanno dimostrato che le concentrazioni plasmatiche di PSP aumentano in pazienti con infezione fungina diffusa nel sangue, mostrando un'associazione positiva con la gravità della malattia (30). Considerate insieme, queste recenti evidenze suggeriscono che la PSP potrebbe essere un utile marcatore di sepsi secondaria ad infezioni fungine.

LIMITI DELLA DETERMINAZIONE DELLA PSP

Il metabolismo e l'escrezione di PSP sono influenzati dalla funzionalità renale, pertanto è necessaria un'attenzione particolare nella interpretazione dei valori in presenza d'insufficienza renale cronica. In particolare, la concentrazione di PSP era maggiore nei pazienti in emodialisi, quindi si dovrebbe considerare un valore decisionale diverso in questi pazienti. Alcune condizioni fisiologiche e patologiche possono influenzare le concentrazioni di PSP, come l'età (in particolare nei neonati e nei soggetti anziani), l'uso di steroidi, la batteriemia, le ustioni o la sindrome emofagocitica (36). Studi futuri saranno necessari per definire i diversi valori decisionali per rilevare i vari tipi di infezioni e in differenti condizioni.

Nonostante si possa considerare PSP come un buon marcatore d'infezione, essa non è però efficiente nel riconoscimento dell'eziologia. Pertanto, per l'identificazione specifica di un patogeno, sono ancora necessari metodi basati sulla coltura e sui biomarcatori immunologici.

Per essere introdotto nella pratica clinica, le prestazioni di PSP devono essere confrontate con quelle dei biomarcatori usati correntemente per la sepsi e le infezioni, come PCT e PCR. Al momento ci sono meta-analisi limitate sulla efficienza diagnostica di PSP confrontata con questi biomarcatori (37). Una recente meta-analisi ha paragonato PSP con PCT (38) per la diagnosi di sepsi precoce in pazienti critici e ha concluso che entrambi i marcatori hanno un'efficacia simile, suggerendone l'utilizzo in combinazione. Inoltre, un lavoro sulla sepsi del neonato pretermine ha indicato che PSP potrebbe essere un fattore predittivo più indipendente di sepsi rispetto a PCT e PCR (32). Analogamente, uno studio prospettico multicentrico ha indicato che PSP è più strettamente associata agli score SOFA e APACHE rispetto a PCT nella valutazione clinica dei pazienti in pronto soccorso e terapia intensiva (39). La valutazione di questo nuovo marcatore è ancora ad uno stadio di verifica perchè mancano ancora studi di intervento sulla diagnosi ed in particolare sull'uso di antibiotici. Per quanto è a nostra conoscenza, finora, un solo studio multicentrico randomizzato ha misurato la correlazione tra la diminuzione del PSP circolante e l'efficacia della terapia antibiotica (40), ma ulteriori ricerche in questo campo e osservazioni su larga scala sono necessarie prima di raccomandarne l'impiego nella routine clinica. Un altro aspetto che dovrebbe essere considerato è il rapporto costo/efficacia e l'attuabilità della misura di nuovi biomarcatori. Finora nessuna indagine estensiva ha valutato questo punto, ma un'analisi recente di Amastha et al. (41) ha esaminato il costo/beneficio di PSP e di PCR nella diagnosi di diverse infezioni batteriche, rilevando una spesa simile. Di conseguenza quindi, altri studi su più ampia scala dovrebbero essere eseguiti per raggiungere più solide conclusioni.

CONCLUSIONI

PSP può essere considerato uno strumento utile per la diagnosi precoce e la prognosi di varie infezioni. Essa mostra un'alta sensibilità per le infezioni batteriche e le sue caratteristiche cliniche sono migliori di quelle di PCT in alcune condizioni, dal momento che PSP dipende da un meccanismo dose-dipendente di interazione ospite-patogeno (fagocitosi). Comunque, come suggerito dalla letteratura recente (42), un pannello di marcatori di infezione/infiammazione, a seconda del tipo di infezione, in combinazione con PSP, potrebbe rinforzare l'efficacia clinica ed essere più informativo. Comunque, sono auspicabili studi eseguiti su più ampia scala che valutino l'efficacia e il costo-beneficio di questo marcatore, paragonato ad altri marcatori correntemente usati, prima di introdurre definitivamente PSP nella routine clinica

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Jacobs L, Wong HR. Emerging infection and sepsis biomarkers: will they change current therapies? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016;14:929-41.
2. Alizadeh N, Memar MY, Moaddab SR, et al. Aptamer-assisted novel technologies for detecting bacterial pathogens. *Biomed Pharmacother* 2017;93:737-45.
3. Marazzi MG, Randelli F, Brioschi M, et al. Presepsin: a potential biomarker of PJI? A comparative analysis with known and new infection biomarkers. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2018;31:1-10.
4. Chenevier-Gobeaux C, Borderie D, Weiss N, et al. Presepsin [sCD14-ST], an innate immune response marker in sepsis. *Clin Chim Acta* 2015;450:97-103.
5. Zou Q, Wen W, Zhang XC. Presepsin as a novel sepsis biomarker. *World J Emerg Med* 2014;5:16-9.
6. Arai Y, Mizugishi K, Nonomura K, et al. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. *J Infect Chemother* 2015;21:564-9.
7. Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, et al. Presepsin [sCD14-ST]: development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:937-9.
8. Okamura Y, Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin [sCD14-ST]. *Clin Chim Acta* 2011;412:2157-61.
9. Novelli G, Morabito V, Ferretti G, et al. Pathfast presepsin assay for early diagnosis of bacterial infections in surgical patients: preliminary study. *Transplant Proc* 2013;45:2750-3.
10. Lippi G, Cervellin G. Can presepsin be used for screening invasive fungal infections? *Ann Transl Med* 2019;7:87.
11. Masson S, Caironi P, Spanuth E, et al. Presepsin [soluble CD14 subtype] and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. *Crit Care* 2014;18:R6.
12. Memar MY, Baghi HB. Presepsin: a promising biomarker for the detection of bacterial infections. *Biomed Pharmacother* 2019;111:649-56.
13. Kellogg JA, Manzella JP, Bankert DA. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol* 2000;38:2181-5.
14. Shabuj KH, Hossain J, Moni SC, et al. C-reactive Protein [CRP] as a single biomarker for diagnosis of neonatal sepsis: a comprehensive meta-analysis. *Mymensingh Med J* 2017;26:364-71.
15. Bellos I, Fitrou G, Pergialiotis V, et al. The diagnostic accuracy of presepsin in neonatal sepsis: a meta-analysis. *Eur J Pediatr* 2018;177:625-32.
16. Klouche K, Cristol JP, Devin J, et al. Diagnostic and prognostic value of soluble CD14 subtype [Presepsin] for sepsis and community-acquired pneumonia in ICU patients. *Ann Intensive Care* 2016;6:59.
17. Titova EA, Eyrikh AR, Titova ZA. The role of presepsin in the diagnosis and assessment of severity of sepsis and severe pneumonia. *Ter Arkh* 2018;90:44-7.
18. Savic D, Simovic A, Markovic S, et al. The role of presepsin obtained from tracheal aspirates in the diagnosis of early onset pneumonia in intubated newborns. *Indian J Pediatr* 2018;85:968-73.
19. Awasthi S. Can estimation of presepsin levels in endotracheal aspirate predict early onset pneumonia in newborns? *Indian J Pediatr* 2018;85:954.
20. Tsujimoto K, Hata A, Fujita M, et al. Presepsin and procalcitonin as biomarkers of systemic bacterial infection in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2018;21:1406-13.
21. Tanimura S, Fujieda Y, Kono M, et al. Clinical significance of plasma presepsin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 2018;28:865-71.
22. Echeverri A, Naranjo-Escobar J, Posso-Osorio I, et al. Neutrophil CD64 expression, procalcitonin and presepsin are useful to differentiate infections from flares in SLE patients with SIRS. *Lupus* 2018;27:1130-9.
23. Nagata T, Yasuda Y, Ando M, et al. Clinical impact of kidney function on presepsin levels. *PLoS One* 2015;10:e0129159.
24. Nakamura Y, Hoshino K, Kiyomi F, et al. Comparison of accuracy of presepsin and procalcitonin concentrations in diagnosing sepsis in patients with and without acute kidney injury. *Clin Chim Acta* 2019;490:200-6.
25. Saito J, Hashiba E, Mikami A, et al. Pilot study of changes in presepsin concentrations compared with changes in procalcitonin and C-reactive protein concentrations after cardiovascular surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2017;31:1262-7.
26. Franekova J, Secnik P Jr., Lavrikova P, et al. Serial measurement of presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein in the early postoperative period and the response to antithymocyte globulin administration after heart transplantation. *Clin Transplant* 2017;31. doi: 10.1111/ctr.12870.
27. Lennerz C, Vrazic H, Haller B, et al. Biomarker-based diagnosis of pacemaker and implantable cardioverter defibrillator pocket infections: a prospective, multicentre, case-control evaluation. *PLoS One* 2017;12:e0172384.
28. Galliera E, Drago L, Marazzi MG, et al. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor [suPAR] as new biomarker of the prosthetic joint infection: correlation with inflammatory cytokines. *Clin Chim Acta* 2015; 441:23-8.
29. Badiie P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res* 2014;139:195-204.
30. Bamba Y, Moro H, Aoki N, et al. Increased presepsin levels are associated with the severity of fungal bloodstream infections. *PLoS One* 2019;13:e0206089.
31. Zhang J, Hu ZD, Song J, et al. Diagnostic value of presepsin for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Medicine [Balt]* 2015;94:e2158.
32. Pagni L, Pietrasanta C, Milani S, et al. Presepsin [soluble CD14 subtype]: reference ranges of a new sepsis marker in term and preterm neonates. *PLoS One* 2015;10:e0146020.
33. Qi ZJ, Yu H, Zhang J, et al. Presepsin as a novel diagnostic biomarker for differentiating active pulmonary tuberculosis from bacterial community acquired pneumonia. *Clin Chim Acta* 2018;478:152-6.
34. Tsuji S, Kitatoube A, Kikuchi-Taura A, et al. Elevated soluble CD14-subtype [PRESEPSIN; P-SEP] levels in rheumatoid arthritis [RA] patients with bacterial infection. *Mod Rheumatol* 2017;27:718-20.
35. Galliera E, Drago L, Vassena C, et al. Toll-like receptor 2 in serum: a potential diagnostic marker of prosthetic joint infection? *J Clin Microbiol* 2014;52:620-3.
36. Claessens YE, Trabattoni E, Grabar S, et al. Plasmatic presepsin [sCD14-ST] concentrations in acute pyelonephritis in adult patients. *Clin Chim Acta* 2017;464:182-8.
37. Hayashida K, Kondo Y, Hara Y, et al. Head-to-head comparison of procalcitonin and presepsin for the diagnosis of sepsis in critically ill adult patients: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *Br Med J Open* 2019;7:e014305.
38. Kondo Y, Umemura Y, Hayashida K, et al. Diagnostic value of procalcitonin and presepsin for sepsis in critically ill adult patients: a systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care* 2019;7:22.

39. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: a multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2014;20:30-4.
40. Masson S, Caironi P, Fanizza C, et al. Circulating presepsin [soluble CD14 subtype] as a marker of host response in patients with severe sepsis or septic shock: data from the multicenter, randomized ALBIOS trial. *Intensive Care Med* 2015;41:12-20.
41. Amastha J, Berdejo L, Acosta-Reyes J. Cost-effectiveness analysis of presepsin compared with C-reactive protein and procalcitonin in detecting severe bacterial infection in children aged 29 days to 36 months old with fever without source. *Value Health* 2016;19:A694.
42. Dolin HH, Papadimos TJ, Stepkowski S, et al. A novel combination of biomarkers to herald the onset of sepsis prior to the manifestation of symptoms. *Shock* 2018;49:364-70.

Valutazione delle prestazioni analitiche dei conteggi cellulari in automazione su liquidi biologici mediante un programma di controllo di qualità dedicato

Gavino Napolitano, Alessandra Caracciolo, Sara Apassiti Esposito, Giovanni Guerra, Sabrina Buoro

Unità Operativa Complessa. Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII di Bergamo

ABSTRACT

Evaluation of the analytical performances of the cell counting on biological fluids using a dedicated program of quality control.

Introduction: the development of new technologies in the era of information technology and digitization has certainly influenced the clinical laboratory and quality management system. The aim of this work is to verify the utility of a dedicated software (SNCS - Sysmex, Inc. Kobe, Japan) for the improvement of quality control management procedures of quantitative parameters obtained by the automated cell counting in biological liquids.

Methods: the measurements were performed on the XN "Body Fluid Mode" (XN-BF) analytical system (Sysmex, Inc. Kobe, Japan) according to the manufacturer's specifications. The parameters that can be included in the report using this mode are the total nucleated elements count, the leukocyte count, the differentiation of mononuclear from polymorphonuclear cells and the erythrocyte count.

Results: our study included: a comparative evaluation between the laboratory CVs and the CV of an international homogeneous group; a retroactive evaluation from the SNCS software using the standard deviation index and the precision index used as accuracy and precision measurements. Finally, a daily comparison was made between the Levi-Jennings cards of the instrument and the SNCS intra-day report, to improve the timely evaluation of the random error.

Conclusion: using the SNCS software, the performance of the analyzers can be precisely monitored and compared on an international basis. Its utility lies in the possibility of comparing internal performances with those of a group of laboratories using the same instruments and the same controls, allowing the quantification of the analytical bias.

INTRODUZIONE

Norme legislative, sia nazionali che regionali, prevedono come obbligatoria l'attivazione di sistemi di Controllo di Qualità Interno (CQI), secondo linee guida dettate a livello, rispettivamente, nazionale e regionale. L'attivazione di programmi di CQI è prevista da qualsiasi norma di "Buona Pratica di Laboratorio" ed è anche un requisito per l'accreditamento istituzionale (1).

Il programma di CQI si prefigge il duplice obiettivo di permettere il controllo delle prestazioni analitiche di un metodo/sistema analitico in modo tale da fornire allarmi nel caso in cui quest'ultimo non stia più lavorando entro limiti di errore totale (ET) predefiniti (2) e di verificare la stabilità del metodo/sistema analitico nel medio-lungo termine.

L'adozione di procedure di controllo di qualità (CQ) nel laboratorio consente di monitorare i risultati prodotti

durante l'attività analitica garantendo che essi siano sotto controllo statistico e quindi affidabili nel tempo.

Per consentire l'applicazione di regole statistiche multiple, sono necessari almeno 2 livelli di controllo le cui concentrazioni dovrebbero essere preferibilmente vicine alle concentrazioni decisionali cliniche (3).

Gli obiettivi che le ditte fornitrici di sistemi di controllo qualità si sono prefissate nell'ultimo decennio non si limitano più all'impostazione del singolo controllo interno del laboratorio, ma si propongono di sfruttare la connessione laboratorio-provider per la gestione in rete dei dati dei controlli (CQI o VEQ) al fine di creare un network di laboratori connessi consentendo di valutare i propri dati sulla base di statistiche di consenso.

Questo approccio al CQ è conosciuto come controllo di qualità interno allargato (CQA) o controllo interlaboratorio. Il CQA mediato dai nuovi strumenti informatici può essere sfruttato in tutte quelle condizioni

Corrispondenza a: Napolitano Gavino, UOC Servizio di Medicina di Laboratorio Asst Papa Giovanni XXIII di Bergamo, piazza OMS 1, 24127 Bergamo. Tel 0352678134, E-mail gav.nap@alice.it

Ricevuto: 05.02.2019

Revisionato: 25.03.2019

Accettato: 23.04.2019

Publicato on-line: 08.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.042

in cui non esistano VEQ dedicate alla valutazione dei parametri, come accade oggi per l'esame citometrico dei liquidi biologici.

L'analisi citometrica dei liquidi biologici può essere eseguita con due metodi: il conteggio manuale in camera di conta con la differenziazione cellulare valutata su citospin in microscopia ottica, oppure il conteggio cellulare in automazione con l'impiego di adeguata strumentazione ed in accordo con le linee guida internazionali (4,5). I più comuni tipi di liquidi valutati in laboratorio con conteggio in automazione sono: liquido cefalo-rachidiano, pleurico, ascitico, pericardico, sinoviale. L'esame citometrico in automazione viene eseguito con emocitometri di ultima generazione, dotati di un canale di analisi specifico per i cosiddetti *Body Fluid* (BF). Le linee guida internazionali (4,5) suggeriscono di intraprendere tutte le procedure necessarie per la verifica o validazione delle caratteristiche analitiche dello strumento adottato in funzione del tipo di liquido analizzato. La valutazione strumentale ed il monitoraggio delle prestazioni analitiche devono necessariamente includere l'esecuzione di CQI e la partecipazione alle VEQ. Qualora non siano disponibili VEQ dedicate, come nel caso dei liquidi biologici, è suggerita la partecipazione a programmi di controllo interlaboratorio.

Il nuovo software Sysmex Network Communication System (SNCS) (Sysmex, Inc. Kobe, Japan), consente di monitorare le prestazioni analitiche dei CQI dei liquidi biologici ottenuti dal sistema analitico XN Body Fluid Mode (XN-BF) (Sysmex, Inc. Kobe, Japan).

Il CQI deve consentire di confermare almeno quotidianamente l'allineamento del sistema analitico, verificando che i valori dei materiali di controllo forniti allo scopo siano inclusi nell'intervallo di accettabilità stabilito dal produttore; nel caso in cui il CQI sia utilizzato per verificare l'incertezza di misura dovuta agli effetti casuali, il materiale dovrebbe essere di terza parte, materiale difficile da reperire per la valutazione dei CQI sui liquidi biologici (6).

SNCS permette la gestione dei controlli monitorando e confrontando a livello internazionale le prestazioni analitiche di XN-BF con un programma accreditato ISO/IEC 17043, ed infine fornisce tutti gli strumenti necessari per l'analisi, la revisione e l'archiviazione dei dati collegando uno specifico laboratorio alla comunità dei laboratori presenti a livello mondiale.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di verificare l'utilità del software SNCS per il miglioramento delle procedure di gestione del controllo di qualità dei parametri quantitativi ottenuti dal conteggio in automazione dei liquidi biologici sopra descritti e quindi delle prestazioni analitiche di un laboratorio clinico.

Per verificare l'efficienza del sistema SNCS abbiamo affiancato ad esso la valutazione dei CQI "fronte macchina" per ciascun analizzatore.

METODI

Lo studio è stato condotto con l'impiego dell'analizzatore ematologico dotato di piattaforma analitica per l'analisi citometrica dei liquidi biologici XN-BF. Il materiale di controllo utilizzato per la valutazione delle prestazioni analitiche dei parametri considerati è l'*XN Check Body Fluid* livello 1 e livello 2 (XN-CHECK; Streck Laboratories Inc., Omaha, NE, USA). Il monitoraggio delle prestazioni strumentali prevede l'esecuzione giornaliera dei due livelli di controllo.

Per lo studio, sono stati inclusi i dati ottenuti nel periodo che va da aprile 2018 a settembre 2018, per un totale di 377 determinazioni per il livello 1 e 355 determinazioni per il livello 2.

I CQ sono stati eseguiti sui due analizzatori presenti in laboratorio dotati dell'applicazione XN-BF identificati rispettivamente come XN-4 e XN-5.

La valutazione interna del CQ avviene attraverso il confronto dei due metodi di visualizzazione dei CQI, ossia mediante software strumentale fronte macchina e mediante software SNCS in modalità on line.

Lo studio ha previsto diverse valutazioni. In prima istanza è stata effettuata una valutazione comparativa (sei mesi di osservazione) tra i coefficienti di variazione del laboratorio (CV-LAB) del CQI XN-CHECK BF livello 1 e 2, effettuati sui 2 moduli XN-4 e XN-5 in dotazione, con i CV del gruppo omogeneo internazionale (CV-O) elaborati dal software SNCS. In secondo luogo è stata effettuata una valutazione retroattiva del CQI valutando l'andamento mensile dell'indice di deviazione standard [SDI= (valore CQ - media_gruppo)/SD_gruppo] e dell'indice di precisione (PI= SD_Lab/Intra SD_gruppo). Infine è stato effettuato un confronto giornaliero tra le carte di Levi-Jennings fronte macchina e la visualizzazione grafica giornaliera SNCS per migliorare la valutazione tempestiva dell'errore casuale. Gli indici SDI e PI sono parametri calcolati che riflettono lo stato di accuratezza e precisione del laboratorio in questione rispetto al gruppo omogeneo, ponendo lo stesso in una scala con valori numerici che vanno da -3 /+3 per SDI (valore ottimale prossimo allo 0) e da 0 a 3 per PI (valore ottimale prossimo all'unità).

Il software SNCS

Il software SNCS è un programma di interazione e collaborazione che si esprime attraverso la connessione via web di ogni singolo strumento con il server SNCS al fine di implementare un servizio realmente predittivo con una effettiva riduzione dei rischi di fermo macchina ed una consulenza tecnico-scientifica immediata.

Mediante l'accesso ad internet, ciascun XN-BF invia i dati dei CQI al server SNCS. Questo processo avviene in parallelo alla tradizionale valutazione dei CQI in base alla quale i dati solitamente vengono registrati e archiviati direttamente sul computer dell'analizzatore.

Il database SNCS registra a livello mondiale tutti i dati dello stesso lotto di controllo degli analizzatori collegati, creando in tempo reale il gruppo omogeneo

internazionale (con un numero di partecipanti - nel periodo della sperimentazione - di 390 laboratori).

SNCS elabora i dati pervenuti giornalmente dai moduli XN-BF e per ogni parametro sottoposto a controllo [conteggio di: leucociti (WBC-BF), cellule mononucleate (MN-BF), cellule polimorfonucleate (PMN-BF), cellule totali (TC-BF), eritrociti (RBC-BF)], calcola la media, le DS interna e del gruppo omogeneo, l'SDI e il PI suddivisi per parametro in base al lotto ed al livello di controllo utilizzato.

Questi calcoli statistici vengono eseguiti una volta ogni 24 ore e vengono utilizzati per valutare le prestazioni di ciascun analizzatore in dotazione con il gruppo internazionale di pari livello che è composto dallo stesso modello di analizzatore (XN), stessa modalità di analisi (cioè modalità aperta o chiusa¹), stesso livello del materiale di controllo (cioè livello 1 o 2) e lo stesso numero di lotto di materiale di controllo. In caso di scostamenti significativi, SNCS genererà un messaggio di errore in automatico. Questa notifica di errore, trasmessa tramite email, specificherà il parametro, il livello di controllo ed il tipo di problema riscontrato.

Il software si presenta con una pagina di login alla quale si accede con credenziali personali per ogni laboratorio. La pagina d'ingresso propone un menù a tabella per scegliere il modulo XN-BF su cui valutare l'andamento del CQ, visionare la lista degli errori, eventualmente inserire dati manualmente o disporre di informazioni tecniche strumentali (ad esempio: numeri seriali degli analizzatori in dotazione, unità di misura dei parametri, regole di validazione dei CQI, indirizzo di posta elettronica a cui inviare segnalazioni sulle violazioni dei CQI).

I dati del CQI possono essere visualizzati in diverse modalità.

- *Chart table*: risultati tabellari o grafici filtrabili per periodo, lotto, livello e parametro;
- *Perform backup of CQ data*: rapporto mensile accreditato scaricabile in PDF di tutti i livelli e lotti eseguiti nel mese richiesto;
- *Quadratic Assignment Problem (QAP MATRIX)*: visualizzazione dei due livelli di controlli in un unico grafico;
- *SDI/PI TWINPLOT*: visualizzazione in grafico dei due parametri calcolati;
- *Scatter Plot*: visualizzazione dei livelli di CQI in relazione alla loro concentrazione.

La visualizzazione dell'errore legato al CQI da parte dell'operatore è semplificata dal gestionale attraverso la codifica dei seguenti allarmi visualizzabili, se presenti, in diverse pagine e in diverse modalità:

- *3 SDI Over e 5 SDI Over*: verifica dell'accuratezza ossia il superamento rispettivamente di 3 e 5 indici di DS;

- *Trend (TR)*: segnala un eventuale tendenza dei CQI (quando SDI > +/- 2,7 per 4 volte di seguito);
- *Shift (SH)*: segnala uno spostamento dei dati (quando SDI > +/- 2,7 per 10 volte di seguito).

L'applicazione XN-BF nell'analizzatore ematologico XN-modulo (Sysmex)

L'analizzatore ematologico XN-modulo è un analizzatore multi-parametrico dotato della modalità fluido biologico (XN-BF mode) dedicata alla lettura di diversi liquidi cavitari come sopra dettagliato (7). Il modulo XN-BF è stato sviluppato, validato e approvato dalla *Food and Drug Administration* statunitense (FDA) per l'esame citometrico dei liquidi sopraccitati (8-11). I parametri refertabili in questa modalità sono TC-BF, RBC-BF, WBC-BF, MN-BF e PMN-BF (queste ultime sia in valore assoluto che percentuale). Fra i parametri di ricerca ad uso interno del laboratorio invece sono disponibili il conteggio dei neutrofili (NE-BF), dei linfociti (LY-BF), degli eosinofili (EO-BF) e delle cellule ad alta fluorescenza (HF-BF).

XN-BF esegue l'esame citometrico dei liquidi biologici selezionando sullo strumento la modalità BF. XN-BF per il conteggio e la differenziazione cellulare utilizza il metodo ottico in fluorescenza. Le cellule presenti nel liquido in esame sono identificate combinando le informazioni provenienti da scatter frontale (dimensioni cellulari), scatter laterale (complessità interna della cellula) e intensità di fluorescenza (contenuto di DNA/RNA) (11). Nel citogramma riportato in Figura 1 (canale dei leucociti - WDF) è possibile apprezzare la distribuzione delle cellule in funzione delle caratteristiche sopraelencate.

RISULTATI

In Tabella 1 sono descritti i CV ottenuti dal laboratorio e quelli del gruppo omogeneo nel periodo oggetto dello studio.

E' stato valutato l'andamento mensile di SDI e PI utilizzando lo strumento di revisione denominato "Report mensile" presente su SNCS. Dall'analisi dei dati del CQI di 6 mesi di osservazione è emerso che il valore SDI su XN-4 per WBC-BF è risultato per 4 volte compreso nell'intervallo -1 e 1 e 2 volte tra -2 e 2; MN-BF è risultato 5 volte tra -1 e 1 e 1 volta tra -2 e 2; PMN-BF è risultato 4 volte tra -1 e 1 e 2 volte tra -2 e 2; TC-BF è risultato 4 volte tra -1 e 1 e 2 volte tra -2 e 2; RBC-BF è risultato 2 volte tra -1 e 1 e 4 volte tra -2 e 2.

Il valore di PI su XN-4 è risultato solo in un caso avere valori tra 2 e 3 per i MN-BF su un solo livello di controllo nell'arco di 6 mesi, mentre tutti gli altri parametri hanno valori compresi tra 0 e 2.

¹Modalità aperta: campionamento fronte macchina con o senza tappo. Modalità chiusa: campionamento in automatico su rack portacampione.

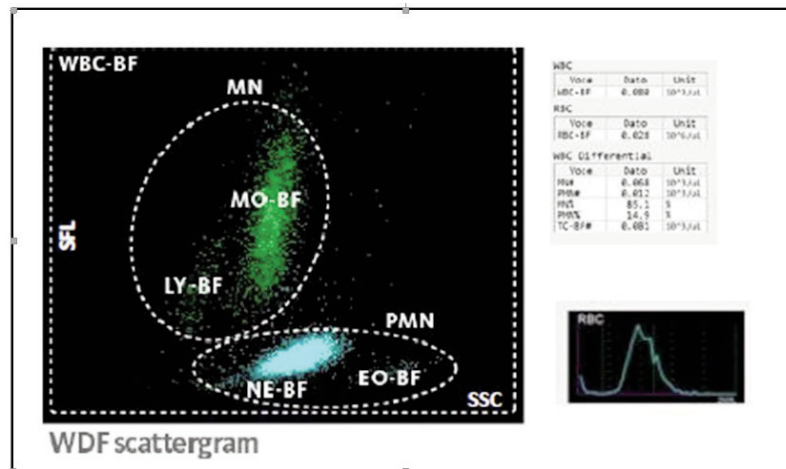


Figura 1

Citogramma del canale dei leucociti su Sysmex XN-modulo in modalità fluido biologico (WBC-BF). Si possono visualizzare i leucociti, distribuiti nelle due nuvole corrispondenti ai polimorfonucleati PMN (a maggiore Side Scatter, SSC) e mononucleati MN. Sono indicate anche le differenti popolazioni leucocitarie: linfociti (LY-BF), monociti (MO-BF), neutrofilo (NE-BF) e eosinofili (EO-BF). A destra la distribuzione degli eritrociti (RBC-BF) conteggiati mediante metodo impedenziometrico e la tabella che riporta direttamente il conteggio assoluto dei leucociti (103/μl) nel fluido biologico (WBC-BF), dei RBC-BF (106/μl), e il conteggio differenziale in assoluto (#) e percentuale (%) dei mononucleati (MN-BF) e dei polimorfonucleati (PMN-BF).

Tabella 1

Confronto tra i CV del laboratorio rispetto ai CV del gruppo omogeneo internazionale.

	WBC-BF (109/L)		RBC-BF (1012/L)		TC-BF (109/L)		MN-BF (109/L)		PMN-BF (109/L)	
	Valori medi L1 da 0,08 a 0,09 L2 da 0,30 a 0,32		Valori medi L1 da 0,02 a 0,02 L2 da 0,07 a 0,08		Valori medi L1 da 0,08a 0,09 L2 da 0,30a 0,32		Valori medi L1 da 0,02a 0,02 L2 da 0,08a 0,10		Valori medi L1 da 0,06a 0,07 L2 da 0,22a 0,23	
	CV-LAB (%)	CV-O (%)	CV-LAB (%)	CV-O (%)	CV-LAB (%)	CV-O (%)	CV-LAB (%)	CV-O (%)	CV-LAB (%)	CV-O (%)
04/2018										
Livello 1	10,57	8,50	3,84	5,67	10,57	8,52	18,13	13,63	13,14	9,82
Livello 2	3,45	5,65	2,77	3,95	3,45	5,65	3,05	8,21	4,00	6,32
05/2018										
Livello 1	9,65	7,96	3,95	5,29	9,65	7,88	19,37	14,30	9,10	9,36
Livello 2	2,45	5,49	1,81	3,48	2,45	5,49	10,10	7,62	4,91	6,25
06/2018										
Livello 1	10,69	8,23	2,51	5,43	10,69	8,19	9,47	3,40	14,96	9,82
Livello 2	2,66	5,65	2,35	3,92	2,66	5,65	2,93	7,16	3,24	6,30
07/2018										
Livello 1	9,84	8,52	3,09	5,99	9,84	7,99	12,20	13,00	12,53	9,17
Livello 2	3,51	5,51	2,11	3,86	3,51	5,51	9,15	9,38	4,59	6,37
08/2018										
Livello 1	4,11	7,30	3,38	4,27	4,11	7,30	15,84	15,83	6,61	8,67
Livello 2	1,58	5,42	1,63	3,19	1,58	5,42	10,98	10,55	3,97	6,50

Tabella 1
Continua

	09/2018									
Livello 1	9,07	8,49	2,71	5,11	9,07	8,49	18,15	14,12	9,89	9,95
Livello 2	4,97	5,98	3,97	3,82	4,97	5,98	4,25	8,55	5,72	6,69

WBC-BF, conteggio leucocitario; RBC-BF, conteggio degli eritrociti; TC-BF, conteggio totale delle cellule; MN-BF, cellule mononucleate; PMN-BF, cellule polimorfonucleate; CV-LAB, CV del laboratorio; CV-O, CV del gruppo omogeneo internazionale; L1 e L2, Livello 1 e 2;

I valori di SDI per XN-5 sono i seguenti: WBC-BF è risultato 3 volte compreso tra -1 e 1 e 3 volte tra -2 e 2; MN-BF è risultato 3 volte tra -1 e 1 e 3 volte tra -2 e 2; PMN-BF è risultato 6 volte tra -1 e 1; TC-BF è risultato 3 volte tra -1 e 1 e 3 volte tra -2 e 2; RBC-BF è risultato 5 volte tra -1 e 1 e 1 volta tra -2 e 2.

Il valore di PI su XN-5 è risultato solo in 2 casi essere tra 2 e 3 per i PMN-BF per un solo livello di controllo nell'arco di 6 mesi; tutti gli altri parametri hanno valori compresi tra 0 e 2.

Entrambi gli analizzatori mostrano buone prestazioni analitiche. Nello specifico XN-4 ottiene migliori prestazioni analitiche per i parametri WBC-BF, MN-BF, PMN-BF e TC-BF, mentre XN-5 sui parametri PMN-BF e RBC-BF. La parte di monitoraggio giornaliero dei CQI mediante software SNCS consente di evidenziare errori oltre le 3SDI, eventuali tendenze (TR) e spostamenti (SHIFT) che sulle carte strumentali non vengono evidenziati in quanto le regole di Westgard, impostate sugli analizzatori fronte macchina, segnalano solo i punti di CQI al di fuori delle 3DS.

Nelle figure 2 e 3 sono riportati i dati del CQI del mese di aprile 2018. In questo esempio, esattamente in data 4 aprile 2018, il parametro PMN-BF # (Valore assoluto) risulta non avere nessun allarme sulle carte strumentali, mentre risulta di 3,244 SDI nella visualizzazione in SNCS (Fig 2 e 3). La capacità maggiore di SDI di evidenziare valori fuori controllo dipende dai rapporti tra i CV interni del laboratorio e i CV del gruppo. Nello specifico, a parità di medie (gruppo e laboratorio), SDI è più "sensibile" nell'identificare un controllo al di fuori dell'intervallo quando il CV di laboratorio è maggiore del CV del gruppo omogeneo.

Nella figura 4 possiamo notare come WBC-BF, PMN-BF# e TC-BF mostrano una tendenza positiva oltre i 3 punti di SDI su SNCS, anche in questo caso non identificabile dalle sole carte strumentali (dati non mostrati).

DISCUSSIONE

Il CQ rappresenta lo strumento più efficace per valutare la qualità analitica delle analisi di laboratorio e per garantire così un risultato tecnicamente affidabile. Il CQI interno e la VEQ costituiscono i due principali schemi di CQ utilizzati in laboratorio.

La valutazione da parte di un ente esterno dei dati

ricavati da controlli giornalieri ha posto le basi per l'organizzazione di programmi di CQA (interlaboratorio), ovvero programmi in grado di valutare l'imprecisione e l'accuratezza di un sistema analitico partendo dai dati del CQI giornaliero.

L'applicazione della connettività interlaboratorio al concetto di CQ ha permesso lo sviluppo di software esperti di ultima generazione capaci non solo di monitorare l'andamento giornaliero dei dati di laboratorio, ma anche di integrare e inviare tali dati ad appositi centri di calcolo per la valutazione statistica di accuratezza e imprecisione in tempi brevi, per la rappresentazione grafica dell'andamento temporale dei dati di controllo, per il confronto dei dati del singolo laboratorio con gruppi di laboratori di riferimento.

In particolare il connubio fra l'utilizzo dei materiali di controllo per i liquidi biologici XN-CHECK e SNCS per quanto riguarda l'analisi citometrica dei liquidi biologici, è in grado di supplire alla carenza di programmi di VEQ. SNCS ha diversi vantaggi rispetto agli schemi di valutazione più tradizionali; fra questi possiamo elencare:

- La valutazione dell'andamento del CQI viene fornita in tempo reale consentendo l'analisi proattiva e la risoluzione dei problemi con azioni correttive.
- Sono valutate tutte le modalità di analisi (chiusa/aperta) fruibili con lo strumento XN-BF.
- Il materiale di controllo stabilizzato previene il possibile effetto matrice, così ogni misurazione è valutata rispetto agli stessi analizzatori, alle stesse modalità di analisi e allo stesso numero di lotto. Eventuali valori anomali sono dovuti solo alle prestazioni degli analizzatori in dotazione.
- Non è richiesta alcuna formazione specifica in quanto il software è di facile utilizzo.
- Sono eliminati gli errori di trascrizione ed invio tardivo dei dati grazie all'invio automatico degli stessi che avviene pochi secondi dopo la processazione dei CQI.
- Non sono previsti ulteriori costi per l'utilizzo e la gestione del software.
- Tutti i parametri sia "refertabili" che di "ricerca" sono valutati completamente, non solo i parametri di base come nel caso degli schemi tradizionali di VEQ.
- Gli avvisi via e-mail vengono emessi per circostanze che richiedono attenzione. L'intervento proattivo è possibile con l'osservazione delle tendenze prima

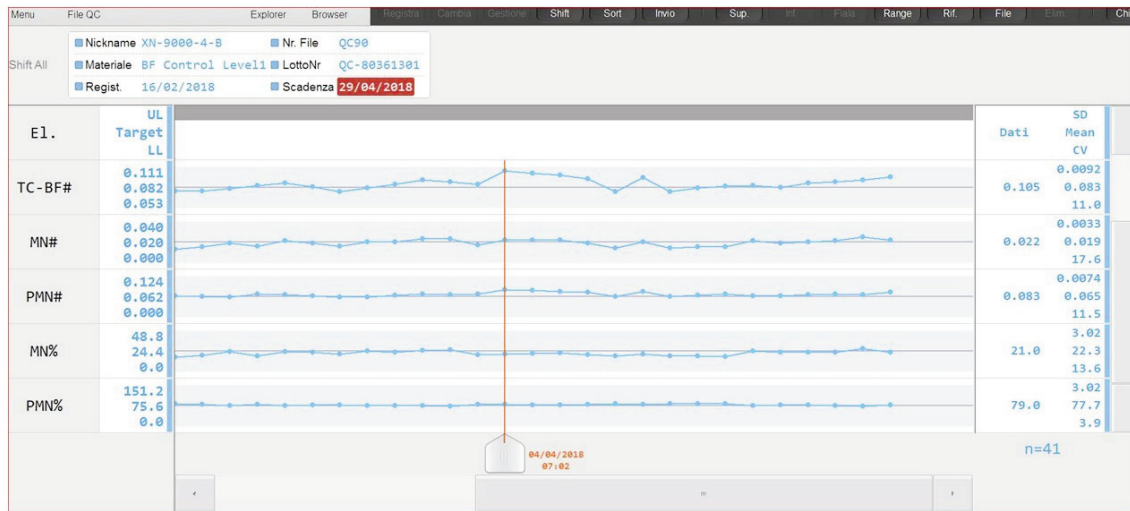


Figura 2
 Carta di controllo del conteggio delle cellule polimorfonucleate (controllo strumentale).

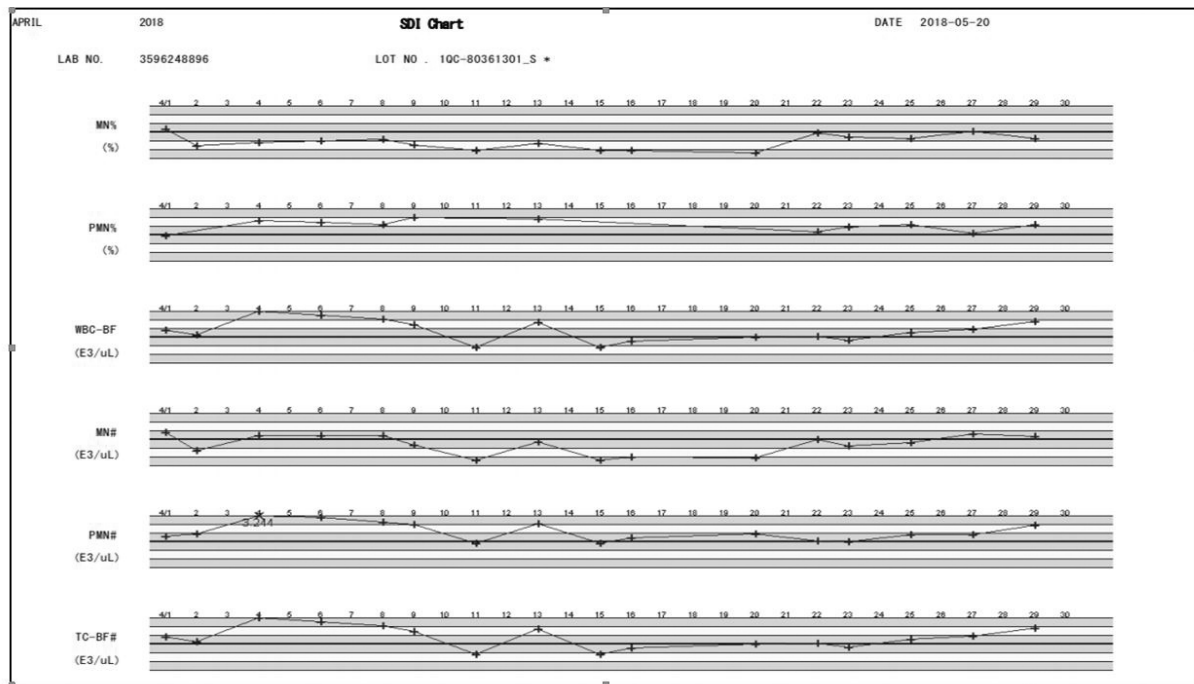


Figura 3
 Carta di controllo del conteggio delle cellule polimorfonucleate (carta di controllo SNCS).

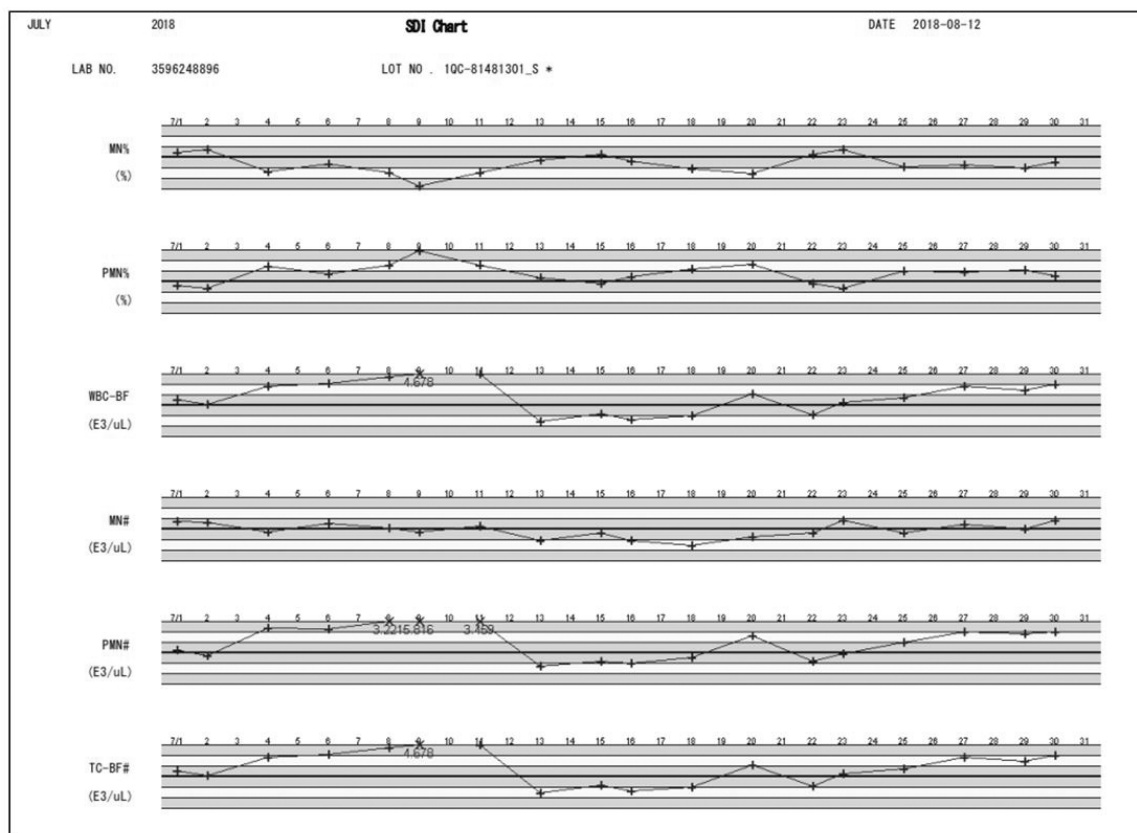


Figura 4

Tendenza ascendente di alcuni parametri (WBC-BF, PMN# e TC-BF) su carta di controllo SNCS.

che si verifichi un errore del CQI.

- Il software SNCS è conforme ai requisiti degli standard ISO/IEC 15189 e ISO/IEC 17025 per uso laboratoristico. In relazione alla conformità degli standard sopra menzionati, i laboratori dotati dell'applicazione XN-BF possono utilizzare SNCS come VEQ per i parametri dei liquidi biologici.

In conclusione, l'integrazione tra digitalizzazione e controllo di qualità rappresenta tutt'oggi un passo in avanti nello sviluppo di strumenti informatici esperti capaci di consentire un'analisi in tempo reale dei dati e una gestione multicentrica dei controlli di diversi laboratori tramite l'implementazione di programmi interlaboratorio.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. DPR 14/01/1997: Approvazione dell'atto di indirizzo e coordinamento alle regioni e alle province autonome di Trento e di Bolzano, in materia di requisiti strutturali, tecnologici ed organizzativi minimi per l'esercizio delle attività sanitarie da parte delle strutture pubbliche e private. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_1163_allegato.pdf (ultimo accesso: gennaio 2019).
2. Besozzi M, Bolelli G, Borsotti M, et al. Il controllo qualità in chimica clinica: le basi, gli obiettivi, il disegno. *Biochim Clin* 1995;19:372-400.
3. Westgard JO A method evaluation decision chart (MEDchart) for judging method performance. *Clin Lab Science* 1995;8:277-83.
4. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Body Fluid Analysis for cellular composition; approved guideline. CLSI document H56-A. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2006.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of instrumental Methods; Approved Guideline - second edition. CLSI document H20-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
6. Braga F, Panteghini M. Riferibilità metrologica come strumento per la standardizzazione delle misure in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:551-8.
7. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, et al. Evaluation of the body fluid mode of automated hematology analyzer XN-series for extremely low peripheral white blood cell counts. *Int J Lab Hematol* 2014;36:e3-7.
8. Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, et al. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1791-8.

9. C Briggs, I Longair, P Kumar et al. A novel modular blood cell counting system. *J Clin Pathol* 2012;65:1024-30.
10. Buoro S, Mecca T, Azzarà G, et al. Cell population data and reflex testing rules of cell analysis in pleural and ascitic fluids using body fluid mode on Sysmex XN-9000. *Clin Chim Acta* 2016;452:92-8.
11. Fleming C, Russcher H, Lindemans J, et al. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1689-706

Attività fisica e biomarcatori dello stress ossidativo nell'invecchiamento

Barbara Tomasello¹, Mariano Malaguarnera², Marcella Renis¹, Claudia Di Giacomo¹

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco- Sezione di Biochimica, Università di Catania.

²Centro di Ricerca "La Grande Senescenza" Ospedale Cannizzaro e Università di Catania

ABSTRACT

Physical exercise and oxidative stress biomarkers in the elderly.

Introduction: aging is regulated by a number of aging genes including sirtuins, linked to redox status and epigenetically controlled. Physical exercise, depending on intensity, type of training and duration, seems to modulate positively the redox state in aging. It was demonstrated an increase in susceptibility to oxidative stress by the depletion of intracellular glutathione (GSH) and total glutathione (tGSH) levels in the muscles of aged animals. Moreover, physical activity, especially if moderate and regular, seems to activate adaptive mechanisms, reducing body's vulnerability to oxidative stress and improving systemic metabolic activities.

Methods: this study is aimed to evaluate the effects of regular exercise (3 times/week for 2 months) on the levels of radical species (d-ROM test), thiol groups (SHp test), plasma antioxidant capacity (BAPtest), 8-OH-guanosine (COMET test) and some redox-related proteins (HSP27, HSP70, Sirt1 and 2) in 40 healthy elderly subjects, aged from 65 to 74 years. In addition, plasma enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were evaluated.

Results: the enrolled subjects showed oxidative stress before exercise with the presence of radical species, oxidation of purine bases and reduced antioxidant capacity. After the scheduled training, a global improvement of oxidative stress markers was observed with an upregulation of HSP27, HSP70, Sirt1 and Sirt2 expression, as adaptive response.

Conclusion: our results underline the importance of these biochemical parameters to monitor oxidative stress in aging and the adaptive redox response to physical exercise in elderly. Therefore, these biomarkers may be routinely used in order to identify individuals at risk for developing oxidative stress related pathologies as well as in personalized physical therapy.

INTRODUZIONE

L'invecchiamento è un evento multifattoriale con manifestazioni di progressivo deterioramento a carico di diverse funzioni dell'organismo e una maggiore vulnerabilità ai danni ambientali e quindi a contrarre malattie, in particolare quelle non trasmissibili come il diabete, le patologie cardiovascolari, neurodegenerative e tumorali. A tutto ciò si associano anche alterazioni significative di tipo quali-quantitativo a carico di proteine o enzimi preposti a prevenire e/o riparare i danni (1,2). Il fatto che si sia allungato il tempo di vita, ma non sempre la qualità di vita, sta portando ad un aumento dei costi socio-sanitari associabili all'invecchiamento ed alle patologie ad esso connesse. Pertanto obiettivi importanti della cabina di regia in ambito sanitario sono un

invecchiamento in buona salute ed una migliore qualità della vita degli anziani attraverso l'assunzione di stili di vita sani e mantenendosi fisicamente attivi (3).

Il progressivo declino delle funzioni di un organismo viene comunemente associato alla presenza di stress ossidativo non facilmente riparabile. Di contro, l'esercizio fisico aerobico, moderato e regolare, contribuisce a contrastare il declino fisiologico proprio dell'invecchiamento con riduzione del rischio di patologie tipiche dell'età e correlate allo stress ossidativo. In realtà, a livello metabolico l'attività fisica genera specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, se prodotte a livelli moderati, sono in grado di modulare la contrazione muscolare, generare risposte fisiologiche e stimolare una risposta adattativa. Questa consiste in un'azione protettiva con conseguente modulazione della

Corrispondenza a: Claudia Di Giacomo, Sezione di Biochimica, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Catania, Tel 095-7384060, E-mail cdigiaco@unicat.it

Ricevuto: 31.01.2019

Revisionato: 12.04.2019

Accettato: 28.04.2019

Pubblicato on-line: 08.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.044

espressione di proteine coinvolte in pathways molecolari di risposta allo stress (*Heat Shock Proteins, HSPs; Sirtuine, Sirts; Uncoupling proteins, UCP*) e nella biogenesi mitocondriale. A tutto ciò si associa, inoltre, la rimozione dei mitocondri vecchi e malsani attraverso dinamica mitocondriale e autofagia (4-7).

La ricerca dei biomarcatori di stress e di modifiche metaboliche stress-indotte, precedentemente centrata sull'analisi effettuata su biopsie cellulari, viene oggi eseguita in modo meno invasivo, ma altrettanto affidabile e molto più veloce utilizzando le cellule ematiche circolanti e/o saliva (8,9).

L'obiettivo principale di questo studio è quello di individuare, nell'invecchiamento, alcuni biomarcatori attraverso cui dimostrare l'influenza dell'attività fisica sullo stress ossidativo e la presenza di una risposta adattativa capace di contrastare i danni ossidativi e proteggere da ulteriori insulti.

Per verificare questa ipotesi, abbiamo misurato i livelli di marcatori di ossidazione (specie radicaliche dell'ossigeno e 8-OH-guanosina), lo stato antiossidante plasmatico (capacità antiossidante plasmatica e livelli di gruppi tiolici) e le attività di alcuni enzimi antiossidanti [superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GPx) e glutatione reduttasi (GR)] e le concentrazioni di alcune proteine di risposta allo stress intracellulari (i) ed extra cellulari (e) (iHSP 27 e 70; eHSP70; sirtuine 1 e 2) sia in condizioni basali sia dopo l'attività fisica in 40 anziani.

METODI

Partecipanti

Per lo studio sono stati arruolati 40 soggetti di età compresa tra 65 e 74 anni, (23 maschi e 17 femmine) reclutati presso l'Ospedale Cannizzaro di Catania. Prima di eseguire le analisi di base e consegnare le informazioni relative alla storia medica completa e lo stile di vita, tutti i soggetti che hanno partecipato allo studio hanno letto e sottoscritto sia il consenso informato, sia la documentazione relativa alla spontanea donazione dei campioni ai fini di ricerca. Lo studio è stato condotto secondo i principi espressi nella Dichiarazione di Helsinki e nelle successive revisioni.

Criteri di esclusione sono stati i fattori che potessero influenzare la relazione tra l'attività fisica e lo stress ossidativo, come la presenza di infiammazione cronica, fumo, consumo di alcol, sovrappeso [definito da un indice di massa corporea (IMC) >27 kg/m²], presenza di infezioni, allergie, malattie autoimmuni, assunzione di alcuni farmaci (inclusi rimedi a base di erbe o vitamine) quali antinfiammatori, antivirali e immunosoppressivi. Su tutti i soggetti la valutazione della possibile presenza di uno stato infiammatorio è stata effettuata mediante la determinazione della proteina C reattiva plasmatica (PCR).

Il massimo consumo di ossigeno (VO_{2max}) è stato misurato eseguendo il test massimale incrementale effettuato su tapis roulant; la potenza massima è stata

valutata mediante il Leg Press Test.

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche demografiche, cliniche e biochimiche dei partecipanti allo studio.

Tabella 1

Caratteristiche demografiche, cliniche e biochimiche dei partecipanti

	Partecipanti (n=40)
Età	69 (4,5)
Sesso (maschi/femmine)	23/17
IMC (Kg/m ²)	23,2 (3,2)
PCR, mg/L	4,4 (1,1)
Glucosio, mg/dL	91,5 (7)
Attività fisica	2 mesi, 3volte/settimana
VO _{2max} , mg/kg x minuto	≥28 (maschi); ≥21(femmine)
Potenza massima (Leg press test), W/kg	>14,5 (maschi); >9,5(femmine)

I dati sono espressi come media (DS)

IMC, Indice di Massa Corporea; PCR, Proteina C Reattiva

Programma di attività fisica

Il programma di attività fisica si è svolto presso il centro sportivo MOV.I.S di Catania tra le 8:00 e le 9:00 del mattino per una durata di due mesi con una frequenza di tre incontri settimanali distinti per carico e tipologia di esercizi, al fine di garantire l'alternanza delle fasi di carico e scarico relative all'intensità dell'esercizio.

L'attività era così organizzata in tre fasi: una fase iniziale di riscaldamento, una serie di esercizi previsti per la mobilitazione e il miglioramento del trofismo dei vari distretti anatomici, ed una attività defaticante atta al ripristino delle condizioni di calma fisiologica del soggetto.

Campioni

I campioni di sangue sono stati raccolti prima dell'inizio dei due mesi di allenamento (pre-esercizio- T0) e al termine dei due mesi di esercizio (post-esercizio- T1) in provette con eparina (Vacutainer, Becton Dickinson, NJ, USA). Le provette sono state conservate a temperatura ambiente, trasportate al laboratorio e processate entro 1 ora dalla raccolta per ottenere plasma, linfociti e sangue intero, in accordo con le indicazioni presenti nei kit utilizzati e/o con le metodiche di laboratorio. Tutti i campioni biologici, processati come descritto in precedenza (10), sono stati mantenuti a -80°C fino al momento dell'analisi e comunque non oltre 40 giorni.

Analisi biochimiche

Derivati dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (d-ROM test)

Il kit diagnostico d-ROMs test (Diacron International srl, Grosseto, Italia) è stato utilizzato per valutare i livelli di specie radicaliche a T0 e a T1. L'esame si basa sul concetto che la quantità di idroperossidi organici presenti nel plasma è correlata ai radicali liberi da cui sono formati. I valori di riferimento riportati dal produttore sono compresi tra 250 e 300 Unità Carratelli (CARR U), dove 1 CARR U corrisponde a 0,8 mg/L di H₂O₂. I valori al di fuori di questo intervallo sono considerati indicativi di un'alterazione nell'equilibrio tra pro-ossidanti e capacità antiossidante dei soggetti. Valori >300 CARR U indicano una condizione di stress ossidativo in atto.

Barriera antiossidante plasmatica (BAP test)

Il kit diagnostico BAP test (Diacron International srl, Grosseto, Italia) è stato utilizzato per valutare il potenziale antiossidante plasmatico a T0 e T1. Si tratta di un saggio fotometrico che misura il potenziale antiossidante biologico del plasma come la capacità del campione di plasma di ridurre il ferro da ferrico (Fe⁺⁺⁺) alla forma ferrosa (Fe⁺⁺). I risultati relativi al potere antiossidante ferro-riducente del plasma sono espressi in µmol/L. L'intervallo dei valori di riferimento indicato dal produttore è 2 200-4 000 µmol/L.

Inoltre, come indice dello stato ossidativo sistemico, è stato calcolato il rapporto tra antiossidanti/stress ossidativo usando la seguente equazione: BAP/D-ROM.

Determinazione dei gruppi tiolici (SHp test)

Il test SHp (kit diagnostico Diacron International s.r.l., Grosseto, Italia) viene utilizzato per la determinazione quantitativa in vitro dei gruppi sulfidrilici (-SH) proteici e non proteici presenti nel plasma, che rappresentano una componente significativa della barriera antiossidante plasmatica. Infatti, tali gruppi possono opporsi alla fase di propagazione dei processi perossidativi inattivando i radicali sia alcossilici (RO•) che idrossilici (HO•). La determinazione è stata eseguita in accordo con il protocollo del fornitore ed il titolo tiolico dei campioni è stato espresso in µmol/L (10).

Attività della super ossido dismutasi (SOD)

La SOD intraeritrocitaria è stata determinata in vitro utilizzando il kit diagnostico RANSOD (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Regno Unito). Il metodo impiega il sistema xantina/xantina ossidasi (XOD) per generare radicali superossido che reagiscono con il 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltretazolio cloruro (INT) per formare formazano, colorato in rosso. L'attività della SOD è quindi misurata indirettamente rilevando l'intensità del prodotto colorato che è espressione del grado di inibizione della reazione (11). L'attività della

SOD in U/mL dei campioni è stata calcolata in accordo con le indicazioni del produttore ed espressa in U/mL.

Attività della glutatione perossidasi (GPx)

Il RANSEL (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Regno Unito) è un test diagnostico per la determinazione in vitro di GPx su campioni di sangue intero, in accordo con Paglia et al. (12). L'attività della GPx, espressa in U/L, è stata calcolata seguendo le indicazioni del produttore.

Attività della glutatione reduttasi (GR)

L'attività della GR è stata determinata utilizzando il kit diagnostico fornito da Randox Laboratories Ltd (Crumlin, Regno Unito), e si basa sul metodo proposto da Goldberg et al. (13). L'attività della GR, espressa in U/L, è stata calcolata secondo le indicazioni del produttore.

Danno ossidativo al DNA

Il *Comet Assay (Single Cell Gel Electrophoresis o SCGE)* è un saggio in vitro che analizza e quantifica il danno al DNA su singola cellula. Per questo studio è stata utilizzata una variante della tecnica, messa a punto da Collins et al. (14), che utilizza l'enzima formamido-pirimidina DNA glicosilasi (Fpg) capace di riconoscere specificamente e sottoporre a clivaggio le basi puriniche ossidate presenti sul DNA, in particolare 7,8-diidro-8-ossiguanina (8-OHdG), producendo siti apurinici. Questi, a loro volta, sono convertiti in rotture del filamento, grazie all'attività endonucleasica associata all'enzima. Il test è stato effettuato utilizzando il kit Trevigen's Fpg, corredato con l'enzima Fpg di *Escherichia coli* (15). La procedura del Comet assay con Fpg presenta, rispetto al Comet assay tradizionale con elettroforesi a pH 13,1, un processamento del campione in doppio: il primo è trattato regolarmente e sottoposto ad elettroforesi a pH 12,1 e l'altro è incubato, dopo la lisi, con Fpg prima di essere sottoposto ad elettroforesi a pH 12,1. Le molecole di DNA danneggiato, previa colorazione con Syber Green, sono state visualizzate al microscopio a fluorescenza e le immagini acquisite sono state analizzate e quantificate mediante il software CASP (16).

Nell'esaminare i due campioni, in doppio, come parametro di valutazione del danno è stato utilizzato il "%TDNA", ossia la percentuale di DNA presente nella coda della cometa, sia a livello basale (%TDNA_{basale}) sia totale (%TDNA_{FPG}). Il danno ossidativo è stato invece calcolato applicando la seguente formula:

$$100x(\Delta\%TDNA)/(\%TDNA_{FPG})$$

dove $\Delta\%TDNA$ è pari a $(\%TDNA_{FPG} - \%TDNA_{basale})$

Espressione delle proteine HSP27 e HSP70, SIRT1 e SIRT2

La tecnica PAGE/Western Blotting consente di effettuare la separazione delle proteine da una miscela complessa, per poi identificarle utilizzando una reazione antigeno-

anticorpo. Il pellet linfocitario ottenuto dal sangue in toto mediante separazione con Ficoll®, come descritto da Tomasello et al. (10), è stato risospeso in una soluzione di lisi (Tris-HCl 40mM, EDTA 25 mM, 0,2% SDS) contenente il cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma®), in concentrazione di 1:100 v/v e successivamente mantenuto per 30 minuti a 4°C. La miscela è stata centrifugata a 10 000 rpm per 10 minuti e sul surnatante sono state misurate le proteine secondo Bradford (17). Le proteine totali (60 µg) sono state separate per elettroforesi (100 V) su un gel di poliaccrilammide (4-20%) trasferite su membrane di nitrocellulosa ed ibridate overnight a 4°C con gli specifici anticorpi primari (Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, U.S.A.) per: SIRT1 (1:200), SIRT2 (1:400), HSP70 (1:200), HSP27 (1:3000). Il complesso antigene-anticorpo è stato riconosciuto dall'anticorpo secondario coniugato con perossidasi e rilevato in chemiluminescenza mediante il kit Ecl-prime (Amersham™ GE Healthcare Lifescience, Milano, Italia). Le immagini digitali, acquisite mediante ChemiDoc Imagers (Biorad, Hercules, California, Stati Uniti), sono state quantificate mediante il software Image Lab™ eseguendo l'analisi densitometrica delle singole bande. Il valore dei livelli di espressione è stato espresso utilizzando unità densitometriche arbitrarie (u.d.a.) e normalizzando i valori ottenuti verso quelli dell'actina scelta come proteina di riferimento (18).

Determinazione della proteina HSP70 extracellulare (eHSP70)

Il kit ELISA HSP70 *High Sensitivity* (Stressegan-Assay Designs, Enzo Life Sciences, Roma, Italia) è stato utilizzato per determinare con alta sensibilità e specificità la presenza dell'isoforma inducibile di HSP70 nel plasma. Per ogni campione la concentrazione di eHSP70 è stata determinata estrapolandola dalla curva di taratura ed è stata espressa in ng/ml.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software GraphPad Prism (Versione 6). La distribuzione normale dei dati è stata testata mediante il test Shapiro-Wilk. Le variabili continue sono state espresse come mediana e intervallo interquartile (IQR) o media (DS), quando appropriato. Il confronto tra le variabili continue prima (T0) e dopo (T1) l'esercizio fisico è stato effettuato con il test di Wilcoxon signed-rank test o il test t di Student per dati appaiati. La correlazione di Spearman (ρ) è stata utilizzata per valutare se gli effetti dell'attività fisica sullo stato ossidativo sistemico (SOS), espresso come Δ BAP/D-ROM ratio, sono legati alle variazioni degli altri parametri biologici (Δ variabile = variabile T1- variabile T0). Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Determinazione dello stato ossidativo sistemico (SOS)

Per lo studio sono stati arruolati 40 soggetti di età media pari a 69 (4,5) anni, di cui 23 maschi (57,5%). I partecipanti al momento dell'arruolamento non presentavano stati infiammatori in atto, almeno quelli evidenziabili dai valori di PCR (Tabella 1). Altre caratteristiche dei soggetti sono pure riportate in Tabella 1.

I dati in Figura 1A evidenziano che l'attività fisica influenza i marcatori plasmatici di stress ossidativo. In particolare, i livelli di specie radicaliche sono significativamente incrementati dall'attività fisica ($p = 0,0001$): CARR U a T0 370,5 (335,4-407,4) verso 483,2 (426,9-531,1) a T1. I valori basali pre-esercizio dei partecipanti (T0) erano caratteristici di una condizione che è definita di "stress ossidativo lieve" se il d-ROM è compreso tra 321-340 CAAR U o di "stress ossidativo medio" per valori tra i 341-400 CARR U. I valori a T1, invece, hanno evidenziato la presenza di una condizione di "stress ossidativo elevato" (401-500 CARR U) o "stress ossidativo elevatissimo" (>500 CARR U).

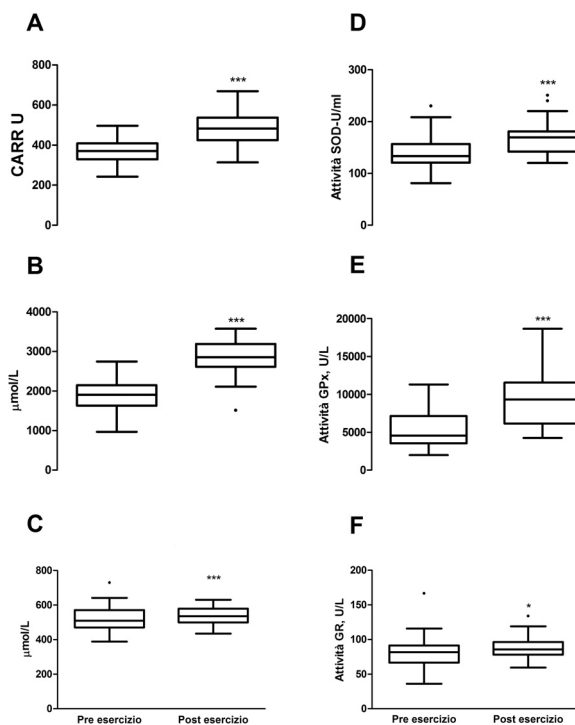


Figura 1

Effetto dell'attività fisica sulle specie ossidanti (d-ROMs) (pannello A); capacità antiossidante plasmatica (BAP) (pannello B); livelli di gruppi tiolici liberi (SHp) (pannello C); attività della SOD (pannello D), GPx (pannello E) e GR (pannello F). I dati sono rappresentati come box-plot e sono espressi come mediana (intervallo interquartile). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ significativo versus i valori pre-esercizio.

CARR U, Unità Carratelli; SOD, Super Ossido Dismutasi; GPx, Glutazione Perossidasi; GR, Glutazione Reduttasi.

La capacità antiossidante (BAP test) era significativamente più alta al T1: 2855 (2613-31754) versus 1906 (1645-2121) $\mu\text{mol/L}$ di ferro ridotto ($p=0,0001$) a T0, come mostrato in Figura 1B. L'attività fisica ha indotto un miglioramento della capacità antiossidante di tutti i partecipanti da uno stato definito di "carenza moderata o lieve" (1800-1600; 2000-1800 $\mu\text{mol/L}$) ad uno "ottimale" (>2200 $\mu\text{mol/L}$). Anche il rapporto BAP/d-ROMs era significativamente più alto dopo l'esercizio fisico: 6 (5,2-6,5) versus 5,14 (4,5-6) ($p=0,0017$).

Tra i componenti della barriera antiossidante le molecole con i gruppi tiolici liberi (-SH) svolgono un ruolo molto importante nel contrastare gli effetti degli ossidanti. Nel nostro studio i partecipanti presentavano dei buoni livelli di SH liberi al T0 [509,1 (471,8-568,1) $\mu\text{mol/L}$] ed in seguito all'attività fisica si è osservato un lieve ma significativo aumento [535,5 (503,2-577,7), $p=0,048$] (Figura 1C). Parallelamente, la valutazione delle attività enzimatiche di SOD, GPX e GR, tre enzimi coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio redox, ha mostrato un incremento significativo al T1: 169,4 (144,4-180,2) versus 133,3 (120,7-154,7) U/mL, $p<0,001$; 9328 (6445-11549) versus 4568 (3458-7045) U/L, $p=0,002$; e 93,0 (79,7-98,3) versus 81,7 (68,1-89,8) U/L ($p=0,018$), rispettivamente (Figura 1D,E,F). Infine la valutazione dello stato del DNA effettuata mediante Comet assay ha evidenziato una riduzione significativa del danno totale al DNA al T1 ($p=0,004$) senza modifiche nella percentuale di danno ossidativo sul totale (22% versus 17,9%, $p=0,7$) (Figura 2).

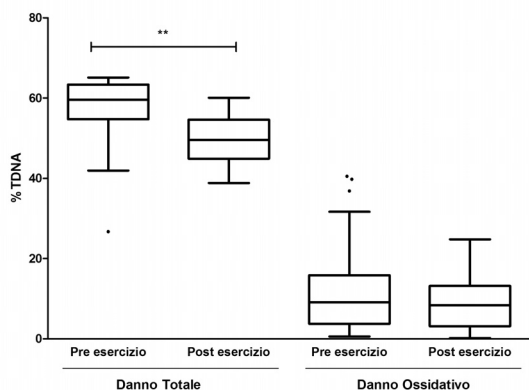


Figura 2

Effetto dell'attività fisica sul danno al DNA. I risultati relativi al danno totale e al danno ossidativo sono rappresentati come box-plot. I dati sono espressi come %TDNA e sono espressi come mediana (intervallo interquartile). La percentuale di danno ossidativo sul danno totale è stata calcolata come riportato nella sezione metodi.

** $p<0,01$ significativo versus i valori pre-esercizio

La correlazione di Spearman (ρ) utilizzata per determinare se gli effetti dell'attività fisica sullo SOS (espresso come $\Delta\text{BAP/d-ROM}$) sono legati alle variazioni degli altri parametri biologici, non mostra

nessuna correlazione significativa (Tabella 2).

Tabella 2

Correlazione di Spearman (ρ) tra il rapporto $\Delta\text{BAP/d-ROM}$ e le variazioni ΔSH , ΔSOD , ΔGPx e ΔGR .

$\Delta\text{BAP/d-ROM}$	ΔSH	ΔSOD	ΔGPx	ΔGR
r	0,31	-0,12	-0,13	-0,2
p	0,06	0,47	0,5	0,3

A variabile = variabile post-esercizio minus variabile pre-esercizio

d-ROM, metaboliti reattivi dell'ossigeno; *BAP*, barriera antiossidante plasmatica; *SH*, gruppi tiolici liberi; *SOD*, super ossido dismutasi; *GPx*, glutazione perossidasi; *GR*, glutazione riduttasi

Determinazione della risposta proteica allo stress

L'analisi della espressione delle proteine mediante *western blot* ha evidenziato un aumento significativo dell'espressione linfocitaria di tutte le proteine analizzate dopo l'attività fisica. In particolare per HSP27 e HSP70 abbiamo osservato livelli di espressione al T1 rispetto ai valori misurati a T0 corrispondenti a 130 (4) versus 109 (5,1) u.d.a ($p=0,02$) per HSP27 e 156 (2) versus 127 (6) u.d.a. ($p=0,03$) per HSP70 (Figura 3A).

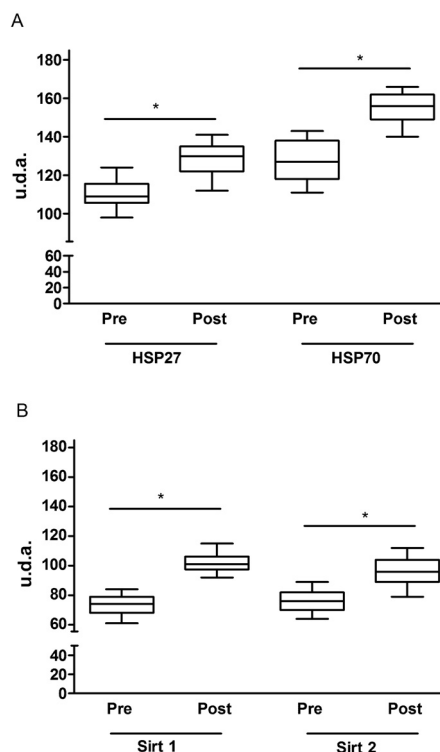


Figura 3

Livelli di espressione di HSP27/HSP70 (pannello A) e SIRT1/SIRT2 (pannello B), nel lisato linfocitario prima e dopo l'esercizio fisico. I valori sono espressi come u.d.a (DS).

* $p<0,05$ significativo versus i valori pre-esercizio.

Anche i livelli di espressione della Sirt1 sono risultati significativamente aumentati a T1 (6) u.d.a a T1 rispetto a T0 (3) u.d.a a T0 ($p=0,02$) e quelli di Sirt2 a 96 (5) u.d.a versus 76 (4) u.d.a., $p=0,008$ (Figura 3B).

In riferimento al rilascio di HSP70 (eHSP70) nel plasma è stata osservata una significativa riduzione dei suoi livelli a T1 rispetto ai valori registrati a T0 [0,8 (0,4-1,3) versus 1,8 (1,1-2,4) ng/mL, $p<0,001$] (Figura 4). Tale riscontro risulta opposto rispetto a quello osservato, a livello intracellulare (iHSP70), per l'espressione di HSP70 misurata mediante Western blotting (Figura 3A).

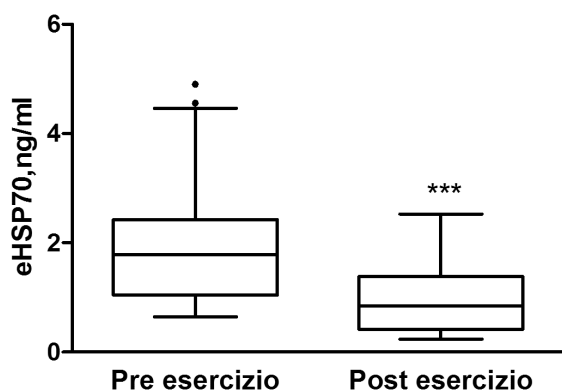


Figura 4
Rilascio plasmatico di HSP70 prima e dopo l'attività fisica. I risultati sono espressi in ng/ml(DS). *** $p < 0,001$ significativo versus il corrispondente valore pre-esercizio.

DISCUSSIONE

L'aumento di ROS indotto dall'attività fisica modula, sia a livello muscolare sia a livello sistemico, una risposta adattativa allo stress che è individualizzata e influenzata da diversi fattori, inclusi l'obesità, lo stile di vita, le comorbilità, il tipo di attività fisica (10, 19-20). Infatti, in letteratura sono presenti dati controversi sulla relazione tra stress ossidativo ed attività fisica, soprattutto in soggetti anziani poiché lo stress ossidativo gioca un ruolo molto importante nell'invecchiamento stesso ed in patologie ad esso associate (20-22).

Nel presente studio, esaminando le concentrazioni di alcuni biomarcatori dello stato redox, abbiamo valutato la risposta adattativa allo stress e la capacità di riparo del danno al DNA in soggetti età compresa tra 65 e i 74 anni che svolgevano attività fisica aerobica moderata. Dopo due mesi di attività fisica moderata e costante, utilizzando come parametri di base le misurazioni di d-ROM (livelli di ROS) ed il BAP test (capacità antiossidante) abbiamo osservato, rispetto alla condizione pre-esercizio, ed in accordo con quanto dimostrato da Bouzid et al. (23), un incremento sia per le specie radicaliche sia per la capacità antiossidante

plasmatica, che evidenziano l'instaurarsi nei soggetti arruolati, di una condizione di stress ossidativo potenziale o compensato, controbilanciato dalle difese antiossidanti. L' aumento del rapporto BAP/d-ROMs dopo l'esercizio fisico, oltre a rinforzare l'associazione tra stress ossidativo e attività fisica, indica, a nostro avviso, la presenza di una risposta ormetica positiva a seguito dell'esposizione a basse dosi di stress (24).

L'aumento di ROS, indotto dall'esercizio fisico, è accompagnato da un aumento dell'espressione e dell'attività delle difese endogene antiossidanti (SOD, catalasi e GPx), che lavorando in sinergia con gli antiossidanti non enzimatici (coenzima Q10, glutazione, acido urico, acido lipoico, bilirubina) contrastano le minacce ossidative (25-26). La SOD, cui si associa il sistema del glutatione costituito da: GPX, GR e glutatione ridotto (GSH), viene descritta come la prima importante protezione contro i radicali superossido (27-28). Le attività enzimatiche di SOD, GPx e GR subiscono un significativo incremento dopo l'esercizio nei soggetti da noi arruolati, contribuendo di certo, ad irrobustire il pool di molecole con gruppi tiolici liberi come il glutatione ridotto. Va però considerato che se la produzione di ROS è eccessiva, viene indotta una serie di danni su diversi target molecolari tra cui il DNA, promuovendo l'instabilità genomica, danneggiando i sistemi di riparo e provocando mutagenesi (29). Nel nostro studio abbiamo utilizzato il Comet assay per misurare, sul medesimo campione, sia il danno totale al DNA sia i livelli di 8-OHdG ed abbiamo osservato che il primo si riduce ed il secondo non si modifica significativamente dopo l'esercizio fisico. Questo ci permette di affermare che l'attività fisica stimola il riparo del DNA, in accordo con quanto dimostrato da Radak et al. (30). In contrasto con questi dati, Mergener et al. (31) hanno osservato un incremento dei livelli di 8-OHdG dopo l'esercizio in donne che praticavano due differenti tipi di attività fisica. Queste discrepanze probabilmente dipendono sia dal fatto che sono differenti i disegni sperimentali tra i diversi studi esaminati (intensità, durata e tipo di esercizio) sia dal coinvolgimento di diversi meccanismi responsabili della risposta adattativa.

Recentemente è anche stato dimostrato che il controllo del dispendio energetico durante l'attività fisica viene esercitato da PGC-1alfa, un regolatore chiave dei mitocondri, e da due sensori metabolici, SIRT1 e AMPK, con effetti opposti in risposta all'esaurimento di energia o al suo eccesso (32,19). In particolare la SIRT1, NAD⁺-deacetilasi, appartiene ad una famiglia (SIRT 1-7) di sensori metabolici redox-dipendenti che rispondono alla variazione del rapporto NAD/NADH e controllano diversi processi cellulari, inclusi la proliferazione, la biogenesi mitocondriale, il riparo del DNA, l'infiammazione, il metabolismo lipidico e molti altri. Una *downregulation* di queste proteine, implicata anche nell'invecchiamento, può essere revertita dalla restrizione calorica e/o dall'assunzione di resveratrolo, con allungamento della vita ("lifespan") (33). I nostri dati, in accordo con altri presenti in letteratura, dimostrano che l'esercizio fisico

moderato aumenta l'espressione della SIRT1 (34). Abbiamo anche osservato, per la prima volta in soggetti anziani, un incremento dell'espressione di SIRT2, principalmente espressa a livello dei neuroni e dei nervi, la cui relazione con l'attività fisica nell'uomo è ad oggi sconosciuta. In letteratura è presente solo uno studio, sui ratti, in cui si dimostra che nel muscolo, dopo un anno di attività fisica, non si modifica l'espressione di SIRT2, SIRT 4 e SIRT 5 e 7, mentre aumenta quella di altre proteine: la heat shock protein HSP27, e gli heat shock factors HSF1 e HSF2 la cui attività è correlata con le SIRTs (35). È noto, infatti, che l'espressione di HSPs, una famiglia di proteine che permette alla cellula di adattarsi ai cambiamenti dell'ambiente e di sopravvivere anche in presenza di condizioni avverse, varia in risposta a differenti stress esogeni od endogeni, incluso lo stress ossidativo, ed è attivata dalle sirtuine tramite gli Heat Shock Factor (HSF) (36). Dimauro et al. (37) hanno dimostrato che l'aumento di ROS indotto dall'attività fisica è associato ad un massiccio incremento di differenti HSPs in molti tessuti, probabilmente per facilitare il processo di rimodellamento cellulare stimolato dall'esercizio. Per quanto concerne HSP27, i pochi studi sull'uomo, condotti su biopsie muscolari, evidenziano andamenti opposti, dall'*upregulation* alla non modulazione della loro espressione, in dipendenza sia dal tipo di attività fisica sia dal tempo in cui si effettua il prelievo (38). I nostri dati, ottenuti valutando l'espressione di HSP27 e di HSP70 a livello linfocitario, dimostrano che la risposta adattiva caratterizzata dall'incremento di entrambe le HSPs viene stimolata anche in tessuti non direttamente coinvolti nell'attività fisica e confermano i dati di altri autori che sull'uomo hanno riportato una modulazione di HSP70 sia a livello muscolare sia in monociti circolanti (37,39,40).

Altri Autori hanno riportato la presenza di HSPs nell'ambiente extracellulare in associazione a stati infiammatori e/o infettivi, una loro riduzione nell'invecchiamento e, invece, un loro incremento con l'esercizio fisico (41-46).

I nostri dati, in accordo con quelli di Marshall et al. (47), evidenziano una riduzione dei livelli di eHSP70 al di sotto dei valori registrati a riposo. Noi ipotizziamo che nelle nostre condizioni sperimentali, dopo 60 giorni di attività fisica moderata e costante, l'osservata riduzione delle eHSP70 rappresenti una risposta adattiva allo stress con ricadute decisamente positive sul possibile processo infiammatorio associato sia all'età che alla attività fisica. A nostro avviso, in questo e/o in simili contesti, il rapporto eHSP70/iHSP70 potrebbe essere un biomarcatore adeguato per il monitoraggio dello stato infiammatorio. Purtroppo noi non abbiamo potuto utilizzare questo parametro poiché la determinazione della HSP70 intra- ed extracellulare è stata eseguita con due metodiche differenti.

Riteniamo sia positivo il fatto che i risultati da noi ottenuti siano in buona parte in accordo con diversi dati di letteratura e valutiamo essere un punto di forza del

nostro lavoro l'aver ridotto la variabilità analitica processando i campioni in contemporanea ed in condizioni controllate. Di contro, un punto di debolezza potrebbe essere individuato nel numero non rilevante di soggetti arruolati, il che rende difficile generalizzare i risultati non potendo quantificare la variabilità inter-individuale dei biomarcatori dello stato redox, associata anche ad altri fattori (genetici, età, stato redox basale, e così via).

CONCLUSIONI

Monitorare a livello preliminare la variazione dei parametri indicativi dello stato redox di un individuo, utilizzando i test dROM e BAP, può avere una ricaduta importante nella pratica clinica, sia in prevenzione sia durante la terapia delle differenti patologie associate allo stress ossidativo come quelle cardiovascolari, metaboliche, neurodegenerative e le neoplasie. Questa valutazione biochimica permette di acquisire informazioni in tempi brevi potendo così intervenire tempestivamente per individuare ed eliminare le eventuali cause (terapia causale), potenziare le difese antiossidanti (terapia integrativa), stabilire se proseguire con ulteriori approfondimenti analitico- diagnostici.

I nostri dati hanno implicazioni cliniche dirette poiché stimolano ad ottimizzare i protocolli di esercizio fisico nell'invecchiamento, in associazione ad un corretto stile di vita, al fine di avere dei benefici sul benessere individuale a breve ed a lungo termine, una indicazione che rientra a pieno titolo nelle linee guida dei piani di salute nazionali.

Oggi ripetutamente viene ricordato quanto sia importante educare le giovani generazioni e guidare gli anziani a modificare in modo più attivo il proprio stile di vita, garantendosi un buon bagaglio antiossidante, per prevenire patologie e promuovere il benessere nel tempo.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Goloubinoff P. Mechanisms of protein homeostasis in health, aging and disease. *Swiss Med Wkly* 2016;146:w14306.
2. Knight E, Stuckey MI, Petrella RJ. Prescribing physical activity through primary care: Does activity intensity matter? *Phys Sports Med* 2014;42:78-9.
3. Jin K, Simpkins JW, Ji X, et al. The critical need to promote research of aging and aging-related diseases to improve health and longevity of the elderly population. *Aging Dis* 2015;6:1-5.
4. Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, et al. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell Metab* 2016;23:1034-47.
5. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012;5:9-19.

6. Di Meo S, Reed TT, Venditti P. Harmful and beneficial role of ROS. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:7909186. .
7. Hood DA, Irrcher I, Ljubcic V, et al. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp. Biol* 2006;209:2265-75.
8. Reynés B, Díaz-Rúa R, Cifre M, et al. Peripheral blood mononuclear cells as a potential source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies. *Obesity* 2015;23:28-31.
9. Cifre M, Díaz-Rúa R, Varela-Calviño R, et al. Human peripheral blood mononuclear cell in vitro system to test the efficacy of food bioactive compounds: Effects of polyunsaturated fatty acids and their relation with BMI. *Mol Nutr Food Res* 2017. doi: 10.1002/mnfr.201600353.
10. Tomasello B, Malfa GA, Strazzanti A, et al. Effects of physical activity on systemic oxidative/DNA status in breast cancer survivors. *Oncol Lett* 2017;13:441-8.
11. Arthur JR, Boyne R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci*, 1985;1569-75.
12. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
13. Goldberg DM, Spooner RJ. Assay of Glutathione Reductase. In: Bergmeyer HV, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edition, vol. 3, Verlag Chemie, Deerfield Beach, 1983:258-65.
14. Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, et al. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlation with heart disease mortality rates. *FASEB J* 1998;12:1397-400.
15. Tomasello B, Malfa G, Galvano F, et al. DNA damage in normal-weight obese syndrome measured by Comet assay. *Mediterr J Nutr Metab* 2011;4:99-104.
16. Koňca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay. *Mutat Res* 2003;534:15-20.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976;72:248-54.
18. Malfa GA, Tomasello B, Sinatra F, et al. Reactive response evaluation of primary human astrocytes after methylmercury exposure. *J Neurosci Res* 2014;92:95-103.
19. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, et al. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1208-46.
20. Margaritelis NV, Kyparos A, Paschalis V, et al. Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox Biol*. 2014;2:520-8.
21. Vincent HK, Bourguignon C, Vincent KR. Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1921-30.
22. Simioni C, Zauli G, Martelli AM, et al. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* 2018;9:17181-98.
23. Bouzid MA, Filaire E, Matran R, et al. Lifelong voluntary exercise modulates age-related changes in oxidative stress. *Int J Sport Med*. 2018;39:21-28.
24. Calabrese EJ, Dhawan G, Kapoor R, et al. HORMESIS: A fundamental concept with widespread biological and biomedical applications. *Gerontology* 2016;62:530-5.
25. Rousseau AS, Margaritis I, Arnaud J, et al. Physical activity alters antioxidant status in exercising elderly subjects. *J Nutr Biochem* 2006;17:463-70.
26. Ookawara T, Haga S, Ha S, et al. Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. *Free Radic Res* 2003;37:713-9.
27. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev* 2016;116:3029-85.
28. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999;31:273-300.
29. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1109-15.
30. Radák Z, Naito H, Kaneko T, et al. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 2002;445:273-8.
31. Mergener M, Martins MR, Antunes MV et al. Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. *Clin Biochem* 2009;42:1648-53.
32. Cantó C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:98-105.
33. Porcu M, Chiarugi A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:94-103.
34. Radak Z, Bori Z, Koltai E et al. I. Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2011;51:417-23.
35. Karvinen S, Silvennoinen M, Vainio P, et al. Effects of intrinsic aerobic capacity, aging and voluntary running on skeletal muscle sirtuins and heat shock proteins. *Exp Gerontol* 2016;79:46-54.
36. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, et al. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 2009;323:1063-6. Erratum in: *Science*. 2013;342:931.
37. Dimauro I, Mercatelli N, Caporossi D. Exercise-induced ROS in heat shock proteins response. *Free Radic Biol Med* 2016;98:46-55.
38. Folkesson M, Mackey AL, Holm L, et al. Immunohistochemical changes in the expression of HSP27 in exercised human vastus lateralis muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;194:215-22.
39. Morton JP, Maclaren DP, Cable NT, et al. Trained men display increased basal heat shock protein content of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40:1255-62.
40. Whitham M, Halson SL, Lancaster GI, et al. Leukocyte heat shock protein expression before and after intensified training. *Int J Sports Med* 2004;25:522-7.
41. Terry DF, Wyszynski DF, Nolan VG, et al. Serum heat shock protein 70 level as a biomarker of exceptional longevity. *Mech Ageing Dev* 2006;127:862-8.
42. Jin X, Wang R, Xiao C, et al. Serum and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: a study in the normal Chinese population. *Cell Stress Chaperones* 2004;9:69-75.
43. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, et al. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol* 2002;544:957-62.
44. Bittencourt A, Porto RR. eHSP70/iHSP70 and divergent functions on the challenge: effect of exercise and tissue specificity in response to stress. *Clin Physiol Funct Imaging* 2017;37:99-105.

45. Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, et al. Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2001;6:386-93.
46. Fehrenbach E, Niess AM, Voelker K, et al. Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. *Int J Sports Med* 2005;26:552-7.
47. Marshall HC, Ferguson RA, Nimmo MA. Human resting extracellular heat shock protein 72 concentration decreases during the initial adaptation to exercise in a hot, humid environment. *Cell Stress Chaperones* 2006;11:129-34.

Vitamin D plasma level can affect nivolumab drug exposure in a cohort of patients with non-small-cell lung cancer

Jessica Cusato¹, Carlo Genova², Cristina Tomasello³, Paolo Carrega^{4,5}, Selene Ottonello^{6,7}, Gabriella Pietra^{6,8}, Maria Cristina Mingari^{6,7,8}, Irene Cossu⁹, Erika Rijavec¹⁰, Anna Leggieri³, Giovanni Di Perri¹, Maria Giovanna Dal Bello¹⁰, Simona Coco¹⁰, Simona Boccardo¹⁰, Guido Ferlazzo^{4,5,11}, Francesco Grossi² and Antonio D'Avolio^{1,12}

¹Department of Medical Sciences, University of Torino, Amedeo di Savoia Hospital, Torino

²Medical Oncology Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

³Hospital Pharmacy- M.Vittoria Hospital - ASL Città di Torino, Torino

⁴Laboratory of Immunology and Biotherapy, Department of Human Pathology, University of Messina

⁵Cell Factory Center, University of Messina

⁶Department of Experimental Medicine (DiMES), University of Genova

⁷Center of Excellence for Biomedical Research (CEBR), University of Genova

⁸Immunology Unit, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

⁹Giannina Gaslini Institute, Genova

¹⁰Lung Cancer Unit, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

¹¹Division of Clinical Pathology, University Hospital Policlinico G. Martino, Messina

¹²Interdepartmental Center for Clinical and Experimental Pharmacology (CIFACS), University of Torino

ABSTRACT

Introduction: immune-checkpoint inhibition using programmed cell death-1 and its ligand drug inhibitors have improved survival, among patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): nivolumab is one of the last approved. Vitamin D deficiency (<20 ng/mL) is frequent in lung cancer patients and studies showed this pre-hormone modulates the expression of genes involved in drug pathway and in the immune system regulation. Furthermore, not many biomarkers related to nivolumab therapy are present in literature. The aim of this study was to understand which factors were able to predict nivolumab concentrations and its anti-antibody levels in patients' plasma at 15, 45 and 60 days of therapy.

Methods: forty-five patients with advanced NSCLC were enrolled to receive nivolumab. Enzyme-linked immunosorbent assay was used for drug and vitamin D quantification.

Results: Median nivolumab plasma levels were 12.5, 22.3 and 27.1 µg/mL respectively at 15, 45 and 60 days (p<0.001). No anti-nivolumab antibodies have been detected. 25-hydroxyvitamin D median concentrations were 12.8 ng/mL at baseline, 13.6 ng/mL at 15 days, 11.8 ng/mL at 45 days and 12.9 ng/mL at 60 days. Gender significantly affected nivolumab concentrations (p=0.010 at 15 days, p=0.033 at 45 days and p=0.006 at 60 days). In linear regression analyses, 25-hydroxyvitamin D <20 ng/mL before starting therapy, gender and 25-hydroxyvitamin D <20 ng/mL at 15 days were able to predict nivolumab concentrations respectively at 15, 45 and 60 days of treatment.

Conclusions: for the first time, this study shows factors able to predict nivolumab exposure at different timings, but further, studies in bigger and different cohorts are needed to clarify these data.

INTRODUCTION

Nivolumab was approved by the USA Food & Drug Administration (FDA) in 2015 for treatment of advanced

non-small-cell lung cancer (NSCLC) with progression on or after platinum-based chemotherapy (1). It is indicated in monotherapy or in combination with ipilimumab, for advanced melanoma treatment (unresectable or

Corrispondenza a: Jessica Cusato, Laboratory of Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics, University of Turin, Department of Medical Sciences, Amedeo di Savoia Hospital, Corso Svizzera 164 - 10149 Turin, Italy, Tel +39.011.4393841, E-mail jessica.cusato@unito.it

Ricevuto: 25.01.2019

Revisionato: 19.04.2019

Accettato: 06.05.2019

Publicato on-line: 31.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.046

metastatic) in adults. Compared to nivolumab monotherapy, an increase in progression free survival and overall survival was established for the association nivolumab and ipilimumab, only in patients with low programmed death cell-1 protein ligand (PD-L1) tumor expression (2).

Nivolumab monotherapy is also indicated in adults, after previous therapy, for adjuvant treatment of other cancers, such as melanoma with involvement of the lymphnodes or metastatic disease, who have undergone full resection; advanced renal cell carcinoma; Hodgkin's lymphoma, classic relapsed or refractory, after autologous stem cell transplantation and treatment with brentuximab vedotin; recurrent or metastatic head and neck squamous carcinoma during or after platinum therapy and for locally advanced urothelial carcinoma, unresectable or metastatic, after failure of previous platinum therapy.

Nivolumab is the first monoclonal antibody that inhibits PD-1/PD-L1 immune checkpoint, consequently blocking the cellular immune response (3). Nivolumab pharmacokinetics is linear, resulting in dose-proportional increase in exposure over the dose range (4).

Vitamin D may influence immune checkpoints (5): studies suggest it is able to modulate different pathways related to innate and adaptive immunity, regulating the expression of many genes encoding proteins involved in its pharmacokinetics, through its receptor (VDR). Not many data are present in literature concerning factors able to predict nivolumab concentrations in real-life context. Considering this concept, aim of this study was to perform a descriptive study, highlighting which factors are able to predict nivolumab concentrations in patients' plasma at 15, 45 and 60 days from starting therapy, also considering 25-hydroxyvitamin D influence.

METHODS

Forty-five patients affected by advanced NSCLC were treated with nivolumab at the Lung Cancer Unit of the Hospital San Martino (Genova, Italy) after approval of Local Ethics Committee (registry number: P.R. 191REG2015). Nivolumab dose was 3 mg/kg every 14 days and it was administered until onset of unacceptable toxicities, patient's refusal, death or up to 96 weeks from the start of treatment. 25-hydroxyvitamin D was quantified at baseline and at 15, 45 and 60 days after starting treatment, with enzyme linked immunosorbent assay technique (DRG DIAGNOSTIC, Marburg, Germany). Nivolumab and its anti-antibody were measured with validated ELISA kits (Matrix Biotek, Ankara, Turkey). The analysis of PD-L1 was performed in 29 out of 45 patients with available tumor tissue at diagnosis using immunohistochemistry. In particular, the PD-L1 expression was assessed manually using the rabbit monoclonal anti-human PD-L1 antibody clone 28-8 (Pharm DX DAKO, CA, USA), according to the FDA approved auto-stainer link 48 protocol. The tumor samples were defined as positive when at least 1% of

tumor cells showed a strong staining according to their membrane location.

All variables were tested for normality through the Shapiro-Wilk test. Normal variables were indicated as average and standard deviation, non-normal ones as median and interquartile range (IQR) and categorical ones as numbers and percentages. Correlation were obtained through Pearson test. Median nivolumab and 25-hydroxyvitamin D plasma levels were evaluated at different timings with Friedman test. Gender/nivolumab and vitamin D/nivolumab level associations were analyzed with Mann-Whitney test at the three different timings, also considering the Bonferroni correction. The predictive power of the considered variables was finally evaluated through univariate ($p < 0.2$) and multivariate ($p < 0.05$) linear (for concentrations at 15, 45 and 60 days) regression analyses (backward model). Statistical tests were performed with IBM SPSS Statistics 25.0 for Windows (Chicago, Illinois, USA).

RESULTS

Forty-five patients were included in this study: 69% of males, median age was 73 years and median body mass index (BMI) 23.4 Kg/m² (Table 1). PD-L1 positivity was present in 4/28 (14.3%) of patients.

Median nivolumab plasma levels were 12.5 µg/mL (IQR: 9.5-17.1) at 15 days, 22.3 µg/mL (IQR: 18.3-34.9) at 45 days and 27.1 µg/mL (IQR: 17.4-39.4) at 60 days, and they were statistical different ($p < 0.001$). No anti-nivolumab antibodies have been detected. 25-hydroxyvitamin D median concentrations were 12.8 ng/mL (IQR: 10.1-16.6) at baseline, 13.6 ng/mL (IQR: 10.9-16.1) at 15 days, 11.8 ng/mL (IQR: 10.1-18.9) at 45 days and 12.9 ng/mL (IQR: 10.1-17.0) at 60 days; no significantly statistical differences were highlighted among timings ($p = 0.976$, Figure 1). Females display significantly higher nivolumab levels than males respectively at 15 days ($p = 0.010$; considering Bonferroni $p = 0.030$), at 45 days ($p = 0.033$; considering Bonferroni $p = 0.099$) and at 60 days ($p = 0.006$; considering Bonferroni $p = 0.018$) (Figure 2).

Low vitamin D levels were associated with decreased nivolumab concentrations: particularly, baseline 25-hydroxyvitamin D levels < 20 ng/mL were associated with nivolumab concentrations at 45 ($p = 0.015$; considering Bonferroni $p = 0.045$) and 60 days ($p = 0.017$; considering Bonferroni $p = 0.051$), whereas 15 days 25-hydroxyvitamin D < 20 ng/mL with 15 ($p = 0.014$; considering Bonferroni $p = 0.042$), 45 ($p = 0.014$; considering Bonferroni $p = 0.042$) and 60 days ($p = 0.022$; considering Bonferroni $p = 0.066$) nivolumab concentrations; finally, 60 days 25-hydroxyvitamin D < 20 ng/mL with 60 days nivolumab levels. Linear regression analyses were performed to understand which factors (clinical, demographic, pharmacological and biochemical) are able to affect nivolumab concentrations at 15, 45 and 60 days after starting therapy: at 15 days (Table 2), adenocarcinoma istotype and 25-

Table 1*Baseline characteristics of the studied population*

Characteristics		
n		45
Age (year), median [IQR]		73 [65-79.5]
Male sex, n (%)		31 (69)
BodyMass Index (Kg/m ²), median [IQR]		23.4 [20.1-26.4]
Caucasian, n (%)		45 (100)
non-small-cell lung cancer istotype, n (%)	Adenocarcinoma	34 (75.6)
	Squamous cell carcinoma	9 (20)
	Poorly differentiated carcinoma	1 (2.2)
	Large-cell neuroendocrine carcinoma	1 (2.2)
Concomitant drugs, n (%)	Cardiovascular	24 (53.3)
	Diabetes	4 (8.9)
	Opioids	9 (20)
	Protease inhibitors	20 (44.4)
	Corticosteroid	12 (26.7)
	Vitamin D	2 (4.4)
Pre-treatment drugs, n (%)	Cisplatine	24 (53.3)
	Docetaxel	10 (22.2)
	Carboplatine	24 (53.3)
	Gemcitabine	12 (26.7)
	Gefitinib	2 (4.4)
	Pemetrexed	30 (66.7)
	Afatinib	1(2.2)
	Osimertinib	1 (2.2)
	Erlotinib	20 (44.4)
	Vinorelbine	10 (22.2)
	Paclitaxel	3 (6.7)
	Bevacizumab	3 (6.7)
	Etoposide	4 (8.9)
	Zometa	1 (2.2)
	Bavacizumab	1 (2.2)
	Farletuzumab	1 (2.2)
Radiotherapy	1 (2.2)	

hydroxyvitamin D <20 ng/mL before starting therapy remained in the univariate analysis, whereas 25-hydroxyvitamin D <20 ng/mL before starting therapy in the multivariate analysis in a statistical significant manner. The BMI <25 Kg/m², age >50 years, gender, concomitant pump inhibitors and 25-hydroxyvitamin D <20 ng/mL at 15 days remained in the univariate analysis, while only gender was statistically significant retained in the multivariate analysis for the prediction of nivolumab at 45 days (Table 3).

Finally, nivolumab plasma levels at 60 days (Table 4) were predicted by gender, 25-hydroxyvitamin D <20 ng/mL before starting therapy, at 15 days and at 45 days in the univariate analysis, whereas only by 25-

hydroxyvitamin D <20 ng/mL at 15 days in the multivariate analysis with statistical significance.

DISCUSSION

The advent of the immunotherapy with immune-checkpoint inhibitors has modified the oncology world in different kind of cancers, but the lack of predictive biomarkers still remains a problem.

In this study, for the first time, factors able to predict nivolumab concentrations in plasma at 15, 45 and 60 days of treatment were suggested in NSCLC-affected patients.

Vitamin D is a fat-soluble steroid able to regulate the

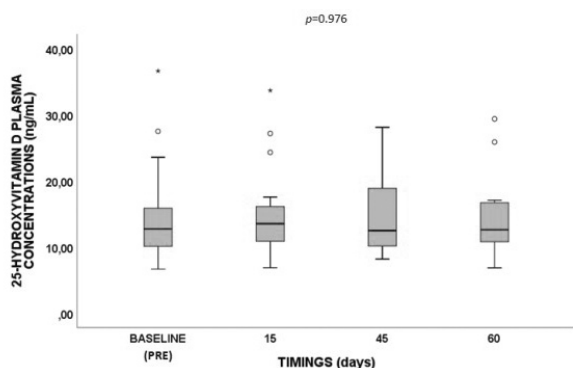


Figure 1
25-hydroxyvitamin D levels according to time

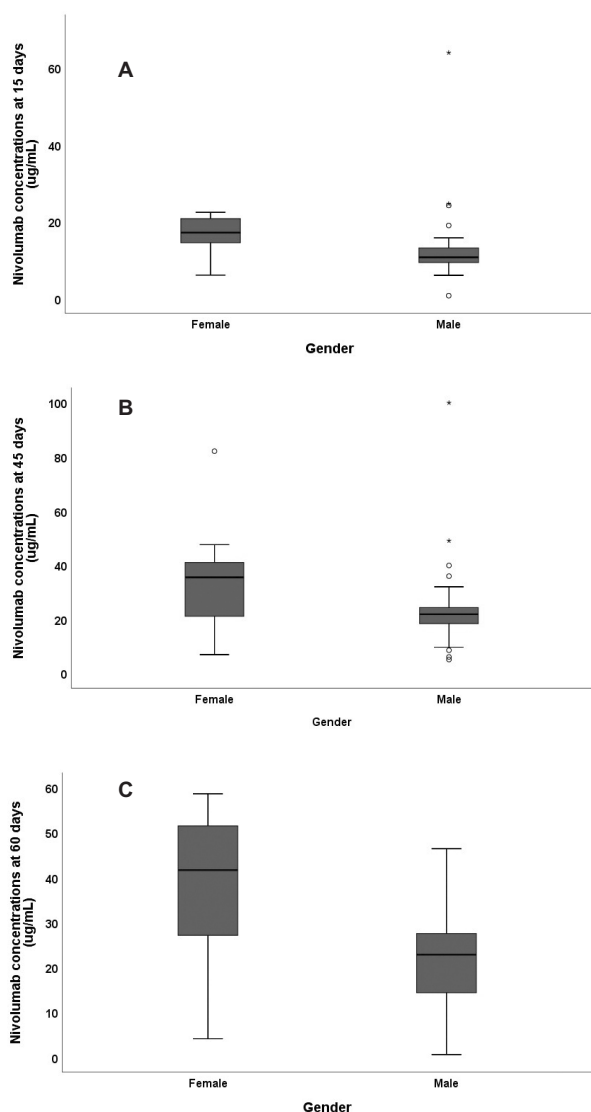


Figure 2
Gender influence on nivolumab exposure at 15 (panel A), 45 (panel B) and 60 (panel C) days.

immune system; for example, it is involved in T-cell differentiation and this seems to be the main link between vitamin D and the immunotherapy with the immune-checkpoint inhibitors, whose principal aim is the T-cell activation, as suggested by Bersanelli et al. (5). Actually, authors highlighted that calcitriol-VDR interaction results in T-cell differentiation and activation, leading to a response against infections or cancer, after antigen presentation. They concluded hypovitaminosis D is prevalent in advanced cancer, thus its supplementation before immunotherapy should be considered, since it could improve therapy responsiveness.

Vitamin D deficiency is frequent in lung cancer patient: Hoffer et al. (6) analyzed 91 patients and 85% had hypovitaminosis D; although a vitamin D load of 20 000 IU per day for 14 days was administered, it failed to achieve the target concentration in 44% of the patients. Consequently, authors concluded that probably, only a dose of 30 000 IU per day for 14 days could be useful for patients at high risk of hypovitaminosis D (6). Furthermore, Akiba et al. (7) performed a randomized, double-blind trial, comparing supplemented NSCLC affected-individuals with 1 200 IU/day with placebo administered ones: no significant differences were suggested in the total study; but considering only adenocarcinoma affected and low vitamin D level patients, supplementation was related to better 5-year relapse-free survival ($p=0.04$) and overall survival ($p=0.02$) compared to placebo group. In addition, they suggested genetic variants in vitamin D binding protein (VDBP, encoded by GC-globulin gene) and its receptor VDR encoding genes were associated with better prognosis (7). In a recent study, our group suggested that rs7041 in GC-globulin gene SNP, together with 25-hydroxyvitamin D levels lower than 10 ng/mL, were able to predict nivolumab concentrations $<18.7 \mu\text{g/mL}$ at 15 days of therapy (cut-off associated with progression, as reported by Feng et al.) (8, 9). Instead, concerning other pathologies, such as multiple sclerosis, in which a central role of vitamin D has been suggested in the pathogenesis, Agnello et al. showed that GC variants were able to affect 25-hydroxyvitamin D concentrations in multiple sclerosis affected individuals compared to control group; moreover they only found wild-type allele for gene *CYP27B1* analyzed variants (10).

Vitamin D synthesis starts in skin thanks to sunlight, with a small percentage coming from dietary intake; cholecalciferol is hydroxylated to calcifediol by cytochrome P-450 (CYP, 27A1, 2R1) in liver, then in kidney. Calcitriol, the active form, is synthesized through *CYP27B1* and transported in the bloodstream through VDBP.

Calcifediol inactivation to calcitric acid is performed by gene *CYP24A1*. Thus, summarizing, CYP genes are very important in the vitamin D signaling system, as the major active form and its subsequent metabolism are exclusively modulated by CYPs (11).

This is the first study showing which factors were able to

Table 2

Linear regression analyses: factors able to predict nivolumab concentrations at 15 days of therapy. Bold represents statistically significant values.

	NIVOLUMAB CONCENTRATIONS at 15 days			
	UNIVARIATE		MULTIVARIATE	
	p VALUE	B (95%CI)	p VALUE	B (95% CI)
BMI < 25 Kg/m ²	0.224	6.956 (-2.008 — 15.921)		
Age >50 years	0.667	1.894 (-3.829 — 7.618)		
Gender (male)	0.322	-2.991 (-9.009 — - 3.027)		
25-hydroxyvitamin D level < 20 ng/mL before starting therapy	0.088	-6.767 (-8.140 — 0.607)	0.017	-4.837 (-8.704 — -0.971)
Adenocarcinoma istotype	0.176	4.378 (-2.040 — 10.797)	0.176	4.391 (-2.075 — 10.857)
Squamous cell carcinoma istotype	0.390	-0.060 (-0.198 — 0.079)		
Concomitant pump inhibitor drug use	0.208	2.498 (-0.570 — 5.566)		
Cisplatin pre-treatment	0.323	0.313 (-0.318 — 0.943)		
Carboplatin pre-treatment	0.777	1.592 (-9.696 — 12.880)		
Pemetrexed pre-treatment	0.282	-3.714 (-9.235 — 1.807)		

95%CI, confidence interval at 95%.

Table 3

Linear regression analysis: factors able to predict nivolumab concentrations at 45 days of therapy. Bold represents statistically significant values.

	NIVOLUMAB CONCENTRATIONS at 45 days			
	UNIVARIATE		MULTIVARIATE	
	p VALUE	B (95%CI)	p VALUE	B (95% CI)
BMI < 25 Kg/m ²	0.078	1.027 (-0.121 — 2.176)	0.225	1.139 (-0.187 — 2.000)
Age >50 years	0.114	-12.272 (-27.607 — 3.063)	0.351	-11.548 (-26.543 — 1.951)
Gender (male)	0.097	-9.449 (-20.675 — 1.778)	0.007	-20.871 (-35.184 — -6.557)
25-hydroxyvitamin D level < 20 ng/mL at 15 days	0.174	-13.726 (-34.117 — 6.664)	0.486	-4.265 (-17.918 — 8.668)
Adenocarcinoma istotype	0.372	0.057 (-0.071 — 0.186)		
Squamous cell carcinoma istotype	0.495	-3.644 (-14.325 — 7.037)		
Concomitant pump inhibitor drug use	0.018	12.296 (22.417 — 2.176)	0.183	11.058 (21.389 — 1.985)
Cisplatin pre-treatment	0.278	0.045 (-0.021 — 0.112)		
Carboplatin pre-treatment	0.856	2.840 (-28.787 — 34.466)		
Pemetrexed pre-treatment	0.555	-3.220 (-14.133 — 7.694)		

95%CI, confidence interval at 95%.

Table 4

Linear regression analysis: factors able to predict nivolumab concentrations at 60 days of therapy. Bold represents statistically significant values.

	NIVOLUMAB CONCENTRATIONS at 45 days			
	UNIVARIATE		MULTIVARIATE	
	p VALUE	B (95%CI)	p VALUE	B (95% CI)
BMI < 25 Kg/m ²	0.236	13.047 (-8.959 — 35.053)		
Age >50 years	0.261	-0.423 (-1.021 — 0.175)		
Gender (male)	0.004	-14.946 (-24.682 — -5.210)	0.134	-10.515 (-20.154 — -0.878)
25-HYDROXYVITAMIN D level < 20 ng/mL before starting therapy	0.006	-16.748 (-28.372 — -5.124)	0.122	-9.488 (-21.680 — 2.704)
25-HYDROXYVITAMIN D level < 20 ng/mL at 15 days	0.003	-30.759 (-50.256 — -11.261)	< 0.001	-32.573 (-42.313 — -23.194)
25-HYDROXYVITAMIN D level < 20 ng/mL at 45 days	0.037	-18.612 (-36.014 — -1.209)	0.984	-15.663 (-36.184 — 5.184)
Adenocarcinoma istotype	0.631	-3.155 (-16.422 — 10.111)		
Squamous cell carcinoma istotype	0.925	-0.295 (-6.583 — 5.992)		
Concomitant pump inhibitor drug use	0.216	9.811 (-2.511 — 22.133)		
Cisplatin pre-treatment	0.295	0.113 (0.101 — 0.327)		
Carboplatin pre-treatment	0.213	6.783 (-4.107 — 17.673)		
Pemetrexed pre-treatment	0.592	-1.951 (-9.230 — 5.329)		

95%CI, confidence interval at 95%.

affect nivolumab levels at different timings: as shown by our data, this drug exposure was significantly influenced by vitamin D amount as well as by gender. For these reasons, these analyses might be recommended to evaluate nivolumab concentrations as well as factors, such as vitamin D levels and gender able to affect it, in order to reach a personalized medicine, avoiding treatment failure due to drug levels.

Limitations are the small sample size and only one analyzed cohort.

In future, larger studies are needed to clarify these aspects, also relating them to other information, such as clinical ones.

Acknowledgements

We thank CoQua Lab (www.coqualab.it) for its methodological support and assistance in the preparation and execution of the study and analysis.

The PD-L1 analysis was supported by a grant from Compagnia San Paolo (SC: 2017-0529).

CONFLICT OF INTEREST

CG received honoraria from Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Merck Sharp & Dohme, Roche; ER received honoraria from Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Roche; FG received honoraria from AMGEN, Astra Zeneca, Bristol-Myers Squibb, Boehringer Ingelheim, Celgene, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Pierre Fabre, Roche.

REFERENCES

1. F.a.D.A. (FDA). FDA grants nivolumab accelerated approval for third-line treatment of metastatic small cell lung cancer. 2015. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm617370.htm>. (ultimo accesso: aprile 2019).
2. S. Bristol-Meyers. OpdivoR_safety data sheet. 2018;7.2.
3. Tykodi SS, Schadendorf D, Cella D et al. Patient-reported outcomes with nivolumab in advanced solid cancers. *Cancer Treat Rev* 2018;70:75-87.
4. Bajaj G, Wang X, Agrawal S et al. Model-Based

- Population Pharmacokinetic Analysis of Nivolumab in Patients With Solid Tumors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2016;6:58-66.
5. Bersanelli M, Leonetti A, Buti S. The link between calcitriol and anticancer immunotherapy: vitamin D as the possible balance between inflammation and autoimmunity in the immune-checkpoint blockade. *Immunotherapy* 2017; 9:1127-31.
 6. Hoffer LJ, Robitaille L, Swinton N et al. Appropriate vitamin D loading regimen for patients with advanced lung cancer. *Nutr J* 2016;15:84.
 7. Akiba T, Morikawa T, Odaka M et al. Vitamin D Supplementation and survival of patients with non-small cell lung cancer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *clin cancer res* 2018;24:4089-97.
 8. Cusato J, Genova C, Tomasello C et al. Influence of Vitamin D in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *Cancers (Basel)* 2019. doi:10.3390/cancers11010125.
 9. Feng Y, Wang X, Bajaj G et al. Nivolumab exposure-response analyses of efficacy and safety in previously treated squamous or nonsquamous non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:5394-405.
 10. Agnello L, Scazzone C, Lo Sasso B et al. VDBP, CYP27B1, and 25-Hydroxyvitamin D gene polymorphism analyses in a group of sicilian multiple sclerosis patients. *Biochem Genet* 2016;55:183-92.
 11. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta* 2010;1814:186-99.

Pazienti diabetici di tipo 2, non in terapia insulinica e albumina glicata: una valutazione multidimensionale

Lucrezia Ferrario¹, Fabrizio Schettini¹, Emanuela Foglia¹, Angelo Avogaro², Chiara Bellia³, Federico Bertuzzi⁴, Graziella Bonetti⁵, Antonio Ceriello⁶, Marcello Ciaccio^{3,7}, Massimiliano Corsi Romanelli^{8,9}, Elena Dozio⁹, Luca Falqui¹⁰, Angela Girelli¹¹, Antonio Nicolucci¹², Gianluca Perseghin^{13,14}, Mario Plebani¹⁵, Umberto Valentini¹¹, Martina Zaninotto¹⁵, Davide Croce^{1,16}

¹Centro sull'Economia e il Management nella Sanità e nel Sociale, Università Carlo Cattaneo - LIUC, Castellanza, Varese

²Dipartimento di Medicina, Azienda Ospedaliera di Padova, Università degli Studi di Padova

³Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi di Palermo

⁴Unità di Diabetologia, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

⁵Laboratorio Centrale Analisi Chimico Cliniche, ASST Spedali Civili, Brescia

⁶Dipartimento di Malattie Cardiovascolari e Metaboliche, IRCCS MultiMedica, Sesto San Giovanni, Milano

⁷Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria, Palermo

⁸Struttura Complessa Laboratorio di Patologia Clinica, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato, Milano

⁹Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano

¹⁰Dipartimento di Medicina, Diabete ed Endocrinologia, IRCCS Multimedica, Sesto San Giovanni, Milano

¹¹Medicina ad indirizzo Metabolico e Diabetologico, Dipartimento della Cronicità, A.S.S.T. Spedali Civili di Brescia

¹²Center for Outcomes Research and Clinical Epidemiology (CORERESEARCH), Pescara

¹³Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano Bicocca, Milano

¹⁴Dipartimento di Medicina e Riabilitazione, Unità di Medicina Metabolica, Policlinico di Monza

¹⁵Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera- Università degli Studi Padova

¹⁶Scuola di Public Health, Facoltà di Scienze della Salute, Università di Witwatersrand, Johannesburg, Sudafrica

ABSTRACT

Insuline-Naive type 2 diabetic patients: a multidimensional evaluation on the role of glycated albumin
Introduction: glycated Albumin (GA) is an innovative glycemic marker, that could be used in the clinical practice, as an add-on strategy, to the traditional glycemic monitoring systems, such as glycated haemoglobin (Hb1Ac) and fasting plasma glucose (FPG). The study aims at presenting the results of a multidimensional analysis conducted in Italy, exploring the main clinical, economic, ethical, social and organizational implications, related to the introduction of GA. Methods: an Health Technology Assessment (HTA) approach was implemented. The analysis considered the Italian National Healthcare Service (NHS) perspective, and assumed a 12-month time horizon, focusing on type 2 diabetes patients insulin-naïve, assuming oral therapy. The 9 HTA dimensions (derived from the Core Model developed by the European Network of HTA – EUnetHTA) were deployed, considering scientific evidence, health economics tools and qualitative approaches, through the administration of specific questionnaires to 15 diabetes experts. Results: literature reported better GA safety and efficacy profiles, thus being a predictor of the relative risk for diabetes complications development, and increasing the therapeutic success after 3 months of therapy (97.0% *versus* 71.6%). From an economic point of view, GA introduction resulted in an economic advantage of 1.06% and in a better trade-off between costs sustained and efficacy gained. Considering a 7-item Likert Scale (ranging from -3 to +3), negative perceptions emerged with regard to equity aspects (0.13 *versus* 0.72) due to GA limited accessibility, whereas it would improve both patients (2.17 *versus* 1.33) and care givers (1.50 *versus* 0.83) quality of life. In the short term, GA required training courses and equipment update, whereas, in the long term, it could be considered the preferable solution from an organizational perspective (0.30 *versus* 0.01). Conclusions: the results of this study demonstrated GA strategic relevance, its economic sustainability and feasibility, as well as the potential clinical pathway improvement.

Corrispondenza a: Emanuela Foglia, Corso Matteotti 22, 21053 Castellanza (VA), Tel +39 033 1572516, E-mail efoglia@liuc.it

Ricevuto: 01.03.2019

Revisionato: 02.04.2019

Accettato: 17.05.2019

Pubblicato on-line: 26.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.049

INTRODUZIONE

Il diabete è una delle più grandi emergenze sanitarie del ventunesimo secolo, tanto che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che, a livello mondiale, l'alto livello di glucosio nel sangue rappresenti il terzo fattore di rischio per mortalità prematura (1). Sotto un profilo esclusivamente epidemiologico, focalizzando l'attenzione all'interno dello specifico contesto del diabete di tipo 2, si riscontra, in Europa, un tasso di prevalenza pari al 9,1%, rappresentativo di circa 60 milioni di soggetti con patologia metabolica (2).

L'obiettivo primario, nel prendere in carico le persone con diabete di tipo 2, risulta essere il raggiungimento di un controllo glicemico adeguato, con il mantenimento del valore di emoglobina glicata (HbA1c) <53 mmol/mol (7%). Tradizionalmente, il controllo della glicemia viene effettuato mediante prelievi eseguiti a digiuno e a distanza dai pasti, nonché con la misurazione della concentrazione plasmatica di molecole glicate. Fra tali molecole quella di gran lunga più utilizzata è HbA1c, che rappresenta il *gold standard* di riferimento all'interno di questo specifico contesto (3). Ma sebbene questi marcatori forniscano informazioni utili, si sono dimostrati inadeguati in determinate condizioni cliniche: in alcune specifiche sub-popolazioni, l'attendibilità dell'HbA1c quale biomarcatore del controllo glicemico può essere ridotta dalle situazioni che modificano la vita media delle emazie, solitamente pari a 120 giorni (4-6).

A fronte di tale difficoltà, è cresciuto l'interesse della comunità clinica e scientifica nei confronti di un diverso biomarcatore, quale l'albumina glicata (GA), da utilizzarsi all'interno del contesto di *screening* e di monitoraggio del diabete di tipo 2, divenendo quindi un potenziale strumento a breve termine (2-4 settimane) del controllo glicemico (7-8), in grado di aggiungere ulteriori informazioni, rispetto a quelle fornite da HbA1c.

Con l'invecchiamento della popolazione, in una logica di aumentata incidenza e prevalenza del diabete (9-10), nonché visti i costi correlati al percorso diagnostico e terapeutico dei pazienti nel medio e lungo periodo, è indispensabile implementare tutti i meccanismi che possano ottimizzare la presa in carico del paziente, per renderla il più fruibile possibile, sia dal punto di vista del paziente, sia soprattutto dal punto di vista clinico. In un contesto, poi, di limitate risorse a disposizione, diviene importante ricercare e trovare un punto di equilibrio tra il perseguimento dell'appropriatezza in ogni fase della patologia, e la verifica del percorso di presa in carico, così da migliorare la qualità e l'efficacia del trattamento delle persone con diabete, ma valutando non solo questi aspetti, bensì tutte le dimensioni che possano influenzare la scelta dei decisori di spesa.

Alla luce di queste premesse, diviene importante valutare le potenziali implicazioni correlate all'introduzione della misura del nuovo parametro (GA), in aggiunta agli strumenti tradizionalmente utilizzati (quali HbA1c e FPG – *Fasting Plasma Glucose*), a livello di efficienza clinica ed economica, ambito di sicurezza,

impatti organizzativi correlati alla struttura sanitaria, accessibilità della tecnologia all'interno del sistema, analizzando inoltre l'impatto per i pazienti fragili e per il loro nucleo familiare (11). Ciò può supportare, inoltre, l'attivazione di politiche di pianificazione e programmazione sanitaria che ottimizzino il percorso del paziente e l'utilizzo delle risorse sanitarie a disposizione.

METODI

Ipotesi di fondo della valutazione proposta è che, giacché GA risulterebbe in aggiunta rispetto agli strumenti di monitoraggio tradizionalmente utilizzati, e non in sostituzione, la sua introduzione in pratica clinica potrebbe generare un maggior costo da parte del Sistema Sanitario Nazionale (SSN), a fronte, però, di un incremento dell'efficacia clinica.

Ai fini del raggiungimento dell'obiettivo sopra illustrato, la metodologia utilizzata risulta essere l'*Health Technology Assessment* (HTA), valutando, in chiave comparativa, le seguenti 9 dimensioni di indagine, derivanti dal *Core Model* sviluppato dall'*European Network of Health Technology Assessment* (EUnetHTA) (12):

- rilevanza generale della patologia (definizione del bacino di utenza potenzialmente affetto e quindi trattabile con le tecnologie oggetto di indagine);
- rilevanza tecnica dei biomarcatori oggetto di indagine (descrizione dei biomarcatori tradizionalmente utilizzati per il monitoraggio della glicemia, unitamente o meno a GA);
- sicurezza (eventuali conseguenze dell'utilizzo dei biomarcatori tradizionalmente utilizzati per il monitoraggio della glicemia, unitamente o meno a GA in termini di sviluppo di complicanze e/o eventi avversi sul paziente);
- efficacia (definizione dell'efficacia dei biomarcatori glicemici tradizionali in aggiunta o meno a GA, misurata come percentuale di pazienti che raggiungono un successo terapeutico a 3 mesi dall'inizio della terapia);
- impatto economico-finanziario (come definizione del reale assorbimento di risorse economiche, correlato al trattamento di tali pazienti diabetici, nonché verifica della sostenibilità dell'introduzione del nuovo marcatore glicemico GA);
- impatto sociale ed etico (in termini di valutazione del punto di vista del paziente, analizzando soddisfazione e qualità di vita del soggetto diabetico);
- impatto di equità (analisi dell'accessibilità dei biomarcatori glicemici in esame, in termini di possibilità di prendere in carico un maggiore numero di pazienti con tale bisogno di salute);
- impatto legale (identificazione delle normative, alle quali i biomarcatori glicemici indagati dovrebbero attenersi);
- impatto organizzativo (analisi delle implicazioni organizzative correlate all'introduzione di GA, all'interno dello specifico contesto locale di riferimento, considerando sia un orizzonte temporale di 12 mesi sia un

orizzonte temporale di 36 mesi).

Nello specifico è stato comparato uno scenario denominato *AS IS* (all'interno del quale il monitoraggio della glicemia viene effettuato con i tradizionali strumenti, quali HbA1c, e FPG), con uno scenario denominato *TO BE* (scenario che prevede l'introduzione di GA, in aggiunta ai parametri tradizionali).

La valutazione di HTA ha assunto il punto di vista del SSN e ha considerato un orizzonte temporale di 12 mesi, implementando i seguenti tre differenti approcci metodologici.

Analisi sistematica della letteratura

L'analisi della letteratura è stata condotta al fine di comprendere lo stato dell'arte in riferimento agli indicatori di efficacia e di sicurezza, e per identificare la popolazione che poteva giovare dell'utilizzo delle alternative tecnologiche prese in considerazione.

La revisione della letteratura è stata condotta considerando inizialmente l'acronimo PICO [P (paziente): pazienti affetti da diabete di tipo 2, non in terapia insulinica; I (intervento): misura di GA in aggiunta ai tradizionali strumenti utilizzati dal clinico per il monitoraggio della terapia (FPG + glicemia postprandiale + profilo glicemico, giornaliero oppure settimanale + HbA1c + GA); C (confronto): tradizionali strumenti utilizzati dal clinico per il monitoraggio della terapia (FPG + glicemia postprandiale + profilo glicemico, giornaliero oppure settimanale + HbA1c); O (*outcome*): successo della terapia orale nel mantenimento del controllo metabolico].

I criteri di inclusione degli studi sono stati:

- numero di pazienti e numero di campioni nello studio (>20);
- l'*impact-factor* della rivista (>1);
- chiarezza del disegno dello studio.

Dopo la definizione delle evidenze rispondenti al succitato PICO e ai relativi criteri di inclusione, si è proceduto alla valutazione della qualità e della bontà degli studi inclusi, mediante lo strumento CASP (*Critical Appraisal Skills Programme*).

Strumenti di economia sanitaria

Tali strumenti sono utili per l'effettuazione di valutazioni economiche e analisi di impatto sulla spesa, così da definire la sostenibilità economica di GA. Nello specifico, è stato dapprima valorizzato economicamente il percorso della persona con diabete di tipo 2, correlato al monitoraggio della glicemia, stratificando il valore economico sulla base dell'eventuale modifica di terapia di cui hanno avuto esperienza i pazienti affetti da diabete di tipo 2 (13): in tal senso, all'interno della sezione "Risultati", i pazienti sono stati categorizzati in *si switch* (ossia pazienti che hanno modificato il proprio trattamento nel corso dei 12 mesi) o *no switch* (ossia pazienti che non hanno modificato il trattamento prescritto nel corso dei 12 mesi). Per ogni paziente, sia nello scenario *AS IS* sia nello scenario *TO BE*, sono stati

reperiti i costi diretti sanitari, in termini di: visite specialistiche diabetologiche, altre visite specialistiche, esami di laboratorio, eventuali procedure diagnostiche, eventuali ospedalizzazioni e automonitoraggio della glicemia.

È stata inoltre implementata un'analisi di impatto sulla spesa (14-15), utile per la stima delle conseguenze finanziarie correlate all'adozione e alla diffusione di GA all'interno del contesto nazionale di riferimento, sempre comparando i due scenari sopra proposti.

Questionari qualitativi

Tali questionari sono utili per indagare il punto di vista del paziente, nonché l'impatto organizzativo e legale, e sono stati compilati da 15 esperti del settore (5 esperti di laboratorio, 1 epidemiologo, 5 specialisti in diabetologia, 2 direzioni strategiche, 2 pazienti). Nello specifico, tali professionisti hanno graduato la loro percezione in riferimento ai marcatori glicemici oggetto di esame, nonché alle dimensioni di valutazione, sulla base di una scala Likert a 7 livelli, variabile da un minimo di -3 a un massimo di +3 (16). A tale riguardo, è opportuno specificare come i valori negativi siano correlati a un maggiore sforzo per l'organizzazione e/o per il sistema complessivamente inteso, mentre i valori positivi rappresentano una sorta di "liberazione di risorse", e quindi un vantaggio per il sistema.

RISULTATI

Analisi sistematica della letteratura

Con la definizione del succitato PICO di indagine, è stata effettuata una revisione della letteratura scientifica disponibile, circa l'utilizzo di GA, usufruendo delle principali banche dati (*Medline/Pubmed, Embase e Cochrane Database*), che ha portato al reperimento di 612 articoli riferiti in linea generale all'implementazione di GA. Sono stati quindi selezionati i 50 articoli più rappresentativi per il *setting* di pazienti correlati alla condizione del controllo glicemico, nello specifico contesto di pazienti affetti da diabete di tipo 2, che assumono ipoglicemizzanti orali e che sono *naïve* al trattamento con insulina. Di questi 50 articoli, sono stati selezionati 5 lavori scientifici (8;17-20), a cui si aggiunge una revisione (21), rispondenti ai criteri di inclusione sopra menzionati. La valutazione sulla qualità delle evidenze, ha dimostrato la bontà della letteratura disponibile sulla tematica, con il raggiungimento di risultati soddisfacenti che possono essere generalizzabili e applicabili anche all'interno del contesto italiano, con delle conseguenze positive in pratica clinica.

Come illustrato nella sezione precedente, le evidenze scientifiche sono state utilizzate per il reperimento del profilo di efficacia e di sicurezza, correlati ai due scenari indagati.

Da un punto di vista di efficacia, si riscontra come l'introduzione di GA potrebbe incrementare significativamente il numero di pazienti che raggiungono

un successo terapeutico a 3 mesi (97% *versus* 72%, $p < 0,05$) (18). Anche per la dimensione sicurezza, da un punto di vista *evidence-based*, sussistono dei vantaggi in riferimento all'aggiunta di GA, al percorso tradizionale costituito da HbA1c. GA risulta migliorare la predittività del rischio di sviluppo di complicanze, rispetto alla valutazione del paziente con il percorso *standard*, fondato su un singolo marcatore, per quello che concerne sia il rischio di sviluppo di retinopatia diabetica, sia di nefropatia (22-23). Rispetto a HbA1c, GA appare inoltre più strettamente correlata ai picchi glicemici ed è perciò considerata un miglior indice di rischio micro e macro-vascolare (22-24).

Valutazione economica e finanziaria

Prima della definizione del costo del percorso, è stata ben delineata la popolazione che potrebbe fruire della nuova tecnologia, costituita dai soli soggetti con diagnosi di diabete di tipo 2, ma non in terapia insulinica. La prevalenza del diabete in Italia è del 5,3% (25), ma se si considera esclusivamente la popolazione adulta con età compresa tra i 20 e i 79 anni, questa stima aumenta fino al 7,9% (2). Se si considerano poi, tra questi, i soli pazienti che assumono ipoglicemizzanti orali e non terapia insulinica, il numero di pazienti si riduce ulteriormente al 61% della popolazione che complessivamente ha ricevuto diagnosi di diabete (26), percentuale che potrebbe essere ancora più significativa, considerando il numero di pazienti che vengono seguiti dal proprio medico curante. A fronte di quanto sopra esposto, partendo dalla popolazione residente in Italia nel 2018, e da una prevalenza del diabete pari al 5,3% (25), il numero di soggetti affetti da diabete di tipo 2 ammonta a 3 205 651, dei quali almeno 1 955 447 trattati con soli ipoglicemizzanti orali, potenzialmente utilizzatori del nuovo biomarcatore glicemico.

La valorizzazione economica del paziente viene mostrata all'interno della tabella 1.

Si specifica come per la valorizzazione del costo del percorso *TO BE* si siano considerati, rispetto al *AS IS*, le seguenti prestazioni aggiuntive: numero di determinazioni di GA pari al numero di determinazioni HbA1C per quanto concerne i pazienti che non hanno modificato linea di trattamento; e una determinazione aggiuntiva di GA per quanto concerne i pazienti che hanno modificato linea di trattamento. Sulla base, della valorizzazione economica dei percorsi nonché dell'occorrenza di eventuali modifiche della terapia, assumendo il punto di vista del SSN e sulla scorta della popolazione nazionale potenzialmente trattabile, si è dimostrato come il SSN possa beneficiare di un vantaggio economico, correlato all'adozione di GA, pari all'1,06% (€ 4 835 985,54), a fronte della presenza di un minore numero di pazienti che, nel correlato percorso di cura, abbiano vissuto esperienza di modifica di linea terapeutica (-89%), all'interno di un orizzonte temporale di 12 mesi (Tabella 2).

Dimensioni di equità etica, sociale, legale e organizzativa

Da un punto di vista qualitativo (Tabella 3), sulla base di una scala di valutazione, per singola variabile di indagine, compreso da un minimo di -3 a un massimo di +3, indagando l'opinione degli esperti, l'utilizzo di strumenti tradizionali risulta più vantaggioso in termini di equità (0,72 *versus* 0,13, come media dei giudizi), probabilmente perché GA è potenzialmente disponibile sul territorio, al momento attuale ma non diffusamente utilizzata, limitando, quindi, a tutti gli effetti l'accessibilità alle cure. Dall'altro lato, focalizzando l'attenzione sul punto di vista del paziente, GA migliorerebbe la qualità di vita sia dei pazienti (1,33 *versus* 2,17) sia del nucleo familiare (0,83 *versus* 1,50), poiché correlata a migliore monitoraggio della glicemia e a minore rischio di complicanze. Da un punto di vista legale, si riscontra come, essendo GA un esame non ancora diffusamente disponibile nella pratica clinica, saranno necessari degli sforzi aggiuntivi per quello che concerne la regolamentazione dell'utilizzo di tale procedura. Inoltre, viene riportato come il manuale d'uso di GA è da considerarsi esaustivo e completo: oltre ai benefici relativamente al nuovo biomarcatore, sono inserite delle specifiche per quello che concerne preparazione, conservazione e stabilità dei reagenti; procedura; raccolta e preparazione dei campioni; calibrazione; controllo di qualità; intervalli di riferimento e limitazioni, oltre a informazioni dettagliate sulle eventuali interferenze esistenti. È da segnalare, inoltre, come GA abbia ricevuto la marcatura CE, nel Dicembre 2015, su sistemi ILab, e nel Dicembre 2016 sugli altri sistemi. Inoltre, ha ricevuto approvazione FDA nell'Ottobre 2017.

È doveroso specificare come, all'interno della Tabella 3, siano stati riportati in corsivo le voci peggiorative nei confronti del nuovo pannello tecnologico (Strumenti tradizionali + GA), rispetto allo *standard* (Strumenti Tradizionali).

In termini organizzativi (Tabella 4), nel breve periodo (12 mesi), la misura di GA richiederebbe attività di formazione integrative, con la necessità di investire in risorse, per adempiere a tale attività (-0,80 *versus* 0,10), oltre all'esigenza di un settaggio delle apparecchiature esistenti (0,50 *versus* 0,00), mentre nel lungo termine, l'introduzione di GA potrebbe portare a un miglioramento dell'impatto organizzativo, oltre che a un miglioramento nel percorso del paziente (2,30 *versus* 0,20). Anche in questo caso, è doveroso specificare come, all'interno della Tabella 4, siano stati riportati in corsivo le voci peggiorative nei confronti del nuovo insieme di biomarcatori, rispetto al pannello di strumenti tradizionalmente utilizzati.

DISCUSSIONE

La valutazione multidimensionale presentata ha dimostrato come l'aggiunta dell'esame GA ai tradizionali strumenti di monitoraggio della glicemia, possa essere un'alternativa valida e, addirittura, preferibile all'interno

dello specifico contesto di riferimento, se disponibile nel territorio e se ben comunicata alla cittadinanza, rispetto ai potenziali benefici, qualora la struttura di riferimento sia in grado di proporla ai pazienti che devono affrontare

questo problema di salute.

Le evidenze scientifiche reperite sulla tematica (27), unitamente alle percezioni dei professionisti coinvolti, mostrano come tale parametro abbia una propria dignità

Tabella 1

Valorizzazione economica del percorso del paziente

Percorso AS IS	Valorizzazione paziente che non ha modificato trattamento nei 12 mesi		Valorizzazione paziente che ha modificato trattamento nei 12 mesi	
	Valorizzazione	Impatto %	Valorizzazione	Impatto %
Esami	€ 68,67	31,89%	€ 74,08	26,66%
Totale visite	€ 55,99	26,00%	€ 68,59	24,68%
Totale procedure	€ 18,66	8,67%	€ 20,01	7,20%
Totale automonitoraggio	€ 72,00	33,44%	€ 115,20	41,46%
Totale gestione medica paziente	€ 215,31	100,00%	€ 277,88	100,00%
Costo medio ponderato	€ 233,08 *			
Percorso TO BE	Valorizzazione paziente che non ha modificato trattamento nei 12 mesi		Valorizzazione paziente che ha modificato trattamento nei 12 mesi	
	Valorizzazione	Impatto %	Valorizzazione	Impatto %
Esami	€ 79,92	35,27%	€ 96,70	32,18%
Totale visite	€ 55,99	24,71%	€ 68,59	22,83%
Totale procedure	€ 18,66	8,24%	€ 20,01	6,66%
Totale automonitoraggio	€ 72,00	31,78%	€ 115,20	38,34%
Totale gestione medica paziente	€ 226,56	100,00%	€ 300,50	100,00%
Costo medio ponderato	€ 230,61**			

* *calcolato come costo medio ponderato dei pazienti che hanno modificato trattamento (28%) o che non hanno modificato trattamento (72%), nel corso dei 12 mesi, come da dati di letteratura [Shima et al. (8)] inteso come pazienti che hanno raggiunto un successo terapeutico a 3 mesi dall'inizio della terapia.*

Tabella 2

Analisi di impatto sulla spesa del sistema, nel corso di 12 mesi

Scenario basale	Popolazione	Costo
Nessuna modifica di trattamento nei 12 mesi (no switch)	1 400 100	€ 301.457.308,22
Modifica di trattamento nei 12 mesi (si switch)	555 347	€ 154.321.073,18
Totale scenario basale		€ 455.778.381,40
Scenario innovativo	Popolazione	Costo
Nessuna modifica di trattamento nei 12 mesi (no switch)	1 896 783	€ 433.313.949,72
Modifica di trattamento nei 12 mesi (si switch)	58 663	€ 17.628.446,14
Totale scenario innovativo		€ 331.146.644,54
Scostamento	-496 683	-€ 4.835.985,54
Scostamento (%)	-89,44%	-1,06%

Tabella 3*Analisi qualitativa della dimensione di equità, etica e sociale, e legale*

Impatto sull'equità	Strumenti Tradizionali	Strumenti Tradizionali + GA
Accessibilità della tecnologia sul territorio	1,83	-0,42
Accessibilità della tecnologia alle categorie protette	1,75	-0,58
Potenziale impatto della tecnologia sulle liste di attesa	0,08	0,33
Capacità della tecnologia di generare fenomeni di migrazione sanitaria	0,75	1,17
Esistenza di fattori che potrebbero impedire a un gruppo o a determinate persone di beneficiare della tecnologia	0,67	1,33
La differente disponibilità del paziente può avere un impatto sull'accessibilità alle tecnologia	0,08	-1,00
Equità o iniquità della tecnologia	0,58	0,17
Le convinzioni culturali, morali o religiose possono modificare l'accessibilità alla tecnologia	0,00	0,00
Media	0,72	0,13
Impatto sociale ed etico	Strumenti Tradizionali	Strumenti Tradizionali + GA
Capacità della tecnologia di salvaguardare l'autonomia del paziente	1,33	1,75
Nell'utilizzo della tecnologia vengono salvaguardati i diritti umani	1,58	1,58
Capacità della tecnologia di salvaguardare l'integrità umana	1,42	1,42
Capacità della tecnologia di assicurare la dignità umana	1,33	1,33
L'utilizzo della tecnologia garantisce i valori sociali e la disponibilità a pagare del paziente	0,83	0,00
Capacità della tecnologia di salvaguardare credo e convinzioni religiose	0,75	0,75
Impatto della tecnologia sui costi sociali	0,67	0,50
I pazienti e la cittadinanza possono avere un buon livello di comprensione della tecnologia	1,08	1,00
Impatto della tecnologia sulla qualità di vita del paziente	1,33	2,17
Impatto della tecnologia sulla qualità di vita del nucleo familiare	0,83	1,50
Media	1,12	1,20
Impatto legale	Strumenti Tradizionali	Strumenti Tradizionali + GA
Livello di autorizzazione della tecnologia	0,80	0,10
Necessità di inserimento della tecnologia in registro nazionale ed europeo	0,00	0,00
Soddisfamento dei requisiti richiesti	1,80	1,70
Garanzie di produzione	1,80	1,80
Assoggettamento al controllo del prezzo	0,90	-0,20
Infrazione dei diritti di proprietà intellettuale	0,00	0,10
Necessità di regolamentare l'acquisizione della tecnologia	0,20	-0,60
La legislazione copre la regolamentazione della tecnologia per tutte le categorie di pazienti	0,50	-0,60
Media	0,75	0,29

In corsivo le voci peggiorative nei confronti del nuovo pannello tecnologico rispetto allo standard.

Tabella 4*Analisi organizzativa a breve e lungo termine*

Impatto organizzativo	Breve periodo (12 mesi)		Lungo periodo (36 mesi)	
	Strumenti Tradizionali	Strumenti Tradizionali + GA	Strumenti Tradizionali	Strumenti Tradizionali + GA
Necessità di personale aggiuntivo	-0,20	-0,20	0,00	0,00
Necessità di formazione dedicata al personale responsabile della procedura	0,10	0,80	0,00	0,20
Formazione da parte degli operatori erogata ai pazienti e al nucleo familiare	-0,10	-0,70	-0,20	-0,20
Riunioni necessarie per la gestione della specifica alternativa tecnologica	-0,10	-0,80	0,00	0,00
Tempi e curva di apprendimento	0,10	0,20	0,00	-0,10
Nuovi spazi necessari	0,00	0,00	0,00	0,00
Nuovi arredi necessari	0,00	0,00	0,00	0,00
Nuovi macchinari necessari	0,00	-0,20	0,00	0,00
Aggiornamento dei macchinari	0,00	-0,50	0,00	-0,10
Acquisto di attrezzature	-0,10	-0,50	0,00	-0,10
Impatto della tecnologia sui processi interni all'U.O	0,00	-0,50	0,10	0,90
Impatto della tecnologia sui processi di acquisto dell'Azienda	-0,10	-0,90	0,00	-0,10
Impatto della tecnologia sui processi di collegamenti tra UU.OO	0,10	0,20	0,10	1,40
Impatto della tecnologia su PDT/PDTA	0,10	0,90	0,20	2,30
Media	-0,01	-0,27	0,01	0,30

In corsivo le voci peggiorative nei confronti del nuovo pannello tecnologico rispetto allo standard.

di utilizzo, sia sotto un profilo di efficacia, sia sotto un profilo di sicurezza. Da un lato, infatti, l'implementazione di GA permetterebbe di incrementare il numero di pazienti che raggiungono un successo terapeutico già a tre mesi, con una diminuzione di soggetti che necessitano di un cambio di terapia (18), con conseguenti vantaggi anche da un punto di vista economico in termini di risorse finanziarie assorbite per la corretta e adeguata gestione del paziente. Dall'altro, GA potrebbe ridurre il rischio relativo di sviluppare complicanze del diabete, proprio grazie alla natura specifica del biomarcatore che permette di fornire un risultato attendibile nel breve termine (22-23; 28-30), con un conseguente impatto positivo, anche in termini di miglioramento della qualità di vita dei pazienti e del nucleo familiare.

Ovviamente tali considerazioni si ripercuotono sotto un profilo di accessibilità: per quanto attualmente GA non sia disponibile capillarmente sul territorio, si ricorda come rappresenti una misura molto utile e preferibile in alcune popolazioni, per le quali l'attendibilità di HbA1c quale biomarcatore di controllo glicemico può essere

ridotta da condizioni che modificano la vita media delle emazie (4-6), incrementando l'accessibilità alle cure per quei pazienti che non trovano in HbA1c una adeguata risposta al proprio bisogno di salute.

Sotto un profilo esclusivamente economico e organizzativo, si riscontra come marginali siano gli investimenti aggiuntivi che una struttura sanitaria dovrebbe realizzare per l'acquisizione dell'esame esclusivamente situati all'interno della formazione del personale che deve saper utilizzare e interpretare il risultato del marcatore. È evidente come l'investimento per l'introduzione di GA possa essere assorbito già nel primo anno dalla sua introduzione, portando anche un vantaggio, legato al processo di ottimizzazione del percorso del paziente diabetico non in terapia insulinica. A tale proposito, infatti, si avrebbe la possibilità di valutare gli effetti della terapia ipoglicemizzante in maniera più efficace e precoce, anticipando di fatto l'identificazione del miglior regime terapeutico a garanzia del corretto controllo glicemico. Questo fattore è strettamente correlato sia a una riduzione degli accessi in Pronto Soccorso sia a una riduzione delle

ospedalizzazioni associate a scompenso cardiaco o a eventi cardio-cerebrovascolari, più in generale. L'introduzione di GA nella pratica clinica risulta essere in linea con le raccomandazioni promulgate dalla *International Diabetes Federation* e raccolte nella Dichiarazione di Berlino, dove gli operatori sanitari, politici ed economici sono stati richiamati e invitati ad adottare misure che portino alla precoce diagnosi, precoce controllo glicemico e precoce accesso alle cure corrette (31).

In conclusione, i risultati hanno dimostrato la rilevanza di GA, la sua sostenibilità economica e il potenziale di miglioramento del percorso diagnostico e terapeutico del paziente. Il valore finale positivo nei confronti del nuovo biomarcatore prende le mosse da tutte queste considerazioni, e anche dal fatto che sono stati coinvolti nel percorso di valutazione esperti, professionisti e protagonisti del percorso diagnostico e terapeutico del paziente.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- World Health Organization. (2018). Diabetes. Disponibile online su: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (ultimo accesso: gennaio 2019).
- International Diabetes Federation (2017). IDF Diabetes Atlas. 8th Edition. Disponibile online su: <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html> (ultimo accesso: gennaio 2019).
- Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:S106-8.
- Gram-Hansen P1, Eriksen J, Mourits-Andersen T, Olesen L. Glycosylated haemoglobin (HbA1c) in iron- and vitamin B12 deficiency. *J Intern Med* 1990;227:133-6.
- Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol* 2004;112:126-8.
- Church D, Simmons D. More evidence of the problems of using HbA1c for diagnosing diabetes? The known knowns, the known unknowns and the unknown unknowns. *J Intern Med* 2014;276:171-3.
- Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:5509-14.
- Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control. *Diabetes Investig* 2011;2:304-9.
- Garavaglia E., Marceletti F. Le età al lavoro. La gestione dell'age-diversity analizzando i processi di invecchiamento nelle organizzazioni. *Sociologia del lavoro* 2014;134:116-33.
- Mazza S., Capacci G, L'invecchiamento della popolazione italiana: effetti e politica sociale. *Quaderno n.05/2006*.
- Drummond MF, Schwartz JS, Jönsson B, et al. Key principles for the improved conduct of health technology assessments for resource allocation decisions. *Int J Technol Assess Health Care* 2008;24:244-58.
- EUnetHTA Joint Action 2, Work Package 8. HTA Core Model © version 3.0 (2016). Disponibile on-line: <https://www.eunethta.eu/wp> (ultimo accesso: gennaio 2019).
- Vagnoni E, Potena G, L'activity based costing in sanità: il caso dell'ossigeno-terapia. *Mecosan*, 2003;47:149-61.
- Mauskopf JA, SullivanSD, Annemans L, et al., Principles of good practice for budget impact analysis: report of the ISPOR Task Force on good research practices--budget impact analysis. *Value Health* 2007;10:336-47.
- SullivanSD, Mauskopf JA, Augustovski F, et al. Budget impact analysis-principles of good practice: report of the ISPOR 2012 Budget Impact Analysis Good Practice II Task Force. *Value Health* 2014;17:5-14.
- Mitton C, Dionne F, Damji R, et al. Difficult decisions in times of constraint: criteria based resource allocation in the Vancouver Coastal Health Authority. *BMC Health Serv Res*. 2011;14:169.
- Won HK, Kim KJ, Lee BW, et al. Reduction in glycated albumin can predict change in hba1c: Comparison of oral hypoglycaemic agent and insulin treatments. *Diabet Med* 2012;29:74-9.
- Shima K, Komatsu M, Noma Y, Miya K. Glycated albumin (ga) is more advantageous than hemoglobin a1c for evaluating the efficacy of sitagliptin in achieving glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Intern Med* 2014;53:829-35.
- Koga M, Murai J, Saito H, Kasayama S. Prediction of near-future glycated hemoglobin levels using glycated albumin levels before and after treatment for diabetes. *J Diabetes Investig* 2011;2:304-9.
- Lu JM, Ji LN, Li YF, et al. Glycated albumin is superior to glycated hemoglobin for glycemic control assessment at an early stage of diabetes treatment: A multicenter, prospective study. *J Diabetes Complications* 2016;30:1609-13.
- Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB. Status of hemoglobin a1c measurement and goals for improvement: From chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem* 2011;57:205-14.
- Nathan DM, McGee P, Steffes MW, et al. Relationship of glycated albumin to blood glucose and HbA1c values and to retinopathy, nephropathy, and cardiovascular outcomes .in the DCCT/EDIC study. *Diabetes* 2014;63:282-90.
- Pan J, Li Q, Zhang L, et al. Serum glycated albumin predicts the progression of diabetic retinopathy--a five year retrospective longitudinal study. *J Diabetes Complications*. 2014;28:772-8.
- Ma X, Shen Y, Hu X, et al. Associations of glycated haemoglobin A1c and glycated albumin with subclinical atherosclerosis in middle-aged and elderly Chinese population with impaired glucose regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015;42:582-7.
- Istituto Nazionale di Statistica. Il diabete in Italia. 2017. Disponibile online su: https://www.istat.it/it/files//2017/07/REPORT_DIABETE.pdf (ultimo accesso: gennaio 2019).
- Associazione Medici Diabetologi. Le monografie degli Annali AMD. Diabete, Obesità e Malattia Cardiovascolare: lo scenario italiano. 2019 Disponibile online su: <http://aemmedi.it/wp-content/uploads/2019/01/Annali-AMD-2018-password.pdf> (ultimo accesso: gennaio 2019).
- Dozio E, Mosca A, L'albumina glicata nella gestione clinica del diabete mellito, *Giornale italiano di diabetologia e metabolismo* 2017;37:179-86.
- Murea M, Moran T, Russell GB, et al. Glycated albumin, not hemoglobin A1c, predicts cardiovascular hospitalization and length of stay in diabetic patients on dialysis. *Am J Nephrol*. 2012;36:488-96.
- Song SO, Kim KJ, Lee BW, et al. Serum glycated albumin predicts the progression of carotid arterial atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225:450-5.

30. Xue Y, Sheng Y, Dai H, et al. Risk of development of acute pancreatitis with pre-existing diabetes: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012;24:1092-8.
31. International Diabetes Federation (2017). The Berlin Declaration. A collective ambition for policy change to drive early action in type 2 diabetes. Disponibile online su: https://www.idf.org/index.php?option=com_attachments&task=download&id=1280:Berlin-Declaration (ultimo accesso: marzo 2019).

Application of array-Comparative Genomic Hybridization analysis in immune-virotherapy approach

Andrea Vitale^{1,3}, Cristian Capasso², Eleonora Leggiero⁴, Mariangela Garofalo², Lukasz Kuryk L², Mari Hirvinen², Francesca D'Alessio⁴, Carla Perrotta^{3,4}, Francesco Verdesca^{3,4}, Annalisa Ranieri^{3,4}, Francesco Salvatore^{3,4}, Lucio Pastore^{3,4}, Pasqualina Buono^{1,4}, Vincenzo Cerullo², Barbara Lombardo^{3,4}

¹Dipartimento di Scienze Motorie e del Benessere (DiSMeB), Università Parthenope, Via Medina 40, 80133 Napoli, Italy

²Laboratory of ImmunoViroTherapy, Drug Research Program, University of Helsinki, Finland

³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, Italy

⁴CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Via G. Salvatore 486, 80145 Napoli, Italy

ABSTRACT

Introduction: oncolytic adenoviruses (OAd), viruses constructed to replicate in tumor cells, improve the outcome of cancer therapy in some cases, such as sarcomas. However, the molecular heterogeneity of tumors requires specific and personalized cancer treatments in order to set up more adequate and effective therapies.

Methods: by using the array Comparative Genomic Hybridization (array-CGH), a molecular approach method, we aimed to identify chromosomal aberrations or Copy Number Variants (CNVs) in three different tumor cell lines: HCT116, SW872 and A2058 selected for their Coxsackievirus and Adenovirus receptor (CAR) expression profile.

Results: the cells showed several duplications of genes involved in replicative Adenovirus cycle (binding, internalization, escape) in the core transport, and in the escape of the viral DNA from the capsid.

Conclusion: in this study, our aim was to identify chromosomal alterations in genes involved in the OAd replication cycle process. Array-CGH method could be useful to design a platform for a screening analysis in order to identify mutations that can contribute to oncolytic virotherapy approach generating a personalized strategy for tumor suppression.

INTRODUCTION

The discovery of new technologies led to development of more sensitive diagnostic methods and new types of cancer treatment, such as virotherapy (1) in order to overcome some of the radiotherapy and chemotherapy limitations.

Actually, virotherapy, especially in a combinatorial approach, could be tested in some types of tumor, such as sarcomas. It is important to understand the "actors" involved in the pathways that promote cell proliferation in order to establish an effective and personalized therapy, like the chromosomal aberrations involved in intra-patient intra-tumor heterogeneity (2).

A better understanding of the molecular mechanisms underlying the replication of oncolytic vectors (OVs), engineered to preferentially replicate in tumor cells,

could be useful to improve the efficacy of OV-based therapy. In addition, the genetically unstable nature of tumors could be responsible for resistance to any therapeutic approaches (3). Therefore, we supposed that genetic screening of several tumor cell lines could help to design and optimize new therapeutic approaches. In fact, it was reported that tumor cells possess high mutation and chromosome rearrangement rates (4) giving, in some cases, growth advantage and high plasticity to modulate gene expression and signal transduction pathways (5). We focused our attention on the evaluation of chromosomal aberrations or copy number variations (CNVs) in order to identify gene alterations involved in the adenovirus replicative cycle that may constitute a prognostic factor for virotherapy approaches. Array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) methodology allows an analysis of the

Corrispondenza a: Barbara Lombardo, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Via G. Salvatore 486, 80145 Napoli, Italy, Tel + 39 081 3737917, E-mail barbara.lombardo@unina.it

Ricevuto: 20.03.2019

Revisionato: 16.05.2019

Accettato: 28.05.2019

Publicato on-line: 10.10.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.053

whole genome and a rapid detection of the genomic imbalances involved in the etiology of several genetic disorders and cancers (6,7) and could be helpful to improve the understanding of tumor genetics.

METHODS

Cell lines and culture conditions

Twelve cell lines are used in this study. Human liposarcoma SW872 (ATCC® HTB-92™), human melanoma A2058 (ATCC® CRL-11147™), muscle rhabdomyosarcoma RD (ATCC® CCL136™), human vulva leiomyosarcoma SK-LMS-1 (ATCC® HTB-88™), human synovial sarcoma SW982 (ATCC® HTB-93™), and human fibrosarcoma HT1080 (ATCC® CCL-121™) cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Human lung carcinoma A549 (DSMZ® ACC-107™), human colon carcinoma HCT116 (DSMZ no. ACC-581), human chronic myelogenous leukemia K-562 (DSMZ no. ACC-10), and human acute monocytic leukemia THP-1 (DSMZ no. ACC-16) cell lines were purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Human colorectal adenocarcinoma Caco-2 (ECACC 86010202) was purchased from European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) and human ovarian carcinoma HEY from Tebu-bio no. CLU302-A, Magenta, Italy. All tumor cell lines were grown according to manufacturers' procedures.

Flow cytometry

The Coxsackievirus and Adenovirus receptor (CAR) expression profile was performed using the protocol already reported. Briefly, the fluorochrome-conjugated monoclonal antibody (mAb) anti FITC CAR (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Dallas, Texas, U.S.A.) and labeled isotype control (IgG2a) were used. After vigorous washing, cells were transferred to fluorescent-activated cell sorter (FACS) tubes and analyzed with flow cytometer (Gallios, Beckman Coulter, Miami, USA). Samples were acquired in duplicates, and analyzed with Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR, USA) (8).

Viability assay

The cell lines cultures were infected with Ad5D24, vector carrier of the d24 deletion in E1 (9) and, at the highest infectivity conditions (100 virus particles per cell/vp/cell), an extensive cytopathic effect (>90%) was evident at microscopy. The cell viability has been determined by using Cell Proliferation Colorimetric Assay MTS according to the manufacturer's protocol (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Naccka, Sweden). The absorbance was measured at 490 nm on Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) and spectrophotometric data were acquired. The experiments were independently performed three times

and each experiment contained triple replicates. Uninfected cells were used as control.

Array - Comparative Genomic Hybridization

Array-CGH analysis was performed by using the Agilent Human Genome CGH Microarray 4x 180K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to manufacturer's procedure (10–12).

The array-CGH platform we used, is a dual color array containing 170,334 60-mer oligonucleotide probes with a spatial resolution of 13 kb that covers the whole genome. Microarrays were scanned on an Agilent G2600D scanner and image files were quantified using Agilent's Feature Extraction software (V11.5.1.1); data were visualized with Agilent's Genomic Work Bench Standard Edition (V7.0.4.0). Results are interpreted as log² ratio of test versus control.

Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

Real Time PCR analysis was performed to assess the amplification and quantification of the number copy of *E4* gene after infection of cell lines cultures with Ad5D24. Primer pairs for *E4* (13) and for *GAPDH* genes were used for analysis according to a validate PCR reaction protocol (14); in particular, to generate a normalizing amplicon, the *GAPDH* gene was used (15). Data represent the mean (SD) of two independent experiments, each performed in duplicate, and are presented by comparison to control (uninfected cells). *E4* gene expression resulted higher in SW872 compared to A2058 and HCT116, respectively.

Statistical analysis

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used to perform data analysis by using one-way or two-way ANOVA with Tukey's post test, considering as variables the time and the different cell lines. Results are presented as mean (SD). A detailed description of the statistical methods used to analyze the data of each experiment can be found in the figures' captions.

RESULTS

Expression profile of CAR and viability test

In order to assess whether the tumor cell lines were susceptible to infection by the oncolytic adenovirus Ad5D24, it was necessary to evaluate the CAR expression. We selected the 3 cell lines, (HCT116, SW872, A2058) that showed the highest CAR profile among the 12 tumor cell lines, by using flow cytometry based on the average of geometric mean fluorescence intensity (gMFI) by comparison with the other cell lines (figure 1). Data represent mean (SD) of triplicate experiments. The cytopathic effect (CPE) is around 100% after infection, with a concentration of 100 vp/cell of Ad5D24 virus at several time points (3, 6, and 7 days

respectively for HCT116, SW872, and A2058 cell lines) (figure 2 A, B, C).

Residual cell viability was evaluated by MTS assay showing greater oncolytic activity on HCT116 [2.6136 (2)] cell line compared to SW872 [4.3705 (0.8)] and to A2058 [1.0067 (0.4)] cell lines (figure 3 A, B, C) at 100

vp/cell. Data represent mean (SD) of duplicate experiments. All data achieved statistical significance ($p \leq 0.0001$), using one-way ANOVA test. Figure 3 reports the significance of the concentration of 100 vp/cell of Ad5D24, corresponding to the CPE.

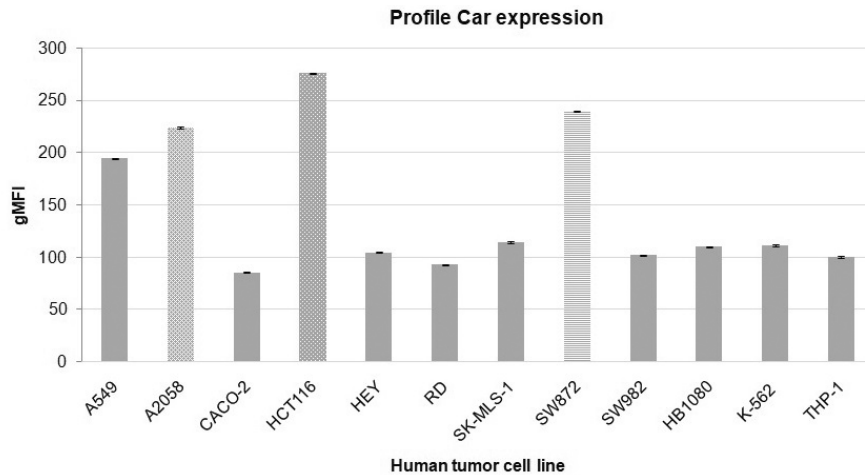


Figure 1
Profile of CAR receptor expression in different tumor cell lines. Geometric mean fluorescence intensity (gMFI) of CAR receptor expression is shown for each cell line. The data are shown as mean (SD), $n = 3$.

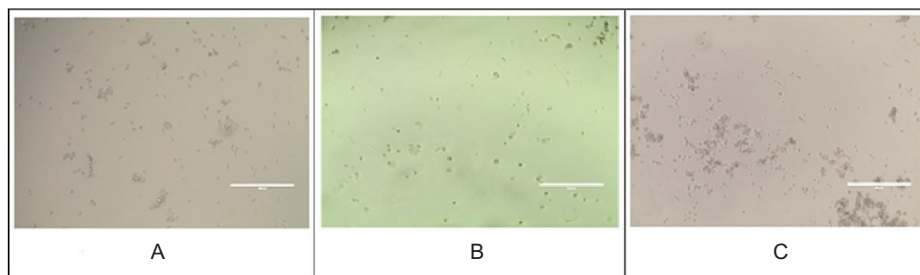


Figure 2
Scan Optical Microscope images of cytopathic effect of different cell lines. Cytopathic effect was obtained with 100 vp/cell of Ad5D24 at 3 days, 6 days and 7 days in HCT116 (A), SW872 (B) and A2058 (C), respectively. Scale bar indicates 400 μm .

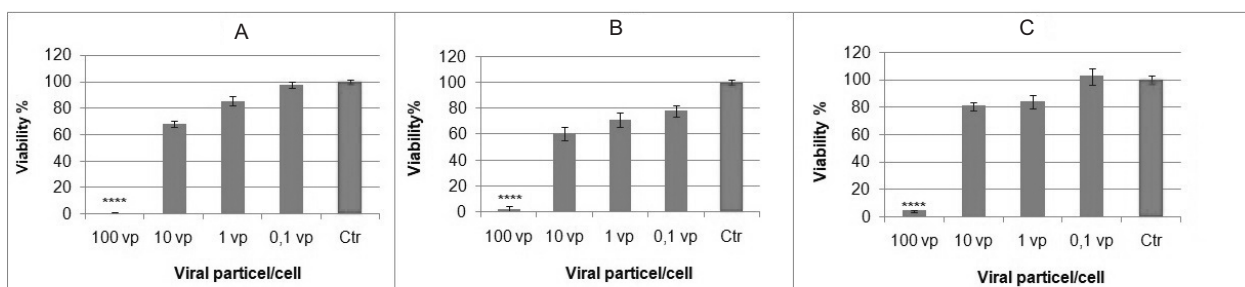


Figure 3
Viability test MTS. Test was performed on HCT116 (A), SW872 (B) and A2058 (C) infected with different concentration of Ad5D24 (0.1, 1, 10 and 100 vp/cell) and it was performed when the cytopathic effect was achieved at a concentration of 100 vp/cell of Ad5D24. Uninfected cells were used as controls (Ctr). The data are shown as mean (SD), $n = 2$. Significance was assessed using one-way ANOVA test; $p \leq 0.0001$

Table 1

Chromosomal aberrations of replication cycle of adenovirus. The alterations reported are: duplication (Dup) and amplification (Amp).

Adenovirus pathway trafficking	Gene	Chromosomal region	Alteration	Cell line
Absorption	<i>CXADR</i> (Coxsackie Virus And Adenovirus Receptor)	21q21.1	Dup	SW872
Absorption/ internalization	<i>ITGB3</i> (Integrin, Beta 3)	17q21.32	Dup	A2058 HCT116 SW872
Entry	<i>CLTC</i> (Clathrin, Heavy Chain)	17q23.1	Dup	A2058 HCT116 SW872
Entry	<i>CLINT1</i> (ClathrinInteractor 1)	5q33.3	Amp	SW872
Entry	<i>CLTA</i> (Clathrin, Light Chain A)	9p13	Dup	SW872
Entry	<i>CAV1</i> (Caveolin 1)	7q31.1	Dup	A2058 SW872
Entry	<i>CAV2</i> (Caveolin 2)	7q31.1	Dup	A2058 SW872
Escape	<i>ATP6V1B2</i> (ATPase, H+ Transporting, Lysosomal 56/58kDa, V1 Subunit B2)	8p21.3	Dup	SW872
Escape	<i>ATP6V1H</i> (ATPase, H+ Transporting, Lysosomal 50/57kDa, V1 Subunit H)	8q11.2	Dup	A2058 SW872
Escape	<i>ATP6V1C1</i> (ATPase, H+ Transporting, Lysosomal 42kDa, V1 Subunit C1)	8q22.3	Dup	A2058 HCT116 SW872
Traslocation	<i>DYNLRB1</i> (Dynein, Light Chain, Roadblock-Type 1)	20q11.21	Dup	SW872
Traslocation	<i>DYNC2H1</i> (Dynein, Cytoplasmic 2, Heavy Chain 1)	11q21-q22.1	Dup	SW872
Traslocation	<i>DYNLL2</i> (Dynein, Light Chain, LC8-Type 2)	17q22	Dup	A2058 HCT116 SW872
Traslocation	<i>KLC1</i> (Kinesin LightChain1)	14q32.33	Dup	SW872
Nuclear Import	<i>NUP214</i> Nucleoporin 214kDa)	9q34.1	Dup	SW872
Nuclear Import	<i>NUP205</i> (Nucleoporin 205kDa)	7q33	Dup	A2058 SW872
E1A	<i>E2F1</i> (E2F TranscriptionFactor 1)	20q11.2	Dup	SW872
E4	<i>GABPA</i> (GA Binding Protein Transcription Factor, Alpha Subunit 60kDa)	21q21.3	Dup	SW872
E1A/E1B	<i>TP53</i> (TumorProtein P53)	17p13.1	Dup	A2058

Array - Comparative Genomic Hybridization analysis and *E4* gene expression

Array-CGH method performed on the 3 selected cell lines, revealed different chromosomal aberrations in genes involved in the replicative cycle of Adenovirus. Table 1 reports the gene mutations involved in the cell membrane adsorption, internalization, lysis of endosomes, translocation, nuclear import and the early genes that will lead to virus replication. To increase the array-CGH result and to verify the pathway of oncolytic adenovirus infection, we analyzed the expression of *E4* gene for its role in viral replication. *E4* expression profile was determined by Real Time PCR in HCT116, SW872 and A2058 cell lines at different time points: 2, 24, 48 and 72 hours after Adenovirus infection (figure 4). Data represent the mean (SD) of two independent experiments, each performed in duplicate, and are presented by comparison to control (uninfected cells). *E4* gene expression resulted higher in SW872 compared to A2058 and HCT116, respectively. Significance was assessed using two-way ANOVA test ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.0001$).

DISCUSSION

In order to improve the application of OAdS in immune-viral therapy, it is necessary to understand and clarify the molecular pathways responsible of infection and replication in tumor cell lines.

The first step of the main adenovirus intracellular trafficking pathway is the vector binding to receptor at the cell surface (16). CAR, the main receptor involved in

Adenovirus infection, is expressed by several normal cell types but its expression level varies highly in tumor cells (17). However, Bagheri et al. (18) observed that a limited virus activity is due to a reduced CAR expression. Among 12 different tumor cell lines, we selected 3 cell lines (HCT116, SW872 and A2058) expressing the highest virus internalization efficiency. Our data, obtained by flow cytometry analysis, showed that the CAR expression profile is higher in the HCT116 compared to SW872 and A2058 cell lines; the results are well correlated to the HCT116 cell viability (100% of cell death in 3 days).

Since the array-CGH platform used in this pilot study is designed for human genes, we were not able to observe mutations in *E4* gene, but on the other hand we could indirectly identify possible gene alterations, in selected tumor cell lines, involved in pathways of OV proteins in order to investigate the efficacy of virus replication. To our knowledge, no data have been reported until now regarding the identification of genetic alterations by using array-CGH analysis in tumor cell lines treated with onco-virotherapy. In this study, we observed that SW872 cells showed several duplications of genes involved in the replicative Adenovirus cycle (binding, internalization, escape) in the core transport, and in the escape of the viral DNA from the capsid.

Our aim was to analyze gene alterations involved in the nucleus entry that allow the transcription of early stage genes, necessary to induce the entry in the S phase, to escape the antiviral defense systems and to synthesize proteins essential for viral DNA replication, such as E2F, GABPA and TP53 (19,20). These genomic regions showed duplications in SW872 cell line.

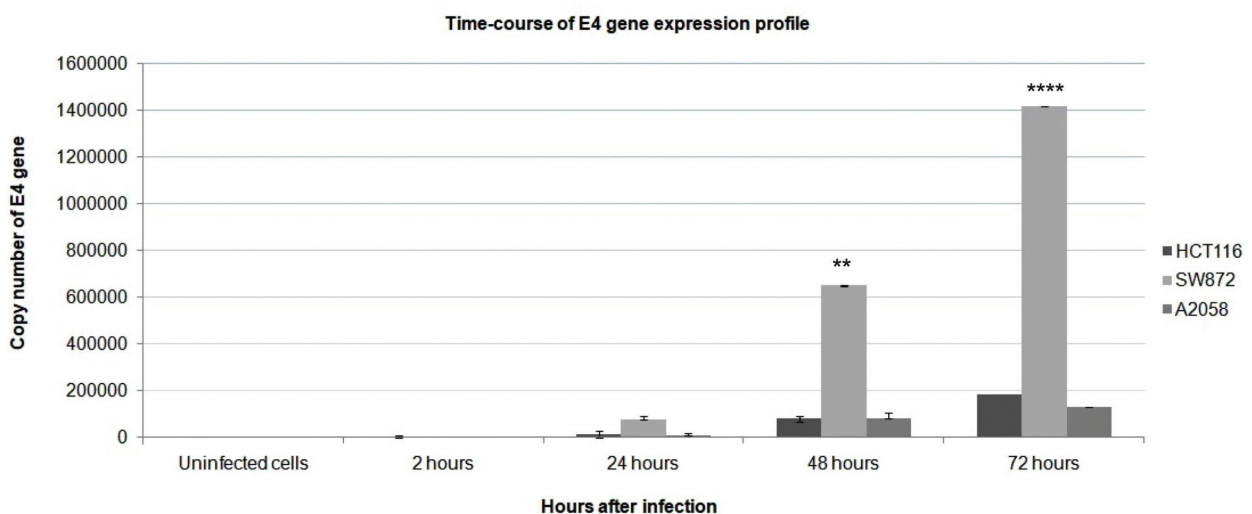


Figure 4

Time-course of *E4* gene expression profile performed by Real Time PCR in HCT116, SW872 and A2058 cell lines at 2, 24, 48 and 72 hours after Ad5D24 infection. SW872 cell line showed a greater *E4* gene expression compared to HCT116 and A2058, respectively. Data analysis was performed by using two-way ANOVA with Tukey's post test considering as variables the time and the different cell lines. The data are shown as the mean (SD), $n = 2$). Significance was assessed using two-way ANOVA test; $p \leq 0.01$ $p \leq 0.0001$.

Of particular interest is the *GABPA* gene duplication. This gene codes a transcription factor necessary for the expression of adenoviral *E4* gene (20). Proteins expressed from the *E4* region are implicated in the regulation of a set of functions during productive infection including transcription, viral DNA replication, RNA splicing and processing, late protein synthesis and the transition from the early to late stages of infection (21). Moreover, *E4* gene products target cellular regulators of cell signaling and DNA repair contributing to cell transformation and oncogenicity. The *E4* promoter is activated very early after infection by the E1a transcriptional activator protein; at later times transcription declines due to repression by the *E2a* gene product and feedback inhibition of E1a-mediated transactivation by the E4orf4 protein; in fact many *E4* open reading frame (orfs) produce multifunctional viral regulators. Mutations in *E4* regions could result in defects in viral DNA replication, accumulation of late viral messages and proteins, virus particle assembly and shut-off of host protein synthesis. Then, to increase the significance of the array-CGH results and to better clarify the possible correlation between *GABPA* and *E4* gene expression, we performed a Real Time PCR. The results suggested that the duplication of the *GABPA* gene could play a primary role in adenoviral replication; in fact, the SW872 cell line showed a significant increase ($p < 0.05$) of *E4* gene copy number compared to the other cell lines, suggesting that genetic alterations might be responsible for the different efficacy of OAds. On the other hand, we observed the highest oncolytic activity in HCT116 cell line compared to the others, where the *GABPA* gene duplication is not present, suggesting that other factors could be involved in the regulation of oncolytic activity in the above mentioned cell. Furthermore, additional studies are necessary to better understand which other factors are involved in the *E4* pathway.

Therefore, the presence of gene duplications, as *GABPA* gene in SW872 cell line, could give a positive advantage in replicative Adenovirus cycle (binding, internalization, escape), in the core transport, and in the escape of the viral DNA from the capsid.

In conclusion, our data suggested that genetic mutations in the viral replication cycle of Adenovirus could contribute to explain differences of the oncolytic effect/efficacy of OAds.

Moreover, future studies on genetic alterations in genes involved in cell-cycle of the host cell and its checkpoints could be effective to realize a suitable platform design for array-CGH analysis and to combine this diagnostic method to the immune-virotherapy in order to set up a personalized therapy for tumor eradication.

ACKNOWLEDGMENTS

AV was supported by CREME grant: "Campania Research in Experimental Medicine" POR Campania FSE 2007/2013 - Asse IV; Asse V, Avviso Pubblico per lo

sviluppo di reti di eccellenza tra Università, Centri di Ricerca e Imprese A.G.C. 06 D.D. n. 414 del 13.11.2009. CUP B25B09000050007.

REFERENCES

1. Pennisi E. Training viruses to attack cancers. *Science* 1998;282:1244-6.
2. Lyng H, Beigi M, Svendsrud DH, et al. Intratumor chromosomal heterogeneity in advanced carcinomas of the uterine cervix. *Int J Cancer* 2004;111:358-66.
3. Sharma A, Tandon M, Bangari DS, et al. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy. *Curr Drug Ther* 2009;4:117-38.
4. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
5. Connolly J, Schnitt S, Wang H, et al. Tumor structure and tumor stroma generation. *Holland-Frei Cancer Med 6th*. Hamilton: Ed BC Decker, 2003.
6. Vosecka T, Musil Z, Vicha A. Detection of chromosome changes by cgh, array-cgh and snp array techniques in tumours. *Cesk Patol* 2014;50:25-9.
7. Zebisch A, Schulz E, Grosso M, et al. Identification of a novel variant of epsilon-gamma-delta-beta thalassemia highlights limitations of next generation sequencing. *Am J Hematol* 2015;90:E52-4.
8. Capasso C, Hirvonen M, Garofalo M, et al. Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes increase the antitumor immunity and efficacy against melanoma. *Oncoimmunology* 2016;5:e1105429.
9. Heise C, Hermiston T, Johnson L, et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 2000;6:1134-9.
10. Sanna V, Ceglia C, Tarsitano M, et al. Aberrant F8 gene intron 1 inversion with concomitant duplication and deletion in a severe hemophilia A patient from Southern Italy. *J Thromb Haemost* 2013;11:195-7.
11. Nunziato M, Starnone F, Lombardo B, et al. Fast detection of a BRCA2 large genomic duplication by next generation sequencing as a single procedure: A case report. *Int J Mol Sci* 2017;18.
12. Lombardo B, Ceglia C, Tarsitano M, et al. Identification of a deletion in the *NDUFS4* gene using array-comparative genomic hybridization in a patient with suspected mitochondrial respiratory disease. *Gene* 2014;535:376-9.
13. Kanerva A, Wang M, Bauerschmitz GJ, et al. Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol Ther* 2002;5:695-704.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods* 2001;25:402-8.
15. Suh JH, Yoon JS, Kwon JB, et al. Identification of genomic aberrations by array comparative genomic hybridization in patients with aortic dissections. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;44:123-30.
16. Leopold PL, Crystal RG. Intracellular trafficking of adenovirus: Many means to many ends. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:810-21.
17. Fueyo J, Alemany R, Gomez-Manzano C, et al. Preclinical characterization of the antiangiogenic activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:652-60.
18. Bagheri N, Shiina M, Lauffenburger DA, et al. A dynamical systems model for combinatorial cancer therapy enhances oncolytic adenovirus efficacy by MEK-inhibition. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1001085.

19. Zhao H, Granberg F, Elfineh L, et al. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J Virol* 2003;77:11006-15.
20. Watanabe H, Wada T, Handa H. Transcription factor E4TF1 contains two subunits with different functions. *EMBO J* 1990;9:841-7.
21. Halbert DN, Cutt JR, Shenk T. Adenovirus Early Region 4 Encodes Functions Required for Efficient DNA Replication, Late Gene Expression, and Host Cell Shutoff. *J Virol* 1985;56:250-7.

Determinazione della presepsina: non solo diagnosi di sepsi

Giada Bragato¹, Monica Maria Mion¹, Andrea Padoan^{1,2}, Martina Zaninotto¹, Mario Plebani^{1,2}

¹UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

²Dipartimento di Medicina, Università degli Studi, Padova

ABSTRACT

Presepsin measurement: beyond sepsis diagnosis.

As sepsis is the leading cause of death among critically ill patients, early diagnosis is essential for the subsequent treatment to improve the outcome. Several diagnostic pathways have been proposed considering multiparametric approaches that combine clinical and biochemical evaluations. Among the several biomarkers proposed, procalcitonin measurement has been obtained significant consensus particularly in the evaluation of the efficacy of the therapeutic treatment. However, the need to define the prognosis and the outcome and to identify the patients at major risk of events during the hospitalization or at a short time later, seems to be an additional clinical value. The soluble cluster of differentiation 14 (S-CD14-ST or presepsin) is a free fragment of a glycoprotein expressed on monocytes and macrophages; several studies have demonstrated the significative prognostic value of the biomarker blood concentrations (at admission in particular) while the diagnostic performance of presepsin remains unclear. In a study carried out in a population of old patients (67-102 years) suffering from suspected pneumonia (n=50) the results of presepsin at admission in association with a Multidimensional Prognostic Index (MPI) score allow to identify the patients at major risk of adverse events (mortality) within 30 days. The prognostic efficiency of presepsin has been evaluated in different studies confirming, in different patient populations, the additional clinical value of this biomarker. Therefore, presepsin and procalcitonin measurements may provide complementary information that, in addition to clinical score and blood culture or molecular biology, can improve the management of patients with suspected sepsis.

INTRODUZIONE

La rilevanza della sepsi come condizione clinica caratterizzata da elevata morbilità e mortalità è ben nota e numerosi studi della letteratura hanno proposto differenti algoritmi diagnostici con l'inclusione di nuovi biomarcatori alla ricerca costante di un approccio multiparametrico per il riconoscimento precoce e specifico della malattia (1-4). Di una recente rassegna sull'argomento è disponibile la traduzione in Italiano, pubblicata su questo stesso fascicolo (5).

Ad oggi, tuttavia, nessun marcatore biochimico può essere considerato un gold standard diagnostico poiché un singolo marcatore di sepsi può riflettere solamente un unico aspetto di un processo patologico molto eterogeneo e complesso, ma non l'intero spettro della malattia (6). Di conseguenza, anche le linee-guida più recenti, suggeriscono l'utilizzo di un marcatore

biochimico, la procalcitonina, non tanto a scopo di diagnosi precoce ma di valutazione dell'efficacia della terapia antibiotica e di eventuale sospensione della stessa (2).

Un altro aspetto di notevole rilevanza clinica in questa complessa patologia, è la gestione terapeutica ottimale che potrebbe avvantaggiarsi e risultare maggiormente efficace se fossero disponibili biomarcatori circolanti in grado di fornire una informazione precoce nella stratificazione del rischio clinico di ogni paziente di andare incontro ad eventi maggiori (7,8). In realtà, i dati e gli studi attualmente disponibili sembrano focalizzarsi soprattutto alla ricerca di biomarcatori per la diagnosi e per il monitoraggio della terapia antimicrobica, che però non sembrano fornire informazioni utili nella stratificazione prognostica del singolo paziente (1).

La presepsina, (S-CD14-ST) è un frammento

Corrispondenza a: Martina Zaninotto, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova, E-mail martina.zaninotto@aopd.veneto.it

Ricevuto: 05.02.2020

Revisionato: 05.02.2020

Accettato: 07.02.2020

Publicato on-line: 01.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.026

solubile N-terminale del cluster di differenziazione (CD) del marcatore proteico CD14, che viene rilasciato in circolo durante l'attivazione dei monociti dopo riconoscimento del lipopolisaccaride (LPS) dell'agente infettivo (9,10). I risultati presenti in letteratura relativamente alla determinazione di questo biomarcatore nella diagnosi precoce di sepsi, sono tuttavia non conclusivi e spesso contraddittori (11,12), mentre sembrano univocamente dimostrare il significativo potere prognostico precoce, all'ammissione, nei pazienti con sepsi e shock settico (13-15).

PRESEPSINA E PROGNOSI

La possibilità di disporre di informazioni prognostiche precoci in pazienti con sospetta sepsi ricoverati nei reparti di emergenza o di terapia intensiva, potrebbe costituire un significativo valore aggiunto che risponde alla necessità clinica di differenziazione gestionale e terapeutica in base alla stratificazione del rischio di eventi maggiori e quindi alla prognosi. Alcuni studi della letteratura (11) hanno dimostrato che i pazienti con sepsi e shock settico che presentano all'ammissione valori elevati di presepsina (nel quartile più alto della distribuzione dei valori misurati) rispetto agli altri gruppi di pazienti con patologie infiammatorie sistemiche, presentano una probabilità di morte a 30 giorni significativamente maggiore. Inoltre in tutti i

pazienti studiati, le concentrazioni circolanti di presepsina all'ammissione stratificano il rischio di mortalità.

In un altro studio (16), effettuato su una popolazione di pazienti con diagnosi di sepsi e shock settico, si dimostra come le concentrazioni di presepsina al giorno 2 e 7 post-ricovero siano indipendentemente correlate non solo alla mortalità in terapia intensiva ma anche nel breve (28 giorni) e nel lungo periodo (90 giorni) post-ricovero. In questo studio, il *Sequential -sepsis related- Organ Failure Assessment* (SOFA) score si dimostrava la sola variabile clinica associata con la mortalità in un modello di analisi multivariata che comprendeva la procalcitonina. Quando nel modello, veniva sostituita la procalcitonina con la presepsina, il SOFA score non risultava più significativamente associato alla mortalità.

Il possibile utilizzo prognostico della determinazione di presepsina, sembra quindi un'applicazione molto utile e per alcuni aspetti scarsamente valutata. Per tale motivo a completamento di uno studio recentemente pubblicato (17) che ha valutato l'efficacia dell'utilizzo combinato della determinazione di procalcitonina in aggiunta ad uno score clinico, il *Multidimensional Prognostic Index* (MPI) nella stratificazione del rischio di mortalità ad 1 mese in pazienti anziani con sospetta infezione delle basse vie respiratorie, è stata aggiunta nella stessa popolazione la determinazione di presepsina. I pazienti, all'ammissione in pronto soccorso (Tabella 1) venivano valutati clinicamente

Tabella 1

Caratteristiche della popolazione studiata (n= 50)

CATEGORIE	Multidimensional Prognostic Index			p		
	BASSO (n=6)	MEDIO (n=13)	ELEVATO (n=31)			
ETA' (anni)	Media (DS)	86,21 (7,50)	82,31 (3,59)	83,70 (8,54)	88,02 (7,16)	0,061*
	Mediana (intervallo)	85,93 (67,64-102,19)	83,11 (77,81-85,65)	84,28 (68,69-97,89)	89,03 (67,64-102,19)	
SESSO (n, %)	Femmine	26 (52%)	3 (50%)	2 (15.4%)	21 (67.7%)	0,004#
	Maschi	24 (48%)	3 (50%)	11 (84.6%)	10 (32.3%)	
MONITORAGGIO (giorni)	Media (DS)	22,92 (11,13)	30,00 (0,00)	28,54 (4,70)	19,19 (12,47)	0,008*
MORTALITA' a 30 giorni (numero/totale)	--	18/50	0/6	2/13	16/31	0,009#

Modificata da riferimento 17

*: ottenuto tramite l'analisi della varianza (ANOVA)

#: ottenuto tramite il test esatto di Fisher

DS, deviazione standard

attraverso indagini radiologiche e biochimiche ed in base a MPI (che prevede la valutazione di diverse variabili cognitive, di terapia e di condizioni sociale) (18); questo ha consentito di suddividere la popolazione in 3 classi di rischio di mortalità (basso, intermedio, alto). Nel prelievo all'ammissione sono state anche determinate procalcitonina (PCT sensitive Kryptor, Brahms) e presepsina (Pathfast Presepsin, Mitsubishi).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che sebbene MPI all'ammissione sembri stratificare bene il rischio di mortalità, il "log-rank test" (test per il confronto delle distribuzioni delle sopravvivenze) non è risultato statisticamente significativo ($p=0,239$) come pure i valori mediani di procalcitonina e presepsina misurati in tutti i pazienti arruolati (0,32 ng/L e 1026 ng/L rispettivamente) (Tabella 2) che, all'ammissione non evidenziano una significativa efficacia prognostica dei biomarcatori (test di Kruskal-Wallis sui ranghi, $p=0,401$; $p=0,225$). Tuttavia dei due biomarcatori valutati, solamente la presepsina aggiunge valore prognostico quando misurata in associazione ad MPI nello stratificare i pazienti a rischio intermedio rispetto ai pazienti a basso rischio ($p=0,037$) (Figura 1). I dati di questo studio, ottenuti su una popolazione numericamente modesta, trovano riscontro in recenti lavori della letteratura nei quali è stato confermato il valore prognostico della presepsina nella stratificazione del rischio di mortalità a breve termine in pazienti con polmonite, indipendentemente dall'eziologia della stessa (19).

Risultati analoghi sono stati descritti in altre categorie di pazienti critici, quali pazienti sottoposti ad interventi cardiocirurgici (20), pazienti con cirrosi (21),

nei neonati con sospetta sepsi (22), in pazienti con insufficienza renale acuta (23).

Di rilievo è infine l'osservazione che non solamente i valori del biomarcatore all'ammissione ma anche le variazioni della concentrazione durante il monitoraggio sembrano fornire un'informazione prognostica interessante che differenzia presepsina da procalcitonina (16,24): infatti, non solo le concentrazioni di presepsina all'ammissione sono significativamente più elevate nei pazienti che vanno incontro a morte, ma in questo gruppo permangono costantemente elevate anche durante il monitoraggio a differenza delle cinetiche della procalcitonina che progressivamente, nel corso del monitoraggio, diminuiscono verso valori di normalità, indipendentemente dalla prognosi.

In conclusione, i dati più interessanti e sicuramente maggiormente conclusivi, relativamente all'utilizzo di presepsina nel contesto della sepsi e dello shock settico, depongono non tanto per una determinazione alternativa a quella di procalcitonina nella diagnosi precoce quanto piuttosto nella accurata e precoce stratificazione del rischio, con una peculiare cinetica di variazioni temporali che consente di identificare i pazienti destinati ad una prognosi peggiore (morte) rispetto ai pazienti con esiti favorevoli (sopravvivenza). In questo tipo di applicazione combinata di biomarcatori che forniscono informazioni aggiuntive piuttosto che mutuamente esclusive, vanno collocate le determinazioni di procalcitonina e presepsina sia nei pazienti con sospetto di sepsi che nei pazienti con diagnosi di sepsi/shock settico: la complessità fisiopatologica della patologia depone per un approccio biochimico combinato con uno specifico valore aggiunto all'inquadramento clinico (25).

Tabella 2

Concentrazioni di procalcitonina e presepsina all'ammissione

	PROCALCITONINA ($\mu\text{g/L}$)			PRESEPSINA (ng/L)		
	TUTTI	VIVI	MORTI	TUTTI	VIVI	MORTI
CONCENTRAZIONI (intervallo)	0,05-1524	0,05-124,3	0,09-1524	417-9540	541-4100	417-9540
MEDIA (DS)	47,7 (225,2)	5,6 (23,5)	101,4 (335)	1507 (1452)	1369 (939)	1683 (1930)
MEDIANA	0,32	0,24	0,45	1026	969,5	1426
PERCENTILE 25°-75°	0,13-1,30	0,10-0,79	0,25-2,2	817,5-1632	784-1622	873-1588

Modificata da riferimento 17
DS, deviazione standard

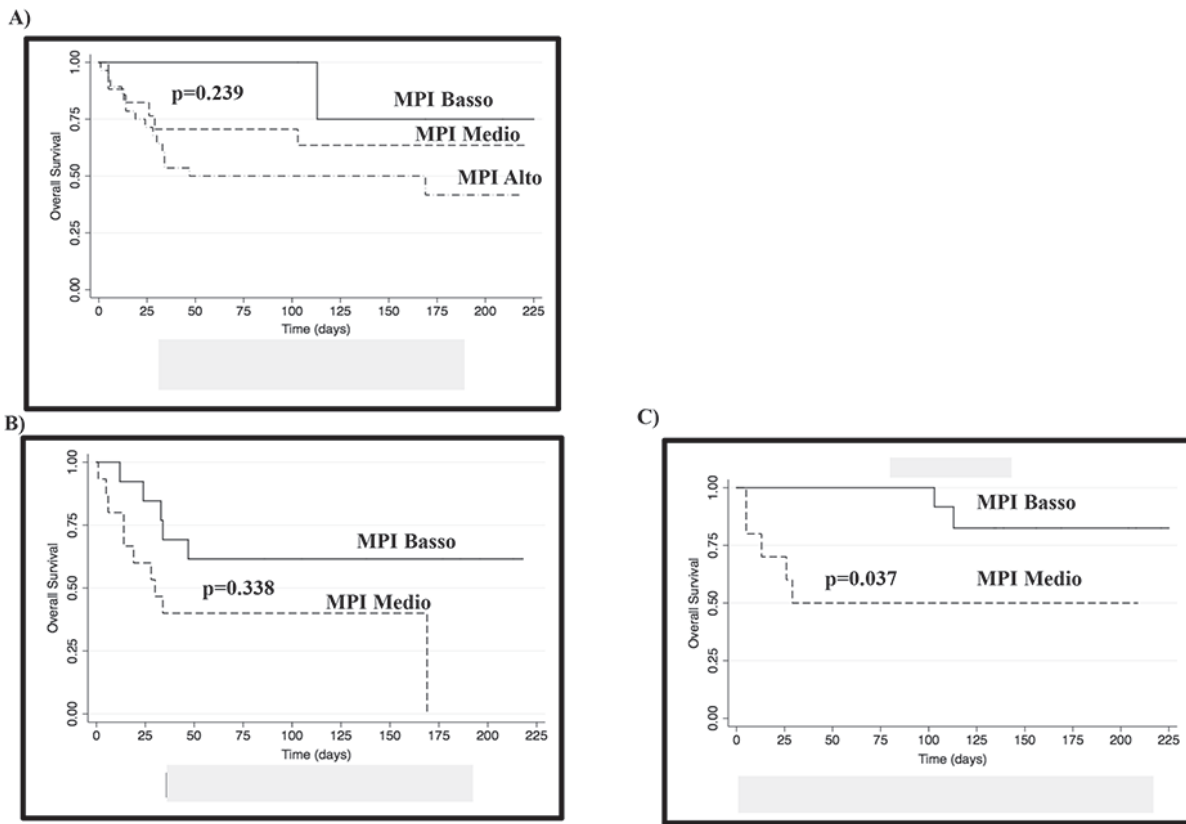


Figura 1

Curve di sopravvivenza in relazione al solo Multidimensional Prognostic Index (MPI) (A), ad MPI in associazione alle concentrazioni di procalcitonina (B) e ad MPI in associazione alle concentrazioni di presepsina all'ammissione (C).

Il test di log-rank è stato usato per valutare le differenze nelle sopravvivenze.

(Modificata da riferimento 17)

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Crit Care Med* 2017;45:486-552.
2. Galliera E, Massacesi L, de Vecchi E, et al. Clinical application of presepsin as diagnostic biomarker of infection: overview and updates. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:11-7.
3. Clerico A, Plebani M. Biomarkers for sepsis: an unfinished journey. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1135-8.
4. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
5. Galliera E, Massacesi L, de Vecchi E et al. Applicazioni cliniche della presepsina come biomarcatore diagnostico d'infezione: rassegna e aggiornamenti *Biochim Clin* 2020;44:21-7.
6. Song J, Park DE, Moon S, et al. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infectious Diseases* 2019;19:968-79.
7. Nguyen HB, Jaehne AK, Jayaprakash N et al. Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: insights and comparisons to ProCESS, ProMiSe, and ARISE. *Crit Care* 2016;20:160-76.
8. Bouadma L, Luyt CE, Tubach F. et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010;375:463-74.
9. Chenevier-Gobeaux C, Borderie D, Weiss N et al. Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clin Chim Acta* 2015;450: 97-103.
10. Arai Y, Mizugishi K, Nonomura K et al. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. *J Infect Chemother* 2015;2:564-69.
11. Carpio R, Zapata J, Spanuth E, et al. Utility of presepsin (sCD14-ST) as a diagnostic and prognostic marker of sepsis in the emergency department. *Clin Chim Acta* 2015;450:169-75.
12. Charles PE, Gibot S. Predicting outcome in patients with

- sepsis: new biomarkers for old expectations. *Crit Care* 2014;18:108-9.
13. Brodska H, Valenta J, Pelinkova K, et al. Diagnostic and prognostic value of presepsin vs. established biomarkers in critically ill patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:658-68.
 14. Ugajin M, Matsuura Y, Matsuura K et al. Impact of initial plasma presepsin level for clinical outcome in hospitalized patients with pneumonia. *J Thorac Dis* 2019;11:1387-96.
 15. Ali FT, Ali MA, Elnakeeb MM, et al. Presepsin is an early monitoring biomarker for predicting clinical outcome in patients with sepsis. *Clin Chim Acta* 2016;490:93-101.
 16. Masson S, Caironi P, Spanuth E, et al. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. *Crit Care* 2014;18:R6.
 17. Pilotto A, Dini S, Daragjati J, et al. Combined Use of the Multidimensional Prognostic Index (MPI) and Procalcitonin Serum Levels in Predicting 1-month Mortality Risk in Older Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia (CAP): A Prospective Study. *Aging Clin Exp Res* 2018;30:193-7.
 18. Pilotto A, Rengo F, Marchionni N, et al. Comparing the prognostic accuracy for all-cause mortality of frailty instruments: a multicentre 1-year follow-up in hospitalized older patients. *PLoS ONE* 2012; 7:e29090.
 19. Klouche K, Cristol JP, Devin J, et al. Diagnostic and prognostic value of soluble CD14 subtype (Presepsin) for sepsis and community-acquired pneumonia in ICU patients. *Ann Intensive Care* 2016 6:59-70.
 20. Bomberg H, Klingele M, Wagenpfeil S, et al. Presepsin (sCD14-ST) is a novel marker for risk stratification in cardiac surgery patients. *Anesthesiology* 2017;126:631-42.
 21. Elefsiniotis I, Tsakiris AS, Barla G et al. Presepsin levels in cirrhotic patients with bacterial infections and/or portal hypertension-related bleeding, presenting with or without acute kidney injury. *Ann Gastroenterol* 2018;31:604-12.
 22. Mussap M, Puxeddu E, Puddu M, et al. Soluble CD14 subtype (sCD14-ST) presepsin in premature and full term critically ill newborns with sepsis and SIRS. *Clin Chim Acta* 2015;451:65-70.
 23. Takahashi G, Shibata S, Fukui Y, et al. Diagnostic accuracy of procalcitonin and presepsin for infectious disease in patients with acute kidney injury. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;86:205-10.
 24. Yu H, Qi Z, Hang C, et al. Evaluating the value of dynamic procalcitonin and presepsin measurements for patients with severe sepsis. *Am J Emerg Med* 2017;35:835-41.
 25. Cervellin G, Schuetz P, Lippi G. Toward a holistic approach for diagnosing sepsis in the emergency department. *Adv Clin Chem* 2019;92:201-16.

Raccomandazioni per la diagnosi di laboratorio della malattia di von Willebrand

Benedetto Morelli¹, Francesca Stufano² per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi

¹Synlab Castenedolo, Castenedolo, Brescia

²Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

ABSTRACT

Recommendations for the laboratory diagnosis of von Willebrand disease. Von Willebrand disease (VWD) is the most common inherited bleeding disorder. Clinically, VWD induces mucosal bleeding caused by a decreased quantity or quality of von Willebrand factor (VWF). Diagnosis of VWD requires careful consideration of patient specific factors, bleeding symptoms, and laboratory results. There is no single diagnostic test for VWD; laboratory diagnosis requires a number of assays of VWF amount and function, and factor VIII activity, with no single straightforward diagnostic test available up to know to either confirm or exclude the diagnosis. The currently available laboratory testing for VWD is imperfect, but if accompanied by an attentive and careful interpretation provides significant clinical utility by categorizing affected patients by type of VWD. As the diagnosis of VWD variants has implications for treatment, laboratory testing is therefore critical for optimising patient care. Newer assays of VWF function are becoming available and will be of great help in establishing the laboratory diagnosis of VWD.

INTRODUZIONE

La malattia di von Willebrand (VWD) è una malattia emorragica ereditaria causata da un difetto genetico che determina un'anomalia quantitativa, strutturale o funzionale, del fattore di von Willebrand (VWF). La malattia fu descritta per la prima volta nel 1926 da Erik von Willebrand, che ne riconobbe le differenze dall'emofilia e per questo venne definita inizialmente come "pseudoemofilia ereditaria" (1).

Il fattore plasmatico responsabile della malattia è stato identificato molti anni fa e fu chiamato VWF in onore del medico scopritore. Il VWF è una glicoproteina multimerica, ad elevato peso molecolare coinvolta nell'emostasi primaria, nell'ambito della quale svolge un ruolo fondamentale per l'adesione e l'aggregazione piastrinica tramite il legame con i recettori delle glicoproteine GPIIb e GPIIb-IIIa in condizioni di elevato *shear stress* (2).

Il VWF agisce inoltre come proteina *carrier* del fattore VIII della coagulazione (FVIII), proteggendolo dalla degradazione proteolitica e da una rapida clearance (3).

La VWD è la più comune malattia emorragica ereditaria ed ha una modalità di trasmissione autosomica dominante nella maggior parte dei casi. La malattia è caratterizzata principalmente da sanguinamento a livello

delle mucose e dopo interventi chirurgici e traumi. La diagnosi della malattia si basa su una storia personale e familiare di eventi emorragici e sul riscontro di ridotti livelli di VWF.

EPIDEMIOLOGIA

Sulla base degli studi più recenti, la prevalenza della VWD è compresa tra lo 0,6 e l'1,3% (4,5). Sebbene il modello di ereditarietà autosomica dominante suggerisca una uguale distribuzione di pazienti di sesso maschile e pazienti di sesso femminile, la malattia è diagnosticata più frequentemente nelle donne a causa dei problemi emorragici specifici delle donne. Non tutte le persone con bassi livelli di VWF hanno sintomi emorragici clinicamente rilevanti. Sulla base delle segnalazioni dei centri specialistici, la prevalenza stimata della VWD è di circa 1 caso ogni 10 000 persone (5). La prevalenza è fortemente dipendente dal valore soglia diagnostico utilizzato per il VWF (6). L'intervallo di riferimento è generalmente compreso tra 50 e 150 UI/dL. In diverse linee guida, la diagnosi è basata su un valore limite per il VWF di 30 UI/dL, mentre i suggerimenti per l'inizio di terapie mirate per la VWD specificano un valore limite di 40 UI/dL (4, 6-8).

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, Synlab Castenedolo, via Beato L. Pavoni 18, 25014, Castenedolo, Brescia, Tel 3407912302, E-mail benemorelli47@gmail.com

Ricevuto: 29.04.2019

Revisionato: 10.05.2019

Accettato: 22.06.2019

Pubblicato on-line: 15.10.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.057

STRUTTURA DEL FATTORE DI VON WILLEBRAND

Il VWF è una lunga catena polipeptidica con peso molecolare di circa 270 kDa; questa proteina multimerica plasmatica è presente nel plasma e nelle piastrine, ed è prodotta dall'endotelio e dai megacariociti. Ogni monomero di VWF è composto da domini ripetuti identici designati come A, B, C, D ed E (9,10). La disposizione dei domini appare come una proteina mosaico (11); le caratteristiche funzionali di ciascun dominio sono illustrate nella figura 1. La dimensione multimerica del VWF è importante per la sua funzione (12).

Il VWF circola nel sangue sotto forma di una serie di multimeri di dimensioni comprese tra circa 500 e 20 000 kDa; quelli di dimensioni maggiori sono i più efficaci dal punto di vista emostatico (13).

La biosintesi del VWF è completata attraverso un complesso processo che comprende diverse modifiche post-traduzionali; la molecola di partenza è un polipeptide di 350 kDa contenente 2 050 residui aminoacidici, un peptide segnale lungo 22 aminoacidi, e un pro-peptide di 741 residui di aminoacidi.

Il propeptide si dimerizza rapidamente all'interno del reticolo endoplasmatico per formazione di un legame disolfuro (14,15). Il precursore subisce la multimerizzazione dopo l'elaborazione nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi della cellula endoteliale e viene scisso in due componenti: una è la proteina matura, mentre l'altra è un pro-peptide (VWFpp) di 97 kDa (16).

La proteina matura media l'interazione tra piastrine e componenti del subendotelio nei siti di danno vascolare,

e il risultato di queste interazioni è la protezione del FVIII dalla degradazione proteolitica. Il VWF è inizialmente sintetizzato come pre-pro-polipeptide. Il pro-polipeptide può essere tagliato e anche secreto. Il pro-polipeptide libero è identificato come von Willebrand antigene II, una glicoproteina plasmatica di funzione sconosciuta (17).

Il VWF plasmatico consiste in una serie eterogenea di multimeri che sono composti da subunità glicoproteiche apparentemente *single-type*, collegate tra loro da legami disolfuro (18,19).

Il VWF è secreto come multimero di grandi dimensioni che viene poi scisso a livello del dominio A2 dalla metalloproteasi *A Disintegrin And with a Thrombospondin type 1 motif, member 13* (ADAMTS-13) formando multimeri più piccoli. Il VWF scisso è attivato da forze idrodinamiche nel sanguinamento arteriolare per promuovere l'emostasi, mentre il VWF non scisso è attivato ad un più basso livello fisiologico di *shear stress* e causa la trombosi (20).

DIAGNOSI

La corrente classificazione della VWD si basa sulla carenza parziale o completa del VWF (VWD di tipo 1 e di tipo 3) o sulla presenza di forme disfunzionali del VWF (VWD di tipo 2). La frequenza dei tre tipi è rispettivamente compresa tra il 70 e l'80% (tipo 1), è di circa il 20% nel tipo 2 ed è <5% nel tipo 3. La VWD di tipo 2 è ulteriormente suddivisa in quattro varianti (2A, 2B, 2M e 2N) in base al diverso fenotipo (2); la variante di tipo 3 è trasmessa in forma autosomica recessiva con una prevalenza di circa 1/1 000 000 nella popolazione

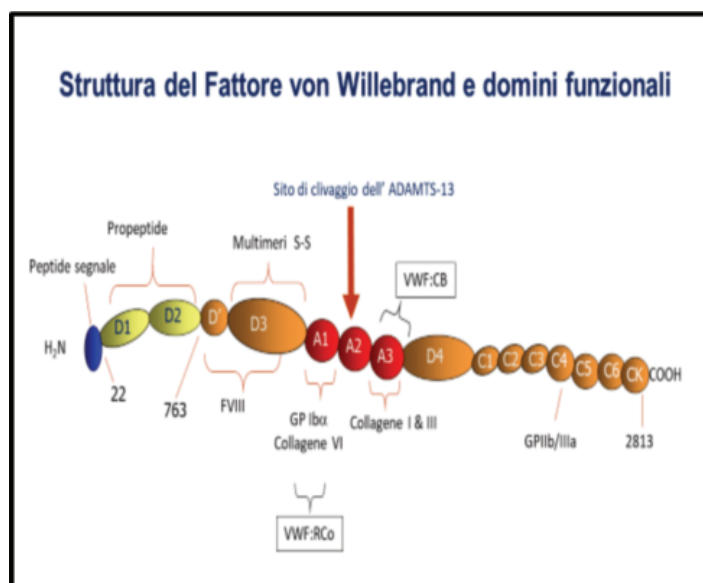


Figura 1

Struttura del Fattore von Willebrand. Modificato da Zhou YF et al. Sequence and structure relationship within von Willebrand factor. Blood 2012;120:449-58. ADAMTS-13, A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13; A1, A2, A3, Domini A; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31, C32, C33, C34, C35, C36, C37, C38, C39, C40, C41, C42, C43, C44, C45, C46, C47, C48, C49, C50, C51, C52, C53, C54, C55, C56, C57, C58, C59, C60, C61, C62, C63, C64, C65, C66, C67, C68, C69, C70, C71, C72, C73, C74, C75, C76, C77, C78, C79, C80, C81, C82, C83, C84, C85, C86, C87, C88, C89, C90, C91, C92, C93, C94, C95, C96, C97, C98, C99, C100, Domini C; D1, D2, D3, D4, Domini D; VWF:CB, attività di legame con il collagene; VWF:RCO, cofattore ristocetina

generale, ma la sua frequenza è significativamente più alta nelle aree con un alto tasso di consanguineità (21). Come per le altre malattie emorragiche, anche l'approccio al paziente con sospetto di VWD è basato su una storia personale o familiare di sanguinamento, o entrambi, in combinazione con l'utilizzo di esami di laboratorio che mostrano anomalie nella determinazione quantitativa o funzionale del VWF, del FVIII o di entrambi. La valutazione del fenotipo emorragico inizia comunque con la raccolta anamnestica dettagliata di tutti i sintomi emorragici nel paziente e nei familiari.

L'utilizzo di uno schema di punteggio (*score*) per definire la gravità dei sintomi emorragici nella VWD è andato sempre più diffondendosi negli anni recenti: sistemi di punteggio numerico, basati su questionari strutturati, di solito riferiti come strumenti di valutazione del sanguinamento, sono stati sviluppati e approvati anche dall'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH). Lo *score* denominato *ISTH-Bleeding Assessment Tool* (BAT) è utile in diversi contesti clinici e può essere impiegato per valutare sia la VWD che alcune disfunzioni piastriniche in pazienti con sospetto di malattia emorragica con coinvolgimento

dell'emostasi primaria (21-24).

Questi strumenti hanno però un uso diagnostico limitato perché dipendono fortemente dall'età del paziente e dal numero di precedenti eventi emorragici. L'utilizzo di questi *score* è dunque particolarmente problematico nel caso di pazienti giovani che non hanno ancora subito un intervento chirurgico o un intervento di estrazione dentale.

DIAGNOSI DI LABORATORIO

Il VWF è una glicoproteina multimerica e multifunzionale con diversi domini contenenti diversi siti di legame correlati a diverse attività funzionali, come mostrato in figura 1. Pertanto, a differenza della diagnostica di altre carenze fattoriali, è necessario più di un esame per valutare tutte le funzioni del VWF, e spesso, la diagnosi della VWD risulta complessa. Sono disponibili diversi esami biochimici per analizzare le funzioni di questa complessa glicoproteina, l'esecuzione dei quali deve avvenire seguendo criteri di approccio diversificati (esami di screening, esami di primo e di secondo livello) (figura 2).

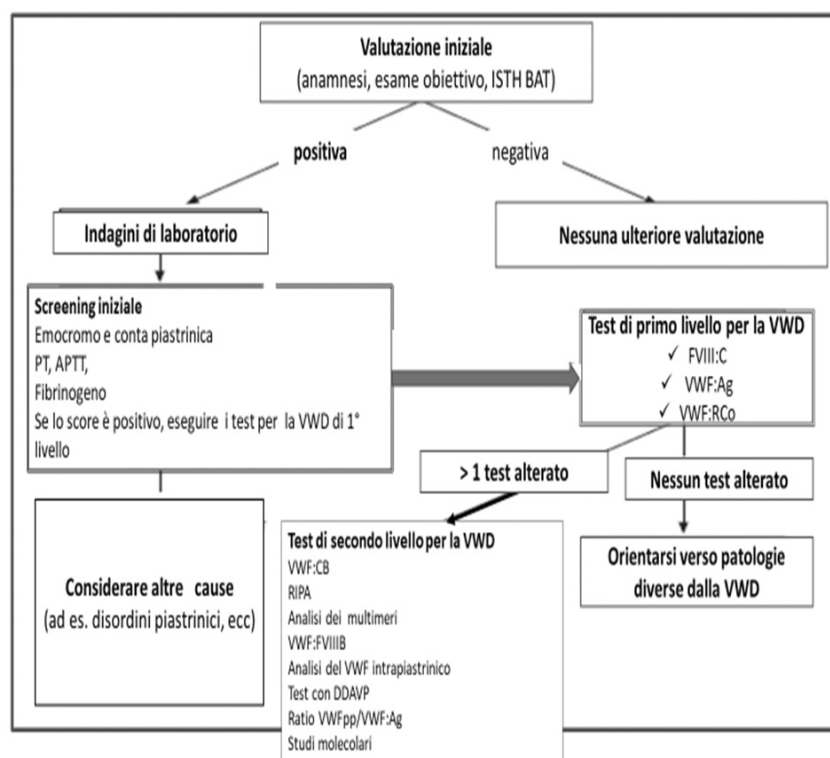


Figura 2

Approccio al paziente con sospetto di malattia emorragica. Modificata da Stufano F et al. *Diagnosis of von Willebrand Disease – Phenotypic characterization. Treatment of hemophilia*. <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1691.pdf>.

ISTH BAT, *International Society of Thrombosis and Hemostasis Bleeding Assessment Tool*; PT, tempo di protrombina; APTT, tempo di tromboplastina parziale attivato; VWD, malattia di von Willebrand; FVIII:C, attività del fattore VIII; VWF:Ag, antigene di von Willebrand; VWF:RCO, cofattore ristocetinico; VWF:CB, attività del legame con il collagene; RIPA, Ristocetin Induced Platelet Aggregation; VWF-FVIII B, test per il legame con il fattore VIII; DDAVP, 1-deamino-8-D-arginine vasopressin; VWFpp, propeptide del fattore di von Willebrand.

Esami di screening

La valutazione iniziale del laboratorio di emostasi deve includere l'emocromo completo, il tempo di protrombina (PT), il tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), il Platelet Function Analyzer-100® (PFA) e la determinazione del fibrinogeno. Questi esami non possono escludere o confermare la presenza della VWD, ma possono suggerire se un deficit di un fattore della coagulazione possa essere la causa potenziale dei sintomi di sanguinamento di un paziente (2).

Anche il conteggio piastrinico è importante perché una trombocitopenia può essere associata alla VWD di tipo 2B. Inoltre nella VWD, la carenza di FVIII può essere secondaria alla mancanza o alla disfunzione del VWF, sua proteina di trasporto. Pertanto, nella VWD, i risultati dell'APTT sono prolungati solo se il livello del FVIII è sufficientemente ridotto (cioè nella VWD di tipo 3 o di tipo 2N).

In alcuni laboratori, vengono eseguiti anche il tempo di sanguinamento (Bleeding Time-BT) e la valutazione della funzionalità piastrinica con PFA-100® (o PFA-200®). Tuttavia, i risultati del tempo di sanguinamento presentano alta variabilità operatore-dipendente e scarsa sensibilità (25). Alcuni studi hanno dimostrato che i risultati ottenuti con questo esame sono anormali nella maggior parte dei pazienti con VWD; tuttavia, il PFA-100® manca di sensibilità e specificità per cui può essere utilizzato solo come esame di screening (26, 27).

Esami di primo livello

Gli esami di primo livello misurano il livello di attività del FVIII (FVIII), la concentrazione antigenica (VWF:Ag) e l'attività funzionale del VWF dipendente dalle piastrine (attività del legame VWF-GPIIb/IIIa), solitamente misurata come attività di cofattore ristocetinico (VWF:RCO). I risultati di questi esami possono essere espressi in unità internazionali per decilitro (IU/dL) o per millilitro (IU/mL) (4).

FVIII:C

La determinazione dell'attività procoagulante del FVIII può essere effettuata con un metodo coagulativo o con un metodo cromogenico. Il metodo più comunemente utilizzato è il metodo coagulativo che misura la capacità del FVIII del paziente di accorciare il tempo di coagulazione di un plasma carente di FVIII (28).

VWF:Ag

Il VWF:Ag misura la concentrazione immunologica della glicoproteina VWF nel plasma del paziente. L'esame può essere eseguito con saggi immunoenzimatici ELISA o con esami immunoturbidimetrici al lattice automatizzati su coagulometri (LIA, Latex ImmunoAssay).

VWF-GPIIb/IIIa

La capacità del VWF nel legarsi alle piastrine tramite la GPIIb/IIIa viene comunemente valutata come VWF:RCO, che misura la capacità del VWF plasmatico di agglutinare piastrine in presenza di ristocetina (29). Negli ultimi dieci anni sono stati introdotti nuovi esami per valutare l'attività del legame tra GPIIb/IIIa piastrinica e VWF con lo scopo di superare le limitazioni dell'esame VWF:RCO (30). Perciò, il comitato scientifico e di standardizzazione dell'ISTH (SSC) ha approvato una nuova nomenclatura che facilita la distinzione di tali esami che differiscono nei loro dettagli funzionali (31). Questa nomenclatura classifica tali esami come segue:

VWF:RCO. Per la valutazione del cofattore ristocetinico, vengono utilizzate piastrine intatte in diverse forme (native, fissate in formalina o liofilizzate ricostituite) e ristocetina. Questi esami sono suddivisi in esami di prima generazione (manuali), di seconda generazione (semi-automatici), di terza generazione (completamente automatizzati), di quarta generazione (modificati, completamente automatizzati), e metodi di citometria a flusso. Questi esami presentano alcune limitazioni, come un alto coefficiente di variazione (CV, che in alcuni casi può superare il 30% quando i valori sono <15 IU/dL), ampia variabilità da lotto a lotto di ristocetina o nel reagente piastrinico (preparato localmente o utilizzando liofilati commerciali) e l'intrinseca instabilità del sistema di analisi (32,33). Anche gli esami di prima e seconda generazione sono dispendiosi in termini di tempo e scarsamente standardizzati.

VWF:GPIIb/IIIaR. Il Ristocetin-triggered GPIIb binding assay utilizza ristocetina e un frammento GPIIb/IIIa catturato da un anticorpo monoclonale (mAb), rivestito su una piastra ELISA o su particelle di lattice o magnetiche. Sono disponibili diversi anticorpi per catturare il frammento GPIIb/IIIa, che può essere derivato da proteine plasmatiche o ricombinanti (34, 35). Esiste una buona correlazione tra VWF:RCO e VWF:GPIIb/IIIaR; tuttavia, quest'ultimo dimostra una precisione migliorata, un CV migliore e un limite inferiore di rilevamento (31).

VWF:GPIIb/IIIaM. Il Gain-of-function mutant GPIIb binding assay utilizza frammenti GPIIb/IIIa "gain-of-function" (rGPIIb/IIIaM), che si legano spontaneamente al VWF senza ristocetina. È possibile utilizzare diverse mutazioni "gain-of-function" della rGPIIb/IIIaM (36). Questi saggi immunologici utilizzano rGPIIb/IIIaM catturato da una piastra ELISA o da una particella al lattice, rivestita con un mAb. Questi esami sono ben correlati con il golden standard VWF:RCO; e i più recenti hanno una precisione, un CV e una sensibilità migliori (30, 37, 38).

VWF:Ab

Costituisce l'esame immunoturbidimetrico automatizzato al lattice. In questo saggio, un mAb è diretto contro un epitopo nel dominio VWF A1 coinvolto nel legame con GPIIb/IIIa. I vantaggi di questo esame includono la sua applicabilità a diverse piattaforme e,

quindi, la sua fattibilità per i laboratori di base. Poiché questo saggio misura VWF legandosi a un mAb e non alla GPIIb α , non è chiaro se questo anticorpo sia in grado di simulare accuratamente il legame in vivo di GPIIb α con il VWF (39). Pertanto, non può essere considerato un vero esame di attività né raccomandato in sostituzione del VWF:RCo.

Esami di secondo livello

Questi esami sono necessari per la definizione e la classificazione delle varianti della VWD. Devono essere utilizzati quando vengono riscontrati bassi livelli di VWF e/o quando esiste una significativa discrepanza tra la concentrazione del VWF e l'attività funzionale piastrino-dipendente (ad esempio se VWF:RCo/VWF:Ag <0,6). Livelli diminuiti di FVIII associati a valori normali o quasi normali di VWF, che portano ad un rapporto FVIII:C/VWF:Ag <1 (40), possono essere correlati al VWD di tipo 2N o all'emofilia A lieve.

VWF:CB

L'interazione del VWF con il collagene è cruciale in condizioni di alto *shear stress* per l'inizio della formazione del tappo piastrinico nel sito della lesione vascolare. Il sito primario del legame con il collagene fibrillare è il dominio A3 del VWF (41-43). Il von Willebrand factor collagen binding assay misura la capacità del VWF di legarsi al collagene. Come per il VWF:RCo, i risultati del VWF:CB dipendono dalla dimensione dei multimeri del VWF, il che significa che i multimeri più grandi si legano al collagene con maggiore affinità rispetto alle forme più piccole. La sensibilità e la capacità del saggio VWF:CB nel discriminare i sottotipi di VWD dipende dalla fonte e dal tipo di collagene utilizzato (44). L'esame VWF:CB può essere utilizzato come surrogato dell'analisi multimerica del VWF, ogni volta che quest'ultimo esame non è disponibile, allo scopo di valutare l'assenza di multimeri ad alto peso molecolare (HMWM). Anche se alcuni studi suggeriscono che l'esame VWF:CB può migliorare la differenziazione tra la VWD di tipo 2M da quella di tipo 2A, nella pratica clinica e di laboratorio, l'esame VWF:CB non fa parte degli esami di routine per la diagnosi della VWD (45, 46). I difetti di legame al collagene sono anche descritti nel VWD di tipo 2M (VWF:CB/VWF:Ag <0,6) a causa di mutazioni nel dominio A3 (47, 48). Attualmente sono disponibili in commercio diversi kit ELISA per valutare questa funzione del VWF.

RIPA

Pochi metodi biochimici sono disponibili per distinguere la VWD di tipo 2B dagli altri tipi di VWD (ad esempio dal tipo 2A o 1) (49-52). Tra questi, l'agglutinazione piastrinica indotta da ristocetina (RIPA) è la più utilizzata (8). La RIPA, eseguita utilizzando plasma del paziente ricco di piastrine (PRP), valuta l'affinità del VWF per il recettore piastrinico GPIIb α ,

utilizzando diverse concentrazioni di ristocetina. Pertanto, per questa analisi è obbligatoria la disponibilità di un campione di sangue fresco. Concentrazioni basse di ristocetina (<0,7 mg/mL) non causano l'agglutinazione delle piastrine nel PRP dei soggetti normali, mentre la stessa quantità di ristocetina è in grado di causare l'agglutinazione piastrinica nel PRP di pazienti con VWD di tipo 2B. Al contrario, a concentrazioni più elevate di ristocetina (tra 0,7 e 1,2 mg/mL) in grado di indurre l'agglutinazione piastrinica in soggetti normali, l'esame RIPA risulta compromesso nei pazienti di tipo 3, 2A e 2M (53). Le mutazioni *gain-of-function* del recettore piastrinico GPIIb α causano la VWD di tipo piastrinico (PT-VWD), nota anche come pseudo-VWD. L'esame RIPA non è in grado di distinguere la VWD di tipo 2B da PT-VWD; tuttavia, una diagnosi differenziale può essere fatta mediante un esame di miscela delle piastrine (53) o tramite l'analisi molecolare del VWF e del gene GPIIb α .

Analisi multimerica del VWF

Il pattern multimerico del VWF nel plasma è importante per la sua attività funzionale. Gli HMWM rappresentano la forma più attiva dal punto di vista emostatico del VWF. Queste molecole si legano al collagene e alle piastrine con affinità significativamente maggiore rispetto ai multimeri a basso peso molecolare. A causa delle loro dimensioni, gli HMWM sono anche più efficaci nel mediare l'adesione e l'aggregazione piastrinica, in particolare in condizioni di elevato *shear stress* (54).

L'analisi della struttura multimerica del VWF è complessa e richiede tempo, ma è utile nella diagnosi della VWD. L'analisi a bassa risoluzione (gel a bassa concentrazione di agarosio) può rilevare la perdita di HMWM, consentendo la distinzione dei pazienti con VWD di tipo 1 dai pazienti di tipo 2 e la distinzione tra il tipo 2A (perdita di HMWM e MWM) e il tipo 2M (normale pattern multimerico). L'utilizzo di gel a risoluzione intermedia consente di rivelare la struttura multimerica interna, mostrando la struttura a tripletta di ogni singolo oligomero. Nei soggetti normali, il modello a triplette consiste in una banda centrale e due sottobande esterne (55); in alcuni pazienti con VWD si possono osservare alterazioni della struttura della tripletta. Recentemente è stato introdotto sul mercato un metodo semi-automatico per l'analisi multimerica del VWF a bassa risoluzione.

VWF:FVIII B.

Il VWF-FVIII binding assay valuta la capacità del VWF di legare il FVIII. Questo esame è fondamentale per la diagnosi differenziale tra VWD di tipo 2N ed emofilia A lieve, poiché entrambe le condizioni sono associate ad una moderata riduzione dei livelli plasmatici di FVIII e livelli normali di VWF:Ag e VWF:RCo (FVIII:C/VWF:Ag <1) (40). L'esame VWF:FVIII B misura la capacità del plasma VWF di legare un FVIII esogeno usando un saggio immunologico in fase solida (56).

Nella diagnosi differenziale, i risultati ottenuti con questo esame possono essere:

- una normale capacità del VWF di legare il FVIII, con conseguente diagnosi di emofilia A lieve;
- una capacità marcatamente ridotta di VWF di legare FVIII, con conseguente diagnosi di VWD di tipo 2N;
- una capacità moderatamente ridotta del VWF di legare il FVIII. Questo risultato è tipico dei portatori asintomatici di difetti di tipo 2N che di solito presentano livelli normali di FVIII (FVIII:C/VWF: Ag >1), ed è anche stato osservato in alcuni pazienti con varianti di tipo 2A/IIe.

Analisi del VWF intrapiastrinico

Oltre che all'interno dei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali, il VWF è anche immagazzinato all'interno degli α granuli delle piastrine. A differenza del VWF plasmatico, questo pool di VWF piastrinico è particolarmente ricco di multimeri emostaticamente attivi (Ultra Large - VWF) (57).

Il VWF intrapiastrinico può essere valutato utilizzando gli stessi esami adottati per il VWF plasmatico (VWF:Ag, VWF:RCO, VWF:CB e analisi multimerica). Tuttavia, per interpretare correttamente i risultati, è necessario stabilire prima un intervallo di riferimento, ottenuto da una piccola popolazione di individui sani. Come per il RIPA, le piastrine devono essere isolate da un campione di sangue fresco. Pochi metodi sono disponibili per l'estrazione del VWF dalle piastrine e nessuno di questi è stato standardizzato.

Mannucci et al. (58) descrivono tre diversi sottogruppi di pazienti basati sui livelli di VWF delle piastrine:

- platelet low, con valori ridotti di VWF:Ag e VWF:RCO piastrinico;
- platelet normal, con valori normali di VWF:Ag e VWF:RCO piastrinico;
- platelet discordant, con concentrazioni normali di VWF:Ag piastrinico, ma con una riduzione sproporzionata di VWF:RCO.

Queste sottocategorie sono state descritte per predire la risposta del VWF plasmatico del paziente alla somministrazione di desmopressina [1-desamino-8-D-arginina vasopressina (DDAVP)], e quindi potrebbero essere clinicamente utili.

Esame di infusione con vasopressina

La DDAVP è un derivato sintetico dell'ormone antidiuretico vasopressina che stimola il rilascio di VWF dai corpi di cellule endoteliali di Weibel-Palade (59, 60). La DDAVP è stata usata per trattare le forme lievi di VWD e il suo meccanismo di azione farmacologica e le indicazioni sono state ampiamente esaminate (3, 59-61). L'esame DDAVP può essere utilizzato per valutare la reattività del paziente prima della somministrazione di DDAVP per la prevenzione o il trattamento del sanguinamento. Per testare la risposta del paziente, viene somministrata per via sottocutanea o endovenosa una dose terapeutica di DDAVP (0,3 μ g/kg di peso corporeo) e i tre parametri FVIII:C, VWF:Ag e VWF:RCO vengono misurati al tempo 0 e a 1, 2 e 4 ore dopo

l'infusione. La valutazione a 4 ore dopo l'infusione è necessaria per identificare i pazienti con maggiore clearance di VWF che sono possibili candidati per trattamenti alternativi (62).

VWFpp/VWF:Ag

Un aumento del rapporto tra il propeptide del VWFpp e VWF (VWFpp/VWF: Ag), che è un marcatore di una elevata clearance del VWF, è stato riscontrato in pazienti con VWD e in pazienti con coagulazione intravascolare disseminata (63-65). Sono disponibili in commercio diversi kit ELISA per la misurazione della concentrazione plasmatica di VWFpp. Tuttavia, il metodo è relativamente nuovo e non ancora diffusamente utilizzato nella diagnosi di VWD. La valutazione del rapporto VWFpp/VWF:Ag è una buona alternativa all'esame DDAVP per studiare la velocità della clearance del VWF (66).

VARIABILITÀ EXTRA-ANALITICA

Variabilità biologica

I gruppi sanguigni ABO hanno un effetto significativo sulle concentrazioni plasmatiche del VWF e del FVIII (67). I soggetti con gruppo sanguigno di tipo O presentano concentrazioni di VWF inferiori del 25% circa rispetto agli individui con gruppi sanguigni non-O, come conseguenza della maggiore clearance del VWF correlata alla presenza di antigeni O sulle molecole del VWF rispetto alle molecole VWF che presentano antigeni non-O (68). Entrambi i livelli di VWF e FVIII aumentano con l'età. Negli adulti il VWF aumenta all'incirca dall'1% al 2% all'anno (69).

Variabilità pre-analitica

La fase pre-analitica comprende varie procedure, dalla preparazione del paziente alla raccolta, gestione, trasporto e conservazione dei campioni. La fase pre-analitica è considerata la parte più vulnerabile dell'intero processo degli esami di laboratorio e le problematiche pre-analitiche rappresentano circa il 70% degli errori di laboratorio. Prima di eseguire esami di laboratorio per la malattia di Willebrand è importante considerare la storia clinica del paziente per rilevare eventuali situazioni patologiche note per influenzare i livelli di VWF (ad esempio, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni, neoplasie, malattie linfoproliferative o mieloproliferative e ipotiroidismo).

La gravidanza e i contraccettivi orali devono essere considerati in quanto associati a elevati livelli dei fattori procoagulanti, incluso il VWF. È importante evitare lo stress (ad esempio, ansia o pianto, nel caso di bambini spaventati) prima del prelievo di sangue poiché aumenta le proteine di fase acuta (ad esempio, VWF e FVIII) (70). L'esercizio fisico non è raccomandato fino a 2 ore prima del prelievo e i soggetti devono riposare almeno 5 minuti prima del prelievo. Altri fattori esterni, come l'infiammazione e la chirurgia, aumentano i livelli

plasmatici di VWF (70).

Di conseguenza, è spesso necessaria la ripetizione degli esami in soggetti sospettati di VWD e bassi livelli di VWF devono essere confermati su almeno due prelievi di sangue in occasioni separate.

Relativamente alla raccolta, manipolazione e trasporto di campioni, il College of American Pathologists (CAP), così come il Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), raccomandano la raccolta del sangue nella soluzione di citrato tamponato al 3,2%. Dopo la raccolta, è importante miscelare tempestivamente il sangue per inversione per assicurare la distribuzione dell'anticoagulante, mentre l'agitazione eccessiva deve essere evitata poiché induce emolisi e/o attivazione di piastrine e fattori. Campioni emolizzati, itterici e lipemici possono compromettere i risultati degli esami. Prima dell'esecuzione, i campioni devono essere valutati per la presenza di coaguli, emolisi, ittero e lipemia (32, 33). Tuttavia, la maggior parte degli strumenti di coagulazione dispone oggi di sistemi di rilevamento delle interferenze ottiche a più lunghezze d'onda per rilevare la presenza di campioni non idonei.

La temperatura e il trasporto sono variabili chiave nella gestione dei campioni. Il trasporto di sangue intero in condizioni refrigerate non è raccomandato. I campioni devono essere trasportati a temperatura ambiente (15-25 °C) nel più breve tempo possibile (70,71).

Il trasporto a basse temperature (tra 2 e 8°C) prima della centrifugazione può causare diminuzioni spurie nel VWF e nel FVIII (70). Dopo il prelievo, il sangue intero deve essere processato rapidamente (idealmente entro 1 ora) per ottenere il plasma. Le analisi per il VWF devono essere eseguite su plasma povero di piastrine (32); per assicurare la rimozione delle piastrine, la centrifugazione dovrebbe preferibilmente essere condotta a ~ 1500 g per 15 minuti a temperatura ambiente allo scopo di ottenere una conta piastrinica $<10 \times 10^9/L$. Dopo la centrifugazione, se gli esami possono essere completati entro 2 ore, le provette devono rimanere tappate e mantenute a temperatura ambiente. Se non è possibile, i campioni devono essere congelati, preferibilmente a -70°C e analizzati entro 18 mesi (71). L'utilizzo di congelatori a temperature più alte (ad esempio -20°C) non consente tempi di conservazione prolungati.

I campioni congelati possono deteriorarsi durante il trasporto; si consiglia una consegna rapida e le aliquote devono essere consegnate con ghiaccio secco. Per evitare la formazione di crioprecipitato, i campioni di plasma congelati devono essere scongelati per almeno 5 minuti a 37°C in un bagno d'acqua prima dell'esecuzione degli esami; i campioni devono poi essere mescolati delicatamente.

CLASSIFICAZIONE

Come precedentemente affermato, l'attuale classificazione della VWD si basa su difetti quantitativi parziali o completi (VWD tipo 1 e 3) o qualitativi (VWD tipo 2) del VWF (tabella 1).

VWD tipo 1

La VWD di tipo 1 è caratterizzata da una carenza quantitativa parziale di VWF. Le manifestazioni emorragiche nei pazienti con VWD di tipo 1 sono attribuite ad una diminuzione della concentrazione di VWF, e non a una diminuzione selettiva dei multimeri emostaticamente efficaci o ad anomalie specifiche nei siti di legame (72). Tipicamente nella VWD di tipo 1 si riscontrano ridotti livelli di VWF con attività funzionali normali rispetto a VWF:Ag. La proporzione di HMWM sul totale dei multimeri VWF è normale o non particolarmente diminuita (8).

La VWD di tipo 1 è di solito ereditata con modalità di trasmissione autosomica dominante, anche se sono state riportate forme gravi di VWD di tipo 1 a causa di eterozigoti composti (73).

È molto importante sottolineare inoltre le difficoltà nella diagnosi differenziale tra VWD di tipo 1 e ridotti livelli di VWF. In questi casi la sintomatologia emorragica può essere dirimente al riguardo (74).

VWD tipo 2

La classificazione di tipo 2 si basa su specifici difetti funzionali del VWF che compromettono l'aggregazione e/o l'adesione piastrinica o compromettono l'emivita del FVIII plasmatico (8). La tabella 1 fornisce un riepilogo delle varianti qualitative del VWF (VWD tipo 2) che sono descritte in dettaglio di seguito.

VWD tipo 2A

Il VWD tipo 2A è caratterizzato da una diminuzione dell'adesione piastrinica VWF-dipendente dovuta a carenza selettiva di HMWM. La perdita di HMWM è associata a diminuzione delle interazioni tra piastrine e VWF (i.e. VWF:RCo) e tra VWF e collagene (i.e. VWF:CB) (75) rispetto a VWF:Ag. Il VWD tipo 2A è un gruppo eterogeneo di varianti (ulteriormente classificate come IIA, IIE, IID e IIC) in cui ciascun sottogruppo è caratterizzato da un diverso meccanismo patogenetico molecolare. Con l'eccezione del VWD tipo 2A IIC, le varianti di tipo 2A sono ereditate con un modello autosomico dominante. Allo stato attuale, la discriminazione tra diverse varianti di tipo 2A richiede l'analisi multimerica a risoluzione intermedia o il sequenziamento del VWF; queste tecniche non sono disponibili presso tutti i laboratori (8).

Le varianti più comuni di tipo 2A, riportate nella precedente versione della classificazione VWD come IIA (75), sono caratterizzate dalla perdita di MWM elevati e intermedi, che può derivare da difetti nell'assemblaggio e nella secrezione dei multimeri o da aumentata suscettibilità intrinseca al taglio proteolitico da parte di ADAMTS-13 (8).

La seconda variante più comune di VWD tipo 2A, precedentemente identificata come IIE (76), è caratterizzata da una modesta perdita di HMWM, associata all'assenza delle bande di triplette satellite a causa di una ridotta suscettibilità alla proteolisi di

Tabella 1

Classificazione della malattia di von Willebrand in tipi (A) e sottotipi e relativi esami di laboratorio (B).

A) Modificata da Leebeek FWG et al. Von Willebrand Disease. *N Engl J Med* 2017;376:701-2.

Meccanismo patogenetico	Classificazione
Nessuno	Soggetti con valori normali di VWF
Sintesi di bassi livelli di VWF	Low VWF
Assenza di sintesi del VWF	VWD di tipo 3
Ridotta sintesi di VWF normale	VWD di tipo 1
Ritenzione intracellulare del VWF Aumento della clearance del VWF	VWD di tipo 1
Diminuzione adesione piastrinica per deficit dei multimeri ad HMW Difetto di multimerizzazione	VWD di tipo 2A
Difetto di dimerizzazione	VWD di tipo 2A
Aumento della proteolisi operata dall'ADAMTS13	VWD di tipo 2A
Aumento spontaneo del legame con la GPIIb	VWD di tipo 2B
Diminuzione della adesione piastrinica o del legame con il collagene senza perdita dei multimeri HMW	VWD di tipo 2M
Diminuzione di legame con il FVIII	VWD di tipo 2N

VWF, fattore di von Willebrand; VWD, malattia di von Willebrand; HMW, multimeri ad alto peso molecolare; ADAMTS13, A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13; GPIIb, glicoproteina Iba; FVIII, fattore VIII.

B) Modificata da National Heart, Lung, and Blood Institute. *The diagnosis, evaluation, and management of von Willebrand disease*. Bethesda, Md.: National Institutes of Health; NIH publication no. 08-5832. <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd>.

Esame	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2M	Tipo 2N	Tipo 3	Valori di riferimento
VWF:Ag	↓	↓	↓	N/↓	N/↓	↓↓↓	50-200 UI/dL
VWF:GPIIbM o VWF:RCo	↓	↓↓	↓↓	↓	N/↓	↓↓↓	50-200 UI/dL
VWF:GPIIbM/VWF:Ag o VWF:RCo/VWF:Ag	N	↓	↓	↓	N	-	>0,6
VWF:CB	↓	↓↓	↓↓	N/↓	N/↓	↓↓↓	50-200 UI/dL
VWF:CB/VWF:Ag	N	↓	↓	N/↓	N	-	>0,6
FVIII:C	N/↓	N/↓	N/↓	N/↓	↓	↓	50-150 UI/dL
FVIII:C/VWF:Ag	N	N	N	N	↓	-	>0,7

VWF:Ag, antigene di von Willebrand; VWF:GPIIbM, glicoproteina Ib mutata del fattore di von Willebrand; VWF:RCo, attività ristocetinica; VWF:CB, attività di legame con il collagene; FVIII:C, attività del Fattore VIII..

ADAMTS-13. Una rara variante di VWD tipo 2A, precedentemente identificata come IID (77), è caratterizzata dalla perdita di HMWM, associata alla presenza di bande "dispari" nell'analisi multimerica a risoluzione intermedia. Una variante rara, in precedenza identificata come IIC (78), è caratterizzata dalla perdita di multimeri ad alto e intermedio peso molecolare, associata all'assenza delle triplette a causa della ridotta suscettibilità alla proteolisi da parte di ADAMTS-13. Come menzionato sopra, il VWD tipo 2A IIC è ereditato con modalità di trasmissione autosomica recessiva.

VWD tipo 2B

Il VWD di tipo 2B è dovuto all'aumentata affinità del VWF per il recettore piastrinico GPIIb ed è caratterizzato da un esame RIPA alterato (cioè da un'agglutinazione piastrinica indotta da basse concentrazioni di ristocetina) (49). La maggiore affinità di questa variante VWF per GPIIb piastrinica porta al legame spontaneo di VWF alle piastrine *in vivo*, con conseguente formazione di aggregati e perdita di HMWM e occasionalmente trombocitopenia (79). Inoltre, l'interazione spontanea tra VWF e GPIIb accelera la proteolisi di VWF da parte dell'ADAMTS-13, con conseguente ulteriore consumo dei HMWM (80). La variante di tipo 2B è trasmessa come malattia autosomica dominante e condivide la maggior parte delle caratteristiche cliniche e di laboratorio del Platelet Type - Von Willebrand Disease (PT-VWD), che è una rara malattia emorragica autosomica dominante descritta per la prima volta da Weiss e Miller (81, 82). Il PT-VWD è anche caratterizzato da un RIPA aumentato, ma in questo caso l'interazione spontanea tra VWF e il recettore piastrinico GPIIb è dovuta alla presenza di mutazioni *gain-of-function* nel recettore piastrinico (83).

VWD tipo 2M

Il VWD di tipo 2M è caratterizzato da una ridotta adesione piastrinica VWF-mediata non associata all'assenza di HMWM. Le mutazioni identificate nei pazienti con VWD di tipo 2M comportano un difetto di interazione del VWF con la GPIIb piastrinica o con il collagene, ma non pregiudicano l'assemblaggio dei multimeri (da cui la denominazione M). La riduzione del legame piastrinico riduce l'esposizione delle subunità del VWF alla scissione mediata dall'ADAMTS-13, con conseguente riduzione delle bande satelliti. La variante 2M è ereditata con modalità autosomica dominante. La maggior parte dei casi di VWD tipo 2M sono stati identificati in base a un valore di VWF:RCo sproporzionatamente basso rispetto al VWF:Ag. Gli esami di primo livello (FVIII:C, VWF:Ag e VWF:RCo) per VWD tipo 2M e 2A sono simili e la diagnosi differenziale è possibile eseguendo l'analisi dei multimeri (84). Sono stati anche segnalati diversi casi di pazienti VWD di tipo 2M con VWF:CB sproporzionatamente basso rispetto al VWF:Ag (47, 48).

VWD tipo 2N

Il VWD di tipo 2N è caratterizzato da una ridotta capacità del VWF di legarsi al FVIII. La prima descrizione di questa variante è stata fatta in un paziente della Normandia (di qui la denominazione N). In particolare, il FVIII:C è diminuito rispetto al livello normale del VWF:Ag e anche il pattern dei multimeri è normale. Pertanto, il VWD di tipo 2N può essere erroneamente diagnosticato come emofilia A lieve, sebbene la prima sia una malattia autosomica recessiva mentre quest'ultima viene ereditata come una malattia legata al cromosoma X.

La diagnosi differenziale viene fatta utilizzando un immunodosaggio in fase solida per valutare la capacità del VWF del paziente di legare il FVIII (VWF:FVIII:B) (56). In alternativa, è possibile eseguire l'analisi genetica di FVIII e VWF. A differenza del tipo 2B, del tipo 2M e della maggior parte delle varianti del tipo 2A, il tipo 2N VWD è ereditato con modalità autosomica recessiva.

VWD tipo 3

La VWD di tipo 3 è caratterizzata da assenza completa di VWF sia nel plasma che nelle piastrine (85). Il tipo 3 di VWD è ereditato come carattere recessivo e i parenti eterozigoti di solito presentano sintomi di sanguinamento lievi o nulli (86,87). I valori di VWF:Ag, VWF:RCo e VWF:CB sono <1 IU/dL e anche i livelli del FVIII:C sono molto bassi (<10 UI/dL) (88).

SINDROME DI VON WILLEBRAND ACQUISITA

La sindrome di von Willebrand acquisita (AVWS) è una rara malattia emorragica causata da alterazioni della concentrazione, della struttura o della funzione del VWF. L'AVWS si manifesta in individui senza precedente storia personale o familiare di sanguinamento. La sindrome è associata a malattie linfoproliferative o mieloproliferative, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni e cancro, e di solito si presenta negli anziani. I risultati degli esami di laboratorio nei pazienti con AVWS sono simili a quelli dei pazienti con VWD e possono includere valori diminuiti di VWF:Ag, VWF:RCo e FVIII:C. La distribuzione dei multimeri può essere normale, ma in alcuni pazienti potrebbero mancare gli HMWM (in analogia al difetto di tipo 2) (89, 90). L'aumento della clearance plasmatica del VWF è uno dei meccanismi patogenetici che sono stati proposti per spiegare il deficit di VWF nei pazienti con AVWS (58).

Alloanticorpi e autoanticorpi VWF

Alloanticorpi contro il VWF sono una complicanza rara, con una prevalenza stimata che va dal 5,8% al 9,5% dei pazienti VWD di tipo 3 (91-93). Non ci sono segnalazioni sullo sviluppo degli alloanticorpi anti-VWF nella VWD tipo 1 o tipo 2. I pazienti con alloanticorpi anti-VWF di solito non hanno risposta emostatica ai

concentrati di VWF somministrati. I pazienti che hanno sviluppato un inibitore, specialmente quelli con alloanticorpi anti-VWF ad alto titolo, possono presentare reazioni anafilattiche gravi o potenzialmente letali in caso di riesposizione al VWF. Questi casi sono caratterizzati dall'attivazione del sistema del complemento e dalla formazione del complesso immunitario (93).

Mentre gli alloanticorpi anti-VWF sono esclusivi per i pazienti VWD di tipo 3 ripetutamente esposti al VWF, gli autoanticorpi giocano un ruolo nella patogenesi di alcuni pazienti con AVWS, in particolare quelli con disturbi linfoproliferativi. Al contrario dell'emofilia acquisita, che è dovuta agli autoanticorpi neutralizzanti il FVIII, una varietà di meccanismi patogenetici possono causare alterazioni strutturali o funzionali del VWF nella AVWS. Questi meccanismi includono autoanticorpi, che interferiscono con il legame FVW-piastrina (94,95) o con il collagene (FVW-collagene) (96,97) o aumentano la clearance del VWF dal plasma del paziente (98).

Solo il 20% dei pazienti con AVWS ha autoanticorpi contro il VWF; i metodi disponibili potrebbero non essere adeguatamente sensibili per rilevare anticorpi o l'AVWS potrebbe non avere sempre una base autoimmune (4).

Tuttavia, la presenza di autoanticorpi anti-VWF, insieme a diatesi emorragica tardiva, storia familiare di sanguinamento negativo, risultati di laboratorio che mimano la VWD e la presenza di una patologia di base solitamente associata all'AVWS, supportano ulteriormente la diagnosi di AVWS. Inoltre, il monitoraggio dei livelli di autoanticorpi VWF e anti-VWF potrebbe aiutare i clinici nella verifica dell'efficacia del trattamento.

Esami per la rilevazione di alloanticorpi anti-VWF

Non esiste un approccio standard di laboratorio per l'identificazione degli alloanticorpi anti-VWF. Le analisi disponibili si basano sul principio di studi di miscela per dimostrare l'inibizione della funzione piastrinica del VWF, sebbene esistano raccomandazioni per valutare la funzione del VWF in modo più ampio (incluso il collagene e il legame al FVIII) (99).

Gli esami di miscela sono simili agli esami di Bethesda per la ricerca degli inibitori dei pazienti emofilici. Le attività del VWF sono valutate in una miscela di plasma del paziente e di un pool di plasmi normali (NPP) dopo 2 ore di incubazione a 37 °C. Il titolo di inibitore anti-VWF è calcolato dalla diluizione del plasma del paziente in grado di inibire il 50% del NPP diluito 1:2 rispetto alla miscela di controllo. Risultati negativi dell'esame di miscela non possono escludere completamente gli inibitori, poiché gli alloanticorpi potrebbero influire su regioni non funzionali della proteina VWF.

Esami per la rilevazione degli autoanticorpi anti-VWF

La presenza di autoanticorpi sembra essere associata a una più marcata tendenza al sanguinamento nei pazienti con AVWS (99-100). A differenza

dell'emofilia acquisita, che è sempre caratterizzata da autoanticorpi anti-FVIII neutralizzanti, nell'AVWS gli autoanticorpi contro il VWF sono raramente identificati con gli studi di miscela che rilevano l'attività funzionale del VWF. Questi esami potrebbero non riuscire a rilevare autoanticorpi a basso titolo, ma clinicamente importanti. Pertanto, gli studi di miscela sono raramente utili nella diagnosi clinica di AVWS. Tiede et al e Siaka et al hanno descritto due saggi ELISA, utilizzando VWF purificato legato alle piastre, per rilevare autoanticorpi anti-VWF (101, 102) indipendentemente dalla loro attività neutralizzante. Di recente, Franchi et al. (103) hanno descritto un nuovo approccio combinato (un saggio ELISA seguito da un esame di conferma) per rilevare autoanticorpi anti-VWF.

CONCLUSIONI

La diagnosi di laboratorio della VWD è oggi alla portata di laboratori non specialistici grazie anche alla introduzione di nuovi metodi implementati sui coagulometri di ultima generazione o grazie all'utilizzo di nuove tecnologie. L'approccio al paziente con sospetto di VWD non può prescindere da tappe di approccio graduale che prevedano uno screening preliminare, esami di primo e di secondo livello. Sia gli esami di primo che di secondo livello devono essere interpretati in maniera corretta tenendo in debito conto l'importante influenza che rivestono sia le variabili biologiche che le variabili pre-analitiche.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Von Willebrand E. Hereditar pseudoemofilia. Fin Lakaresallsk Handl 1926;68:87-112.
2. Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand Disease. *Thromb Haemost* 2000;84:160-74.
3. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2004;351:683-94.
4. Nichols WL, Hultin MB, James AH, et al. Von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008;14:171-232.
5. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987;69:454-59.
6. Battle J, Perez-Rodriguez A, Corrales I, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost* 2016;115:40-50.
7. Castaman G, Goodeve A, Eikenboom J. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Haematologica* 2013;98:667-74.
8. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand

- Factor. *J Thromb Haemost* 2006;4:2103-14.
9. Jin SY, Skipwith CG, Zheng XL. Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood* 2010;115:2300-10.
 10. Fujimura Y, Fukui H, Usami Y, et al. Domain structure of human von Willebrand factor, and its modulators involved in the platelet adhesion process in vitro. *Rinsho Ketsueki* 1991;32:475-80.
 11. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl 1):24-7.
 12. Meyer D, Girma JP. von Willebrand factor: structure and function. *Thromb Haemost* 1993;70:99-104.
 13. Pimanda J, Hogg P. Control of von Willebrand factor multimer size and implications for disease. *Blood Rev* 2002;16:185-92.
 14. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:217-46.
 15. Bonthron DT, Handin RI, Kaufman RJ, et al. Structure of prepro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature* 1986;324:270-3.
 16. Purvis AR, Sadler JE. A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization. *J Biol Chem* 2004;279:49982-8.
 17. Vischer UM, Wagner DD. von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood* 1994;83:3536-44.
 18. Luo GP, Ni B, Yang X, et al. von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol* 2012;128:158-69.
 19. Verweij CL. Biosynthesis of human von Willebrand factor. *Haemostasis* 1988;18:224-45.
 20. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, et al. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* 2009;324:1330-4.
 21. Lak M, Peyvandi F, Mannucci PM. Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2000;111:1236-9.
 22. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006;4:766-73.
 23. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8:2063-5.
 24. Elbatarny M, Mollah S, Grabell J, et al. Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the Merging Project. *Haemophilia* 2014;20:831-5.
 25. Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1990;16:1-20.
 26. Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, et al. Evaluation of the PFA-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1999;82:35-9.
 27. Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, et al. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost* 2004;2:892-8.
 28. Potgieter JJ, Damgaard M, Hillarp A. One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A. *Eur J Haematol* 2015;94:38-44.
 29. MacFarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, et al. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* 1975;34:306-8.
 30. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, et al. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 2013;19:338-42.
 31. Bodo I, Eikenboom J, Montgomery R, et al. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015;13:1345-50.
 32. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, et al. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost* 2009;7:1832-9.
 33. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood* 2010;116:280-6.
 34. Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Schlamadinger A, et al. Plasma glycoconjugate as a source of GPIIb/IIIa in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thromb Haemost* 2005;93:165-71.
 35. Federici AB, Canciani MT, Forza I, et al. A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Iba for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Haematol* 2004;89:77-85.
 36. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Gain-of-function GPIIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood* 2011;117:e67-e74.
 37. Patzke J, Budde U, Huber A, et al. Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIIb binding in the absence of ristocetin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25:860-70.
 38. Geisen U, Zieger B, Nakamura L, et al. Comparison of von Willebrand factor (VWF) activity VWF:Ac with VWF ristocetin cofactor activity VWF:RCo. *Thromb Res* 2014;134:246-50.
 39. Pinol M, Sales M, Costa M, et al. Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. *Haematologica* 2007;92:712-3.
 40. Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2009;94:610-5.
 41. Pareti FI, Niiya K, McPherson JM, et al. Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J Biol Chem* 1987;262:13835-41.
 42. Flood VH, Schlauderer AC, Haberichter SL, et al. Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen. *Blood* 2015;125:2297-304.
 43. Morales LD, Martin C, Cruz MA. The interaction of von Willebrand factor-A1 domain with collagen: mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational change in A1 domain induced by collagen. *J Thromb Haemost* 2006;4:417-25.
 44. Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (vWF:CBA): detection of von Willebrand disease (vWD), and discrimination of vWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000;83:127-35.
 45. Flood VH, Gill JC, Friedman KD, et al. Collagen binding provides a sensitive screen for variant von Willebrand disease. *Clin Chem* 2013;59:684-91.
 46. Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Hematol* 2017;92:114-8.
 47. Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, et al. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb Haemost* 2001;86:848-54.

48. Riddell AF, Gomez K, Millar CM, et al. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* 2009;114:3489-96.
49. Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, et al. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 1980;302:1047-51.
50. Scott JP, Montgomery RR. The rapid differentiation of type IIb von Willebrand's disease from platelet-type (pseudo-) von Willebrand's disease by the "neutral" monoclonal antibody binding assay. *Am J Clin Pathol* 1991;96:723-8.
51. Caron C, Hilbert L, Vanhoorelbeke K, et al. Measurement of von Willebrand factor binding to a recombinant fragment of glycoprotein Ibalpha in an enzyme-linked immunosorbent assay- based method: performances in patients with type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2006;133:655-63.
52. Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, et al. Evaluation of a heterogeneous group of patients with von Willebrand disease using an assay alternative to ristocetin induced platelet agglutination. *J Thromb Haemost* 2015;13:1806-14.
53. Favaloro EJ, Patterson D, Denholm A, et al. Differential identification of a rare form of platelet-type (pseudo-) von Willebrand disease (VWD) from Type 2B VWD using a simplified ristocetin-induced-platelet agglutination mixing assay and confirmed by genetic analysis. *Br J Haematol* 2007;139:623-6.
54. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, et al. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest* 1985;76:1102-6.
55. Ott HW, Griesmacher A, Schnapka-Koepf M, et al. Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection. *Am J Clin Pathol* 2010;133:322-30.
56. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, et al. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 1989;74:1591-9.
57. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, et al. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 1988;71:1366-74.
58. Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, et al. Heterogeneity of Type I von Willebrand Disease: Evidence for a Subgroup with an Abnormal von Von Willebrand Factor. *Blood* 1985;66:796-802.
59. Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003;1:682-9.
60. Federici AB. The use of desmopressin in von Willebrand disease: the experience of the first 30 years (1977-2007). *Haemophilia* 2008;14Suppl1:5-14.
61. Mannucci PM, Franchini M, Castaman G, et al. Italian Association of Hemophilia Centers. Evidence-based recommendations on the treatment of von Willebrand disease in Italy. *Blood Transfus* 2009;7:117-26.
62. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, et al. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood* 2008;111:3531-9.
63. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood* 2006;108:3344-51.
64. Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, et al. Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance. *J Thromb Haemost* 2005;3:2228-37.
65. Habe K, Wada H, Ito-Habe N, et al. Plasma ADAMTS13, von Willebrand factor (VWF) and VWF propeptide profiles in patients with DIC and related diseases. *Thromb Res* 2012;129:598-602.
66. Casonato A, Daidone V, Padriani R. Assessment of von Willebrand factor propeptide improves the diagnosis of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:456-63.
67. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ Jr, et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987;69:1691-5.
68. Nitu-Whalley IC, Lee CA, Griffioen A, et al. Type 1 von Willebrand disease - a clinical retrospective study of the diagnosis, the influence of the ABO blood group and the role of the bleeding history. *Br J Haematol* 2000;108:259-64.
69. Sanders YV, Giezenaar MA, Laros-van Gorkom BA, et al. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype. *J Thromb Haemost* 2014;12:1066-75.
70. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, et al. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J* 2016;14:49 doi: 10.1186/s12959-016-0123-z.
71. Favaloro EJ, Nair SC, Forsyth CJ. Collection and transport of samples for laboratory testing in von Willebrand's disease (VWD): time for a reappraisal? *Thromb Haemost* 2001;86:1589-90.
72. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood* 2007;109:112-21.
73. Favaloro EJ. Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:299-319.
74. Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:106-12.
75. Lyons SE, Cooney KA, Bockenstedt P, et al. Characterization of Leu777Pro and Ile865Thr type IIA von Willebrand disease mutations. *Blood* 1994;83:1551-7.
76. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, et al. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID and IIE). *J Clin Invest* 1986;77:947-51.
77. Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, et al. Defective dimerization of the von Willebrand factor subunits due to a Cys->Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3581-6.
78. Lynch CJ, Cawte AD, Millar CM, et al. A common mechanism by which type 2A von Willebrand disease mutations enhance ADAMTS13 proteolysis revealed with a von Willebrand factor A2 domain FRET construct. *PLoS One* 2017;12:e0188405.017.
79. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 2009;113:526-34.
80. Nishio K, Anderson PJ, Zheng XL, et al. Binding of platelet

- glycoprotein Ib to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:10578-83.
81. Weiss HJ, Meyer D, Rabinowitz R, et al. Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. *N Engl J Med* 1982;306:326-33.
 82. Miller JL, Castella A. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder. *Blood* 1982;60:790-4.
 83. Othman M, Kaur H, Emsley J. Platelet-type von Willebrand disease: new insights into the molecular pathophysiology of a unique platelet defect. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:663-73.
 84. Meyer D, Fressinaud E, Hilbert L, et al. Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:349-64.
 85. Mannucci PM, Bloom AL, Larrieu MJ, et al. Atherosclerosis and von Willebrand factor. Prevalence of severe von Willebrand's disease in western Europe and Israel. *Br J Haematol* 1984;57:163-9.
 86. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, et al. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells, Mol & Dis* 2003;30:264-70.
 87. Mannucci PM, Lattuada A, Castaman G, et al. Heterogeneous phenotypes of platelet and plasma von Willebrand factor in obligatory heterozygotes for severe von Willebrand disease. *Blood* 1989;74:2433-6.
 88. Barbui T, Baudo F, Ciavarella N, et al. (Italian Working Group). Spectrum of von Willebrand's disease: a study of 100 cases. *Br J Haematol* 1977;35:101-12.
 89. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, et al. Acquired von Willebrand Syndrome: data from an International Registry. *Thromb Haemost* 2000;84:345-9.
 90. Veyradier A, Jenkins CS, Freissinaud E, et al. Acquired von Willebrand Syndrome: from Pathophysiology to Management. *Thromb Haemost* 2000;84:175-82.
 91. Mannucci PM, Federici AB. Antibodies to von Willebrand factor in von Willebrand disease. *Adv Exp Med Biol* 1995;386:87-92.
 92. Iorio A, Oliovecchio E, Morfini M, et al. Italian registry of haemophilia and allied disorders. Objectives, methodology and data analysis. *Haemophilia* 2008;14:444-53.
 93. James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 2013;122:636-40.
 94. Fricke WA, Brinkhous KM, Garris JB, et al. Comparison of inhibitory and binding characteristics of an antibody causing acquired von Willebrand syndrome: an assay for von Willebrand factor binding by antibody. *Blood* 1985;66:562-9.
 95. Mohri H, Tanabe J, Ohtsuka M, et al. Acquired von Willebrand disease associated with multiple myeloma; characterization of an inhibitor to von Willebrand factor BI. *Coag Fibrin* 1995;6:561-6.
 96. van Genderen PJJ, Vink T, Michiels JJ, et al. Acquired von Willebrand disease caused by an autoantibody selectively inhibiting the binding of von Willebrand factor to collagen. *Blood* 1994;84:3378-84.
 97. Guerin V, Ryman A, Velez F. Acquired von Willebrand disease: potential contribution of the von Willebrand factor collagen-binding to the identification of functionally inhibiting auto- antibodies to von Willebrand factor: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2008;6:1051-2.
 98. Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, et al. Studies of the Pathophysiology of Acquired von Willebrand Disease in Seven Patients with Lymphoproliferative Disorders or Benign Monoclonal Gammopathies. *Blood* 1984;64:614-21.
 99. Berntorp E, Peake I, Budde U, et al. von Willebrand's disease: a report from a meeting in the Aland islands. *Haemophilia* 2012;18:1-13.
 100. Mohri H, Motomura S, Kanamori H, et al. Clinical significance of inhibitors in acquired von Willebrand syndrome. *Blood* 1998;91:3623-9.
 101. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, et al. Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study. *J Thromb Haemost* 2008;6:569-76.
 102. Siaka C, Rugeri L, Caron C, et al. A new ELISA assay for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2003;9:303-8.
 103. Franchi F, Biguzzi E, Stufano F, et al. A two-step approach (Enzyme-linked immunosorbent assay and confirmation assay) to detect antibodies against von Willebrand factor in patients with Acquired von Willebrand Syndrome. *Thromb Res* 2014;134:1316-22.

Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: raccomandazioni per la fase postanalitica del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica Apparato Urinario (GIAU)

Fabio Manoni¹, Gianluca Gessori², Giovanni B. Fogazzi³, Maria G. Alessio⁴, Rudi Ravasio⁴, Alberta Caleffi⁵, Giovanni Gambaro⁶, Sandra Secchiero⁷, Barbara Pieretti⁸, Cosimo Ottomano⁹, Anna Liverani¹, Cettina Drago¹⁰, Fiamma Balboni¹¹, Maria G. Epifani⁷, Graziella Saccani¹², Giovanni Di Rienzo¹³, Sara Valverde², Giuliano Brunori¹⁴, Loreto Gesualdo¹⁵ a nome del Gruppo Interdisciplinare Analisi delle Urine (GIAU)

¹Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura, Ospedali Riuniti Padova Sud "Madre Teresa di Calcutta", Monselice (Padova)

²Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Madonna della Navicella, Chioggia (Venezia)

³Laboratorio Clinico e di Ricerca sul Sedimento Urinario, U.O. Di Nefrologia e Dialisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁴Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, ASST Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS, Bergamo

⁵U.O Diagnostica Ematochimica, Dipartimento Diagnostico, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Parma

⁶Divisione di Nefrologia e Dialisi, Fondazione Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

⁷Centro di Ricerca Biomedica, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

⁸UOC Laboratorio Analisi, Ospedale S. Croce, Fano (Pesaro-Urbino)

⁹Centro Analisi Monza, Monza; ¹⁰Laboratorio di Analisi Cliniche e Microbiologiche, Centro Cuore Morgagni, Pedara (Catania)

¹¹Laboratorio Analisi IFCA, Firenze

¹²Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Orlandi, Bussolengo (Verona)

¹³UOC Patologia Clinica, Ospedale Altamura, (Bari); ¹⁴UOC Nefrologia e Dialisi, Ospedale Santa Chiara, Trento

¹⁵Università degli Studi di Bari, Azienda Ospedaliero-Universitaria Consorziale "Policlinico" di Bari

ABSTRACT

Physical, chemical and morphological urine examination: recommendations for the postanalytical phase from the Interdisciplinary Urinalysis Group (GIAU).

This document of the Interdisciplinary Urinalysis Group (GIAU) is aimed to provide recommendations on how to improve and standardize the postanalytical approach to physical, chemical and morphological urine examination (ECMU). The main tool to emphasize the value of the ECMU is the development of a laboratory report suitable for the clinical needs. As a consequence, these recommendations are mainly related to the structure and content of the report. They include: the layout, the parameters to be included, the measurement units, the reference values, the inclusion of interpretative comments. Really, an important section of the report is dedicated to the interpretative comments: these are a real add-on value and are tailored on the type of laboratory performing the analysis (general or with a specific section dedicated to the urine examination). The different levels of the laboratory competence determine the category of possible comments. The basic one concerns comments that evaluate the non-conformity of the sample (i.e. presence of urethral, seminal, vaginal, faecal contamination; too concentrated/too diluted samples). The second level of comments is dedicated mainly to the reporting of the discrepancies between the biochemical analysis and the microscopy examination (i.e. presence of haemoglobin and no erythrocyte detection; presence of leucocyte esterase and no leucocyte detection). The third level requires a specific competence of the pathologist together with a strict collaboration with the clinic; these comments are elaborated on the basis of a specific clinical request. The detection of the "decoy cells" in immunosuppressed solid organ transplant recipients, that are typical of a poliovirus infection, is a good example of the third level of interpretative comments.

Questo documento è pubblicato congiuntamente da Biochimica Clinica, La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio e dalle Società Scientifiche che hanno partecipato alla sua stesura.

Corrispondenza a: Fabio Manoni, Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura, Ospedale Madre Teresa di Calcutta, Monselice, Padova, E-mail fabio.manoni@aulss6.veneto.it

Ricevuto: 17.12.2019

Accettato: 06.01.2020

Pubblicato on-line: 20.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.015

A final section of the document is dedicated to the opportunity to implement and adopt specific programs of external evaluation of the urinary sediment.

After the issuing of the recommendations dedicated to pre-analytical and analytical phases, this GIAU document gives suggestions for the standardisation and harmonisation of post-analytical phase in the attempt to emphasize the diagnostic importance of ECMU.

INTRODUZIONE

Il referto

Per la medicina di Laboratorio il referto è la traduzione di accertamenti diagnostici in un'informazione utilizzabile clinicamente. Nel classico schema del "Brain-to-brain loop" di Lundberg,(1) accanto al cervello del clinico, il Maestro A. Burlina (2) inseriva un secondo cervello, quello del laboratorista a simboleggiare il processo di professionalità e di competenze che guidava una catena di eventi caratterizzati da una forte matrice culturale e organizzativa, a snodarsi dalla fase pre-pre-analitica, fino alla fase post-post-analitica, sintetizzando una risposta sotto forma di referto. Il referto deve quindi la propria rilevanza al fatto che un risultato analitico venga trasformato in informazione utile al clinico. Alla base di questo processo di trasformazione vanno riconosciute l'attitudine, l'abilità e l'esperienza del professionista di laboratorio congiuntamente alle competenze dell'equipe che ha prodotto il risultato. Il ruolo del referto come indicatore, facilitatore e guida di appropriatezza ed efficacia clinica sono connotati largamente accettati (3). Il referto deve presentare basilari requisiti: fornire risultati esenti da errori, nei tempi utili alla corretta gestione del paziente, formulati in modo da favorire la loro corretta interpretazione e utilizzazione (4).

Il Gruppo Interdisciplinare laboratorio e clinica dell'Apparato Urinario (GIAU) nel corso degli anni ha prodotto e pubblicato le linee guida per la fase preanalitica e analitica dell'esame chimico-fisico e morfologico delle urine (ECMU) (5, 6). Si è ritenuto quindi di procedere alla stesura delle raccomandazioni per la fase postanalitica con l'intento di definire un documento rivolto sia ai laboratoristi, per uniformare e standardizzare un linguaggio comune delle risposte, sia ai clinici, per trasmettere loro uno strumento utile alla corretta comprensione e interpretazione in chiave clinica dei contenuti del referto dell'ECMU (7).

Definizione di linea guida

Le linee guida possono essere definite come *"raccomandazioni di comportamento clinico, elaborate mediante un processo di revisione sistematica della letteratura e delle opinioni di esperti, con lo scopo di aiutare i medici a decidere le modalità assistenziali più appropriate in specifiche situazioni cliniche"* (8). Le linee guida nascono quindi per rispondere a un obiettivo fondamentale: assicurare il massimo grado di appropriatezza degli interventi, riducendo al minimo

quella parte di variabilità nelle decisioni cliniche che è legata alla carenza di conoscenze e alla soggettività nella definizione delle strategie assistenziali (9).

Metodologia per il reperimento delle fonti

Queste raccomandazioni sono state sviluppate da un gruppo multiprofessionale e multidisciplinare, il GIAU appunto, impegnato a rivalutare l'esame delle urine per l'importanza che questo riveste nella diagnosi precoce delle alterazioni dell'apparato urinario. In particolare, in queste raccomandazioni vengono affrontate le tematiche relative alla fase postanalitica dell'ECMU e sulla base di una revisione sistematica della letteratura, sono state sviluppate delle raccomandazioni inerenti le modalità di refertazione.

Strategia di ricerca delle prove di efficacia

Le presenti raccomandazioni si basano su una revisione della letteratura, volta alla ricerca di prove di efficacia per fornire risposte ai quesiti individuati dal gruppo di lavoro. Il processo di ricerca delle prove di efficacia ha seguito una strategia di selezione gerarchica, secondo il principio di saturazione teoretica. L'analisi è iniziata con la ricerca di linee guida (studi terziari) pubblicate su questo argomento, selezionate sulla base di criteri di qualità, come indicato dalla metodologia AGREE (10). La ricerca ha condotto all'identificazione di alcune linee guida (5, 6, 11-14), che sono state utilizzate come riferimento nella stesura di questo documento.

La ricerca è poi proseguita con l'identificazione di studi primari e secondari che sono stati selezionati e inclusi partendo da quelli di livello superiore (revisioni sistematiche) e interrompendo la selezione al livello gerarchico più elevato al quale è stata identificata una prova di efficacia rilevante (8-10). In questo modo si è riusciti a fornire le risposte ai quesiti utilizzando il più elevato livello di prova di efficacia disponibile. Nell'attribuzione del livello delle prove di efficacia e del grado delle raccomandazioni, si è fatto riferimento ai principi adottati dal gruppo di lavoro del GRADE (15). Il grado della raccomandazione (forte o debole) è un giudizio finale basato sulla valutazione di diverse componenti il cui valore deve essere esplicitato contestualmente alla raccomandazione. Tutte le raccomandazioni sono state discusse, condivise e accettate dai componenti del gruppo di lavoro.

Un procedimento differente è stato invece adottato per la proposta dei commenti descrittivi e interpretativi con cui integrare il referto di ECMU. In assenza di una adeguata rilevante bibliografia sull'argomento si è

ritenuto di adottare una metodica di acquisizione del consenso utilizzando il metodo Delphi. Si tratta di una metodica che prevede che un gruppo di esperti esprima la propria opinione su di un questionario proposto da un facilitatore (o da un gruppo di facilitatori) inerente un problema complesso e sul quale non esista bibliografia adeguata. All'interno di un perimetro ristretto di consultazioni, i risultati vengono elaborati e riassunti in un documento che viene poi inviato a tutti i partecipanti che hanno la possibilità di confrontare ed eventualmente rivedere le proprie posizioni alla luce di quanto emerso. Il processo deve essere ripetuto più volte sino a ottenere un significativo allineamento delle opinioni espresse (16-20). In particolare, per la stesura delle raccomandazioni sui commenti all'ECMU abbiamo applicato il metodo Delphi in due fasi. La prima fase ha comportato l'invio di un questionario a 370 Specialisti in Medicina di Laboratorio iscritti a SIBioC e alla Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL), e la successiva elaborazione e presentazione/diffusione dei risultati ottenuti. Contemporaneamente, dal GIAU sono stati acquisiti i commenti utilizzati dai laboratoristi che hanno ritenuto di dividerli. La seconda fase ha comportato l'invio dello stesso questionario già elaborato a un gruppo multidisciplinare e multiprofessionale di esperti assieme ai commenti raccolti nella fase precedente, adeguatamente omogeneizzati e categorizzati. In questa seconda fase ciascun esperto componente il gruppo, in forma anonima, ha espresso la propria opinione. I risultati sono stati riassunti ed elaborati e inviati nuovamente al gruppo sino a quando non è stato raggiunto un grado di concordanza superiore al 90% degli esperti (21, 22).

Necessità di una linea guida

Si stima che, in Italia, nella popolazione adulta con più di 40 anni di età, circa 1 individuo ogni 7 (13%) abbia un grado qualsiasi di malattia renale cronica cui si va ad aggiungere la patologia urologica, anch'essa in incremento. Tale dato, colloca il laboratorio di fronte un ampio ventaglio di quesiti clinici cui deve essere data tempestivamente una risposta sia in termini di diagnosi precoce che di accurata definizione del processo patologico in atto (23, 24).

IL REFERTO DELL'ECMU

Per referto ECMU si intende la risposta a una richiesta del clinico relativa ad accertamenti volti a definire lo stato del paziente relativamente all'apparato urinario, contenente informazioni clinicamente utili. L'informazione è efficace solamente quando cambia lo stato del ricevente e ne modifica il livello di conoscenza. Questo aspetto, che è comune a moltissimi esami di laboratorio, è ancora più evidente quando il quesito non si riferisce a una possibile condizione di malattia e nemmeno a uno specifico costituente, ma all'esame generico di un liquido

biologico, come l'urina.

Se la domanda circostanziata è fondamentale perché una misura di laboratorio diventi un'informazione clinica, occorre anche che la risposta, espressione della misura, sia facilmente e inequivocabilmente compresa dall'interlocutore clinico ricevente. Una terminologia corretta deve descrivere la misura ma anche la tecnologia utilizzata, soprattutto se, allo stato dell'arte, coesistono più tecnologie, con sensibilità e specificità diverse.

La standardizzazione dell'espressione dei risultati può facilitare la comprensione dell'informazione non solo nella nomenclatura, ma anche nell'espressione delle unità di misura e della scala dei risultati.

Importante è anche il sistema di riferimento. Una misura diviene informazione se comparata con limiti che definiscono classificazioni di pazienti o con livelli decisionali. Interpretare gli esami di laboratorio significa confrontare i risultati degli esami con "riferimenti" che permettano un giudizio e di conseguenza un'azione. Lo scopo dei valori di riferimento è quello di fornire la base per interpretare i risultati di laboratorio all'interno delle valutazioni cliniche. Gli intervalli di riferimento sono sicuramente il sistema più utilizzato per poter costruire questi "riferimenti". Tuttavia la loro produzione, pur ben definita da numerosi standard, è in generale poco e mal applicata; inoltre, in alcune situazioni altre tipologie di "riferimenti" possono fornire livelli decisionali più robusti.

Il referto di ECMU è costituito solitamente da un profilo formulato su tre tipologie di esami: fisico, chimico e morfologico. L'impostazione del profilo di risposta deriva da una tradizione di oltre quarant'anni, da quando cioè le strisce reattive hanno modificato l'esame chimico-fisico e guidato il modo di esprimere i risultati.

La risposta del profilo urinario è l'anello terminale di una catena di azioni: richiesta, raccolta, valutazione dell'idoneità del campione, analisi, valutazione della congruenza tra esame chimico-fisico e microscopico, interpretazione del profilo in chiave clinica. È quindi evidente, come ampiamente illustrato nelle linee guida per la fase analitica, che il tradizionale profilo chimico si gioverebbe di una revisione che, procedendo dagli obiettivi clinici riguardanti la valutazione della funzione/lesione dell'apparato urinario, focalizzasse l'indagine sui soli parametri realmente utili (6). Per questo si delinea la necessità di esprimere attraverso il profilo di risposta, stratificato per livelli analitici, informazioni clinicamente rilevanti che derivino da campioni correttamente prelevati e analizzati con metodi affidabili ed efficaci.

La struttura

Considerando che alcuni aspetti sono comuni a qualunque referto di laboratorio, si elencano gli elementi caratterizzanti un referto ECMU:

- identità del soggetto il cui materiale è sottoposto ad

- analisi;
- data e ora di accettazione del campione;
- medico richiedente;
- il sistema, ovvero il materiale esaminato (solitamente con un simbolo convenzionale la cui legenda deve essere esplicitata: U, urine);
- denominazione dell'esame (nel caso dell'ECMU si tratta di un profilo costituito da diverse analisi);
- parametri costituenti il profilo che da luogo all'ECMU;
- metodo utilizzato per ogni parametro analizzato;
- unità di misura utilizzate;
- giudizio di idoneità del campione;
- risultato della misura analitica;
- valori di riferimento e/o eventuali livelli decisionali;
- risoluzione delle discordanze;
- commento/i;
- validazioni, ambito di responsabilità e firma.

Identità del soggetto il cui materiale è sottoposto ad analisi

Nome, cognome, data di nascita, domicilio, sono di norma sufficienti per identificare in modo univoco la persona il cui campione è oggetto di analisi. In alcune circostanze può non essere sufficiente e in tal caso dovranno essere valutati gradi superiori di identificazione. Questa precede l'identificazione del contenitore destinato alla raccolta; l'operatore addetto al ritiro del campione ha il compito di verificare la totale corrispondenza fra soggetto e campione da analizzare. Là dove possibile sarebbe opportuno indicare anche la provenienza del paziente, se ambulatoriale o, se ospedalizzato, da quale unità operativa.

Raccomandazione

Il referto deve riportare in modo completo l'identità e la provenienza, ambulatoriale o del reparto o servizio, del soggetto il cui campione è stato analizzato.

Data e ora di accettazione del campione

L'idoneità del campione è una condizione necessaria, anche se non sufficiente al fine di ottenere risultati attendibili. Uno dei criteri che definisce l'idoneità, è il tempo che intercorre dal momento della raccolta al momento dell'accettazione del campione. Pertanto, considerato il naturale decadimento al quale va incontro il campione urinario, è fondamentale conoscere data e ora di accettazione del campione. È fortemente raccomandato che dal momento della raccolta al momento della consegna non debba intercorrere un lasso di tempo superiore alle due ore. Il rispetto di questi tempi è necessario al fine di consentire l'analisi del campione nei tempi raccomandati nella linea guida della fase preanalitica (4 ore se il campione è conservato a temperatura ambiente, 6 ore se refrigerato a +4-8 °C) (5). È vivamente sconsigliata la raccolta serale del campione

e la conservazione in frigorifero dello stesso a partire dalla sera precedente.

Raccomandazione

il referto deve riportare data e ora di accettazione del campione.

Medico richiedente

Il medico che richiede l'indagine è l'interlocutore di riferimento per il referto e di qualunque comunicazione relativa al paziente: valori critici, anomalie repertate, non idoneità del campione. Soprattutto in casi complessi, la comunicazione con il curante è essenziale per orientare la diagnosi, valutare la progressione della malattia o l'efficacia delle cure. I recapiti dei medici curanti devono essere presenti e disponibili per queste comunicazioni.

Raccomandazione

il referto deve riportare il nome del medico richiedente l'esame.

Materiale esaminato

La descrizione del materiale esaminato nel caso dell'ECMU deve corrispondere al tipo di campione raccolto. Pertanto si raccomanda di elaborare una legenda che oltre a esplicitarlo con un simbolo convenzionale (U, urine), incorpori anche la tipologia del campione, ad esempio prima urina mattino (PUM), per differenziare il campione da altre modalità di raccolta per altri esami come ad esempio la seconda urina mattino (SUM) per la citologia, l'urina estemporanea per esami in urgenza (UES).

Raccomandazione

Il referto deve riportare il nome e la connotazione del materiale che è stato esaminato, espresso in una legenda.

Denominazione dell'esame

Come detto, ECMU è l'acronimo di Esame Chimico Morfologico Urine e delinea un profilo costituito da diverse analisi. Si raccomanda di mantenere questa denominazione tutte le volte che viene eseguito un profilo analitico completo che comprende: analisi visive, fisiche, chimiche, conteggio e morfologia della componente corpuscolata sia esso eseguito in microscopia che con analizzatori automatici.

Raccomandazione

Il referto deve riportare la denominazione dell'esame eseguito: ECMU nel caso si tratti di Esame Chimico Morfologico Urine.

Parametri costituenti il profilo ECMU

Come descritto nella linea guida della fase analitica, il profilo dell'ECMU è costituito da più parametri che vengono di seguito elencati. Si rimanda alla stessa linea guida per la descrizione nel referto delle diverse tipologie di parametri: irrinunciabili analiticamente o di indubbia utilità clinica; utili e di verifica analitica per il laboratorio; utili solo in particolari condizioni cliniche; parametri da evitare perché ritenuti inutili e/o obsoleti (6).

I parametri costituenti il profilo ECMU suddivisi nelle categorie menzionate sono:

- concentrazione urinaria (densità relativa o osmolalità o conduttività), emoglobina, albumina (proteine totali fino ai 2 anni di età), creatinina, esterasi leucocitaria, numero e morfologia degli elementi corpuscolati;
- pH, nitriti, ascorbato;
- glucosio, chetoni;
- bilirubina, urobilinogeno.

Quindi vanno refertati quei parametri che sono stati definiti obbligatori e di indubbia utilità clinica nella linea guida per la fase analitica di ECMU (6). Essi sono: densità relativa (conduttività e/o osmolalità), emoglobina, albumina o proteine totali, creatinina, esterasi leucocitaria, esame della frazione corpuscolata. A questi possono essere utilmente aggiunti ulteriori parametri che risultano rilevanti in particolari condizioni cliniche od operative: pH, nitriti, acetoacetato e acetone, glucosio. È fortemente sconsigliato inserire nel referto parametri obsoleti o privi di significato clinico come, la presenza di pigmenti biliari, l'ascorbato, la presenza di schiuma, o valutazioni sull'aspetto (6). Alcuni parametri invece devono essere refertati solo se francamente patologici. Ad esempio, non appare necessario riportare nel referto il colore delle urine nelle sue diverse, fisiologiche, sfumature di giallo (citrino, paglierino, oro, arancio, e così via); mentre deve essere riportato il rilievo di un colore patologico assieme alla interpretazione della sua possibile etiologia (Tabella 1).

Raccomandazione

Il referto deve riportare chiaramente espressi i parametri utili scelti sui quali è stata effettuata l'analisi, evitando di refertare parametri inutili e/o obsoleti.

Indicare il metodo utilizzato per ogni parametro analizzato

La scelta della metodica deve garantire adeguata sensibilità e specificità; è fondamentale pertanto che questa venga indicata nel referto. Considerata la diversità degli analiti che compongono l'ECMU, occorre specificare quali siano i metodi utilizzati per l'esecuzione dei singoli esami o loro raggruppamenti. I metodi possono essere diversi in relazione alla tipologia del laboratorio (di base o specialistica).

Tabella 1

Principali alterazioni del colore delle urine e loro possibili cause

Colore	Significato patologico	Farmaci	Alimenti
Rosso	Ematuria Porfirinuria Emoglobinuria Mioglobinuria	Cascara Desferroxamina Doxorubicina Levodopa Fenotiazine Fenitoina Rifampicina Senna (urine alcaline) Epirubicina Sulfametossazolo Ibuprofene	Barbabietole More Rabarbaro
Verde-blu	Ittero Infezioni urinarie da Pseudomonas "Blue diaper syndrome"	Amitriptilina Indometacina Blu di metilene Triamterene	
Marrone	Alkaptonuria Tirosinosi Porfirinuria Ittero	Cascara Ferro Levodopa Metronidazolo Metildopa Nitrofurantoina Fenotiazine Fenitoina Chinino Senna (urine alcaline)	
Nero	Febbre emoglobinurica in corso di alcune malattie infettive (Black water fever) Melanoma maligno	Cascara Ferro Metildopa Chinino	
Viola	Porfirinuria Sindrome da catetere vescicale (Purple urine bag syndrome)	Senna (urine alcaline)	

Indicare quindi se il laboratorio utilizza solo e sempre la chimica secca con strisce reattive o se alcuni analiti come l'albumina o le proteine totali, vengono misurati in chimica liquida o immunoturbidimetria, così come se la creatinina viene eseguita con metodo enzimatico o cinetico colorimetrico (Jaffè) o con striscia reattiva. Relativamente all'esame morfologico, è necessario indicare sul referto se lo stesso è eseguito in citofluorimetria, in microscopia automatizzata, a cattura di immagini o microscopia manuale in campo chiaro o in contrasto di fase specificando l'ingrandimento utilizzato.

Raccomandazione

Il referto deve riportare sempre il metodo utilizzato per l'esecuzione dell'analisi di ogni parametro.

Unità di misura

La espressione nel referto della unità di misura utilizzata per esprimere i risultati è assolutamente necessaria per comunicare "il valore" di un determinato parametro con una definizione chiara e univoca della quantità. Le unità di misura garantiscono l'utilità, la riproducibilità e il confronto dei risultati. Esse non sono arbitrarie, bensì codificate per nomenclatura e simbologia all'interno di un sistema di unità di misura, allo scopo di facilitare una immediata comprensione. Con il DPR 12/08/1982 n° 802 è stato adottato per legge anche in Italia il Sistema Internazionale (SI). L'adozione delle unità di misura SI, risulta pertanto ineludibile. Per tutti i parametri espressi in termini quantitativi fare riferimento alle unità di misura SI indicate nelle rispettive metodiche (ad esempio, albumina, mg/L). In relazione alla parte corpuscolata riferire il numero medio degli elementi per microlitro o per campo microscopico [esempio, eritrociti = n/μL o n/campo microscopico HPF (High Power Field)] (25, 26).

Raccomandazione

Il referto deve riportare sempre accanto al risultato le unità di misura utilizzate.

Giudizio di idoneità del campione

L'adeguatezza del campione è un fattore di criticità della fase preanalitica di tutti gli esami di laboratorio; essa influenza l'accuratezza e di conseguenza l'utilizzo clinico dei risultati. Per questo il laboratorio dovrebbe avvalersi di standard e linee guida utili per la stesura di procedure operative interne per definire i criteri di accettabilità (27).

L'urina è un liquido molto instabile e sensibile; tale caratteristica rende indispensabile il giudizio di idoneità del campione che deve essere espresso, quando negativo, tramite un commento inserito nel referto. Tale

commento, come descritto in seguito in modo più dettagliato, è basato sulle scelte di accettabilità o meno del campione da parte del laboratorio. Le non idoneità possono riguardare aspetti rilevati nella fase preanalitica (contenitore, igiene, identificazione, volume, tempo intercorso tra la raccolta e la consegna, modalità di trasporto e conservazione dei campioni) e/o aspetti rilevati nella fase analitica (contaminanti di provenienza da altri apparati o dall'ambiente esterno durante la raccolta e/o la conservazione). Una corretta informazione del paziente resta il comune denominatore per la riduzione delle non conformità (5). A questo riguardo, si ricorda come la creatinina sia notevolmente rappresentata nelle urine e risulta discriminante rispetto ad altri liquidi biologici. Questa caratteristica può risultare decisiva qualora per finalità cliniche si dovesse determinare la natura urinaria del campione in esame; l'idoneità in questo caso viene espressa come una nota all'interno del referto (5, 6, 11, 12, 27).

Raccomandazione

Il referto deve riportare sempre un giudizio sulla non idoneità del campione che giustifichi la mancata accettazione dello stesso.

Risultato della misura analitica

Il referto ECMU è l'atto ufficiale e definitivo con cui vengono comunicati i risultati dei vari componenti analizzati, pertanto essi rappresentano l'oggetto principale di attenzione da parte dei clinici, come indicato dalla norma ISO 15189:2012 (28). I risultati vanno inseriti in colonna accanto alla descrizione del parametro, subito prima della rispettiva unità di misura e del valore di riferimento. Vanno inseriti i risultati solo degli esami eseguiti; si preferisce refertare in ordine prima l'esame chimico e poi quello del sedimento. È opportuno inserire un segnale di attenzione accanto al risultato fuori dai valori di riferimento.

Secondo la European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM) e le linee guida GIAU, l'espressione dei risultati dei parametri sia microscopici che chimici deve essere quantitativa (6, 11). I parametri chimici: albumina, creatinina, esterasi leucocitaria, pseudoperossidasi (tranne i nitriti che possono essere espressi in termini qualitativi, presenti/assenti) dovranno essere quindi quantificati così come pure il numero delle cellule e degli altri elementi corpuscolati, esprimendo questi ultimi come numero medio per microlitro o per campo microscopico (11-14, 29, 30).

Raccomandazione

Il referto deve riportare solo i risultati dei parametri per i quali è stata eseguita l'analisi.

Valori di riferimento e/o eventuali livelli decisionali

Per una migliore interpretazione dei risultati, oltre all'espressione quantitativa del risultato, l'ECLM propone che la risposta nel profilo urinario contempli termini di riferimento che possano essere interpretati con facilità, tali da permettere un giudizio e di conseguenza una eventuale azione clinica.

Da questo deriva che le espressioni letterali quali rari, alcuni, e simili, non devono mai essere utilizzate per la soggettività che tali termini hanno insita sia in chi scrive che in chi legge. Gli indicatori di lesione hanno soltanto un valore di riferimento superiore calcolato al 95° percentile di una popolazione sana. Per calcolare questo valore si fa riferimento alle raccomandazioni del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) GP16 (2009) Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimen (12).

Interpretare gli esami di laboratorio significa confrontare i risultati degli esami con "riferimenti" che permettano un giudizio e di conseguenza un'azione. Teoricamente oggi noi possiamo trovare sui referti di laboratorio almeno cinque strumenti diversi di comparazione dei valori misurati (31):

- valutazioni biodinamiche: integrano e confrontano i risultati con modelli fisiopatologici, per consentire previsioni sulle condizioni del paziente;
- valori di riferimento individuali: di fatto impossibili da ottenersi;
- differenza critica: indica, al livello di probabilità prescelto, la differenza massima fra due valori successivi ottenuti sullo stesso paziente che può ancora essere attribuita all'effetto congiunto della variabilità analitica e biologica di quel costituente;
- livelli decisionali: molto diffusi e, molto spesso, non chiaramente differenziati nel referto dagli intervalli di riferimento. Di derivazione empirica, indicano la concentrazione al di sopra, o al di sotto della quale, viene presa una decisione medica;
- valori di riferimento collettivi: sono i riferimenti più usati, anche se forse i meno informativi. Di fatto, permettono una valutazione "descrittiva" di una misurazione, con un parametro di distribuzione statistica.

I valori di riferimento collettivi sono gli strumenti più facilmente standardizzabili e, almeno teoricamente, più facilmente ottenibili (32-39). Lo standard EP28-A3 del CLSI costituisce la più autorevole linea guida per la costruzione degli intervalli di riferimento (40).

La distribuzione dei valori di riferimento può essere studiata con opportuni metodi statistici. Se i risultati sono distribuiti in maniera normale (gaussiana), i limiti possono essere calcolati sia con metodi parametrici sia non parametrici. I metodi non parametrici aderiscono alle esigenze degli indicatori di lesione in cui la distribuzione viene riferita al 95° percentile; mentre per gli indicatori di funzione sono da preferire i metodi parametrici in cui i valori di riferimento vanno dal 2,5° al 97,5° percentile (40). Tra gli indicatori di lesione

individuamo albuminuria, ematuria, leucocituria, esterasi; tra gli indicatori di funzione la concentrazione urinaria e la creatinuria. Per i primi individueremo un limite superiore di riferimento che coinciderà con il 95° percentile, sottintendendo con lo zero il limite inferiore, ad esempio, eritrociti, fino a 10 elementi/uL. Per i secondi avremo due limiti di riferimento al 2,5 e al 97,5 percentile che definiranno un intervallo di riferimento ad esempio: densità relativa, 1007-1029.

In alternativa a stabilire un nuovo intervallo di riferimento, il già citato standard EP28-A3 (40) prevede, sotto opportune condizioni, la possibilità di trasferire nella realtà attuale, gli intervalli di riferimento precedentemente determinati nello stesso laboratorio con un differente metodo analitico, oppure quelli stabiliti in un altro laboratorio o da un Produttore. L'accettabilità del trasferimento dell'intervallo può essere facilmente verificata in laboratorio effettuando le misurazioni su un numero limitato di individui di riferimento (ad esempio n=20), dopo aver escluso eventuali outlier. Se non più di 2 (10%) risultati cadono al di fuori dell'intervallo di riferimento proposto, lo stesso è considerato valido; se 3 o 4 cadono al di fuori dei limiti, la misurazione viene ripetuta su un nuovo campione di 20 individui di riferimento. In questo caso, se 2 nuovi risultati o meno cadono al di fuori dei limiti, l'intervallo è accettato; se nuovamente, 3 o più risultati (oppure 5 o più risultati del primo campione) eccedono i limiti, l'intervallo non può essere accettato.

Gli intervalli di riferimento rimangono il sistema maggiormente utilizzato nella categorizzazione della condizione clinica dei pazienti. Essi rappresentano comunque un'espressione matematico-statistica della distribuzione dei valori in una popolazione di riferimento e non sono sempre e comunque identificabili con limiti decisionali (41).

I valori decisionali utilizzati vanno chiaramente differenziati dagli intervalli di riferimento. Quasi sempre di origine empirica, indicano la concentrazione al di sopra, o al di sotto della quale, viene presa una decisione clinica.

Poiché le strisce reattive misurano in modo semi-quantitativo gli analiti (scala ordinale), per la valutazione delle prestazioni analitiche, in particolare dell'esattezza, nel confronto con un metodo selezionato si raccomanda di utilizzare due limiti: uno di sensibilità analitica (LD) e uno di conferma (LC) con una zona grigia di incertezza compresa tra i due. La letteratura suggerisce come prestazioni ottimali per l'esattezza dei risultati i seguenti criteri:

- a LC è raccomandato che i falsi negativi siano inferiori al 5%;
- a LD è raccomandato che i falsi positivi siano inferiori al 10%;
- nella zona grigia può essere accettato un numero di falsi negativi inferiori al 30%.

Inoltre, sulla base dell'esperienza con i metodi su striscia reattiva, l'ECLM raccomanda un rapporto tra le concentrazioni LC/LD=5.

LC e LD possono essere anche legati alla decisione

clinica: per esempio, 100-200 leucociti/uL sono indicativi di infezione urinaria, mentre meno di 10-20 la escludono (11).

Raccomandazione

Il referto deve riportare sempre per ogni parametro i valori di riferimento e/o gli eventuali livelli decisionali.

Risoluzione delle discordanze

Nel referto devono essere indicate, risolte e spiegate le eventuali discordanze, vere o apparenti, tra parametri di analogo significato o meglio riferentesi alla stessa origine, ovvero:

- nitriti/batteri;
- pseudoperossidasi-emoglobina/emazie;
- esterasi/leucociti;
- proteine/cilindri.

La risposta deve essere valutata anche sulla base delle conoscenze delle possibili interferenze, stimandone le false positività e false negatività pertinenti ai metodi in chimica secca. Peraltro sono già noti i limiti esistenti nella preparazione del sedimento o nell'esame automatizzato della frazione corpuscolata.

Nel caso di discordanze, la valutazione con metodi di conferma deve essere perseguita e, in relazione al metodo utilizzato, potrà essere:

- valutazione di report grafici/immagini e di allarmi su sistemi automatizzati;
- esame microscopico, meglio se alla osservazione in campo chiaro si affianca la osservazione in contrasto di fase e al polarizzatore;
- esecuzione in chimica liquida o immunochimica.

Qualora vi sia una dissociazione tra assenza di leucociti e presenza di batteri, nella popolazione femminile potrebbe essere utile aggiungere un commento del tipo *“il risultato rilevato correla con la probabile presenza di contaminazione del campione o di batteriuria asintomatica”*, al fine di evitare allarmismi inutili e approfondimenti diagnostici inappropriati.

Raccomandazione

Il referto deve offrire evidenza della risoluzione delle discordanze tra parametri ad analogo significato o riferibili alla stessa origine.

Commento interpretativo

Fornire commenti interpretativi nel referto è un compito essenziale del Laboratorio Clinico. La Direzione del laboratorio deve garantire disponibilità per la consulenza degli esami e l'interpretazione dei risultati al fine di soddisfare le esigenze e i requisiti dei clinici. Le osservazioni interpretative devono essere chiare, inequivocabili, corrette nella semantica e nei contenuti tecnici, devono essere sintetiche ma al contempo veicolare l'informazione (35). La frequenza dell'uso e la

tipologia dei commenti, come verrà espresso in seguito, varia sulla base dei livelli analitici e di conseguenza dei livelli di competenza di ciascun laboratorio. Tali livelli devono essere facilmente individuabili. A tale scopo i livelli analitici e di competenza sono già disponibili in tabelle inserite nella linea guida relativa alla fase analitica. Il riconoscimento della appropriatezza delle risorse disponibili e della complessità da trattare, consentirà ai laboratoristi di individuare coerentemente il tipo di referto da produrre: commentato o in risposta ad una specifica richiesta (6, 11).

Raccomandazione

Il referto deve riportare commenti sulla base del livello analitico del laboratorio e del livello di competenza dell'equipe.

Validazioni, ambito di responsabilità e firma

Prima del suo rilascio, il referto deve essere validato mediante un processo di verifica che riguarda globalmente la validità dell'informazione generata dal laboratorio rispetto alla richiesta. All'interno del processo che porta all'informazione da trasferire, partecipano più figure professionali che giocano un ruolo importante. In Medicina di Laboratorio ormai vi è accordo che in questo processo esistono almeno due livelli di validazione, quello tecnico *“sample-oriented”* e quello clinico *“patient-oriented”* che hanno sistemi di verifica diversi e richiedono competenze professionali diverse (3, 4). Il livello tecnico provvede alla verifica del dato analitico mediante la verifica degli errori pre-pre analitici, delle interferenze analitiche, del controllo di qualità, delle prestazioni strumentali. Il livello clinico provvede alla validazione della congruità del risultato dopo averne verificato eventuali incongruenze e all'attivazione dell'interfaccia clinica-laboratorio come momento di scambio di informazioni, in caso di risposte su uno specifico quesito diagnostico. Nel mondo anglosassone i commenti interpretativi sono emessi da membri esperti dello staff: in circa il 70% dei laboratori dai patologi (con MRCPATH) o dai *“clinical scientist”* di grado più elevato (grade C) senza limitazioni, mentre altri laureati, medici e non, di grado inferiore sono autorizzati in riferimento all'esperienza individuale o solo in aree specialistiche o sotto controllo di colleghi di maggiore esperienza (32-37).

È evidente pertanto che data l'importanza clinica del referto, questo deve essere affidato a personale qualificato. Secondo Marshall et al. (43), in sintonia con il documento IFCC 37 i biochimici clinici, sia medici che *“scientist”*, dovrebbero avere una base di conoscenza e di esperienza almeno equivalente alla Part 1 di MRCPATH o simile livello di studio (27, 38-45).

Ciascun dato analitico prodotto da un Laboratorio Clinico deve essere sottoposto ad almeno due livelli di verifica: verifica tecnica e di plausibilità clinica, prima della procedura di firma.

 Raccomandazione

Il referto deve riportare la firma per validazione del risultato secondo i livelli di refertazione stabiliti in laboratorio.

Il referto commentato

I commenti sono il valore aggiunto espresso in un referto in base alle competenze dell'operatore, che consentono una lettura circostanziata della risposta del laboratorio: procedendo dalla mancata idoneità del campione fino all'interpretazione in chiave clinica dei reperti analitici. Premesso che in tutte le circostanze vanno rispettate le raccomandazioni riguardanti la corretta raccolta/conservazione dei campioni, i commenti sono espressi da specialisti che, grazie alla propria competenza in materia, consentono una corretta e informata lettura del referto. Negli ultimi anni molti lavori hanno confermato l'importanza del commento interpretativo a corredo del dato di laboratorio (46-49). Il referto interpretativo e la consulenza, cioè l'attività di interfaccia e di comunicazione tra il professionista di laboratorio e il clinico, appaiono sempre più importanti per contenere i costi, ridurre gli errori medici e migliorare la qualità delle cure ai pazienti. Inoltre, l'incalzante progresso tecnologico e scientifico in ambito laboratoristico, da un lato, e la sempre maggiore complessità delle conoscenze mediche dall'altro, rendono ancor più necessarie al clinico l'esperienza specifica e le conoscenze basate sull'evidenza del professionista di laboratorio, sia per quanto attiene la selezione degli esami più idonei ad inquadrare il problema del paziente, sia per la loro interpretazione nel singolo contesto clinico, entrambi finalizzati ad una cura appropriata ed efficace del paziente (50-52).

Il referto commentato ha quindi lo scopo di affiancare e guidare il clinico nello studio e nella definizione della patologia e nel trattamento della malattia, sia in fase diagnostica che di monitoraggio, attraverso criteri razionali e basati sulla medicina delle evidenze.

È quindi di estrema importanza che il commento inserito nel referto rivesta specifiche caratteristiche: deve essere corretto nella forma e nei contenuti tecnici; deve fornire informazioni chiare, non ambigue e facilmente interpretabili; deve essere sintetico e dare informazioni che siano effettivamente utili sul piano clinico.

Documenti specifici sui commenti al referto nei vari campi della Medicina di Laboratorio sono stati prodotti dalle società scientifiche, da organismi internazionali e dalle norme ISO (32-34, 36-40, 53-55). L'ECMU rientra tra gli esami di laboratorio per i quali risulta utile l'utilizzo di commenti interpretativi, sia quando si tratti di fornire una chiave di lettura corretta relativamente a parametri misurati con metodiche e con sistemi analitici differenti (ad esempio, chimico fisico con strisce reattive e sedimento automatizzato o lettura microscopica), sia quando il riscontro di elementi significativi sul piano diagnostico offrano indicazioni utili al riconoscimento di

una patologia in atto. Premesso che i commenti adottati per i livelli analitici di base, possono venire incorporati nei commenti adottati per il livello analitico specialistico, riteniamo che possano essere identificate tre categorie di commenti.

La prima categoria (Tabella 2) comprende commenti descrittivi che possono essere utilizzati da tutti i laboratori e riguardano principalmente valutazioni sulla fase preanalitica e sulla idoneità del campione.

La seconda categoria di commenti (Tabella 3) include i commenti interpretativi: essi sono volti essenzialmente a garantire la corretta interpretazione dei dati, con particolare riguardo al riscontro di incongruenze tra il dato dell'esame chimico fisico e quello del sedimento.

 Raccomandazione

I commenti descrittivi e interpretativi possono essere utilizzati da tutti i laboratori che eseguono ECMU.

La terza categoria di commenti può essere definita "diagnostica"; i relativi commenti sono riportati nella Tabella 4. Sono commenti di tipo clinico, volti a richiamare l'attenzione del medico richiedente sulla possibile presenza di una patologia a carico del rene e/o delle vie urinarie. Sono utilizzabili nei laboratori con una competenza clinica e microscopica di livello specialistico (56).

Verifica esterna di qualità e controllo di qualità interno

La verifica di qualità mediante le procedure per la gestione del Controllo di Qualità Interno (CQI) e la partecipazione a Programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) sono elementi connotanti la pratica di Laboratorio (57-59). I Programmi di VEQ nel campo dell'ECMU sono stati finora poco diffusi in Europa nonostante siano contemplati sia nelle Linee Guida Europee sia in quelle del CLSI (60, 61). Gli schemi di VEQ per l'Esame Chimico Fisico delle urine con striscia reattiva sono poco diffusi poiché, poco applicabili per le determinazioni di tipo semi-quantitativo o su scala ordinale utilizzate per l'esame delle urine (62). I risultati degli esami eseguiti da laboratori diversi sullo stesso campione devono poter essere confrontati, con affidabilità e coerente interpretazione. Ciò è valido per determinazioni di tipo semiquantitativo, come quelle per l'esame chimico-fisico delle urine su striscia reattiva che dovrebbero fornire risultati omogenei all'interno di uno stesso intervallo di lettura. Il Programma di VEQ consente infatti di valutare come un laboratorio si "colloca" nel contesto generale e favorisce la riduzione dell'errore analitico allertando quando un valore risulta appartenere a una classe di valori diversa da quella in cui cadono tutti gli altri risultati (63). Inoltre permette di evidenziare i limiti analitici propri di ciascun tipo di striscia reattiva rafforzando la consapevolezza che l'analisi su striscia reattiva deve essere integrata con l'analisi microscopica del sedimento urinario e refertata

Tabella 2*Commenti utilizzabili da tutti i laboratori*

 Commenti relativi alla fase preanalitica:

attengono alla fase di raccolta, trasporto e conservazione del campione, nonché alle condizioni di non idoneità rilevabili macroscopicamente (ad esempio per quantità insufficiente del campione o per contaminazione macroscopicamente evidente):

- contenitore non idoneo, si prega di ripetere la raccolta del campione
 - campione insufficiente, si prega di ripetere la raccolta
 - esame non eseguito per mancato rispetto delle norme igieniche e di sicurezza
 - contenitore contaminato, si prega di ripetere la raccolta del campione
 - campione non idoneo a causa del mancato rispetto dei tempi di conservazione
 - campione non idoneo a causa di una scorretta temperatura di conservazione
 - campione non idoneo per presenza di macrocontaminanti
-

Commenti inerenti la fase analitica:

riguardano il giudizio di idoneità del campione in caso di contaminazione (uretrale, vaginale, fecale, spermatica) rilevabile solo con l'analisi del sedimento urinario, nonché tutte le situazioni in cui si riscontrino anomalie quali/quantitative dei parametri chimici, fisici o del sedimento. Rientrano in questo gruppo, ad esempio, la contaminazione da liquido seminale o il primo riscontro di una proteinuria e/o albuminuria.

Non-idoneità del campione rilevata all'osservazione microscopica:

- probabile contaminazione in fase di raccolta; ottenere un nuovo campione attenendosi scrupolosamente alle modalità di raccolta raccomandate dal laboratorio
 - campione non idoneo per contaminazione (fecale, uretrale, vaginale, spermatica); ottenere un nuovo campione attenendosi scrupolosamente alle modalità di raccolta raccomandate dal laboratorio
 - cellule/muco: la presenza di cellule epiteliali squamose in numero elevato (ad esempio >1 per campo microscopico a 400x) e di abbondante muco è indicativa di una raccolta non corretta; ottenere un nuovo campione attenendosi scrupolosamente alle modalità di raccolta raccomandate dal laboratorio.
-

Concentrazione del campione:

- campione non idoneo per eccessiva diluizione del campione; si prega di ripetere la raccolta;
 - campione poco concentrato possibile lisi degli elementi cellulari.
-

Proteinuria/albuminuria:

- in caso di primo riscontro di albuminuria e/o proteinuria alterati, riconfermare il dato su altri campioni prima di procedere ad approfondimenti diagnostici. Nel caso specifico di soggetti di età inferiore a 30 anni escludere proteinuria ortostatica.
 - proteinuria (e/o albuminuria) non eseguibile per contaminazione genitale (da liquido seminale).
 - quadro compatibile con infezione delle vie urinarie. Il dato di albuminuria e/o proteinuria dovrà essere rivalutato una volta risolto il quadro clinico.
 - probabile contaminazione da raccolta non corretta; la presenza di proteinuria e/o albuminuria potrebbe essere non attendibile. Ottenere un nuovo campione attenendosi scrupolosamente alle modalità di raccolta raccomandate dal laboratorio
-

con commenti adeguati ad interpretare eventuali discrepanze tra l'analisi chimica e la valutazione morfologica del sedimento. I programmi di VEQ per l'analisi della frazione corpuscolata delle urine sono ancora meno sviluppati poiché i risultati di tipo qualitativo per l'analisi morfologica in generale, non possono essere suddivisi in categorie e il giudizio su ogni singola risposta richiede la consulenza di un professionista esperto nella disciplina (63-65). In programmi di VEQ in cui sono proposti casi clinici, in particolare, l'ente organizzatore si deve avvalere di uno o più consulenti molto esperti della patologia inerente i casi clinici che vengono trattati e disponibili a fornire assistenza al riguardo. Da uno studio del College of American Pathologist, è emerso che, mentre il Proficiency Testing (PT) per le strisce reattive evidenziava una concordanza soddisfacente tra laboratori, il PT per l'esame

microscopico, condotto mediante fotografie del sedimento urinario, evidenziava notevoli differenze tra laboratori nell'identificazione degli elementi (66); dati questi ultimi confermati anche da un lavoro del GIAU (67). Questa VEQ è utile per evidenziare eventuali necessità di formazione/aggiornamento e rappresenta uno stimolo ad approfondire le conoscenze su una determinata patologia (63, 68, 69). Sono molto rari i programmi di VEQ per l'analisi automatizzata della frazione corpuscolata intesi in senso tradizionale e cioè con l'utilizzo di materiali di controllo; vi sono infatti difficoltà ad approntare un materiale idoneo a garantire la stabilità e l'integrità morfologica degli elementi in esame e che risulti idoneo all'analisi con tutti i sistemi disponibili sul mercato che utilizzano tecnologie molto diverse tra loro.

Tabella 3*Commenti utilizzabili dai laboratori con area specialistica*

Commenti interpretativi: sono volti essenzialmente a garantire la corretta interpretazione dei dati, in particolare riguardo al riscontro di incongruenze tra il dato dell'esame chimico fisico e quello del sedimento (ad esempio, emoglobina positiva con striscia reattiva e assenza di emazie nel sedimento). Questi commenti possono essere facilmente codificati sia sui middleware dedicati sia sui gestionali di laboratorio; in entrambi i casi, è quasi sempre possibile implementare delle regole che consentono l'inserimento automatico da parte del sistema di specifici commenti in relazione alla positività/negatività o presenza/assenza di uno o più parametri tra loro correlati. Per la loro natura, questi commenti devono essere considerati obbligatori.

Emazie/emoglobina:

- assenza di emazie integre all'osservazione microscopica in campione non diluito. Se non sussistono cause di emoglobinuria, probabile falso positivo del della striscia reattiva.
- assenza di emazie integre all'osservazione microscopica. Probabile lisi delle emazie da bassa concentrazione del campione. Si consiglia ripetere sul primo campione del mattino riducendo l'apporto di liquidi la sera precedente l'esame.
- possibile falso positivo della striscia reattiva per interferenza da perossidasi batteriche o interferenti.
- presenza di microematuria (con o meno presenza di emazie dismorfiche e/o acantociti): Si consiglia studio morfologico delle emazie sul campione delle seconde urine del mattino (SUM).

Leucociti / batteri:

- la positività delle esterasi in assenza di leucociti nel sedimento può essere dovuta alla presenza di interferenti o a lisi dei leucociti per invecchiamento del campione. Si consiglia di ripetere raccolta.
- probabile lisi dei leucociti da bassa concentrazione del campione. Batteriuria associata a leucocituria può essere indice di infezione delle vie urinarie. Valutare il risultato alla luce del quadro clinico dopo aver escluso la contaminazione da raccolta non corretta.
- batteriuria significativa in assenza di leucocituria può coesistere con inquinamento della raccolta, leucopenia, portatori di catete permanente. Si consiglia di verificare la presenza di una o più di queste situazioni e il quadro clinico prima di considerare una terapia antibiotica.
- la presenza di leucocituria senza batteriuria va inquadrata clinicamente. In presenza di sintomi di infezione delle vie urinarie, si consiglia la specifica richiesta per patogeni esigenti.

Proteinuria e/o albuminuria:

- la scarsa concentrazione del campione può falsare il dato della proteinuria e/o albuminuria (falso negativo). Si consiglia la ripetizione dell'esame riducendo l'apporto di liquidi la sera precedente la raccolta
- l'elevata concentrazione del campione potrebbe alterare il dato della proteinuria e/o albuminuria (falso positivo). Si consiglia la ripetizione dell'esame.

Tabella 4*Commenti utilizzabili dai laboratori che interagiscono con le specialità cliniche sulla base di uno specifico quesito diagnostico*

Sono commenti di tipo clinico, volti a indirizzare il medico richiedente verso la possibile presenza di una patologia a carico del rene e/o delle vie urinarie. Sono utilizzabili nei laboratori con una competenza clinica e microscopica di livello elevato:

- eritrociti dismorfici in numero elevato ($\geq 50/HPF$) e cilindri eritrocitari/emoglobinici con/senza: leucociti, cellule epiteliali renali tubulari, cilindri granulosi, leucocitari e/o epiteliali e/o cerei. Proteinuria da >150 a ≥ 3.5 g/24 ore; creatinina plasmatica da normale a elevata: *possibile/probabile glomerulonefrite proliferativa in fase attiva*;
- lipidi in quantità da moderata a severa e eritrociti dismorfici in basso numero ($\leq 10/\text{campo}$ microscopico) o assenti con/senza: cellule epiteliali renali tubulari, cilindri granulosi, epiteliali. Proteinuria ≥ 3.5 g/24 ore; creatinina plasmatica da normale a elevata: *possibile/probabile glomerulonefrite non proliferativa con sindrome nefrosica*;
- eritrociti dismorfici in numero elevato ($\geq 50/\text{campo}$ microscopico), cilindri eritrocitari/emoglobinici, e lipidi in quantità da moderata a severa con/ senza: leucociti, cellule epiteliali renali tubulari, cilindri granulosi, leucocitari e/o epiteliali e/o cerei. Proteinuria: ≥ 3.5 g/24 ore; creatinina plasmatica: da normale a elevata: *possibile/probabile glomerulonefrite proliferativa in fase attiva con sindrome nefrosica*;
- cellule epiteliali renali tubulari in numero variabile, cilindri epiteliali, cilindri granulosi. Proteinuria: assente o lieve; creatinina plasmatica: rapidamente aumentata - da ore a pochi giorni: *possibile/probabile insufficienza renale acuta (IRA) con necrosi tubulare acuta*. Gli stessi elementi sopra elencati con: cristalli (*IRA da precipitazione intrarenale di cristalli*); cilindri mioglobinici (*IRA associata a rhabdmiolisi*); cilindri emoglobinici (*IRA associata a emolisi intravascolare*);
- "Decoy cells" o "cellule richiamo" (cellule epiteliali di origine uroteliale e/o renale tubulare con alterazioni nucleari caratteristiche) in numero variabile, (proteinuria: assente; creatinina plasmatica: nella norma): *Riattivazione del poliomavirus BK* (in paziente immunosoppresso, nella maggior parte dei casi portatore di trapianto di rene);
- "Decoy cells" o "cellule richiamo" (cellule epiteliali di origine uroteliale e/o renale tubulare con alterazioni nucleari caratteristiche) in numero variabile anche all'interno di cilindri. Proteinuria assente; creatinina plasmatica in aumento: *possibili/probabile nefropatia da riattivazione del poliomavirus BK* (in paziente immunosoppresso, nella maggior parte dei casi portatore di trapianto di rene);

Tabella 4
Continua

- leucociti in numero variabile e batteri in quantità elevata con/senza: eritrociti isomorfi, cellule transizionali superficiali. Proteinuria: assente; creatinina plasmatica: nella norma: *possibile/probabile infezione urinaria*;
- leucociti in numero variabile e batteri in quantità elevata con/ senza: eritrociti isomorfi, cellule transizionali superficiali, cellule epiteliali renali tubulari, cilindri leucocitari. Proteinuria: assente; creatinina plasmatica: nella norma o elevata: *possibile/probabile infezione urinaria con coinvolgimento del parenchima renale*;
- leucociti in numero variabile, batteri in quantità variabile, cellule epiteliali squamose in numero elevato con/senza: eritrociti isomorfi, miceti, trichomonas vaginalis. Proteinuria: assente; creatinina plasmatica: nella norma: *possibile/probabile contaminazione urinaria da parte di secrezioni genitali*;
- cellule transizionali profonde e/o superficiali in numero da moderato elevato, leucociti, eritrociti isomorfi. Proteinuria: assente; creatinina plasmatica: nella norma o elevata: *possibile/probabile patologia urologica*;
- cellule transizionali superficiali e/o profonde con atipie morfologiche anche in ammassi, leucociti, eritrociti isomorfi. Proteinuria: assente; creatinina plasmatica: nella norma o elevata: *possibile/probabile patologia urologica di natura neoplastica*.

NB. Quanto più il numero degli elementi caratterizzanti è elevato, tanto più aumenta la probabilità rispetto alla possibilità.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano tutti i componenti del Gruppo Interdisciplinare: Maria G. Alessio (Bergamo), Roberta Anderlini (Baggiovara MO), Fiamma Balboni (Firenze), Maria A. Burgio (Canicatti, AG), Giuliano Brunori (Trento), Alberta Caleffi (Parma), Alessandro Camporese (Pordenone), Piero Cappelletti (Castelfranco TV), Giovanni Casiraghi (Como), Rita de Rosa (Pordenone), Giovanni Di Rienzo (Altamura BA), Cettina Drago (Catania), Maria G. Epifani (Padova), Gian P. Franzè (Ferrara), Giovanni B. Fogazzi (Milano), Giovanni Gambaro (Roma), Gianluca Gessoni (Mestre VE), Loreto Gesualdo (Bari), Anna Liverani (Monselice, PD), Maria Lorubbio (Firenze), Fabio Manoni (Monselice, PD – Coordinatore GIAU), Franco Nembrini (Bergamo), Cosimo Ottomano (Monza), Angelo Perego (Monselice PD), Barbara Pieretti (Fano, PU), Giulia Previtali (Bergamo), Elena Ranieri (Foggia), Rudi Ravasio (Bergamo), Graziella Saccani (Bussoleto VR – Segretaria GIAU), Michele Schinella (Rovereto TN), Sandra Secchiero (Padova), Francesca Sirianni (Monfalcone GO), Sara Valverde (Chioggia VE), Daniela Vannoni (Siena).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;245:17623.
- Burlina AB. *Medicina di laboratorio – Fondamenti di diagnostica*. Torino: CG Edizioni Medico Scientifiche, 1992.
- Cappelletti P. Il "referto" in Medicina di Laboratorio. *Riv Med Lab – JLM* 2004;5:197–208.
- Plebani M. Il referto in medicina di Laboratorio. *RiMeL/JLaM* 2005;1(suppl):57-9.
- Manoni F, Caleffi A, Gessoni G, et al.. L'esame delle urine chimico morfologico e colturale: proposta di linee guida per una procedura standardizzata della fase preanalitica. *Biochim Clin* 2011;35:131-9.
- Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, et al.. Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: proposta di linee guida per la fase analitica del gruppo intersocietario analisi delle urine (GIAU). *Biochim Clin* 2016;40: 353-83.
- Cappelletti P. Linee guida per il referto ematologico. *Riv Med Lab – JLM* 2002;3(suppl):87-93.
- Grilli R, Penna A, Zola P, et al. Physicians' view of practice guidelines. A survey of Italian physicians. *Soc Sci Med* 1996;43:1283-7.
- Formoso G, Liberati A, Magrini N. Practice guidelines: useful and "participative" method? Survey of Italian physicians by professional setting. *Arch Intern Med* 2001;161:2037-42.
- Grilli R. AGREE uno strumento per la valutazione della qualità delle linee guida. *Dossier 60* Bologna. Agenzia Sanitaria Regionale dell'Emilia-Romagna; 2002. <http://assr.regione.emilia-romagna.it/publicazioni/dossier/doss060> (ultimo accesso: novembre 2019).
- European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2000;231:1-86.
- CLSI. *Urinalysis; Approved Guideline - Third edition*. CLSI document GP16-A3. Wayne, PA, 2009.
- Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). Management of suspected bacterial urinary tract infection in adults. A National Clinical Guideline. Edinburgh (Scotland), Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). SIGN publication 2006;88. <https://www.sign.ac.uk/assets/sign88.pdf> (ultimo accesso: novembre 2019).
- Kouri T, Gyory A, Rowan RM. ISLH Urinalysis Task Force. ISLH recommended reference procedure for the enumeration of particles in urine. *Lab Hematol* 2003;9:58-63.
- Atkins D, Best D, Briss PA, et al.; GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2004;328:1490-5.
- Dipartimento della Programmazione e dell'Ordinamento del Servizio Sanitario Nazionale (2012) *Manuale di Formazione per il Governo Clinico: Appropriatazza*. opicomio.it/documenti/Programma_del_corso_Appropriatazza

- ezza.pdf (ultimo accesso: novembre 2019).
17. Hsu C, Sandford B. The Delphi technique: making sense of consensus. *Pract Assess, Res Eval* 2007;12.
 18. Tomasik T. Reliability and validity of the Delphi method in guideline development for family physicians. *Qual Prim Care* 2010;18:317-26.
 19. Hasson F, Keeney S, McKenna H. Research guidelines for the Delphi survey technique. *J Adv Nurs* 2000;32:1008-15.
 20. Boulkedid R, Abdoul H, Loustau M, et al. Using and reporting the Delphi method for selecting healthcare quality indicators: a systematic review. *PLoS One* 2011;6:e20476.
 21. MacLure K, Paudyal V, Stewart D. Reviewing the literature, how systematic is systematic? *Int J Clin Pharm* 2016;38:685-94.
 22. West LM, Diack L, Cordina M, et al. A systematic review of the literature on 'medication wastage': an exploration of causative factors and effect of interventions. *Int J Clin Pharm* 2014;36:873-81.
 23. Gambaro G, Yabarek T, Graziani MS, et al.; INCIPE Study Group. Prevalence of CKD in northeastern Italy: results of the INCIPE study and comparison with NHANES. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1946-53.
 24. Yuno T, Hisada Y, Nishimura Y. A review of urinary examination - what medical practice expects now and what urinary examinations have to provide in the future]. *Rinsho Byori* 2013;61:622-8.
 25. DPR 12/08/1982 n° 802. Attuazione della direttiva (CEE) n. 80/181 relativa alle unità di misura *Gazzetta Ufficiale* n° 302 del 03/11/1982. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1982/11/03/082U0802/sg> (ultimo accesso: novembre 2019)
 26. Burnet D, Plebani M. Guida pratica all'accreditamento dei laboratori Clinici. Milano: Biomedica Source Books, 2003.
 27. Morandini M. Criteri di qualità per l'accettabilità dei campioni. *RIMeL/IJLaM* 2006;2:32-41.
 28. Pradella M. Risultati di esami nel laboratorio accreditato ISO 15189: il nuovo paradigma. *Riv Ital Med Lab* 2015;11:118-21.
 29. Aspevall O, Hallander H, Gant V, et al. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:173-8.
 30. Lee A, McLean S. The laboratory report: a problem in communication between clinician and microbiologist? *Med J Aust* 1977;2:858-60.
 31. Pradella M, Dorizzi RM. Il problema dei valori di riferimento. In: Burlina A, editor. *Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio*. Padova: Piccin edizioni, 1995.
 32. Andrew CE, Hanning I, McBain AM, et al. A model for a multicentre approach to the derivation of reference intervals for thyroid hormones and testosterone for laboratories using identical analysers. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1013-9.
 33. Zardo L, Secchiero S, Sciacovelli L, et al M. Reference intervals: are interlaboratory differences appropriate? *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1131-3.
 34. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:337-42.
 35. Petit-Clerc C, Solberg HE. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:639-44.
 36. Solberg HE, PetitClerc C. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:593-8.
 37. Solberg HE, Stamm D. International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division: approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:531-5.
 38. Solberg HE. Approved recommendations on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:645-56.
 39. Dybkaer R, Solberg HE. Approved recommendations on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:657-62.
 40. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved Guideline, 3rd ed. CLSI document EP28-A3c. CLSI Wayne, PA, 2008.
 41. Moore RA. On the need for evidence-based clinical biochemistry. *Evid Based Med* 1998;3:7-8.
 42. Prinsloo PJ, Gray TA. A survey of laboratory practice in the clinical authorization and reporting of results. *Ann Clin Biochem* 2003;40:149-55.
 43. Marshall WJ, Challand GS. Provision of interpretative comments on biochemical report forms. *Ann Clin Biochem* 2000;37:758-63.
 44. Gruppo PHASE-Lab. Responsabilità ed etica professionale nella medicina di laboratorio. Milano: Lauri Edizioni, 2006.
 45. ISO 15189:2003, Medical laboratories –Particular requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2003.
 46. ISO 15189: 2007 Medical laboratories-particular requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2007.
 47. UKAS Policy on Participation in Proficiency Testing. www.ukas.com/download/CPA/Standards%20for%20the%20Medical%20Laboratory.pdf. (ultimo accesso: novembre 2019)
 48. Sciacovelli L, Zardo L, Secchiero S, et al. Interpretative comments and reference ranges in EQA programs as a tool for improving laboratory appropriateness and effectiveness. *Clin Chim Acta* 2003;333:209-19.
 49. Royal College of Pathologists. Code of practice for clinical biochemists/chemical pathologists and clinical biochemistry services. G0 27. 2011. https://www.rcpath.org/uploads/assets/7075e884-f548-44cc-b319bc4b3233b5c9/g027_clinbiocodeofpractice_mar11.pdf. (ultimo accesso: novembre 2019).
 50. Vasikaran SD, Penberthy L, Gill J, et al. Review of a pilot quality-assessment program for interpretative comments. *Ann Clin Biochem* 2002;39:250-60.
 51. Lim EM, Sikaris KA, Gill J, et al. Quality assessment of interpretative commenting in clinical chemistry. *Clin Chem* 2004;50:632-7.
 52. Smith BR, Aguero-Rosenfeld M, Anastasi J, et al.; Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientists. Educating medical students in laboratory medicine: a

- proposed curriculum. *Am J Clin Pathol* 2010;133:533-42.
53. Vasikaran S, Sikaris K, Kilpatrick E, et al.; IFCC WG Harmonization of Quality Assessment of Interpretative Comments. Assuring the quality of interpretative comments in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1901-11.
 54. Plebani M. Interpretative commenting: a tool for improving the laboratory-clinical interface. *Clin Chim Acta* 2009;404:46-51.
 55. Price C, Chrisenson R. *La medicina di laboratorio basata sulle prove di efficacia: dai principi agli outcome*. Milano: Biomedica Source Books, 2005.
 56. Fogazzi GB. *The Urinary Sediment an Integrated View*. Third Edition. Milano: Elsevier; 2013. p. 177-220.
 57. Libeer JC. Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clin Chim Acta* 2001;309:173-7.
 58. Sciacovelli L, Secchiero S, Zardo L, et al. External Quality Assessment: an effective tool for Clinical Governance in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:740-9.
 59. Ceriotti F, Secchiero S, Plebani M, et al. Linee guida per la gestione dei Programmi di Valutazione Esterna di Qualità. *Biochim Clin* 2011;35:107-26.
 60. Kouri TT, Gant VA, Fogazzi GB, et al. Towards European urinalysis guidelines. Introduction of a project under European Confederation of Laboratory Medicine. *Clin Chim Acta* 2000;297(Suppl 231):305-11.
 61. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). *Urinalysis; approved guidelines, 3rd Edition*. CLSI document GP16-A3. CLSI Wayne, PA, 2009.
 62. Kouri T, Laippala P, Kutter D, et al. Quality specifications for ordinal scale measurements with multiproperty (multiple) urine test strips. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:523-6.
 63. Secchiero S, Epifani MG, Plebani M. Verso l'armonizzazione dell'analisi delle urine con striscia reattiva: il ruolo di un programma di VEQ. *Biochim Clin* 2017;41:248-57.
 64. Schürer-Maly C, Wood WG, Falbo R, et al. An educational web-based external quality assessment outcome and evaluation: first experiences with urinary sediment and hemostaseology. *Clin Lab* 2013;59:1061-9.
 65. Wood WG, Schwarz P, Illigen D, et al. Experience with an alternative form of samples for external quality assessment of urinary sediment (visual sample EQA). *Clin Lab* 2013;59:875-83.
 66. Takubo T, Tatsumi N. Quality control in urinalysis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999;30(Suppl 3):136-48.
 67. Manoni F, Gessoni G, Alessio MG, et al. Gender's equality in evaluation of urine particles: results of a multicenter study of the Italian Urinalysis Group. *Clin Chim Acta* 2014;427:1-5.
 68. Secchiero S, Fogazzi GB, Manoni F, et al. The Italian External Quality Assessment (EQA) program on urinary sediment: results of the period 2012-2015. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(Suppl 2):s1495-502.
 69. Kilpatrick ES, Freedman DB; National Clinical Biochemistry Audit Group. A national survey of interpretative reporting in the UK. *Ann Clin Biochem* 2011;48:317-20.

Utilizzo dei droni per il trasporto di campioni biologici e possibile impiego nella medicina di laboratorio: il progetto PHILOTEA

Maurizio D'Amora

Medicina di Laboratorio, Polo Ospedaliero San Paolo e Loreto Crispi, Asl Napoli 1 Centro, Napoli
a nome del Gruppo di Studio Sibioc "Management e Innovazione organizzativa nella Medicina di Laboratorio"

Caro Editore,

E' noto come l'innovazione, sia tecnologica che organizzativa, impatti in Medicina di Laboratorio rapidamente sia nei processi clinico-diagnostici che organizzativi. Se l'introduzione delle nuove tecnologie è primariamente finalizzata al miglioramento dell'efficacia dei servizi sanitari offerti per ottenere risultati sempre migliori sulla salute del paziente, l'ottimizzazione dell'efficienza dell'organizzazione è comunque essenziale per rendere sostenibile l'uso delle risorse, comunque limitate, nell'ambito dei processi di cura.

Senza analizzare in modo approfondito le politiche e le scelte di riorganizzazione dei Servizi di Laboratorio, è indubbiamente in atto una centralizzazione delle attività di diagnostica che necessita di una logistica adeguata per i trasporti di materiali e campioni biologici. E' fondamentale garantire qualità del dato e correttezza del risultato prodotto con un processo organizzativo anche della fase pre-analitica garantendo che il materiale biologico sia consegnato in tempi brevi, a temperatura controllata ed in uno stato ottimale, nel pieno governo e controllo del complessivo processo diagnostico.

In molti laboratori italiani, una parte importante dei campioni da analizzare proviene da diversi punti di prelievo e raccolta distribuiti sul territorio di competenza e di riferimento sanitario. E' scontato e fortemente raccomandato che il trasporto dei campioni biologici, pur con diverse modalità, debba garantire sempre l'idoneità degli stessi alla presa in carico analitica, per evitare errori di varia natura e gravità e tutelare la sicurezza del paziente. Sicuramente SIBioC ed EFLM con i rispettivi Gruppi di Studio sulla Variabilità Extra-Analitica (GdS VEA) (WG-PRE) hanno fornito un contributo di grande rilievo e particolare importanza per la professione (1-5).

Negli ultimi anni la possibilità di disporre di nuove tecnologie di trasporto dei campioni biologici ha portato a proporre ed ipotizzare anche l'utilizzo dei droni come strumento utile e di forte potenziale d'impatto sull'organizzazione dei laboratori quando ne sia validato l'uso in termini di efficacia ed efficienza.

Un drone è definito come un aeromobile a pilotaggio remoto (APR) ma anche come "Remotely Piloted Aircraft" (RPA), "Unmanned Aerial Vehicle" (UAV), "Remotely Piloted Vehicle" (RPV), "Remotely operated aircraft" (ROA) o "Unmanned Vehicle System" (UVS) essendo caratterizzato dall'assenza di pilota a bordo. Le operazioni di volo sono controllate da remoto da un pilota oppure utilizzando un navigatore o un computer a bordo del drone stesso. In quanto aeromobili, devono sottostare a regole e procedure tipiche degli aerei con pilota ed equipaggio a bordo, tuttavia dei 174 Paesi sovrani valutati dalla UAV Coach (6), solo 57 hanno un regolamento riguardo l'uso dei droni. I droni possono essere di diversa dimensione, da quelli piccoli, utili a trasportare oggetti o strumenti di piccole dimensioni, a mezzi più grandi che possono volare ad altitudini importanti (massimo 4 000 mt) per trasportare carichi pesanti, attualmente maggiormente sviluppati in ambito militare (la Boeing ha sviluppato un drone con 6 mt di apertura alare capace di trasportare sino a 330 kg). Tutti si caratterizzano per essere controllati da remoto ed atterrare in postazioni definite in ragione delle condizioni geografiche del territorio, delle condizioni meteorologiche e delle normative vigenti, così che il loro utilizzo è ormai consolidato per usi militari ed è crescente per applicazioni civili in vari settori con compiti scientifici, di pubblica sicurezza, nell'industria, nell'agricoltura, e così via.

In campo medico i droni possono svolgere diverse funzioni. Sperimentazioni sono state messe in atto per il trasporto dei campioni biologici negli ospedali, di defibrillatori nella medicina di urgenza (in modo da raggiungere il soggetto infartuato in brevissimo tempo), di medicinali, vaccini, kit diagnostici, nelle zone colpite da disastri ambientali

Corrispondenza a: Maurizio D'Amora, E-mail damora_maurizio@libero.it

Ricevuto: 26.10.2019

Revisionato: 28.10.2019

Accettato: 12.11.2019

Publicato on-line: 20.01.2019

DOI: 10.19186/BC_2020.008

o da epidemie, e anche di campioni biologici sacche di sangue ed emoderivati in piena sicurezza (7,8).

Essi hanno il vantaggio di poter facilmente raggiungere zone impervie e rappresentano un'opportunità nell'integrazione dei processi assistenziali in telemedicina (9). I limiti sono dovuti principalmente alla necessità di implementazione operativa, progettuale ed organizzativa, ovvero la necessità di addestrare i piloti, la mancanza di normative chiare che ne regolino l'utilizzo (l'autorizzazione per l'utilizzo dei voli deve essere rilasciata dalle autorità dell'aviazione civile - in Italia l'ENAC), l'utilizzo di tecnologie più affidabili per garantire il corretto trasporto e conservazione dei campioni, le modalità condivise di validazione dei progetti proposti e attivati sperimentalmente (10).

I tre elementi principali per garantire la sicurezza del traffico aereo sono:

- le caratteristiche del veicolo, il quale deve essere registrato e controllato regolarmente;
- le competenze del pilota che deve possedere una licenza conseguita al termine di un corso di addestramento specifico ove le abilità, le conoscenze e le condizioni di salute del pilota devono essere regolarmente verificate;
- la validazione dell'operatività nelle diverse condizioni meteorologiche per consentire il volo in piena sicurezza.

Nonostante le potenzialità dell'utilizzo dei droni in campo medico (11,12), e nello specifico nella medicina di laboratorio, le esperienze a riguardo sono scarse e frammentarie, tuttavia i risultati di accertamenti analitici di chimica, ematologia, coagulazione e microbiologia eseguiti su campioni trasportati in volo rispetto a quelli trasportati a terra sembrerebbero essere confrontabili e non risentire della modalità di trasporto. Anche la stabilità dei campione sembra essere adeguata, come riportato da alcuni studi in letteratura; questi sono comunque estemporanei e con limiti di trasferibilità a specifici ambiti di utilizzo (13-16).

In questa visione vi è stato l'interesse di SIBioc che attraverso il Gruppo di Studio "Management e Innovazione organizzativa nella Medicina di Laboratorio" ha supportato e patrocinato un importante ed innovativo progetto denominato PHILOTEIA, acronimo di Public Health Integrated Logistic Operation Transport Emergency APR.

PHILOTEIA (rete di aziende Health Tech Fly-HTF- costituita da Carpitech srl, Elite Consulting srl, DJI, P.R.I.S.M.A. srls, Wiplab srl, Drone Group srls) è un progetto che utilizza la piattaforma IoT (Pantheon®) integrata nei sistemi dei droni per la governance del complessivo processo di fase pre-analitica extra-laboratorio, finalizzato a migliorare gli attuali processi di controllo della mobilità per le matrici biologiche, sicurezza del personale, metodi e telecomunicazione tra funzioni professionali distanti tra loro ed in condizioni critiche. Il progetto si basa su due pilastri funzionali: tecnologia condivisa ed eco-sostenibilità. Il progetto ha tra i propri obiettivi la valutazione non solo del processo di volo in aree urbane italiane che presentino alcuni limiti geografici e territoriali (centri storici di interesse artistico culturale, zone costiere e montane) ma anche la verifica, con l'uso della citata piattaforma PANTHEON®, dell'integrazione tra richiesta ed offerta di prestazione diagnostica, quando critica. Il progetto pone grande attenzione sulla fase pre-analitica extra laboratorio proprio per le distanze fisiche e geografiche di una rete di laboratori che costituiscono una indubbia ed oggettiva criticità del processo analitico. L'obiettivo è quello di risolvere operativamente la necessità di pieno controllo e governo del processo pre-analitico, a garanzia della qualità complessiva del processo diagnostico, rispondendo anche alle richieste di accreditamento ISO, e di gestione del "risk management" e alle raccomandazioni delle linee guida delle società scientifiche per ridurre e controllare gli errori di sistema.

La prima esperienza di volo in Italia per il trasporto di campioni biologici su drone, è stata condotta a Napoli a marzo 2019. Questa esperienza fa parte di un complessivo progetto sperimentale nazionale ben più ampio che, nato nel 2018, vuole sviluppare l'uso integrato di droni. La sperimentazione proseguirà a Torino nell'ambito di un progetto denominato DORALAB cui PHILOTEIA partecipa nell'ambito dell'iniziativa Torino City Lab.

E' noto come Napoli sia una città con grandi difficoltà relative ai trasporti cittadini con particolari condizioni di logistica ed organizzazione. L'esperienza si è svolta presso l'Azienda Ospedaliera dei Colli seguendo le attuali norme del volo VLOS. Questo primo test è stato patrocinato oltre che da SIBioc, dall'Ordine Nazionale dei Biologi, dalla Regione Campania e dal Comune di Napoli.

Sette campioni biologici, mantenuti a temperatura costante, hanno percorso un tragitto di 600 mt, distanza che separa gli ospedali di Napoli, Cotugno e Monaldi appartenenti all'Azienda Ospedaliera citata, utilizzando un drone progettato per i trasporti in piena sicurezza. Pur essendo risultati del tutto preliminari nell'ambito del progetto complessivo, si è evidenziato come i diversi esami di base testati ovvero emocromo, esami di emostasi (tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale attivato) e di chimica clinica (sodio, potassio, cloro, urea, creatinina, acido urico, calcio) dimostrassero un'ottima corrispondenza in ciascun campione prima e dopo il volo. Inoltre gli stessi esami eseguiti su provette appartenenti agli stessi volontari sani trasportate via terra hanno evidenziato un'ottima correlazione tra i risultati ottenuti nei campioni trasportati con drone rispetto ai campioni trasportati via terra.

Questa è stata probabilmente la prima vera esperienza che si sia svolta in Italia di utilizzo di droni per il trasporto di provette fra laboratori. I risultati, seppure preliminari, sono più che incoraggianti a proseguire il progetto per esplorare, sviluppare e validare l'utilizzo dei droni nel trasporto dei campioni biologici. E' necessario, però, superare eventuali limiti rappresentati da alcune variabili pre-analitiche, dai costi, nonché dalle condizioni atmosferiche, garantendo la sicurezza del trasporto con il coinvolgimento sia di personale esperto che delle diverse autorità competenti.

La seconda fase della sperimentazione, che avverrà a Torino a fine 2019, vedrà la partecipazione oltre che di

PHILOTEA con SIBioC, anche del Politecnico di Torino, del Comune di Torino e di ENAC. L'obiettivo è di sviluppare una fase di test in un contesto bio-tecnologico con la possibilità di stressare le condizioni di trasporto in condizioni mai sperimentate prima in pregresse esperienze, anche internazionali, nell'ambito della complessiva piattaforma integrata di e-Health ove i droni sono connessi in 4G Long Term Evolution (LTE) cioè la quarta e più recente generazione tecnologica per la trasmissione dei dati sulle reti cellulari. I droni oggi possono essere connessi anche con sistemi di quinta generazione (5G) al complessivo sistema digitale denominato "on field" (circuito integrato digitale ad alta scala di integrazione gestibile dall'utente collegato a dispositivi logici programmabili complessi o "gate array"). Oltre a sperimentare le tecnologie in volo in situazioni critiche di condizioni meteorologiche, copertura di distanze diverse ed altro, sarà valutato l'aspetto relativo alla formazione degli operatori possibilmente idonei alla guida dei droni ed anche a permettere al personale sanitario di aumentare le proprie competenze professionali nell'interesse delle aziende sanitarie e conformemente alla normativa europea.

Se saranno confermati i dati preliminari e la possibilità del trasporto con droni verrà validata, così da suggerire un passaggio alla pratica quotidiana, sarà di estremo interesse professionale per SIBioC, coinvolgendo i suoi Gruppi di Studio Societari ed in particolare il GdS VEA, studiare questa opportunità di trasporto e il suo possibile utilizzo all'interno di un governo corretto e professionale della fase pre-analitica. In particolare sarà utile definire raccomandazioni o protocolli di validazione nel momento in cui sarà possibile utilizzare ed implementare il trasporto con droni, in diverse realtà nazionali, con necessità non omogenee, diverse sia rispetto alle condizioni delle sperimentazioni, sia tra di loro.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Giavarina D per il Gruppo di Studio SIBioC "Variabilità extra analitica del dato di laboratorio" (GdS VEA). Indagine conoscitiva su matrice biologica e gestione della fase preanalitica nei laboratori pubblici. *Biochim Clin* 2017;41:142-7.
2. Piva E, Balboni F, Lippi G, et al. per Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIPMeL. "Variabilità extra-analitica del dato di laboratorio", Gruppo di Studio SIBioC "Rischio clinico" e per Società Italiana di Ergonomia e fattori umani (SIE). Raccomandazioni per l'identificazione e la gestione dei risultati critici nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2018;42:167-79.
3. Lippi G, Simundic AM for the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). The EFML strategy for harmonization of the preanalytical phase. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1660-6.
4. Lippi G, Baird GS, Banfi G et al. Improving quality in the preanalytical phase through innovation, on behalf of the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med* 2017;55:489-500.
5. Zaninotto M, Brando B, Cenci AM et al. Raccomandazioni FISMeLab per il trasporto del materiale biologico. *Biochim Clin* 2019;43:187-99.
6. Master list of drone laws (organized by State and Country). A global directory of drone laws and regulations. <http://uavcoach.com/drone-laws/> (ultimo accesso: novembre 2019).
7. Carrillo-Larco RM, Moscoso-Porras M, Taype-Rondan A, et al. The use of unmanned aerial vehicles for health purposes: a systematic review of experimental studies. *Glob Health Epidemiol Genom* 2018;3:e13.
8. Rosser JC, Vignesh V, Terwilliger BA, et al. Surgical and medical applications of drones: a comprehensive review. *JLS* 2018 doi: 10.4293/JLS.2018.00018.
9. Laksham KB. Unmanned aerial vehicle (drones) in public health: A SWOT analysis. *J Family Med Prim Care* 2019;8:342-6.
10. Balasingam M. Drones in medicine-The rise of the machines. *Int J Clin Pract* 2017 doi: 10.1111/ijcp.12989.
11. Lippi G., Mattiuzzi C. Biological samples transportation by drones: ready for prime time? *Ann Transl Med* 2016 10.21037/atm.2016.02.03.
12. Boucher P. Domesticating the Drone: The demilitarisation of unmanned aircraft for civil markets. *Sci Eng Ethics*. 2015 21:1393-412.
13. Amukele TK, Sokoll LJ, Pepper D, et al. Can unmanned aerial systems (drones) be used for the routine transport of chemistry, hematology, and coagulation laboratory specimens? *PLoS One* 2015;10:e0134020
14. Amukele TK, Street J, Carroll K, et al. Drone transport of microbes in blood and sputum laboratory specimens. *J Clin Microbiol* 2016;54:2622-5.
15. Amukele TK, Hernandez J, Snozek CLH, et al. Drone transport of chemistry and hematology samples over long distances. *Am J Clin Pathol* 2017;148:427-35.
16. Amukele T, Ness PM, Tobian AA, et al. Drone transportation of blood products. *Transfusion* 2017;57:582-8.

Droni o laboratori clinici a chilometro zero?

Mario Plebani

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

Caro Editore,

Il trasporto dei campioni biologici rappresenta un momento cruciale della fase pre-pre-analitica ed un aspetto fondamentale per la qualità dei risultati analitici e, in ultima analisi, per l'informazione globale di laboratorio.

Benchè la letteratura abbia accumulato solide evidenze nel dimostrare la vulnerabilità della fase pre-analitica nel suo complesso (1), il problema del trasporto dei campioni biologici e della qualità del campione trasportato sono stati oggetto di scarse ricerche e lavori scientifici. In aggiunta, la maggior parte dei lavori si sono focalizzati sulla qualità del trasporto dei campioni biologici all'interno degli ospedali con sistemi di posta pneumatica, o meglio con le varie tipologie di posta pneumatica oggi disponibili. Una recente revisione sistematica della letteratura sui sistemi di trasporto pneumatico dei campioni biologici ha messo in evidenza un'elevata eterogeneità dei dati che risentono delle diverse forze di accelerazione utilizzate, ma soprattutto che pochi studi hanno valutato l'effetto del trasporto in campioni di pazienti con patologie acute (e quindi con maggiori probabilità di risultati "anomali"), limitandosi a campioni di soggetti di controllo ("sani"). Inoltre, la maggior parte degli studi presenti nella letteratura ha valutato solamente alcuni parametri, ben selezionati, in particolare di chimica clinica, ematologia ed emogasanalisi. Le conclusioni di questa revisione sistematica, pertanto, sono che non esistono prove della sicurezza del trasporto dei campioni con posta pneumatica e che sono necessari ulteriori studi condotti utilizzando campioni di pazienti reali e non solo soggetti di controllo, prendendo in esame una maggior varietà di parametri di laboratorio ed, infine, specificando le condizioni di accelerazione, decelerazione, tempo di esposizione e condizioni di temperatura utilizzate nello specifico sistema di trasporto (2).

La qualità del trasporto a distanza, da altri Ospedali, centri prelievo, ambulatori e altre realtà sanitarie è stato finora oggetto di ancor minore attenzione. Non solo i lavori presenti nella letteratura sono carenti nel disegno di studio per aver valutato quasi esclusivamente campioni di soggetti sani e per i pochi parametri indagati, ma soprattutto non descrivono con accuratezza importanti aspetti quali l'eventuale agitazione del campione, e deviazioni rispetto alla temperatura e durata del trasporto stabilite. In un nostro lavoro, nel quale erano ben stabilite e descritte tutte queste variabili, le conclusioni erano che per alcuni parametri (alanina amino transferasi, potassio, tempo di tromboplastina parziale attivato) si erano osservate variazioni significative a seconda del tempo di trasporto, pur se effettuato in condizioni standardizzate e controllate (3). Per tali ragioni, dopo aver rivisto le procedure operative e aver migliorato la standardizzazione ed il monitoraggio di tutte le condizioni del trasporto, abbiamo proposto specifiche di qualità ben definite per assicurare la qualità del risultato analitico in condizioni di trasporto dei campioni con tempi non superiori alle 3 ore (4). La criticità del trasporto per esami della coagulazione è stata oggetto di alcuni lavori e revisioni sistematiche che sottolineano l'importanza della manipolazione del campione (centrifugazione) e del trasporto per assicurare una buona qualità analitica (5). Per quanto riguarda l'esame emocromocitometrico, si sono documentate differenze significative nel conteggio del numero assoluto di neutrofili e monociti fra campioni processati in sede e dopo un trasporto "overnight" con Federal Express (6). Interessante rilevare che questi dati sono stati ottenuti per la curiosità del laboratorista che ha voluto effettuare, non richiesto, l'analisi in sede prima di inviare i campioni dello studio multicentrico al laboratorio di riferimento.

Una recente revisione sul tema del trasporto dei campioni (7), dopo aver rivisto la letteratura del settore ed analizzato i problemi tuttora aperti, conclude sottolineando le numerose "sfide", ossia problematiche tuttora aperte, nel trasporto dei campioni, e ricorda, peraltro, che lo standard di accreditamento dei laboratori clinici (ISO 15189) richiede espressamente che i laboratori "stabiliscano specifiche di prestazione" per il trasporto dei campioni. Nel

Corrispondenza a: Mario Plebani, Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Università di Padova
Via Giustiniani,2 - 35128 Padova, Tel 0498212792, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 06.11.2019

Revisionato: 07.11.2019

Accettato: 12.11.2019

Publicato on-line: 21.01.2019

DOI: 10.19186/BC_2020.007

paragrafo dedicato al "trasporto esterno dei campioni", rivedendo la letteratura sulle varie modalità adottate (automobile, aereo, treno, posta celere e anche droni), si ribadiscono i problemi ancora aperti e la necessità di un maggior controllo e monitoraggio delle condizioni di trasporto. Ma, in aggiunta, la revisione mette in discussione i costi della logistica, del lavoro per la preparazione dei campioni da inviare, rispetto ai reali benefici del consolidamento dell'attività analitica. E su questo punto, che peraltro rappresenta l'essenza della tematica, non vi sono nella letteratura dati che dimostrino l'efficienza/efficacia del consolidamento "estremo", con trasporto e raccolta di campioni da sedi (centri prelievo e altre realtà sanitarie) a grandi distanze. Il modello "hub e spokes" invocato da amministratori ed eseguito da professionisti del laboratorio senza mettere in discussione costi, vantaggi e problematicità, sembra maggiormente un assunto teorico-politico piuttosto che uno strumento per garantire qualità e sostenibilità (8,9). Del resto, al di là della carenza di dati numerici e trasparenti sui costi della logistica rispetto al risparmio nella fase analitica, che dovrebbe risultare dall'aumento dei volumi e quindi da possibili economie di scala (scarsamente documentate anch'esse), alcune riflessioni vanno fatte. In primis, specialmente nel caso in cui i laboratori clinici di alcuni Ospedali vengono costretti a ridursi a laboratori di urgenza, o "a risposta rapida" se si preferisce questa dizione, il costo del personale che deve presidiare l'attività residua potrebbe essere ammortizzato in modo più razionale conservando anche parte, se non tutta l'attività in elezione, vista la semplificazione garantita dalle strumentazioni automatizzate attuali. In secondo luogo, viene dato poco risalto ai costi ed alla qualità del lavoro di preparazione dei campioni da inviare al laboratorio hub, costi peraltro non indifferenti in termini di tempo e risorse umane impegnate. In terzo luogo, i costi economici del trasporto, legati ad una logistica che tenga in considerazione ed attui procedure standardizzate per il controllo/monitoraggio di temperatura, durata, condizioni del trasporto, sono rilevanti e non trascurabili. Se si aggiungono le crescenti difficoltà legate all'aumento del traffico stradale, della pericolosità legata a possibili incidenti con perdita/danneggiamento dei campioni trasportati, e le altre problematiche (ad esempio, per i droni le norme vigenti) diviene essenziale un ripensamento a tutto raggio.

Per tutti questi motivi, e per avviare un dibattito interno alla professione, ho recentemente avanzato la proposta di istituire il "Laboratorio a chilometro zero (km 0)", prendendo lo spunto dal successo di locali per ristorazione, negozi e altre attività che hanno proposto la formula del "km 0".

Il Chilometro Zero in economia è un tipo di commercio nel quale i prodotti vengono commercializzati e venduti nella stessa zona di produzione. La locuzione "a chilometro zero" identifica una politica economica che predilige il prodotto locale garantito dal produttore nella sua genuinità, in contrapposizione a quello globalizzato (nel nostro caso consolidato).

Nel caso del laboratorio clinico, il km 0 identifica la minimizzazione delle problematiche legate al trasporto "esterno" e a grandi distanze, premia la professionalità in tutte le fasi di attività, assicura la possibilità dei professionisti del laboratorio di entrare a far parte dei gruppi di diagnostica integrata all'interno della struttura e dei percorsi diagnostico-terapeutici. Va sottolineato come la creazione di questi gruppi, definiti "diagnostic teams" o "diagnostic management teams", sia stata proposta per ridurre l'errore diagnostico e migliorare la qualità delle cure e la sicurezza dei pazienti (10-12)

La Tabella 1 riporta gli elementi fondanti il laboratorio a km 0.

Tabella 1

-
- Certezza della tracciabilità del percorso richiesta-prelievo-trasporto-arrivo in laboratorio del campione biologico
 - Certezza della qualità pre-pre-analitica
 - Certezza della determinazione "in house" dell'analisi e/o della corretta selezione di chi la esegue in service e della comunicazione al paziente
 - Certezza della qualità di procedure e processi (accreditamento ISO 15189)
 - Certezza della professionalità, dell'accreditamento e della formazione continua del personale
 - Certezza della consulenza analitica ed interpretativa di chi esegue l'esame
 - Certezza di poter essere parte dei gruppi di diagnostica integrata all'interno dei percorsi clinici
 - Certezza di superare il "modello del silo" e l'isolamento del laboratorio dal contesto clinico
 - Certezza per il cittadino/paziente di ricevere informazioni su indagini successive e/o percorsi diagnostico-terapeutici nella stessa sede o in altre strutture qualificate
-

Il lavoro del Collega D'Amora a nome del Gruppo di studio SIBioC "Management e innovazione organizzativa nella Medicina di Laboratorio" (13), che descrive l'interessante progetto PHILOTEa merita sicuramente attenzione, visto che la letteratura sull'utilizzo dei droni in medicina di laboratorio è ancora molto ridotta e presenta numerosi punti da sviscerare ulteriormente (14-16). I lavori presentati nella letteratura, in effetti, presentano le stesse problematiche nel disegno di studio e nella scarsa rappresentatività dei campioni e tipologia di esami analizzati, descritte in precedenza anche per gli studi sul trasporto esterno ed interno agli Ospedali.

Ma, ancor di più, oltre a valutare le possibili innovazioni tecnologiche, sarebbe importante riesaminare la problematica, ed il rapporto fra possibili benefici e sicure limitazioni del consolidamento "estremo" dell'attività analitica, del modello "hub e spokes" e del ruolo e valore del laboratorio clinico nei processi diagnostico-terapeutici e nella promozione della qualità e sicurezza per il paziente.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Ann Clin Biochem* 2010;47:101-10.
2. Nybo M, Lund ME, Titlestad K, et al. Blood sample transportation by pneumatic transportation systems: a systematic literature review. *Clin Chem* 2018;64:782-90.
3. Zaninotto M, Tasinato A, Padoan A, et al. Effects of sample transportation on commonly requested laboratory tests. *Clin Chem Lab Med* 2012;17:55-60.
4. Zaninotto M, Tasinato A, Vecchiato G, et al. Performance specifications in extra-analytical phase of laboratory testing: sample handling and transportation. *Clin Biochem* 2017;50:574-8.
5. Lippi G, Favaloro EJ. Preanalytical issues in hemostasis and thrombosis testing. *Methods Mol Bio* 2017;1646: 29-42..
6. Kalpathi R, Thompson B, Lu M, et al. BABY HUG Investigators. Comparison of hematologic measurements between local and central laboratories: data from the BABY HUG trial. *Clin Biochem* 2013;46:278-81.
7. Nybo M, Cadamuro J, Comes MP, et al. Sample transportation - an overview. *Diagnosis (Berl)* 2019;6:39-43.
8. Plebani M. Clinical laboratory: bigger is not always better. *Diagnosis (Berl)* 2018; 5: 41-6.
9. Plebani M. Laboratorio Clinico: non sempre più grande è migliore. *Biochim Clin* 2019;43:156-61.
10. Graber ML, Rusz D, Jones ML, et al. The new diagnostic team. *Diagnosis (Berl)* 2017;4:225-38.
11. Plebani M, Laposata M, Lippi G. Driving the route of laboratory medicine: a manifesto for the future *Intern Emerg Med*. 2019;14:337-40.
12. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019;489:49-52.
13. D'Amora M, a nome del Gruppo di studio SIBioC "Management e innovazione organizzativa nella Medicina di Laboratorio". Utilizzo dei droni per il trasporto di campioni biologici e possibile impiego nella medicina di laboratorio: il progetto PHILOTEa. *Biochim Clin* 2020;44:xx-xx
14. Amukele TK, Sokoll LJ, Pepper D, et al. Can unmanned aerial systems (drones) be used for the routine transport of chemistry, hematology, and coagulation laboratory specimens? *PLoS One* 2015 Jul 29;10(7):e0134020
15. Lippi G, Mattiuzzi C. Biological samples transportation by drones: ready for prime time? *Ann Transl Med* 2016;4:92.
16. Amukele T, Ness PM, Tobian AA, et al. Drone transportation of blood products. *Transfusion* 2017;57:582-8.

Lab Tests Online Italia, oggi

LAB TESTS ONLINE

La tua Guida di Fiducia

Prenditi cura della tua salute. Comprendi le tue analisi.

Berardi M.¹, Messeri G.²

¹IFCA -Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

²National Editor di labtestsonline.it

Sono passati oramai più di 10 anni da quando SIBioC ha stipulato un accordo con l' American Association of Clinical Chemistry (AACC) per tradurre in italiano i contenuti relativi alle analisi di laboratorio ed alle patologie ad essi correlate del sito labtestsonline.org (LTO), già attivo negli USA da diversi anni. Una descrizione dettagliata della storia e dello sviluppo del sito è stata pubblicata su BC lo scorso anno (1). Scopo di queste righe è fornire un aggiornamento sullo stato dell'arte del sito italiano ed in particolare sulle azioni intraprese per la sua crescita, i risultati ottenuti ed i programmi per un ulteriore sviluppo.

Nel corso del 2019 si è assistito ad un continuo aumento degli accessi che hanno raggiunto il massimo nel mese di ottobre con la cifra, impensabile all'inizio del progetto, di più di 600 000 visite/mese (Figura 1). In totale, nel 2019 sono stati registrati più di 6 milioni di accessi; questo ci ha portato ad essere il sito nazionale più visionato al mondo dopo quello USA e in Europa prima di Spagna, Francia e Regno Unito. Anche le visite con durata superiore ad 1 minuto, che testimoniano un reale interesse per i contenuti del sito, mostrano un

aumento che segue quello dei contatti totali, anche se ad un livello numerico molto più basso.

Questa continua crescita è attribuibile prevalentemente a due fattori: la costante ed efficace diffusione e promozione del sito mediante i "social media" e l'aggiornamento continuo dei contenuti. L'influenza dei "social" è ben nota in molti settori della vita privata e pubblica e non stupisce che abbia contribuito in maniera sostanziale anche a questa crescita. In particolare su Facebook (@SIBioCmedicinadilaboratorio) e Twitter (@LabTestsIT) sono stati pubblicati, nell'approccio tipico di questi strumenti di comunicazione, in maniera semplice e con stile accattivante immagini e post riguardanti i contenuti del sito. Sono stati creati "hashtag" personalizzati con l'intento di fidelizzare gli utenti proponendo degli "appuntamento settimanali" (ad esempio #quandofareilttest, #tispiegoilttest, #LtOsapeviche).

Anche il continuo aggiornamento dei contenuti ha sicuramente contribuito all'aumento delle visite. La maggior parte degli accessi avviene infatti quasi

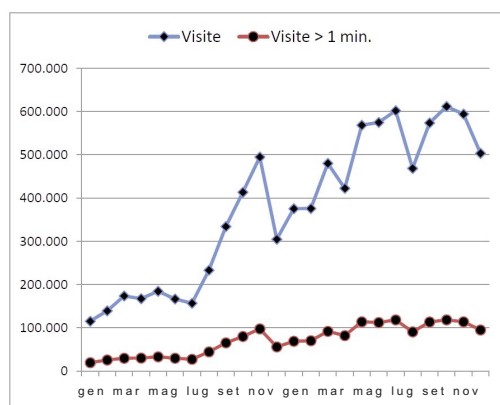


Figura 1

Accessi mensili al sito labtestsonline.it nel 2018 e 2019

Corrispondenza a: Margherita Berardi, Lab Tests Online Italia. E-mail margherita.berardi82@gmail.com

Ricevuto: 03.02.2020

Revisionato: 04.02.2020

Accettato: 04.02.2020

Pubblicato on-line: 01.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.024

esclusivamente attraverso i motori di ricerca ed è noto come la data dell'aggiornamento influenzi il "ranking" con cui tali motori propongono i risultati delle ricerche. Nel contratto con AACC è fra l'altro specificato che i testi presenti nel sito debbano essere aggiornati al massimo ogni tre anni. La data dell'ultimo aggiornamento, che include anche la bibliografia, compare sempre in ogni articolo.

Per capire meglio chi sono i visitatori del nostro sito è stato effettuato un sondaggio on-line su circa 1 000 soggetti i cui risultati sono riportati nella figura 2.

Nonostante sia sempre stato dichiarato che il sito è orientato al cittadino, più di un terzo dei visitatori è costituito da professionisti del mondo sanitario. Fra questi un terzo è rappresentato da clinici, un terzo da specialisti di laboratorio ed il rimanente da tecnici di laboratorio, infermieri e farmacisti.

Un'altra importante novità è costituita dall'attivazione di un Comitato di Consulenza SIBioC per LTO, i cui componenti sono elencati nel sito

<https://labtestsonline.it/comitato-editoriale>. Il compito del Comitato è quello di revisionare e validare quanto tradotto dal sito USA apportando, se e quando necessario, le opportune modifiche che tengano conto della realtà italiana. I componenti sono stati scelti in modo da poter disporre di tutte le competenze necessarie a coprire le varie branche della Medicina di Laboratorio. Questa operazione oltre che importante dal punto di vista della qualità dei contenuti ha anche il significato di rendere LTO sempre più strutturato all'interno di SIBioC attraverso il coinvolgimento e l'impegno di tanti tra i suoi più validi professionisti.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Berardi M. LTO: un successo che parte da lontano. *Biochim Clin* 2019;43:245-7.

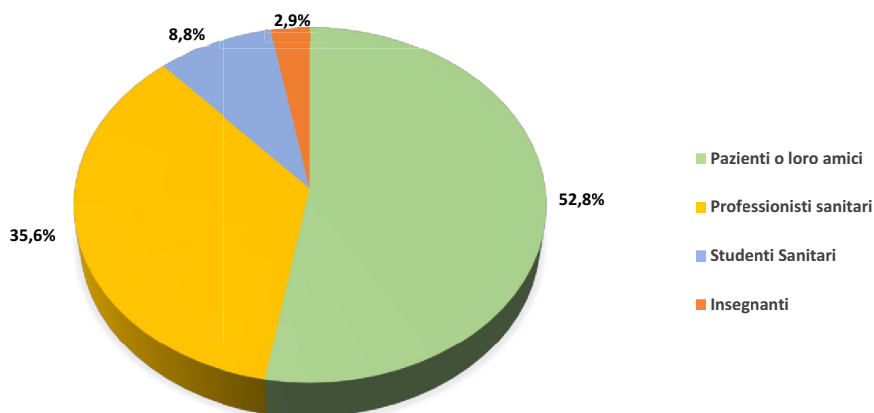


Figura 2

Tipologia di visitatori del sito labtestsonline.it

In ricordo di Giorgio Federici

Il mio aereo stava per muovere per un lungo viaggio, l'altoparlante avvisava di spegnere tutti i dispositivi elettronici per il decollo ed in quel momento arrivava un sms di una riga con la terribile notizia che riguardava Giorgio. Subito dopo dovevo spegnere il telefono senza poter scendere né poter chiamare e condividere con nessuno la profonda tristezza mista a nostalgia per un evento purtroppo atteso, ma come spesso accade, rinvio nella mia mente a "data da destinarsi". Giusto il tempo di due brevi messaggi a Laura e Giuseppe.

Iniziava così un viaggio di 10 ore insieme a Giorgio, come tanti che avevamo fatto insieme, i ricordi si accalcavano in modo confuso e disordinato per poi trovare lentamente una loro cronologia. Sceso finalmente dall'aereo, potevo inviare un messaggio di cordoglio, scrivere a qualche amico, chiamare mia moglie, condividere le emozioni mentre il ricordo ormai trovava una dimensione compiuta.

Nel 1992, giovane pediatra affascinato dal "bancone" del Laboratorio, ero alla ricerca di un fluorimetro per completare una ricerca iniziata in Svezia. Il mio mentore pediatra mi consigliava di chiedere consiglio al Collega Prof. Giorgio Federici i cui laboratori erano allocati presso la Facoltà di Scienze Biologiche. Immaginate cosa possa aver pensato e provato, provenendo da un ambiente clinico accademico "ingessato", nell'incontrare Giorgio: chimico, biologo, biochimico, biotecnologo, medico, scienziato e soprattutto persona di grande umanità, umile e semplice come solo le grandi menti riescono ad essere. Uno studio piccolo, un laboratorio essenziale, ma un rapporto meraviglioso con gli studenti ed i collaboratori tra cui Mario, Renato, AnnaMaria, Fiorella, Anna, Giorgio ed altri. Fu un colpo di fulmine, finalmente sapevo cosa avrei fatto della mia vita professionale. Apprendevo allora i suoi primi insegnamenti: tanto lavoro, tanta passione, tanto studio, tanto "bancone", estrema disponibilità, amicizia, semplicità. Da quel momento abbiamo vissuto fianco a fianco per 25 anni.

Prima a Scienze Biologiche, poi all'Ospedale Bambino Gesù, poi finalmente il Policlinico Tor Vergata dove insieme a Claudio e Renato approntammo il Laboratorio Analisi Cliniche per il Giubileo dei Giovani di Giovanni Paolo II; era il 2000, venne più di un milione di Giovani e facemmo le prime 2000 analisi del nostro Laboratorio. Fu un periodo entusiasmante, sceglievamo insieme ogni dettaglio nella costruzione del Laboratorio: il mobilio, i circuiti elettrici, le strumentazioni; appresi così le sue capacità organizzativa e manageriale senza pari. Allora mi ha insegnato a partire sempre dai bisogni da ciò che serve, da ciò che può essere utile.

Poi tanti anni nei quali la porta del suo studio era sempre aperta; nessun appuntamento per studenti, colleghi, pazienti, rappresentanti dell'Industria, sempre disponibile, sempre pronto a dare fiducia a chi era più indietro, pronto ad affrontare nuove sfide umane e professionali.

L'Enzimologia prima, la Proteomica poi sono stati ambiti scientifici nei quali Giorgio si è cimentato spesso anticipando i tempi. Soprattutto per la Proteomica e la Spettrometria di Massa organizzando un Laboratorio all'epoca all'avanguardia e preconizzando con 20 anni di anticipo quello che oggi si configura all'orizzonte: rendere fruibile la spettrometria di massa e portare le Omics al letto del paziente.

Amava il golf e l'elettronica, in ogni viaggio fatto insieme, e ne abbiamo fatti tanti, cercavamo articoli per golf ed elettronica, sempre alla ricerca del nuovo. Giorgio mi ha insegnato ad innovare, a cercare sempre il nuovo, a guardare oltre, perché l'Università forma "il futuro al futuro".

Tanti Allievi, tanti di loro con carriere accademiche brillanti a Roma e a Chieti. Non solo accademiche, ma anche assistenziali, basta pensare ai primariati di Claudio, Ottavia, Fabrizio, Andrea e mio.

Ci insegnava soprattutto il rispetto, diceva sempre che non conta la targhetta sul camice, ma la Persona che lo indossa.

All'Università di Tor Vergata ha creato la Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, il Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico, il Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche, è stato Direttore del Dipartimento di Medicina Interna nel periodo di massima crescita dello stesso, membro del Consiglio di Amministrazione quando a Tor Vergata si realizzavano le opere più importanti. Credo di non aver citato tanti altri successi di una carriera straordinaria che lo ha visto Presidente della SIBioC, Segretario della Federazione Europea di Medicina di Laboratorio dalla quale sarebbe nata l'attuale EFLM, autore di almeno 350 articoli, forse molti di più. Dietro c'ero sempre io a raccogliere il frutto dei suoi successi, delle sue intuizioni, crescevo imparando ogni giorno da Lui modi, comportamenti, competenze.

Per questo ho avuto la gioia a Napoli, al 50° Congresso SIBioC, di consegnarli la nomina di Maestro della Medicina di Laboratorio. Nella Napoli dove aveva tanti cari amici che amava veramente a partire da Franco.



Il titolo di Maestro è riduttivo per Giorgio, Lui è stato molto di più, è stato una Persona esemplare, un uomo onesto, che ha amato enormemente la sua famiglia, i suoi collaboratori, la sua Università.

Ti chiedo scusa Giorgio, perché la vita ci mette sempre fretta, perché quando sai che qualcuno che ami soffre a volte cerchi di scotomizzare il tutto e andare avanti con il pensiero rivolto a quando tutto era perfetto. Ti chiedo scusa per non esserti stato vicino negli ultimi due anni come avrei dovuto, come nei precedenti incredibili venticinque. Ma anche in questo sei stato un esempio, quando ci incontravamo, tra i tuoi momenti di cura al Policlinico di Tor Vergata, non me lo hai mai fatto pesare, mi salutavi e mi abbracciavi col sorriso e l'ottimismo di sempre. Grazie anche per questo, ultimo, generoso insegnamento, non detto, non scritto insieme, ma pieno della tua meravigliosa umanità.

Sergio Bernardini

Il ricordo di un Maestro della Medicina di Laboratorio: Giorgio Federici

Abbiamo accolto con tristezza il messaggio che ci comunicava la scomparsa di Giorgio Federici.

Molti anni di conoscenza, di colleganza, di amicizia mi consentono di avere la possibilità di scrivere queste poche parole sulla sua figura di studioso, maestro e amico che hanno accompagnato la sua vita culturale scientifica e quella mia. Esse sono state un pò parallele, anche se a distanza di alcuni anni, in quanto svoltesi, sia pur in ambienti e scuole diverse, lungo percorsi affini di curiosità e interessi scientifici e culturali di simile tipologia.

Infatti, partiti dalla Biochimica classica e seguendo i binari delle metodologie, delle tecnologie e dei desideri di conoscenza delle basi molecolari delle intricate vie metaboliche della materia vivente, le direttive di interesse scientifico hanno portato il suo pensiero intellettuale ed anche il mio, a sentieri di sempre maggiore vicinanza con la Medicina Clinica e soprattutto con i suoi aspetti diagnostici. Essi hanno contribuito così più da vicino all'interesse di ritrovare meccanismi di più immediata valenza per il contributo che lo studio dei meccanismi molecolari alla base della materia vivente potessero fornire al medico ed al paziente.

Questo è stato il percorso personale di Giorgio, dalla Biochimica, alla Biochimica Clinica e alla Medicina di Laboratorio più in generale, che lo ha portato ad ottenere in varie Università italiane raggiungimenti scientifici e di ricerca di tutto rilievo nei settori menzionati. Ma anche, e soprattutto, Giorgio Federici ha creato una Scuola vivace e di allievi di grande valore che hanno anch'essi portato lustro alle Discipline nel solco da lui percorso, e che hanno stabilizzato ad elevati livelli le relative competenze facendosi anche apprezzare nel più ampio panorama culturale di studi e ricerche perseguite.

Tra i vari onori ricevuti, mi piace citare per Giorgio quello attribuitogli dalla nostra Società Scientifica di "Maestro della Medicina di Laboratorio" che nella sua stessa dizione, veramente altamente significativa, forse meglio di ogni altra cosa, sta ad indicare il valore del suo contributo alla nostra Disciplina.

Di carattere molto sereno, con la sua calma ed il suo equilibrio era in grado di infondere queste sensazioni anche nei suoi interlocutori, come pure nelle discussioni un po' accese che potevano sorgere per sostenere pareri e iniziative giuste ma diverse, tra i vari Soci e Colleghi. Tutto ciò ha dato una "signature" alla sua valenza umana e di studioso ed amico che non potremo non ricordare come una caratteristica, non solo da apprezzare, ma anche da seguire come esempio di vita e comportamento non comuni nell'Accademia e nella vita.

Francesco Salvatore

STAT PROFILE
Prime+[®]

L'evoluzione tecnologica nel Critical Care Testing

Fino a 22 Analiti, compresi
importanti test:



Tecnologia Nova MicroSensor
Card™ senza Manutenzione

CQ liquido automatico
e preciso

Protezione Clot Block™

Menù:

pH, PCO₂, PO₂, Na, K, Cl, iCa,
iMg, Glu, Lac, Urea (BUN),
Creat, Hct, TCO₂, SO₂%, O₂Hb,
COHb, MetHb, HHb, tBil,
tHb, HbF



nova[®]
biomedical
novabio.us.it

Nova Biomedical Italia S.r.l.
Via Como 19 - 20020 Lainate (MI)
Tel. +39 02 87070041
it-info@novabio.com





BIO MEDIA

La condivisione del sapere

“ Da oltre vent'anni al servizio della comunità scientifica ”



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

Biomedica progetta, organizza e coordina eventi formativi ECM medico-scientifici residenziali e a distanza. È partner di numerose Società Scientifiche, editore in ambito sanitario, ed è attiva nell'ambito della comunicazione digitale, realizzando servizi sviluppati e gestiti *in house*.