
BC

biochimica clinica

In questo numero:

MALATTIE NEURODEGENERATIVE

vedi pag. 117, 119, 157, 194

DIABETE GESTAZIONALE

vedi pag. 116, 143, 206



SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di

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



 **BIOMEDIA**
La condivisione del sapere



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*

sommario



EDITORIALI

115

La Medicina di Laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2
MS. Graziani

116

Ruolo chiave del laboratorio nella diagnosi del diabete gestazionale: forse la prevalenza è sotto-stimata
A. Mosca, M. Montagnana

117

Ruolo dei biomarcatori per la diagnosi precoce e il monitoraggio delle malattie neurologiche
L. Parnetti, G. Bellomo

RASSEGNE

119

Recenti sviluppi nella diagnosi differenziale tra malattia di Parkinson e parkinsonismi atipici
FA. Cazzaniga, AE. Elia, F. Moda

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

129

Indagine conoscitiva sulla qualità del referto dell'esame emocromocitometrico per i Gruppi di Studio SIBioC "Diagnostica Ematologica Integrata" e "Variabilità extra-analitica"
R. Pajola, B. Manenti, D. Giavarina, D. Avino, ML. Ciardelli, B. Cremonesi, G. Da Rin, AM. Di Fabio, F. Dima, A. Fanelli, S. Francione, L. Germagnoli, G. Introcaso, M. Gioia, A. Marini, A. Papa, S. Pipitone, R. Rolla, F. Tosato, C. Ortolani, Sabrina Buoro

143

Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale
G. Bonetti, D. Giavarina, D. Urbani, C. Marchetti, M. Marini, M. Carta

149

Confronto tra un metodo nefelometrico ed un metodo turbidimetrico per la determinazione delle catene leggere libere sieriche: punti di forza e criticità
P. Natali, MR. Cucinelli, G. Patelli, D. Debbia, E. De Santis, M. Varani, T. Trenti

OPINIONI

157

Catene leggere libere nella diagnostica liquorale della sclerosi multipla: possibile alternativa alla ricerca delle bande oligoclonali?
B. Lo Sasso, G. Bivona, CM. Gambino, P. Altavilla, EM. Pappalardo, G. Candore, M. Ciaccio

DOCUMENTI

168

Proposta di un protocollo per la gestione degli approfondimenti in ambito coagulativo nel percorso preoperatorio
S. Luzi, L. De Valentin, R. Turrini, L. Dumitrescu, S. Bonaguro, L. Zardo

174

Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica
Parte III: diagnostica molecolare
F. Di Maggio, F. Borrillo, F. Cariati, R. Tomaiuolo, V. D'Argenio

DOCUMENTI SIBioC

180

Raccomandazioni per la rilevazione e la gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici
per il Gruppo diStudio SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica del Dato di Laboratorio
D. Farci Santarcangeli, M. Careno, ML. Frassanito, D. Giavarina, G. Lippi, A. Modenese, B. Morelli, E. Trauio, R. Vettori, G. Bonetti

sommario

LETTERE ALL'EDITORE

NOTIZIE SIBioC

CASI CLINICI

194

Raccomandazioni italiane di consenso per l'utilizzo dei biomarcatori in pazienti con deterioramento cognitivo lieve: Presentazione del Documento
M. Ciaccio

196

Raccomandazioni italiane di consenso per una diagnosi eziologica basata sui biomarcatori in pazienti con deterioramento cognitivo lieve
M. Boccardi, V. Nicolosi, C. Festari, A. Bianchetti, S. Cappa, D. Chiasserini, A. Falini, UP. Guerra, F. Nobili, A. Padovani, G. Sancesario, S. Morbelli, L. Parnetti, P. Tiraboschi, C. Muscio, D. Perani, FB. Pizzini, A. Beltramello, G. Salvini Porro, M. Ciaccio, O. Schillaci, M. Trabucchi, F. Tagliavini, GB. Frisoni

206

Impatto delle variabili preanalitiche e analitiche sulla diagnosi di diabete melito gestazionale
M. Carta, D. Giavarina, G. Bonetti

209

IFCC Task Force on COVID-19
MS. Graziani

e8

Un caso di gammopatia monoclonale di significato renale
J. Ripepi, M. Basset, M. Bozzola, P. Milani, M. Nuvolone, F. Lavatelli, G. Ferraro, T. Bosoni, L. Pirolini, R. Albertini, G. Palladini

e11

I marcatori di clonalità per la diagnosi e la valutazione della risposta alla terapia nell'amiloidosi da catene leggere: il ruolo del laboratorio
M. Basset, M. Bozzola, J. Ripepi, P. Milani, M. Nuvolone, F. Lavatelli, G. Ferraro, T. Bosoni, L. Pirolini, R. Albertini, G. Palladini

e16

Mieloma multiplo: da plasmocitoma a coinvolgimento multiorgano
A. Vasco, L. Sierchio, F. De Gregorio, M. Mascolo, L. Catalano, M. Savoia

StatStrip® GLU/KET

Sistema di monitoraggio di glucosio e chetoni per uso ospedaliero

L'unica tecnologia di misurazione del glucosio autorizzata dalla FDA per l'uso su tutti i pazienti, inclusi quelli in condizioni critiche



Misuratore StatStrip Xpress® 2



Misuratore con connettività StatStrip® per uso ospedaliero

**I più accurati biosensori per la misura del glucosio, come dimostrato in 138 pubblicazioni
8.000 medicinali studiati - Elimina le interferenze causate da ematocrito, maltosio, galattosio,
paracetamolo, N-acetilcisteina, acido ascorbico e acido urico**

Campioni da 1,2 µL, risultati del glucosio disponibili in 6 secondi

Connettività wireless con LIS/HIS



nova
biomedical

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 2 - Giugno 2020

La Medicina di Laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2

Maria Stella Graziani

Gentili Lettori

Negli ultimi mesi, la vita professionale e personale di tutti noi è stata pesantemente condizionata dal diffondersi a livello globale della infezione da SARS-CoV-2 e quasi nulla nella nostra quotidianità assomiglia alla realtà che conoscevamo.

Questo secondo numero di *Biochimica Clinica* 2020, esce nei tempi stabiliti e con i contenuti programmati, includendo i lavori già pervenuti in redazione, che hanno seguito il normale percorso editoriale. Gli Autori vedono così pubblicati a stampa i loro lavori nei tempi consueti. Mi auguro che questo serva a farvi pervenire una sensazione di normalità: non tutto è stato stravolto da questa inattesa e grave situazione.

Tuttavia, il Comitato Editoriale, ben consapevole della enorme importanza della Medicina di Laboratorio nel corso di questa pandemia, ai fini di una corretta gestione dei pazienti ma anche di tutela della salute della popolazione, ha deciso di dedicare uno spazio specifico ai contributi su COVID-19 inviati alla rivista. Come indicato nella Newsletter di qualche giorno fa, sul sito di BC verrà creata una sezione specifica dove verranno inseriti i contributi su questo tema che saranno liberamente scaricabili.

Molte riviste scientifiche, anche importanti e diffuse a livello internazionale, hanno deciso di pubblicare molto velocemente i lavori connessi a COVID-19, senza che questi, in alcuni casi, siano sottoposti al tradizionale percorso di peer-review. Questa decisione è stata presa nella consapevolezza che la comunità scientifica ha una urgente e pressante necessità di essere informata rapidamente sulle conoscenze che si vanno acquisendo in termini di capacità diagnostica, di terapia, di monitoraggio dei pazienti nonché di epidemiologia. È necessario peraltro che i lettori siano consapevoli che le informazioni fornite in questa forma non sempre sono così solide come quelle presenti nei contributi che hanno seguito il normale processo editoriale di peer-review.

Biochimica Clinica ha preso una decisione diversa: tutti i lavori inviati alla rivista sono sottoposti al consueto processo editoriale, indipendentemente dall'argomento trattato, se relativo o meno a COVID-19. Tuttavia, per i contributi relativi alla pandemia in corso, gli Editori Associati, io personalmente e la Segreteria di Redazione, sono impegnati a rendere il processo editoriale rapido, chiedendo ai Revisori uno sforzo maggiore per velocizzare le revisioni, in modo da rendere disponibili i contributi on line nel più breve tempo possibile.

Se la numerosità dei contributi pervenuti lo consentirà, verranno raccolti in un supplemento dedicato, da pubblicare eventualmente dopo l'estate.

Spero che le sottomissioni alla rivista siano numerose; sono convinta infatti che molti di voi abbiano accumulato (o accumuleranno) in questo periodo esperienze e dati interessanti, da condividere con la nostra comunità professionale.

La Medicina di Laboratorio sta dimostrando anche in questa particolare e drammatica circostanza tutta la sua rilevanza per la cura dei pazienti e la tutela della salute. Una corretta gestione dei pazienti non può in alcun modo prescindere dai dati di laboratorio che sono fondamentali all'interno di ogni scenario clinico e di popolazione.

In attesa di ricevere i contributi con le vostre esperienze professionali, mi auguro che troviate di vostro interesse anche questo nuovo numero di *Biochimica Clinica*.

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Sezione di *Biochimica Clinica*, Università di Verona. E-mail mariastella@graziani.eu

Ricevuto: 04.05.2020

Accettato: 05.05.2020

Publicato on-line: 01.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.049

Ruolo chiave del laboratorio nella diagnosi del diabete gestazionale: forse la prevalenza è sotto-stimata

Andrea Mosca¹, Martina Montagnana²

¹Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano

²Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona

Il diabete gestazionale è una condizione di alterata tolleranza ai carboidrati che si manifesta per la prima volta in gravidanza. È una condizione abbastanza comune con prevalenze variabili dal 4 al 10% a seconda dei centri, e si stima che interessi in tutto il mondo oltre 18 milioni di gravidanze. È importante riconoscere per tempo il diabete gestazionale, che è associato a rischio di esiti avversi materno-fetali quali preeclampsia, taglio cesareo, ipoglicemia neonatale ed altri problemi, non ultimo il rischio che le madri ed i loro figli sviluppino il diabete di tipo 2 in futuro.

Le linee guida italiane per la gravidanza fisiologica hanno declinato una procedura di screening che non è universale, e che viene effettuata sulle donne in base a fattori di rischio (1, 2), ma è in discussione una proposta per ritornare a renderlo obbligatorio per tutte le gravidanze, perché di fatto l'aderenza alle attuali raccomandazioni non è ottimale.

La curva da carico orale di glucosio ha un ruolo chiave nel percorso per la diagnosi del diabete gestazionale, e grande attenzione va posta alla standardizzazione di tutti gli aspetti, tra i quali sicuramente uno dei più importanti riguarda il tipo di anticoagulante da utilizzare per la misura della glicemia. Il gruppo di studio inter-societario SIBioC SIPMeL sul diabete aveva recentemente raccomandato che, per ottenere una misura corretta della glicemia, laddove non sia possibile effettuare il trattamento "gold standard" (raccolta del campione di sangue con eparina, immersione della provetta in un bagnetto di acqua e ghiaccio, e centrifugazione entro 30 minuti dal prelievo) si debba utilizzare una miscela ternaria contenente sodio fluoruro, tampone citrato ed EDTA (3).

In questo numero di *Biochimica Clinica* compaiono due pubblicazioni (4,5) che testimoniano come l'utilizzo della miscela ternaria può impattare in maniera importante sullo screening del diabete gestazionale, col risultato complessivo che il numero di nuove diagnosi potrebbe ragionevolmente raddoppiare. Occorre dunque che tutta la comunità dei laboratoristi, dei ginecologi e di tutti gli altri operatori interessati alla gravidanza sia sensibilizzata su questo aspetto ed adeguatamente preparata. Ci auguriamo che la lettura di questi contributi serva da stimolo per una discussione più ampia, approfondita e che esiti in azioni uniformemente concordate e condivise.

BIBLIOGRAFIA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
1. Sistema nazionale per le linee guida. Gravidanza fisiologica. Linea Guida 20. SNLG-ISS, Roma 2010. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1436_allegato.pdf. (ultimo accesso: aprile 2020)
2. Lapolla A, Mosca A. Screening e diagnosi del diabete gestazionale: definite le raccomandazioni. *Biochim Clin* 2012;36:12-4.
3. Bonetti G, Carta M, Lapolla A, Miccoli R, Testa R, Mosca A in qualità di delegati SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) e Società Italiana di Diabetologia (SID) e per il Gruppo di Studio SIBioC-SIPMeL Diabete Mellito. Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico. *Biochim Clin* 2018;42:263-5.
4. Bonetti G, Giavarina D, Urbani D et al. Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:143-8.
5. Carta M, Giavarina D, Bonetti G. Impatto delle variabili preanalitiche e analitiche sulla diagnosi di diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:206-8.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Milano, E-mail andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 02.04.2020

Revisionato: 03.04.2020

Accettato: 03.04.2020

Pubblicato on-line: 01.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.037

Ruolo dei biomarcatori per la diagnosi precoce e il monitoraggio delle malattie neurologiche

Lucilla Parnetti, Giovanni Bellomo

Sezione di Neurologia - Laboratorio di Neurochimica Clinica, Dipartimento di Medicina, Università di Perugia

L'ultimo ventennio ha visto una radicale trasformazione della definizione di malattia neurodegenerativa da un costruito clinico-patologico ad uno biochimico. Questa evoluzione ha comportato l'inserimento di nuove figure con competenze diverse (chimici clinici, biotecnologi) al fianco dei neurologi, per affrontare la sfida dalla diagnosi precoce fino a quella preclinica. E infatti, la profonda conoscenza dei meccanismi fisiopatologici alla base di condizioni quali la malattia di Alzheimer (Alzheimer's disease - AD), la malattia di Parkinson (Parkinson's disease - PD) e la sclerosi multipla (multiple sclerosis, MS) ha permesso sostanziali avanzamenti sia per la diagnosi precoce che per la possibilità di monitorare gli effetti di farmaci eziologici ("disease-modifying drugs"). L'elemento fondante di questa rivoluzione è il "biomarcatore", inteso come qualunque entità misurabile in un fluido o in un tessuto biologico, capace di testimoniare in maniera affidabile la presenza della malattia fino a predirne l'insorgenza clinica o di monitorarne il decorso. In questo numero, la rivista della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) ha voluto dare spazio a tre lavori di gruppi italiani riguardanti i biomarcatori di PD, SM e AD e le nuove frontiere della diagnostica di laboratorio per queste malattie.

Il primo lavoro "Recenti sviluppi nella diagnosi differenziale tra morbo di Parkinson e parkinsonismi atipici" di Cazzaniga et al. (1) è una rassegna che tratta dei più recenti sviluppi nella diagnostica differenziale tra PD e parkinsonismi atipici. La PD è caratterizzata dalla presenza di aggregati intraneuronali di α -sinucleina (chiamati corpi di Lewy) principalmente a livello della *substantia nigra*. A tutt'oggi, non ci sono biomarcatori efficaci ed utilizzabili in clinica per la diagnosi di PD (2) ed altre sinucleinopatie. Un recente sviluppo in questo campo è rappresentato dall'utilizzo di tecniche come la "protein misfolding cyclic amplification" (PMCA) e "real-time quaking induced conversion" (RT-QuIC) applicate all' α -sinucleina. Queste tecniche sfruttano le peculiari proprietà delle proteine prone all'aggregazione o "amiloidogeniche", amplificando la quantità di aggregati presenti in fluidi biologici o tessuti, permettendone così l'identificazione (3). L'applicazione della PMCA e dell'RT-QuIC ha portato risultati più che incoraggianti nella rilevazione liquorale di aggregati di α -sinucleina, dimostrando elevata specificità e sensibilità in varie forme di sinucleinopatia, come la demenza a corpi di Lewy (DLB) e l'atrofia multisistemica (MSA) (4). Il lavoro in questione commenta soprattutto i risultati ottenuti recentemente dallo stesso gruppo, ovvero l'applicazione dell'RT-QuIC sulla mucosa olfattiva di pazienti con parkinsonismi appartenenti a sinucleinopatie (PD, DLB, MSA) o taupatie (progressive supranuclear palsy - PSP, corticobasal degeneration - CBD) (5). L'RT-QuIC è stata applicata con successo su una nuova matrice biologica (la mucosa olfattiva) ottenendo risultati incoraggianti sia nel differenziare tra loro le diverse sinucleinopatie che nel distinguere taupatie da sinucleinopatie. Una possibile spiegazione della differenza osservata tra sinucleinopatie potrebbe essere rappresentata dal coinvolgimento di ceppi diversi di α -sinucleina aggregata. In tal senso, la potenzialità di RT-QuIC di amplificare la quantità degli aggregati presenti nel campione non alterandone le proprietà strutturali, viene ad assumere un'importanza veramente straordinaria per le potenzialità, sia in termini di diagnosi precoce che differenziale.

Il secondo lavoro "Catene leggere libere nella diagnostica liquorale della sclerosi multipla: possibile alternativa alla ricerca delle bande oligoclonali?" di Lo Sasso et al. (6), è un'opinione sull'uso delle catene leggere libere (Free-Light-Chains, FLC), misurate con nefelometria o turbidimetria nel liquido cefalorachidiano, come biomarcatore per la diagnosi della MS. Attualmente la risonanza magnetica è la tecnica neuroradiologica di riferimento per la diagnosi di MS, cui si affianca, come elemento di supporto, la verifica della presenza nel liquor, con isoelectrofocusing, delle bande oligoclonali. La presenza e la quantità di queste bande esprime la sintesi intratecale di immunoglobuline IgG nel sistema nervoso centrale, espressione della dis-immunità che caratterizza la malattia. Nel lavoro viene valutata la possibilità di usare come biomarcatori liquorali i livelli di FLC di tipo kappa e lambda (κ FLC e λ FLC), che si formano

Corrispondenza a: Lucilla Parnetti, Sezione di Neurologia, Dipartimento di Medicina, Università di Perugia
E-mail lucilla.parnetti@unipg.it

Ricevuto: 30.04.2020

Accettato: 30.04.2020

Publicato on-line: 01.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.046

in eccesso durante la sintesi delle immunoglobuline. In particolare, κ FLC si è dimostrato marcatore altamente sensibile e specifico di malattia demielinizzante anche in quadri molto precoci e non dotati di tutti i requisiti diagnostici neuroradiologici per MS, quali le sindromi clinicamente isolate (7,8).

Il terzo contributo riguardante tematiche neurologiche è la traduzione italiana del lavoro "Italian consensus recommendations for a biomarker-based aetiological diagnosis in mild cognitive impairment patients" di Boccardi et al. (9,10). La tematica in questo caso è la diagnosi pre-demenza della AD. Questa malattia si caratterizza per l'accumulo e l'aggregazione della β amiloide ($A\beta$) e della tau fosforilata (p-tau), ove il peptide neurotossico $A\beta_{42}$ è il costituente principale delle placche amiloidee, mentre la p-tau è il componente che caratterizza i grovigli neurofibrillari. Riscontrare concentrazioni liquorali patologiche di $A\beta$ e p-tau permette di porre diagnosi di AD, indipendentemente dal livello di compromissione clinica (11), così come di predire la progressione a demenza di soggetti affetti da deficit cognitivi lievi (12). In questo contesto, il lavoro di Boccardi et al. definisce un accurato algoritmo diagnostico per predire l'evoluzione dei pazienti. Il lavoro in questione vede la sua principale importanza nel consenso di tutte le società scientifiche Italiane pertinenti (tra cui SIBioC) nell'utilizzo dei criteri proposti.

I tre lavori pubblicati in questo fascicolo di *Biochimica Clinica* testimoniano in maniera eccellente, in diverse patologie neurologiche, l'importanza della diagnosi precoce ed accurata basata sui biomarcatori. In questo campo, il laboratorio clinico diventa un protagonista di primo piano, vedendo nella complementarietà della competenza biochimica e neurologica la strada vincente verso la sconfitta di queste patologie con farmaci capaci di bloccarne i meccanismi.

BIBLIOGRAFIA

1. Cazzaniga FA, Elia AE, Moda F. Recenti sviluppi nella diagnosi differenziale tra malattia di Parkinson e parkinsonismi atipici. *Biochim Clin* 2020;44:119-28.
2. Parnetti L, Paciotti S, Farotti L, et al. Parkinson's and Lewy body dementia CSF biomarkers. *Clin Chim Acta* 2019;495:318-25.
3. Paciotti S, Bellomo G, Gatticchi L, et al. Are we ready for detecting α -synuclein prone to aggregation in patients? The case of 'Protein-Misfolding Cyclic Amplification' and 'Real-Time Quaking-Induced Conversion' as diagnostic tools. *Front Neurol* 2018 doi: 10.3389/fneur.2018.00415.
4. Kang UJ, Boehme AK, Fairfoul G, et al. Comparative study of cerebrospinal fluid α -synuclein seeding aggregation assays for diagnosis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2019;34:536-44.
5. De Luca CMG, Elia AE, Portaleone SM, et al. Efficient RT-QuIC seeding activity for α -synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Transl Neurodegener* 2019 doi: 10.1186/s40035-019-0164.
6. Lo Sasso B, Bivona G, Gambino CM, et al. Catene leggere libere nella diagnostica liquorale della sclerosi multipla: possibile alternativa alla ricerca delle bande oligoclonali? *Biochim Clin* 2019;44:157-67.
7. Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Cuadri Benítez P, et al. Free kappa light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker to assess risk conversion to multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 2015 doi: 10.1177/2055217315620935.
8. Gurtner KM, Shosha E, Bryant SC, et al. CSF free light chain identification of demyelinating disease: comparison with oligoclonal banding and other CSF indexes. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1071-80.
9. Boccardi MM, Nicolosi V, Festari C, et al. Italian consensus recommendations for a biomarker-based aetiological diagnosis in mild cognitive impairment patients. *Eur J Neurol* 2020;27:475-83.
10. Boccardi MM, Nicolosi V, Festari C, et al. Raccomandazioni italiane di consenso per una diagnosi eziologica basata sui biomarcatori in pazienti con deterioramento cognitivo lieve. Traduzione Italiana a cura di Onorato D. *Biochim Clin* 2020;44:196-205.
11. Jack Jr CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2018;14:535-62.
12. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009;302:385-93.

Recenti sviluppi nella diagnosi differenziale tra malattia di Parkinson e parkinsonismi atipici

Federico Angelo Cazzaniga¹, Antonio Emanuele Elia², Fabio Moda¹

¹Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unità di Neurologia 5 - Neuropatologia, Milano

²Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unità di Neurologia 1 - Malattia di Parkinson e Disordini del Movimento, Milano

ABSTRACT

Recent advances in the differential diagnosis of Parkinson's disease and atypical parkinsonisms.

The presence of α -synuclein aggregates in the brain is the main hallmark of Parkinson's disease (PD) as well of other atypical parkinsonisms, including multiple system atrophy (MSA) and dementia with Lewy bodies (DLB). The *in vivo* diagnosis of these disorders is based on clinical criteria that are characterized by unsatisfactory sensitivity and specificity. Several cases thus might be misdiagnosed, especially in the early stages when clinical symptoms overlap. A definite diagnosis can be achieved only at *post-mortem* after the identification of α -synuclein aggregates in the brain. According to the disease, these aggregates affect specific cells and brain areas and are characterized by typical biochemical and morphological features. As a consequence, they are considered disease-specific biomarkers that remain confined to the brain. However, thanks to the development of an ultrasensitive technique named Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC), traces of these specific biomarkers, undetectable with the standard diagnostic techniques, were found in the cerebrospinal fluid (CSF) and olfactory mucosa (OM) of patients with PD, DLB and MSA. This technology is currently being exploited for the analysis of OM and other peripheral tissues such as urine and blood that might contain these biomarkers, likely encapsulated in brain-derived vesicles (e.g. microvesicles, exosomes). For this reason, RT-QuIC could be soon introduced in the field of PD, DLB and MSA diagnosis, finally leading to early diagnosis and patient stratification by a simple OM, blood or urine analysis.

INTRODUZIONE

La malattia di Parkinson (PD) rappresenta la seconda malattia neurodegenerativa più comune dopo la malattia di Alzheimer (AD) (1). Da un punto di vista neuropatologico si riscontrano due alterazioni caratteristiche: perdita di neuroni dopaminergici e presenza di aggregati intraneuronali di α -sinucleina (chiamati anche corpi di Lewy) a livello della *substantia nigra* (2–5). A livello clinico, la PD si presenta con tremore a riposo, rigidità muscolare, instabilità posturale e rallentamento dei movimenti volontari (6, 7). Tuttavia, la diagnosi clinica di questa malattia è molto complessa perché gli stessi sintomi della PD possono presentarsi in una serie di altre condizioni cliniche note come parkinsonismi atipici, caratterizzati da un'evoluzione di malattia più rapidamente aggressiva e meno responsivi alla terapia dopaminergica, e che comprendono la paralisi sopranucleare progressiva (PSP), la

degenerazione corticobasale (CBD), l'atrofia multisistemica (MSA) e la demenza con corpi di Lewy (DLB). L'alterazione neuropatologica cardine di MSA e DLB è la presenza di aggregati di α -sinucleina (come per la PD) che si riscontrano però in differenti aree cerebrali e tipi cellulari. In particolare, nell'MSA troviamo aggregati di α -sinucleina nel citoplasma delle cellule oligodendrogliali (GCI) a livello di gangli della base, ponte e cervelletto, con rari depositi riscontrabili nei nuclei dei neuroni (8, 9). Nella DLB invece, gli aggregati di α -sinucleina (anche in questo caso sottoforma di corpi di Lewy) si localizzano prevalentemente nei neuroni della neocorteccia (10, 11). Poiché gli aggregati di α -sinucleina sono presenti in PD, MSA e DLB, da un punto di vista molecolare, queste patologie vengono classificate come sinucleinopatie (12). L'alterazione patologica caratteristica di PSP e CBD è invece rappresentata dalla presenza di aggregati di proteina

Corrispondenza a: Fabio Moda, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, via Celoria 11, 20133 Milano, Tel 0223942770, E-mail fabio.moda@istituto-besta.it

Ricevuto: 18.02.2020

Revisionato: 13.03.2020

Accettato: 31.03.2020

Pubblicato on-line: 01.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.034

tau. Nella PSP si riscontrano nei neuroni, negli oligodendrociti e negli astrociti a livello del tronco e dei gangli della base mentre nella CBD si riscontrano sia nei gangli della base che nella corteccia cerebrale (13). Da un punto di vista molecolare queste due patologie vengono invece classificate come tauopatie (14). Data la loro peculiare composizione e distribuzione nel sistema nervoso centrale (SNC), questi aggregati sono considerati biomarcatori specifici di malattia (BsM) e la loro rilevazione serve per formulare una diagnosi definitiva (15–17). Questo però richiede l'esecuzione di analisi neuropatologiche condotte sul cervello prelevato all'autopsia (18). Quindi, finché il paziente rimane in vita, la diagnosi si basa su valutazioni cliniche e strumentali definite che sono però caratterizzate da un'accuratezza piuttosto limitata. Per tale ragione la diagnosi rimane probabile o possibile, ma non definitiva. In questa rassegna sarà descritta una nuova tecnica ultrasensibile potenzialmente in grado di diagnosticare queste patologie in modo molto accurato ed in fasi precoci, tramite l'analisi di liquidi biologici e tessuti periferici prelevabili da pazienti in vita.

L'ABBRACCIO MORTALE DI DUE PROTEINE

Crescenti evidenze scientifiche supportano l'ipotesi che, oltre a depositarsi nel SNC, sia l' α -sinucleina che la proteina tau rappresentino proprio la causa di queste patologie. Infatti, prima di accumularsi nel cervello, queste proteine vanno incontro ad un riarrangiamento della loro struttura che conferisce loro caratteristiche patologiche, esattamente come succede nelle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSEs) (2, 19–25). Le TSEs sono l'esempio paradigmatico di molte malattie neurodegenerative perché ne condividono i meccanismi molecolari patologici. Sono state ben studiate in passato ed è stato scoperto che la loro causa è un'isoforma anomala della proteina prionica fisiologicamente espressa a livello cellulare (PrP^C, dove C sta per cellulare), chiamata prione che si forma in seguito al riarrangiamento strutturale della PrP^C (26, 27). Il prione viene anche indicato come PrP^{Sc}, dove Sc sta per scrapie che è il termine inglese della malattia spongiforme trasmissibile che colpisce pecore e capre. Una volta formatosi, PrP^{Sc} è in grado di diffondersi nel SNC causando neurodegenerazione e portando a morte il paziente (28). I meccanismi coinvolti nella generazione e nella propagazione del prione non sono ancora ben noti. E' noto invece che una volta formatasi, la PrP^{Sc} è in grado di interagire con la PrP^C forzandola ad acquisire una simile conformazione patologica. In questo modo i prioni si auto-replicano a spese della PrP^C in una reazione a catena che porta poi alla manifestazione clinica della malattia (Figura 1).

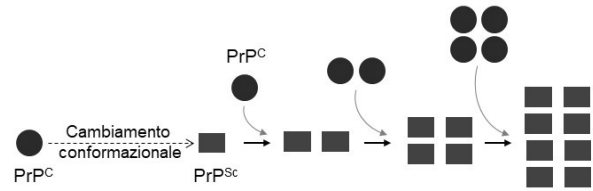


Figura 1
Schematizzazione dell' autoreplicazione della PrP^{Sc} a spese della PrP^C.
PrP^{Sc}, proteina prionica scrapie; PrP^C, proteina prionica cellulare.

L'aspetto più affascinante delle TSEs risiede nel fatto che, seppur causate dalla stessa proteina, presentano caratteristiche cliniche e patologiche molto eterogenee. Nell'uomo ad esempio, esistono almeno 6 diverse forme sporadiche della malattia che hanno manifestazioni cliniche ed alterazioni neuropatologiche totalmente distinte (29, 30). Ad oggi sappiamo che questa eterogeneità fenotipica è associata a differenze nella struttura anomala che può essere acquisita dalla PrP^{Sc} (31). Per cui, prioni con conformazioni differenti (definiti anche "ceppi") promuovono TSEs caratterizzate da quadri clinico-patologici altrettanto differenti e caratteristici (32). Questa premessa sulle malattie da prioni è importante per capire meglio ciò che accade nella PD e nei parkinsonismi atipici che sono causati da proteine aberranti con caratteristiche simili a quelle della PrP^{Sc}. A tal proposito, PD, MSA e DLB sono causate da tre differenti Aberranti α -sinucleine (A α S) che vengono anche definiti "ceppi" (Figura 2).

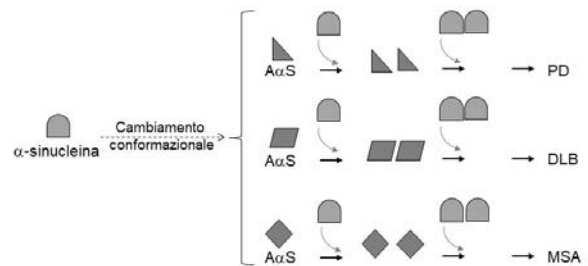


Figura 2
Schematizzazione della capacità di differenti ceppi di A α S di autoreplicare a spese di α -sinucleina causando patologie distinte (PD, DLB ed MSA).
A α S, aberranti α -sinucleine; PD, malattia di Parkinson; DLB, demenza con corpi di Lewy; MSA, atrofia multisistemica.

Non solo, come succede per la PrP^{Sc}, anche le A α S sono in grado di abbracciare α -sinucleina normale inducendola ad acquisire simili anomalie strutturali (33). In questo modo si instaura un meccanismo di auto-replicazione di A α S che si diffonde nel SNC e causa malattia. La differente localizzazione degli aggregati potrebbe derivare dal fatto che ogni ceppo di A α S possa avere un tropismo specifico per una determinata area cerebrale e un caratteristico citotipo, ma questo è ancora

tutto da verificare. Inoltre, minime variazioni strutturali nei ceppi di A α S sembrerebbero essere responsabili delle varianti fenotipiche (clinico-patologiche) riscontrabili nella stessa malattia, come recentemente descritto per PD, DLB ed MSA (34–39).

Queste nuove scoperte relative al ruolo chiave dei diversi ceppi di A α S nel caratterizzare e causare PD, DLB ed MSA rappresentano un nuovo ed importantissimo punto di partenza per lo sviluppo di strumenti diagnostici e terapeutici mirati. Inoltre, la scoperta che la stessa patologia può mostrare molteplici varianti fenotipiche associate a minime variazioni strutturali di A α S, sta generando criticità sul piano terapeutico perché ciascun fenotipo può essere più o meno sensibile ad uno stesso trattamento. Di conseguenza, la possibilità di rilevare ed identificare differenti ceppi di A α S in campioni biologici di pazienti con PD, DLB e MSA rappresenta la base per migliorare significativamente l'accuratezza diagnostica di queste malattie, ma soprattutto di sviluppare trattamenti farmacologici personalizzati. Ad oggi PD, DLB e MSA possono essere diagnosticati clinicamente seguendo criteri standardizzati che hanno però un livello di accuratezza limitato che non consente, *in vivo*, una diagnosi certa. Questi criteri infatti prevedono l'analisi di biomarcatori meno specifici di A α S e, non di rado, le diagnosi cliniche di PD, DLB ed MSA non vengono confermate al riscontro neuropatologico.

DIAGNOSTICA DI PARKINSON E PARKINSONISMI ATIPICI

Diagnosi clinica

La diagnosi *intra-vitam* di PD, DLB, MSA ed altri parkinsonismi si basa sulla storia clinica dei pazienti con approfondimenti neurologici e strumentali. Esistono dei criteri che permettono di facilitare e standardizzare il processo diagnostico, tuttavia hanno un'accuratezza limitata che si aggira intorno all'80% nel caso di PD (40), 62% per MSA (41, 42), 95% per PSP (43), 68% per CBD (44) e 80-85% per DLB (45). Questo significa che diverse diagnosi cliniche non trovano poi conferma all'autopsia. Soprattutto agli esordi, PD, MSA, DLB, PSP e CBD condividono dei sintomi motori molto simili che non consentono di riconoscerle con certezza.

La PD si presenta con una sindrome non motoria caratterizzata da sintomi di natura neuropsicologica, autonoma, disturbi del sonno e delle sensibilità come ad esempio l'iposmia e il dolore (46). È stato suggerito che sintomi quali il deficit olfattivo, i disordini del sonno (REM sleep Behaviour Disorder – RBD), la depressione e la stipsi possano essere presenti anche prima dei disturbi motori costituendo così una fase premotoria della malattia (47). I criteri clinici della Movement Disorders Society prevedono inoltre il riconoscimento di sintomi pre-motori come criteri di supporto ed in particolare hanno dato enfasi al riconoscimento della denervazione autonoma cardiovascolare (valutabile anche attraverso un esame di scintigrafia cardiaca con

metaiodobenzilguanidina - MIBG) e soprattutto alla presenza dell'iposmia, come fattori confermativi della diagnosi motoria (48).

La diagnosi clinica di MSA richiede la presenza di disturbi autonomici, quali ipotensione ortostatica o sintomi genitourinari, associati ad una sindrome cerebellare nella MSA-C o a parkinsonismo nella MSA-P. La diagnosi differenziale tra MSA-P e PD è guidata da test autonomici cardiovascolari, indagini di neuroimaging strutturale (RM encefalo) e funzionale (scintigrafia miocardica con MIBG) (41).

Infine la DLB si presenta con un quadro sintomatologico piuttosto ampio. Le principali categorie di sintomi sono rappresentate da deficit cognitivi, sintomi neuropsichiatrici, segni motori extrapiramidali. La demenza è la caratteristica clinica centrale e imprescindibile per la diagnosi clinica di DLB, mentre segni motori extrapiramidali sono presenti nel 25-50% dei pazienti. Al momento, la maggiore difficoltà nel corso dell'iter diagnostico rimane la sua discriminazione dalla malattia di Alzheimer (AD). Numerosi studi hanno mostrato come la DLB sia caratterizzata da maggiori deficit visuospatiali e dell'attenzione, allucinazioni visive, parkinsonismo e disautonomia. In particolare, i segni motori extrapiramidali sono fortemente suggestivi di DLB, poiché sono inusuali negli stadi precoci dell'AD e della demenza vascolare. Il parkinsonismo è una caratteristica tipica della DLB rispetto ad altre sindromi dementigene e ne giustifica l'inclusione nell'ambito dei cosiddetti parkinsonismi atipici. Inoltre, il quadro motorio determina anche una delle principali difficoltà nella diagnosi differenziale, poiché rende la DLB clinicamente equivalente a quadri di PD caratterizzati dalla presenza di demenza (PDD) eccezione fatta per la sequenza temporale dei sintomi. Un esempio è la controversa ipotesi definita "one year rule", che indica come la comparsa di sintomi cognitivi entro un anno dall'esordio del parkinsonismo (sintomi motori), sia maggiormente associata ad una diagnosi di DLB rispetto al PDD. Oltre alle principali caratteristiche, si riscontrano particolari clinici "suggestivi" come: la positività della scintigrafia cerebrale con 123I-ioflupane per il trasportatore della dopamina (DaTSCAN), la spiccata sensibilità ai neurolettici ed il disturbo del comportamento del sonno REM. Nonostante i continui aggiornamenti delle linee guida risulta attualmente complessa la differenziazione nosologica.

Risulta quindi chiaro come l'eterogeneità fenotipica che caratterizza queste malattie sia in grado di complicare ulteriormente la loro classificazione clinica che è oggi fondamentale per una corretta informazione e gestione del paziente, soprattutto alla luce della diversa risposta al trattamento farmacologico e della diversa prognosi delle varie forme. Il corretto inquadramento clinico dei pazienti, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia, è inoltre importante per identificare il rischio di sviluppare complicanze specifiche di una malattia, impostare una corretta terapia farmacologica, ottimizzare l'inclusione di pazienti appropriati negli studi clinici (49). Questa incertezza clinica risulta dal fatto che

ad oggi non sono ancora stati identificati BsM accurati ed affidabili e quindi, per arrivare ad una diagnosi definitiva, è necessario attendere la morte del paziente, prelevare il SNC e condurre analisi biochimiche e neuropatologiche specifiche volte all'identificazione, alla caratterizzazione ed alla localizzazione dei ceppi di A α S (nel caso di PD, DLB ed MSA) o tau (nel caso di PSP e CBD).

Tuttavia, grazie allo sviluppo di una tecnica ultrasensibile chiamata "Real Time Quaking Induced Conversion" (RT-QuIC) è stato possibile dimostrare che per alcune patologie neurodegenerative tracce di BsM siano in realtà presenti in liquidi biologici e tessuti periferici facilmente prelevabili (50, 51). La loro concentrazione però è così limitata da non consentirne una corretta rilevazione con le comuni tecniche diagnostiche. Come descriveremo nel paragrafo successivo, negli ultimi anni l'RT-QuIC si è fortemente indirizzata verso la valutazione di BsM presenti nel liquido cefalorachidiano (LCR), urina e sangue, ed in altri tessuti periferici come mucosa olfattiva (OM), che possano supportare la diagnosi clinica di specifiche patologie neurodegenerative (in particolare PD, MSA e DLB), in fasi più o meno precoci di malattia. Tutto questo si è reso possibile grazie ai numerosi studi condotti nel campo delle TSEs che hanno permesso di dimostrare la capacità dell'RT-QuIC di rilevare tracce di prioni nel LCR e nella OM di pazienti con diverse forme di malattia con elevata sensibilità e specificità. Dopo un lungo processo di armonizzazione e validazione inter-laboratorio la tecnica RT-QuIC si è dimostrata estremamente robusta ed affidabile per la diagnosi clinica delle TSEs ed è recentemente entrata a fare parte dei criteri diagnostici del Sistema Sanitario Nazionale (SSN) per queste malattie. Molteplici laboratori stanno ottimizzando la tecnica per la ricerca di BsM periferici responsabili di PD, MSA e DLB.

Sviluppo di tecniche ultrasensibili per la diagnostica liquorale di PD, MSA e DLB

Il principio di funzionamento dell'RT-QuIC sfrutta la capacità intrinseca delle proteine con conformazione aberrante di interagire con i loro conformeri normali inducendone un cambiamento conformazionale. Nel caso del PD, MSA e DLB si sfrutta la caratteristica dei diversi ceppi di A α S di indurre il cambiamento conformazionale dell' α -sinucleina (rec- α S) utilizzata come substrato di reazione RT-QuIC (α S_RT-QuIC). Come substrato si utilizzano proteine ricombinanti (generalmente prodotte in *Escherichia Coli*) che vengono diluite in un tampone di reazione (generalmente tampone fosfato salino o PBS) contenente un colorante fluorescente chiamato tioflavina T (ThT). A questo substrato viene poi aggiunto il campione biologico di interesse (ad esempio LCR o OM) opportunamente preparato. Le reazioni vengono preparate in piastre da 96 pozzetti e ciascun campione biologico viene generalmente analizzato in quadruplicato. Una volta pronte, le piastre vengono inserite in appositi lettori di fluorescenza per micropiastre

(BMGLabtech, Ortenberg, Germania) che sottopongono i campioni a cicli di incubazione ed agitazione a temperatura controllata a cui alternano letture di fluorescenza i cui valori vengono registrati in tempo reale.

Bisogna premettere che, in condizioni fisiologiche l' α -sinucleina è una proteina intrinsecamente disordinata (manca di struttura terziaria ordinata) e si ripiega correttamente solo in seguito alla sua interazione con le membrane cellulari. In seguito a questo legame, la porzione N-terminale della proteina si riorganizza in strutture secondarie ad α -elica (52). Al contrario, i ceppi di A α S presentano un elevato contenuto di strutture secondarie a β -foglietto che rendono la proteina propensa all'aggregazione. Nelle reazioni α S_RT-QuIC, la rec- α S si presenta in forma intrinsecamente disordinata, ma è comunque in grado di andare incontro ad un riarrangiamento strutturale caratterizzato da elevato contenuto di strutture β -foglietto in seguito all'interazione con A α S. Per massimizzare l'efficienza di queste reazioni, i campioni biologici possono essere pretrattati per eliminare molecole o fattori capaci di influenzare l'indagine (ad esempio isolamento ed analisi della frazione esosomiale da sangue e urina). Di conseguenza, se i campioni biologici analizzati in α S_RT-QuIC contengono A α S (anche in quantità molto piccole) questi interagiranno con la rec- α S e la forzeranno ad acquisire strutture β -foglietto (rec- α S^m). In questa fase di incubazione, le rec- α S^m interagiranno con altre rec- α S innescando un meccanismo di conversione a cascata. Le rec- α S^m inizieranno ad aggregare tra loro generando fibre amiloidi la cui formazione verrà monitorata attraverso misure di emissione di fluorescenza determinate dalla ThT. Nella fase di agitazione, le fibre amiloidi vengono spezzettate generando piccoli aggregati che a loro volta promuoveranno la formazione e l'aggregazione di nuova rec- α S^m. La ThT è un sale del benzotiazolo in grado di intercalarsi nei foglietti- β presenti negli aggregati proteici ed emettere fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 480 nm. L'intensità di fluorescenza risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di fibre amiloidi presenti nel campione. Grazie alla ThT è quindi possibile monitorare in tempo reale la cinetica di formazione delle fibre amiloidi di rec- α S^m. Se rappresentiamo questa cinetica su un piano cartesiano dove la fluorescenza è in funzione del tempo, possiamo osservare tre diverse fasi:

- lag phase, fase iniziale di generazione di rec- α S^m e formazione dei primi aggregati che sono però in numero non sufficiente per determinare un aumento di intensità di fluorescenza
- growth phase, fase di formazione delle fibre amiloidi di rec- α S^m con velocità molto rapida (per effetto della trasmissione a cascata del riarrangiamento strutturale da rec- α S a rec- α S^m) a cui si associa un'esponenziale aumento di fluorescenza
- equilibrium phase, fase di equilibrio in cui è stata raggiunta la massima concentrazione di fibre amiloidi e la fluorescenza mantiene un valore più o meno

costante.
Si forma quindi una curva di aggregazione che

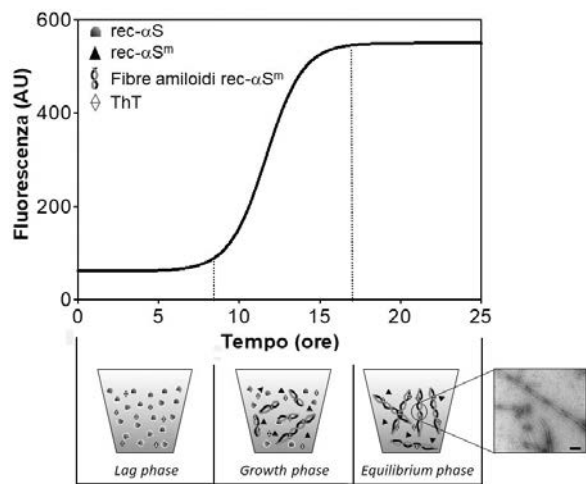


Figura 3
Grafico rappresentativo del processo di conversione della $rec-\alpha S$ in $rec-\alpha S^m$ e sua aggregazione a formare fibre amiloidi che si verifica in $\alpha S_{RT-QuIC}$. Il grafico riporta le tre fasi principali: lag phase, growth phase ed equilibrium phase con le principali modificazioni che si verificano nella mix di reazione. Sull'asse delle ordinate vengono riportati valori esemplificativi ed arbitrari di fluorescenza (AU) mentre sull'asse delle ascisse viene riportato il tempo (ore). In basso a destra viene mostrata un'immagine di Microscopia Elettronica a Trasmissione rappresentativa degli aggregati di $rec-\alpha S^m$ che si ottengono a fine della reazione. Scale bar: 100nm.
 $rec-\alpha S$, α -sinucleina ricombinante; $rec-\alpha S^m$, alfa sinucleina ricombinante a beta foglietto.

generalmente assume un aspetto sigmoidale (Figura 3).
E' importante sottolineare che in condizioni normali di $\alpha S_{RT-QuIC}$, la $rec-\alpha S$ va incontro ad una spontanea conversione a $rec-\alpha S^m$, anche in assenza di $A\alpha S$. Anche in questo caso la cinetica di aggregazione segue un andamento sigmoidale che può essere apprezzato sul grafico fluorescenza/tempo (Figura 4, linea nera continua). Tuttavia, la presenza di $A\alpha S$ nei campioni biologici provoca una netta e significativa accelerazione della cinetica di aggregazione del substrato determinando uno spostamento a sinistra della curva sigmoide (Figura 4, linea nera tratteggiata). Questo fenomeno viene definito effetto "seeding" ed è un indice indiretto della presenza di $A\alpha S$ nel campione biologico. Recenti studi suggerirebbero che l'effetto "seeding" sia proporzionale alla quantità di $A\alpha S$ presente nel campione (53).

Il meccanismo di funzionamento dell' $RT-QuIC$ è concettualmente analogo a quello della Polymerase Chain Reaction (PCR). In questo caso però, al posto degli acidi nucleici, vengono amplificate proteine con conformazione anomala. Attualmente, diversi gruppi hanno raggiunto ottimi risultati nello sviluppo di specifici protocolli sperimentali (Tabella 1) per identificare $A\alpha S$ nell' LCR di soggetti con PD, DLB ed MSA. Nel 2016

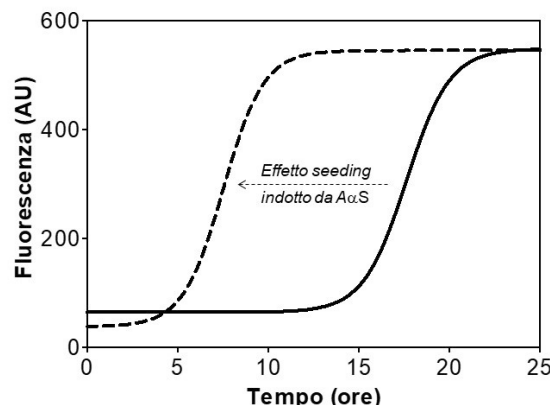


Figura 4
Rappresentazione dell'effetto seeding in $\alpha S_{RT-QuIC}$ dovuto all'aggiunta alla reazione di campioni biologici (ad esempio LCR) contenenti tracce di $A\alpha S$. E' possibile osservare il caratteristico spostamento della sigmoide a sinistra (linea tratteggiata) caratteristico del fenomeno di accelerazione della cinetica di aggregazione della $rec-\alpha S^m$.
 $A\alpha S$, aberranti α -sinucleine; LCR, liquido cefalo-rachidiano; $rec-\alpha S^m$, α -sinucleina ricombinante a beta foglietto.

Green et al. (54) hanno analizzato in $\alpha S_{RT-QuIC}$ campioni di LCR collezionati da una coorte di pazienti con diagnosi neuropatologicamente confermata di DLB, PD, PSP, CBD, DLB con concomitante patologia AD, AD con presenza di corpi di Lewy e AD. Lo studio ha permesso di osservare un'efficiente effetto "seeding" dai campioni dei pazienti PD e DLB con una sensibilità rispettivamente del 95% e 92% e con una specificità del 100%. In pazienti con patologia mista DLB/AD è stata osservato effetto "seeding" con una sensibilità del 65%; mentre come atteso, nessuno dei campioni collezionati da pazienti con PSP, CBD, AD e controlli ha indotto effetto "seeding". Nel 2017 Soto et al. (55) hanno condotto analisi $\alpha S_{RT-QuIC}$ su campioni di LCR di pazienti con PD o altri disturbi neurodegenerativi o neurologici osservando un efficiente effetto "seeding" dai campioni di pazienti PD con una sensibilità complessiva dell'88,5% e una specificità del 96,9%. Nel 2018 il gruppo di Caughey B. (53) ha analizzato in $\alpha S_{RT-QuIC}$ campioni di LCR di pazienti con PD, DLB e controlli ed ha notato un effetto "seeding" significativo in 27 campioni su 29 di pazienti con diagnosi di PD e DLB. Lo studio ha raggiunto una sensibilità diagnostica del 93% ed una specificità del 100%. Inoltre, rispetto ai due studi precedentemente descritti, le condizioni sperimentali utilizzate hanno prodotto risultati in tempi decisamente più rapidi (1-2 giorni *versus* 5-13 giorni).

Nel 2019, il gruppo di Kanthasamy A. (56) ha eseguito analisi $\alpha S_{RT-QuIC}$ su LCR di pazienti con PD, PSP e controlli dimostrando un efficiente effetto "seeding" solo nei campioni di pazienti con PD e in due pazienti PSP che avevano però concomitante presenza di patologia a corpi di Lewy. Pertanto, anche questo studio si è dimostrato molto sensibile nel rilevare $A\alpha S$. Nello stesso anno il gruppo di Verbeek M. (57) ha

Tabella 1

Protocolli sperimentali di α S_{RT-QuIC} su campioni di liquido cefalo rachidiano (LCR) e mucosa olfattiva descritti fino ad oggi.

Anno (ref)	Diagnosi	Campione biologico	Mix di reazione	Condizioni sperimentali	Sensibilità	Specificità
2016 (54)	PD	LCR	PBS (pH 8.2), 100 mmol/L ThT, 10 μ mol/L rec- α S umana, 0.1 mg/mL	Fluorimetro: BMG OPTIMA FluoSTAR Temperatura: 30°C Incubazione: 14 min Agitazione: 1 min (200rpm) Biglie: silice 0,5 mm	95%	100%
	DLB				92%	
2017 (55)	PD	LCR	PIPES (pH 6.5), 100 mM NaCl, 500 mM ThT, 5 μ mol/L rec- α S umana, 1 mg/mL	Fluorimetro: Gemini EM Temperatura: 37°C Incubazione: 29 min Agitazione: 1 min (500rpm)	88,5%	96,9%
2018 (53)	PD/DLB	LCR	PBS (pH 8.0), 40 mM NaCl, 170 mM SDS, 0.0015% ThT, 10 μ M rec- α S umana, 0.1 mg/mL	Fluorimetro: BMG Omega FluoSTAR Temperatura: 42°C Incubazione: 1 min Agitazione: 1 min (400rpm) Biglie: silice 0,8 mm	93%	100%
2019 (56)	PD	LCR	NaCl, 100 mM rec- α S umana, 5 mg/mL	Temperatura: 37°C Incubazione: 0 min Agitazione: Continuo (1000rpm) Biglie: silice 0,8 mm	100%	-
2019 (57)	PD	LCR	PBS (pH 8.2), 100 mmol/L ThT, 10 μ mol/L rec- α S umana, 0.1 mg/mL	Fluorimetro: BMG OPTIMA FluoSTAR Temperatura: 30°C Incubazione: 14 min Agitazione: 1 min (200rpm) Biglie: silice 0,5 mm	75%	94%
2019 (58)	DLB	LCR	PBS (pH 8.0), 40 mM NaCl, 170 mM SDS, 0.0015% ThT, 10 μ M rec- α S umana, 0.1 mg/mL	Fluorimetro: BMG Omega FluoSTAR Temperatura: 30°C Incubazione: 14 min Agitazione: 1 min (200rpm) Biglie: silice 0,8 mm	92,9%	95,9%
2019 (60)	PD/MSA	Mucosa olfattiva	PBS (pH 8.0), 40 mM NaCl, 170 mM ThT, 10 μ M rec- α S umana, 0.1 mg/mL	Fluorimetro: Fluoroskan Ascent microplate reader Temperatura: 42°C Incubazione: 14 min Agitazione: 1 min (600rpm)	-	-
2020 (59)	PD/MSA	LCR	PIPES (pH 6.5), 100 mM NaCl, 500 mM ThT, 5 μ mol/L rec- α S umana, 1 mg/mL	Fluorimetro: Gemini EM Temperatura: 37°C Incubazione: 29 min Agitazione: 1 min (500rpm)	93,6% 84,6%	100%

PD, malattia di Parkinson; DLB, demenza a corpi di Lewy; MSA, atrofia multisistemica; PBS, tampone fosfato salino; ThT, Tioflavina T; rec- α S umana, α -sinucleina ricombinante umana; SDS, Sodio Dodecil Solfato; PIPES, Piperazina-N,N'-bis.

eseguito analisi α S_{RT}-QuIC di campioni di LCR collezionati da pazienti con diagnosi clinica di PD e pazienti la cui diagnosi invece non era ancora ben chiara. Questi ultimi pazienti sono stati seguiti nel tempo fino al momento in cui è stato possibile arrivare ad una diagnosi clinica. Le analisi α S_{RT}-QuIC hanno mostrato un significativo effetto “seeding” solo nei pazienti che hanno poi sviluppato una sinucleinopatia con una sensibilità del 75% e una specificità del 94%.

Sempre nel 2019, Zanusso et al. (58) hanno applicato la α S_{RT}-QuIC per analizzare LCR di pazienti con diagnosi neuropatologica di DLB ed altre malattie neurodegenerative. Questo studio ha mostrato un efficiente effetto “seeding” promosso dai campioni di LCR appartenenti a pazienti con DLB (sensibilità 92,9% e specificità 95,9%). Nel febbraio 2020, il gruppo di Soto C. (59) ha invece sottoposto ad analisi α S_{RT}-QuIC campioni di LCR collezionati da un'ampia popolazione di pazienti con PD, MSA e controlli dimostrando la capacità di rilevare un effetto “seeding” nei campioni PD ed MSA con una sensibilità del 93,6% (PD) e 84,6% (MSA) e una specificità del 100%.

Tutti questi risultati dimostrano che l' α S_{RT}-QuIC è davvero un ottimo strumento che, una volta ottimizzato, potrebbe essere in grado di rivoluzionare la diagnosi clinica di PD, DLB ed MSA. Questo perché vengono analizzati i BsM (ceppi di A α S) e non biomarcatori surrogati di malattia (ad esempio, altre proteine presenti nel LCR, DatSCAN, MIBG). Uno degli aspetti più critici però riguarda il fatto che, ad oggi, ogni laboratorio utilizza le proprie condizioni sperimentali di α S_{RT}-QuIC. E' quindi fondamentale armonizzazione i protocolli tra laboratori per poter validare la tecnica ed introdurla ufficialmente tra i criteri diagnostici delle sinucleinopatie.

Nuove frontiere diagnostiche: la mucosa olfattiva

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente pubblicato un lavoro sulla rivista *Translational Neurodegeneration* in cui dimostra che, in seguito ad opportune modifiche delle condizioni sperimentali, la α S_{RT}-QuIC può rilevare un significativo effetto “seeding” anche in campioni di OM prelevati da pazienti con diagnosi clinica di PD ed MSA (60). Tale scoperta suggerisce che le OM, continuamente esposte a stress chimici e fisici ambientali, possano essere il sito di partenza del cambiamento conformazionale di α -sinucleina che poi si propaga all'interno del sistema nervoso centrale determinando la comparsa di patologia (61, 62). Inoltre, il drenaggio del LCR tramite il sistema glinfatico può ulteriormente contribuire alla raccolta di A α S a livello dell'OM (63). Infatti, durante la circolazione liquorale il LCR drena all'interno dei vasi linfatici meningei attraverso il sistema glinfatico dove scorre lungo spazi periarteriosi, spazi perivasali e spazi perivenosi. Durante la circolazione, il LCR entra in contatto con il circolo linfatico a livello degli spazi subaracnoidei perineurali disposti attorno al bulbo olfattorio per poi drenare nei vasi linfatici della mucosa

nasale attraverso la lamina cribrosa dell'etmoide (64–66). La possibilità di rilevare BsM a livello di OM rappresenta una rivoluzione in ambito diagnostico perché, rispetto al LCR, questo tessuto può essere prelevato con tecniche non invasive e l'operazione può essere ripetuta nel tempo (a distanza di 2-3 mesi per permettere un rinnovo della mucosa). L'aspetto più innovativo del lavoro riguarda il fatto che i prodotti di reazione α S_{RT}-QuIC (aggregati di rec- α S^m) sono stati sottoposti ad approfondite analisi biochimiche e biofisiche. Per gli studi biochimici i campioni sono stati digeriti con proteinasi K (PK) per un'ora a 37°C e poi analizzati al Western blot utilizzando un anticorpo anti α -sinucleina diretto contro la sua porzione N-terminale (epitopi 1-15, Agrisera, Vännäs, Svezia) (67). I risultati hanno mostrato che gli aggregati di rec- α S^m ottenuti da OM di pazienti con PD erano meno resistenti alla digestione con PK rispetto a quelli ottenuti da OM di pazienti con MSA ($p = 0,0061$, Mann-Whitney U test). Inoltre, i frammenti di rec- α S^m resistenti alla PK generavano dei profili biochimici caratterizzati da una banda di intensità molto debole e di peso molecolare leggermente superiore a 3 kDa nel caso di OM di pazienti PD, e da due bande di peso molecolare compreso tra 3 e 6 kDa nel caso di OM di pazienti MSA (Figura 5a). Queste differenze indicano che gli aggregati di rec- α S^m derivati da PD ed MSA hanno subito tagli proteolitici diversi da parte della PK come conseguenza di un loro differente riarrangiamento strutturale. Grazie ad analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), abbiamo osservato che sia i campioni PD che MSA inducevano la formazione di fibre amiloidi di rec- α S^m caratterizzate dalla presenza di “passi” (punti in cui si verifica un avvolgimento delle fibre). Tuttavia, la distanza tra i passi presenti nelle fibre amiloidi generate da campioni PD era minore rispetto a quella osservata nelle fibre generate da campioni MSA: 131 *versus* 142 nm, rispettivamente. Seppur minime, queste differenze sono risultate statisticamente significative ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U test) (Figura 5b).

I nostri risultati rappresentano un primo grande passo in avanti per la diagnosi di queste patologie perché, oltre all'utilizzo di campioni facilmente prelevabili come le OM, viene mostrato per la prima volta che α S_{RT}-QuIC non solo può rilevare tracce di A α S ma anche che gli aggregati di rec- α S^m sembrano acquisire caratteristiche morfologiche malattia- (e quindi ceppo A α S) specifiche. Tuttavia, queste sottili differenze morfologiche cruciali per la classificazione delle sinucleinopatie possono essere rilevate solo tramite utilizzo di tecniche altamente specializzate. Seguendo il nostro esempio, il gruppo di Soto (59) ha valutato con tecniche biochimiche e di microscopia crioelettronica i prodotti α S_{RT}-QuIC ottenuti dall'analisi di LCR di pazienti con PD e MSA. Anche in questo caso gli aggregati di rec- α S^m ottenuti dai LCR avevano caratteristiche peculiari tra le due patologie che ne permettevano una netta discriminazione.

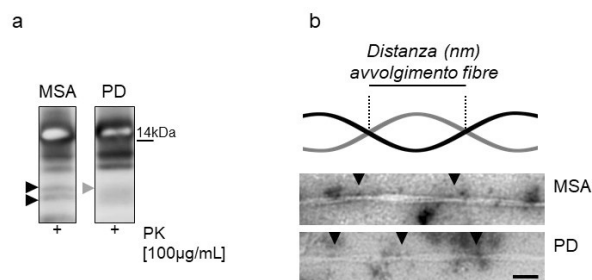


Figura 5

Analisi biochimica e strutturale degli aggregati finali di α S_{RT-QuIC} generati dall'analisi di campioni di mucosa olfattiva collezionati da pazienti con malattia di Parkinson (PD) e atrofia multisistemica (MSA). a) Western blot dopo digestione con proteinasi K (PK) dei campioni che mostra la presenza di 2 bande a 3 e 6 kDa (freccie nere) nei campioni OM-MSA ed una banda a 3 kDa (freccia grigia) nei campioni OM-PD; b) Immagine TEM analisi al microscopio elettronico a trasmissione utilizzata per misurare la distanza tra i punti di avvolgimento delle fibre amiloidi (passi) in campioni OM-MSA (142 nm) e OM-PD (131 nm) dopo α S_{RT-QuIC}. Scale bar: 50nm.

CONCLUSIONI

Alla luce di quanto descritto, appare chiaro che il problema principale delle sinucleinopatie (PD, DLB ed MSA) ma in generale di tutte le malattie neurodegenerative, riguarda la carenza di BsM periferici che consentano di formulare una diagnosi precoce e definitiva quando il paziente è in vita. Ad oggi, infatti, per avere la diagnosi certa di PD, DLB ed MSA è necessario aspettare la morte del paziente, prelevarne il cervello e sottoporlo ad analisi neuropatologiche volte all'identificazione ed alla caratterizzazione degli aggregati di A α S. Oggi però, grazie al progresso tecnologico, sono disponibili tecniche estremamente sensibili ed affidabili che stanno apportando significativi miglioramenti in ambito diagnostico. L'utilizzo, ma soprattutto l'integrazione di queste tecnologie ultrasensibili (α S_{RT-QuIC}, TEM, microscopia crioelettronica) ha portato non solo alla rilevazione ma anche alla caratterizzazione di BsM in tessuti periferici di pazienti con diverse forme di malattia neurodegenerativa, tra cui A α S nelle sinucleinopatie. Ovviamente questi studi sono ancora preliminari ma, se confermati, potrebbero rappresentare una vera rivoluzione diagnostica. Ad oggi la quasi totalità degli studi si è focalizzata all'analisi del LCR perché un suo campione è prelevato ogniqualvolta si sospetti una patologia a carico del SNC. Tuttavia, il prelievo dell'LCR è invasivo. Molti gruppi di ricerca stanno lavorando all'ottimizzazione dell'RT-QuIC e delle altre tecnologie per l'analisi di tessuti periferici come la mucosa olfattiva ma anche su urina e sangue che sono decisamente più facili da ottenere rispetto al LCR. Questo perché molteplici evidenze indicano che nell'urina e e nel

sangue sono presenti esosomi e microvescicole di derivazione neuronale contenenti BsM la cui concentrazione però è così bassa da richiedere processi di amplificazione del segnale tramite tecnologie come la RT-QuIC (68–71). L'utilizzo di metodologie ultrasensibili pone però serie problematiche di specificità che spesso, anziché chiarire, complicano le incertezze diagnostiche. Per questo motivo la collaborazione tra i laboratori che ne fanno uso è di fondamentale importanza per apprezzarne le potenzialità ma anche per valutarne i limiti. Avere la possibilità di diagnosticare PD, DLB ed MSA quando i pazienti sono in vita ed in fasi precoci di malattia rappresenta la chiave per intervenire rapidamente e consentire lo sviluppo di trattamenti farmacologici mirati, gettando le basi per quella che oggi viene definita medicina di precisione. In aggiunta, sarà possibile formulare diagnosi definitive senza più il bisogno del riscontro autoptico che rappresenta un'esperienza spesso dolorosa per i familiari.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Lee A, Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol Clin* 2016;34:955–65.
- Stefanis L. Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a009399.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* 2009;373:2055–66.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, et al. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839–40.
- Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:745–52.
- Safarpour D, Willis AW. Clinical epidemiology, evaluation, and management of dementia in Parkinson disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2016;31:585–94.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neuro*. 1999;56:33–9.
- Lin WL, DeLucia MW, Dickson DW. α -Synuclein immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions and neurites in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 2004;354:99–102.
- Lantos PL. The definition of multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:1099–111.
- Campbell BCV, Li QX, Culvenor JG, et al. Accumulation of Insoluble α -synuclein in dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2000;7:192–200.
- Mckeith I. Dementia with Lewy bodies. In: Koller W, Melamed E, ed. *Parkinson Disease and Related Disorders, Part II*. Elsevier Science Publisher, 2007;531–48.
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG. The synucleinopathies: twenty years on *J Parkinsons Dis* 2017;7:S51–S69.
- Levin J, Kurz A, Arzberger T, et al. The differential diagnosis and treatment of atypical parkinsonism. *Dtsch. Aertzblatt*. 2016;113:61–9.
- Williams DR. Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Intern Med J*

- 2006;36:652–60.
15. Sweeney P, Park H, Baumann M, et al. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl Neurodegener* 2017;6:6.
 16. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004;10:S10–S17.
 17. Deng HX, Bigio EH, Siddique T. Detection of protein aggregation in neurodegenerative diseases. In: Manfredi G, Kawamata H, ed *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2011:259–72.
 18. Love S. Post mortem sampling of the brain and other tissues in neurodegenerative disease. *Histopathology* 2004;44:309–17.
 19. Marques O, Outeiro TF. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death Dis.* 2012;3:e350.
 20. Luk KC, Kehm V, Carroll J, et al. Pathological synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 2012;338:949–53.
 21. Olanow CW, Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord* 2013;28:31–40.
 22. Henderson MX, Trojanowski JQ, Lee VMY. α -Synuclein pathology in Parkinson's disease and related α -synucleinopathies. *Neurosci Lett* 2019;709:134316.
 23. Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. Propagation of tau aggregates and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2017;40:189–210.
 24. Holmes BB, Diamond MI. Prion-like properties of tau protein: the importance of extracellular tau as a therapeutic target. *J Bio. Chem* 2014;289:19855–61.
 25. Clavaguera F, Duyckaerts C, Haik S. Prion-like properties of tau assemblies. *Curr OpinNeurobiol* 2020;61:49–57.
 26. Stahl N, Prusiner SB. Prions and prion proteins. *FASEB J.* 1991;5:2799–807.
 27. Prusiner SB. Nobel Lecture: Prions. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:13363–83.
 28. Peggion C, Sorgato M, Bertoli A. Prions and prion-like pathogens in neurodegenerative disorders. *Pathogens* 2014;3:149–63.
 29. Gambetti P, Kong Q, Zou W, et al. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* 2003;66:213–39.
 30. Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999;46:224–33.
 31. Baskakov I, Katorcha E, Makarava N. Prion strain-specific structure and pathology: a view from the perspective of glycobiology. *Viruses*, 2018;10:723.
 32. Morales R, True HL. Prion strains in mammals: Different conformations leading to disease. *PLOS Pathog.* 2017;13:e1006323.
 33. Angot E, Steiner JA, Hansen C, et al. Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol* 2010;9:1128–38.
 34. Peelaerts W, Bousset L, Baekelandt V, et al. α -Synuclein strains and seeding in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy: similarities and differences. *Cell Tissue Res.* 2018;373:195–212.
 35. Orme T, Guerreiro R, Bras J. The genetics of dementia with Lewy bodies: current understanding and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2018;18:67.
 36. Outeiro TF, Koss DJ, Erskine D, et al. Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol Neurodegener.* 2019;14:5.
 37. Foltynie T, Brayne C, Barker RA. The heterogeneity of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol*2002;249:138–45.
 38. Peng C, Gathagan RJ, Lee VMY. Distinct α -Synuclein strains and implications for heterogeneity among α -synucleinopathies. *Neurobiol Dis* 2018;109:209–18.
 39. Whittaker HT, Qui Y, Bettencourt C, et al. Multiple system atrophy: genetic risks and alpha-synuclein mutations. *F1000Research* 2017;6:2072.
 40. Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, et al. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease. *Neurology* 2016;86:566–76.
 41. Gilman S, Wenning GK, Low PA, et al. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 2008;71:670–6.
 42. Koga S, Aoki N, Uitti RJ, et al. When DLB, PD, and PSP masquerade as MSA. *Neurology* 2015;85:404–12.
 43. Osaki Y, Ben-Shlomo Y, Lees AJ, et al. Accuracy of clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2004;19:181–9.
 44. Alexander SK, Rittman T, Xuereb JH, et al. Validation of the new consensus criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:925–9.
 45. Rizzo G, Arcuti S, Copetti M, et al. Accuracy of clinical diagnosis of dementia with Lewy bodies: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89:358–66.
 46. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006;5:235–45.
 47. Heinzel S, Berg D, Gasser T, et al. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord* 2019;34:1464–70.
 48. Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:1591–601.
 49. Aerts M, Meijer FJA, Verbeek M, et al. Diagnostic challenges in parkinsonism. *Expert Rev Neurother.* 2011;11:1099–101.
 50. Atarashi R, Satoh K, Sano K, et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 2011;17:175–8.
 51. Orrù CD, Bongianni M, Tonoli G, et al. A test for Creutzfeldt–Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med* 2014;371:519–29.
 52. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, et al. Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998;273:9443–9.
 53. Groveman BR, Orrù CD, Hughson AG, et al. Rapid and ultra-sensitive quantitation of disease-associated α -synuclein seeds in brain and cerebrospinal fluid by α Syn RT-QuIC. *Acta NeuropatholCommun* 2018;6:7.
 54. Fairfoul G, McGuire LI, Pal S, et al. Alpha-synuclein RT-QuIC in the CSF of patients with alpha-synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3:812–8.
 55. Shah Nawaz M, Tokuda T, Waragai M, et al. Development of a biochemical diagnosis of Parkinson disease by detection of α -synuclein misfolded aggregates in cerebrospinal fluid. *JAMA Neurol* 2017;74:163.
 56. Manne S, Kondru N, Hepker M, et al. Ultrasensitive detection of aggregated α -synuclein in glial cells, human cerebrospinal fluid, and brain tissue using the RT-QuIC Assay: new high-throughput neuroimmune biomarker assay for parkinsonian disorders. *J Neuroimmune Pharmacol* 2019;14:423–35.
 57. van Rumund A, Green AJE, Fairfoul G, et al. α -Synuclein real-time quaking-induced conversion in the cerebrospinal fluid of uncertain cases of parkinsonism. *Ann Neurol* 2019;85:777–81.
 58. Bongianni M, Ladogana A, Capaldi S, et al. α -Synuclein

- RT-QuIC assay in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies. *Ann Clin Transl Neurol* 2019;6:2120–6.
59. Shahnawaz M, Mukherjee A, Pritzkow S, et al. Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature* 2020;578:273–7.
 60. De Luca CMG, Elia AE, Portaleone SM, et al. Efficient RT-QuIC seeding activity for α -synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Transl Neurodegener* 2019;8:24.
 61. Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neuro*. 2012;8:329–39 .
 62. Rey NL, Wesson DW, Brundin P. The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* 2018;109:226–48.
 63. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol* 2018;17:1016–24.
 64. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol* 2017;18:123–31.
 65. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, et al. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2016;132:317–38.
 66. Valdinocci D, Radford R, Siow S, et al. Potential modes of intercellular α -synuclein transmission. *Int J Mol Sci* 2017;18:469.
 67. Brännström K, Lindhagen-Persson M, Gharibyan AL, et al. A generic method for design of oligomer-specific antibodies. *PLoS One* 2014;9:e90857.
 68. Croese T, Furlan R. Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Me*2018;60:52–61.
 69. Cheng L, Zhao W, Hill AF. Exosomes and their role in the intercellular trafficking of normal and disease associated prion proteins. *Mol Aspects Med* 2018;60:62–8.
 70. Goetzl EJ, Mustapic M, Kapogiannis D, et al. Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2016;30:38539.
 71. Coleman BM, Hill AF. Extracellular vesicles – Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2015;40:89–96.

Indagine conoscitiva sulla qualità del referto dell'esame emocromocitometrico

Rachele Pajola¹, Barbara Manenti², Davide Giavarina³, Daniela Avino⁴, Maria Laura Ciardelli⁵, Benedetta Cremonesi⁶, Giorgio Da Rin⁷, Anna Maria Di Fabio⁸, Francesco Dima⁹, Alessandra Fanelli¹⁰, Sara Francione¹¹, Luca Germagnoli¹², Giovanni Introcaso¹³, Maria Gioia¹⁴, Alessandra Marini¹⁵, Angela Papa¹⁶, Silvia Pipitone¹⁷, Roberta Rolla¹⁸, Francesca Tosato¹⁹, Claudio Ortolani²⁰, Sabrina Buoro² per i Gruppi di Studio SIBioC "Diagnostica Ematologica Integrata" e "Variabilità extra-analitica"

¹Unità Operativa Complessa Laboratorio Analisi, Ospedali Riuniti Padova Sud Schiavonia, Unità Locale Socio-Sanitaria 6 Euganea, Veneto

²Unità Operativa Complessa SMeL 2 Analisi chimico-cliniche, Azienda Socio-Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

³Unità Operativa Complessa Laboratorio Analisi, Unità Locale Socio Sanitaria 8 Berica, Veneto

⁴Unità Operativa Diagnostica Ematologica, Presidio Ospedaliero "A. Tortora" Pagani, Salerno

⁵Servizio Analisi Chimico Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

⁷Medicina di Laboratorio, IRCCS-Azienda Ospedaliero-Universitaria San Martino, Genova

⁸Laboratorio Analisi, Ospedale S. Salvatore L'Aquila

⁹Unità Operativa Complessa Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero-Universitaria Integrata, Verona

¹⁰Laboratorio Generale Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

¹¹Laboratorio Analisi, Azienda Sanitaria Locale Borgomanero, Novara

¹²Synlab Italia, Laboratorio Centrale Castenedolo, Brescia

¹³Servizio di Medicina di Laboratorio, IRCCS-Centro Cardiologico Monzino, Milano

¹⁴Laboratorio Analisi Presidio Ospedaliero "Abele Ajello" di Mazara del Vallo, Trapani

¹⁵Laboratorio Analisi, Ospedale Versilia, Unità Sanitaria Locale Toscana Nord Ovest

¹⁶Medicina di Laboratorio Fondazione CNR/Regione Toscana "G. Monasterio" Pisa

¹⁷Unità Operativa Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

¹⁸Struttura Complessa Laboratorio di Ricerche Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità" Novara

¹⁹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Università di Padova

²⁰Università di Urbino

ABSTRACT

A survey on the quality of the hematological reporting among the Italian laboratories.

Introduction: the Working Groups "Hematology" and "Extra-Analytical Variability" of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC) promoted a survey investigating the quality of the complete blood count reporting among Italian Laboratories.

Methods: the survey included 36 questions and was sent to all the SIBioC members. 251 laboratories participated in the survey.

Results: there is a full concordance in reporting the traditional parameters (leukocytes, erythrocytes and platelet count, hemoglobin, hematocrit and the calculated indices, plus the leukocytes differential count), while other relatively new parameters, like the mean platelet volume (MPV) and the platelet distribution width (PDW) are reported by 70% of the laboratories. A low percentage of laboratories (20-30%) do not report the presence of abnormal cell populations, if detected (blasts, immature granulocytes, plasma cells, prolymphocytes and erythroblasts). 70% of laboratories do not report the erythrocyte and leukocyte related parameters available on the new analyzers. Specific reference intervals for gender and age are adopted by 68% of the laboratories, but only 50% have instrument-specific

Corrispondenza a: Rachele Pajola, UOC Laboratorio Analisi, Ospedali Riuniti Padova Sud Madre Teresa di Calcutta, Via Albere 30, 35043 Monselice (PD), Tel 0429 715425 - 349 4627723, E-mail rachele.pajola@aui6.veneto.it - rachelepajola@yahoo.it

Ricevuto: 26.04.2019

Revisionato: 03.06.2019

Accettato: 09.07.2019

Pubblicato on-line: 31.10.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.061

intervals. 83% of the laboratories include interpretative comments in the report, but only in less than half of them these are harmonized according to the recent available recommendations. 83% of the laboratories have a shared document to manage critical values, that are communicated to the requesting physician by 90% of the laboratories. Discussion: activities promoted by the SIBioC Hematology working group to harmonize the hematological report have been effective on traditional parameters reporting with a substantial improvement compared to the 2014 survey. Two issues remain however unresolved: the inclusion of interpretative comments and of the recent available parameters in the report.

INTRODUZIONE

L'emocromo è uno degli esami di laboratorio più frequentemente richiesti e fornisce in tempi rapidi informazioni essenziali sull'omeostasi dell'emopoiesi e sulle cause e gravità in caso di eventuale alterazione della stessa (1-2).

La presentazione e i contenuti del referto dell'esame emocromocitometrico sono il cardine per una corretta interpretazione dei risultati al fine di agevolare l'efficacia del percorso diagnostico-terapeutico. L'esame emocromocitometrico è un esame multiparametrico il cui referto è costituito da un insieme di dati numerici/quantitativi, in alcuni casi accompagnati da un commento qualitativo e/o semiquantitativo. Nel referto viene generalmente incluso un numero importante (fino a circa 20) di parametri quantitativi di base, prodotti da pressoché tutti gli emocitometri disponibili sul mercato, ai quali tuttavia oggi si possono affiancare, grazie al progresso tecnologico, altri nuovi parametri. Questi ultimi offrono, se correttamente interpretati, informazioni diagnostiche aggiuntive e preziose nella gestione clinica delle diverse alterazioni dell'emopoiesi, in particolare delle piastrinopenie e delle anemie (3-6). I commenti, parte integrante del referto e generalmente derivanti dall'osservazione microscopica dello striscio di sangue periferico, sono utili per segnalare anomalie cellulari e per suggerire possibili approfondimenti diagnostici (7-8). Nel 2014, il Gruppo di Studio Diagnostica Ematologica Integrata (GdS-DEI) di SIBioC ha promosso un'indagine conoscitiva per valutare lo stato dell'arte della diagnostica ematologica in Italia con la finalità di conoscere sia le diverse modalità organizzative del servizio, sia gli aspetti più strettamente applicativi, come le regole di validazione, le regole di gestione dei parametri critici, i modelli di refertazione (9).

Nel 2018, in accordo alle politiche societarie di SIBioC in tema di armonizzazione, ad integrazione delle iniziative intraprese riguardanti il referto ematologico quali l'adozione delle unità di misura internazionali e un percorso di armonizzazione dei commenti interpretativi (10,11), il GdS-DEI in collaborazione con il Gruppo di Studio Variabilità Extra-Analitica (GdS-VEA), a seguito altresì delle criticità emerse nell'iter di valutazione del rischio clinico per il processo di ematologia di laboratorio (12), ha predisposto una nuova indagine conoscitiva con l'obiettivo di verificare il grado di applicazione delle indicazioni fornite e le modalità di refertazione dell'esame emocromocitometrico, inclusa la gestione dei commenti, la comunicazione dei valori critici e l'eventuale introduzione nel referto di parametri quantitativi di recente generazione.

METODI

È stato predisposto un questionario costituito da 36 domande, sia a risposta chiusa con diverso grado di complessità sia a risposta aperta, e organizzato in 6 sezioni così ripartite:

- anagrafica del Laboratorio: 8 domande per definire la tipologia e l'inquadramento anagrafico dei laboratori partecipanti;
- contenuti del referto dell'esame emocromocitometrico: 6 domande per stabilire le modalità di refertazione dei parametri classici dell'emocromo, dei reticolociti e degli eritroblasti;
- gestione dei parametri di nuova generazione dell'esame emocromocitometrico: 6 domande per determinare quali sono e in che modo sono refertati tali parametri relativi alle emazie, alla formula leucocitaria, ai reticolociti;
- gestione degli intervalli di riferimento: 2 domande;
- gestione dei commenti: 8 domande;
- gestione dei valori critici: 6 domande.

Il questionario, consultabile quale materiale supplementare (1S), è stato predisposto sulla piattaforma SurveyMonkey™ (SurveyMonkey Software, SurveyMonkey Inc., USA). Il link per la compilazione del questionario è stato inviato a tutti i soci SIBioC e pubblicato sul sito della Società per due mesi (maggio-luglio 2018); a tutti i partecipanti è stato garantito l'anonimato. Per contenere l'invio di più questionari dello stesso laboratorio, nella lettera di presentazione ai soci è stato chiesto, ai fini di una corretta informazione, di far pervenire una sola compilazione per laboratorio.

L'elaborazione dei dati mediante un'analisi statistica descrittiva è stata eseguita con i software gestionali SurveyMonkey™ (SurveyMonkey Software, SurveyMonkey Inc., USA) e Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK).

RISULTATI

All'indagine conoscitiva hanno aderito 258 Laboratori (LAB). È stata eseguita a posteriori un'attenta verifica sulla completezza di compilazione, includendo nell'elaborazione solo i LAB che hanno risposto all'80% delle domande. Contestualmente, è stato eseguito un controllo incrociato dei dati realtivi alla sezione "Anagrafica di Laboratorio" escludendo questionari uguali per anagrafica. I LAB eliminati per non aver superato tali verifiche sono stati 17; pertanto l'elaborazione dei dati è derivata dalle risposte di 241 LAB.

Anagrafica dei laboratori (domande 1-8)

Le prime cinque domande di questa sezione riguardavano la regione di appartenenza, il volume di attività, il tipo di laboratorio, il tipo di pazienti, gli strumenti adottati.

I LAB partecipanti sono rappresentativi di tutto il territorio italiano. Le regioni più rappresentate sono state la Lombardia (18,6%), la Toscana (12,7%), il Veneto e il Lazio (10,1%); tra le regioni del Sud, la regione che ha manifestato la maggiore adesione all'iniziativa è stata la Campania (8,9%); nessun laboratorio del Molise e della Sardegna ha aderito all'iniziativa.

In merito al volume di attività dei LAB inclusi nello studio, definita in funzione del numero di emocromi

eseguiti per anno, la maggior parte dei LAB partecipanti processa meno di 50 000 emocromi/anno, circa un terzo dei LAB ha un volume tra 50 000 e 300 000, mentre il 16% dei LAB ne processa più di 300 000 (Figura 1). Il 58,9% dei partecipanti sono LAB di base con sezioni specializzate, il 29,9% sono LAB di base, mentre il 9,1% dei LAB è di tipo specialistico. Al 18,7% dei LAB afferiscono solo pazienti ambulatoriali, al 3,3% dei LAB solo pazienti ricoverati, al 76,8% dei LAB afferiscono sia pazienti ricoverati che ambulatoriali.

Nei LAB partecipanti al questionario sono presenti pressoché tutte le strumentazioni oggi disponibili in commercio, pur con diversa rappresentatività (Figura 2). Da sottolineare che il 10,4% dei laboratori è dotato di doppia strumentazione.

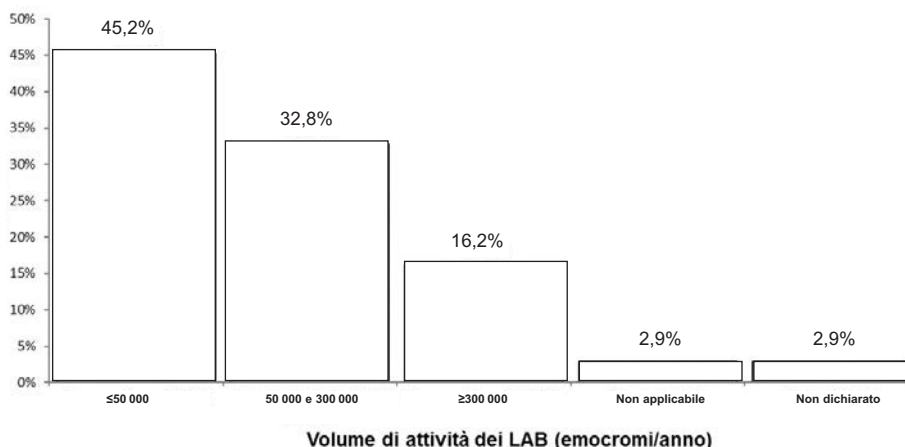


Figura 1. Distribuzione del volume di attività dei laboratori in base al numero di emocromi eseguiti per anno.

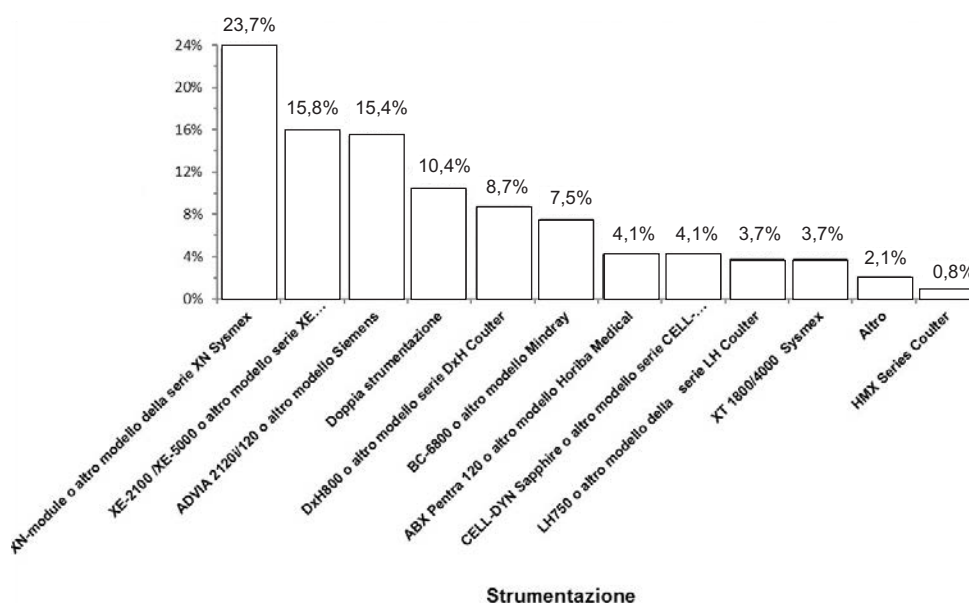


Figura 2. Distribuzione dei laboratori in funzione del tipo di strumentazione utilizzata.

In riferimento alla domanda 6 che indagava la modalità operativa adottata per l'esecuzione della revisione microscopica ovvero con sistemi automatizzati di digitalizzazione delle immagini o in manuale con il solo impiego del microscopio ottico, la maggior parte dei LAB (80,1%) riferisce di eseguirla esclusivamente in microscopia ottica non digitalizzata, il 12,4% utilizza sia la microscopia ottica che l'analisi morfologica digitalizzata, il 4,6% utilizza esclusivamente quest'ultima. Dall'indagine emerge inoltre che l'1,7% dei LAB non esegue in alcun modo la revisione microscopica.

Alla domanda 7 "Indicare il numero in valore percentuale (anche approssimato) di revisione microscopiche", più di un terzo dei LAB dichiara di avere un indice di revisione inferiore al 5%, mentre il 12,4% ha un indice di revisione del 10%. Inoltre risulta che circa il 20% dei LAB non è a conoscenza, neppure in modo approssimativo, di quale sia il valore percentuale di revisione microscopica del proprio laboratorio (Figura 3).

Alla domanda 8, posta per indagare sugli eventuali approfondimenti diagnostici effettuabili all'interno dello stesso laboratorio, il 64,7% dei LAB dichiara di non eseguire alcun approfondimento diagnostico; il 14% esegue un solo tipo di approfondimento, il 9,5% almeno 2 tipi di approfondimenti, il 6,2% 3 tipi di approfondimenti e il 3,3% esegue in sede i 4 diversi approfondimenti diagnostici proposti come scelta opzionale. L'approfondimento più frequentemente eseguito è la valutazione della morfologia del midollo osseo, a seguire la citofluorimetria, meno frequentemente si effettuano gli approfondimenti diagnostici in biologia molecolare e con citochimica; una piccola percentuale di laboratori dichiara di eseguire altri approfondimenti, tuttavia senza definirli (Tabella 1).

Contenuti del referto (domande 9-14)

Dalle risposte alla domanda 9 "Quali parametri sono riportati nel referto?", riassunte in Tabella 2, si evince che i parametri classici dell'esame emocromocitometrico, quali il conteggio di leucociti, piastrine, eritrociti, emoglobina, ematocrito, la concentrazione di emoglobina corpuscolare media (MCHC), il contenuto di emoglobina corpuscolare medio (MCH), il volume corpuscolare medio (MCV), l'ampiezza di distribuzione dei globuli rossi (RDW) sono presenti nel referto della quasi totalità dei laboratori. Gli indici piastrinici sono meno rappresentati sul referto: il volume piastrinico medio (MPV) è riportato dal 78,6% dei LAB e l'ampiezza di distribuzione delle piastrine (PDW) dal 67,5% dei LAB. La domanda 10 ha indagato la modalità di refertazione degli eritroblasti (NRBC). Il 29,9% dei LAB non riporta in alcun modo sul referto la eventuale presenza di NRBC, il 27,8% li riporta sia in percentuale che in valore assoluto, il 20,3% li riporta solo in valore percentuale, il 7,5% li riporta solo in valore assoluto, il 2,5% li riporta solo su richiesta del clinico, lo 0,4% esegue il conteggio inviando il campione in altra sede.

La domanda 11 sulle modalità di refertazione della formula leucocitaria ha messo in evidenza che nel 97% dei LAB la formula leucocitaria è presente sul referto con valori espressi sia in valore percentuale che in valore assoluto; il 2,6% dei LAB la riporta esclusivamente in valore assoluto.

La domanda 12 sull'impiego delle unità di misura del Sistema Internazionale ha evidenziato che queste vengono utilizzate dal 64,3% dei LAB.

I dati relativi alla domanda 13 sulla formula leucocitaria estesa, che comprende il conteggio di popolazioni leucocitarie patologiche (quali blasti,

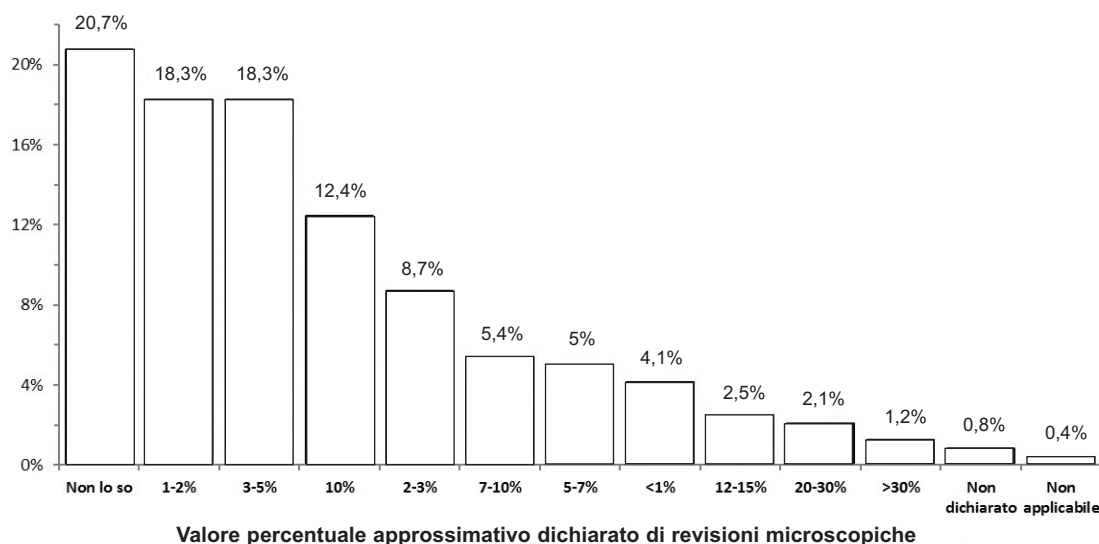


Figura 3.

Distribuzione dei laboratori in base al valore percentuale approssimativo di revisioni microscopiche dichiarato dai rispondenti al questionario.

Tabella 1

Domanda 8 "Possibilità nello stesso laboratorio di approfondimento diagnostico?" Percentuale e numero (N) delle risposte

	%	N
Nessuno	64,7	156
Immunofenotipo	4,1	10
Morfologia del midollo	5,8	14
Biologia molecolare	3,3	8
Citochimica	0,8	2
Immunofenotipo e morfologia del midollo	5,8	14
Morfologia del midollo e citochimica	2,1	5
Immunofenotipo e biologia molecolare	0,8	2
Immunofenotipo e citochimica	0,8	2
Immunofenotipo, morfologia del midollo e biologia molecolare	4,1	10
Immunofenotipo, morfologia del midollo e citochimica	2,1	5
Immunofenotipo, morfologia del midollo, biologia molecolare e citochimica	3,3	8
Altro	1,7	4
Non so	0,4	1

Tabella 2

Domanda 9 "Quali parametri sono riportati nel referto?" Percentuale e numero (N) delle risposte

	Sì		No	
	%	N	%	N
Conteggio leucociti	100	241	0	0
Conteggio piastrine	100	241	0	0
Conteggio eritrociti	100	241	0	0
Emoglobina	100	241	0	0
MCHC	100	239	0	0
Ematocrito	100	240	0	0
RDW	95,8	227	4,2	10
MCH	99,6	237	0,4	1
MCV	99,6	239	0,4	1
MPV	78,6	169	21,4	46
PDW	67,5	141	32,5	68

MCHC, concentrazione di emoglobina corpuscolare media; RDW, ampiezza di distribuzione dei globuli rossi; MCH, contenuto di emoglobina corpuscolare medio; MCV, volume corpuscolare medio; MPV, volume piastrinico medio; PDW, ampiezza di distribuzione delle piastrine.

promielociti, linfociti atipici e quant'altro), evidenziano che ancora molti LAB non riportano tali popolazioni cellulari e che spesso, fino al 60% dei casi circa, la presenza di popolazioni cellulari anomale, viene segnalata esclusivamente con un commento semiquantitativo/qualitativo. In sintesi, il 16% dei LAB non riporta il conteggio dei blasti, mentre il 34,3% ne segnala la presenza con un commento; il 24% dei LAB non segnala promielociti, mielociti e metamielociti; solo il

55,7% dei LAB trasmette sul referto i neutrofili "a banda". Per quanto riguarda la serie linfocitaria, circa il 20% dei LAB non riporta la presenza di linfociti atipici e attivati e circa il 30% dei LAB non riporta in alcun modo la presenza di plasmacellule e prolinfociti (Tabella 3). I reticolociti, tema della domanda 14, sono riportati nel referto sia in percentuale che in valore assoluto dalla maggior parte dei LAB, ma il 10,5% dei LAB non li esegue (Tabella 4)

Tabella 3

Domanda 13 "Quali delle seguenti popolazioni cellulari della Formula Leucocitaria Estesa sono riportate nel referto e con quali modalità?" Percentuale e numero (N) delle risposte

	In percentuale		In valore assoluto		In percentuale e in valore assoluto		Con commento semi-quantitativo		Con commento qualitativo		Parametri non riportati		Non so	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
Blasti	31,8	75	1,3	3	14,8	35	14,4	34	19,9	47	16,5	39	1,3	3
Promielociti	32,7	75	0,9	2	13,1	30	15,3	35	11,8	27	24,9	57	1,3	3
Mielociti	34,2	78	0,9	2	12,3	28	16,2	37	11,4	26	24,1	55	0,9	2
Metamielociti	34,1	78	0,9	2	12,2	28	16,2	37	11,3	26	24,4	56	0,9	2
Neutrofili "a banda"	19,6	20	1,0	2	6,7	14	16,3	34	22,1	46	41,8	87	2,4	5
Linfociti atipici	14,0	32	1,3	3	6,1	14	27,1	62	30,6	70	19,6	45	1,3	3
Linfociti attivati/reattivi	11,5	26	0,9	2	7,1	16	26,5	60	31,0	70	21,7	49	1,3	3
Plasmacellule	21,4	47	0,9	2	8,2	18	18,6	41	18,2	40	30,0	66	2,7	6
Prolinfociti	19,7	43	0,9	2	8,7	19	19,2	42	17,4	38	31,2	68	2,7	6

Tabella 4

Domanda 14 "Come sono riportati i Reticolociti nel referto?" Percentuale e numero (N) delle risposte

	%	N
In percentuale	18,9	45
In valore assoluto	3,4	8
In percentuale e in valore assoluto	66,8	159
Non sono eseguiti/riportati	10,5	25
Non so	0,42	1

Parametri di ultima generazione (domande 15-20)

Alla domanda 15 "Nel referto sono riportati i parametri di più recente introduzione relativi alle emazie? (ad esempio la percentuale di emazie ipocromiche o ipercromiche, di emazie microcistiche o macrocistiche)", il 68% dei LAB ha risposto che non riporta tali parametri, il 24% li riporta esclusivamente con un commento e solo una piccola percentuale li referta come parametri a sé stanti. Come risulta dalle risposte alla domanda 16, i parametri relativi alle emazie più frequentemente riportati sono la percentuale di emazie ipocromiche (24% dei LAB), la percentuale di emazie microcistiche e macrocistiche (16,5% e 13,9% rispettivamente) (Tabella 5).

I parametri strumento-specifici relativi ai leucociti in aggiunta alle 5 popolazioni della formula leucocitaria, indagati nella domanda 17, sono riportati da una minoranza di laboratori; infatti il 68,8% dei LAB non li riporta, il 14,7% li riporta come parametri specifici a sé stanti e il 13,8% li riporta nel referto in forma di commento. Come risulta dalle risposte alla domanda 18, i parametri leucocitari strumento-specifici più frequentemente riportati sono, per i 66 LAB che hanno risposto affermativamente alla domanda precedente del questionario, i granulociti immaturi (IG) e i linfociti atipici; le *Large Unstained Cell* (LUC) sono riportate nel referto dal 34,8% dei LAB (Tabella 5).

Alla domanda 19 sui parametri di più recente introduzione relativi ai reticolociti, più di un terzo dei LAB ha risposto di includerli nel referto come parametri a sé stanti, una minima percentuale di LAB di riportarli in appendice al commento e circa il 60% di non riportarli affatto. I parametri reticolocitari più frequentemente presenti nel referto, in base alle risposte alla domanda 20, sono IRF (frazione di reticolociti immaturi) e le specifiche frazioni reticolocitarie, come LFR (frazione reticolocitaria ad alto grado di maturazione), MFR (frazione reticolocitaria a medio grado di maturazione) e HFR (frazione reticolocitaria a basso grado di maturazione); più della metà dei LAB referta il contenuto medio di emoglobina reticolocitaria (Tabella 6).

I nuovi parametri riguardanti le piastrine non sono stati purtroppo indagati per mancata inclusione nel questionario della domanda relativa a causa di un problema tecnico.

Gestione degli intervalli di riferimento (domande 21 e 22)

La maggior parte dei LAB dichiara di riportare sul referto intervalli di riferimento stratificati sia per genere che per età, ma meno della metà utilizza intervalli di riferimento strumento-specifici per i reticolociti e per altri parametri metodo-dipendenti (Tabella 7).

Gestione dei commenti (domande 23-30)

Come riepilogato in Tabella 8, alla domanda 23 "Introduci commenti nel referto? e se Sì, come è stato

definito il contenuto?", il 37% dei LAB ha risposto di includere commenti con l'adozione integrale o parziale del Documento SIBioC "I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio" (11); circa un terzo dei LAB di utilizzare commenti sulla base delle conoscenze del laboratorio, mentre il 7,9% dichiara di non includere commenti.

Alla domanda 24 "Se introduci commenti nel referto, i commenti sono:", più dell'80% dei LAB ha risposto di utilizzare commenti standardizzati/armonizzati, ma solamente nel 33% i commenti sono condivisi all'interno del laboratorio; il 17% dei LAB riporta commenti a testo libero, quindi non codificati (Tabella 8).

Alla domanda 25 sull'adozione del documento SIBioC "I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio", il 64,2% dei LAB ha risposto di aver adottato il documento (completamente, parzialmente o con qualche modifica), il 16,9% non sa rispondere alla domanda, mentre il 18,8% non ha adottato il documento (Tabella 8). La ragione principale di non adozione al documento SIBioC è stata la non conoscenza del documento stesso (17 laboratori su 40).

Alla domanda 26 "Se hai adottato il documento SIBioC "I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio", hai qualche suggerimento in merito al documento?" hanno risposto 164 laboratori, di cui il 78,7% dichiara che non sono necessarie modifiche, il 18,3% dichiara di non essere a conoscenza del documento, mentre il 3% che ritiene necessarie alcune modifiche, non fornisce indicazioni chiare e univoche; queste indicazioni risultano pertanto di difficile interpretazione. Con la domanda 27 si sono indagate le modalità di gestione del commento dei laboratori che non hanno adottato il documento SIBioC: la percentuale maggiore di LAB utilizza commenti semi-quantitativi, il 22,7% utilizza commenti descrittivi, il 27,7% utilizza tutti i tipi di commenti presenti tra le diverse opzioni di risposta, compresi i commenti interpretativi (Tabella 8).

Alla domanda 28 "In Laboratorio sono state definite delle regole/criteri univoci per l'inserimento del commento nel referto in funzione degli esiti o della revisione microscopica?" il 63,2% dei LAB risponde affermativamente, il 33% non ha definito regole, il 3,8% non sa rispondere alla domanda.

Le regole/criteri di inserimento dei commenti nel referto, analizzati con la domanda 29, sono da circa la metà dei LAB condivisi verbalmente all'interno del laboratorio, nel 43,5% dei LAB sono condivisi e documentati, solo il 7,2% dei LAB li ha condivisi con il clinico (Tabella 9).

Alla domanda 30 "Il contenuto dei commenti utilizzati è condiviso e/o concordato con i Colleghi Clinici o con i Medici di Medicina Generale e i Pediatri di Libera scelta?", il 66% dei LAB ha risposto in modo negativo e si evince che la comunicazione verbale (non formalizzata) è ancor oggi la più diffusa modalità di condivisione, come riportato in Tabella 9.

Tabella 5

Risultati relativi alle domande 15, 16, 17 e 18 inerenti i parametri di ultima generazione riguardanti le emazie e i leucociti. Percentuale e numero (N) delle risposte.

Domanda 15 "Nel referto sono riportati i parametri di più recente introduzione relativi alle emazie? (ad esempio percentuale di emazie ipocromiche o ipercromiche, microcitiche o macrocitiche)"

	%	N
SI	7,3	17
NO	68,0	159
SI, ma solo con un commento	24,0	56
Non so	0,4	1

Domanda 16 "In caso di risposta affermativa alla precedente domanda, quali parametri di recente introduzione e/o strumento-specifici relativi alle emazie sono riportati sul referto?"

	%	N
(% emazie microcitiche) / (% emazie ipocromiche), (Rapporto M/H)	3,8	3
Fattore anemia microcitica (MAF)	1,3	1
% Emazie ipocromiche	24,0	19
% Emazie ipercromiche	10,1	8
Densità emoglobina bassa (LHD)	1,3	1
% Emazie microcitiche	16,5	13
% Emazie macrocitiche	13,9	11
Nessuno	68,3	54
Altro (specificare)	3,8	3

Domanda 17 "Nel referto, oltre alle 5 popolazioni della formula leucocitaria, sono riportati parametri aggiuntivi relativi ai leucociti ottenibili dagli emocitometri di ultima generazione"

	%	N
SI	14,7	34
NO	68,8	159
SI, ma solo con un commento	13,8	32
No so	2,6	6

Domanda 18 "In caso di risposta affermativa alla precedente domanda, quali parametri strumento-specifici relativi ai leucociti sono riportati sul referto?"

	%	N
Granulociti immaturi (IG)	62,1	41
Cellule ad elevata fluorescenza (HFC)	4,5	3
Large Unstained Cell (LUC)	34,8	23
Large Immature Cell (LIC)	10,6	7
Linfociti atipici (ALY)	43,9	29
Altro (specificare)	12,1	8

Tabella 6

Risultati relativi alle domande 19 e 20 inerenti i parametri strumento-specifici riguardanti i reticolociti. Percentuale e numero (N) delle risposte

Domanda 19 "Nel referto vengono riportati i parametri di più recente introduzione e/o strumento specifici relativi ai reticolociti?"

	%	N
SI	36,4	84
NO	58,4	135
SI, ma solo con un commento	2,2	5
Non so	3,0	7

Domanda 20 "In caso di risposta affermativa alla precedente domanda, quali parametri di recente introduzione e/o strumento specifici relativi ai Reticolociti sono riportati sul referto?"

	%	N
Contenuto medio di emoglobina reticolocitaria	53,3	49
Volume reticolocitario medio	22,8	21
Frazione reticolocitaria ad alto grado di maturazione (LFR)	54,3	50
Frazione reticolocitaria a medio grado di maturazione (MFR)	54,3	50
Frazione reticolocitaria a basso grado di maturazione (HFR)	54,3	50
Frazione di reticolociti immaturi (IRF)	59,8	55
Altro (specificare)	9,8	9

Tabella 7

Risultati relativi alle domande 21 e 22 inerenti gli Intervalli di riferimento. Percentuale e numero (N) delle risposte.

Domanda 21 "Gli Intervalli di Riferimento nel referto sono stratificati per:"

	%	N
Per genere	25,4	58
Per età	1,7	4
Per genere ed età	67,5	154
Non so	3,0	7
Altro (specificare)	2,2	5

Domanda 20 "Gli intervalli di riferimento dei reticolociti o altri parametri metodo-dipendenti sono strumento-specifici?"

	%	N
SI	45,8	103
NO	31,1	70
Non so	21,3	48
Altro (specificare)	1,8	4

Tabella 8

Risultati relativi alle domande 23, 24, 25 e 27 inerenti la gestione dei commenti. Percentuale e numero (N) delle risposte.

Domanda 23 "Introduci commenti nel referto? e se Sì, come è stato definito il contenuto?"		
	%	N
SI, in base alle conoscenze del laboratorio	33,3	72
SI, tramite confronto con altri specialisti di medicina di laboratorio non afferenti alla mia realtà lavorativa	7,4	16
SI, con l'adozione integrale o parziale del documento SIBioC "I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio"	37,0	80
SI, ma il contenuto dei commenti non è stato definito con nessuna delle modalità indicate	7,9	17
NO, non introduco commenti	7,9	17
Non so	1,8	4
Altro (specificare)	4,6	10
Domanda 24 "Se introduci commenti nel referto, i commenti sono:"		
	%	N
Standardizzati/armonizzati e condivisi dall'equipe ovvero utilizzati da tutti i componenti in presenza della medesima condizione	33,0	66
Standardizzati/armonizzati (ad esempio è disponibile un elenco)	14,0	28
A testo libero: ovvero ciascun operatore scrive il commento in funzione della propria competenza ed esperienza	17,0	34
Sia standardizzati/armonizzati che a testo libero	34,0	68
Altro (specificare)	2,0	4
Domanda 25 "Hai adottato il documento SIBioC "I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio" e con quali modalità?"		
	%	N
SI, completamente	5,6	12
SI, solo parzialmente	23,9	51
SI, ma con delle modifiche di adattamento al contesto del mio laboratorio	34,7	74
No so	16,9	36
NO perché	18,8	40
Domanda 27 "Se introduci i commenti nel referto, ma non hai adottato il documento SIBioC, che tipo di commenti usi nel tuo laboratorio:"		
	%	N
Descrittivi (ad esempio: presenza di linfociti atipici)	22,7	32
Semi-quantitativi (ad esempio: presenza di numerosi/alcuni/rari linfociti atipici)	36,9	52
Interpretativi (ad esempio: presenza linfociti atipici: quadro compatibile con sospetto di...)	9,2	13
Sono utilizzati tutti i tipi sopraelencati	27,7	39
Altro (specificare)	3,5	5

Tabella 9

Risultati relativi alle domande 29 e 30 inerenti la "Condivisione dei commenti". Percentuale numero (N) delle risposte.

	%	N
Condivisi verbalmente dall'equipe	47,1	65
Condivisi e documentati (ad esempio: sono state scritte delle regole per l'inserimento del commento)	43,5	60
Condivisi anche con il clinico	7,2	10
Altro (specificare)	2,2	3

	%	N
Domanda 30 "Il contenuto dei commenti utilizzati è condiviso e/o concordato con i colleghi clinici o con i medici di medicina generale e i pediatri di libera scelta?"		
NO	66,0	138
SI, tramite audit clinico	3,3	7
SI, tramite comunicazione verbale	16,7	35
SI, tramite comunicazione scritta a cura del Direttore del Laboratorio	2,9	6
SI, tramite la Direzione Sanitaria	1,0	2
Non so	9,1	19
Altro (specificare)	1,0	2

Gestione dei valori critici (domande 31-36)

Alla domanda 31 "Esiste in laboratorio un documento che descrive la gestione dei valori critici?", il 79,3 % dei LAB ne dichiara la presenza.

I valori critici comunicati, indagati nella domanda 32 del questionario, sono riportati in Tabella 10 con le relative percentuali. Il valore critico maggiormente trasmesso è quello dell'emoglobina <70 g/L, comunicato dal 85,4% dei LAB, mentre solo il 56,1% comunica la presenza di parassiti malarici, di batteri e di miceti.

Per la definizione di tali valori critici, investigata con la domanda 33, dei 156 LAB che fanno riferimento a Società Scientifiche, il 38,1% fa riferimento al solo documento SIBioC, ma tale documento è utilizzato complessivamente, in associazione ad altri, da quasi il 70% dei LAB (Tabella 10).

Il 73,3% dei LAB comunica al medico richiedente i valori critici sia dei pazienti ricoverati che di quelli ambulatoriali (domanda 34), il 14,4% dei LAB comunica i valori critici solo dei pazienti ambulatoriali e il 4% dei LAB comunica solo quelli dei pazienti interni; il 4% dei LAB non comunica i valori critici al medico richiedente.

Nella quasi totalità dei casi (98,4% dei LAB), la comunicazione telefonica, come appurato con la domanda 35, rimane il mezzo di comunicazione più utilizzato. La tracciabilità della comunicazione (domanda 36) è garantita mediante registrazione su documento interno nel 52,3% dei LAB, mediante registrazione sul

referto nel 28,5% e mediante registrazione personale, quindi non governata da regole condivise, nel 9,8%.

DISCUSSIONE

I dati raccolti rappresentano una fotografia dell'attuale stato dell'arte del referto ematologico in Italia, considerate l'eterogeneità geografica e le specifiche dei laboratori che hanno partecipato all'indagine.

Le diverse tecnologie strumentali oggi disponibili in commercio sono rappresentate nel loro complesso, anche se in proporzioni diverse. Il tipo di dotazione strumentale può essere un fattore determinante nell'uso dei parametri di più recente introduzione, che sono generalmente strumento-specifici; in effetti, il 10,4% dei laboratori provvisti di doppia tecnologia strumentale, può garantire, in determinate situazioni, una maggiore completezza diagnostica, legata alle specifiche caratteristiche dei diversi emocitometri a disposizione.

La maggior parte dei laboratori esegue la revisione microscopica esclusivamente in microscopia ottica ed è minoritaria la percentuale che esegue la revisione anche in microscopia digitalizzata; tuttavia, visti i processi di accentramento e di riorganizzazione dei laboratori che coinvolgono molte regioni italiane, si presuppone che i sistemi automatizzati di digitalizzazione delle immagini acquisiscano nel prossimo futuro una sempre maggiore rilevanza e diventino, grazie alle potenzialità telematiche

Tabella 10

Risultati relativi alle domande 32 e 33 inerenti i valori critici. Percentuale e numero (N) delle risposte.

Domanda 32 "In caso di risposta affermativa, quali valori critici sono comunicati al medico curante?"		
	%	N
Emoglobina <70 g/L	85,4	146
Emoglobina <50 g/L	12,9	22
Emoglobina >200 g/L	34,5	59
Piastrine <50 x 10 ⁹ /L	43,9	75
Piastrine <20 x 10 ⁹ /L	52,0	89
Piastrine >1000 x 10 ⁹ /L	59,1	101
Granulociti neutrofili <0,5 x 10 ⁹ /L	58,5	100
Leucociti >50 000 x 10 ⁹ /L	35,1	60
Leucociti >30 000 x 10 ⁹ /L	34,5	59
Leucociti <2 000 x 10 ⁹ /L	46,8	80
Riscontro di anomalie quantitative e/o qualitative per sospetta emopatia (ad esempio presenza di blasti; incremento del numero di granulociti basofili; presenza di linfociti atipici; altro)	70,2	120
Presenza di parassiti malarici o batteri o miceti	56,1	96
Altro (specificare)	9,4	16
Domanda 33 "I valori critici indicati nella domanda precedente sono stati recepiti dalle indicazioni di quale delle seguenti Società scientifiche:"		
	%	N
Joint Commission on Accreditation of Health Organizations (JCAHO)	14,7	23
Royal College of Pathologist (RCP)	10,3	16
International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)	32,7	51
SIBioC	66,7	104
International Council for Standardization in Haematology (ICSH)	21,8	34
Altro (specificare)	14,7	23

e all'ottimizzazione dei tempi di risposta che sono in grado di offrire, una soluzione importante per la revisione microscopica e un'alternativa valida per sopperire alla sempre più carente disponibilità di esperti in morfologia ematologica (13-14).

Uno dei dati di maggiore criticità evidenziati dall'indagine è che l'1,7% dei laboratori non esegue in alcun modo la revisione microscopica; tali laboratori non sono quindi in grado di differenziare ad esempio una pseudopiastrinopenia da una vera piastrinopenia, esponendo il paziente a rischio trasfusionale (15) o di individuare alcune urgenze quali il sospetto di leucemia acuta promielocitica, la presenza di schistociti o di drepanociti (6).

Le risposte alla domanda sulla percentuale di campioni sottoposti a revisione microscopica evidenziano un'ampia variabilità, che può essere

spiegata dal diverso tipo di laboratorio (di base o specialistico), dal tipo di pazienti che vi afferiscono (ambulatoriali e/o interni), dalla disponibilità all'interno dello stesso laboratorio di approfondimenti diagnostici e, probabilmente, dalla scarsa armonizzazione delle regole e dei criteri di revisione adottati sulla base della tecnologia strumentale utilizzata e del tipo di pazienti. Quest'ultima considerazione richiederebbe maggiori informazioni per essere avvalorata, ma a suo favore vi è l'evidenza che circa il 20% dei laboratori non è a conoscenza, neppure in modo approssimativo, di quale sia il proprio indice di revisione microscopica medio. Il numero elevato di risposte "Non so" a questa e ad altre domande del questionario impone comunque una riflessione sul grado di condivisione e di armonizzazione dei percorsi intra-laboratorio. Non vi può essere un referto dell'esame emocromocitometrico

qualitativamente completo senza un'appropriata gestione del processo analitico e altresì della revisione microscopica (16,17).

I dati relativi alla seconda sezione del questionario (domande 9-14) ci permettono numerose osservazioni. La quasi totalità dei laboratori riporta i parametri classici dell'esame emocromocitometrico, ma anche gli indici piastrinici PDW e MPV sono presenti nei referti di più del 70% dei laboratori. È noto che i parametri piastrinici presentano ampia variabilità legata al conteggio piastrinico, al sesso, all'età, all'etnia e soprattutto alla fase preanalitica. Se si considera che la validità delle informazioni cliniche che offrono rimane dubbia, a meno che non sia garantito un rigido controllo sulla fase preanalitica e non siano utilizzati specifici intervalli di riferimento, al momento si sconsiglia la loro inclusione sul referto (18).

La maggior parte dei laboratori utilizza unità di misura conformi al Sistema Internazionale: questa evidenza rappresenta un ragguardevole progresso rispetto al 2014, quando sulla base dei dati dell'indagine conoscitiva di allora solo il 6% dei laboratori ne faceva uso (9,10). Il merito di tale successo va dato senza dubbio alle società scientifiche che si sono impegnate in una serie di iniziative, avviando percorsi di informazione e formazione con l'obiettivo principe dell'armonizzazione del referto di laboratorio.

Un dato estremamente allarmante, appurata la loro rilevanza in ambito diagnostico e soprattutto prognostico, è che il 30% dei laboratori non riporta nel referto gli eritroblasti. Questo elemento è in controtendenza anche con l'evoluzione tecnologica: oggi molti degli emocitometri di ultima generazione hanno un canale di analisi dedicato al conteggio degli NRBC con prestazioni analitiche adeguate alle esigenze cliniche (19).

Estremamente critica è anche l'evidenza che ci siano laboratori che non riportano in alcun modo la presenza di blasti e che un numero significativo non segnali l'eventuale presenza di promielociti, mielociti e metamielociti, linfociti atipici e attivati; circa il 30% dei laboratori non indica la presenza di plasmacellule e prolinfociti. La presenza di alcune di queste cellule è da considerarsi in molti casi una vera e propria "urgenza ematologica" e, pertanto, appare auspicabile mettere in atto soluzioni finalizzate alla divulgazione capillare di una conoscenza ematologica di base.

I reticolociti sono riportati sul referto dalla maggior parte dei laboratori, perlomeno sia in percentuale che in valore assoluto; risulta difficile comprendere perché il 10% dei laboratori non esegua il conteggio reticolocitario, visto il ruolo insostituibile ormai comprovato che esso gioca nella diagnostica delle anemie e non solo (3-6).

Relativamente ai parametri di più recente introduzione e/o strumento-specifici, l'indagine evidenzia come questi non siano presenti nel referto di più della metà dei laboratori e che, quando presenti, siano di solito indicati in appendice al commento e non come parametri a sé stanti. Trattandosi prevalentemente di

parametri strumento-specifici, essi dipendono dalla tecnologia strumentale adottata dal laboratorio e dalla disponibilità di intervalli di riferimento dedicati. Inoltre, la loro rappresentazione sul referto presuppone non solo la competenza di chi li emette, e quindi del professionista in medicina di laboratorio, ma anche la formazione del clinico, in modo che sia garantita una richiesta appropriata e clinicamente utile, nonché una valutazione competente dei valori riportati (3-6,20). I parametri strumento-specifici maggiormente proposti dai laboratori italiani sono le emazie ipo/ipercromiche e micro/macrocitiche per la serie eritrocitaria, le frazioni reticolocitarie e il contenuto di emoglobina reticolocitaria, gli IG e i linfociti atipici per la serie leucocitaria. Sono davvero molti i laboratori, quasi il 35% tra coloro che utilizzano parametri strumento-specifici relativi ai leucociti, che riportano le LUC: questo è correlabile ai dati scoraggianti relativi all'impiego della formula estesa. Le azioni promosse dalle società scientifiche per migliorare l'armonizzazione hanno sicuramente dato una spinta verso l'impiego di intervalli di riferimento stratificati per età e sesso (9,21), mentre sono ancora pochi quelli che utilizzano intervalli di riferimento strumento-specifici per i parametri metodo-dipendenti. Questo dato rileva carenze culturali spiegabili anche con la scarsa diffusione e conoscenza del significato dei parametri di nuova introduzione (3-6).

Nel 2014, il 96% dei laboratori si avvaleva di commenti nel referto dell'esame emocromocitometrico, ma solo nel 32% dei casi tali commenti erano condivisi e documentati all'interno dell'equipe, nel 41% dei laboratori erano condivisi ma non documentati e solo il 5% dei laboratori aveva condiviso il significato dei commenti con i clinici (8).

La presente indagine conoscitiva ha rilevato che la gestione dei commenti interpretativi negli ultimi anni è migliorata; nel 2018 si rileva infatti un aumento dei laboratori che introducono commenti, di cui la maggior parte standardizzati/armonizzati, che utilizzano regole univoche per l'inserimento degli stessi a seguito della revisione microscopica e che condividono il loro significato con il clinico. Il Documento SIBioC del 2016 "I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio" (11) ha dato un impulso positivo rilevato dal confronto dei dati delle due indagini: tale documento è stato adottato con diverse modalità dalla maggior parte dei laboratori italiani, stimolando una sensibilizzazione dei professionisti in medicina di laboratorio in tema di armonizzazione e condivisione con i clinici e con i medici di medicina generale.

A tal proposito è da evidenziare come spesso i clinici non sfruttino appieno il potenziale diagnostico del referto ematologico (22-23), per quanto esso possa essere ancora qualitativamente perfezionato: solo 4 parametri quantitativi sono comunemente letti e valutati, cioè emoglobina, ematocrito, piastrine e leucociti totali. È stato riscontrato come solo il 30% dei clinici legga eventuali commenti presenti nel referto, ma che tali commenti, quando recepiti, hanno contribuito

notevolmente alla diagnosi o alla gestione clinica del paziente. Queste informazioni non particolarmente positive devono indurre lo specialista di medicina di laboratorio ad intraprendere attività correttive e a cercare, anche se può risultare difficoltoso, un contatto diretto con i medici ospedalieri e con i medici e i pediatri che operano sul territorio. È necessario, anche attraverso le società scientifiche coinvolte, promuovere un dibattito costruttivo con i colleghi che si servono ogni giorno dei nostri referti, al fine di definire quali siano le informazioni clinicamente utili che il referto può contenere e quale sia la forma più adatta affinché tali informazioni siano fornite, recepite e utilizzate.

La gestione dei valori critici è risultata generalmente efficace, poiché la maggior parte dei laboratori possiede un documento che la descrive; i valori critici sono definiti prevalentemente in accordo con le indicazioni delle società scientifiche, quasi sempre comunicati al medico richiedente, soprattutto mediante comunicazione telefonica, e con una tracciabilità della comunicazione ampiamente garantita.

In conclusione, le attività sostenute negli anni dal GdS di Diagnostica Ematologica Integrata al fine di armonizzare il referto dell'esame emocromocitometrico sono state efficaci sui parametri classici con un progresso rispetto all'indagine del 2014, ma ampi margini di miglioramento vi sono relativamente ai nuovi parametri. La gestione dei commenti presenta ancora notevoli diversità, mentre appare generalmente efficiente quella dei valori critici.

Sarebbe opportuno promuovere, con il coinvolgimento delle diverse società scientifiche, iniziative finalizzate alla formazione e alla diffusione della conoscenza, affinché possa diventare, tramite le avanzate e innovative modalità di comunicazione oggi presenti, capillare e fruibile a tutti. Inoltre, una nuova raccomandazione dedicata all'armonizzazione del referto ematologico nel suo complesso potrebbe essere il trampolino di lancio per raggiungere un obiettivo impegnativo, ma possibile.

RINGRAZIAMENTI

Il GdS Diagnostica Ematologica Integrata e il GdS Variabilità Extra-Analitica ringraziano tutti gli specialisti di Medicina di Laboratorio che hanno partecipato all'iniziativa.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Leach M. Interpretation of the full blood count in systemic disease—a guide for the physician. *J R Coll Physicians Edinb* 2014;44:36-41.
2. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocytosis. *Int J Lab Hematol* 2014;36:279-88.
3. Lecompte TP, Bernimoulin MP. Novel parameters in blood cell counters. *Clin Lab Med* 2015;35:209-24.
4. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, et al. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med* 2015;35:133-63.
5. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol* 2016;38:123-32.
6. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hem* 2009;31:277-97.
7. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005;353:498-507.
8. Buoro S, Da Rin G, Fanelli A, et al. Harmonization of interpretative comments in laboratory hematology reporting: the recommendations of the Working Group on Diagnostic Hematology of the Italian Society of Clinical Chemistry and Clinical Molecular Biology (WGDH-SIBioC). *Clin Chem Lab Med* 2018;57:66-77.
9. Buoro S, Apassiti Esposito S, et al. Stato dell'arte della diagnostica ematologica nei servizi di Medicina di Laboratorio in Italia. *Biochim Clin* 2015;39:25-40.
10. Papa A, Buoro S, Marini A et al. Armonizzazione del referto ematologico con l'impiego di unità di misura conformi al Sistema Internazionale. *Biochim Clin* 2015;39:627-30.
11. La Gioia A, Balboni F, Buoro S, et al. I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:255-69.
12. Aita A, Tosato F, Balboni F, et al. Rischio clinico e sicurezza del paziente e diagnostica ematologica integrata. *2018 Biochim Clin* 2018;42:300-12.
13. Riedl JA, Stouten K, Ceelie H et al. Interlaboratory reproducibility of blood morphology using the digital microscope. *J Lab Autom* 2015;20:670-5.
14. Merino A, Puigví L, Boldú L, et al. Optimizing morphology through blood cell image analysis. *Int J Lab Hematol*. 2018;40:54-61.
15. Balboni M, Morrocchi B. Gestire il rischio clinico in medicina di laboratorio: un'inaspettata piastrinopenia. *Biochim Clin* 2017;41:e1-e3.
16. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, et al. The International Consensus Group for Hematology Review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005;11:83-90.
17. Pipitone S, Germagnoli L, Da Rin G, et al. Comparing the performance of three panels rules of blood smear review criteria on an Italian multicenter evaluation. *Int J Lab Hematol* 2017;39:645-52.
18. Noris P, Melazzini F, Balduini CL. New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice? *Platelets* 2016;27:607-12.
19. Da Rin G, Vidali M, Balboni F, et al. Performance evaluation of the automated nucleated red blood cell count of five commercial hematological analyzers. *Internat J Lab Hematol* 2017;39:1-8.
20. Sehgal KK, Tina D, Choksey U, et al. Reference range evaluation of complete blood count parameters with emphasis on newer research parameters on the complete blood count analyzer Sysmex XE-2100. *Indian J Pathol Microbiol* 2013;56:120-4.
21. Roehrl MHA, Lantz D, Sylvester C, et al. Age-dependent reference ranges for automated assessment of immature granulocytes and clinical significance in an outpatient setting. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:471-7.
22. Sandhaus LM, Meyer P. How useful are CBC and reticulocyte reports to clinicians? *Am J Clin Pathol* 2002;118:787-93.
23. Sandhaus ML, Wald DN, Sauder KJ, et al. Measuring the clinical impact of pathologist reviews of blood and body fluid smears a laboratory outcome study. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:468-72.

Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale

Graziella Bonetti^{1*}, Davide Giavarina², Donatella Urbani², Cristina Marchetti², Mirella Marini³, Mariarosca Carta^{2*}

¹Laboratorio di Patologia Clinica, A.S.S.T. - Valcamonica

²Medicina di Laboratorio, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza

³Laboratorio Centrale Analisi Chimico Cliniche, A.S.S.T.- Spedali Civili, Brescia

*Gruppo di Studio SIBioC-SIPMeL Diabete mellito

ABSTRACT

An appropriate sample for oral glucose tolerance test is fundamental for a correct identification of gestational diabetes mellitus.

Background: Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is diagnosed by the oral glucose tolerance test (OGTT) using Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes (HAPO) study-derived definite cut-off values, where reference glucose is determined in sodium fluoride (NaF) containing tubes immediately centrifuged. The aim of the present study is to evaluate the effect of the use of the recommended citrate containing tubes, as immediate glycolysis inhibitor, for OGTT as screening for GDM, comparing them with NaF containing tubes, used in routine laboratory conditions.

Methods: a total of 83 pregnant women were enrolled in the study; OGTT (75 g) was carried out in the Clinical Laboratories of Brescia and Vicenza in all the subjects for screening of GDM. All subjects signed written informed consent to participate in the study. Glucose determination was performed using three different types of glycolysis inhibitor: [sodium fluoride (NaF, in both laboratories), a lyophilized acidified mixture (FC-MIX, in Vicenza), and a liquid acidified mixture (GlucoEXACT, in Brescia)]. The glucose concentration was measured by an hexokinase method on Dimension Vista systems from Siemens HealthCare. The International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IAPDGS) criteria, derived from the HAPO study, were used for the diagnosis of GDM.

Results: Using NaF and FC-mix tubes, 6/51 (11.8%) and 12/51 (23.5%) women respectively, were diagnosed having GDM in Vicenza. Using NaF and GlucoEXACT tubes 2/31 (6.5%) and 6/31 (18.8%) women respectively, were diagnosed having GDM in Brescia. There was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between NaF and citrate acidified mixture in the glucose measurements at all time points.

Conclusions: The use of the tubes containing a mixture of NaF, EDTA and citrate is a useful and necessary pre-analytical tool for an accurate OGTT, when utilized for the screening of GDM. Tubes containing NaF alone should no longer be used for screening of GDM because their use results in underdiagnosis of GDM.

INTRODUZIONE

La determinazione del glucosio plasmatico è fondamentale per lo screening e la diagnosi di diabete mellito (DM), di alterata glicemia a digiuno (IFG) e/o di ridotta tolleranza al glucosio (IGT) ed, in particolar modo, per lo screening e la diagnosi del diabete mellito gestazionale (GDM) per la quale l'emoglobina glicata (HbA1c) non può essere impiegata (1,2). È quindi di enorme importanza che i laboratori clinici forniscano risultati accurati ed affidabili per la misura del glucosio al fine di permettere una corretta interpretazione del valore

e fornire quindi valide informazioni cliniche.

La qualità analitica della determinazione della glicemia nei laboratori è ritenuta soddisfacente (3), problemi permangono invece nella fase pre-analitica. La glicolisi *in vitro*, con riduzione del glucosio nel campione, è la principale fonte di incertezza nelle determinazioni del glucosio. Per effetto della glicolisi *in vitro* mediamente si riscontra una riduzione della concentrazione di glucosio del 5-7%/ora, che può essere anche superiore qualora siano presenti leucocitosi o temperature elevate (4). Di conseguenza, le concentrazioni di glucosio dipendono fortemente da

Corrispondenza a: Graziella Bonetti, Laboratorio di Patologia Clinica, ASST-Valcamonica, Ospedale di Esine, Via Manzoni, 142, 25040 Esine (BS), Tel 0364 369495, E-mail graziella.bonetti@asst-valcamonica.it

Ricevuto: 02.10.2019

Revisionato: 02.10.2019

Accettato: 06.11.2019

Pubblicato on-line: 15.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.006

alcune variabili pre-analitiche, come il tipo di additivo impiegato nelle provette di raccolta ed il tempo di attesa tra il prelievo e l'analisi (1).

Per prevenire la glicolisi *in vitro* sono state prodotte alcune raccomandazioni (1,5). Le linee guida dell'American Diabetes Association (ADA) e della National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) nonché le raccomandazioni del gruppo di studio intersocietario Diabete di SIBioC, della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) congiuntamente ai rappresentanti della Società Italiana di Diabetologia (SID), indicano che per prevenire la riduzione della concentrazione di glucosio è necessario:

- centrifugare immediatamente e separare il plasma dalla parte corpuscolata del sangue, oppure
- immergere immediatamente la provetta in un bagno di ghiaccio fondente e separare il plasma entro 30 minuti da prelievo ematico, oppure
- raccogliere il sangue in provette contenenti un inibitore immediato della glicolisi, come un tampone citrato invece di impiegare il solo fluoruro di sodio (NaF) (1,5).

Appare evidente come le prime due modalità suggerite siano logisticamente difficilmente percorribili poiché quasi ovunque i punti prelievo sono ubicati lontano dai laboratori clinici ove avviene la misura del glucosio. L'uso del tampone citrato, congiuntamente con NaF ed EDTA (miscela acidificata) è descritta come un'adeguata soluzione per il problema di inibizione della glicolisi (6,7).

Oggi sono commercialmente disponibili due diverse ed efficaci tipologie di provette contenenti la miscela acidificata. La miscela si trova in forma liquida nelle provette GlucoEXACT (Sarstedt, Verona), che necessitano della correzione dei valori di glucosio per effetto della diluizione, mentre si trova in forma granulata nelle provette FC-Mix (Greiner BioOne, Cassina de' Pecchi, Milano) (8-10).

Il GDM è definito come "*intolleranza ai carboidrati con conseguente iperglicemia di gravità variabile con insorgenza o primo riconoscimento durante la gravidanza*" (11). Il GDM complica tra l'1% e il 24% delle gravidanze (12,13), rappresenta il disturbo metabolico più comune della gravidanza ed è associato ad un aumento della morbilità materna e perinatale, come preeclampsia, parto pre-termine, necessità di parto cesareo, macrosomia ed ipoglicemia neonatale (14-16). Secondo le ultime valutazioni della Federazione Internazionale del Diabete si ritiene che nel mondo il 14% di tutte le gravidanze siano affette da GDM, con 18 milioni nati l'anno (17). Inoltre si stima che le donne che hanno avuto GDM abbiano un 60% di probabilità in più di sviluppare diabete mellito tipo II nel corso della loro vita (18,19). Vi è una relazione lineare tra i livelli di glucosio materno e gli esiti perinatali avversi lungo tutta la distribuzione delle concentrazioni di glucosio durante la gravidanza (2).

Le raccomandazioni congiunte di International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) e Organizzazione Mondiale della Sanità

(OMS) per diagnosticare il GDM indicano l'utilizzo del carico orale di glucosio con 75 grammi (OGTT 75 g) a 2 ore (11,20,21).

I livelli decisionali impiegati per diagnosticare il GDM sono derivati dallo studio Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) (2) all'interno del quale il glucosio è stato determinato in provette contenenti NaF ed immediatamente centrifugate dopo il prelievo. In Italia, le indicazioni IADPSG sono state riprese dalla linea guida sulla gravidanza fisiologica dell'Istituto Superiore della Sanità in cui viene suggerito uno screening selettivo delle gravide da sottoporre a screening per GDM con OGTT 75 g, basato su alcuni fattori di rischio (22).

In uno studio condotto in 19 reparti di maternità irlandesi nel 2016, si è evidenziato come le raccomandazioni sulla fase pre-analitica nella determinazione della glicemia non fossero conosciute dai ginecologi (23) e come nei laboratori venissero impiegate ancora le provette con il solo NaF.

Nell'ipotesi che anche a livello italiano l'OGTT venga ancora eseguito impiegando provette con il solo NaF, abbiamo condotto uno studio volto a determinare la differenza nella diagnosi di GDM impiegando per l'OGTT 75 g le provette standard contenenti NaF e confrontando i risultati della misura del glucosio con le provette contenenti la nuova miscela acidificata sia in forma liquida che granulata.

METODI

Lo studio è stato condotto nel 2018 presso il Laboratorio Analisi Chimico Cliniche degli Spedali Civili di Brescia e presso il Laboratorio dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza. È stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 (http://www.wma.net/e/humanrights/policy_meetings.htm) ed è stato ottenuto uno specifico consenso informato scritto per la partecipazione allo studio da parte di tutte le partecipanti.

Sono state arruolate 83 donne in gravidanza, età media 32,6 (intervallo 18-44) anni; 51 a Vicenza di età media 33 anni (intervallo 18-44) e 32 a Brescia di età media 32 anni (intervallo 22-43), inviate dai ginecologi per l'esecuzione dell'OGTT per lo screening del GDM alla 24-28ª settimana di gestazione.

In ogni sede dello studio tutti i prelievi venosi sono stati eseguiti da un singolo esperto prelevatore al fine di ridurre al minimo la variabilità durante l'attività di prelievo. L'OGTT è stato eseguito al mattino dopo un digiuno notturno di almeno 8 ore. La diagnosi di GDM è stata posta se la glicemia a digiuno era ≥ 92 mg/dL, o la glicemia ad 1 ora era ≥ 180 mg/dL, o la glicemia a 2 ore era ≥ 153 mg/dL, secondo le linee guida IADPSG (20).

Nel laboratorio di Brescia l'OGTT è stato eseguito impiegando 2 provette: una prima provetta contenente NaF-K₃EDTA da 2,7 mL (Rif. 04.1918, Sarstedt, Verona) ed una seconda con la miscela acidificata di Na₂EDTA, NaF, acido citrico in forma liquida, da 3,1 mL (GlucoEXACT, Rif. 04.1945.001, Sarstedt, Verona).

Nel laboratorio di Vicenza per l'OGTT sono state impiegate due provette: una con NaF-K₂ ossalato da 2 mL, (NaF/KOx, Rif. 454514, Vacutest Kima, Arzegrande, Padova e una con miscela acidificata Na₂EDTA, NaF, acido citrico e Na-citrato in forma granulata, da 2 mL (FC-MIX, Ref. 454511, Greiner Bio-One, Cassina de Pecchi, Milano).

Immediatamente dopo il prelievo, tutte le provette sono state miscelate secondo le indicazioni delle aziende produttrici (ovvero 6 volte per le GlucoEXACT e 10 volte per le FC-Mix, rispettivamente) e sono state conservate a temperatura ambiente (20-25°C) fino al momento della centrifugazione. Tutte le provette appartenenti allo stesso soggetto sono state centrifugate entro 3-4 ore dal prelievo a 2000 g per 10 minuti a 20°C utilizzando la centrifuga Sorvall RG3 (Thermo Fisher Scientific, Monza) nel laboratorio di Brescia e Haereus Megafuge 1.0 Centrifuga R (Thermo Fisher Scientific, Monza) nel laboratorio di Vicenza.

Le determinazioni del glucosio della stessa gravida sono state eseguite nella stessa seduta sugli analizzatori Dimension Vista 1500 (Siemens HealthCare, Milano) usando il metodo esochinasi (CV intralaboratorio= 2,1% a Brescia e 2,8% a Vicenza). I valori di glucosio ottenuti sulle provette GlucoEXACT (miscela liquida) sono stati moltiplicati per il fattore 1,16 come raccomandato dal produttore.

Analisi statistica

La distribuzione di tutte le variabili continue è stata valutata mediante il test di Kolmogorov Smirnov ed i dati sono stati espressi come media (DS) se distribuiti normalmente o come mediana e range interquartile (IQR) se non distribuiti normalmente. Poiché i dati hanno mostrato distribuzioni non gaussiane, il test Wilcoxon per dati appaiati è stato impiegato per confrontare le

concentrazioni di glucosio misurate nei due tipi di provette oggetto dello studio. La regressione di Passing e Bablock è stata impiegata nel confronto tra le concentrazioni di glucosio nelle provette contenenti NaF e NaF/EDTA/citrato. Il bias tra glucosio nelle provette della miscela di NaF e NaF/EDTA/citrato è stato calcolato come:

$$B = [(Glucosio \text{ in miscela acidificata} / Glucosio \text{ in NaF}) \times 100] - 100$$

I criteri di accettazione del bias sono stati definiti in base agli studi di variazione biologica (bias desiderabile $\leq \pm 2,1\%$) (23). L'analisi statistica è stata eseguita con il software MedCalc, versione 19.0.7 (Ostend, Belgio). I valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Nella tabella 1 sono rappresentati i valori del glucosio a digiuno e dopo 1 e 2 ore dall'OGTT 75 g per lo screening della GDM ed i relativi bias.

Il confronto tra le concentrazioni di glucosio durante l'OGTT 75 g per lo screening di GDM ha evidenziato come queste siano significativamente più elevate impiegando la miscela acidificata di NaF/Na₂EDTA/citrato sia in forma granulata che liquida ($p < 0,0001$) rispetto alle concentrazioni di glucosio ottenute impiegando le provette in uso contenenti il solo NaF (NaF/K₃EDTA a Brescia e NaF/K₂Ox a Vicenza). Il bias medio tra il glucosio determinato sul campione di plasma NaF rispetto a quello ottenuto con miscela acidificata è superiore al bias desiderabile in base agli studi sulla variazione biologica (2,1%) e pertanto va considerato come clinicamente significativo (24).

Nella tabella 2 vengono mostrati i dati della classificazione delle gravide all'OGTT per lo screening di

Tabella 1

Mediana (IQR) della glicemia al tempo 0 (T0), dopo 1 ora (T1h), dopo 2 ore (T2h) dell'OGTT per lo screening del diabete mellito gestazionale ottenuta con le provette con sodio fluoruro mantenute a temperatura ambiente e con le provette con miscela acidificata e i relativi bias (95% IC).

Laboratorio	Provetta	n	Glucosio, mg/dL			Bias medio, %		
			T0	T1h	T2h	T0	T1h	T2h
Brescia	NaF/K ₃ EDTA	32	74,4 (71,2-78,0)	122,5 (103,5-137,2)	107,1 (98,5-131,9)	-	-	-
	GlucoEXACT forma liquida	32	83,3* (78,9-85,9)	128,4* (111,9-145,0)	118,3* (106,6-139,1)	+10,78 (9,44-12,12)	+6,72 (4,92-8,52)	+7,42 (5,80-9,04)
Vicenza	NaF/K ₂ Ox	51	76,0 (70,3-83,8)	130,0 (109,3-150,5)	106,0 (91,3-125,5)	-	-	-
	FC-Mix forma granulata	51	81,0* (77,0-89,0)	131,0* (115,3-154,0)	109,0* (96,5-129,8)	+7,93 (6,53-9,33)	+3,86 (2,75-4,97)	+5,83 (4,51-7,14)

* $P < 0,0001$ al test di Wilcoxon per dati appaiati

In grassetto sono mostrati i bias clinicamente significativi che superano l'obiettivo di bias desiderabile in base allo studio su variabilità biologica (cioè $\leq \pm 2,1\%$) (23).

NaF, sodio fluoruro; GlucoExact, miscela acidificata in forma liquida; FC-Mix, miscela acidificata in forma granulata.

Tabella 2

Numero di campioni (percentuale) che eccedono all'OGTT i livelli decisionali IADPSG per lo screening del GDM impiegando le provette con sodio fluoruro (NaF) e la miscela acidificata in forma liquida (GlucoExact) e granulare (FC-mix).

Glucosio (Criteri IADPSG)	Brescia (n=32)		Vicenza (n=51)	
	NaF/K ₃ EDTA, n (%)	GlucoEXACT, n (%)	NaF/K ₂ Ox, n (%)	FC-Mix, n (%)
Basale: ≥92 mg/dL	0	4 (12,5)	3 (5,8)	8 (15,6)
1h OGTT: ≥180 mg/dL	0	1 (3,1)	5 (9,8)	7 (13,7)
2h OGTT: ≥153 mg/dL	2 (6,3)	3 (9,3)	3 (5,8)	5 (9,8)
Diagnosi di GDM	2 (6,3)	6 (18,8)	6 (11,8)	12 (23,5)

IADPSG, International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups; GDM, diabete mellito gestazionale

GDM secondo i criteri IADPSG utilizzando NaF e la miscela acidificata in forma liquida e granulare nei due laboratori partecipanti allo studio.

La regressione di Passing e Bablok (Figura 1) impiegata nel confronto tra i valori di glucosio nei campioni oggetto della valutazione mostrano un significativo scostamento costante tra i valori determinati sulle provette contenenti il NaF rispetto a quelli ottenuti nei campioni raccolti nelle provette contenenti la miscela acidificata, sia nella forma liquida sia nella forma liofilizzata-granulare.

DISCUSSIONE

Il presente studio valuta e compara l'effetto dell'impiego delle provette con miscela acidificata sia nella forma liquida che granulare nella diagnosi di GDM secondo le raccomandazioni IADPSG (20) rispetto alle provette contenenti NaF conservate a temperatura ambiente, come comunemente impiegato nei laboratori italiani.

In un precedente studio condotto su sessanta donne al primo trimestre di gestazione sottoposte a OGTT per lo screening del GDM, la glicemia a digiuno era mediamente superiore di 10 mg/dL rispetto a quella ottenuta impiegando provette di plasma NaF trattate in condizioni ottimali (cioè provette di sangue centrifugate entro 5 minuti dal prelievo ematico) rispetto a quelle centrifugate e analizzate entro 30-45 minuti dal prelievo. Nello studio non erano stati diagnosticati 13 casi (21,7%) di GDM e 2 (3,3%) di diabete manifesto, dimostrando che un trattamento corretto del campione di sangue è fondamentale per una corretta diagnosi di GDM (25).

In un recente studio retrospettivo su circa 1200 donne sottoposte a OGTT per screening di GDM, impiegando i criteri diagnostici IADPSG, la prevalenza di GDM si è evidenziata essere del 13,5% utilizzando le provette con solo NaF conservate a temperatura ambiente. Gli autori dello studio mediante la definizione

di un modello teorico, peraltro discutibile in quanto basato su dati relativi alla comparazione su soli 15 soggetti, hanno stimato come la prevalenza di GDM utilizzando la raccomandata miscela acidificata in forma granulare possa raggiungere il 39,2%, concludendo che le condizioni pre-analitiche ottimali portano ad una sovrastima del GDM, e come sia necessaria una ridefinizione dei livelli decisionali (26). Gli autori dello studio hanno, secondo la nostra opinione, tratto delle conclusioni errate in quanto i criteri diagnostici IADPSG si basano su HAPO study dove le condizioni pre-analitiche erano ottimali (immediata centrifugazione e separazione del plasma). Pertanto non si tratterebbe di una ipotetica sovra-diagnosi di GDM usando la miscela acidificata ma al contrario di una reale sottostima di GDM usando le provette con il solo NaF (26).

A conferma di tale ipotesi, nel 2016 uno studio condotto da un gruppo irlandese su 155 donne sottoposte a screening per GDM ha mostrato come la prevalenza di GDM fosse del 14,2% usando provette con NaF/EDTA mantenute a temperatura ambiente, mentre usando le stesse provette immerse in bagno di ghiaccio fondente con centrifugazione e separazione del plasma entro 30 minuti, una delle modalità pre-analitiche raccomandate, fosse del 38,1%. (27).

Nel nostro studio, con l'impiego delle provette contenenti la raccomandata miscela acidificata, sia nella forma liquida che granulare, sono stati diagnosticati più casi di GDM (+12,5% a Brescia e +11,7% a Vicenza) rispetto all'uso di NaF senza acidificazione.

Nel 2017, nell'ambito di uno studio volto alla validazione dell'utilizzo della nuova provetta Greiner BioOne FC-Mix per la diagnosi di GDM su 40 donne in gravidanza, van der Hagen et al. (10) avevano confrontato la glicemia ottenuta impiegando la provetta FC-Mix rispetto a quella ottenuta con l'impiego di provette contenenti potassio ossalato e NaF trattate in condizioni ottimali. Tuttavia i criteri diagnostici dell'OGTT 75 g in uso nei Paesi Bassi si basavano sulle linee guida

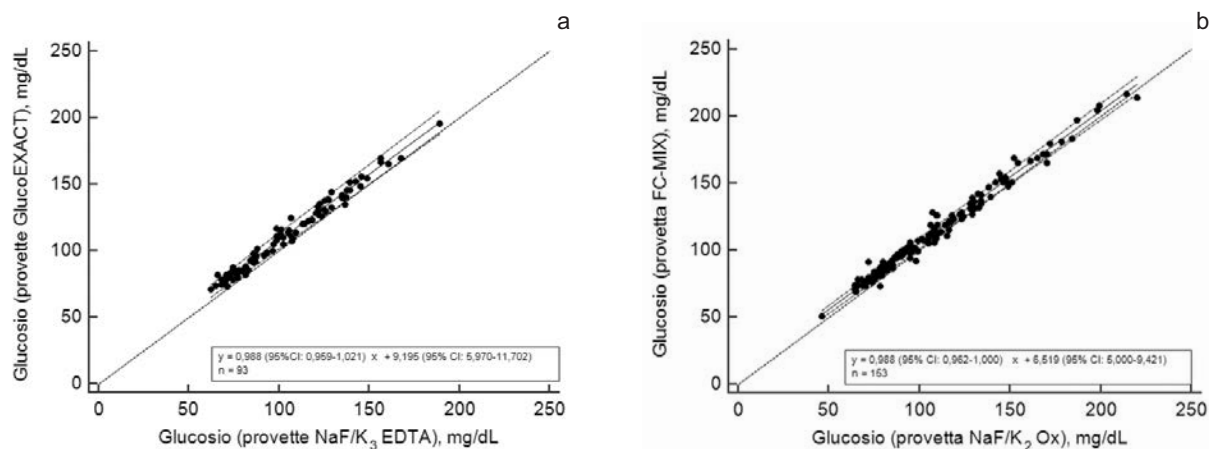


Figura 1

Regressione secondo Passing e Bablok tra i valori di glucosio ottenuti impiegando le provette con NaF/K₃EDTA e quelle con miscela acidificata in forma liquida (GlucoEXACT) (1a) e tra quella ottenuta con le provette NaF/K₂Ox e con quelle con miscela acidificata in forma liofila (FC-MIX) (1b).

dell'OMS del 1999 secondo le quali veniva posta diagnosi di GDM con glicemia a digiuno >126 mg/dL o >140 mg/dL dopo 120 minuti, rendendo difficoltosa la comparazione dei loro risultati con quelli del presente studio che è basato sulle attuali raccomandazioni IADPSG e sui livelli decisionali derivati dallo studio HAPO.

Nel presente studio si è evidenziata una differenza statisticamente e clinicamente significativa nella determinazione della glicemia per ogni punto della curva da carico tra le provette contenenti NaF e quelle con la miscela acidificata con tampone citrato/NaF ed EDTA, sia che questa fosse nella forma liquida o granulare. Nei campioni raccolti dopo 60 minuti e in quelli con concentrazioni di glucosio più elevate, il bias tra la determinazione del glucosio eseguita su provette con la miscela acidificata, rispetto a quella su provette con NaF senza acidificazione era inferiore rispetto al bias riscontrato sul campione basale. Ciò potrebbe imputarsi ad un ridotto uptake di glucosio negli eritrociti in presenza di valori elevati di glucosio, come osservato peraltro nei pazienti diabetici rispetto ai non diabetici (28). Un analogo riscontro è stato osservato anche da Daly et al. (29) nella sua casistica. Nel nostro studio il bias riscontrato nei valori di glucosio su campioni con NaF/Na₂EDTA/citrato in forma liquida (provette GlucoEXACT) rispetto a NaF/K₃EDTA è superiore a quello individuato confrontando NaF/Na₂EDTA/citrato in forma granulare (provette FC-Mix) e NaF/K₂Ox. Si può ipotizzare pertanto o una maggiore efficienza di NaF/K₂Ox rispetto a NaF/K₃EDTA nell'inibire la glicolisi in vitro o, più probabilmente, ad un diverso comportamento dei laboratori riguardo ai tempi di centrifugazione dei campioni, più rapido nel laboratorio di Vicenza rispetto a quello di Brescia.

A livello nazionale vi è discussione sulle modalità di

screening precoce mediante OGTT 75 g delle donne ad elevato rischio e sul fatto che alcune gravide a basso rischio affette da GDM possano non essere diagnosticate utilizzando le attuali linee guida (30).

Gli autori del presente studio ritengono che sia giunto il tempo per l'inserimento nelle raccomandazioni nazionali, ad esempio negli Standard Italiani di Cura del Diabete mellito (31) delle indicazioni sulla gestione ottimale della fase pre-analitica, come già avviene negli standard di cura statunitensi (32).

In conclusione, i risultati del nostro studio sembrano corroborare e rendere imperativo l'impiego delle provette contenenti miscela acidificata, sia in forma granulare che in forma liquida, nell'OGTT per lo screening del GDM qualora non sia possibile una centrifugazione e separazione immediata del campione, come effettuato nell'HAPO study dal quale sono derivati i livelli decisionali per GDM. L'impiego di provette contenenti il solo NaF potrebbe comportare una sottostima dei casi diagnosticati di GDM esponendo la madre e il neonato ad un aumentato rischio di complicanze e potrebbe esporre anche a controversie legali qualora non venga diagnosticato GDM a causa di condizioni pre-analitiche non ottimali.

I risultati dello studio dovranno essere comunque confermati mediante ulteriori studi su una maggiore casistica.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem.

- 2011;57:e1-47.
2. The HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.
 3. Mosca A, Quercioli M, Paleari R. The analytical performance of laboratory plasma glucose and HbA1c measurements are largely acceptable. *Acta diabetologica* 2019 doi: 10.1007/s00592-019-01408-4.
 4. Chan A, Swaminathan R, Cockram C. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989;35:315-17.
 5. Bonetti G, Carta M, Lapolla A, et al. on behalf of the SIBioC-SIPMeL working group on Diabetes. Correct determination of glycemia in the diagnosis and management of diabetes: recommendations for the optimization of the pre-analytical phase. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018 <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.09.013>.
 6. Bonetti G, Carta M, Montagnana M, et al. on behalf of the Italian joint SIBioC-SIPMeL Study Group on Diabetes Mellitus. Effectiveness of citrate buffer-fluoride mixture in Terumo tubes as an inhibitor of in vitro glycolysis. *Biochem Med* 2016;26:68-76.
 7. Carta M, Montagnana M, Lo Cascio C, et al. Italian joint SIBioC-SIPMeL study group on diabetes mellitus. Glucose sampling: importance of citrate. *Ann Clin Biochem*. 2016;53:715-6.
 8. Bonetti G, Cancelli V, Coccoli G, et al. Which sample tube should be used for routine glucose determination? *Prim Care Diabetes* 2016;10:227-32.
 9. Bonetti G, Carta M. The new Greiner FC-Mix tubes equal the old Terumo ones and are useful as glucose stabilizer after prolonged storage of samples. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017;27:030901.
 10. Van der Hagen EAE, Fokkert MJ, Kleefman AMD, et al. Technical and clinical validation of the Greiner FC-Mix glycaemia tube. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1530-6.
 11. Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. WHO/NMH/MND/13.2. WHO 213. Ginevra. Switzerland.
 12. Farrar D, Simmonds M, Bryant M, et al. Hyperglycaemia and risk of adverse perinatal outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2016 doi: 10.1136/bmj.i4694.
 13. Farrar D, Duley L, Dowswell T, et al. Different strategies for diagnosing gestational diabetes to improve maternal and infant health. *Cochrane Database Syst Rev* 2017: CD007122. doi: 10.1002/14651858.CD007122.pub4.
 14. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, et al. Australian Carbohydrate Intolerance Study in Pregnant Women (ACHOIS) Trial Group. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. 2005;352:2477-86.
 15. Sacks DA, Black MH, Li X, et al. Adverse pregnancy outcomes using the international association of the diabetes and pregnancy study groups criteria: glycemic thresholds and associated risks. *Obstet Gynecol* 2016;126:67-73.
 16. Tan PC, Ling LP, Omar SZ. The 50-g glucose challenge test and pregnancy outcome in a multiethnic Asian population at high risk for gestational diabetes. *Int J Gynecol Obstet* 2009;105:50-5.
 17. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 8th ed.; IDF: Brussels, Belgium, 2017.
 18. Peters RK, Kjos, SL, Xiang A, et al. Long-term diabetogenic effect of single pregnancy in women with previous gestational diabetes mellitus. *Lancet* 1996;347:227-30.
 19. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, et al. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009;373(9677):1773-9.
 20. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33:676-82.
 21. Lapolla A, Mosca A. Screening e diagnosi del diabete gestazionale: definite le raccomandazioni. *Biochim Clin* 2012;36:12-4.
 22. Linea-guida Gravidanza fisiologica. 2011 update. Diagnosi del diabete gestazionale, vol 1, pp 169-173. www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1426_allegato.pdf (ultimo accesso: ottobre 2019).
 23. Daly N, Flynn I, Carroll C, et al. A national survey of preanalytical handling of oral glucose tolerance tests in pregnancy. *CCLM* 2016;54:e221-3.
 24. Aarsand AK, Diaz-Garzon J, Fernandez-Calle P, et al. The EuBIVAS: within- and between-subject biological variation data for electrolytes, lipids, urea, uric acid, total protein, total bilirubin, direct bilirubin and glucose. *Clin Chem* 2018;64:1380-93.
 25. Festa R, Carta M, Ceriello A, et al. Time is glucose, can't miss gestational diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2012;14:444-6.
 26. Song D, Lia M, Hurley JC. Recommended pre-analytical plasma glucose sampling methodology may distort gestational diabetes mellitus prevalence: implications for diagnostic thresholds. *Diabet Med* 2019 doi: 10.1111/dme.14073.
 27. Daly N, Flynn I, Carroll C, Farren M et al. Impact of implementing preanalytical laboratory standards on the diagnosis of Gestational Diabetes mellitus: a prospective observational study. *Clin Chem* 2016;62:387-91.
 28. Yoa RG, Rapin Jr, Wiernsperger NF, et al. Demonstration of defective glucose uptake and storage in erythrocytes from non-insulin dependent diabetic patients and effect of metformin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993;20:563-7.
 29. Daly N, Flynn I, Carroll C, et al. Comparison of citrate-fluoride-EDTA with Fluoride-EDTA additives to stabilize plasma glucose measurements in women being screened during pregnancy with an oral glucose tolerance test: a prospective observational study. *Clin Chem* 2016;62:886-7.
 30. Vitacolonna E, Succurro E, Lapolla A, et al. Guidelines for the screening and diagnosis of gestational diabetes in Italy from 2010 to 2019: critical issues and the potential for improvement. *Acta diabetologica* 2019 doi 10.1007/s00592-019-01397-4.
 31. Standard Italiani per la Cura del diabete mellito 2018. <https://aemmedi.it/wp-content/uploads/2009/06/AMD-Standard-unico1.pdf> (ultimo accesso: ottobre 2019).
 32. American Diabetes Association. Standards of Medical Care. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2019;42 (Suppl 1):S13-S28.

Confronto tra un metodo nefelometrico ed un metodo turbidimetrico per la determinazione delle catene leggere libere sieriche: punti di forza e criticità

Patrizia Natali, Maria Rosaria Cucinelli, Giovanna Patelli, Daria Debbia, Elena De Santis, Manuela Varani, Tommaso Trenti

Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda Unità Sanitaria Locale di Modena

ABSTRACT

Comparison between a turbidimetric and a nephelometric method for the measurement of serum free light chains: strengths and weaknesses.

Background: monoclonal gammopathies include a broad spectrum of pathologies, and free light chains (FLC) measurement is recommended by guidelines for the diagnosis, follow up and prognosis of plasma cell dyscrasia. The aim of the study is to compare the measurement of FLC performed with two different analytical platforms, a nephelometer and a turbidimeter, in order to assess the analytical and diagnostic agreement.

Methods: 87 consecutive samples received by the laboratory with a request of FLC measurement were analyzed on nephelometer Immage 800 (Beckman Coulter, USA) and turbidimeter Optilite (The Binding Site, UK), using the same antibodies (Freelite, The Binding Site, UK).

Results: by applying the Passing-Bablok regression and the Bland-Altman analysis, a proportional and constant systematic error but non-significant bias for FLC ratio (rFLC) has been observed. By applying the Weighted Cohen's Kappa (WK) test to the rFLC values, an excellent diagnostic agreement between the two instruments has been shown, considering both the normal range (0.26 – 1.65) (WK=0.87) and the diagnostic range for multiple myeloma (<0.01 or >100) (WK=0.84).

Conclusions: Although there are statistical differences between the measurements performed by the two instruments, these do not affect the diagnostic agreement, that is excellent. Nevertheless, the turbidimeter is provided with a software that can automatically detect the antigen excess; by diluting further the samples automatically, it performs fewer dilutions than the nephelometer and provides a wider range of measurement, especially for low concentrations. These characteristics assist the operator both during the analysis and the validation phases of the results, saving time and resources. On the basis of the results of the study, it can be concluded that the turbidimeter shows better performances compared to the nephelometer.

INTRODUZIONE

La gammopatia monoclonale (GM) comprende un ampio spettro di patologie, tra cui il mieloma multiplo (MM), la gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS), il mieloma multiplo smoldering (SMM), il plasmacitoma, il morbo di Waldstrom, l'amiloidosi AL ed altro. Queste condizioni sono caratterizzate dalla presenza di un'immunoglobulina monoclonale generata dalla proliferazione di un clone di plasmacellule in cui le catene leggere libere (FLC), poiché prodotte in eccesso rispetto alla catena pesante,

diventano un efficace marcatore di malattia (1-2).

Nel 2014, l'International Myeloma Working Group (2) ha aggiornato i criteri per la diagnosi di MM aggiungendo alla ormai consolidata sintomatologia CRAB - ipercalcemia, insufficienza renale, anemia e lesioni ossee - altri criteri diagnostici definiti con l'acronimo SLIM dove S indica presenza $\geq 60\%$ plasmacellule nel midollo osseo; Li, il rapporto FLC coinvolta/FLC non coinvolta ≥ 100 ; M, una risonanza magnetica con 1 o più lesioni focali ossee.

La determinazione di FLC assume quindi un'importanza cruciale non solo per la diagnosi di MM

Corrispondenza a: Patrizia Natali, Via Giardini 1355, 41126 Baggiovra (MO), Tel 059/3961077 - 347/4330775; E-mail p.natali@ausl.mo.it

Ricevuto: 24.09.2019

Revisionato: 25.11.2019

Accettato: 05.12.2019

Pubblicato on-line: 20.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.012

ma anche come soglia decisionale per l'inizio della terapia, il monitoraggio della stessa e la valutazione della risposta stringente completa che prevede la normalizzazione del rapporto FLC kappa/ lambda (rFLC) (3).

Ad oggi sono state messe a punto differenti piattaforme analitiche per la misurazione delle FLC con metodiche in nefelometria e turbidimetria che impiegano antisieri policlonali o monoclonali. Diversi sono stati gli studi di confronto tra metodi dai quali si evince che esistono differenze, a volte anche di rilievo, specialmente per i valori estremi, ben al di fuori dei rispettivi intervalli di normalità (4-8).

In questo contesto e parallelamente ad un aggiornamento tecnologico del nostro laboratorio, si è condotto uno studio di comparazione della misurazione delle FLC tra nefelometria e turbidimetria allo scopo di valutare le caratteristiche analitiche e diagnostiche dei due strumenti.

METODI

Disegno dello studio

Dal 1/7/2016 al 30/9/2016 sono pervenuti 87 campioni consecutivi provenienti dal reparto di Oncoematologia dell'Azienda Ospedaliero Universitaria del Policlinico di Modena con richiesta di determinazione delle FLC. Tutti i campioni pervenuti sono stati inclusi nello studio senza applicare alcun criterio di selezione.

Dopo centrifugazione per 10 minuti a 3000 rpm, veniva eseguita la determinazione delle FLC con il nefelometro Image 800 (Beckman Coulter, USA) ed entro le 2 ore successive era ripetuta sul turbidimetro Optilite (The Binding Site, UK).

Su entrambi gli strumenti era impiegato il kit Freelite (Binding Site, UK), composto da anticorpi policlonali di pecora monospecifici rivestiti con lattice di polistirene che, amplificando le dimensioni del precipitato, aumentano la sensibilità della misurazione nefelometrica o turbidimetrica (9). Per il nefelometro è stato utilizzato il reattivo Freelite® Human Kappa/Lambda Free Kit per Beckman Coulter IMAGE®/IMAGE®800. Per il turbidimetro Optilite Freelite® Kappa/Lambda Free Kit. Per entrambi gli strumenti si è utilizzato il medesimo lotto per tutto il periodo in cui è durato il confronto.

Determinazione nefelometrica

Il nefelometro Image 800 (Beckman Coulter, USA) misura la luce diffusa dall'immunocomplesso formatosi durante la reazione antigene-anticorpo. La curva di calibrazione è a 6 punti con un intervallo di misurazione per le FLC kappa di 6,0-180,0 mg/L e per le FLC lambda di 4,8-162,0 mg/L. Prima di procedere all'analisi, ogni campione viene automaticamente prediluito 1:10 dallo strumento. Per i campioni che eccedono il limite superiore della curva di calibrazione, o per i quali si sospetta un eccesso di antigene, si applicano una serie di diluizioni manuali: 1:25, 1:100, 1:500 come suggerito

dal produttore. Questo strumento non prevede un rilevamento automatico di eccesso di antigene, pertanto in soggetti che hanno già evidenziato in passato un effetto prozona, o qualora il valore ottenuto non fosse congruente con il dato precedente o con il tracciato elettroforetico o ancora con la clinica del paziente, così come suggerito da Tate et al. (10), si diluisce il campione ad un livello superiore. Se si ottiene un risultato non proporzionale alla diluizione ma >4 volte il dato iniziale, si può ritenere che la reazione stia avvenendo in condizioni di eccesso di antigene.

Determinazione immunoturbidimetrica

Il turbidimetro utilizzato per la misurazione di FLC è Optilite (Binding Site, UK) che rileva la diminuzione della luce che attraversa la soluzione contenente l'immunocomplesso.

Per le FLC kappa il siero è prediluito automaticamente 1:10 e la curva di calibrazione a 7 punti ha un intervallo di linearità compreso tra 2,9-127,0 mg/L. Per le FLC lambda il siero è prediluito 1:8 ed l'intervallo di linearità della curva a 7 punti è compreso tra 5,2-139,0 mg/L.

Nell'evenienza che un campione presenti una reattività troppo bassa al di sotto del limite inferiore della curva di calibrazione, lo strumento ripesca in automatico il campione e lo diluisce 1:2 aumentando così la sensibilità a 0,6 mg/L per le FLC kappa e a 1,3 mg/L per le FLC lambda.

Se nel campione è presente una concentrazione di FLC oltre al limite superiore di linearità della curva di calibrazione, il siero viene automaticamente diluito in progressione logaritmica fino a quando il valore ottenuto non rientra nei parametri di accettabilità impostati. Grazie alla valutazione della cinetica di reazione, Optilite è inoltre dotato di un sistema automatico di controllo di eccesso di antigene. I sieri che presentano un eccesso di antigene, caratterizzati da una reazione molto veloce all'inizio che tuttavia si arresta rapidamente quando l'antisiero si satura, vengono contrassegnati come ad "attività elevata". Tali campioni vengono diluiti in progressione logaritmica fino ad ottenere un dato congruente con la diluizione applicata.

Analisi statistica

In accordo con il protocollo proposto da SIBioC (11,12), i due metodi sono stati comparati tramite la regressione di Passing-Bablok e analisi di Bland-Altman. La concordanza rispetto al valore soglia selezionato è stata valutata tramite il test Kappa pesato di Cohen (WK). Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software MedCalc v14.8.1 (Ostend, Belgio).

Durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996.

RISULTATI

La popolazione di 87 pazienti reclutati per questo studio è costituita da 47 uomini (54,0%) e 40 donne (46,0%) con una età media di 68 (DS 12) anni. Di questi, 48 (55,2%) presentavano una diagnosi di MM; 15 (17,2%) di MGUS; 13 (14,9%) di MM a catene leggere (MMLC); 5 (5,7%) di amiloidosi AL; 4 (4,6%) sospetto MM; 1 (1,2%) malattia da catene pesanti (HCD); 1 (1,2%) insufficienza renale cronica (IRC). La tipologia di tracciato elettroforetico e componenti monoclonali rilevate nel siero e/o nelle urine di ogni paziente in associazione alla diagnosi sono riportate in Tabella 1.

Analisi dell'imprecisione

Il controllo di qualità interno di The Binding Site per FLC kappa determinato su Immage 800 ha evidenziato un CV di 4,3% e di 2,9% rispettivamente per il livello basso (14,2 mg/L) e alto (27,0 mg/L); per FLC lambda si

è rilevato un CV di 2,1% per il livello basso (24,0 mg/L) e 2,2% per il livello alto (51,5 mg/L).

Su Optilite il CV per il livello basso delle FLC kappa (16,0 mg/L) era di 3,6%, mentre per il livello alto (29,8 mg/L) era di 3,5%. Per le FLC lambda il livello basso (28,1 mg/L) ha mostrato un CV di 4,3%, mentre per il livello alto (53,5 mg/L) di 3,4%.

In entrambi i casi il CV rientra nel limite della variabilità biologica raggiungendo l'obiettivo analitico desiderabile come valutato da Hansed et al.(13).

Misurazioni su Immage 800

Per 34 (39,1%) degli 87 campioni analizzati, (24 FLC kappa e 10 FLC lambda) si è reso necessario procedere con una o più diluizioni oltre a quella effettuata direttamente dallo strumento. Le diluizioni erano eseguite manualmente seguendo lo schema suggerito dal produttore, come indicato in tabella 2. Per 3 (3,4%) determinazioni il valore di FLC lambda è risultato più

Tabella 1

Tracciato elettroforetico e tipizzazione sierico alla diagnosi.

Tracciato elettroforetico	MM	MGUS	MMLC	Amiloidosi AL	Sospetto clinico MM	HDC	IRC	Totale
CM IgGkappa	18	10						28
CM IgG lambda	4	1						5
CM IgA kappa	4							4
CM IgA lambda	2	2						4
CM IgG kappa + IgG lambda	4	1						5
CM IgA kappa+ IgG kappa+, IgG lambda	1							1
CM catene gamma						1		1
CM IgG lambda + sFLC lambda			2					2
sFLC kappa			6					6
sFLC lambda			2	1				3
Alterazione poco definita in zona gamma	5		1	1				7
Ipgammaglobulinemia				1				1
Tracciato elettroforetico normale (proteina di Bence Jones kappa)	1		1					2
Tracciato elettroforetico normale	9	1	1	2	4		1	18
Totale	48	15	13	5	4	1	1	87

MM, mieloma multiplo; MGUS, gammopatia monoclonale di significato indeterminato; MMLC, mieloma multiplo a catene leggere; HDC, malattia a catene pesanti; IRC, insufficienza renale cronica; CM, componente monoclonale; sFLC catene leggere libere sieriche.

basso del limite inferiore di linearità della curva di calibrazione e non è stato possibile ottenere un risultato strumentale. Complessivamente sono state eseguite 126 analisi di FLC kappa e 105 di FLC lambda per un totale di 231 determinazioni (Tabella 2). Nella casistica esaminata non si sono riscontrati campioni in eccesso di antigene non essendosi rilevato alcun risultato non congruente con la diluizione applicata.

Misurazioni su Optilite

Degli 87 sieri analizzati con Optilite, ne sono stati diluiti automaticamente 26 (29,9%): 21 FLC kappa e 5 FLC lambda secondo lo schema indicato dal produttore. Dei 26 campioni diluiti, 23 (18 FLC kappa e 5 FLC lambda) hanno mostrato un dato al di sopra del limite superiore della curva di calibrazione, mentre 3 casi (2 FLC kappa e 1 FLC lambda) sono stati contrassegnati come "attività elevata" e quindi potenzialmente affetti da eccesso di antigene; tutti questi sieri sono stati diluiti direttamente dallo strumento. Gli stessi 3 campioni analizzati con Immage 800 hanno fornito risultati superiori al valore massimo della curva di calibrazione.

In 7 campioni la misurazione delle FLC lambda era al di sotto del limite inferiore della curva di calibrazione (5,71 mg/L) e pertanto sono stati rianalizzati in

automatico ad una diluizione minore ottenendo così un dato misurabile per lo strumento. In totale sono state eseguite 217 determinazioni di cui 115 FLC kappa e 102 FLC lambda (tabella 3), il 6,1% in meno rispetto Immage 800.

Concordanza analitica

Nel confronto Immage 800 e Optilite, sono state prese in considerazione 87 determinazioni per le FLC kappa e 84 per FLC lambda in quanto 3 campioni non hanno fornito un risultato all'analisi con Immage 800; per questi stessi 3 campioni non è stato neppure possibile la comparazione con rFLC.

Applicando la regressione lineare di Passing Bablok ai valori di FLC kappa si è ottenuta un'intercetta di -1,11 (IC 95% -2,16 - 0,61) e una pendenza di 0,95 (IC 95%: 0,90 - 1,00) da cui si evince l'assenza di errore sistematico costante o proporzionale. Il grafico di Bland-Altman ha fornito una media delle differenze di 205,5 (IC 95% 33,1 - 378,0) e il 95% delle differenze tra i due metodi è compreso nell'intervallo tra -1 380,6 e 1 791,7, mostrando un bias significativo ($p = 0,02$).

Relativamente alle FLC lambda, con la regressione di Passing Bablok si sono ottenuti i seguenti risultati: intercetta -4,31 (IC 95%: -5,59 - -2,73) e pendenza 1,01

Tabella 2

Diluizioni applicate ai campioni analizzati con nefelometro Immage 800 e reattivo Freelite. 1, il campione è sottoposto ad un'ulteriore diluizione manuale oltre a quella iniziale; 2, il campione è sottoposto 2 diluizioni manuali oltre a quella iniziale; 3, il campione è sottoposto 3 diluizioni manuali oltre a quella iniziale.

Immagine 800	Diluizione strumentale iniziale	Diluizioni manuali			Campioni diluiti	Campioni ND	Analisi eseguite
		1 1:250	2 1:1000	3 1:5000			
FLC kappa	87	14	5	5	24	-	126
FLC lambda	87	5	2	3	10	3	105
Totale analisi	174	19	14	24	34	3	231

ND, campioni con concentrazione inferiore al limite basso della curva di calibrazione.

Tabella 3

Diluizioni applicate in automatico ai campioni dal turbidimetro Optilite e reattivo Freelite. 1, il campione è sottoposto un'ulteriore diluizione automatica oltre a quella iniziale; 2 il campione è sottoposto 2 diluizioni automatiche oltre a quella iniziale.

Optilite	Diluizioni strumentali				Campioni diluiti/ concentrati	Campioni ND	Analisi eseguite
	Ridotta 1:2	Iniziale 1:10/1:8	1 1:100/1:80	2 1:1000/1:800			
FLC-κ	0	87	14	7	21	-	115
FLC-λ	7	87	2	3	5	-	102
Totale analisi	7	174	16	20	26	0	217

ND, campioni con concentrazione inferiore al limite basso della curva di calibrazione.

(IC 95% 0,91 - 1,08) con un errore sistematico costante, mentre con il grafico di Bland-Altman la media delle differenze è 122,9 (IC 95% -30,1 - 275,9) e il 95% delle differenze tra i due metodi è compreso nell'intervallo tra -1 259,1 e 1 504,9 con un bias non significativo ($p = 0,11$).

Per quanto riguarda rFLC, su 84 dati la regressione di Passing Bablok ha fornito i seguenti risultati: intercetta -0,19 (IC 95% -0,37 - -0,05) e pendenza 1,31 (IC 95% 1,20 - 1,48) evidenziando un errore sistematico costante e proporzionale; con il grafico di Bland-Altman la media delle differenze è -36,0 (IC 95% -76,5 - 4,5) e il 95% delle differenze tra i due metodi è compreso nell'intervallo tra -402,2 e 330,2 con un bias non significativo ($p = 0,08$).

Ad eccezione di quelli relativi a rFLC, tutti i dati sopra indicati espressi in mg/L. Nella Figura 1 sono riportati i grafici della regressione lineare di Passing Bablok e di Bland-Altman.

Concordanza diagnostica

Per la valutazione della concordanza diagnostica si è tenuto conto del solo rapporto rFLC che è il dato di riferimento riportato nelle linee guida per la gestione del paziente con GM. I valori ottenuti sono stati confrontati sia con l'intervallo di normalità di rFLC (0,26-1,65) che con i valori diagnostici per MM (<0,01 e >100). Sono stati valutati tutti gli 87 pazienti, considerando i 3 campioni con FLC lambda non misurabile con Immage 800

patologici e con un rFLC >100. Nel primo caso i campioni concordanti sono stati 80 (92,0%) e 7 (8,0%) quelli discordanti: 5 normali per Immage 800 ma anormali per Optilite (1 <0,26 e 4 >1,65), 2 normali per Optilite ma >1,65 per Immage 800. I campioni coinvolti erano in 4 casi di pazienti con MM sottoposti a trattamento: 1 con tracciato elettroforetico nella norma, 1 con alterazione poco definita in zona gamma, 1 con IgG lambda e 1 con doppia componente monoclonale (CM) IgG kappa e IgG lambda che poteva giustificare la normalizzazione del rapporto; i rimanenti 3 erano pazienti con MGUS (1 IgA lambda, 2 IgG kappa). Nel secondo caso i campioni concordanti sono stati 83 (95,4%) e discordanti 4 (4,6%) di cui 2 compresi tra 0,01 e 100 per Immage 800 ma >100 per Optilite e 2 compresi tra 0,01 e 100 per Optilite ma >100 per Immage 800 (tabella 4). In tutti 4 i casi si trattava di pazienti affetti da MM: 2 MMLC kappa 1 IgG kappa, 1 IgA kappa, cioè mielomi con catena leggera coinvolta di tipo kappa che giustifica che rFLC si posizioni intorno a valori prossimi a 100. In un caso non è stato possibile calcolare rFLC in quanto il valore di FLC lambda per Immage 800 era al di sotto del limite di linearità dello strumento. Solo ai fini grafici (Figura 2), rFLC è stato ugualmente calcolato considerando arbitrariamente un valore di FLC lambda uguale alla metà del limite di misurabilità (2,4 mg/L). In Tabella 5 sono riportati i valori di rFLC dei campioni discordanti ottenuti con Immage 800 e Optilite in relazione alla diagnosi di accompagnamento della richiesta di determinazione FLC e al quadro

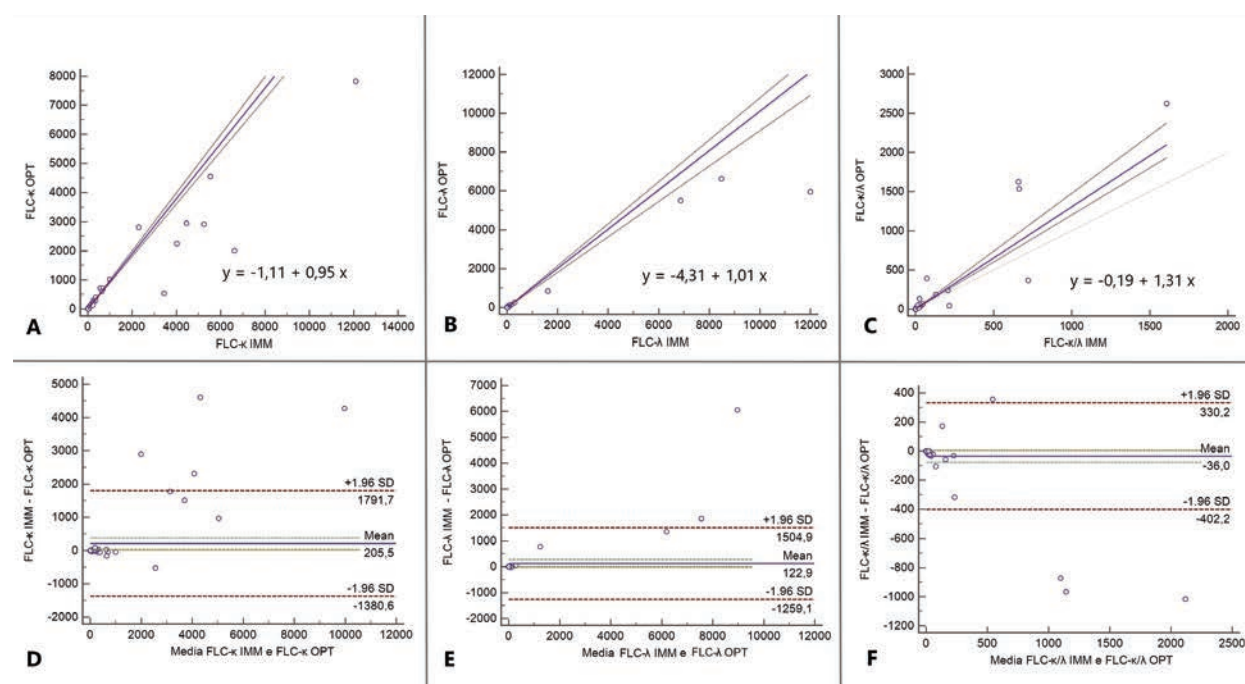


Figura 1

Regressione di Passing-Bablok di Immage 800 versus Optilite. A: FLC-k. B: FLC- λ . C: rFLC. Grafico di Bland-Altman di Immage 800 versus Optilite. D: FLC-k. E: FLC- λ . F: rFLC.

Tabella 4

Tablelle di contingenza per il calcolo della concordanza diagnostica tra i due metodi mediante test Kappa pesato di Cohen (WK) prendendo a riferimento A: l'intervallo di riferimento del rapporto kappa/lambda (rFLC) (0,26-1,65) e B: i valori di rFLC diagnostici per mieloma multiplo (<0,01 - >100)

A					B				
	OPTILITE rFLC				OPTILITE rFLC				
IMMAGE 800 rFLC	<0,26	0,16-1,65	>1,65	Totale	IMMAGE 800 rFLC	<0,01	0,01-100	>100	Totale
<0,26	5	0	0	5	<0,01	4	0	0	4
0,26-1,65	1	37	4	42	0,01-100	0	71	2	73
>1,65	0	2	38	40	>100	0	2	8	10
Totale	6	39	42	87	Totale	4	73	10	87

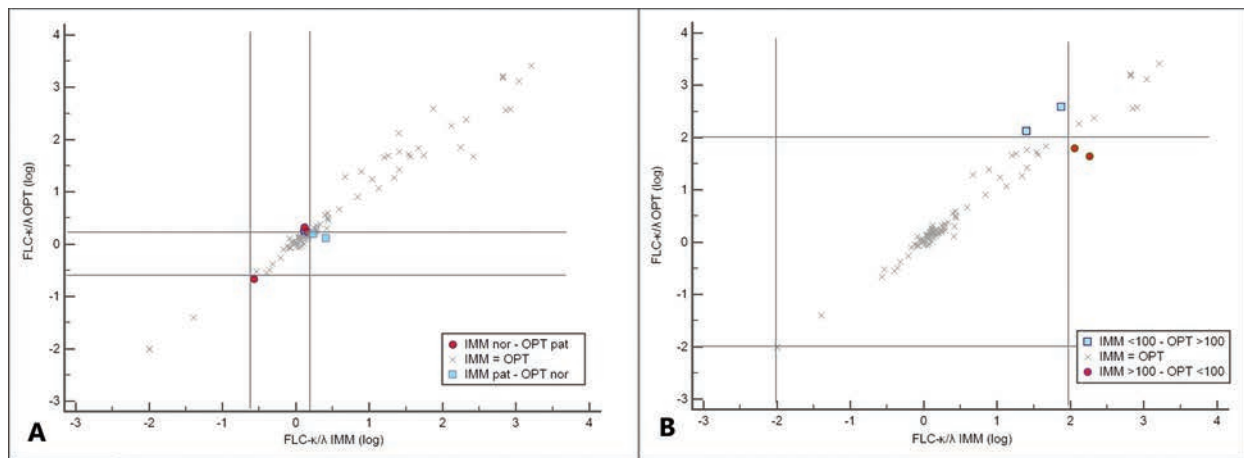


Figura 2

Rappresentazione dei campioni discordanti su un grafico a punti: rFLC Immage 800 vs Optilite in scala logaritmica.

A: IMM nor – OPT pat, campioni con rFLC entro l'intervallo di normalità (0,26 – 1,65) per Immage 800 e non per Optilite; IMM = OPT, campioni con rFLC equivalente per Immage 800 e per Optilite; IMM pat – OPT nor, campioni con rFLC nell'intervallo di normalità per Immage 800 e non per Optilite.

B: IMM <100 – OPT >100, campioni con rFLC <100 su Immage 800 e >100 su Optilite, IMM = OPT campioni con rFLC equivalente per Immage 800 e per Optilite; IMM >100 – OPT <100, campioni con rFLC >100 su Immage 800 e <100 su Optilite.

Tabella 5

Campioni discordanti per il rapporto FLC-κ/λ (rFLC) nell'ambito dell'intervallo di normalità (0,26 – 1,65) e dei valori diagnostici per mieloma multiplo (MM) (<0,01 - >100) confrontati con le diagnosi di accompagnamento della richiesta di determinazione FLC e quadro dell'elettroforesi sierica.

rFLC	Diagnosi	Immage 800	Optilite
Intervallo di normalità (0,26 – 1,65)	MM, ELF nella norma	2,59	1,28
	MM, Alterazione poco definita in zona γ	1,73	1,57
	MM, IgGλ	0,27	0,22
	MM, IgGκ + IgGλ	1,30	1,79
	MGUS, IgGκ	1,44	1,74
	MGUS, IgGκ	1,30	1,87
	MGUS, IgAλ	1,31	2,11
Valori diagnostici di MM (<0,01 - >100)	MMLC-κ	216,35	43,5
	MMLC-κ	73,82	391,06
	MM, IgGκ	NC	50,56
	MM, IgAκ	25,37	131,01

MM, mieloma multiplo, MGUS, gammopatia monoclonale di significato indeterminato; MMLC, mieloma multiplo a catene leggere; ELF tracciato elettroforetico; NC, non calcolabile: il valore di FLC-λ misurato con Immage 800 era inferiore al limite di linearità dello strumento.

dell'elettroforesi sierica, mettendo in evidenza le differenze tra i metodi. In Figura 2 gli stessi dati sono evidenziati in grafici in scala logaritmica, da cui si evince come questi siano prossimi al valore soglia di riferimento potendo rientrare, in alcuni casi, nei limiti della variabilità analitica. Applicando il WK si è rilevata un'eccellente concordanza tra i due metodi sia in riferimento ai valori di normalità (0,26 – 1,65) con un WK = 0,87 (IC 95% 0,78 – 0,96), che per i valori diagnostici per MM (≤ 100 o ≥ 100) con WK = 0,84 (IC 95% 0,69 – 0,99) rispettivamente.

DISCUSSIONE

Nel confronto dei dati ottenuti dai due strumenti applicando la regressione di Passing-Bablok e l'analisi delle differenze di Bland-Altman si evidenzia assenza di errore sistematico ma un bias significativo per FLC kappa, un errore sistematico costante con un bias non significativo per FLC lambda e un errore sistematico proporzionale e costante con un bias non significativo per il rFLC. Questo denota una differenza analitica tra le due piattaforme. Errori anche statisticamente significativi, tuttavia, non necessariamente precludono l'utilizzo di un determinato metodo (11), ma vanno valutati in relazione ad ulteriori parametri.

Nella determinazione delle FLC il dato clinicamente rilevante è rFLC, ed è proprio su questo che si è focalizzata l'attenzione nella valutazione della concordanza diagnostica tra i due strumenti. Applicando il test Kappa pesato di Cohen, la concordanza diagnostica è risultata eccellente sia rispetto all'intervallo di normalità (0,26 – 1,65 mg/L) - importante soprattutto nella valutazione della risposta stringente alla terapia - sia in riferimento ai valori di patologia (FLC-coinvolta/FLC non coinvolta ≥ 100 mg/L) su cui si può basare la diagnosi di MM e la decisione di iniziare la terapia. In entrambi i casi la concordanza diagnostica è risultata eccellente.

I sette campioni non concordanti in relazione all'intervallo di normalità, mostravano tutti dati prossimi al valore soglia di riferimento (0,26 o 1,65). Quattro erano pazienti con MM in trattamento con una buona risposta alla terapia, 3 erano pazienti con MGUS e quindi in una condizione clinica non patologica.

Nel confronto con i limiti diagnostici per MM, i quattro campioni risultati discordanti appartenevano a pazienti con MM per i quali rFLC rilevato, nonostante le differenze analitiche osservate, non modificava il proprio significato clinico essendo comunque fortemente sbilanciato verso la produzione di FLC kappa.

Immagine 800 e Optilite si differenziano per il metodo analitico, per la gestione del campione e soprattutto nel controllo dell'eccesso di antigene. Il primo è un nefelometro a completa gestione manuale, il secondo un turbidimetro corredato di un software per il controllo della fase analitica. In questo studio si evidenzia il ruolo cardine che l'alto livello di automazione strumentale riveste nella gestione di criticità caratteristiche di un

metodo immunochimico, quale la determinazione delle FLC. Nel caso specifico il miglioramento tecnologico presentato dal turbidimetro, determina la semplificazione degli interventi dell'operatore nella fase analitica, limitando così la possibilità d'errore. Consente inoltre di ridurre il numero di repliche per diluizione e quindi di esami effettuati, con positiva ricaduta anche sui costi (14,15). Da non sottovalutare poi, è il più ampio intervallo di misurabilità, in particolare verso il limite inferiore, che consente di ottenere una maggiore percentuale di campioni con un valore determinabile di FLC, dato indispensabile per il monitoraggio del paziente con GM. Infine, una peculiarità del turbidimetro, è quella di essere munito di software in grado di indentificare l'eccesso di antigene che, se non fosse riconosciuto, produrrebbe risultati falsamente negativi con ripercussioni nel percorso diagnostico-clinico del paziente. Il controllo dell'eccesso di antigene e la gestione automatica delle diluizioni del campione, si pone quindi come un valido ausilio per l'operatore sia nella fase analitica che in quella validazione del dato strumentale.

La determinazione delle FLC, imprescindibile nella valutazione del paziente con GM come suggerito dalle linee guida disponibili (3,14), presenta, ad oggi, molte criticità che emergono nei rapporti periodici dei programmi di VEQ quali ad esempio il UK-NEQAS (4,15). I risultati ottenuti dai diversi centri che partecipano al controllo di qualità esterno infatti, sono differenti tra loro a seconda dei sistemi analitici - nefelometri o turbidimetri - e del reattivo utilizzato: anticorpo policlonale o monoclonale.

Diverse sono le problematiche sollevate a questo proposito da molti Autori (10,16-20): la variabilità tra lotti, la sotto o sovrastima della concentrazione di FLC a causa della non linearità della diluizione, il bias determinato dall'impiego di calibratori e reagenti policlonali per misurare FLC monoclonali, la possibilità di incorrere nell'eccesso di antigene, ma più di tutti la carenza di un calibratore universale di riferimento. Tutto questo implica che qualsiasi piattaforma non si possa ritenere intercambiabile con altre, per cui è opportuno che il paziente si riferisca sempre ad uno stesso laboratorio per limitare la variabilità analitica (6).

Nonostante le criticità insite nella determinazione delle FLC, dai dati ottenuti dallo studio emerge una differenza analitica statisticamente rilevabile tra i due strumenti oggetto del confronto che tuttavia non compromette la concordanza diagnostica che risulta molto buona. Il turbidimetro, tuttavia, presenta supporti tecnologici che gli conferiscono caratteristiche analitiche migliori rispetto al nefelometro e di maggiore ausilio all'operatore di laboratorio sia nella fase analitica e che di validazione dei dati prodotti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il personale tecnico del Settore proteine del Laboratorio dell'Ospedale Civile di Baggiovara, AUSL di Modena, senza la cui collaborazione questo

studio non sarebbe stato possibile: Lucia Lezzi, Liliana Taglini, Angela Quagliarella, Valerio Ialonardi, Daniela Zappaterra, Angela Lodesani, Claudia Collini.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Kyle RA, Rajkumar V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:538-48.
- Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17:328-46.
- Jacobs JFM, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1021-30.
- Cigliana G, Gulli F, Napodano C, et al. Serum free light chain quantitative assays: dilemma of a biomarker. *J Clin Lab Anal* 2018;32:1-6.
- Messiaen A-S, De Sloovere MMW, Claus P-E, et al. Performance evaluation of serum free light chain analysis. *Am J Clin Pathol* 2017;147:611-22.
- Carr-Smith HD, Jenner EL, Evans JAR, et al. Analytical issues of serum free light chain assays and the relative performance of polyclonal and monoclonal based reagents. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:997-1003.
- Schneider N, Sablon É, Maquart F-X, et al. Comparative analysis of immunoglobulin free light chains quantification by Freelite™ (The Binding Site) and N Latex FLC (Siemens) methods. *Ann Biol Clin* 2013;71:13-9.
- Tang L, Showell P, Carr-Smith H, et al. Evaluation of F(ab')₂-based latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™II. *Clin Chem* 2000;46:S705-A181.
- Tate J, Mollee P. Towards improved measurement of serum free light chains: clinical and laboratory issues. *Biochim Clin* 2013;37:395-404.
- Vidali M, Tronchin M, Dittadi R. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
- Vidali M, Padoa A, Dittadi R, et al. Protocollo operativo per la verifica della compatibilità dei risultati di laboratorio ottenuti su più procedure analitiche. *Biochim Clin* 2019;43:228-43.
- Hansen CT, Münster AM, Nielsen L, et al. Clinical and preclinical validation of the serum free light chain assay: Identification of the critical difference for optimized clinical use. *Eur J Haematol* 2012;89:458-68.
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:538-48.
- Vercammen M, Meirlaen P, Broodtaerts L, et al. Effect of sample dilution on serum free light chain concentration by immunonephelometric assay. *Clin Chim Acta* 2011;412:1798-804.
- Vercammen MJ, Broodtaerts L, Meirlaen P, et al. Overestimation of free light chain antigen excess rate. *Clin Chim Acta* 2015;444:297-302.
- Bosmann M, Kößler J, Stolz H, et al. Detection of serum free light chains: The problem with antigen excess. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1419-22.
- Jenner E, Levoguer A, Evans J, et al. Serum free light chain immunoassays: A guide to antigen excess detection. *Clin Chim Acta* 2012;413:949.
- Bossuyt X, Delforge M, Reynders M, et al. Antigen excess detection by automated assays for free light chains. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:235-8.
- Graziani MS. Measurement of free light chains - Pros and cons of current methods. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1015-20.

Catene leggere libere nella diagnostica liquorale della sclerosi multipla: possibile alternativa alla ricerca delle bande oligoclonali?

Bruna Lo Sasso¹, Giulia Bivona¹, Caterina Maria Gambino¹, Patrizia Altavilla², Emanuela Maria Pappalardo²,
Giuseppina Candore¹, Marcello Ciaccio^{1,2}

¹Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata, Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare Clinica e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Palermo

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Universitario P. Giaccone, Palermo

ABSTRACT

Free light chains in diagnosis of multiple sclerosis: an alternative to oligoclonal bands?

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common causes of neurological disability in young adults. MS presents heterogeneous clinical manifestations and both genetic and environmental factors are considered involved in the risk of developing the disease. The clinical diagnosis is rather complex reflecting the heterogeneity of the pathology. The diagnostic criteria, frequently modified over the years, require clinical symptoms, presence of typical lesions detected by magnetic resonance imaging and laboratory findings. The laboratory examination of the cerebrospinal fluid (CSF) allows an evaluation of inflammatory processes confined to the central nervous system reflecting the changes in the immunological pattern due to the progression of the pathology, playing thus an important role in the diagnosis and monitoring of MS. The detection of the oligoclonal bands (OCBs) is recognized as a "gold standard" for laboratory diagnosis of MS, although it suffers from methodological limitations. Indeed, OCBs assay is a manual multistep procedure, time-consuming that requires a subjective interpretation. In the last years, the measurement of the free light chains (FLC) in CSF appeared to assist in the diagnosis of MS. This procedure has been presented as a simpler and cheaper tool than the qualitative detection of OCBs. This article examines the current knowledge about the laboratory diagnostic of CSF, investigating both the validated method (OCBs) and the alternative biomarkers of immunoglobulins intrathecal synthesis, as the quantification of FLC in CSF.

INTRODUZIONE

Secondo l'ultima versione dei criteri di McDonald il percorso diagnostico della sclerosi Multipla (SM) si basa su tre elementi: la valutazione di segni clinici, le indagini strumentali ed esami di laboratorio effettuati su una duplice matrice [liquido cefalorachidiano (LCR) e siero]. In particolare, la rilevazione di una sintesi immunoglobulinica intratecale di tipo oligoclonale [ricerca delle bande oligoclonali (BO)] è considerata, ad oggi, il gold standard nel processo diagnostico della SM (1). Tuttavia, il percorso analitico laborioso e, talvolta, di difficile interpretazione delle BO, contestualmente ad un interesse sociale sempre più crescente verso una patologia invalidante come la SM, ha incoraggiato la ricerca di nuovi biomarcatori. La SM è una patologia

autoimmune neurodegenerativa cronica caratterizzata da processi infiammatori a livello del sistema nervoso centrale (SNC) che si manifesta tipicamente in soggetti tra i 20 ed i 50 anni di età, soprattutto di sesso femminile (rapporto di 2:1 femmine-maschi) presentando, tuttavia, una maggiore severità nel sesso maschile (2).

La SM è caratterizzata da uno spettro eterogeneo di sintomi dipendenti dalla localizzazione dei focolai infiammatori che possono interessare tutte le regioni del SNC in cui è presente la mielina (encefalo, nervi ottici e midollo spinale) e da molteplici gradi di severità espressi mediante indici numerici, tra cui lo score ideato da Kurtzke negli anni 80' e denominato "Expanded Disability Status Scale" (EDSS) che valuta i livelli di disabilità dei pazienti con SM (3).

La SM interessa più di 2,5 milioni di persone nel

Corrispondenza a: Marcello Ciaccio, Via del Vespro 129, 90127 Palermo, Tel 09123865701, E-mail marcello.ciaccio@unipa.it

Ricevuto: 09.01.2020

Revisionato: 09.01.2020

Accettato: 21.02.2020

Pubblicato on-line: 15.04.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.027

mondo, con un'incidenza che aumenta con la latitudine, rendendo l'Europa settentrionale una zona ad alto rischio con una prevalenza di 140-250 casi per 100 000 abitanti (4-7). E' ormai noto, infatti, che la distribuzione della malattia nel mondo non è uniforme, manifestandosi in misura maggiore nelle zone lontane dall'Equatore a clima temperato (Nord Europa, Stati Uniti, Nuova Zelanda ed Australia del Sud) ed in misura minore con l'avvicinarsi all'equatore (8). Questa distribuzione peculiare ha fatto ipotizzare un nesso tra l'esposizione ai raggi solari ed un maggior rischio di insorgenza della patologia, coinvolgendo il processo di sintesi della vitamina D, noto per essere correlato alla latitudine. A tal proposito, dati presenti in letteratura hanno messo in luce un filo conduttore tra alcuni polimorfismi genetici nel pathway metabolico della vitamina D, associati ad uno status di ipovitaminosi D, ed un aumento dell'incidenza della SM (9-13). Ulteriori studi sono, peraltro, necessari per comprendere molteplici aspetti a partire dall'eziopatogenesi, ancora oggi, poco conosciuta. E' ben noto, infatti, il verificarsi di un processo di infiltrazione di cellule T e B linfocitarie nel SNC e nel midollo spinale, attraverso la barriera emato-encefalica (BEE). Tale migrazione cellulare media il rilascio di citochine pro-infiammatorie (IFN γ , IL-2, TNF α , IL-17) che, a loro volta, promuovono l'attivazione di popolazioni citotossiche, a cui vanno attribuite le lesioni a carico delle guaine mieliniche. In particolare, le cellule B sembrano essere degli importanti intermediari nei processi di neuroinfiammazione e neurodegenerazione (14-16). A tal proposito, Myhr et al. hanno recentemente evidenziato come una deplezione delle cellule B determini una soppressione dei processi infiammatori osservati in alcune forme cliniche di SM supportando l'ipotesi di un ruolo determinante di tale popolazione cellulare nella patogenesi della SM (17).

Forme cliniche della sclerosi multipla

La SM può presentarsi in differenti forme cliniche che, nella maggior parte dei casi, tracciano una progressione della malattia, diversificandosi sia per la durata e l'intensità di attacchi acuti che in base all'entità, all'estensione del danno e al grado di riparazione. Si possono, infatti, osservare periodi di remissione della malattia seguiti da ricadute, definibili come la comparsa in forma acuta o subacuta di un'anomalia neurologica della durata di almeno 24 ore. Si possono identificare 5 distinti quadri clinici, con una prima manifestazione clinica denominata sindrome clinicamente isolata (Clinically Isolated Syndrome, CIS) e definita da un singolo episodio neurologico della durata di almeno 24 ore. Tuttavia, è bene precisare che non tutti i casi di CIS progrediscono verso una forma di SM clinicamente definita. In ordine di progressione, la forma recidivante-remittente (SM-RR) è la più comune, colpisce l'85% dei pazienti affetti da SM e comporta ricadute seguite da remissione; segue il quadro clinico secondario progressivo (SM-SP), che si sviluppa nel tempo e che progredisce verso la forma progressiva primaria (SM-PP), caratterizzata da un progressivo e continuo deterioramento neurologico (Figura 1). La variabilità clinica della SM giustifica la necessità di individuare nuovi biomarcatori, essenziali per effettuare una diagnosi precoce, per identificare l'evoluzione nelle differenti forme patologiche ed infine per prevedere i tempi di intercorrenza tra una recidiva e l'altra.

CRITERI DIAGNOSTICI

La diagnosi si avvale di parametri inseriti e descritti all'interno dei "Criteri di McDonald" che prendono il nome dall'autore che li propose nel 2001 e che considerano la valutazione dei segni clinici, delle analisi strumentali (Risonanza Magnetica, RM) e degli esami di laboratorio specifici, il percorso più idoneo per la diagnosi e la valutazione dei differenti quadri della SM.

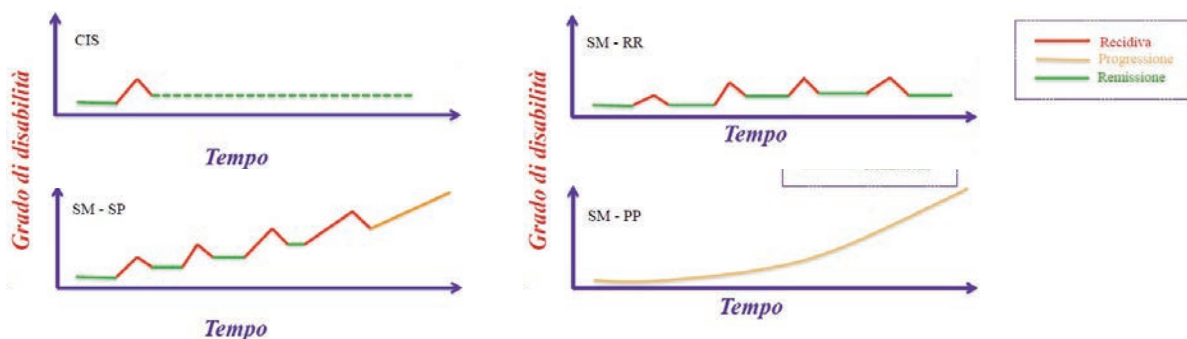


Figura 1
 Forme cliniche della sclerosi multipla in funzione del tempo.
 In ordine di disabilità crescente: CIS, Sindrome clinicamente isolata; SM – RR, Sclerosi multipla a decorso recidivante – remittente; SM – SP, Sclerosi multipla secondariamente progressiva; SM – PP, Sclerosi multipla primariamente progressiva

Dal 2001 tali criteri sono stati verificati nella pratica clinica, validati e progressivamente aggiornati nel corso degli anni (2005, 2010 e 2017), in considerazione della, ancora attuale, difficoltà di identificazione precoce della malattia e di implementazione di nuove metodiche strumentali (Tabella 1) (1, 18, 19). I soggetti affetti da SM presentano condizioni cliniche e sintomi differenti in base alla diversa possibile localizzazione delle lesioni nel SNC. La frequenza dei sintomi può aumentare in relazione alla gravità e alla durata della malattia, anche se in alcuni casi non vi sono chiare correlazioni. Le lesioni possono coinvolgere percorsi sensoriali, visivi, motori e del tronco cerebrale.

I sintomi neurologici più frequenti sono rappresentati da disturbi della sensibilità tattile (intorpidimento, formicolio e pizzicore), astenia, spasticità muscolare, disturbi della coordinazione (atassia e tremore), disturbi del linguaggio (disartria), disturbi della deglutizione (disfagia) e disturbi parossistici. Si manifesta frequentemente, inoltre, un deterioramento cognitivo ed una condizione di depressione causata sia da un depauperamento strutturale del tessuto nervoso, che da un cambiamento radicale della qualità di vita. Ulteriori sintomi sono rappresentati da disturbi visivi, vescicali ed intestinali; meno frequentemente si osservano cefalea, perdita dell'udito e problemi respiratori.

Fin dalla prima versione, i criteri di McDonald (2001) sottolineano la necessità di individuare una "disseminazione" delle lesioni nello spazio e nel tempo (Tabella 1). La disseminazione nello spazio (DIS) è riconducibile alla presenza di una o più lesioni T2 in due o più delle seguenti quattro aree del SNC: area corticale, area giustacorticale, area periventricolare e area infratentoriale.

La disseminazione nel tempo (DIT) è rappresentata dallo sviluppo di nuove lesioni nel SNC in momenti successivi e può essere documentata dall'evidenza simultanea di lesioni amplificate e non amplificate con il gadolinio in qualsiasi momento. La DIT può essere, altresì, documentata o da una nuova lesione T2 o da una lesione amplificata con gadolinio individuata durante un controllo, rispetto ad un riscontro di base. L'identificazione delle DIS e DIT è importante, in quanto, una singola lesione, in un'area del SNC, non è sufficiente per porre diagnosi di SM, come non lo è un singolo episodio della malattia nel tempo. I criteri recentemente aggiornati, sottolineano, altresì, la necessità di differenziare la SM e le sue prime manifestazioni cliniche (forme CIS) da altre patologie, avvalendosi della valutazione dei segni clinici, del riscontro obiettivo della DIS e DIT mediante RM e della diagnostica di laboratorio su siero e LCR (Tabella 1).

Diagnostica di laboratorio

La Medicina di Laboratorio sta vivendo, oggi, una veloce evoluzione alla luce delle enormi potenzialità diagnostiche che i biomarcatori possono fornire in differenti ambiti clinici ed in particolare la diagnostica del LCR grazie alla scoperta di nuovi biomarcatori liquorali

(20-23). Nel campo della SM, il laboratorio clinico riveste un ruolo centrale non solo nella diagnosi ma, anche, nel monitoraggio, mettendo in luce modificazioni del pattern immunologico nel tempo e fornendo informazioni importanti sullo stato immuno-infiammatorio presente a livello del SNC. I criteri diagnostici di McDonalds raccomandano, in particolare, la ricerca delle BO nel LCR e nel siero per comparazione, nei casi in cui:

- i segni clinici e le indagini strumentali (RM) non diano evidenze sufficienti per effettuare una diagnosi di SM;
- nelle forme primariamente progressive (SM-PP) caratterizzate da sintomi atipici;
- nei casi di CIS;
- nelle popolazioni in cui la sclerosi multipla non risulta essere molto frequente, ovvero nei bambini, negli anziani e in etnie non caucasiche (1).

Il gold standard: la ricerca delle bande oligoclonali

La ricerca delle BO rappresenta una valutazione qualitativa e fa riferimento alla sintesi intratecale di immunoglobuline (Ig), in particolare le IgG, come indice di un processo flogistico circoscritto al SNC. La presenza di immunoglobuline nel LCR può derivare da un'alterazione della permeabilità della BEE e, quindi da un passaggio di Ig dal plasma al LCR, o da una sintesi intratecale di IgG da parte dei linfociti B attivati. Differenti funzioni lineari e non lineari (Reiber, indice di Link) che integrano l'albumina nel siero e nel LCR tramite il rapporto delle concentrazioni dell'albumina nel siero e nel liquor, $[Q \text{ albumina} = (\text{Albumina liquor}) / (\text{Albumina siero})]$, rappresentano un indice di funzionalità di barriera. Tale indice permette di quantificare l'aumento selettivo di IgG e distinguere una sintesi intratecale, espressione di attivazione immunitaria del SNC, da un'origine plasmatica. La presenza di immunoglobuline nel LCR è rilevata mediante tecniche di separazione elettroforetica ad alta risoluzione, in particolare l'isoelettrofocalizzazione (IEF), che consente di evidenziare l'oligoclonalità della componente immunoglobulinica, seguita dalla tipizzazione delle eventuali bande rilevate tramite l'immunofissazione IgG-specifica. Siero e LCR devono essere processati in parallelo, nella stessa seduta analitica e alla stessa concentrazione. Un esito positivo sarà evidenziato dalla presenza delle BO nel LCR e assenti nel siero, a dimostrazione di una sintesi intratecale di anticorpi nel SNC. L'approccio qualitativo della ricerca di BO IgG tramite IEF ed immunofissazione IgG-specifica rappresenta, attualmente, il gold standard per il percorso diagnostico di laboratorio della SM (1, 24). Tuttavia, tale indagine presenta complessità metodologiche, essendo una tecnica manuale che si svolge in più fasi con tempi analitici piuttosto lunghi (3-4 ore) e che richiede inoltre la raccolta di un numero di campioni idoneo per avviare le sedute analitiche; la fase post analitica include un percorso interpretativo soggettivo e operatore-dipendente. A tal proposito,

Tabella 1

Confronto tra i criteri di MacDonald: aggiornamenti del 2001, 2005, 2010 e 2017.

Criteri Diagnostici di McDonald 2001		
Presentazione Clinica	Requisiti supplementari per la diagnosi	Criteri di Laboratorio
2 o più attacchi e l'evidenza di 2 o più lesioni	Nessuno*	-
2 o più attacchi e l'evidenza di 1 lesione	DIS dimostrata alla RM.	Oppure positività bande oligoclonali specifiche**.
1 attacco e l'evidenza di 2 o più lesioni	DIT dimostrata alla RM o, clinicamente, un secondo attacco.	-
1 attacco e l'evidenza di 1 lesione	DIS dimostrata alla RM e 2 o più lesioni alla RM compatibili con SM e DIT dimostrata alla RM o, clinicamente, un secondo attacco.	Oppure positività bande oligoclonali specifiche**.
Nessun attacco, nessuna lesione	DIS dimostrata alla RM da 9 o più lesioni cerebrali o 2 o più lesioni midollari o 4-8 lesioni cerebrali e 1 midollare oppure PEV positivi con 4-8 lesioni cerebrali alla RM oppure PEV positivi con meno di 4 lesioni cerebrali più 1 lesione midollare e DIT alla RM o progressione continua per un anno.	Positività bande oligoclonali specifiche**.
Criteri diagnostici di McDonald 2005		
2 o più attacchi e l'evidenza di 2 o più lesioni	Nessuno*	-
2 o più attacchi e l'evidenza di 1 lesione	DIS dimostrata alla RM. Due o più lesioni evidenti alla RM.	Oppure positività bande oligoclonali specifiche**.
1 attacco, evidenze cliniche oggettive ed evidenza di 2 o più lesioni	DIT dimostrata alla RM o, clinicamente, un secondo attacco.	-
1 attacco e l'evidenza clinica oggettiva di 1 lesione (CIS)	DIS dimostrata alla RM e 2 o più lesioni alla RM compatibili con SM e DIT dimostrata alla RM o, clinicamente, un secondo attacco.	Oppure positività bande oligoclonali specifiche**.
Progressione neurologica che suggerisce SM	Un anno di progressione (retrospettivamente o determinato prospettivamente) e Due su tre dei seguenti: - RM positiva (9 o più lesioni cerebrali o 4 o più lesioni midollari con PEV positivi) - RM positiva per lesione midollare (2 lesioni focali).	Positività bande oligoclonali specifiche**.
Criteri diagnostici di McDonald 2010		
2 o più attacchi e l'evidenza di 2 o più lesioni o di una lesione con evidenza attendibile di un precedente attacco	Nessuno*	-
2 o più attacchi e l'evidenza di 1 lesione	DIS dimostrata da 1 o più lesioni in almeno 2 delle 4 regioni tipiche della SM (periventricolare, juxtacorticale, infratentoriale, spinale) oppure attesa di un ulteriore attacco clinico in una differente regione del SNC.	-
1 attacco e l'evidenza di 2 o più lesioni	DIT dimostrata da contemporanea presenza di lesioni asintomatiche oppure 1 o più lesioni riscontrate con RM oppure attesa di un secondo attacco clinico.	-

Tabella 1
Continua

Criteri Diagnostici di McDonald 2010		
Presentazione Clinica	Requisiti supplementari per la diagnosi	Criteri di Laboratorio
1 attacco e l'evidenza clinica obiettiva di 1 lesione (CIS)	- DIS dimostrata da 1 o più lesioni in almeno 2 delle 4 regioni tipiche della SM (periventricolare, juxtacorticale, infratentoriale, spinale) oppure attesa di un ulteriore attacco clinico in una differente regione del SNC - DIT dimostrata da contemporanea presenza di lesioni asintomatiche oppure 1 o più lesioni riscontrate con RM oppure attesa di un secondo attacco clinico.	-
Progressione neurologica nella forma Sclerosi Multipla Primariamente Progressiva	Positività bande oligoclonali specifiche** e/o elevato IgG index.	-
Criteri diagnostici di McDonald 2017		
2 o più attacchi e l'evidenza di 2 o più lesioni	Nessuno*	-
2 o più attacchi e l'evidenza di 1 lesione con evidenze di precedenti attacchi con lesioni in differenti sedi	Nessuno*	-
2 o più attacchi e l'evidenza di 1 lesione	DIS dimostrata da un ulteriore episodio clinico riferito a una lesione localizzata in un'altra area del SNC oppure da un riscontro con RM.	-
1 attacco e l'evidenza di 2 o più lesioni	DIT dimostrata da un ulteriore episodio clinico oppure da un riscontro con RM.	oppure positività bande oligoclonali specifiche**
1 attacco e l'evidenza di 1 lesione	DIS dimostrata da 1 o più lesioni in almeno 2 delle 4 regioni tipiche della SM oppure un ulteriore episodio clinico, riferito a una lesione localizzata in un'altra area del SNC oppure a un riscontro con RM oppure DIT dimostrata da un ulteriore episodio clinico o da un riscontro con RM.	oppure positività bande oligoclonali specifiche**

Secondo l'ultimo aggiornamento dei criteri di McDonald il termine "attacco" è definito come un episodio clinico monofasico con sintomi riferiti dal paziente e segni oggettivi tipici della sclerosi multipla, che riflettono un evento demielinizante infiammatorio focale o multifocale con una durata di almeno 24 ore, con o senza recupero, e in assenza di febbre o infezione.

DIS, disseminazione nello spazio; RM, risonanza magnetica; DIT, disseminazione nel tempo; PEV, potenziali evocati visivi; CIS, sindrome clinicamente isolata; SNC, sistema nervoso centrale.

*Sono sufficienti i soli segni clinici.

** La positività delle bande oligoclonali specifiche è definita dalla presenza di almeno due bande specifiche nel liquor.

recentemente, Hegen et al, hanno approfondito le criticità metodologiche della ricerca delle BO, che, oltre a quelle sopra ricordate, riguardano l'inadeguata adesione ai medesimi protocolli analitici nei diversi laboratori clinici (25). Questi protocolli infatti, possono prevedere l'utilizzo di matrici alternative per la preparazione del gel (agarosio o poliacrilammide a concentrazioni diverse), richiedere volumi di campioni da analizzare non sempre standardizzati, parametri tecnici diversificati in termini di applicazione di voltaggio

o metodi di rivelazione differenti (marcatura con fosfatasi alcalina o perossidasi di rafano) (25). Tutti questi aspetti possono influenzare in maniera considerevole la sensibilità nella rivelazione delle BO. Contestualmente, lo stesso gruppo di ricerca, sottolinea un altro aspetto interessante, ovvero il valore soglia di riferimento per definire la positività delle BO. E' noto che il termine "positività delle BO" si riferisce in genere alla presenza ≥ 2 bande liquorali; tuttavia, è opportuno ricordare come alcuni studi identifichino una positività

considerando un valore ≥ 3 bande liquorali (1, 26-31). Hegen et al affermano, inoltre, che la presenza di una o due bande nel liquor potrebbe indicare una sintesi precoce di IgG che meriterebbe una rivalutazione nel tempo, suggerendo una nuova categoria definita come "possibile sintesi intratecale di IgG" (25). A supporto di ciò, alcuni autori osservano una specificità diagnostica più elevata quando si considerano 3 o più bande oligoclonali, rispetto a quando si considera un valore ≥ 2 (26-32). Oltre alle criticità presentate è opportuno ricordare che altre patologie sono associate ad una positività delle BO (lupus eritematoso sistemico, neurosarcoide, infezione da HIV, sindrome di Sjögren, encefalite erpetica, meningite asettica, sindrome di Morvan). Inoltre, la presenza di BO è evidente nel 4% dei soggetti sani e nel 19% di fratelli di soggetti affetti da SM indicando una specificità non ottimale (24, 33-36).

Biomarcatori emergenti: le catene leggere libere nel liquor

La scoperta negli anni 80' della possibilità di misurare le catene leggere libere di tipo kappa (FLCk) e di tipo lambda (FLCλ) nel LCR ha entusiasmato molti gruppi di ricerca, proponendo una via alternativa alle criticità evidenziate per la ricerca delle BO. E' noto che le cellule B sintetizzano differenti classi di immunoglobuline (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) assemblate mediante la combinazione di 5 classi di catene pesanti (α , δ , ϵ , γ e μ) e di due classi di catene leggere, kappa (k) e lambda (λ). Nel processo di sintesi le catene leggere vengono sintetizzate in quantità maggiore rispetto alle catene pesanti e ciò comporta che, successivamente all'assemblaggio delle immunoglobuline complete, le catene leggere in eccesso vengano rilasciate nei liquidi biologici dove si ritrovano come catene leggere libere. La loro concentrazione fisiologica nel siero è modesta, così come nelle urine (circa <15 mg/L). Contestualmente, diverse evidenze scientifiche hanno documentato la presenza di immunoglobuline complete e FLC nel LCR ed, in particolare, è stata dimostrata la presenza di cellule B nelle lesioni della sostanza bianca dei pazienti con SM, nei follicoli linfoidi ectopici ed una elevata concentrazione di citochine liquorali associate alle cellule B (come ad esempio CXCL13 e BAFF) (14-15). L'interesse scientifico nei confronti delle FLC è stato agevolato da un percorso analitico di quantificazione più snello e veloce rispetto alla ricerca delle BO mediante metodiche di nefelometria/turbidimetria e/o di tecniche immunoenzimatiche (ELISA) (37-42). Differenti indicatori numerici possono essere utilizzati per la valutazione quantitativa della sintesi intratecale delle FLC (43-44). L'indicatore più utilizzato è l'indice FLCk o FLCλ che prevede la misura, nel liquor e nel siero, della catene di interesse (k o λ), il calcolo del loro rapporto

$$[\text{quoziente (Q)}] = (\text{FLC liquor})/(\text{FLC siero})$$

che viene normalizzato con il quoziente per l' albumina

(Qalb). Di seguito le formule utilizzate per entrambe le catene (k o λ) :

$$\text{Indice FLCk} = (\text{FLCk liquor}) / (\text{FLCk siero}) / (\text{Albumina liquor}) / (\text{Albumina siero})$$

$$\text{Indice FLC}\lambda = (\text{FLC}\lambda \text{ liquor}) / (\text{FLC}\lambda \text{ siero}) / (\text{Albumina liquor}) / (\text{Albumina siero})$$

La normalizzazione con il Q albumina è necessaria per minimizzare l'influenza di un'eventuale danno della barriera ematoencefalica.

La maggior parte degli studi sulla diagnostica liquorale della SM ha rivolto un maggior interesse nei confronti delle catene FLCk e, quindi, all'indice FLCk, rispetto alle FLCλ (15-29). Tale scelta è supportata da alcune evidenze scientifiche che hanno verificato aumenti più evidenti delle FLCk nel liquor di soggetti affetti da SM rispetto alle catene FLCλ (15-29-38). Tuttavia, i dati di letteratura non sono del tutto concordi e non validati pienamente per un approccio che, spesso, implica la valutazione esclusiva delle FLCk (34, 40-41). E' noto, altresì, che, in soggetti con malattie neurologiche su base infettiva, l'aumento osservato nei livelli di FLCλ nel LCR è di entità simile, e in alcuni casi maggiore, rispetto ai livelli delle catene FLCk riscontrati nei soggetti affetti da SM. Alla luce di tali evidenze, un aumento delle FLCλ potrebbe essere maggiormente associato ad un processo infettivo ed, in tal senso, essere considerato un marcatore di infezione, piuttosto che un parametro associato alla SM (45).

Un ulteriore spunto di riflessione nasce dallo studio del LCR mediante l'utilizzo della spettroscopia di massa; mediante tale analisi si è osservato che le catene k possono presentarsi sotto forma di monomeri e di dimeri, mentre, le catene λ principalmente sotto forma di dimeri (46). Alla luce di queste informazioni, Ramsden et al. hanno messo in discussione la cinetica delle misure nefelometriche utilizzate per la quantificazione delle FLC, in considerazione del fatto che la velocità di aggregazione anticorpo-antigene è alla base di tale quantificazione, ponendo domande quali: la catena FLCk leggerà un anticorpo o due? Potrebbe il rapporto monomero/dimero influenzare il risultato finale? Queste domande attendono ancora delle risposte ed opportune valutazioni, necessarie altresì, per approfondire il ruolo delle catene FLCλ nelle malattie neurologiche di natura infettiva (47).

E', tuttavia, evidente dalla letteratura attuale che la frazione FLCk nel LCR è maggiormente presente nei pazienti con SM e, per tale motivo, si è ipotizzato possa essere un buon biomarcatore liquorale sia in fase diagnostica che a lungo termine, come marcatore prognostico (48-50). A tal proposito, recentemente Nazarov et al. hanno evidenziato, in una coorte di 92 soggetti affetti da SM, un'associazione significativa tra elevati livelli di FLCk ed un grado di disabilità irreversibile raggiunto più velocemente rispetto ai pazienti che presentavano livelli più bassi, fornendo prospettive di utilizzo delle FLCk come possibile

marcatore di progressione della patologia (51-52). Goffette et al. hanno enfatizzato il potenziale ruolo della ricerca delle FLC nel LCR evidenziando una positività liquorale delle FLC κ nel 54% della popolazione esaminata (33 soggetti affetti da SM) che, ad una valutazione iniziale, risultava negativa, alla ricerca delle BO. Gli autori concludono che la determinazione delle FLC κ nel liquor potrebbe sostituire la ricerca delle IgG oligoclonali (53). Allo stesso modo, studi successivi, hanno messo in evidenza una sensibilità ed una specificità diagnostica delle FLC κ meritevoli di interesse, riconoscendo, in alcuni casi, prestazioni diagnostiche migliori rispetto alla valutazione delle BO (34, 54-55). A sostegno dell'utilizzo delle FLC nella SM, Valencia-Vera et al., recentemente, hanno esaminato le prestazioni analitiche dell'Indice FLC κ in 123 soggetti valutati precedentemente per la ricerca delle BO, identificando dei valori soglia di esclusione e di inclusione della patologia e proponendo la determinazione delle FLC κ , all'interno di un algoritmo diagnostico, come esame di screening per ridurre i possibili candidati sui quali eseguire la ricerca delle BO. L'analisi dei dati ha constatato la rapidità e la semplicità nell'esecuzione della determinazione delle FLC κ rispetto alla ricerca delle BO ma non ha evidenziato una sensibilità ed una specificità diagnostica migliore

rispetto alla valutazione delle BO (56). E' opportuno sottolineare che, i dati presenti in letteratura sono, spesso, discordanti tra di loro, derivano da piccole casistiche ed utilizzano valori soglia differenti; il percorso di valutazione e validazione si può definire, pertanto ancora aperto (Tabella 2) (15, 48, 56-63). Inoltre, è importante ricordare che gli attuali criteri di McDonalds considerano esclusivamente la ricerca delle BO tra i criteri diagnostici, sebbene, riportino alcuni biomarcatori emergenti utili per effettuare una diagnosi differenziale tra un sospetto di SM ed altre patologie demielinizzanti del SNC. Ad esempio le linee guida considerano gli autoanticorpi IgG dell'acquaporina-4 (AQP4) e gli autoanticorpi IgG diretti contro la glicoproteina mielinica oligodendrocitica (MOG-IgG), entrambi utili nei casi in cui il quadro clinico, di imaging o di laboratorio siano atipici per la diagnosi di SM. In particolare, l'anticorpo AQP4 è un biomarcatore specifico per il disturbo dello spettro della neuromielite ottica (Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders, NMOSD). L'anticorpo MOG-IgG è un biomarcatore di encefalomielite associata a MOG (MOG-EM), una malattia demielinizzante relativamente rara caratterizzata da una varietà di manifestazioni che includono neurite ottica recidivante e bilaterale, mielite trasversa, encefalite del tronco cerebrale e

Tabella 2

Sinossi della letteratura attuale nella valutazione e comparazione degli indici di sintesi delle FLC a confronto con le indagini tradizionali

Pubblicazione	Popolazione esaminata	Metodo per la misura di FLC	Indice metrico utilizzato	Valore soglia	Sensibilità	Specificità	Conclusioni
Menendez-Valladares P et al (2019) [rif 63]	234 soggetti con SM e 100 con CIS	Nefelometria	Indice FLC κ	10,62	91%	89%	Un elevato indice FLC κ è associato ad un incremento della probabilità di progressione della forma CIS in SM.
Saez MS et al (2019) [rif 59]	41 soggetti con SM e 36 con CIS	Turbidimetria	kFLC (liquor) λ FLC (liquor) kFLC+ λ FLC BO	7 mg/L / 0,7 mg/L Positive	95% 71% 95% 93%	97% 81% 91% 90,4%	Le kFLC mostrano una elevata sensibilità e specificità come marcatore diagnostico di SM rispetto ai test tradizionali (BO).
Christiansen M et al. (2019) [rif 60]	96 soggetti con SM, 37 con CIS, 66 controlli sintomatici e 31 con altre pat. neurol.	Turbidimetria	kFLC (liquor) λ FLC (liquor) Indice FLC κ Indice FLC λ BO	0,42 mg/L 0,14 mg/L 5,9 2,8 Positive	93,8% 93,8% 92,7% 93,8% 82,3%	85,6% 35,1% 86,6% 46,4% 93,8%	La quantificazione delle kFLC nel liquor e l'Indice FLC κ rappresentano una valida alternativa alle BO. La quantificazione delle λ FLC nel liquor e l'indice FLC λ mostrano una prestazione inferiore.

Tabella 2
Continua

Publicazione	Popolazione esaminata	Metodo per la misura di FLC	Indice metrico utilizzato	Valore soglia	Sensibilità	Specificità	Conclusioni
Gurtner KM et al. (2018) [rif 61]	325 soggetti con richiesta di BO e con differenti patologie demielinizzanti	Nefelometria	kFLC (liquor) λFLC (liquor) Indice FLCκ BO	0,0611 mg/dL 0,0244 mg/dL ≥8,87 Presenza di 4 bande	92,5% 75,8% 88,1% 86,6%	86,1% 84,4% 88,7% 89,6%	Le kFLC nel liquor mostrano delle prestazioni analitiche comparabili alla ricerca delle BO nell'ambito delle malattie demielinizzanti. Le kFLC potrebbero sostituire la ricerca delle BO con una riduzione dei costi, un percorso diagnostico più veloce e automatizzato.
Valencia-Vera E et al. (2018) [rif 56]	122 soggetti consecutivi con richiesta di BO e sospetto di patologie demielinizzanti	Nefelometria	Indice FLCκ BO	<0,92 0,92 - 8,33 >8,33 Positive	97,3% 83,8% 70,2% 89,2%	45,88% 85,8% 95,6% 81,2%	La valutazione preliminare delle kFLC, tramite l'indice FLCκ, potrebbe identificare i campioni di liquor candidati alla ricerca delle BO. Inoltre, un valore soglia >8,33 è altamente suggestivo di SM o presenza di sintesi intratecale.
Bayart JL et al (2018) [rif 62]	83 soggetti con sospetto di patologie infiammatorie del SNC e 59 con SM	Turbidimetria	Indice FLCκ (casi con SM) Indice FLCκ (altre pat. inf. neurol.) Indice FLCλ BO (casi con SM) BO (altre patologie infiammatorie del SNC)	>12,45 >6,29 Non riportato Positive Positive	78% 61,2% 78% 61,2%	77% 100% 79,5% 100%	L'Indice FLCκ non discrimina la SM dalle altre patologie infiammatorie neurologiche, pur rappresentando una tecnica affidabile per identificare un processo infiammatorio intratecale. La quantificazione delle kFLC non sembra poter sostituire le BO ma può essere considerato un esame complementare.
Puthenparampil M et al. (2018) [rif 15]	70 soggetti con SM e 37 soggetti controllo	Nefelometria	kFLC (siero e liquor) λFLC (siero e liquor) Indice FLCκ Indice FLCλ	4,25	93,8%	100%	Le kFLC potrebbero essere dei marcatori promettenti nella diagnosi di SM.
Makshakov et al. (2015) [rif 48]	198 soggetti con sospetto di SM	ELISA	kFLC	0,1 mg/L	92,9%	88,8%	I livelli di kFLC correlano con la progressione della malattia (dalla forma CIS in altre forme di SM)

FLC, catene leggere libere; SM, sclerosi multipla; CIS, sindrome clinicamente isolate; BO, bande oligoclonali.

encefalomielite acuta disseminata (Acute Disseminated Encephalomyelitis, ADEM) (1,64-65).

CONCLUSIONI

La valutazione delle BO nel LCR e nel siero prevede, attualmente, un percorso analitico lungo, articolato ed operatore-dipendente. A sostegno di ciò sono stati riportati in letteratura casi clinici caratterizzati da quadri di BO "dubbi" e/o di non facile interpretazione che non hanno reso possibile un'identificazione clinica precoce di SM, accertata, successivamente, dall'evidenza di un valore di indice FLCK elevato (66).

D'altra parte i dati di letteratura sull'utilizzo delle FLC non forniscono risultati concordi nè, al momento attuale, sono stati proposti valori soglia unici e condivisi ed, inoltre, le linee guida attuali non prevedono altro tipo di determinazione e/o biomarcatore utile nella diagnosi della SM al di fuori della ricerca delle BO.

Alla luce di quanto riportato, è plausibile ritenere che, un singolo biomarcatore non sia in grado di fornire tutte le informazioni utili a comprendere una patologia multifattoriale e articolata come la SM. Tuttavia, l'integrazione tra la semeiotica clinica, le indagini strumentali e l'utilizzo di algoritmi diagnostici integrati come, ad esempio, un indice, opportunamente validato e standardizzato, di sintesi intratecale di FLC (indice FLCK, o FLCA, o entrambi), unitamente alla ricerca delle BO nel liquor e nel siero in casi specifici, rappresentano uno strumento utile per guidare verso una diagnosi certa e precoce di SM, al fine di elaborare un piano terapeutico ottimale portando a compimento un progetto di intervento globale che migliori la qualità e l'aspettativa di vita del paziente.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018;17:162-73.
- Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, et al. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 2015;127:1-22.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444-52.
- Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 2013; doi: 10.1186/1471-2377-13-128.
- Heydarpour P, Khoshkish S, Abtahi S, et al. Multiple sclerosis epidemiology in Middle East and North Africa: A systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 2015;44:232-44.
- Ahlgren C, Odén A, Lycke J. High nationwide incidence of multiple sclerosis in Sweden. *PloS ONE* 2014; 9:e108599.
- Jiang X, Olsson T, Alfredsson L. Age at menarche and risk of multiple sclerosis: Current progress from epidemiological investigations. *Front Immunol* 2018; 9:2600.
- Pirttialo AL, Soilu-Hänninen M, Sipilä JOT. Multiple sclerosis epidemiology in Finland: Regional differences and high incidence. *Acta Neurol Scand* 2018;. doi: 10.1111/ane.13057.
- 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* 2017;55:183-92.
- Bivona G, Agnello L, Ciaccio M. Vitamin D and immunomodulation: Is it to change the reference values? *Ann Clin Lab Sci* 2017;47:508-10.
- Bivona G, Agnello L, Pivetti A, et al. Association between hypovitaminosis D and systemic sclerosis: True or fake? *Clin Chim Acta* 2016;458:115-9.
- Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 2016;37:261-7.
- Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, et al. A new role of CYP2R1 in multiple sclerosis. *Biochim Clin* 2018;42:294-9.
- Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68S22-31, S43-54,.
- Puthenparampil M, Altinier S, Stropparo E, et al. Intrathecal k free light chain synthesis in multiple sclerosis at clinical onset associates with local IgG production and improves the diagnostic value of cerebrospinal fluid examination. *Mult Scler Relat Disord* 2018;25:241-5.
- Lisak RP, Benjamins JA, Nedelkoska L, et al. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol.* 2012;246:85-95.
- Myhr KM, Torkildsen Ø, Lossius A, et al. B cell depletion in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* 2019;11:1-11.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Neurol* 2005;58:840-6.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
- Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2016;15:673-84.
- Agnello L, Bivona G, Novo G, et al. Heart-type fatty acid binding protein is a sensitive biomarker for early AMI detection in troponin negative patients: a pilot study. *Scand J Clin Lab Invest* 2017;77:428-32.
- Agnello L, Bellia C, Di Gangi M, et al. Utility of serum procalcitonin and C-reactive protein in severity assessment of community-acquired pneumonia in children. *Clin Biochem* 2016;49:47-50.
- Vivona N, Bivona G, Noto D, et al. C-reactive protein but not soluble CD40 ligand and homocysteine is associated to common atherosclerotic risk factors in a cohort of coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2009;42:1713-8.
- Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902.
- Hegen H, Zinganell A, Auer M, et al. The clinical significance of single or double bands in cerebrospinal fluid isoelectric focusing. A retrospective study and

- systematic review. *PLoS One* 2019;14:e0215410.
26. McLean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications. *Brain* 1990;113:1269-89.
 27. Hegen H, Auer M, Zeileis A, et al. Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:285-92.
 28. Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Am J Clin Pathol* 2003;120:672-5.
 29. Zeman D, Hradilek P, Kušnierová P, et al. Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2015;159:104-13.
 30. Gama PDD, Machado LDR, Livramento JA, et al. Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67:1017-22.
 31. Dias-Carneiro RPC, Glehn von F, Moraes AS, et al. MRZH reaction increases sensitivity for intrathecal IgG synthesis in IgG oligoclonal band negative multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2016;300:30-5.
 32. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, et al. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Front Immunol* 2019;10:726.
 33. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2012;122:1180-8.
 34. Hassan-Smith G, Durant L, Tsentemidou A, et al. High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014;276:175-9.
 35. Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *Am J Clin Pathol* 2003;120:672-5.
 36. Olek MJ. Diagnosis of multiple sclerosis in adults. In: Francisco González-Scarano M, editor. *Diagnosis of multiple sclerosis in adults*. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc., 2017.
 37. Ramsden DB. Multiple sclerosis: assay of free immunoglobulin light chains. *Ann Clin Biochem* 2017;54:5-13.
 38. Senel M, Tumani H, Lauda F, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PLoS One* 2014;9:1-7.
 39. Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, et al. Diagnostic and prognostic value of the cerebrospinal fluid concentration of immunoglobulin free light chains in clinically isolated syndrome with conversion to multiple sclerosis. *PLoS One* 2015;10:e0143375.
 40. Fischer C, Arneth B, Koehler J, et al. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. *Clin Chem* 2004;50:1809-13.
 41. Duranti F, Pieri M, Centonze D, et al. Determination of kFLC and k Index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunol* 2013;263:116-20.
 42. Presslauer S, Milosavljevic D, Brucke T, et al. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 255:1508-14.
 43. Zeman D, Kusnierova P, Bartos V, et al. Quantitation of free light chains in the cerebrospinal fluid reliably predicts their intrathecal synthesis. *Ann Clin Biochem* 2016;53: 174-6.
 44. Desplat-je'go S, Feuillet L, Pelletier J, et al. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry. *J Clin Immunol* 2005;25:338-45.
 45. Bernardi G, Cataldo I. La determinazione delle catene leggere libere nel liquido cefalorachidiano: l'esperienza di due laboratori Italiani. *Biochim Clin* 2013;37:389-94.
 46. Kaplan B, Golderman S, Yahalom G, et al. Free light chain monomer-dimer patterns in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Immunol Methods* 2013;390:74-80.
 47. Ramsden DB. Multiple sclerosis: assay of free immunoglobulin light chains. *Ann Clin Biochem* 2017;54:5-13.
 48. Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, et al. Diagnostic and prognostic value of the cerebrospinal fluid concentration of immunoglobulin free light chains in clinically isolated syndrome with conversion to multiple sclerosis. *PLoS One* 2015;10:e0143375.
 49. Pieri M, Storto M, Pignalosa S, et al. KFLC Index utility in multiple sclerosis diagnosis: further confirmation. *J Neuroimmunol* 2017;309:31-3.
 50. Voortman MM, Stojakovic T, Pirpamer L, et al. Prognostic value of free light chains lambda and kappa in early multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017;23:1496-505.
 51. Nazarov VD, Makshakov GS, Kalinin I, et al. Concentrations of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid predict increased level of brain atrophy in multiple sclerosis. *Immunol Res* 2018;66:761-7.
 52. Nazarov VD, Makshakov GS, Mazing AV, et al. The role of assay of free immunoglobulin light chains in the diagnosis of the onset of multiple sclerosis. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S S Korsakova.* 2017;117:60-5.
 53. Goffette S, Schlupe M, Henry H, et al. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:308-10.
 54. Presslauer S, Milosavljevic D, Hubl W, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a multicenter study. *Mult Scler* 2015;22:502-10.
 55. Bernardi BC, Duranti F, Pieri M, et al. Determination of kFLC and k Index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunol* 2013;263:116-20.
 56. Valencia-Vera E, Martinez-Escribano Garcia-Ripoll A, Enguix A et al. Application of κ free light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker in multiple sclerosis diagnosis: development of a diagnosis algorithm. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:609-13.
 57. Hegen H, Auer M, Zeileis A, et al. Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:285-92.
 58. Haghighi S, Andersen O, Rosengren L, et al. Incidence of CSF abnormalities in siblings of multiple sclerosis patients and unrelated controls. *J Neurol* 2000;247:616-22.
 59. Sáez MS, Rojas JI, Lorenzón MV, et al. Validation of CSF free light chain in diagnosis and prognosis of multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: prospective cohort study in Buenos Aires. *J Neurol* 2019;266:112-8.
 60. Christiansen M, Gjelstrup MC, Stilund M, et al. Cerebrospinal fluid free kappa light chains and kappa index perform equal to oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:210-20.
 61. Gurtner KM, Shosha E, Bryant SC, et al. CSF free light chain identification of demyelinating disease: comparison

- with oligoclonal banding and other CSF indexes. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1071-80.
62. Bayart JL, Muls N, van Pesch V. Free Kappa light chains in neuroinflammatory disorders: Complement rather than substitute? *Acta Neurol Scand.* 2018;138:352-8.
 63. Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Adorna Martínez M, et al. Validation and meta-analysis of kappa index biomarker in multiple sclerosis diagnosis. *Autoimmun Rev* 2019;18:43-9.
 64. Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, et al. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology* 2014;82:474-81.
 65. Waters P, Woodhall M, O'Connor KC, et al. MOG cell-based assay detects non-MS patients with inflammatory neurologic disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2:e89.
 66. Lopergolo D, Scribano D, Dell'Abate MT et al. La misura delle catene leggere libere nel liquor nella diagnosi della sclerosi. *Biochim. Clin* 2018;42:e22-e25.

Proposta di un protocollo per la gestione degli approfondimenti in ambito coagulativo nel percorso preoperatorio

Sonia Luzi, Lucia De Valentin, Roberta Turrini, Lavinia Dumitrescu, Serena Bonaguro, Lorena Zardo
Laboratorio Analisi - Ospedale S. Giacomo, Castelfranco Veneto (Treviso) – ULSS2 Marca Trevigiana

ABSTRACT

Proposal for a protocol aimed to investigate the alterations of the coagulation tests in patients undergoing surgical procedures.

A hemostatic assessment is usually included in the evaluation of patients undergoing surgical procedures. The aim of this work is to present a protocol shared with the Intensive Care, Hematology and Clinical Laboratory Units of the San Giacomo Hospital (Castelfranco Veneto, Treviso, Italy) to investigate the causes of the prolonged coagulation tests in these patients. In case of altered coagulation screening tests, a form is filled in with the pertinent anamnestic information and sent to the laboratory together with an adequate amount of blood. Following a pre-defined algorithm, the clinical laboratory performs the second level tests. The most relevant one for the purpose is the mixing test that permits an easy identification of the appropriate subsequent tests. The results of these tests allow clinicians to take the appropriate decisions. In case of a negative bleeding anamnesis, and/or in presence of a factor XII deficiency or a lupus anticoagulant positive test, the patient undergoes the surgical intervention; in other cases, the hematologist carefully evaluates the hemorrhagic risk of the specific patient.

In 2017, the protocol was applied to 37 cases of prolonged PT/APTT. In 8% of the patients the alteration was not confirmed, in 11% of cases the investigations could not identify the cause of the alterations. In the remaining 81% of cases, the identification of the specific coagulative defect was possible.

The application of this protocol can achieve a number of benefits: it reduces the number of accesses to the hospital for the patients, only the appropriate tests are performed on the basis of reflex testing procedures, the clinician is provided with all the relevant tests at one time with no need to request the tests one after another. The value of the mixing test in this clinical scenario is confirmed.

INTRODUZIONE

La valutazione del rischio emorragico individuale prima di un intervento chirurgico include di norma la determinazione del tempo di protrombina (PT), del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) e il conteggio delle piastrine. La determinazione dell'APTT consente di individuare le anomalie della via intrinseca, mentre quella del PT verifica la presenza di alterazioni della via estrinseca; entrambi gli esami consentono di indagare la via comune. La suddivisione della cascata della coagulazione nelle vie intrinseca, estrinseca e comune ha una scarsa validità in vivo, ma rappresenta un'utile categorizzazione concettuale per interpretare i risultati delle indagini di laboratorio. Il riscontro di un

allungamento non noto in precedenza del PT e/o dell'APTT in fase preoperatoria, impone di indagare se il paziente abbia o meno un rischio emorragico (1-3). L'attivazione del percorso di approfondimento, spesso molto articolato, include il richiamo del paziente, ulteriori esami di laboratorio e visite specialistiche che possono portare ad un allungamento dei tempi di attesa, ritardando l'intervento e aumentando lo stress per il paziente e per i famigliari. I tempi per indagare in laboratorio il rischio emorragico del paziente possono allungarsi anche in seguito a richieste incomplete o non appropriate di esami specialistici di coagulazione.

In realtà, lo studio delle alterazioni di PT e APTT può essere semplificato se viene seguito uno schema ordinato di valutazione e se il percorso viene gestito da

Corrispondenza a: Sonia Luzi, Via dei Carpani 16/z, 31033 Castelfranco Veneto (TV), Tel 3393020356, E-mail sonia.luzi@aulss2.veneto.it

Ricevuto: 24.09.2019

Revisionato: 25.11.2019

Accettato: 13.12.2019

Pubblicato on-line: 06.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.013

personale esperto.

A tal proposito, all'interno dell'Ospedale S. Giacomo di Castelfranco Veneto (Treviso), è stato messo a punto un protocollo di gestione dello screening preoperatorio degli esami di coagulazione all'interno del quale il personale specialista del Laboratorio Analisi e i Clinici di riferimento (anestesista ed ematologo) gestiscono in maniera concordata il percorso diagnostico e clinico del paziente. Questo percorso consente di ridurre il numero di accessi del paziente, di ottimizzare le risorse e di evitare l'esecuzione di esami inutili. Scopo di questo lavoro è la descrizione e presentazione del protocollo.

DESCRIZIONE DEL PROTOCOLLO

Il protocollo concordato prevede che il paziente venga richiamato per confermare i risultati ottenuti al primo riscontro, per escludere interferenze e/o errori preanalitici e per proseguire (se è il caso) con accertamenti ulteriori. Il reparto preleva in un'unica seduta tre campioni in sodio citrato che assicurano un volume necessario di sangue per gestire tutti gli eventuali approfondimenti e compila una scheda anamnestica del paziente contenente l'indicazione dell'anagrafica, i valori del primo riscontro degli esami coagulativi di base, eventuali terapie anticoagulanti in corso, riferiti episodi emorragici e/o patologie coagulative note (Figura 1). Il materiale raccolto presso l'Unità Operativa di Preospitalizzazione viene recapitato al laboratorio analisi con il primo trasporto utile e comunque entro 4 ore dal prelievo (4). Il laboratorio, prima di attivare il percorso diagnostico, esclude la presenza di interferenti e/o anticoagulanti attraverso la valutazione della scheda anamnestica, in quanto la presenza nel campione di anticoagulanti può alterare i risultati degli esami di laboratorio. I campioni sono presi in carico e processati iniziando dalla determinazione degli esami di base per confermare o meno la prima anomalia riscontrata. Se i valori di PT e/o APTT risultano all'interno dell'intervallo di riferimento, il percorso diagnostico viene concluso e il reparto procede con la programmazione dell'intervento, in quanto, con grande probabilità, l'alterazione era dovuta ad una problematica preanalitica. Al contrario, se i valori di PT e/o APTT si mantengono allungati, si procede con l'esecuzione del test di miscela con uno dei campioni raccolti; gli altri campioni vengono direttamente centrifugati [l'aliquota per il lupus anticoagulant (LAC) viene centrifugata due volte] e conservati a -20°C per ulteriori eventuali approfondimenti (5). Il test di miscela è il punto cardine del percorso per decidere gli esami di approfondimento e permette di orientare lo specialista verso lo studio di difetti fattoriali o di inibitori.

Il test di miscela

Questo test consiste nel miscelare il plasma del paziente con un'uguale quantità di un pool di plasma normale (NPP) per poi rieseguire l'esame di base (PT o APTT) e valutare se è avvenuta o meno la correzione

dell'alterazione presente nel plasma paziente. L'aggiunta del pool normale introduce una quantità di fattori (circa il 50%) che dovrebbe essere sufficiente a correggere i valori di PT e APTT. La capacità o meno della miscela di correggere i tempi di coagulazione può essere valutata attraverso diverse modalità quali formule o valori di riferimento. La modalità utilizzata è il calcolo dell'indice di Rosner (Index of Circulating Anticoagulant, ICA), valore ottenuto da una formula che rapporta la differenza fra il tempo della miscela e del NPP, al tempo del paziente

$$[(Tempo\ miscela\ 1:1 - Tempo\ NPP)/Tempo\ paziente] \times 100$$

Se l'indice ottenuto è <10% si assume che il pool aggiunto sia sufficiente a correggere la miscela, se >15% si assume che non corregga, se nell'intervallo 10-15%, il risultato del test viene considerato dubbio e quindi non dirimente (6,7).

Il test di miscela viene eseguito al tempo zero e dopo incubazione a 37°C per 2 ore in bagno termostato per valutare la presenza di eventuali inibitori ad azione lenta e/o temperatura dipendenti.

Prima di eseguire un test di miscela è opportuno:

- escludere che l'allungamento del tempo di coagulazione sia legato all'effetto di una terapia anticoagulante;
- escludere la presenza di una diagnosi già nota che comporti l'allungamento del tempo del test di screening riscontrato;
- raccogliere le notizie clinico-anamnestiche del paziente.

Queste informazioni sono contenute nella scheda inviata al laboratorio.

La non correzione nella miscela al tempo zero o dopo incubazione è suggestiva della presenza di un inibitore specifico o aspecifico in quanto questo andrà ad inibire anche i fattori presenti nel NPP. Normalmente un inibitore aspecifico come il LAC non corregge l'APTT già nella miscela al tempo zero, mentre la maggior parte degli inibitori fattore-specifici agiscono lentamente e/o a temperature fisiologiche quindi la loro attività si manifesta solo nel test di miscela eseguito dopo incubazione e termostatazione (8,9). Se la miscela corregge sia prima che dopo incubazione, questo è suggestivo del difetto di un fattore in quanto l'aggiunta dei fattori contenuti nel NPP sopperisce al difetto di fattore presente nel plasma paziente (10,11).

L'algoritmo applicato in relazione all'esito del test di miscela, con l'aggiunta dei test di approfondimento appropriati, è descritto in Figura 2. In presenza del solo PT allungato, con test di miscela che corregge, si procede con la determinazione dei fattori della via estrinseca/comune (FVII, FII, FV, FX) la cui carenza è evidenziata dal test del PT. Analogamente, in presenza del solo APTT allungato, con test di miscela che corregge prima e dopo incubazione, si procede con la determinazione dei fattori della via intrinseca (FVIII, FIX, FXI, FXII) e del fattore di von Willebrand, la cui carenza

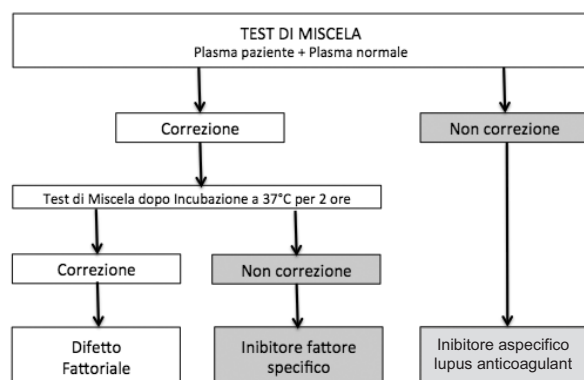


Figura 2

Algoritmo per l'interpretazione del test di miscela

può essere evidenziata dal test dell'APTT. Un APTT allungato, con test di miscela che non corregge al tempo zero, suggerisce la presenza di inibitori aspecifici (non tempo/temperatura dipendenti), e fa attivare la procedura di ricerca del LAC (12-15). Un APTT allungato, con test di miscela che corregge nel test di miscela al tempo zero e non corregge dopo incubazione, suggerisce la presenza di inibitori specifici tempo/temperatura dipendenti, e fa attivare la determinazione dei fattori della via intrinseca per individuare il fattore inibito e successivamente determinare l'inibitore fornendo il risultato in Unità Bethesda (16,17).

A fronte di un allungamento sia di PT che di APTT, con test di miscela che corregge entrambi gli esami, si procede con la determinazione dei fattori della via estrinseca/comune (FVII, FII, FV, FX) per l'individuazione del fattore carente.

Potrebbe tuttavia coesistere più di una anomalia ed essere presenti interferenti che rompono il perfetto schema sopra riportato, pertanto lo specialista di laboratorio ed il clinico devono sempre essere in contatto continuo perché molto spesso la clinica del paziente indirizza già verso un sospetto diagnostico.

ESPERIENZA PRELIMINARE

Il protocollo concordato con l'Unità Operativa di Preospedalizzazione, è stato applicato a 37 pazienti in attesa di intervento chirurgico, provenienti dal reparto di Preospedalizzazione dell'ospedale di Montebelluna nel 2017, 19 femmine e 18 maschi dai 3 agli 82 anni, di cui 18 in età pediatrica (3-12 anni), 13 in età compresa fra 15 e 58 anni e 6 con età compresa fra 68 e 82 anni. I pazienti presentavano allungamenti di PT (intervallo: 1,29-1,47 ratio; v.r. 0,9-1,2) o APTT (intervallo: 1,24 - 2,33 ratio, v.r. 1,82-1,19) o, di entrambi i parametri (PT 1,33 ratio e APTT 1,22 ratio; un solo paziente). Gli esami sono stati eseguiti su strumentazione automatica della ditta Werfen, Barcellona, Spagna, (ACL TOP500 e ACL

TOP700), utilizzando reattivi della stessa ditta (18-21). Le prestazioni dei metodi impiegati rispondono ai requisiti di precisione ed accuratezza definiti dai programmi di Controllo di Qualità Interno ed Esterno a cui il laboratorio partecipa. Oltre alle determinazioni indicate, viene effettuato anche il test di miscela basato su determinazioni di PT/APTT (22) (vedi paragrafo dedicato).

Il pool di plasma normale utilizzato nel test di miscela viene preparato da plasmi di pazienti aventi gli esami di coagulazione di base all'interno dei valori di riferimento. Il pool viene conservato a -80°C in aliquote sufficienti per una seduta analitica (5).

I risultati ottenuti durante questa esperienza sono presentati in tabella 1. Nell'81% dei 37 pazienti studiati, applicando la metodologia descritta, si è riusciti ad individuare la causa della alterazione degli esami di base, potendo così indirizzare il paziente verso il percorso più adatto alla sua condizione clinica. In alcuni casi (8%) non c'è stata una conferma dell'allungamento, e non sono stati quindi necessari ulteriori approfondimenti; nel rimanente 11% dei casi non si è riusciti a trovare la causa dell'allungamento e la sola clinica ha orientato il percorso del paziente (Tabella 1).

CONSIDERAZIONI FINALI

La valutazione del rischio emorragico è inclusa nella valutazione dei pazienti che devono essere sottoposti ad intervento chirurgico. La disomogeneità degli interlocutori coinvolti nel processo (laboratorio clinico, ematologia, anestesia, area di emergenza) rende problematico un approccio standard a tale valutazione; per questo motivo la stesura di un protocollo condiviso e la compilazione di un modulo pure condiviso consente di avere sempre a disposizione le informazioni necessarie, facilitando il percorso.

Sul versante del laboratorio clinico, il test di miscela si è rivelato particolarmente importante per l'identificazione veloce delle cause delle anomalie degli esami di base. Questo test infatti è una procedura analitica che consente di identificare rapidamente il motivo di un allungamento non noto di uno o entrambi i test di screening (PT e APTT) in assenza di terapia anticoagulante (eparine, antagonisti della vitamina K o anticoagulanti ad azione diretta) o di una diagnosi precedente che lo motivi (positività al LAC, malattia di von Willebrand, emofilia, epatopatia) (23). Si assume che PT e APTT risultino normali quando siano presenti livelli di almeno il 50% dei fattori interessati. Con il test di miscela si va a valutare se la miscela 1:1 del campione in esame con un pool normale corregge l'alterazione del test di screening dal momento che un livello del 50% di un fattore è sufficiente a riportare nella norma il test alterato.

Il test di miscela è una procedura utilizzabile in situazioni di urgenza per dirimere la causa di un allungamento inatteso ed indirizzare il clinico nella valutazione del rischio emorragico del paziente ed è anche una procedura utilizzabile in routine per definire

Tabella 1*Tipologia e frequenza delle anomalie riscontrate*

N pazienti	PT ratio	APTT ratio	Difetto riscontrato	%	
26	10	normale	1,25-1,42	FXII	27%
	1	normale	1,32	FIX	3%
	2	normale	1,27-1,50	VWF	5%
	9	normale	1,27-2,33	LAC	24%
	4	normale	1,24-1,39	nessuno	11%
7	1,29-1,47	normale	FVII	19%	
1	1,30	1,22	FV e FVII	3%	
3	normale	normale	esami di II livello, non eseguiti	8%	

PT, tempo di protrombina; APTT, tempo di tromboplastina parziale attivato; FXII, fattore XII; FIX, fattore IX; VWF, fattore di von Willebrand; LAC, lupus anticoagulant; FVII, fattore VII.

gli approfondimenti necessari allo studio della causa di un allungamento degli esami di base, ottimizzando tempi e risorse, effettuando i test in maniera appropriata.

L'interpretazione della correzione è un punto cruciale del test di miscela per la prosecuzione degli approfondimenti ma non sempre è facile da eseguire, richiede molta esperienza e flessibilità di applicazione delle diverse procedure esistenti (16)(6).

Una prima modalità interpretativa è di ritenere presente la correzione quando il risultato dell'APTT (e/o PT) della miscela rientra all'interno dei valori di riferimento prestabiliti; invece, quando il risultato dell'APTT (e/o PT) rimane al di fuori di limiti di riferimento, si parla di mancata correzione (non correzione). Una seconda modalità di interpretazione, invece, prevede un calcolo matematico impostato su formule, per esempio l'indice di Rosner utilizzato in questo lavoro.

In conclusione, l'applicazione del protocollo proposto consente la determinazione del difetto coagulativo nei pazienti che devono essere sottoposti ad interventi in elezione di chirurgia minore o maggiore con un percorso razionale che sfrutta le competenze delle Unità Operative coinvolte. Il Reparto di Anestesia e Rianimazione si occupa di coordinare i percorsi preoperatori individuando i pazienti potenzialmente a rischio emorragico; il Reparto di Ematologia esegue le consulenze sulla base dei risultati dei test coagulativi di primo e secondo livello e il Laboratorio Analisi, si occupa di gestire il percorso diagnostico, identificando gli esami più adeguati da eseguire. Inoltre questo percorso consente di prevedere meno accessi per il paziente, due o al massimo tre se la consulenza ematologica si rende

necessaria. Vengono raccolti in un'unica soluzione tutti i prelievi necessari per la conferma dell'alterazione e l'esecuzione dei test indispensabili alla definizione del difetto coagulativo. Questo è particolarmente importante nella gestione dei pazienti pediatrici nei quali la diminuzione dello stress legato agli accessi multipli (che arrivavano fino a 5 nel percorso preoperatorio tradizionale) migliora significativamente il benessere del bambino che deve sottoporsi all'intervento e dei suoi familiari.

Di tutte le anomalie riscontrate, il 30% erano degne di significato da un punto di vista di rischio emorragico mentre negli altri casi si è trattato o di presenza di LAC (con eventuale effetto trombotico) o di difetti, quali la carenza di FXII, che non causano sanguinamenti. La determinazione del tipo di difetto è utile all'ematologo per valutare il rischio emorragico e decidere se il paziente può direttamente sottoporsi all'intervento oppure se necessita di una visita ematologica più approfondita.

Infine, una corretta esecuzione degli approfondimenti, oltre ad escludere o confermare il rischio emorragico nella circostanza specifica, è utile per il paziente in quanto fornisce una documentazione della causa della anomalia degli esami di base che, in caso di future emergenze, evita allungamenti nei tempi di intervento consentendo azioni terapeutiche o chirurgiche immediate.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tagariello G, Radossi P, Castaman G, et al. Clinical relevance of isolated APTT prolongation in a cohort of adult patients undergoing surgical procedures. *Blood Transfus* 2011;15:557-61.
2. Toso A, Castaman G, Plug I, et al. Prospective evaluation of the clinical utility of quantitative bleeding severity assessment in patients referred for hemostatic evaluation. *J Thromb Haemost* 2011;9:1143-8.
3. Kershaw G, Orellana D. Mixing Tests: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin times. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:283-90.
4. Benedetto M, Barbara M, Daniela C, et al. per il Gruppo di Studio Emostasi. La variabilità preanalitica in coagulazione. *Biochim Clin* 2019;43:313-26.
5. Documenti CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays, approved guidelines, 5th ed. CLSI document H21-A5. CLSI Wayne, PA, 2008.
6. Chang S H, Tillema V, Scherr D A "Percent Correction" formula for evaluation of mixing studies. *Am J Clin Pathol* 2002;117:62-73.
7. Devreese KMJ. Interpretation of normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *Thrombosis Research* 2007;119:369-76.
8. Associazione Italiana Centri Emofilia (AICE). Diagnosi e trattamento degli inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione. Raccomandazioni AICE 2014. <https://aiceonline.org/?p=9827> (ultimo accesso: novembre 2019).
9. Rosner E, Pazner R, Lusky A, et al. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb and Haemost* 1987;57:144-7.
10. World Federation of Hemophilia (WFH). Guidelines for the Management of Hemophilia. 2nd edition (2012). <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1472.pdf> (ultimo accesso: novembre 2019).
11. Wagenman BL, Townsend KT, Mathew P, et al. The laboratory approach to inherited and acquired coagulation factor deficiencies. *Clin Lab Med* 2009;29:229-52.
12. Tripodi A. Laboratory testing for lupus anticoagulants diagnostic criteria and use of screening, mixing, and confirmatory studies. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:373-9.
13. Hong S K, Hwang SM, Kim JE, et al. Clinical significance of the mixing test in laboratory diagnoses of lupus anticoagulant: the fate of the mixing test in integrated lupus anticoagulant test systems. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:739-44.
14. Thom J, Ivey L, Eikelboom J. Normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2003;1:2689-91.
15. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Official communication of the SSC, Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *JThromb Haemost* 2009;7:1737-40.
16. Akkawat B, Rojnuckarin PA. Modified mixing test with a proposed cutoff value to screen for clotting factor inhibitors. *J Hematol Transfus Med*. 2014;24:137-43.
17. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995;73:247-51.
18. Tripodi A. To mix or not to mix in lupus anticoagulant testing? That is the question. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:385-9.
19. Fritsma GA, Dembitzer FD, Randhawa A, et al. Recommendations for appropriate activated partial thromboplastin time reagent selection and utilization. *Am J Clin Pathol* 2012;137:904-8.
20. Saxena R, Kannan M, Choudhry VP. Laboratory studies in coagulation disorders. *Indian J Pediatr* 2007;74:649-55.
21. Documenti CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory testing for the lupus anticoagulant; approved guideline. CLSI H60-A. CLSI Wayne, PA, 2014.
22. Ohsaka A, Ishii K, Yamamoto T, et al. Automated mixing studies and pattern recognition for the laboratory diagnosis of a prolonged activated partial thromboplastin time using an automated coagulation analyzer. *Thrombosis Research* 2011;128:86-91.
23. Morelli B, Ascari E. Il laboratorio e i nuovi anticoagulanti orali. *Biochim Clin* 2013;37:292-300.

Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica Parte III: diagnostica molecolare

Federica Di Maggio^{1,2}, Francesca Borrillo^{1,2}, Federica Cariatì^{3,4}, Rossella Tomaiuolo^{1,2,4}, Valeria D'Argenio^{1,5}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Via G. Salvatore 486, Napoli

²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II

³Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II

⁴KronosDNA s.r.l., spin-off accademico dell'Università Federico II di Napoli

⁵San Raffaele Open University, Roma

ABSTRACT

Glossary of molecular biology and clinical molecular biology. Part III: molecular diagnostics.

This document is the third and last section of a glossary on molecular biology. In particular, the main categories of the currently available molecular diagnostic procedures, and the related terminology, will be described herein. Based on the availability of more and more sensitive and standardized technologies for the study of DNA/RNA alterations, molecular diagnostic tests are now widely diffused in clinical laboratories, and commonly offered to patients and their families.

Aiming to support less experienced readers, the terms related to the main molecular diagnostic procedures and tests are included in this third part of the glossary. For each term the corresponding English version is reported (see also the complete list, both in Italian and in English alphabetical order, reported in the Appendix). In addition, for some of the terms, a link to articles already published in *Biochimica Clinica*, where they have been used, is reported.

INTRODUZIONE

Il recente avanzamento tecnologico ha coinvolto anche il settore della ricerca biomedica portando allo sviluppo e alla standardizzazione di nuove metodiche in grado di identificare, con elevata risoluzione ed accuratezza, alterazioni molecolari. Pertanto, negli ultimi anni, la diagnostica molecolare ha ricevuto un notevole impulso propulsivo grazie alla possibilità di offrire nuovi test caratterizzati da elevata sensibilità diagnostica e tempi di esecuzione brevi, rispetto alle metodiche tradizionalmente in uso (1). La diffusione su larga scala di indagini di diagnostica molecolare ne ha, di conseguenza, aumentato la rilevanza all'interno della medicina di laboratorio con un numero crescente di pubblicazioni che riportano esempi di sviluppo, validazione e/o confronto di metodiche di diagnostica molecolare. Tuttavia, gli articoli che riportano questi studi includono alcuni termini tecnici che, seguendo l'evoluzione tecnologica, diventano sempre più specifici;

pertanto, dopo la pubblicazione delle prime due sezioni del glossario, relative rispettivamente ai termini di base di biologia molecolare (2) ed alla rassegna delle principali metodiche di biologia molecolare attualmente in uso (3), si procede in questa terza ed ultima sezione alla descrizione delle principali indagini di diagnostica molecolare attualmente disponibili.

Allo scopo di fornire un rapido riferimento per la diagnostica molecolare saranno di seguito descritti i termini maggiormente utilizzati. Inoltre, per ciascun termine è indicato il nome corrispondente in lingua inglese (vedi anche l'elenco in ordine alfabetico riportato in Appendice) e, dove disponibile, è riportato un link a lavori pubblicati su *Biochimica Clinica* negli ultimi anni, in modo da fornire un riscontro concreto.

ALBERO GENEALOGICO (PEDIGREE)

L'albero genealogico è una rappresentazione grafica utilizzata per indicare i rapporti di parentela tra

Corrispondenza a: Valeria D'Argenio, Tel 081 3737909, E-mail dargenio@ceinge.unina.it

Ricevuto: 27.02.2020

Revisionato: 16.04.2020

Accettato: 19.04.2020

Publicato on-line: 18.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2019.043

individui appartenenti ad una famiglia in modo da fornire un'immediata visione di tali rapporti, che unitamente all'anamnesi familiare, permettono di seguire l'ereditarietà di un determinato carattere all'interno della famiglia stessa. La costruzione di un albero genealogico è un momento fondamentale in fase di consulenza genetica (vedi) e utilizza dei simboli convenzionali per indicare il genere, lo stato di vita/morte e i rapporti di parentela intercorrenti tra i vari individui.

AMNIOCENTESI (AMNIOCENTESIS)

È una tecnica invasiva che permette la raccolta di materiale biologico di origine fetale e che viene utilizzata in combinazione con esami biochimici e/o molecolari, per ottenere una diagnosi prenatale (4). L'amniocentesi, da effettuare generalmente o tra la 16°-18° settimana di gestazione o dopo la 25° settimana, secondo stima ecografica, consiste nel prelievo di un campione di liquido amniotico, mediante una puntura transaddominale eseguita sotto controllo ecografico. Il liquido amniotico raccolto viene sottoposto a successive analisi di laboratorio; la componente corpuscolata (cellulare) può essere utilizzata per eseguire indagini genetiche, generalmente finalizzate ad evidenziare eventuali anomalie a carico della struttura o del numero dei cromosomi (aneuploidie) attraverso l'analisi del cariotipo (3), mentre la componente non corpuscolata può essere utilizzata per misurare eventuali marcatori biochimici.

ANALISI MOLECOLARE DIRETTA (DIRECT TEST)

Con questa definizione si intendono tutte le metodiche di biologia molecolare finalizzate all'identificazione di mutazioni, note o non note, direttamente nel probando (vedi). L'analisi molecolare diretta, pertanto, fornisce informazioni relative unicamente all'individuo analizzato.

ANALISI MOLECOLARE INDIRETTA (INDIRECT TEST)

Analisi di un pannello di biomarcatori (generalmente polimorfismi di sequenza o di lunghezza) all'interno di una famiglia per verificarne la segregazione rispetto al fenotipo malato (5). In questo modo, è possibile valutare la probabilità che un probando (vedi) possa aver ereditato l'allele correlato alla variante mutata. Presupposto essenziale è che i polimorfismi selezionati per l'analisi siano informativi (cioè distinguibili all'interno dell'albero genealogico) e che siano ereditati insieme alla mutazione causativa, ossia siano in "linkage" (2); i test indiretti vengono pertanto anche denominati "analisi di linkage". Inoltre, a differenza delle analisi molecolari dirette, in questo

caso è necessario analizzare più membri della stessa famiglia.

BIOPSIA LIQUIDA (LIQUID BIOPSY)

Il termine indica l'impiego di fluidi biologici come alternativa del tessuto tumorale per fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta alla terapia con specifici farmaci antitumorali. Attualmente, il principale tipo di biopsia liquida impiegato nella pratica clinica consiste nell'analisi del DNA tumorale circolante (ctDNA) che può essere isolato dal sangue periferico. Rispetto alla biopsia tradizionale, la biopsia liquida è una procedura non invasiva e può essere ripetuta nel tempo per monitorare l'evoluzione della malattia. Tuttavia, considerata la scarsa quantità di ctDNA, sono possibili falsi negativi.

(Raccomandazioni per l'esecuzione di indagini molecolari su biopsia liquida in oncologia. Documento intersocietario di AIOM, SIF, SIAPEC, SIBioC. Biochim Clin 2019;43:106-14)

CONSULENZA GENETICA (GENETIC COUNSELING)

Processo attraverso cui i pazienti o i consanguinei di un paziente, affetto da una malattia genetica o a rischio per una malattia che può essere di origine genetica, ricevono informazioni sulla malattia in questione, in particolare sulla probabilità di svilupparla e/o di trasmetterla, sulle conseguenze, e sulle opzioni di prevenzione e/o terapia. Si tratta, dunque, di un atto mirato alla specifica malattia genetica in questione, con lo scopo di: fornire informazioni sulla diagnosi, la prognosi e il trattamento; illustrare il meccanismo di ereditarietà e/o il rischio per gli altri membri della famiglia; fornire informazioni relativamente alle opzioni riproduttive in merito al rischio di trasmissione della malattia alla prole.

In particolare, una consulenza genetica si definisce di primo livello o pre-test quando ha lo scopo di chiarire le modalità, i vantaggi ed i limiti di un'indagine genetica che sarebbe indicato eseguire nel probando (vedi) in base all'anamnesi personale e/o familiare. Si definisce, invece, di secondo livello o post-test una consulenza genetica che ha lo scopo, in presenza di un'indagine molecolare già effettuata, di studiare un caso clinico e la famiglia, valutando anche la necessità di estendere la stessa indagine ad altri membri dell'albero genealogico (vedi).

DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO (PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS - PGD)

Questa diagnosi genetica include una serie di procedure diagnostiche finalizzate all'identificazione di alterazioni cromosomiche e/o a carico di specifici

geni in embrioni prodotti in un ciclo di procreazione medicalmente assistita (PMA) (6).

È importante sottolineare, quindi, che questa indagine è indicata in presenza di coppie a rischio di trasmissione di patologie genetiche ereditarie già accertate e presenti nella famiglia e che scelgono di sottoporsi a procedure di PMA in modo da ottenere la diagnosi prima dell'impianto ed evitare successive interruzioni di gravidanza.

La PGD sfrutta la combinazione di tecniche di fecondazione assistita e di biologia molecolare: i pazienti iniziano un trattamento di PMA che prevede generalmente il prelievo di ovociti con successiva iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Una volta avvenuta la fecondazione in vitro, dagli embrioni ai primi stadi di sviluppo si preleveranno una o due cellule, il cui DNA sarà analizzato in maniera specifica in relazione al tipo di patologia genetica da diagnosticare. L'embrione che risulterà non affetto dalla patologia genetica esaminata, verrà infine trasferito in utero.

Il termine PGD è stato recentemente affiancato dalla dizione test genetici preimpianto (PGT) (vedi).

DIAGNOSI MOLECOLARE (MOLECULAR DIAGNOSIS)

Identificazione di alterazioni a carico di DNA, RNA, proteine o metaboliti, responsabili dell'insorgenza di specifiche patologie, o indicative della prognosi o della risposta a specifiche terapie. In base alla finalità, all'età del probando (vedi) ed al tipo di informazioni che è possibile ottenere, si distinguono diverse tipologie di diagnosi molecolare (vedi definizioni successive).

DIAGNOSI MOLECOLARE ANTENATALE (ANTENATAL MOLECULAR DIAGNOSIS)

Insieme di procedure diagnostiche finalizzate all'identificazione di alterazioni cromosomiche e/o a carico di specifici geni in epoca antenatale (4). In questa categoria rientrano, pertanto, la diagnosi genetica preimpianto e la diagnosi prenatale (vedi).

DIAGNOSI MOLECOLARE POSTNATALE (POSTNATAL MOLECULAR DIAGNOSIS)

Insieme di procedure diagnostiche finalizzate all'identificazione di alterazioni cromosomiche e/o a carico di specifici geni in epoca postnatale. In base alla finalità ed al tipo di informazioni che è possibile ottenere, si distinguono diverse tipologie di test (diagnostico, predittivo, di screening) descritti di seguito in dettaglio (vedi definizioni).

DIAGNOSI PRENATALE (PRENATAL DIAGNOSIS)

La diagnosi prenatale ha lo scopo di monitorare alcuni aspetti dello stato di salute del feto durante la gravidanza, dalle prime fasi dello sviluppo embrionale fino ai momenti che precedono il parto (4).

Tutte le indagini prenatali disponibili (vedi test non invasivi e test invasivi) permettono di identificare ed individuare precocemente solo alcune malattie o condizioni patologiche ed è importante che ogni coppia scelga con consapevolezza se sottoporvisi, o meno.

I principali obiettivi della diagnosi prenatale consistono nel fornire informazioni alle coppie e, in caso di rischio elevato di malattie congenite, nell'informarle dell'esistenza di analisi mirate per l'accertamento della presenza di specifiche anomalie del DNA, di alterazioni dei cromosomi, malattie infettive contratte in gravidanza, come la rosolia o la toxoplasmosi, o dell'assunzione di farmaci che possono indurre malformazioni fetali.

DIAGNOSTICA MOLECOLARE (MOLECULAR DIAGNOSTICS)

È l'impiego di tecniche di biologia molecolare per identificare alterazioni a carico di DNA, RNA, proteine o metaboliti, responsabili dell'insorgenza di specifiche patologie, o indicative della prognosi o della risposta a specifiche terapie.

ESPRESSIVITÀ VARIABILE (VARIABLE EXPRESSION)

Diversa severità clinica di un fenotipo-malattia a parità di genotipo.

MALATTIA GENETICA (GENETIC DISEASE)

Rientrano in questa categoria le patologie dovute ad alterazioni del genotipo, incluse alterazioni cromosomiche o mutazioni a carico di specifici geni.

MALATTIA MITOCONDRIALE (MITOCHONDRIAL DISEASE)

Malattie genetiche (vedi) dovute alla presenza di mutazioni patogenetiche nel genoma mitocondriale.

MALATTIA MONOGENICA (MONOGENIC DISEASE)

Malattie genetiche (vedi) dovute alla presenza di una o più mutazioni patogenetiche in specifici geni-malattia che sono generalmente ereditate e trasmesse in base alle leggi dell'ereditarietà di Mendel.

MALATTIA POLIGENICA (POLIGENIC DISEASE)

Patologie dovute all'effetto combinato di più mutazioni in diversi geni, ciascuno a bassa/media penetranza (vedi) e fattori di rischio ambientali.

PENETRANZA (PENETRANCE)

Frequenza con cui un allele si manifesta fenotipicamente. La penetranza si definisce completa se tutti gli individui portatori di un allele dominante hanno il fenotipo corrispondente. Si ha, invece, una penetranza incompleta se solo una parte degli individui portatori di un determinato allele dominante manifesta il fenotipo corrispondente.

PORTATORE (CARRIER)

Individuo che ha una mutazione/variante genetica in uno dei due alleli (2) di un gene-malattia. Un portatore, pertanto, risulta fenotipicamente sano ma può trasmettere la mutazione alla progenie e la probabilità di avere un figlio affetto dipenderanno dallo stato (portatore/sano/malato) del partner.

PROBANDO (PROBAND)

Il primo individuo di una famiglia sottoposto ad un'indagine molecolare. Pertanto, è dal probando che, generalmente, si parte per la costruzione di un albero genealogico (vedi).

SCREENING GENETICO PREIMPIANTO (PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING - PGS)

Metodica di diagnostica molecolare antenatale (vedi) che permette di valutare l'eventuale presenza di alterazioni cromosomiche (ad esempio aneuploidie) in embrioni ottenuti con tecniche di PMA al fine di: aumentare la probabilità di una gravidanza a termine; ridurre il rischio di aborti; ridurre il rischio di trasferire embrioni portatori di alterazioni cromosomiche (6).

SCREENING NEONATALE (NEONATAL SCREENING)

Lo screening neonatale è un test effettuato a tutti i nuovi nati al fine di diagnosticare tempestivamente alcune malattie congenite per le quali l'inizio precoce di interventi terapeutici/riabilitativi influenza significativamente la prognosi. Il test viene effettuato su gocce di sangue tramite puntura del tallone del neonato nei primi giorni di vita.

(Un effettivo vantaggio dello screening neonatale allargato Biochim Clin 2019;43:e12-e16)

SENSIBILITÀ DIAGNOSTICA (DIAGNOSTIC SENSITIVITY)

La sensibilità diagnostica di un test genetico è la capacità dello stesso di identificare tra i soggetti analizzati quelli realmente malati, ossia affetti dalla patologia in esame. Un test viene definito sensibile, pertanto, quando è positivo in presenza della patologia e il rischio di falsi negativi è basso.

SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA (DIAGNOSTIC SPECIFICITY)

La specificità diagnostica è la capacità di identificare tra i soggetti analizzati i sani rispetto alla patologia che ci si propone di studiare. Un test viene definito specifico quando è negativo in assenza della patologia e il rischio di ritrovare falsi positivi è basso.

TEST DI FARMACOGENETICA (PHARMACOGENETIC TEST)

I test farmacogenetici studiano la risposta individuale ad un determinato farmaco, analizzandone sia l'efficacia sia la probabilità di effetti avversi.

TEST DI PATERNITÀ (PATERNITY TEST)

Indagine molecolare effettuata per accertare la paternità di un individuo; si basa sul principio che ogni individuo eredita il 50% del proprio patrimonio genetico dal padre ed il rimanente 50% dalla madre. Confrontando le caratteristiche genetiche del figlio oggetto dell'indagine con quelle della madre e del presunto padre è possibile confermare o escludere la paternità.

TEST GENETICI PREIMPIANTO (PREIMPLANTATION GENETIC TEST- PGT)

In questa definizione rientrano tutti le indagini di diagnostica molecolare eseguite su DNA di embrioni per la tipizzazione HLA o per determinare la presenza di specifiche anomalie genetiche o di alterazioni cromosomiche. Queste indagini si rivolgono a coppie a rischio di trasmissione di alterazioni cromosomiche o malattie monogeniche in quanto, grazie ad essi, è possibile esaminare il corredo genetico e/o cromosomico dell'embrione ancor prima della gravidanza, trasferendo nell'utero materno gli embrioni privi delle malattie genetiche ereditarie o alterazioni cromosomiche evidenziate. Nello specifico, ci si riferisce a: PGT-A, per la ricerca di aneuploidie; PGT-SR, per i riarrangiamenti strutturali cromosomici; PGT-M, per i difetti monogenici.

TEST MOLECOLARE DEL PORTATORE (CARRIER TEST)

Viene richiesto per determinare lo stato di portatore per una o più patologie recessive in individui clinicamente sani. È indicato in individui appartenenti a famiglie con patologie genetiche recessive o in coppie che desiderino valutare la probabilità di trasmissione di eventuali malattie genetiche alla prole.

TEST MOLECOLARE DIAGNOSTICO (MOLECULAR DIAGNOSTIC TEST)

Ha lo scopo di confermare o escludere la presenza di una patologia genetica in un probando.

TEST MOLECOLARE DI SCREENING (MOLECULAR SCREENING TEST)

Indagini eseguite al fine di individuare in maniera precoce una patologia genetica per la quale la tempestività del trattamento è fondamentale per la prognosi; pertanto, a seconda dell'esigenza specifica, vengono effettuati a tappeto sull'intera popolazione o in gruppi di individui selezionati e considerati a rischio.

TEST MOLECOLARE PREDITTIVO (MOLECULAR PREDICTIVE TEST)

Si effettuano in individui non sintomatici al momento dell'esecuzione, ma con anamnesi familiare positiva per una patologia genetica. In questa categoria rientrano: i test presintomatici, ossia effettuati per verificare la presenza di mutazioni responsabili di malattie ad esordio tardivo ma per le quali la presenza di mutazione corrisponde alla presenza di malattia; i test di predisposizione, ossia effettuati per verificare la presenza di mutazioni responsabili di un aumentato rischio di specifiche patologie e per le quali, pertanto, la presenza di mutazione non corrisponde necessariamente alla presenza di malattia.

TEST PRENATALE NON INVASIVO (NON INVASIVE PRENATAL TEST - NIPT)

Questa indagine, analizzando il DNA fetale libero circolante isolato da un campione di sangue materno a partire dalla decima settimana di gravidanza, valuta la presenza di aneuploidie fetali (più comunemente relative ai cromosomi 21, 18, 13 ed ai cromosomi sessuali X e Y). Il test prevede anche l'opzione di un approfondimento diagnostico di secondo livello, che consente di individuare la presenza nel feto di alterazioni cromosomiche strutturali ed alcune comuni sindromi da microdelezione/microduplicazione.

VILLOCENTESI (VILLOCENTESIS)

La villocentesi, o prelievo dei villi coriali, è una procedura invasiva che permette di ottenere materiale biologico fetale tra la 11° e 13° settimana di gravidanza da utilizzare per analisi molecolari prenatali (4).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Cariati F, D'Argenio V, Tomaiuolo R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med* 2019;17:267.
2. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte I: termini generali. *Biochim Clin* 2019;43:90-105.
3. 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;43:435-8.
4. Cariati F, D'Argenio V, Tomaiuolo R. Innovative technologies for diagnosis and screening of genetic diseases in antenatal age. *J Lab Precis Med* 2020;5:6.
5. 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.
6. D'Argenio V, Nunziato M, D'Uonno N, et al. Indications and limitations for preimplantation genetic diagnosis. *Biochim Clin* 2017;41:314-21.

APPENDICE

Indice analitico dei termini riportati nel glossario elencati in ordine alfabetico in base alla lingua italiana (colonna di sinistra). Si riporta anche la corrispondente traduzione in inglese (colonna di destra).

Italiano	Inglese	Inglese	Italiano
Albero genealogico	Pedigree	Amniocentesis	Amniocentesi
Amniocentesi	Amniocentesis	Antenatal molecular diagnosis	Diagnosi molecolare antenatale
Analisi molecolare diretta	Direct test	Carrier	Portatore
Analisi molecolare indiretta	Indirect test	Carrier test	Test molecolare del portatore
Biopsia liquida	Liquid biopsy	Diagnostic sensitivity	Sensibilità diagnostica
Consulenza genetica	Genetic counseling	Diagnostic specificity	Specificità diagnostica
Diagnosi genetica preimpianto - PGD	Preimplantation genetic diagnosis - PGD	Direct test	Analisi molecolare diretta
Diagnosi molecolare	Molecular diagnosis	Genetic counseling	Consulenza genetica
Diagnosi molecolare antenatale	Antenatal molecular diagnosis	Genetic disease	Malattia genetica
Diagnosi molecolare postnatale	Postnatal molecular diagnosis	Indirect test	Analisi molecolare indiretta
Diagnosi prenatale	Prenatal diagnosis	Liquid biopsy	Biopsia liquida
Diagnostica molecolare	Molecular diagnostics	Mitochondrial disease	Malattia mitocondriale
Espressività variabile	Variable expression	Molecular diagnosis	Diagnosi molecolare
Malattia genetica	Genetic disease	Molecular diagnostic test	Test molecolare diagnostico
Malattia mitocondriale	Mitochondrial disease	Molecular diagnostics	Diagnostica molecolare
Malattia monogenica	Monogenic disease	Molecular predictive test	Test molecolare predittivo
Malattia poligenica	Poligenic disease	Molecular screening test	Test molecolare di screening
Penetranza	Penetrance	Monogenic disease	Malattia monogenica
Portatore	Carrier	Neonatal screening	Screening neonatale
Probando	Proband	Non invasive prenatal test - NIPT	Test prenatale non invasivo - NIPT
Screening genetico preimpianto - PGS	Preimplantation genetic screening - PGS	Paternity test	Test di paternità
Screening neonatale	Neonatal screening	Pedigree	Albero genealogico
Sensibilità diagnostica	Diagnostic sensitivity	Penetrance	Penetranza
Specificità diagnostica	Diagnostic specificity	Pharmacogenetic test	Test di farmacogenetica
Test di farmacogenetica	Pharmacogenetic test	Poligenic disease	Malattia poligenica
Test di paternità	Paternity test	Postnatal molecular diagnosis	Diagnosi molecolare postnatale
Test genetici preimpianto - PGT	Preimplantation genetic test - PGT	Preimplantation genetic diagnosis - PGD	Diagnosi genetica preimpianto - PGD
Test molecolare del portatore	Carrier test	Preimplantation genetic screening - PGS	Screening genetico preimpianto - PGS
Test molecolare diagnostico	Molecular diagnostic test	Preimplantation genetic test - PGT	Test genetici preimpianto - PGT
Test molecolare di screening	Molecular screening test	Prenatal diagnosis	Diagnosi prenatale
Test molecolare predittivo	Molecular predictive test	Proband	Probando
Test prenatale non invasivo - NIPT	Non invasive prenatal test - NIPT	Variable expression	Espressività variabile
Villocentesi	Villocentesis	Villocentesis	Villocentesi

Raccomandazioni per la rilevazione e la gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici

Davide Farci Santarcangeli¹, Marzia Careno², Maria Loredana Frassanito³, Davide Giavarina⁴, Giuseppe Lippi⁵, Annalisa Modenese⁶, Benedetto Morelli⁷, Ernesto Trabuio⁸, Roberto Vettori⁹, Graziella Bonetti¹⁰ per il Gruppo di Studio SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica del Dato di Laboratorio

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, IRCCS MultiMedica, Milano

²Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Bolognini di Seriate, ASST Bergamo Est

³Laboratorio Analisi Lifebrain, Guidonia, Roma

⁴Medicina di Laboratorio, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza

⁵Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona

⁶Laboratorio Analisi, Istituto Clinico Città Studi - Milano

⁷Laboratorio Analisi Synlab, Castenedolo, Brescia

⁸Laboratorio Analisi, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza

⁹Laboratorio Analisi, Centro di Riferimento Oncologico di Aviano, Pordenone

¹⁰Laboratorio Analisi, Ospedale di Esine, ASST Valcamonica

ABSTRACT

Recommendations for the detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories.

A large body of evidence supports that quality improvement efforts tailored to the analytical phase only, are less likely to generate further clinical and economical progresses. Actually, most diagnostic errors made within the laboratory diagnostics emerge in the extra-analytical domains of testing, especially within the preanalytical phase. It is now clear that the underlying causes are most frequently due to system errors or to the implementation of poorly standardized procedures for collection, handling, transportation, preparation and storage of biospecimens. Some of these problems could generate a number of issues related to the quality of clinical samples, ending up with the reception by the laboratory of unsuitable samples. The identification and the management of unsuitable samples represent thus unavoidable practices in clinical laboratories to guarantee the quality of test results throughout the total testing process. Due to the ongoing evolution of the in vitro diagnostic market and the availability of new evidence, this paper provides a revision of the national recommendations issued by the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology in 2007 for detection and practical management of unsuitable specimens in clinical laboratories.

INTRODUZIONE

Interventi mirati a migliorare la fase analitica del processo diagnostico (implementazione di nuove e più accurate tecniche diagnostiche, attuazione di specifici programmi di valutazione interna ed esterna di qualità), hanno consentito sostanziali progressi nella qualità dei risultati di laboratorio. Poiché la maggior parte degli errori scaturisce dalle fasi extra-analitiche del processo diagnostico (soprattutto nella fase preanalitica), il gruppo di studio "Variabilità Extra-Analitica del Dato di

Laboratorio" (GdS-VEA) di SIBioC ha ritenuto opportuno predisporre un intervento atto a limitare le incertezze in quest'ambito, con lo scopo di uniformare e armonizzare contestualmente i comportamenti dei differenti servizi di medicina di laboratorio nazionali.

Il GdS-VEA già nel 2007 aveva prodotto una prima raccomandazione sulla gestione delle Non Conformità (NC) relative ai campioni non idonei (1). A distanza di oltre 10 anni, il GdS propone una revisione e un aggiornamento di tali raccomandazioni, definite sempre attraverso il metodo delle conferenze di consenso.

Corrispondenza a: Davide Farci Santarcangeli, E-mail davide.santarcangeli@gmail.com

Ricevuto: 07.10.2019

Accettato: 19.11.2019

Publicato on-line: 20.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.009

Questo approccio, originariamente ideato dal National Institute of Health (NIH), consta nella stesura di raccomandazioni da parte di un gruppo di esperti che, in seguito a una conferenza di consenso, sintetizzano le conoscenze scientifiche su uno specifico argomento (2, 3).

L'analisi critica della letteratura, condotta preliminarmente dal comitato promotore, consente il confronto tra prove disponibili e pareri o relazioni degli esperti. La scelta è in linea con le indicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (4), che prevedono di utilizzare questo approccio per la stesura di raccomandazioni quando il tema da trattare sia limitato e possa essere suddiviso in pochi quesiti principali o sia controverso (per esempio non siano disponibili linee-guida o raccomandazioni di consenso definitive, in ambito sia nazionale sia internazionale, al momento dell'emanazione del documento).

Sulla fase preanalitica, a parte qualche raccomandazione nazionale, come le raccomandazioni dalla German Society for Clinical Chemistry and the German Society for Laboratory Medicine (5), le uniche raccomandazioni rilevanti sul tema sono quelle prodotte dal Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE) di EFLM e dal Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) di Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI) per il prelievo venoso, elemento della fase preanalitica determinante per molti aspetti dell'accettabilità del campione biologico. Di questa raccomandazione è disponibile la traduzione italiana (6-8).

In attesa che sia reso disponibile un ulteriore sistema unificato e condiviso, in accordo con il Programma Nazionale per le Linee Guida (9), le raccomandazioni sono al momento prodotte con un sistema di "grading" per quanto riguarda la "forza delle raccomandazioni" che da esse possono essere derivate (dall'inglese "strength of recommendations"), espresso in lettere (da A a E) (Tabella 1).

Lo scopo del presente documento è fornire

indicazioni in merito alla rilevazione e alla modalità di gestione di campioni non idonei da parte dei laboratori clinici. Verranno trattate principalmente le problematiche relative alla idoneità dei campioni da prelievo venoso. Per quanto concerne il trasporto dei campioni biologici, si rimanda al recente documento FISMeLab (10). Non fa parte del documento la discussione sull'idoneità di campioni destinati a esami microbiologici, o eseguiti su urine o liquidi cavitari o destinati a strumenti di tipo Point of Care (POC).

PREMESSA

I servizi di medicina di laboratorio producono sostanziali informazioni in molti ambiti del percorso di cura (screening, prevenzione, diagnosi, trattamenti personalizzati, monitoraggio). Il costante aumento dell'importanza del ruolo del laboratorio clinico nelle decisioni mediche impone una specifica attenzione alla qualità e alla sicurezza dei dati prodotti (11-16).

Secondo la definizione corrente, accettata anche dalla International Organization for Standardization (ISO), è definito come errore di laboratorio "ogni difetto dalla prescrizione dell'esame, alla sua refertazione, all'appropriata interpretazione e reazione" (17). Interventi diagnostici o terapeutici inopportuni, imputabili a errori nell'ambito della diagnostica di laboratorio, influenzano sostanzialmente la prognosi dei pazienti e contribuiscono a dissipare risorse umane ed economiche (5, 18-24).

Numerosi articoli e studi hanno dimostrato come la fase preanalitica e la fase postanalitica siano maggiormente suscettibili di errore rispetto alla fase analitica (25-27), soprattutto in situazioni caratterizzate da un basso livello di standardizzazione e automazione. Errori nella fase preanalitica possono incidere fino al 60-70% del totale e possono associarsi a gravi conseguenze cliniche, economiche e legali, del tutto analoghe a quelle conseguenti agli errori analitici (25-38).

Tabella 1

Definizione della forza delle raccomandazioni, in accordo con le indicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità (9).

Grado	Definizione
A	L'esecuzione di quella particolare procedura è fortemente raccomandata. Indica una particolare raccomandazione sostenuta da prove scientifiche di buona qualità, anche se non necessariamente di tipo I o II.
B	Si nutrono dei dubbi sul fatto che quella particolare procedura o intervento debba essere raccomandata, ma si ritiene che la sua esecuzione debba essere attentamente considerata.
C	Esiste una sostanziale incertezza a favore o contro la raccomandazione di eseguire la procedura o intervento.
D	L'esecuzione della procedura non è raccomandata.
E	Si sconsiglia vivamente l'esecuzione della procedura.

Le cause più frequenti di NC della fase preanalitica coinvolgono campioni inadeguati per qualità (emolizzati, coagulati, contaminati, non adeguatamente miscelati, raccolti in contenitori inappropriati), quantità (volume, in particolare per gli esami emocoagulativi per l'inadeguato rapporto sangue/anticoagulante) o identificazione (19,20,24-38). Le principali tipologie di campioni non idonei sono elencate in Tabella 2. La

Tabella 3 è ricavata dal Modello di Indicatori di Qualità proposto dal Working Group "Laboratory Errors and Patient Safety" (WG-LEPS) di IFCC (39, 40). In conformità a quanto richiesto dalla norma ISO 15189:2012 (41) questi sono espressamente concepiti per i laboratori clinici e contemplano il controllo e il monitoraggio della fase preanalitica e delle relative NC, nell'ambito dei requisiti essenziali di qualità (42-43).

Tabella 2

Principali tipologie di campioni non idonei.

Natura della non idoneità	Definizione
Campione con errata identificazione del paziente	Assenza di informazioni che permettano l'indubitabile e sicura identificazione del paziente.
Campione lipemico	Presenza di torbidità causata da una elevata concentrazione di lipoproteine visibile a occhio nudo o quantificabile a 660/700 nm e corrispondente solitamente a una concentrazione di trigliceridi >1000 mg/dL (11,3 mmol/L) nei campioni di sangue intero e >300 mg/dL (>3,4 mmol/L) nei campioni centrifugati.
Campione itterico	Presenza di bilirubina totale >2,5 mg/dL (42,7 µmol/L). La valutazione mediante la sola ispezione visiva del campione centrifugato può non essere attendibile; si raccomanda quindi di utilizzare una rilevazione fotometrica, mediante lettura a 450 e 575 nm.
Campione coagulato	Presenza di micro o macrocoaguli visibili in campioni che non dovrebbero contenerli, destinati quindi prevalentemente a esami di emocitometria e coagulazione (il sospetto può essere generato da un valore incongruo di piastrine, associato ad allarmi strumentali e citogrammi caratteristici).
Campione emolizzato	Presenza di concentrazioni di emoglobina libera nel siero o nel plasma >0,3 g/L (18,8 mmol/L) e visibile nel campione dopo centrifugazione.
Campione insufficiente	Questa tipologia di errore può essere classificata in ulteriori categorie: "Quantità di campione inferiore alle specifiche richieste". In questo caso l'errore di raccolta è indipendente dalla possibilità di eseguire l'esame. Il problema va comunque evidenziato e risolto (azione preventiva). "Quantità di campione non idoneo all'esecuzione dell'esame richiesto". In questo caso l'errore di raccolta impedisce l'esecuzione dell'esame con una ricaduta sul paziente (azione correttiva). Gli indicatori di qualità proposti dal WG-LEPS dell'IFCC raccolgono i dati seguendo la prima categoria. Per una più facile analisi delle cause di errore, è stato tuttavia introdotto anche l'indicatore "Campione con inappropriato rapporto del volume sangue-anticoagulante".
Campione contaminato	Presenza di sostanze e/o materiali non previsti quali il liquido di infusione (ad esempio: soluzione fisiologica o glucosata), droghe e/o farmaci, anticoagulanti (EDTA, citrato, eparina), liquidi da nutrizione parenterale.
Campione con errata conservazione	Condizioni di trasporto e conservazione del campione non conformi ai criteri definiti.

Tabella 3

Motivi di possibile non accettabilità dei campioni, in relazione agli esami richiesti.

Errori di identificazione

- Campioni pervenuti senza modulo di accompagnamento debitamente compilato quando necessario (per esempio con l'indicazione del sospetto diagnostico in caso di esame chimico-fisico del liquor)
- Campioni pervenuti con richieste incomplete o senza richieste
- Campioni non etichettati, con etichetta illeggibile, etichettati in modo errato

Errori di richiesta dell'esame

- Mancanza del quesito clinico
- Esami non congruenti con il quesito clinico

Errori di trascrizione

- Richiesta di esami errati (errore di compilazione)
- Richiesta con esami mancanti
- Richieste con esami ridondanti o non necessari

Richieste non comprensibili o incomplete

- Richieste non comprensibili

Campione raccolto in contenitore errato

- Matrice non corretta (ad esempio siero/plasma)
- Provetta o contenitore errato rispetto all'esame richiesto

Errato riempimento

- Volume insufficiente di campione
- Errato rapporto campione/anticoagulante

Problemi di trasporto e conservazione

- Campioni non ricevuti
- Campioni non appropriatamente conservati prima dell'analisi
- Campioni danneggiati durante il trasporto
- Campioni trasportati a temperature non idonee
- Campioni con un tempo di trasporto eccessivo

Contaminazione

- Campioni contaminati

Campioni emolizzati

- Campioni con una concentrazione di emoglobina libera $>0,3$ g/L (18,8 mmol/L)

Campioni coagulati

- Campioni di sangue con anticoagulante con evidenza di macro o microcoaguli

Campioni lipemici

- Campioni con torbidità evidente

Campioni itterici

- Campioni con bilirubina $>2,5$ mg/dL (42,7 μ mol/L)

Campione non idoneo per tempo di raccolta inappropriato e/o per errata preparazione del paziente

- Errato momento del prelievo per esami influenzati dal ritmo circadiano
- Preparazione non idonea del paziente prima del prelievo (ad esempio non a digiuno, assunzione di farmaci)

Tabella 3
Continua

Campioni a rischio biologico per gli operatori

- Contenitore/provetta/vetrino rotti
- Contenitore/provetta visibilmente contaminata esternamente da sangue o fluidi biologici
- Documenti di accompagnamento contaminati da materiale biologico
- Siringhe di campionamento (ad esempio per emogasanalisi) con ago ancora inserito

RACCOMANDAZIONI

Poste queste premesse, le seguenti raccomandazioni elaborate dal GdS-VEA hanno lo scopo di definire, promuovere, standardizzare e armonizzare la rilevazione e la gestione delle NC relative ai campioni non idonei nei laboratori clinici.

Educazione, formazione e responsabilizzazione del personale per ridurre gli errori nella fase preanalitica

L'educazione, la formazione e la responsabilizzazione di tutte le figure professionali coinvolte nel prelievo, trasporto e conservazione di campioni biologici è essenziale, poiché la consapevolezza che lo svolgimento di procedure non idonee possa generare gravi conseguenze cliniche, organizzative ed economiche rende meno vulnerabile il processo. Questo iter di educazione, formazione e responsabilizzazione del personale dovrebbe iniziare dagli studi universitari di tutte le professioni sanitarie, e svilupparsi in seguito durante la specializzazione, utilizzando anche lo strumento della formazione continua per il personale impiegato (44,45).

Al fine di una riduzione degli errori nella fase preanalitica i processi di certificazione ISO 9001 e di accreditamento ISO 15189, nonché i vari accreditamenti istituzionali regionali e le raccomandazioni e linee-guida disponibili sulle modalità per un corretto prelievo venoso (6-8,46) indicano come il coinvolgimento e la formazione del personale si realizzino mediante la diffusione di raccomandazioni, linee guida e documenti di consenso (2-4,9) (raccomandazione di grado A), riunioni interdipartimentali (raccomandazione di grado A) o seminari specifici (raccomandazione di grado A) sulle modalità di corretta esecuzione dei prelievi di materiale biologico, conservazione e trasporto dei campioni. Le indicazioni fornite devono essere chiare, facilmente consultabili e disponibili a tutto il personale sanitario coinvolto nelle procedure di raccolta e gestione dei campioni biologici, sia esso interno o esterno ai servizi di Medicina di Laboratorio (raccomandazione di grado A). Il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) hanno emanato e aggiornano periodicamente raccomandazioni specifiche in questo ambito, che possono essere utilizzate quale punto di partenza per definire manuali

operativi da diffondere nell'ambito delle strutture di pertinenza (47-49); questi possono anche essere mutuati da altre esperienze (50).

I documenti del CLSI non solo definiscono le modalità idonee di raccolta e gestione del campione, ma producono anche chiari riferimenti alla organizzazione e all'automazione della fase preanalitica (51-57).

Adozione di sistemi oggettivi e standardizzati per la rilevazione delle non conformità relative a campioni non idonei

Poiché, secondo il modello di Reason, la vulnerabilità di un sistema di difesa dagli errori dipende dal numero delle barriere difensive e dalla loro diversificazione (58), è auspicabile attuare misure idonee a limitare i rischi nel processo, evitando, se e quando possibile, l'evenienza e il ripetersi di incidenti. L'identificazione e il monitoraggio dei campioni non idonei è agevolato dalla moderna strumentazione di laboratorio che si avvale di moduli di strumentazione preanalitica e di analizzatori in grado di quantificare automaticamente gli indici del campione indicativi di interferenza da emolisi, lipemia, iperbilirubinemia, così come campioni coagulati e insufficienti (59-71). Sfortunatamente la disponibilità di questi strumenti non è omogenea né uniformemente diffusa in tutti i settori diagnostici (per esempio nell'ambito emocoagulativo) del laboratorio; ciononostante, ove disponibile, l'adozione di questa tecnologia è raccomandabile, poiché consente di superare il limite soggettivo dell'ispezione visiva del campione, aumentando contestualmente la sensibilità nell'identificazione dei campioni non idonei (69) e consentendo un confronto più standardizzato tra diverse realtà (raccomandazione di grado A).

Procedura sistematica di rilevazione e monitoraggio delle non conformità relative ai campioni non idonei

La refertazione di risultati ottenuti su campioni non idonei può generare gravi conseguenze cliniche, economiche e organizzative. E' inoltre descritta una discreta eterogeneità nella prevalenza delle diverse NC nei campioni biologici, imputabile alla differente interpretazione del concetto medesimo, alle metodologie d'indagine e alla organizzazione delle diverse strutture sanitarie. E' auspicabile l'adozione di una procedura

standardizzata di sistematica identificazione e registrazione delle NC relative ai campioni non idonei in laboratorio, sia per esami processati in urgenza, sia in regime ordinario.

Ogni laboratorio deve definire Indicatori di Qualità (QIs), in relazione a tutte le fasi critiche dell'intero processo d'esame (fase pre, intra e postanalitica), per monitorare e valutare le proprie prestazioni. L'uso di QIs, consensualmente validati, permette l'efficace identificazione e riduzione del rischio di errore (39-41,69). La raccolta dei dati deve rispondere a criteri di standardizzazione (stessi criteri e modalità di raccolta, indipendentemente dall'operatore) e sistematicità (garantire la conformità ai criteri e alle modalità operative, nel tempo).

La creazione di un database per la raccolta dei dati è altamente auspicabile; esso deve consentire di:

- identificare l'epidemiologia dell'errore (frequenza e natura);
- stabilire la causa degli errori intercettati (errore di sistema o errore umano) e le conseguenze (rischio clinico);
- adottare strategie per la prevenzione dell'errore;
- pianificare corsi di formazione, istruzioni operative, educazione sul campo;
- identificare i gradi di responsabilità.

Il database dovrebbe pertanto contenere tutti i seguenti dati (raccomandazione di grado A) (Tabella 4):

- la registrazione dell'operatore che identifica la NC;
- la registrazione della data e ora di accertamento della NC;
- la registrazione dell'identificativo del campione non idoneo (codice campione) e della provenienza (reparto interno od ambulatorio);
- la registrazione della tipologia della NC sulla base di codici prestabiliti a priori (auspicabilmente in linea con gli QIs dell'IFCC WG-LEPS);
- la registrazione della procedura attuata per correggere la NC, auspicabilmente mediante codici prestabiliti a priori;
- se si sia proceduto a informare il reparto o l'utente in caso di paziente ambulatoriale;
- la registrazione dell'identificativo della persona cui è stata notificata la NC;
- l'inserimento di commenti codificati, secondo uno schema prestabilito, consente una omogenea raccolta di informazioni da parte di tutto il personale coinvolto, una più semplice archiviazione delle NC, un confronto longitudinale (nello stesso laboratorio) e trasversale (tra diversi laboratori).

Per la valutazione del rischio si suggerisce, ove possibile, l'implementazione di una analisi "Failure Mode, Effects and Criticality Analysis" (FMECA) per i processi più significativi dove si riscontrano maggiori NC (70).

Inoltre si consiglia di identificare i tipi di NC e ricondurle ad una classificazione rigida di errori di sistema (system errors) o errori riconducibili a un fattore umano (cognitive errors) (71).

La parte più complessa nell'affrontare il problema delle NC relative ai campioni non idonei è la loro gestione. L'analisi della realtà sul territorio nazionale evidenzia che i diversi servizi di Medicina di Laboratorio adottano politiche eterogenee, anche nell'ambito di aree geografiche omogenee (72).

Tutto ciò si riflette in un'armonizzazione inaccettabile in quest'ambito, che può generare considerevoli perplessità soprattutto negli utenti. Si rende quindi necessario adottare una politica comune, volta a uniformare i comportamenti. Premesso che la refertazione di risultati ottenuti su campioni non idonei può associarsi a conseguenze legali e gravi ricadute cliniche ed economiche per tutto il servizio sanitario nazionale, è assolutamente da evitare la trasmissione da parte del laboratorio di risultati viziati da NC documentata, senza accompagnarla o farvi seguire alcun intervento (raccomandazione di grado A). Si rammenta inoltre che, in accordo alla legislazione vigente sul territorio nazionale, lo studio della colpa medica in ambito diagnostico viene affrontato in termini di omissione, ritardo ed errore differenziale e l'ente ospedaliero è responsabile dei danni causati ai pazienti da comportamenti colposi dei propri sanitari (Cassazione 4400/04). Su questa premessa, l'attuazione di misure idonee a prevenire danni causati dalla comunicazione di risultati inattendibili (finanche di errore diagnostico) è essenziale, non solo per presupposti analitici ed etici, ma anche per le potenziali ricadute di natura medico-legale, in particolare alla luce del disposto della Legge Gelli-Bianco (Legge 8 marzo 2017, n. 24).

Procedura di gestione dei campioni non idonei per presenza di interferenti

Per quanto riguarda la stima dell'interferenza, si assume in linea generale che essa debba essere considerata analiticamente significativa qualora la deviazione massima consentita (bias interferente %) nella determinazione dell'analita, espressa in termini percentuali rispetto al risultato senza interferenza, sia maggiore della deviazione massima tollerata (bias analitico %) per la medesima procedura analitica (bias interferente % > bias analitico %), così come deducibile da database disponibili in letteratura o sul web (73) (raccomandazione di grado B).

Poiché tuttavia la potenziale interferenza determina una modifica della misura della concentrazione di un analita che dipende intrinsecamente dalla variabilità totale, data dalla stima della variabilità biologica e analitica, può essere considerata clinicamente significativa una variazione che ecceda la variabilità totale espressa in termini di differenza critica o "Reference Change Value" (RCV) (74) (raccomandazione di grado A).

Documentazione delle interferenze. Il laboratorio dovrebbe specificare dettagliatamente, nell'ambito delle procedure operative

- la natura delle NC dei campioni e le procedure

Tabella 4

Esempio di database per la registrazione delle non-conformità (NC) relative ai campioni non idonei

ID Operatore (1)	Data e ora (2)	ID campione (3)	Tipologia della NC (4)	Procedura di correzione NC (5)	ID del ricevente della comunicazione (6)
xx	26/11/12 10,40	8093140601 MED GEN	Pre-Clot	RIC-CAMP	xx
xx	26/11/12 12,23	1210869203 AMB PREL	Pre-Cont	AV-REP	xx

1) Inserire l'identificativo (ID) dell'operatore che registra la NC

2) Inserire data e ora della rilevazione della NC

3) Inserire l'identificativo del campione che presenta la NC e il reparto di provenienza

4) Inserire la tipologia della NC, secondo uno schema prestabilito, per quanto possibile coerente con il progetto degli indicatori di qualità WG-LEPS di IFCC (www.ifcc-mqi.com)

5) Inserire la procedura attuata per la correzione della NC, secondo uno schema prestabilito. Ad esempio:

a. avvisato reparto: AV-REP

b. richiesto altro campione (per pazienti ricoverati): RIC-CAMP

c. richiamato paziente (per pazienti ambulatoriali): RIC-PAZ

d. inserito specifico commento nel referto: INS-COMM

6) inserire l'identificativo della persona a cui è stata riportata la NC

utilizzate per identificarle (5, 75) (raccomandazione di grado A);

- la tipologia di analisi influenzate dalla presenza di una specifica interferenza (75-79) (raccomandazione di grado A);
- i limiti di entità dell'interferenza oltre i quali l'analisi non è più attendibile, utilizzando i criteri esposti in precedenza (raccomandazione di grado A);
- la specifica procedura operativa adottata per gestire ogni singola NC (raccomandazione di grado A).

Ciò si rende necessario per standardizzare e omogeneizzare la procedura di gestione delle NC da parte degli operatori, sia nell'ambito del medesimo servizio di Medicina di Laboratorio, sia in tutto il territorio nazionale.

Comunicazione tempestiva della non conformità. Poiché il personale del laboratorio non sempre è in grado di stabilire a priori la natura (origine) dell'interferenza (emolisi *in vivo* ed *ex vivo*, lipemia endogena o esogena, sovradosaggio terapeutico o contaminazione da soluzioni infusive del campione durante il prelievo) (80), si rende necessario comunicare tempestivamente la natura della NC al personale sanitario che ha in gestione il paziente (64, 76, 81, 82) (raccomandazione di grado A), affinché metta in atto tempestivamente le misure appropriate.

Gestione dei campioni in presenza di interferenti. Sulla base dei criteri e delle modalità operative definite dal laboratorio, il personale valuta la natura dell'interferenza e il suo impatto sui risultati delle analisi. Gli esami per cui non è descritta interferenza possono essere normalmente eseguiti e comunicati, mentre quelli per cui è descritta interferenza e per cui non sia disponibile una tecnica o un metodo per eliminarla non dovrebbero essere eseguiti né tanto meno comunicati i risultati (75) (raccomandazione di grado B), richiedendo un secondo campione e sostituendo quindi al risultato dell'analita un commento codifi-

cato nel referto (ad esempio "Analisi non eseguibile per campione emolizzato" o "Analisi non eseguibile per campione contaminato") (75,83), (raccomandazione di grado A).

Questa soluzione sembra più idonea anche sulla base di considerazioni legali, poiché è più semplice difendersi dall'accusa di non aver prodotto un risultato ritenuto clinicamente inattendibile piuttosto che aver prodotto un risultato clinicamente inattendibile perché eseguito su un campione non idoneo (84, 85).

La procedura che prevede l'analisi del campione e la refertazione di tutti i risultati, correggendo quelli influenzati dall'interferente mediante specifiche formule matematiche (76), con (raccomandazione di grado D) o senza aggiunta di un commento specifico in accompagnamento al risultato è sconsigliata (raccomandazione di grado E). La correzione dei risultati di campioni non idonei, soprattutto in presenza di emolisi, è stata suggerita da alcuni autori (76-79). Ciò si ottiene applicando formule matematiche, basate sulla moltiplicazione della concentrazione dell'interferente (ad esempio emoglobina libera) nel campione di siero o plasma per il valore della pendenza ottenuto da una regressione lineare tra il bias riscontrabile per ciascun analita e la relativa concentrazione di interferente (86, 87).

Questa soluzione presenta tuttavia molti limiti, imputabili principalmente alla

- eterogenea sensibilità delle differenti tecniche nei confronti della natura e concentrazione della sostanza interferente [emoglobina libera (88-91), lipidi (92,93), ittero (94-96)],
- contaminazione da infusione, per inattendibilità biologica del risultato (una procedura inadeguata per la raccolta del campione può aver influenzato direttamente la concentrazione di molti parametri ematochi-

- mici, come ad esempio nel caso di campioni emolizzati o coagulati per prelievi male eseguiti) (89, 97)
- eterogenea variazione dei parametri ematochimici nei diversi campioni biologici in risposta alla natura e alla concentrazione dell'interferente (54, 76).

Procedura di gestione dei campioni non idonei per volume insufficiente

Analogamente alla gestione di altre tipologie di non idoneità, il laboratorio dovrebbe specificare dettagliatamente, nell'ambito delle procedure operative, il volume minimo richiesto per completare l'analisi e la prassi da seguire per gestire questo specifico problema (5) (raccomandazione di grado A). Il volume minimo richiesto per le determinazioni varia sostanzialmente in relazione al numero di analisi richieste su quella provetta e alle relative tecniche analitiche. Esistono suggerimenti attendibili per stimare la quantità minima di campione (VolMin), definite in base a volume analitico (VolAnal), spazio morto di provetta primaria (SM-Pp), secondaria (SMPs) e analizzatore (SM-An), volume richiesto per l'eventuale procedura di esecuzione di test riflessi (N) ed ematocrito (Ht). Integrando questi parametri e stimando un Ht medio di 0,50, è possibile ottenere una formula di calcolo attendibile (5,98) (raccomandazione di grado B):

$$VolMin = 2 \times [N \times (VolAnal + SM-An) + SM-Ps] + SM-Pp$$

In presenza di campioni insufficienti, il laboratorio dovrebbe provvedere a richiedere un secondo campione con volume idoneo (raccomandazione di grado A); se ciò non è possibile, si raccomanda di sostituire il valore dell'analita con un commento codificato nel referto (ad esempio "Analisi non eseguibile per campione insufficiente" (5) (raccomandazione di grado A).

Questa raccomandazione assume grande importanza per esami in cui sia essenziale un corretto rapporto tra concentrazione di anticoagulante e sangue, come gli esami emocoagulativi. In questa circostanza, poiché il riempimento inadeguato della provetta altera l'attendibilità dei risultati (97-102), la prassi consigliata è quella di non eseguire le analisi in presenza di riempimento $\pm 10\%$ rispetto al volume nominale della provetta primaria, sostituendo al valore dell'analita un commento codificato nel referto (ad esempio "Analisi non eseguibile per errato rapporto sangue/anticoagulante"). Il recente documento SIBioC sulla variabilità preanalitica in coagulazione indica però che per alcuni esami come la determinazione del tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale attivata, tempo di trombina, fibrinogeno ed antitrombina, è tollerabile un riempimento del 80% rispetto al valore nominale (103). Ciò vale per gli esami emocoagulativi (raccomandazione di grado A) (47, 48, 98-101, 103-105), mentre appare meno stringente per gli esami emocromocitometrici (102, 106) (raccomandazione di grado C), soprattutto se in presenza di anticoagulanti liofilizzati. In aggiunta alla procedura di definizione del volume minimo per analisi, si ritiene opportuno che il laboratorio adotti misure atte a ridurre il

volume necessario. Tra queste, l'utilizzo sugli analizzatori di contenitori primari (con eliminazione di quelli secondari), l'uso di provette di ridotto diametro, l'implementazione di analizzatori che richiedano volumi analitici contenuti (5) (raccomandazione di grado B).

Procedura di gestione dei campioni non idonei per presenza di coaguli

La presenza di coaguli all'interno di campioni primari di sangue influenza il risultato degli esami emocromocitometrici ed emocoagulativi a seguito del consumo di piastrine, fattori della coagulazione e incorporazione di elementi corpuscolati del sangue nei coaguli (47, 103-105, 108), oltre a rappresentare un tangibile rischio di aspirazione parziale del campione necessario all'analisi e di danneggiamento degli strumenti a seguito dell'aspirazione dei coaguli nella fluidica.

A parte qualche eccezione, la maggior parte dei risultati di analisi di tipo non ematologico eseguite su campioni di siero o plasma inopportuno coagulati non risultano invece clinicamente modificate (97).

La rilevazione dei coaguli può essere possibile sia mediante ispezione visiva del campione (raccomandazione di grado A), sia utilizzando combinazioni di tecniche automatiche di rilevamento dei coaguli (ad esempio, sensori di presenza di campione su contaglobuli) (raccomandazione di grado A), allarmi strumentali che segnalano aumento del rumore di fondo e citogrammi bidimensionali suggestivi di presenza di aggregati piastrinici in presenza o meno di conta piastrinica particolarmente bassa (raccomandazione di grado A). In presenza di campioni coagulati destinati ad analisi emocoagulative ed emocromocitometriche, gli esami non devono essere eseguiti e il laboratorio deve richiedere un secondo campione (raccomandazione di grado A). Se ciò non è possibile, si raccomanda di sostituire al valore dell'analita un commento codificato nel referto (ad esempio "Analisi non eseguibile per campione coagulato") (raccomandazione di grado A).

Procedura di gestione dei campioni non idonei per problemi di identificazione del campione

Il College of American Pathologist (CAP), i Patient Safety Goals della Joint Commission (JC), il CLSI nel documento GP33, come la pure raccomandazione congiunta EFLM-COLABIOCLI sul prelievo venoso raccomandano espressamente che tutti i campioni destinati a esami ematochimici debbano ricevere identificazione positiva al momento del prelievo (raccomandazione di grado A), preferibilmente con l'utilizzo di due identificatori diversi (6, 109-111).

Qualora persistano dubbi sulla corretta identificazione, sia sulla base di criteri oggettivi (errori palesi d'identificazione, rilevati dal personale del laboratorio al momento del ricevimento del campione) o probabilistici (riscontro di palesi incongruenze nei risultati

del campione rispetto alla clinica del paziente o scostamenti ingiustificabili rispetto ai valori precedenti), il laboratorio deve richiedere un altro campione su cui eseguire l'analisi (raccomandazione di grado A). Sulla base delle indicazioni di CAP e JC in virtù delle possibili implicazioni cliniche (109,110,112) e legali (84, 85), procedure di rietichettatura dei campioni a opera di personale del laboratorio, di personale dell'unità operativa di origine del campione o di terzi sono sconsigliate (raccomandazione di grado A).

Nell'impossibilità di ottenere ulteriori campioni, quelli con problemi di identificazione non devono essere processati, sostituendo ai risultati un commento codificato (ad esempio "Campione non analizzabile per errori di identificazione") (5) (raccomandazione di grado A).

Procedura di gestione per campioni irripetibili

Anche se le presenti raccomandazioni si applicano principalmente alla gestione dei campioni ematici non idonei, si ritiene opportuno fornire indicazioni in merito ad alcuni materiali (per esempio il liquido cefalorachidiano, il liquido amniotico o materiali biotipici) la cui natura rende improbabile una seconda raccolta. Si suggerisce in tal caso di esaminare comunque il campione, registrando opportunamente la NC e inserendo in nota al risultato un commento che descriva la natura del problema riscontrato (raccomandazione di grado A).

Ulteriori considerazioni

Le indicazioni riguardo le corrette modalità di preparazione del paziente in relazione all'esame richiesto, e quindi di raccolta del campione, devono essere facilmente disponibili per l'utente/paziente e il medico prescrittore mediante appositi documenti informativi o applicazioni informatiche (raccomandazione di grado A). La definizione dello stato alimentare è un buon indicatore di qualità, oltre a essere un requisito importante dal punto di vista medico-legale. Qualora non sia possibile eliminare tale interferenza (pazienti con sondino nasogastrico, enterogastrostomia percutanea), in coincidenza con una particolare urgenza/emergenza clinica, deve essere contattato il personale sanitario responsabile del paziente, cui va comunicata tempestivamente la situazione.

A causa del graduale decentramento dei punti di prelievo, le modalità di conservazione e trasporto dei campioni biologici al laboratorio rappresentano una criticità che tutto il personale (sia sanitario e sia addetto ai trasporti) deve conoscere (10). L'obiettivo di questo documento trascende l'emanazione di indicazioni o raccomandazioni riguardo alla gestione di questo complesso problema, già trattato dalle raccomandazioni FISMeLab (10). Nondimeno, un possibile suggerimento preliminare per gli utilizzatori è che ciascun laboratorio, in rapporto alla strumentazione analitica, stabilisca per tutti i parametri (soprattutto quelli ematologici), il tempo massimo che può intercorrere dal prelievo del campione

all'analisi, anche in relazione alla temperatura di conservazione, e referti conseguentemente solo i parametri per i quali c'è garanzia di attendibilità. Si segnala inoltre l'importanza della collaborazione fra laboratorio e personale di reparto o ambulatorio prelievi, sia per quanto riguarda la condivisione delle procedure di raccolta e trasporto del materiale biologico, sia per quanto riguarda l'attività di audit relativo alle NC, al fine di garantire un miglioramento continuo del processo di gestione dei campioni (raccomandazione di grado A).

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i Colleghi che hanno contribuito a formulare le raccomandazioni: Adriano Anesi, Anna Rosa Corno, Massimo Daves, Maria Luisa De Angelis, Giovanni Lombardi, Claudia Lo Cascio, Palma Manduzio, Barbara Marcon, Valentino Miconi, Bruno Milanese, Martina Montagnana, Rocco Negri, Andrea Padoan, Paola Pauri, Brunetta Porcelli, Laura Roli.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

TABELLA SINOTTICA

Sintesi delle raccomandazioni contenute nel documento.

Raccomandazione	Forza	Media	DS	
[1] Educazione e formazione del personale per ridurre gli errori della fase preanalitica				
a. mediante diffusione di raccomandazioni, linee guida e documenti di consenso	A	1,08	0,28	
b. mediante riunioni interdipartimentali	A	1,33	0,56	
c. mediante seminari specifici	A	1,21	0,51	
d. le indicazioni fornite devono essere chiare, facilmente consultabili e disponibili a tutto il personale sanitario coinvolto nelle procedure di raccolta e gestione dei campioni biologici, sia esso interno o esterno ai servizi di Medicina di Laboratorio	A	1,04	0,20	
[2] Adozione di sistemi oggettivi e standardizzati per la rilevazione delle NC relative ai campioni non idonei				
In ogni diagnostica è raccomandabile l'impiego di strumenti o moduli di preanalitica in grado di quantificare automaticamente gli indici di emolisi, lipemia, iperbilirubinemia, e il volume campione, quando disponibili	A	*	1,29	0,86
[3] Procedura sistematica di rilevazione e monitoraggio delle NC relative a campioni non idonei				
Utilizzo di un database con le seguenti opzioni:				
a. registrazione dell'operatore che identifica la NC	A	1,21	0,51	
b. registrazione di data e ora di accertamento della NC	A	1,17	0,38	
c. registrazione dell'identificativo del campione non idoneo (codice campione) e del reparto di provenienza	A	1,04	0,20	
d. registrazione della tipologia della NC sulla base di codici prestabiliti a priori, in linea con quelli suggeriti dall'IFCC WG-LEPS	A	1,08	0,28	
e. registrazione della procedura attuata per correggere la NC, auspicabilmente mediante codici prestabiliti a priori	A	1,21	0,51	
f. se si sia proceduto a informare il reparto, registrare l'identificativo della persona cui è stata notificata la NC	A	1,25	0,53	
g. è raccomandabile l'inserimento di commenti codificati, secondo uno schema prestabilito	A	1,13	0,34	
E' assolutamente da evitare la trasmissione da parte del laboratorio di risultati viziati da NC documentata senza farvi seguire alcun intervento	A	1,04	0,20	
[4] Procedura di gestione dei campioni non idonei per presenza di interferenti				
4.1 Documentazione delle interferenze; laboratorio deve specificare dettagliatamente nell'ambito delle procedure operative:				
a. natura delle NC nei campioni e procedura utilizzata per identificarle	A	1,04	0,20	
b. tipologia delle analisi influenzate dalla presenza di una specifica interferenza	A	1,04	0,20	
c. limiti di interferenza oltre i quali l'analisi non è attendibile sulla base di:	A	1,20	0,41	
d. bias interferente	B	*	1,88	0,99
e. differenza critica o reference change value	A	1,38	0,65	
f. specifica procedura operativa adottata per la gestione di ogni singola NC	A	1,13	0,34	
4.2 Comunicazione tempestiva delle non conformità				
E' necessario comunicare sempre e tempestivamente la natura della NC al personale sanitario che ha in gestione il paziente	A	1,14	0,47	
4.3 Gestione dei campioni in presenza di interferenti				
a. esecuzione e comunicazione delle analisi per cui non è descritta interferenza; non esecuzione né comunicazione di risultati di analisi per cui non sia disponibile una tecnica o un metodo per eliminare l'interferenza	B	*	1,88	1,08
b. richiesta di un secondo campione e sostituzione del valore dell'analita con un commento codificato in ragione della natura dell'interferente	A	1,08	0,28	
c. esecuzione e comunicazione di tutte le analisi del campione; correzione di quelle influenzate dall'interferenza mediante specifiche formule matematiche, con aggiunta di un commento specifico in accompagnamento al risultato	D	3,67	1,17	
d. esecuzione e comunicazione di tutte le analisi del campione; correzione di quelle influenzate dall'interferenza mediante specifiche formule matematiche, senza aggiunta di un commento specifico in accompagnamento al risultato	E	4,58	0,93	

TABELLA SINOTTICA

Continua

Raccomandazione	Forza	Media	DS
[5] Procedura di gestione dei campioni non idonei per volume insufficiente			
a. descrizione specifica, nell'ambito delle procedure operative, del volume minimo richiesto a completare le analisi e la prassi da gestire per gestire questo specifico problema	A	1,33	0,92
b. stimare la quantità minima di campione (VolMin) mediante: VolMin = 2 x [N x (VolAnal + SM-An) + SM-Ps] + SM-Pp (vedi testo)	B	2,39	0,84
c. richiesta di un secondo campione con volume idoneo	A	1,17	0,48
d. se ciò non è possibile, si raccomanda di sostituire al valore dell'analita un commento specifico	A	1,18	0,39
e. in campioni destinati a esami emocoagulativi con riempimento $\pm 10\%$ rispetto al volume nominale della provetta primaria, le analisi non devono essere eseguite, sostituendo al valore dell'analita un commento specifico	A	*	1,17
f. in campioni destinati a esami emocromocitometrici con riempimento $\pm 10\%$ rispetto al volume nominale della provetta primaria, le analisi non devono essere eseguite, sostituendo al valore dell'analita un commento specifico	C	3,04	1,20
g. adozione di misure atte a ridurre il volume necessario: è consigliato l'utilizzo di contenitori primari (con eliminazione di quelli secondari), l'uso di provette di ridotto diametro, l'implementazione di analizzatori che richiedano volumi analitici contenuti	B	*	1,65
[6] Procedura di gestione dei campioni non idonei per presenza di coaguli			
6.1 La rilevazione dei coaguli nei campioni per esami emocromocitometrici ed emocoagulativi può essere possibile:			
- mediante ispezione visiva del campione	A	1,13	0,34
- utilizzando combinazioni di tecniche automatiche di rilevamento dei coaguli	A	1,00	0,00
- con allarmi strumentali che segnalano aumento del rumore di fondo e citogrammi bidimensionali suggestivi di presenza di aggregati piastrinici in presenza o meno di conta piastrinica particolarmente bassa	A	1,17	0,48
6.2 In presenza di campioni coagulati destinati ad analisi emocoagulative ed emocromocitometriche, gli esami non devono essere eseguiti e il laboratorio dovrebbe richiedere un secondo campione.			
Se ciò non è possibile, si raccomanda di sostituire al valore dell'analita un commento codificato nel referto	A	1,08	0,28
[7] Gestione dei campioni non idonei per problemi di identificazione del campione			
a. tutti i campioni destinati a esami ematochimici devono ricevere identificazione positiva al momento del prelievo	A	1,00	0,00
b. richiesta di un secondo campione in caso di dubbia identificazione	A	1,04	0,20
c. le procedure di rietichettatura dei campioni sono sconsigliate	A	*	1,25
d. nell'impossibilità di ottenere ulteriori campioni, l'intero referto va annullato, sostituendo con commento codificato	A	1,04	0,20
[8] Procedura di gestione per campioni irripetibili			
8.1 Esaminare comunque il campione, registrando opportunamente la NC e inserendo in nota al risultato un commento che descriva la natura del problema riscontrato	A	1,33	0,58
[9] Ulteriori considerazioni			
a. le indicazioni sulle corrette modalità di preparazione del paziente e raccolta del campione devono essere disponibili per l'utente/paziente ed il medico prescrittore mediante appositi documenti informativi o applicazioni informatiche	A	*	1,13
b. è opportuna la massima collaborazione fra laboratorio e personale di reparto o ambulatorio prelievi sia per quanto riguarda la condivisione delle procedure di raccolta e trasporto del materiale biologico, sia per quanto riguarda l'attività di audit relativo alle NC	A	1,04	0,20

Hanno votato 23 membri del Gruppo di Studio Variabilità Extra-Analitica. I voti sono stati espressi come: 1=A; 2=B; 3=C; 4=D; 5=E. La media di consenso è stata definita secondo il seguente schema: con media <1,5 la raccomandazione è stata classificata come grado A; con media compresa tra 1,5 e <2,5 come grado B; con media compresa tra 2,5 e <3,5 come grado C; con media compresa tra 3,5 e <4,5 come grado D; con media $\geq 4,5$ come grado E.

*: coefficiente di variazione del consenso >50%.

NC, non-conformità

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, et al. Raccomandazioni per la rilevazione e la gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2007;31:216-24.
2. Fink A, Kosecoff J, Chassin M, et al. Consensus methods: characteristics and guidelines for use. *Am J Public Health* 1984;74:979-83.
3. Candiani G, Colombo C, Daghini R, et al. Manuale metodologico: come organizzare una Conferenza di consenso. Istituto Superiore di Sanità, Sistema Nazionale Linee Guida SNLG, Roma Novembre 2009, aggiornamento 2013. <http://www.psy.it/wp-content/uploads/2018/02/Manuale-Metodologico-Consensus.pdf> (ultimo accesso: novembre 2019).
4. Programma nazionale per le linee guida. Manuale metodologico come produrre, diffondere e aggiornare raccomandazioni per la pratica clinica. http://old.iss.it/binary/lgmr2/cont/Manuale_PNLG.1234439852.pdf (ultimo accesso: novembre 2019).
5. Guder WG, Ehret W, Da Fonseca-Wollheim F, et al. Die Qualität diagnostischer Proben. *J Lab Med* 2002;26:267-83.
6. Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, et al. on behalf of the Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) and Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) of the Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI), Joint EFLM-COLABIOCLI. Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:2015-38.
7. Giavarina D. L'importanza della standardizzazione del prelievo venoso: la raccomandazione EFLM-COLABIOCLI 2018. *Biochim Clin* 2019;43:200-3.
8. Raccomandazione congiunta EFLM-COLABIOCLI per il prelievo di sangue venoso. *Biochim Clin* 2019;43:204-27.
9. Programma nazionale per le linee guida. Come produrre, diffondere e aggiornare raccomandazioni per la pratica clinica. Istituto Superiore di sanità, Maggio 2002. http://old.iss.it/binary/lgmr2/cont/Manuale_PNLG.1234439852.pdf (ultimo accesso: novembre 2019).
10. Zaninotto M, Brando B, Cenci A.M., et al. Raccomandazioni FISMeLab per il trasporto del materiale biologico. *Biochim Clin* 2019;43:187-99.
11. Plebani M. Charting the course of medical laboratories in a changing environment. *Clin Chim Acta* 2002;319:87-100.
12. Laposata ME, Laposata M, Van Cott EM, et al. Physician survey of a laboratory medicine interpretive service and evaluation of the influence of interpretation on laboratory test ordering. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:1424-7.
13. Westgard JO, Darcy T. the truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory tests. *Clin Chim Acta* 2004;346:3-11.
14. Plebani M. The future of clinical laboratories: more testing or knowledge services? *Clin Chem Lab Med* 2005;43:893-6.
15. Guidi GC, Lippi G, Solero GP, et al. Managing transferability of laboratory data. *Clin Chim Acta* 2006;374:57-62.
16. Regan M, Forsman R. The impact of the laboratory on disease management. *Dis Manag* 2006;9:122-30.
17. ISO/TS 22367:2008. Medical laboratories – Reduction of error through risk management and continual improvement. Ginevra, 2008.
18. Narayanan S, Guder WG. Preanalytical variables and their influence on the quality of laboratory results. *eJIFCC* 2001;13:9-12.
19. Kalra J. Medical errors: impact on clinical laboratories and other critical areas. *Clin Biochem* 2004;37:1052-62.
20. Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, et al. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:150-60.
21. Foubister V. Bench press: the technologist/technicians shortfall is putting the squeeze on laboratories nationwide. *CAP Today*. http://www.captodayonline.com/Archives/feature_stories/feat2900.html (ultimo accesso: novembre 2019)
22. Nutting PA, Main DS, Fischer PM, et al. Problems in laboratory testing in primary care. *JAMA* 1996;275:638.
23. American Society for Clinical Pathology. Quality laboratory practice and its role in patient safety: The American Society for Clinical Pathology Policy Statement (Policy Number 06-01). <http://www.medscape.com/viewarticle/546192>. (ultimo accesso: novembre 2019)
24. Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, et al. Blood sample quality. *Diagnosis (Berl)*. 2019;6:25-31.
25. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem* 1997;43:1348-51.
26. Wiwanitkit V. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6-month monitoring. *BMC Clin Pathol* 2001;1:5.
27. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, et al. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002;48:691-8.
28. Valenstein PN, Sirota RL. Identification errors in pathology and laboratory medicine. *Clin Lab Med* 2004;24:979-96.
29. Dale JC, Novis DA. Outpatient phlebotomy success and reasons for specimen rejection. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:416-9.
30. Hollensead SC, Lockwood WB, Elin RJ. Errors in pathology and laboratory medicine: consequences and prevention. *J Surg Oncol* 2004;88:161-81.
31. Howanitz PJ. Errors in laboratory medicine: practical lessons to improve patient safety. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1252-61.
32. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, et al. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:358-65.
33. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750-9.
34. Siddiqui S. Laboratory errors as judged by test request slips and test reports. *J Coll Physicians Surg Pak* 2006;16:136-8.
35. Wagar EA, Tamashiro L, Yasin B, et al. Patient safety in the clinical laboratory. A longitudinal analysis of specimen identification errors. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1662-8.
36. Gómez-Salgado J, Romero A, et al. Preanalytical errors: a preliminary approach to the point of view of primary health care givers. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:225-9.
37. Romero A, Munoz M, Ramos JR, et al. Identification of preanalytical mistakes in the stat section of the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:974-5.
38. Lippi G, Bassi A, Brocco G, et al. Preanalytic error tracking in a laboratory medicine department: results of a 1-year experience. *Clin Chem* 2006;52:1442-3.
39. Sciacovelli L, Panteghini M, Lippi G, et al. Defining a roadmap for harmonizing quality indicators in Laboratory Medicine: a consensus statement on behalf of the IFCC Working Group "Laboratory Error and Patient Safety" and EFLM Task and Finish Group "Performance specifications for the extra-analytical phases". *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1478-88.
40. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A. Quality Indicators for the

- Total Testing Process. *Clin Lab Med* 2017;37:187–205.
41. ISO15189:2012 Medical laboratories: Particular requirements for quality and competence. International organization for Standardisation: Ginevra, 2012.
 42. Hyltoft-Petersen P, Fraser CG, Kallner A, et al. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:475-585.
 43. Wood WG. The preanalytical phase - Can the requirements of the DIN-EN-ISO 15189 be met practically for all laboratories? A view of the "German situation". *Clin Lab* 2005;51:665-71.
 44. Guidi GC, Lippi G. Formazione in medicina di laboratorio. *Biochim Clin* 2007;31:127-30.
 45. Ying Li H, Yang YC, Huang WF, et al. Reduction of preanalytical errors in laboratory by establishment and application of training system. *J Evid Based Med*. 2014;7:258-62.
 46. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection of diagnostic venous blood specimens. 7th ed. CLSI document GP41. CLSI: Wayne, PA: 2017.
 47. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays, 5th ed.. CLSI document H21-A5 . CLSI: Wayne, PA, 2008.
 48. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evacuated tubes and additives for blood specimen collection; approved standard, 5th ed. CLSI document H1-A5. CLSI: Wayne, PA, 2003.
 49. World Health Organization. Diagnostic Imaging and Laboratory Technology. (2002). Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65957> (ultimo accesso novembre 2019).
 50. ISO 6710:2017 Single-use containers for human venous blood specimen collection. : International Organization for Standardization: Ginevra, 2017.
 51. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory automation: specimen container/specimen carrier; approved standard. CLSI document AUTO01-A. Wayne, PA, 2000.
 52. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory automation: bar codes for specimen container identification; approved standard, 2nd ed. CLSI document AUTO02-A2. Wayne, PA, 2005.
 53. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory automation: communications with automated clinical laboratory systems, instruments, devices, and information systems; approved standard, 2nd ed. CLSI document AUTO03-A2. Wayne, PA, 2009.
 54. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory automation: systems operational requirements, characteristics, and information elements; approved standard. CLSI document AUTO04-A. CLSI: Wayne, PA, 2001.
 55. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory automation: electromechanical interfaces; approved standard. CLSI document AUTO05-A. CLSI: Wayne, PA, 2001.
 56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory automation: data content for specimen identification; approved standard. CLSI document AUTO07-A. Wayne, PA, 2004.
 57. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Specimen labels: Content and location, fonts, and label orientation; approved standard. CLSI document AUTO12-A. Wayne, PA, 2011.
 58. Reason J. Human error: models and management. *Br Med J* 2000;320:768-70.
 59. Fuentes-Arderiu X, Fraser CG. Analytical goals for interference. *Ann Clin Biochem* 1991;28:393-5.
 60. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry. Approved guideline 3rd ed. CLSI document EP07. Wayne, PA, 2018.
 61. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Supplemental tables for interference testing in Clinical Chemistry 1st ed. CLSI document EP37. Wayne, PA, 2018.
 62. Grafmeyer D, Bondon M, Manchon M, et al. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analysers. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:31-52.
 63. Kroll H. Evaluating Interference Caused by Lipemia. *Clin Chem*. 2004;50:1968-9.
 64. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, et al. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:181-4.
 65. Steen G, Vermeer HJ, Naus AJ, et al. Multicenter evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assays. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:413-9.
 66. Vermeer HJ, Thomassen E, de Jonge N. Automated processing of serum indices used for interference detection by the laboratory information system. *Clin Chem* 2005;51:244-7.
 67. Agarwal S, Vargas G, Nordstrom C, et al. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays. *Clin Chim Acta* 2015;438:241-5.
 68. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med* 2014;15:57-67.
 69. Plebani M. Performance specifications for the extra-analytical phases of laboratory testing: Why and how. *Clin Biochem* 2017;50:550-4.
 70. Aita A, Tosato F, Balboni F, et al. Sicurezza del paziente e rischio clinico nel processo ematologico di laboratorio. *Biochim Clin* 2018; 42:300-12.
 71. Lippi G, Bonelli P, Rossi R, et al. Development of a preanalytical errors recording software. *Biochem Med* 2010;20:90-5.
 72. Lippi G, Montagnana M, Giavarina D. National survey on the pre-analytical variability in a representative cohort of Italian laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1491-4.
 73. EFLM Biological Variation Database. <https://biologicalvariation.eu>. (ultimo accesso: novembre 2019).
 74. Fraser GC. Biological variation: from principles to practice. Washington DC: AACC Press 2001.
 75. Guder WG, Fonseca-Wollheim FD, Heil W, et al. The haemolytic, icteric and lipemic sample. Recommendation regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *Lab Med* 2000;24:357-64.
 76. Dimeski G, Clague AE, Hickman PE. Correction and reporting of potassium results in haemolysed samples. *Ann Clin Biochem* 2005;42:119-23.
 77. Cantero M, Conejo JR, Jimenez A, Interference from lipemia in cell count by hematology analyzers. *Clin Chem* 1996;42:987-8.
 78. Lippi G, Plebani M, Favalaro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39:258-66.
 79. Novelli C, Vidali M, Brando B, et al. A collaborative study by the Working Group on Hemostasis and Thrombosis of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical

- Molecular Biology (SIBioC) on the interference of haemolysis on five routine blood coagulation tests by evaluation of 269 paired haemolysed/non-haemolysed samples. *Biochem Med*. 2018;28:030711 doi: 10.11613/BM.2018.030711.
80. Direttiva 98/79/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 ottobre 1998 relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. *Gazzetta Ufficiale Europea* 7.12.1998 L311.
 81. Ismail A, Shingler W, Seneviratne J, et al. In vitro and in vivo hemolysis and potassium measurement. *Br Med J* 2005;330:949.
 82. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:311-6.
 83. Baer DM, Ernst DJ, Willeford SI. Investigating elevated potassium values. *MLO Med Lab Obs* 2006;24:30-1.
 84. Harty-Golder B. When irreplaceable specimens are inadequate. *MLO Med Lab Obs* 2004;36:36.
 85. Harty-Golder B. Legal dangers of testing unacceptable specimens. *MLO Med Lab Obs* 2004;36:43.
 86. Jay D, Provasek D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. *Clin Chem* 1993;39:1804-10.
 87. Owens H, Siparsky G, Bajaj L, et al. Correction of factitious hyperkalemia in hemolyzed specimens. *Am J Emerg Med* 2005;23:872-5.
 88. Glick MR, Pieper J, Ryder KW. Interference-reduced methodologies for Boehringer Mannheim/Hitachi analyzers: Validation using recombinant haemoglobin blood substitute product. *Clin Chem* 1998;44(suppl):A140.
 89. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24:127-39.
 90. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ. *Interferographs*. Evaluation. 2nd ed. Indianapolis: Sciences Inc. 1991.
 91. Taylor LJ. Laboratory management of the bleeding patient. *Clin Lab Sci* 2003;16:111-4.
 92. Artiss JD, Zak B. Problems with measurements caused by high concentrations of serum lipids. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1987;25:19-41.
 93. Cobbaert C, Tricarica A. Different effects of Intralipid and triacylglycerol rich lipoproteins on Kodak Ektachem serum cholesterol determination. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993;31:107-9.
 94. da Fonseca-Wollheim F. Ultrafiltrate analysis confirms the specificity of the selected method for plasma ammonia determination. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:15-9.
 95. Roß RS, Paar D. Analytisch und klinisch relevante Interferenzen in der Gerinnungsanalytik am Beispiel des MDA 180. *J Lab Med* 1998;22:90-4.
 96. Spain MA, Wu AHB. Bilirubin interference with determination of uric acid, cholesterol, and triglycerides in commercial peroxidase-coupled assays. *Clin Chem* 1986;32:518-21.
 97. Zweig MH, Glickman J, Csako G. Analytical interference caused by incompletely clotted serum specimens. *Clin Chem* 1994;40:2325-6.
 98. Acute care testing org. Guder WG. The quality of diagnostic samples. <https://acute-care-testing.org/-/media/acute-care-testing/files/pdf/the-quality-of-diagnostic-samples.pdf> (ultimo accesso: novembre 2019)
 99. Reneke J, Ezzell J, Leslie S, et al. Prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time due to underfilled specimen tubes with 109 mmol/L (3.2%) citrate anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1998;109:754-7.
 100. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence of citrate concentration. *Am J Clin Pathol* 1998;109:595-9.
 101. Chuang J, Sadler MA, Witt DM. Impact of evacuated collection tube fill volume and mixing on routine coagulation testing using 2.5-ml (pediatric) tubes. *Chest* 2004;126:1262-6.
 102. Narayanan S. Preanalytical issues in hematology. *J Lab Med* 2003;27:243-8.
 103. Morelli B, Montaruli B, Cabodi D, et al. La variabilità preanalitica in coagulazione. *Biochim Clin* 2019;43:313-32.
 104. Walker ID. Blood collection and sample preparation: Preanalytic variation. In: Jespersen J, Bertine RM, Haverkate F, eds. *Laboratory techniques in thrombosis. A manual*. 2nd edition of the ECAT assay procedures. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1992;21-8.
 105. Polack B, Schved JF, Boneu B. Groupe d'Etude sur l'Hemostase et la Thrombose (GEHT). Preanalytical recommendations of the Groupe d'Etude sur l'Hemostase et la Thrombose (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis* 2001;31:61-8.
 106. Sarig G, Albersheim B, Stam T, et al. Quality management in hematology laboratory improved preanalytics variables. *Accredit Qual Assur* 2003;8:267-71.
 107. Bates SM, Weitz JI. Coagulation assays. *Circulation* 2005;112:53-60.
 108. Favaloro EJ, Adcock Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012;43:1-10.
 109. College of American Pathologists. Laboratory Accreditation Program. Laboratory General Checklist. http://webapps.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/checklists/laboratory_general_sep07.pdf (ultimo accesso: novembre 2019).
 110. The Joint Commission. National Patient Safety Goals Effective January 2020 - Laboratory Accreditation Program. https://www.jointcommission.org/assets/1/6/NPSG_Chapter_LAB_Jan2020.pdf (ultimo accesso: novembre 2019).
 111. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Accuracy in patient and specimen identification. Approved standard 2nd ed. CLSI documenti GP33. Wayne, PA, 2019.
 112. Valenstein PN, Raab SS, Walsh MK. Identification errors involving clinical laboratories: a College of American Pathologists Q-Probes study of patient and specimen identification errors at 120 institutions. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1106-13.

Raccomandazioni italiane di consenso per l'utilizzo dei biomarcatori in pazienti con deterioramento cognitivo lieve: Presentazione del Documento

Marcello Ciaccio^{1,2} rappresentante SIBioC nel Gruppo di Consenso, già Presidente SIBioC

¹Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata, Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare Clinica e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Palermo

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Universitario P. Giaccone, Palermo

PRESENTAZIONE

La demenza è una malattia cronico-degenerativa, caratterizzata da un progressivo deterioramento cognitivo irreversibile dovuto alla compromissione di numerose funzioni, quali la memoria ed il linguaggio, associata all'alterazione della personalità e del comportamento. Pertanto, nelle fasi avanzate della malattia, si ha la totale perdita di capacità e di autonomia del soggetto nello svolgimento delle normali attività di vita quotidiana. Da un punto di vista epidemiologico, la demenza rappresenta, oggi, una malattia con un'elevata incidenza nella popolazione ultra-sessantacinquenne. È stata, infatti, definita dal Rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e dell'Alzheimer's Disease International del 2016 (1) una priorità mondiale di salute pubblica, rappresentando la quarta causa di morte in questa fascia di età nei Paesi Occidentali. Il principale fattore di rischio per la demenza è l'invecchiamento, con oltre il 90% delle demenze che si presentano dopo i 65 anni. Pertanto, l'incremento dell'età media della popolazione generale è associato ad un costante incremento dell'incidenza di malattie cronico-degenerative, di cui la demenza rappresenta una delle forme più gravi ed invalidanti. La demenza, infatti, ha un importante impatto socio-economico, richiedendo una qualificata rete integrata di servizi sanitari e socio-assistenziali, nonché un'assistenza continua da parte dei familiari. In Italia, il costo medio annuo per assistere i soggetti affetti da demenza è stato stimato pari a 70 587 euro pro-capite, comprensivo dei costi a carico del Servizio Sanitario Nazionale, di quelli che ricadono direttamente sulle famiglie e dei costi indiretti (gli oneri di assistenza che pesano sui "caregiver").

Esistono diverse forme di demenza che, sulla base dell'eziopatogenesi, possono essere classificate in primarie, o degenerative, e secondarie. La malattia di Alzheimer (AD, Alzheimer's Disease), che fa parte delle forme primarie, rappresenta la causa più frequente di demenza. Da un punto di vista clinico, l'AD è caratterizzata da tre fasi, iniziale, intermedia e terminale, la cui durata varia da persona a persona. Inoltre, in aggiunta a questi tre stadi principali, si distinguono uno stadio preclinico e uno prodromico. Quest'ultimo, definito Mild Cognitive Impairment (MCI), è caratterizzato da un reversibile lieve declino cognitivo, in uno o più domini, rispetto ad un precedente livello di prestazioni, tale da non compromettere le normali attività della vita quotidiana del paziente. Evidenze scientifiche indicano che i soggetti con MCI presentano un rischio 5 volte superiore di sviluppare AD rispetto alla popolazione generale. Tuttavia, la MCI non è una condizione clinica esclusivamente evolutiva a demenza e studi di popolazione hanno riportato tassi di reversione ad una condizione di normalità cognitiva intorno a 1/3 dei casi. Pertanto, l'identificazione precoce dei pazienti con MCI è fondamentale per l'inizio tempestivo di percorsi di cura mirati a bloccare o, comunque rallentare, l'evoluzione a demenza.

La diagnosi di demenza si basa sull'integrazione dei risultati di diverse indagini sia cliniche che di laboratorio. Recentemente, è stata riconosciuta l'importanza della valutazione dei biomarcatori come utile strumento diagnostico per supportare sia una corretta diagnosi differenziale tra le varie forme di demenza sia l'identificazione precoce della malattia. Infatti, i nuovi criteri diagnostici per AD proposti dal National Institute on Aging e Alzheimer's Association (NIA-AA) (2) si basano sull'integrazione di dati clinici con la ricerca di biomarcatori, definibili come parametri fisiologici, biochimici o anatomici misurabili *in vivo* in grado di riflettere specifiche caratteristiche legate al processo fisiopatologico che determina la malattia. Nonostante l'importanza dei biomarcatori sia riconosciuta a livello

Corrispondenza a: Marcello Ciaccio, Via del Vespro 129, 90127 Palermo, Tel 09123865701, E-mail marcello.ciaccio@unipa.it

Ricevuto: 03.04.2020

Accettato: 08.04.2020

Publicato on-line: 18.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.039

internazionale, manca un algoritmo diagnostico che possa guidare nella pratica i clinici al loro corretto utilizzo. Pertanto, la SIBioC ha ritenuto opportuno redigere un documento multi-societario, basato su robuste evidenze di letteratura, per supportare l'utilizzo razionale e uniformato dei biomarcatori di demenza nella pratica clinica. Il presente documento di consenso, stilato da cinque Società Scientifiche italiane, sia di Medicina Clinica (Associazione Italiana di Medicina Nucleare-AMN, Associazione Italiana di Neuroradiologia-AINR, Associazione Italiana di Psicogeriatría- AIP, Federazione Alzheimer Italia, Società Italiana di Neurologia per lo studio delle demenze-SINdem) che di Medicina di Laboratorio (SIBioC), ha, quindi, l'obiettivo di rendere disponibile ai clinici uno strumento di consultazione nella routine clinica per l'impiego appropriato dei biomarcatori. Il documento è stato pubblicato su *European Journal of Neurology* (EJN 2020;27:475-83); viene qui proposta la traduzione italiana del documento per assicurarne la più ampia diffusione all'interno della comunità scientifica italiana di Medicina di Laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. World Alzheimer Report 2016 <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016> (ultimo accesso: aprile 2020)
2. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 2011;7:270-9.

Raccomandazioni italiane di consenso per una diagnosi eziologica basata sui biomarcatori in pazienti con deterioramento cognitivo lieve

M. Boccardi^{1,2}, V. Nicolosi¹, C. Festari^{1,3}, A. Bianchetti^{4,5}, S. Cappa^{1,6,7}, D. Chiasserini^{8,9}, A. Falini^{10,11,12}, U.P. Guerra^{13,14}, F. Nobili^{14,15,16}, A. Padovani^{7,17}, G. Sancesario^{9,18}, S. Morbelli^{15,16}, L. Parnetti¹⁹, P. Tiraboschi²⁰, C. Muscio²⁰, D. Perani^{10,11}, F.B. Pizzini²¹, A. Beltramello^{21,22}, G. Salvini Porro²³, M. Ciaccio^{9,24}, O. Schillaci^{25,26}, M. Trabucchi^{15,25}, F. Tagliavini²⁰, G.B. Frisoni^{1,2}

¹IRCCS Istituto Centro S. Giovanni di Dio-Fatebenefratelli, Brescia, Italy;

²University of Geneva, Geneva, Switzerland;

³University of Brescia, Brescia;

⁴Istituto Clinico S. Anna, Brescia;

⁵Italian Psychogeriatric Association (AIP), Brescia;

⁶University Institute of Higher Studies, Pavia;

⁷Italian Society of Neurology for the Study of the Dementias (SINdem), Milan;

⁸University of Perugia, Perugia;

⁹Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology – Laboratory Medicine (SIBioC), Rimini;

¹⁰IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan;

¹¹Vita-Salute San Raffaele University, Milan;

¹²Italian Association of Neuroradiology (AINR), Milan;

¹³Poliambulanza Foundation Brescia;

¹⁴Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN), Bari;

¹⁵University of Genoa, Genoa;

¹⁶IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova;

¹⁷Brescia University Hospital, Brescia;

¹⁸IRCCS Santa Lucia Foundation, Neuroimmunology Unit Via Ardeatina 354, Rome;

¹⁹Ospedale S. Maria della Misericordia University of Perugia, Perugia;

²⁰IRCCS 'Carlo Besta', Milan;

²¹Verona University Hospital, Verona;

²²IRCCS 'Sacro Cuore-Don Calabria', Negrar, Verona;

²³Federazione Alzheimer Italia, Milan;

²⁴University of Palermo, Palermo;

²⁵University Tor Vergata, Rome;

²⁶IRCCS-Neuromed, Pozzilli, Italy

Traduzione a cura di Diletta Onorato

Università degli Studi di Verona

Questo articolo è la traduzione di "Italian consensus recommendations for a biomarker-based aetiological diagnosis in mild cognitive impairment patients" Eur J Neurol 2020;27:475-83 con l'autorizzazione dell'Editore. L'articolo originale è disponibile come materiale supplementare (1S). European Journal of Neurology non è responsabile della accuratezza della traduzione. In caso di citazione, riferirsi alla pubblicazione originale.

Ricevuto: 03.04.2020

Accettato: 08.04.2020

Publicato on-line: 18.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2019.039

ABSTRACT

Italian consensus recommendations for a biomarker-based aetiological diagnosis in mild cognitive impairment patients.

Background and purpose: Biomarkers support the aetiological diagnosis of neurocognitive disorders *in vivo*. Incomplete evidence is available to drive clinical decisions; available diagnostic algorithms are generic and not very helpful in clinical practice. The aim was to develop a biomarker-based diagnostic algorithm for mild cognitive impairment patients, leveraging on knowledge from recognized national experts.

Methods: With a Delphi procedure, experienced clinicians making variable use of biomarkers in clinical practice and representing five Italian scientific societies (neurology – Società Italiana di Neurologia per le Demenze; neuroradiologia – Associazione Italiana di Neuroradiologia; biochimica – Società Italiana di Biochimica Clinica; psichiatria – Associazione Italiana di Psichiatria; medicina nucleare – Associazione Italiana di Medicina Nucleare) defined the theoretical framework, relevant literature, the diagnostic issues to be addressed and the diagnostic algorithm. An N–1 majority defined consensus achievement.

Results: The panellists chose the 2011 National Institute on Aging and Alzheimer's Association diagnostic criteria as the reference theoretical framework and defined the algorithm in seven Delphi rounds. The algorithm includes baseline clinical and cognitive assessment, blood examination, and magnetic resonance imaging with exclusionary and inclusionary roles; dopamine transporter single-photon emission computed tomography (if no/unclear parkinsonism) or metaiodobenzylguanidine cardiac scintigraphy for suspected dementia with Lewy bodies with clear parkinsonism [round VII, votes (yes-no-abstained):3-1-1]; 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for suspected frontotemporal lobar degeneration and low diagnostic confidence of Alzheimer's disease (round VII, 4-0-1); cerebrospinal fluid for suspected Alzheimer's disease (round IV, 4-1-0); and amyloid positron emission tomography if cerebrospinal fluid was not possible/accepted (round V, 4-1-0) or inconclusive (round VI, 5-0-0).

Conclusions: These consensus recommendations can guide clinicians in the biomarker-based aetiological diagnosis of mild cognitive impairment, whilst guidelines cannot be defined with evidence-to-decision procedures due to incomplete evidence.

INTRODUZIONE

I biomarcatori supportano la diagnosi eziologica della malattia di Alzheimer (AD) e di altri disturbi neurocognitivi che sono inseriti nella diagnosi differenziale di AD, anche in uno stadio clinico prodromico di deterioramento cognitivo lieve (MCI). Il loro impiego può migliorare la diagnosi del crescente numero di pazienti con MCI che si presentano nei centri specializzati dei disturbi della memoria. Un'accurata diagnosi precoce permette di affrontare la malattia, prima che si sviluppi la disabilità, con trattamenti già disponibili o sperimentali, cambiamenti di stile di vita o strategie logistiche. È prevedibile che un intervento precoce possa avere un maggiore impatto clinico, aumenti la durata della vita attiva ed indipendente, ne migliori la qualità e diminuisca il carico sociale e i costi della malattia. La diagnosi di MCI pertanto merita sforzi mirati per un adeguato utilizzo dei biomarcatori nelle procedure diagnostiche cliniche (1).

Tuttavia, la validazione di questi biomarcatori è ancora in corso, e le evidenze del loro valore diagnostico comparativo e combinato, che sono richieste per definire un algoritmo diagnostico, sono tutt'ora incomplete (1). Le istruzioni per il loro impiego sono incluse nei criteri di consenso specifici per l'uso appropriato dei singoli biomarcatori o nei criteri diagnostici di ricerca specifici di malattia (2S-Sezione 1). Per quanto a noi noto, non è disponibile un algoritmo clinico diagnostico globale fondato sull'utilizzo di biomarcatori multipli per MCI (1). I biomarcatori sono pertanto usati in modo diverso nei

diversi centri, a seconda dell'esperienza dei clinici o di contingenze logistiche (vicinanza del laboratorio, liste d'attesa, accettabilità percepita) (2, 3).

Con questo lavoro, si è cercato un consenso intersocietario su un algoritmo diagnostico, basato sui biomarcatori per la diagnosi eziologica di deterioramento neurocognitivo in pazienti con MCI, in modo da aiutare gli esperti di demenza nei centri italiani che si occupano specificamente del problema.

METODI

Da Giugno 2017 ad Ottobre 2018 è stata condotta una procedura di consenso Delphi che ha coinvolto le 5 società scientifiche italiane pertinenti. Ognuna ha partecipato con un singolo voto, nominando uno o più delegati ufficiali con specifiche competenze (2S-Tabella 1): medicina nucleare [Associazione Italiana di Medicina Nucleare (AIMN)] (UPG, FN), neuroradiologia [Associazione Italiana di Neuroradiologia (AINR)] (AF), psichiatria [Associazione Italiana di Psichiatria (AIP)] (AB), medicina di laboratorio [Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBioC)] (GS, MC) e neurologia [Società Italiana di Neurologia per le Demenze (SIndem)] (SC, AP).

I facilitatori di Delphi avevano tutti esperienza sui biomarcatori per AD. I membri del gruppo di esperti hanno concordato sul quadro teorico di riferimento [criteri diagnostici del 2011 dell'Istituto Nazionale dell'Invecchiamento e Associazione dell'Alzheimer (NIA-AA) (4)], sull'ambito di applicazione [diagnosi (dei

pazienti allo stadio MCI]), sulle strutture (centri italiani specializzati nei disturbi della memoria); sui destinatari (esperti di demenza - di solito neurologi o geriatri), sulla selezione della letteratura e delle tematiche da trattare. È stato estrapolato un algoritmo diagnostico iniziale dalla letteratura selezionata (2S-Tabella 2), ricapitolando uguaglianze e differenze nella scelta delle indagini e nella tempistica di prescrizione delle procedure diagnostiche (2S-Figura 1). Successivamente, il metodo Delphi ha risolto le incongruenze e aggiornato l'algoritmo, integrandovi i recenti progressi scientifici sui biomarcatori. I membri del gruppo di studio hanno motivato ogni risposta e si sono potuti astenere dalla votazione sulla base delle competenze personali. Nelle sedute successive, i membri del gruppo di lavoro hanno ricevuto le statistiche e le risposte originali anonime. Si è raggiunto il consenso con la maggioranza di almeno "(N votanti) -1".

In questo lavoro non è inclusa alcuna informazione individuale che necessitava di approvazione etica.

RISULTATI

L'algoritmo diagnostico di consenso, definito in 7 sedute di Delphi (Tabella 1), consta di vari livelli di valutazione: iniziale (generale T0; dettagliato T1), con biomarcatori (T2) e di risoluzione delle ambiguità (T3) (Figura 1).

Valutazione di base generale (T0)

Durante la prima visita nel centro specializzato nei disturbi della memoria, i pazienti dovrebbero essere sottoposti ad una valutazione clinica generale, neurologica e cognitiva, esami biochimici ed indagini di neuroimaging strutturali (Figura 1). In Italia, i pazienti indirizzati agli specialisti sono normalmente conosciuti e seguiti dai medici di medicina generale. È comunque raccomandato di eseguire una valutazione clinica approfondita (2S-Sezione 2) per evidenziare qualsiasi causa di deterioramento cognitivo non neurodegenerativa, che non sia stata rilevata in precedenza. In aggiunta a quanto indicato nelle linee guida italiane (5)¹, gli esami di laboratorio dovrebbero valutare anche la funzionalità renale, epatica e le possibili cause infettive, se plausibili per il singolo paziente (2S-Sezione 3). Le abilità intellettive globali andrebbero valutate con la Valutazione Cognitiva Montreal (6) (2S-Sezione 4). La risonanza magnetica cerebrale (RMN) dovrebbe essere eseguita all'inizio per scopi non solo di esclusione, ma anche di inclusione (valutazione di atrofia temporale mediale o altre anomalie). La RMN dovrebbe essere prescritta dall'esperto in demenza, acquisita con un protocollo

standard (2S-Tabella 3) e valutata in centri competenti o da specialisti adeguatamente preparati. Anche in uno stadio prodromico, la RMN fornisce informazioni accurate su degenerazione, vascolarizzazione o caratteristiche tipiche di disordini meno comuni, come ad esempio la malattia di Creutzfeldt-Jacob (7) e andrebbe preferita alla tomografia computerizzata (TC) fino all'età di 85 anni (i biomarcatori radiologici di neurodegenerazione hanno minor impatto diagnostico in età più avanzata – Tabella 1, T0-D).

Valutazione di base specifica (T1)

Se i dati clinici sono coerenti con un possibile disturbo neurodegenerativo, un esame clinico più approfondito fornisce un'ipotesi eziologica diagnostica guidando la prescrizione dei biomarcatori. Oltre alle condizioni mediche (nutrizione, sonno, terapia farmacologica; 2S-Sezione 6), la valutazione cognitiva dovrebbe coprire tutte le principali aree ed essere idealmente standardizzata in tutti i centri (2S-Sezione 5). La valutazione dell'autonomia funzionale dovrebbe essere concepita per i tempi attuali (ad esempio digitale) ed evitare errori di genere (8) (2S-Sezione 6). È opportuno valutare la depressione e l'ansia con le comuni scale approvate.

Valutazione basata sui biomarcatori (T2)

Le diverse combinazioni d'informazione acquisite guidano le indagini successive (Figura 1).

Se l'ipotesi diagnostica principale è la demenza a corpi di Lewy (DLB), la TC ad emissione di fotoni singoli per trasportatore di dopamina (DaT-SPECT) può escludere AD quando il parkinsonismo è assente o poco chiaro. La scintigrafia miocardica con metaiodobenzilguanidina (¹²³I-MIBG) ha maggiore specificità diagnostica (9,10), sebbene non sia ancora rimborsata per questo scopo diagnostico. In pazienti con parkinsonismo evidente, i pattern di ipometabolismo riscontrati sia con ¹²³I-MIBG che con la tomografia ad emissione di positroni con 18F-fluorodeossiglucosio (FDG-PET), sono più informativi rispetto alla più accettata DaT-SPECT (11,12).

Se la degenerazione lobare frontotemporale (FTLD) è la principale ipotesi diagnostica, i differenti quadri di ipometabolismo frontale e temporoparietale aiutano la diagnosi differenziale con AD nella maggior parte dei casi (11, 13). Circa un terzo dei pazienti con demenza fronto-temporale (FTD) può presentare parkinsonismo, spesso associato con DaT-SPECT alterata. In questi casi, un'attenta indagine, volta ad escludere la presenza di altri sintomi/segni neurologici o disautonomici associati e il quadro di ipometabolismo alla FDG-PET,

¹Nota del traduttore. La Linea Guida Italiana "Impiego delle tecniche di imaging nelle demenze" del 2013 prescrive l'esecuzione di: emocromo, elettroliti, calcio, glucosio, TSH, vitamina B12. È invece sconsigliata la determinazione di omocisteina nonché il test genetico per apolipoproteina E; mentre la misura dell'acido folico è riservata ai pazienti con sospetto deficit nutrizionale di cereali. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1517_allegato.pdf

Tabella 1

Decisioni motivate secondo la metodologia Delphi che definiscono l'algoritmo diagnostico per la diagnosi eziologica dei disordini neurocognitivi in pazienti con deterioramento cognitivo lieve (MCI)

	Raccomandazione	Sessione Delphi n° voti (si, no, astenuti)	Motivazione
	Cornice teorica Adottare i criteri diagnostici NIA-AA del 2011 per MCI (4)	S-I, 5-0-0	Valutare i pazienti con disturbo oggettivo ed evidenza di neurodegenerazione riduce i falsi positivi. I criteri NIA-AA sono facilmente applicabili nella pratica clinica
Valutazione generale iniziale (T0)			
T0-A	Esame clinico Eseguire un'accurata valutazione clinica alla prima visita, coerentemente con il protocollo del "Queen square dementia group"	S-I, 5-0-0	La precedente valutazione e l'attenzione alle cause non degenerative di disturbo cognitivo attuate presso il medico di medicina generale non dovrebbero essere date per scontate
T0-B	Esami biochimici In aggiunta a quelli raccomandati dall'ISS (5), determinare anche urea, creatinina, transaminasi e bilirubina; considerare sifilide, Borrelia, HIV, se pertinenti	S-II, 5-0-0	Completare la valutazione per rilevare qualsiasi possibile causa di disturbo cognitivo con costi ragionevoli
T0-C	Valutazione cognitiva globale Usare il MoCA (6) o, se non è possibile, altri test che siano stati validati in Italia (esempio: MMSE, ACE-R (37, 38)	S-IV, 4-0-1	MoCA è più sensibile di MMSE nel rilevare MCI e demenza. MMSE ha poca specificità per persone con basso grado di istruzione e poca sensibilità per quelli con alto grado di istruzione (39)
	Se si deve usare MMSE, integrare la valutazione delle funzioni esecutive e della memoria (esempio: il test del disegno dell'orologio (40); il test go-no-go (41), il test tre-oggetti-tre- luoghi (42)	S-I,5-0-0	Gli esercizi di memoria del MMSE sono troppo facili per persone con un alto livello di istruzione; lo studio della funzione frontale non è sufficiente; l'esame ha un elevato "ceiling effect" (39)
T0-D	Neuroimaging strutturale Prescrivere una RMN alla prima visita e usarla sia per scopo di inclusione che esclusione	S-I, 5-0-0	Per escludere cause non degenerative di deterioramento cognitivo e per valutare la neurodegenerazione, la vascolarizzazione e le anomalie connesse con la capacità cognitiva
	Usare RMN piuttosto che TC	S-III, 5-0-0	Maggior valore informativo sulle alterazioni cerebrali potenzialmente causa di disturbo cognitivo
	Eseguire RMN sulla base di un protocollo standard minimo come riferimento (43)	S-I, 5-0-0	Permette una valutazione accurata e standardizzata tra i centri
	Se possibile, eseguire una valutazione quantitativa dell'atrofia cerebrale con RMN, tramite strumenti automatizzati appropriatamente validati	S-V, 5-0-0	Migliorare l'accuratezza e la standardizzazione della lettura.
	Valutare l'atrofia cerebrale alla RMN almeno con scale visive/qualitative validate appropriatamente	S-V, 5-0-0	In mancanza di lettura automatizzata, le scale di visione validate sono comunque più accurate rispetto alla lettura soggettiva
	TC è accettabile sopra gli 85 anni	S-II, 3-1-1	La TC è meno sensibile rispetto alla RMN. Comunque, l'informazione radiologica ha minor utilità diagnostica ad una età più avanzata
Valutazione dettagliata iniziale (T1)			
T1-A	Visita clinica dettagliata Raccogliere informazioni sulla dominanza della mano, le condizioni di vita e familiari, costipazione, urgenza minzionale o incontinenza, disturbi del sonno (vedi materiale supplementare)	S-III, 5-0-0	La valutazione iniziale è rilevante per la diagnosi eziologica. Pertanto, le condizioni dei pazienti devono essere valutate esaustivamente
	Accertare le attività strumentali con scale che superano le tipiche limitazioni culturali, come A-IADL (8, 44)	S-II, 3-0-2	L'A-IADL, anche nella versione breve, è più aggiornata (indaga l'uso indipendente degli apparecchi digitali) e meno soggetta agli errori di valutazione basati sul sesso delle IADL tradizionali

Tabella 1

Continua

T1-B	Valutare depressione ed ansia alla prima visita usando le scale accettate disponibili	S-III, 4- 1 – 0	Condizioni psichiatriche possono essere una causa di disturbo cognitivo non degenerativo (45)
	Valutare lo stato di nutrizione con MNA (46) e MUST (47)	S-III, 5-0-0	Le carenze nutritive sono associate a disturbi cognitivi. Esiti correlati alla malnutrizione come sarcopenia, depressione, decadimento cognitivo, cadute, ritardata risposta immunitaria e aumentato rischio di infezione contribuiscono alla fragilità (48, 49)
	Valutazione cognitiva dettagliata Usare possibilmente prove omologhe a UDS-3 (50) che siano state validate in Italia, il test di memoria libera e guidata (51) e un test di abilità sociale (52)	S-VI, 4-0-1	È necessaria una valutazione standard per fornire ai pazienti informazioni ampiamente fruibili e per facilitare i clinici. L'UDS-3 supera le limitazioni delle valutazioni standard precedenti (CERAD) (53), soprattutto la limitata sensibilità nei pazienti con MCI (54), ed è pertanto più adeguato per il nostro scopo
Valutazione dei biomarcatori (T2)			
T2-A	DLB come ipotesi diagnostica primaria Se il paziente presenta chiari segni di parkinsonismo, prescrivere ¹²³ I-MIBG scintigrafia miocardica come esame di prima scelta o FDG-PET come seconda scelta.	S-VII, 3-1-1	Sebbene non universalmente accettato, ¹²³ I-MIBG è più informativo e specifico di altri esami (9)
	Se il parkinsonismo non è chiaro prescrivere ¹²³ I-MIBG scintigrafia miocardica o DaT-SPECT	S-VII, 3-1-1	¹²³ I-MIBG è più specifico di DaT-SPECT (9). La sensibilità di DaT-SPECT è comunque alta, e sono disponibili strumenti semi-quantitativi ben accettati
T2-B	FTLD come ipotesi diagnostica primaria Prescrivere FDG-PET quando AD e DLB non sono plausibili come diagnosi differenziali (ad esempio FTLD),	S-VIII, 4-0-1	Un quadro con ipometabolismo frontale e normalità temporoparietale esclude AD (11, 13)
T2-C	AD come diagnosi possibile		
	Coerenza tra clinica e dati RMN Prescrivere l'esame LCS in pazienti al di sotto dei 75 anni	S-IV, 5-0-0	Informativo e con buon rapporto costo beneficio per studiare l'eziologia
	Prescrivere l'esame LCS in base all'impatto clinico atteso in pazienti tra i 75-85 anni	S-II, 4-1-0	Alta variabilità di impatto clinico potenziale in questo intervallo d'età
	Prescrivere l'esame LCS in pazienti con più di 85 anni non è necessario	S-IV, 5-0-0	Informazioni aggiuntive hanno di solito un impatto clinico limitato in età avanzata
	Incoerenza tra dati clinici e RMN Prescrivere sia LCS (14) che FDG-PET(11)	S-IV, 4-1-0	Quando RMN è negativa, FDG-PET può fornire prova di disfunzione sinaptica che denota neurodegenerazione
Risoluzione delle cause indefinite (T3)			
T3-A	Diagnosi ancora indefinita dopo la valutazione T2 Prescrivere FDG-PET, se non eseguita precedentemente	S-VII, 4-1-0	La FDG-PET è più sensibile nella neurodegenerazione precoce rispetto alla RMN. Il quadro di ipometabolismo è informativo e fornisce valore diagnostico incrementale nei casi clinicamente incerti. È incluso nei criteri diagnostici della maggior parte delle malattie neurodegenerative (4, 10, 55, 56)
	Prescrivere PET-amiloide, se la diagnosi è ancora indefinita dopo una valutazione completa	S-VI, 5-0-0	È una misura più diretta dell'amiloidosi cerebrale, informativa (per i valori di riferimento, vedi riferimento 20) soprattutto con valori borderline dei parametri LCS - (20). Può fornire valore diagnostico incrementale aggiuntivo alla FDG-PET (18, 19)
Precisazioni sulla valutazione radiologica			
	La perfusione SPECT non dovrebbe essere usata in modo intercambiabile con FDG-PET	S-III, 0-5-0	La FDG-PET è più sensibile e ha maggior risoluzione spaziale rispetto alla perfusione SPECT (21)
	Valutare FDG-PET con i metodi di quantificazione approvati	S-V, 5-0-0	Maggior accuratezza e concordanza (57)

Tabella 1
Continua

Dal momento che mancano strumenti di quantificazione, valutare le scansioni di FDG-PET e RMN con scale visuali qualitative	S-VI, 4-1-0	L'uso di scale visive migliora l'accuratezza e la concordanza nella lettura (43, 57)
Se si richiede la valutazione dell'amiloidosi cerebrale al T2, prescrivere PET-amiloido solo se la puntura lombare è controindicata o rifiutata	S-V, 4-1-0	Accertare l'amiloidosi cerebrale è rilevante per la prognosi e la terapia, ma l'analisi del LCS è più efficace dal punto di vista costo-beneficio (oltre che più economico, fornisce anche informazioni sulle tauopatie) (15)
Valutare le scansioni di PET-amiloido con i metodi accettati di quantificazione	S-VI, 5-0-0	Migliore accuratezza e concordanza (17)

¹²³I-MIBG, Metaiodobenzilguanidina; ACE-R, Valutazione Cognitiva di Addenbrooke; AD, Malattia di Alzheimer; A-IADL, Indice di Dipendenza nelle Attività Strumentali della Vita Quotidiana secondo Amsterdam; CERAD, Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; LCS Liquido cerebrospinale; TC, Tomografia Computerizzata; DaT, Trasportatore di Dopamine; DLB, Demenza a Corpi di Lewy; FDG, 18F-Fluorodeossiglucosio; FTLT, Degenerazione Lobare Frontotemporale; HIV, Virus dell'Immunodeficienza Umana; ISS, Istituto Superiore di Sanità (NIH Italiana); MCI, Deterioramento Cognitivo Lieve; MMSE, Mini-Mental State Examination; MNA, Mini Nutritional Assessment; MoCA, Valutazione Cognitiva Montreal; RMN, Risonanza Magnetica Nucleare; MUST, Strumento di Screening Universale della Malnutrizione; NIA-AA, Istituto Nazionale dell'Invecchiamento e Associazione dell'Alzheimer; PET, Tomografia ad Emissione di Positroni; SPECT, Tomografia Computerizzata ad Emissione di Singolo Fotone; T0, Valutazione iniziale generale; T1, Valutazione iniziale dettagliata; T2, Valutazione dei biomarker; T3, Risoluzione delle diagnosi non definite; UDS-3, Uniform Data Set

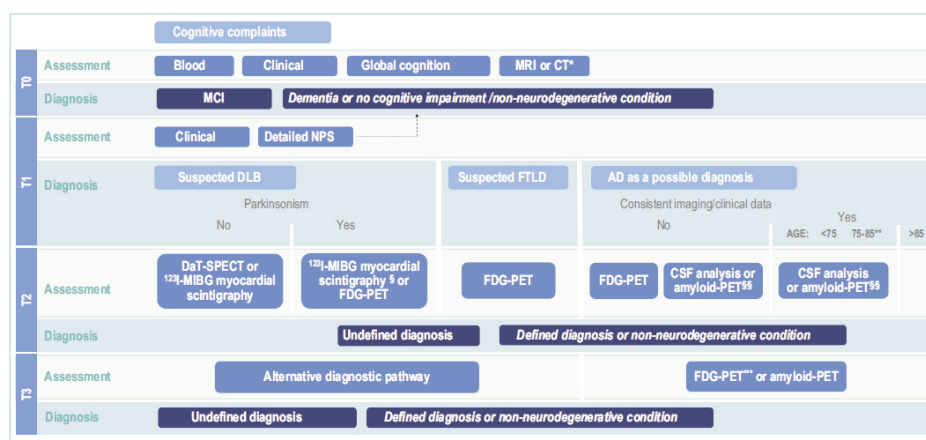


Figura 1

Algoritmo diagnostico di consenso per la diagnosi eziologica nei pazienti con MCI nei centri specializzati dei disturbi della memoria. T0, Valutazione di base generale. T1, Valutazione di base specifica. T2, Valutazione basata sui biomarcatori. T3, Disambiguazione delle eziologie non ancora definite.

*TC dovrebbe essere usata solo se la RMN non è disponibile o è controindicata. Inoltre, è accettabile in pazienti con più di 85 anni per il minor impatto dei biomarcatori di imaging sulla diagnosi in età avanzata.

**A causa dell'ampia variabilità individuale, ulteriori esami al di sopra dei 75 anni dovrebbero essere prescritti sulla base dell'impatto clinico potenziale per il singolo paziente.

***Se non ancora eseguita, la FDG-PET è l'esame di prima scelta per i pazienti con possibile AD, la cui diagnosi è ancora incerta al T2.

§Nonostante la maggiore validazione, l'autorizzazione attuale e il rimborso, DaT-SPECT fornisce un valore aggiunto limitato se il paziente presenta chiari segni di parkinsonismo.

§§Se l'analisi del LCS non è possibile, prescrivere la PET-amiloido per valutare l'amiloidosi cerebrale al T2.

LCS, Liquido cerebrospinale; TC, Tomografia computerizzata; DaT, Trasportatore di dopamina; FDG, 18F-Fluorodeossiglucosio; MCI, Deterioramento cognitivo lieve; RMN, Risonanza magnetica nucleare; NPS, Neuropsicologia; PET, Tomografia ad emissione di positroni; SPECT, Tomografia computerizzata ad emissione di singolo fotone; ¹²³I-MIBG Metaiodobenzilguanidina.

può aiutare a differenziare la FTD con parkinsonismo da malattia di Parkinson, Atrofia Multipla Sistemica (MSA), paralisi sopranucleare progressiva e degenerazione corticobasale (11,12). Inoltre, il ridotto legame di MIBG alla scintigrafia miocardica esclude in modo inequivocabile la FTD prodromica, indicando MCI dovuto a DLB.

Con AD sospetta, i differenti scenari clinici indirizzano la ricerca dei biomarcatori (Figura 1, Tabella 1). Una RMN negativa richiede una FDG-PET per evidenziare il danno neuronale precoce (11, 13). Con RMN o FDG-PET positivi, i biomarcatori come l'amiloide β_{1-42} ($A\beta_{42}$) e la proteina tau (tau totale e fosforilata T-tau e p-tau181) nel liquido cerebrospinale (LCS) sono l'esame di prima scelta per ricercare l'eziologia fino all'età di 75 anni (14). Tra i 75 e gli 85 anni l'impatto clinico di ulteriori esami clinici dovrebbe essere valutato e discusso con il singolo paziente ed potrebbe essere limitato oltre gli 85 anni. A questo livello di investigazione clinica, si raccomanda la più costosa PET-amiloide solo quando la puntura lombare è controindicata o rifiutata (15).

Disambiguazione delle eziologie non ancora definite (T3)

Se non eseguita precedentemente, la FDG-PET può spiegare casi ancora indefiniti dopo l'indagine per AD. La PET-amiloide (16, 17) può chiarire i casi con valori borderline di $A\beta_{42}$ nel LCS (18, 19)².

I casi ancora indeterminati al T2 possono beneficiare della valutazione con un diverso percorso diagnostico. Per esempio, casi insoliti di parkinsonismi atipici che si presentano con MCI (ad esempio paralisi sopranucleare progressiva, MSA), ma privi di altri segni o sintomi neurologici (12), possono essere chiariti dalla FDG-PET (se non ancora eseguita) (21) e confermati tramite DaT-SPECT. I casi non definiti al termine del percorso diagnostico possono essere attribuiti a cause psichiatriche, uso eccessivo di farmaci o invecchiamento non patologico, e possono richiedere una valutazione da parte di altri specialisti.

Raccomandazioni ulteriori

Per una maggior accuratezza e affidabilità, i membri del gruppo di esperti raccomandano di analizzare le scansioni di neuroimaging con metodi approvati di valutazioni quantitative o semiquantitative, o con scale visive accettate (Tabella 1, T0-D, e [2S-Sezione 4](#)). La FDG-PET ha maggior sensibilità e risoluzione spaziale rispetto alla SPECT di perfusione e questi due esami non sono intercambiabili.

In particolare, il punto di vista dei pazienti deve essere tenuto in primaria considerazione nelle scelte del

percorso diagnostico. Un'attenzione speciale va dedicata all'uso del linguaggio nella comunicazione fra medico e paziente (o loro rappresentanti) ([2S-Sezione 7](#)).

DISCUSSIONE

Con questo lavoro, si è definito un algoritmo diagnostico di consenso, basato sui biomarcatori, per guidare i clinici dei centri italiani dei disturbi della memoria ad un uso razionale ed armonizzato dei più consolidati biomarcatori eziologici per la diagnosi causale di disturbi neurocognitivi in pazienti con MCI. L'algoritmo include biomarcatori per i quali, le evidenze pubblicate al momento ancora non permettono una definizione "evidence-to-decision" del loro uso combinato (1).

Coerentemente con il quadro NIA-AA 2011, questo algoritmo diagnostico è stato ideato per ridurre al minimo i falsi positivi e, se possibile, gli approfondimenti superflui, completando il percorso diagnostico solo in pazienti con segni obiettivi sia di deterioramento cognitivo che di neurodegenerazione. Le decisioni degli esperti sono in armonia con le attuali linee guida cliniche e con i più aggiornati criteri diagnostici di ricerca e progressi scientifici; seguendo le istruzioni europee per la definizione delle linee guida (22), il punto di vista dei pazienti è previsto e incoraggiato come componente fondamentale nel percorso diagnostico ([2S-Sezione 7](#)). Per quanto a noi noto, un tale algoritmo è nuovo in questo ambito e potrebbe ricoprire un ruolo nel favorire lo sviluppo di future linee guida decisionali basate sull'evidenza.

L'algoritmo include i biomarcatori più avanzati per la diagnosi eziologica dei disordini neurocognitivi. Tuttavia, alcuni di essi non sono ancora approvati o rimborsati dagli enti regolatori e dai fornitori di assistenza sanitaria, e la loro validazione è spesso incompleta (1).

Di conseguenza, questi esami andrebbero prescritti con la consapevolezza di questa limitazione; la loro valutazione e refertazione dovrebbe essere eseguita in centri esperti o da personale adeguatamente formato, sulla base delle procedure più avanzate e provvedendo ad un'adeguata comunicazione ai pazienti e a coloro che li assistono (1, 23, 24).

Tenersi aggiornati sugli sviluppi in questo ambito è essenziale. Le priorità di ricerca per tale progresso includono la valutazione formale del valore diagnostico incrementale relativo e combinato per i biomarcatori più consolidati (1, 25) specificamente calcolato per le diagnosi di DLB, FTLT e AD, e per superare i più frequenti errori metodologici (26).

Inoltre, per i biomarcatori di neuroimaging già consolidati che traggono beneficio da valutazioni

²Stante l'assenza di armonizzazione tra i diversi metodi disponibili per la misura di $A\beta_{42}$, T-tau e p-tau181, i valori di riferimento per questi analiti sono strettamente metodo dipendenti (Biochim Clin 2018;42:39-43). Molinuevo et al (20) suggeriscono di definire "borderline", i valori che si discostano dal valore soglia del metodo di -10% per $A\beta_{42}$ o di +10% per T-tau e p-tau₁₈₁

quantitative automatiche o semiautomatiche, la selezione di strumenti ad elevata prestazione o la dimostrazione di pari equivalenza dovrebbe essere eseguita con priorità, insieme con la validazione appropriata di strumenti selezionati, la definizione e l'implementazione di procedure operative standard (2S-Tabella 4).

All'interno del ramo diagnostico dell'AD, i membri del gruppo di lavoro hanno dato priorità all'esame del LCS più che alla PET-amiloide, per il minor costo e il maggior spettro d'informazioni. Un'esatta valutazione delle diverse caratteristiche dei pro e contro dei due esami è, comunque, complessa: la limitata flessibilità e l'invasività della valutazione dei biomarcatori liquorali si è dimostrata ingiustificata (3, 15). Comunque, il loro potenziale informativo sull'amiloidosi cerebrale è indiretto, e la loro affidabilità rimane un problema. Piattaforme recenti completamente automatizzate migliorano l'affidabilità dei risultati, ma non sono ancora sufficientemente diffuse nelle realtà cliniche. Nonostante la variabilità dei valori assoluti (27), la partecipazione ai programmi di controllo di qualità garantisce un'appropriatezza valutazione perseguendo la riduzione della variabilità preanalitica e analitica (28); l'adesione dei singoli laboratori può essere impegnativa, ma è altamente raccomandata.

La SPECT del trasportatore della dopamina ha un ruolo ben stabilito nella diagnosi differenziale tra DLB e AD (9, 10, 29). Comunque, la DaT-SPECT ha un limitato valore aggiunto nella DLB sospetta con parkinsonismo chiaro e non può escludere altre sindromi neurodegenerative parkinsoniane che si presentano con deterioramento cognitivo (9). Inoltre, circa il 10% dei pazienti con DLB può avere una deposizione dei corpi di Lewy nella fase prodromica, soprattutto nella regione limbica e corticale, e pertanto una DaT-SPECT iniziale normale (29). La scintigrafia miocardica ¹²³I-MIBG è dunque più accurata (9) ed è inclusa nei più recenti criteri diagnostici (10), nonostante non sia al momento completamente validata (30). Il diabete, alcune patologie cardiache e l'utilizzo di alcuni farmaci possono interferire con l'assorbimento di ¹²³I-MIBG. Sebbene tale interferenza non sia stata evidenziata in almeno 3 coorti "naturalistiche" di pazienti con demenza che sono stati sottoposti all'esame (9, 31, 32), l'impatto di questi possibili interferenti dovrebbe essere ulteriormente valutato in campioni più ampi. Al momento, i clinici italiani possono prescrivere la scintigrafia cardiaca ¹²³I-MIBG a soggetti con disturbi neurocognitivi solo con prescrizione off-label. Inoltre, diversamente dalla DaT-SPECT, linee guida procedurali formali (33) o approcci semiquantitativi per la valutazione delle scansioni di scintigrafia cardiaca con ¹²³I-MIBG non sono disponibili o non ancora approvati.

Infine, la richiesta di un pannello di biomarcatori, così come l'interpretazione dei risultati, dovrebbero considerare che i pazienti spesso presentano patologie miste (amiloidosi, corpi di Lewy, vasculopatie). Il peso relativo delle malattie concomitanti nel causare deterioramento cognitivo può essere difficile da

riconoscere. Il presente consenso non ha affrontato specificatamente le forme miste, ma le riconosce come una fonte di incertezza nei singoli pazienti. Infine, le analisi genetiche, che potrebbero essere richieste dai pazienti, andrebbero eseguite solo sulla base della presenza di precise circostanze (ad esempio anamnesi familiare, età all'insorgenza e quadro clinico) e seguendo le linee guida pubblicate (34).

RICONOSCIMENTI

Queste raccomandazioni rappresentano l'opinione delle società scientifiche ufficialmente rappresentate da: Flavio Nobili e Ugo Paolo Guerra per AIMN (approvazione formale societaria finale Febbraio 2019); Andrea Falini per AINR (Febbraio 2019); Marco Trabucchi per AIP (Gennaio 2019); Giulia Sancesario e Marcello Ciaccio per SIBioC (approvazione a priori della società); Stefano Coppa per SINDem (Marzo 2019); e Gabriella Salvini Porro per la Federazione Alzheimer Italia (Febbraio 2019). Il lavoro è stato finanziato dal fondo del ministero della salute italiano NET-2011-02346784 e dal fondo EU-EFPIA Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking grant 115952 (AMYPAD).

BIBLIOGRAFIA

1. Frisoni GB, Boccardi M, Barkhof F, et al. Strategic roadmap for an early diagnosis of Alzheimer's disease based on biomarkers. *Lancet Neurol* 2017;16:661–676.
2. Bocchetta M, Galluzzi S, Kehoe PG, et al. The use of biomarkers for the etiologic diagnosis of MCI in Europe: an EADC survey. *Alzheimer's Dement* 2015;11:195–206.e1.
3. Sancesario GM, Toniolo S, Chiasserini D, et al. The clinical use of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis: the Italian Selfie. *J Alzheimers Dis* 2017; 55:1659–1666.
4. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 2011;7:270–279.
5. Istituto Superiore di Sanità (Italian NIH). Impiego delle tecniche di imaging nelle demenze. Sistema Nazionale per le Linee Guida. 2010; Update 2013. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1517_allegato.pdf
6. Conti S, Bonazzi S, Laiacona M, Masina M, Coralli MV. Montreal Cognitive Assessment (MoCA)-Italian version: regression based norms and equivalent scores. *Neurol Sci*. 2015;36:209–314.
7. Novi G, Canosa A, Nobili F, et al. Longitudinal brain magnetic resonance imaging and real-time quaking induced conversion analysis in presymptomatic Creutzfeldt–Jakob disease. *Eur J Neurol*. 2018;25:e127–e128.
8. Jutten RJ, Peeters CFW, Leijdesdorff SMJ, et al. Detecting functional decline from normal aging to dementia: development and validation of a short version of the Amsterdam IADL Questionnaire. *Alzheimer's Dement* 2017;8:26–35.
9. Tiraboschi P, Corso A, Guerra UP, et al. (123)I-FP-CIT

- SPECT and 123I-MIBG in differentiating dementia with Lewy bodies from other dementias: a comparative study. *Ann Neurol* 2016;80:368–378.
10. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* 2017;89:88–100.
 11. Nobili F, Arbizu J, Bouwman FH, et al. EANM-EAN recommendations for the use of brain 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDGPET) in neurodegenerative cognitive impairment and dementia: Delphi consensus. *Eur J Neurol* 2018;25:1201–1217.
 12. Walker Z, Gandolfo F, Orini S, et al. Clinical utility of FDG PET in Parkinson's disease and atypical parkinsonism associated with dementia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018;45:1534–1545.
 13. Arbizu J, Festari C, Altomare D, et al. Clinical utility of FDG-PET for the clinical diagnosis in MCI. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018;45:1497–1508.
 14. Herukka SK, Simonsen AH, Andreasen N, et al. Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment. *Alzheimer's Dement* 2017;13:285–295.
 15. Engelborghs S, Niemantsverdriet E, Struyfs H, et al. Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. *Alzheimer's Dement* 2017;8:111–126.
 16. Johnson KA, Minoshima S, Bohnen NI, et al. Appropriate use criteria for amyloid PET: a report of the Amyloid Imaging Task Force, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the Alzheimer's Association. *Alzheimers Dement*. 2013;9:e-1-16.
 17. Guerra UP, Nobili FM, Padovani A, et al. Recommendations from the Italian Interdisciplinary Working Group (AIMN, AIP, SINDEM) for the utilization of amyloid imaging in clinical practice. *Neurol Sci*. 2015;36:1075–1081.
 18. Brendel M, Schnabel J, Schonecker S, et al. Additive value of amyloid-PET in routine cases of clinical dementia work-up after FDG-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44:2239–2248.
 19. Frederiksen KS, Hasselbalch SG, Hejl AM, Law I, Hojgaard L, Waldemar G. Added Diagnostic Value of (11)C-PIB-PET in Memory Clinic Patients with Uncertain Diagnosis. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2012;2:610–621.
 20. Molinuevo JL, Blennow K, Dubois B, et al. The clinical use of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimer's Dement* 2014;10:808–817.
 21. Hellwig S, Amtage F, Kreft A, et al. 18FFDG-PET is superior to 123IIBZM-SPECT for the differential diagnosis of parkinsonism. *Neurology* 2012;79:1314–1322.
 22. Leone MA, Brainin M, Boon P, Pugliatti M, Keindl M, Bassetti CL. Guidance for the preparation of neurological management guidelines by EFNS scientific task forces – revised recommendations 2012. *Eur J Neurol* 2013;20:410–419.
 23. Porteri C, Albanese E, Scerri C, et al. The biomarkerbased diagnosis of Alzheimer's disease. 1 – Ethical and societal issues. *Neurobiol Aging* 2017;52:132–140.
 24. de Wilde A, van Buchem MM, Otten RHJ, et al. Disclosure of amyloid positron emission tomography results to individuals without dementia: a systematic review. *Alzheimers Res Ther* 2018;10:72.
 25. Boccardi M, Gallo V, Yasui Y, et al. The biomarkerbased diagnosis of Alzheimer's disease. 2 – Lessons from oncology. *Neurobiol Aging* 2017;52:141–152.
 26. Boccardi M, Festari C, Altomare D, et al. Assessing FDG-PET diagnostic accuracy studies to develop recommendations for clinical use in dementia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018;45:1470–1486.
 27. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, et al. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimer's Dement* 2011;7:386–95.e6.
 28. Fourier A, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, Quadrio I, Perret-Liaudet A. Pre-analytical and analytical factors influencing Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarker variability. *Clin Chim Acta* 2015;449:9–15.
 29. Thomas AJ, Attems J, Colloby SJ, et al. Autopsy validation of 123I-FP-CIT dopaminergic neuroimaging for the diagnosis of DLB. *Neurology* 2017;88:276–283.
 30. Sonni I, Ratib O, Boccardi M, et al. Clinical validity of presynaptic dopaminergic imaging with 123I-ioflupane and noradrenergic imaging with 123I-MIBG in the differential diagnosis between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging*. 2017;52:228–242.
 31. Slaets S, Van Acker F, Versijpt J, et al. Diagnostic value of MIBG cardiac scintigraphy for differential dementia diagnosis. *Int J Geriatr Psychiatry* 2015;30:864–869.
 32. Kane JPM, Roberts G, Petrides GS, Lloyd JJ, O'Brien JT, Thomas AJ. (123I)-MIBG scintigraphy utility and cut-off value in a clinically representative dementia cohort. *Parkinsonism Relat Disord* 2019;62:79–84.
 33. Calvini P, Rodriguez G, Inguglia F, Mignone A, Guerra UP, Nobili F. The basal ganglia matching tools package for striatal uptake semi-quantification: description and validation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34:1240–1253.
 34. Bocchetta M, Mega A, Bernardi L, et al. Genetic counseling and testing for Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: an Italian consensus protocol. *J Alzheimers Dis*. 2016;51:277–291.
 35. Fox N. *The Guide to the Specialist Cognitive Disorders Clinic at the National Hospital for Neurology and Neurosurgery*, London. rev. 2015, personal communication, Nick Fox.
 36. Rossor MN, Fox NC, Mummery CJ, Schott JM, Warren JD. The diagnosis of young-onset dementia. *Lancet Neurol* 2010;9:793–806.
 37. Magni E, Binetti G, Bianchetti A, Rozzini R, Trabucchi M. Mini-Mental State Examination: a normative study in Italian elderly population. *Eur J Neurol* 1996;3:198–202.
 38. Pigliautile M, Ricci M, Mioshi E, et al. Validation study of the Italian Addenbrooke's Cognitive Examination Revised in a young-old and old-old population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2011;32:301–307.
 39. Nieuwenhuis-Mark RE. The death knoll for the MMSE: has it outlived its purpose? *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23:151–157.
 40. Caffarra P, Gardini S, Zonato F, et al. Italian norms for the Freedman version of the clock drawing test. *J Clin Exp Neuropsychol* 2011;33:982–988.
 41. Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: a frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000; 55:1621–1626.
 42. Prestia A, Rossi R, Geroldi C, et al. Validation study of the three-objects-three-places test: a screening test for Alzheimer's disease. *Exp Aging Res* 2006;32:395–410.
 43. Vernooij MW, Smits M. Structural neuroimaging in aging

- and Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* 2012; 22:33–55, vii-viii.
44. Sikkes SA, de Lange-de Klerk ES, Pijnenburg YA, et al. A new informant-based questionnaire for instrumental activities of daily living in dementia. *Alzheimers Dement* 2012;8:536–543.
 45. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th edn. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.
 46. Vellas B, Villars H, Abellan G, et al. Overview of the MNA – its history and challenges. *J Nutr Health Aging* 2006;10: 456–463; discussion 63–5.
 47. Elia M. The 'MUST' report. Nutritional screening for adults: a multidisciplinary responsibility. 'Malnutrition Universal Screening Tool' (MUST) for adults. Redditch, UK: British Association for Parenteral and Enteral Nutrition (BAPEN), 2003.
 48. Doorduyn AS, Visser M, van de Rest O, et al. Associations of AD biomarkers and cognitive performance with nutritional status: the NUDAD Project. *Nutrients* 2019; 11(5):1161.
 49. Agarwal E, Miller M, Yaxley A, Isenring E. Malnutrition in the elderly: a narrative review. *Maturitas* 2013;76:296–302.
 50. Weintraub S, Besser L, Dodge HH, et al. Version 3 of the Alzheimer Disease Centers' Neuropsychological Test Battery in the Uniform Data Set (UDS). *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2018;32:10–17.
 51. Girtler N, De Carli F, Amore M, et al. A normative study of the Italian printed word version of the free and cued selective reminding test. *Neurol Sci* 2015;36:1127–1134.
 52. Dodich A, Cerami C, Cappa SF, et al. Combined sociobehavioral evaluation improves the differential diagnosis between bvFTD and AD. In search of neuropsychological markers. *J Alzheimers Dis* 2018;61: 761–772.
 53. Morris JC, Weintraub S, Chui HC, et al. The Uniform Data Set (UDS): clinical and cognitive variables and descriptive data from Alzheimer Disease Centers. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006; 20: 210–216.
 54. Beck IR, Gagneux-Zurbriggen A, Berres M, Taylor KI, Monsch AU. Comparison of verbal episodic memory measures: CERAD-NAB versus California Verbal Learning Test (CVLT). *Arch Clin Neuropsychol* 2012;27: 510–519.
 55. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 2011;134(Pt 9):2456–2477.
 56. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011;76:1006–1014.
 57. Nobili F, Festari C, Altomare D, et al. Automated assessment of FDG-PET for differential diagnosis in patients with neurodegenerative disorders. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018;45:1557–1566.

Impatto delle variabili preanalitiche e analitiche sulla diagnosi di diabete melito gestazionale

Mariarosa Carta¹, Davide Giavarina¹, Graziella Bonetti²

¹Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza

²Laboratorio di Patologia Clinica, A.S.S.T. Valcamonica

Caro Editore,

le Linee Guida per la gravidanza fisiologica (1) raccomandano l'esecuzione dello screening per il diabete gestazionale secondo le indicazioni del documento di consensus internazionale degli esperti dell' International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) (2).

Tali raccomandazioni sono basate sullo studio Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) (3) che ha evidenziato una relazione lineare tra i livelli di glicemia registrati a digiuno e dopo 1 e 2 ore dal carico orale con 75 grammi di glucosio e l'aumento della frequenza degli esiti primari e secondari avversi.

Per la diagnosi di diabete mellito gestazionale è sufficiente un solo valore che eguagli o ecceda il valore soglia indicato poiché è stato dimostrato che ognuno dei tre campioni contribuisce in maniera indipendente alla predizione degli eventi avversi neonatali (4).

È evidente che uno screening così progettato richiede una elevata qualità degli esami di laboratorio, in questo caso della determinazione del glucosio, che deve presentare variabilità analitiche e preanalitiche minime. Per quanto riguarda la fase preanalitica una grande importanza riveste l'impatto della glicolisi *in vitro* (5), che può provocare una diminuzione della concentrazione di glucosio pari a 5-7%/ora; per questo motivo l'American Diabetes Association (ADA) raccomanda il blocco della glicolisi tramite la centrifugazione immediata e separazione del plasma dalla parte corpuscolata, oppure l'immersione della provetta in ghiaccio fondente e la separazione del plasma entro 30 minuti dal prelievo, oppure ancora l'utilizzo di una provetta contenente un inibitore immediato della glicolisi [fluoruro di sodio (NaF), e tampone citrato] (6).

Nell'HAPO Study la glicolisi è stata inibita posizionando immediatamente le provette in un bagno di ghiaccio fondente e centrifugandole nel più breve tempo possibile (7). Tuttavia, quando lo screening viene trasferito nella realtà dei laboratori clinici distribuiti in tutto il mondo, difficilmente è possibile garantire condizioni pre-analitiche così controllate ma soprattutto così standardizzate.

Una recente indagine condotta sul web (8) evidenzia ad esempio la situazione spagnola, dove ben il 37% dei laboratori utilizza sistemi POCT per la misura della glicemia delle curve da carico e solo un 19% dei laboratori utilizza provette con inibitori della glicolisi, nella quasi totalità si tratta del solo NaF. L'utilizzo di provette con NaF è molto diffuso anche nei laboratori italiani anche se è ben noto che il fluoruro di sodio agisce su un enzima posto a valle della cascata glicolitica e quindi la glicolisi viene bloccata non prima di 90 minuti (9).

L'implementazione, consigliata dalle linee guida, di provette contenenti oltre al NaF anche tampone citrato, in grado di bloccare in maniera rapida la glicolisi, è avvenuta, per il momento, solo in pochi laboratori italiani. È evidente che l'impatto clinico legato all'utilizzo di tali provette sarà quello di aumentare il numero di casi diagnosticati, come evidenziato in alcuni studi preliminari (10, 11,12).

Nel laboratorio di Vicenza, tali provette sono state introdotte per l'esecuzione delle curve da carico sia negli adulti che nelle donne in gravidanza, agli inizi del 2019. Abbiamo quindi confrontato i risultati dello screening eseguito nelle donne in gravidanza nel 2018, quando venivano utilizzate provette con solo NaF (Vacutest Kima, Arzegrande Padova, Italia), con quello eseguito nel 2019 utilizzando provette contenenti NaF e tampone citrato (FC-Mix, Greiner BioOne, Cassina de Pecchi, Milano, Italia). Nel 2018 abbiamo diagnosticato 274 casi di diabete gestazionale su 2058 pazienti (13,3%), mentre nel 2019 325 casi su 1 876 pazienti (17,3%) ($p < 0,0001$, test Chi quadrato). Considerando la positività dello screening per i singoli punti, si può notare che mentre nel 2018 i pazienti con una glicemia a digiuno

Corrispondenza a: Mariarosa Carta, Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza, Tel 0444752486, E-mail mariarosa.carta@aulss8.veneto.it

Ricevuto: 10.02.2020

Revisionato: 27.02.2020

Accettato: 03.03.2020

Publicato on-line: 15.04.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.028

superiore a 91 mg/dL erano il 7,7%, nel 2019 sono stati 12,1% ($p < 0,0001$), mentre le positività per gli altri due valori soglia relativi ai prelievi dopo 60 e 120 minuti dal carico orale di glucosio risultano pressochè sovrapponibili dopo 60 minuti (8,4% *versus* 8,3%, $p = 0,95$) e con una differenza comunque non significativa dopo 120 minuti (5,8% *versus* 7,3%, $p = 0,06$).

Questo riscontro era prevedibile perché l'effetto di blocco della glicolisi è evidente soprattutto nei prelievi basali, probabilmente per un effetto metabolico di saturazione di glucosio che avviene subito dopo l'assunzione del carico orale di glucosio (13). Il problema preanalitico legato al mancato blocco della glicolisi interessa proprio il primo punto dello screening che peraltro è quello che nella nostra casistica, così come nell'HAPO Study determina il maggior numero di diagnosi di diabete mellito gestazionale (14).

Il primo punto dello screening è anche quello che richiede un più stretto controllo della variabilità. Infatti, se si analizza la curva della distribuzione di frequenza della glicemia basale a digiuno, si nota che il valore soglia di 92 mg/dL cade in una zona della curva dove piccole oscillazioni potrebbero far cambiare categoria a numerose pazienti, mentre invece analizzando le distribuzioni di frequenza delle glicemie dopo 60 e 120 minuti dal carico orale di glucosio, i valori soglia si trovano in una zona più piatta della curva, dove eventuali variazioni del dato hanno ripercussioni meno importanti dal punto di vista quantitativo (Figura 1).

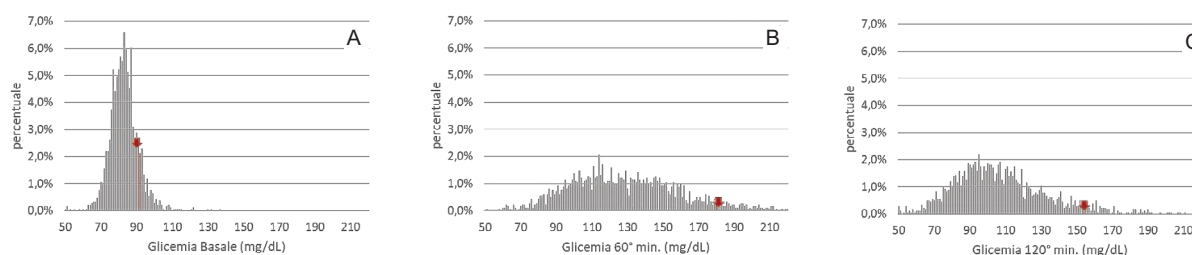


Figura 1

A: Curva di distribuzione della glicemia basale

B: Curva di distribuzione della glicemia dopo 60' dall'assunzione di carico orale di glucosio

C: Curva di distribuzione della glicemia dopo 120' dall'assunzione di carico orale di glucosio

L'incertezza della misura ha, in altri termini, una maggior rilevanza se il valore si trova in una curva di distribuzione molto stretta, come quella relativa alla distribuzione della glicemie del punto basale, mentre è meno impattante quando le concentrazioni hanno una distribuzione di frequenza più ampia e il valore cade ai margini della distribuzione, come avviene per la distribuzione delle glicemie dopo 60 e 120 minuti (Figure 1B e 1C). Ad esempio, nella popolazione studiata, una variabilità del dato legata solo all'imprecisione e ipoteticamente ottimale, secondo le specifiche di qualità richieste, ($< \pm 2,2\%$) (14), potrebbe comportare una perdita di diagnosi pari al 4,2% (82 donne con glicemia basale compresa tra 92 e 93 mg/dL) oppure una sovra-diagnosi del 5,4% (100 donne con glicemia basale compresa tra 90 e 91 mg/dL). Considerazioni analoghe possono essere fatte per l'influenza del bias analitico, teoricamente azzerato nell'HAPO Study, dal momento che le determinazioni erano centralizzate.

Ad esempio, confrontando i risultati della VEQ (Randox International Quality Assessment Scheme RIQAS), le prestazioni del nostro laboratorio, relativamente alla misura della glicemia, risultavano in linea con quelle di altri utilizzatori dello stesso metodo e strumento (106,95 mg/dL *versus* 107,00 mg/dL). Tuttavia, confrontando questo valore con la media ottenuta con altri metodi sempre basati sull'esochinasi (109,8 mg/dL) i risultati ottenuti nel nostro laboratorio risultavano più bassi con un bias pari circa al 3%, che arrivava al 4% considerando le glicemie misurate con metodi diversi dall'esochinasi (glucosio deidrogenasi, chimica secca.). L'impatto di tale bias, pur soddisfacendo alle specifiche di qualità, non è trascurabile da un punto di vista clinico: se ad esempio, nella popolazione studiata si fosse utilizzato un metodo basato sempre su esochinasi ma implementato su diverso analizzatore, con caratteristiche analitiche precise ed assolutamente in linea con le VEQ, (corrispondente esattamente al valore medio ottenuto tra tutti i metodi esochinasi), il numero di casi diagnosticati di diabete mellito gestazionale sarebbe del 26,2% (+8,9%). Imprecisione e inesattezza producono quindi un possibile errore totale estremamente significativo, ed è evidente quindi che uno screening basato su un valore soglia netto come quello suggerito dagli esperti della IASDGP può determinare diverse incidenze di diabete gestazionale nella popolazione studiata, anche garantendo le specifiche di qualità suggerite per la glicemia.

Le variabili analitiche possono e devono essere controllate e limitate ma non possono essere azzerate. Resta comunque imperativo cercare la maggior standardizzazione possibile dei dati e quindi risulta necessario agire dove possibile, ovvero garantendo un blocco completo della glicolisi, variabile che altrimenti incide sul valore della glicemia con un decremento quantitativamente molto significativo (6-7%) (15).

È evidente che questo porterà ad un incremento del numero di casi di diabete mellito gestazionale, ma garantirà una maggior standardizzazione e confrontabilità dei dati tra laboratori diversi e soprattutto renderà le glicemie

confrontabili con i valori soglia definiti dall'HAPO Study. Tuttavia, le considerazioni sull'importanza della variabilità analitica e sul loro impatto sullo screening del diabete mellito gestazionale devono essere tenute in considerazione dai clinici nel considerare i valori ottenuti con la curva da carico dalle loro pazienti.

Anche se la diagnosi di diabete mellito gestazionale comporta, almeno nella prima fase, solo l'adozione di un migliore "stile di vita" con misure dietetiche e rivalutazione successiva, tuttavia per le considerazioni analitiche sopra esposte è importante sottolineare come i clinici debbano considerare con cautela valori di glicemia basale posizionati attorno al valore soglia di 92 mg/dL.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Linee guida per la gravidanza fisiologica. 2011 Update. Diagnosi del diabete gestazionale, vol 1, pp 169-173. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1436_allegato.pdf (ultimo accesso gennaio 2020).
2. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676-82.
3. The HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.
4. Coustan DR, Lowe LP, Metzger BE, et al. The HAPO Study: paving the way for the new diagnostic criteria for GDM. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:654-60.
5. Daly N, Flynn I, Carroll C, et al. Impact of implementing preanalytical laboratory standards on the diagnosis of gestational diabetes mellitus: a prospective observational study. *Clin Chem* 2016;62:387-91.
6. American Diabetes Association. Standards of Medical Care. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2019;42 (Suppl 1):S13-S28.
7. Gambino R, Bruns DE. Stabilization of glucose in blood samples: out with the old, in with the new. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1883-5.
8. Garcia del Pino I, Bauca JM, Gomez C et al. Preanalytical issues related to routine and diagnostic glucose tests: results from a survey in Spain. *Biochem Med* 2020;30:1-8.
9. Chan A, Swaminathan R, Cockram C. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989;35:315-7.
10. Bonetti G, Giavarina D, Urbani D, et al. Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:143-8.
11. Song D, Lia M, Hurley JC. Recommended pre-analytical plasma glucose sampling methodology may distort gestational diabetes mellitus prevalence: implications for diagnostic thresholds. *Diabet Med* 2019;36:1226-33.
12. Daly N, Flynn I, Carroll C, et al. Comparison of citratefluoride-EDTA with fluoride-EDTA additives to stabilize plasma glucose measurements in women being screened during pregnancy with an oral glucose tolerance test: a prospective observational study. *Clin Chem* 2016;62:886-7.
13. Yoa RG, Rapin JR, Wiernsperger NF, et al. Demonstration of defective glucose uptake and storage in erythrocytes from non-insulin dependent diabetic patients and effect of metformin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993;20:563-7.
14. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (ultimo accesso febbraio 2020).
15. Bonetti G, Carta M, Lapolla A et al. On behalf of the SIBioC-SiPMel working group on Diabetes. Correct determination of glycemia in the diagnosis and management of diabetes: recommendations for the optimization of the pre-analytical phase, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2018 <https://doi.org/10.1016/J.numecd.2018.09.013>.

È un piacere comunicare a tutti i Soci SIBioC e a tutti i lettori di Biochimica Clinica che il prof Giuseppe Lippi è stato nominato Coordinatore della

IFCC Task Force on COVID-19

La Task Force include fra i suoi membri alcuni dei maggiori esponenti della Medicina di Laboratorio internazionale e fra i suoi mandati è compresa la disseminazione di informazioni utili a migliorare l'accuratezza e l'efficienza diagnostica per COVID-19, come pure fornire informazioni utili ai clinici ed alla popolazione sul significato dei test diagnostici per COVID-19, e produrre raccomandazioni e linee guida in merito a protocolli diagnostici e biosicurezza nella gestione dei campioni utilizzati per diagnosi e monitoraggio di COVID-19.

È certamente un grande onore per SIBioC che uno dei suoi membri più prestigiosi, generosamente e proficuamente attivo all'interno della Società per molti anni in qualità di Coordinatore della Divisione Scientifica e della Divisione Attività Internazionali nonché referente scientifico del nostro Congresso Nazionale, abbia ricevuto un tale prestigioso incarico che lo porterà ad occuparsi a livello internazionale di questo problema sanitario che sta preoccupando e affliggendo il mondo intero.

Auguriamo al prof Lippi e a tutta la Task Force buon lavoro, nella convinzione che la loro azione sarà tempestiva ed efficiente ed assicurerà alla nostra Comunità Scientifica e a tutti i cittadini le migliori informazioni e raccomandazioni per affrontare al meglio questa epidemia.

La Medicina di Laboratorio è ancora una volta essenziale per una corretta gestione dei pazienti, nella diagnosi, nel monitoraggio della malattia e della terapia come pure nell'utilizzo degli esami diagnostici a livello di popolazione e siamo sicuri che queste fondamentali attività non potrebbero essere in mani migliori.



Maria Stella Graziani

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, PCO_2 , PO_2 , Na, K, Cl, iCa,
iMg, Glu, Lac, Urea (BUN),
Creat, Hct, TCO_2 , $SO_2\%$, O_2Hb ,
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*.