
BC

biochimica clinica

In questo numero:

IL FUTURO DELLA MEDICINA DI LABORATORIO
vedi pag. 217 e pag. 263

**LA GESTIONE DEL PAZIENTE IN TERAPIA
IPOLIPEMIZZANTE**
vedi pag. 287 e pag. 290



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

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



sommario



EDITORIALI

215

Una lezione che arriva da lontano
P. Pezzati

217

Gestire, integrare e comunicare l'informazione di laboratorio:
il futuro della medicina di laboratorio
D. Giavarina

RASSEGNE

219

Il deficit di G6PD in Medicina di Laboratorio
A. Mosca, R. Paleari, E. Capoluongo

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

232

Effetti della restrizione calorica sullo stress ossidativo nell'obesità:
sono miglioramenti transitori?
A. Bolner, A. Vanzo, D. Giavarina, G. Nordera, O. Bosello

239

ISO 15189 all'ombra dell'Equatore. Descrizione dell'esperienza del North
Kinangop Catholic Hospital Laboratory in Kenya
L. Marchioro, PN. Mwangi, JW. Njuru, A. Marchionne

249

Pharmacogenetic markers able to predict lipid-related parameters in a cohort
of ritonavir treated patients
*J. Cusato, A. Calcagno, M. Antonucci, L. Marinaro, V. Avataneo, A. De Nicolò,
A. Palermi, S. Bonora, G. Di Perri, A. D'Avolio*

255

A wide next-generation-sequencing panel improves the molecular diagnosis
of dyslipidemias
*C. Giacobbe, MD. Di Taranto, D. Palma, G. Maione, G. Cardiero, G. Iannuzzo,
A. Buonaiuto, F. Forte, I. Calcaterra, G. Fortunato*

OPINIONI

263

Il futuro della Medicina di Laboratorio: un Manifesto per i suoi professionisti
M. Plebani

270

Misura e identificazione delle componenti monoclonali plasmatiche:
risultati di uno studio multicentrico internazionale
M. Mussap

DOCUMENTI SIBioC

279

Valutazione precoce del danno cardiaco da farmaci chemioterapici: importanza
della misura delle troponine cardiache I e T con metodi ad alta-sensibilità analitica
Documento del Gruppo di Studio inter-societario delle Società Scientifiche Italiane di Medicina
di Laboratorio SIBioC ed European Ligand Assay Society- Italia (ELAS), e della Associazione
Nazionale Medici Cardiologi Ospedalieri (ANMCO)
*A. Clerico, DM. Cardinale, M. Zaninotto, N. Aspromonte, MT. Sandri, C. Passino,
M. Plebani, M. Migliardi, M. Perrone, A. Fortunato, A. Padoan, T. Trenti,
S. Bernardini, L. Sciacovelli, F. Colivicchi, D. Gabrielli*

287

Il contributo del laboratorio alla corretta gestione del paziente in terapia
ipolipemizzante: le raccomandazioni di EFLM e della Società Europea
di Aterosclerosi (EAS)
MS. Graziani

sommario

LETTERE ALL'EDITORE

290

Quantificazione delle lipoproteine aterogeniche per le terapie ipolipemizzanti: Raccomandazioni di Consenso della European Atherosclerosis Society (EAS) e di EFLM

MR. Langlois, BG. Nordestgaard, A. Langsted, PR. Kamstrup, MJ. Chapman, KM. Aakre, H. Baum, J. Borén, O. Wiklund, E. Bruckert, A. Catapano, C. Cobbaert, P. Collinson, OS. Descamps, CJ. Duff, A. von Eckardstein, A. Hammerer-Lercher, G. Kolovou, F. Kronenberg

314

Il ruolo del laboratorio di Biochimica Clinica nell'organizzazione di un evento sportivo internazionale: la XXX Universiade Estiva

R. de Falco, L. Fotia, C. Mazzaccara, G. Frisso, G. Fortunato

RECENSIONI

318

Il sedimento urinario: atlante per immagini

M. Plebani

NOTIZIE SIBioC

320

In ricordo di Jan-Olof Jeppsson

A. Mosca, V. Bianchi

321

52° Congresso Nazionale: Virtual Edition

L. Sciacovelli, G. Lippi, T. Trenti

CASI CLINICI

e20

Una variante emoglobinica rara

M. Carta, MG. Meneghini, L. Forner, T. Guidolin, G. Marzotto, MT. Comberlato, C. Tripodi, D. Giavarina

e23

È tempo di ridefinire gli intervalli di riferimento e terapeutici della cupruria nella malattia di Wilson?

MF. Starita, F. Di Dato, M. Matarazzo, R. Iorio, M. Savoia

e27

Una variante emoglobinica co-migrante con le normali frazioni emoglobiniche in HPLC

A. Guastini, LA. Rizzi, F. Santoni, S. Vinci, G. Barberio, G. Ivaldi

Save the Date

VIRTUAL EDITION

**52° CONGRESSO NAZIONALE
SIBioC-Medicina di Laboratorio**

***Medicina di Laboratorio: vecchi e nuovi
interlocutori per un'alleanza vincente***

6-8 Ottobre 2020



un evento
organizzato da



BIOMEDIA
La condivisione del sapere

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 3 - Settembre 2020

Una lezione che arriva da lontano

Paola Pezzati

SOD Sicurezza e Qualità, Dipartimento dei Servizi, AOU Careggi Firenze

Biochimica Clinica propone in questo numero, un contributo (1) che sposta l'attenzione dei professionisti della Medicina di Laboratorio, generalmente focalizzata sugli scenari di Europa ed America del nord, verso quelli della Africa sub sahariana. Zona che sappiamo essere martoriata da endemie, instabilità politica e sociale e cattivo uso delle risorse locali, per citare solo gli ambiti che occasionalmente ricevono spazio sulla stampa europea. Rischia invece di sfuggire alla nostra osservazione la volontà di cambiamento che sta attraversando molti paesi africani, testimoniata da documenti di indirizzo, condivisi fra stati con realtà molto diverse, ma disposti a fare proprio il concetto di necessità di copertura sanitaria universale (2). La espressione collettiva della convinzione che tutte le persone dovrebbe avere accesso ai servizi sanitari di cui hanno bisogno senza rischiare la rovina finanziaria o l'impoverimento, ovvero il diritto alla copertura sanitaria universale, deve essere considerata una pietra miliare ed un potente innesco delle iniziative politiche e sociali necessarie per passare dalle affermazioni di principio ai fatti. Nel corso della terza "Africa Health Agenda International Conference" tenutasi a Kigali in Ruanda nel marzo 2019 (2), che ha visto la presenza di rappresentanti di 49 stati africani, sono stati enunciati gli elementi fondanti per il raggiungimento della copertura sanitaria universale: trasparenza e responsabilità politica, finanziamenti pubblici, equità degli accessi e qualità dei servizi. I primi elementi dipendono strettamente dalla volontà dei governi, ma la qualità dei servizi chiama in causa anche i professionisti della sanità e ben sappiamo che sono essi la leva per il cambiamento, quando riescono ad esprimere appieno le specifiche competenze.

Il ruolo della Medicina di Laboratorio in paesi ad alta incidenza e prevalenza di malattie infettive e di malnutrizione, ma anche di patologie croniche come diabete, insufficienza renale, ipertensione, è di grandissima rilevanza. Riconoscendo tale valore, gli enti di cooperazione internazionale hanno modificato negli anni l'impostazione organizzativa relativa alle attività di laboratorio, passando da iniziative di emergenza, che malgrado le migliori intenzioni, potevano risultare "estemporanee", ad iniziative strutturate e tali da costruire localmente in modo graduale, progressivo e sistematico, un sistema qualità.

Il contributo di Marchioro (1), offre un bell'esempio di questo approccio, ripercorrendo il percorso seguito dal laboratorio del North Kinangop Catholic Hospital (Kenia) per conseguire la certificazione ISO 15189 (3). La breve descrizione del contesto geografico e sociale, nonché delle necessità della popolazione che affrisce all'ospedale ed ai servizi del laboratorio, consente al lettore di intuire la ricaduta, in termini di salute, che la presenza di una struttura di qualità può avere in simili realtà. L'Autore descrive dettagliatamente e senza reticenze le tappe del percorso svolto nell'arco di molti anni e segnato da qualche inevitabile fallimento, da aggiustamenti e miglioramenti in corso d'opera; sottolinea il ruolo fondamentale dei consulenti esterni, portatori di risorse economiche e culturali e di come tali risorse siano state proposte in modo rispettoso della realtà e delle professionalità locali, ma anche con coerenza e rigore. La lettura del contributo offre, a mio avviso, uno spunto di riflessione non banale sulla lenta e paziente creazione, si direbbe dal nulla, di un sistema in accordo con i più alti livelli di qualità. Nel riferimento al proverbio Swahili "*pole pole 'ndio mwendo*" (piano piano la strada si apre) sta tutto il fascino della vicenda: una paziente e laboriosa costruzione che necessita tempo, impegno, fiducia nella possibilità di riuscita e che ha il sapore delle grandi imprese. Suggestivo è anche un ulteriore piano di lettura per questo contributo. Gli aspetti pratici affrontati nel corso degli anni dal laboratorio keniota, quali la limitazione della scelta delle metodiche analitiche, di strumentazione, di reagenti, la necessità di una attenta valutazione della logistica, la pianificazione oculata degli spazi di accoglienza e di lavoro, la impossibilità di programmare adeguatamente l'accesso della popolazione che necessita assistenza, sono senz'altro difficoltà legate alla specifica situazione geografica e sociale, ma sono anche alcune delle difficoltà con cui, drammaticamente, molti Colleghi si sono confrontati nel corso della recente emergenza COVID-19, all'interno della quale, nel giro di poche settimane, la Medicina di Laboratorio si è dovuta organizzare per rispondere alle nuove

Corrispondenza a: Paola Pezzati, SOD Sicurezza e Qualità, Dipartimento dei Servizi, AOU Careggi Firenze, Tel 0557947791, E-mail pezzati@au-careggi.toscana.it

Ricevuto: 31.05.2020

Accettato: 03.06.2020

Pubblicato on-line: 26.08.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.064

necessità. Certo il parallelismo finisce qui: il confronto fra la disponibilità di risorse culturali, tecnologiche e finanziarie è ovviamente impari. Ma voglio credere che lo sguardo che abbiamo gettato in questi mesi sul baratro, ci faccia comprendere meglio il dramma che tanti Colleghi, in altre latitudini, vivono costantemente, e ci faccia anche riflettere sul ruolo che il sistema qualità può concretamente esercitare a garanzia della salute della popolazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Marchioro L, Ndonga Mwangi P, Wairagu Njuru J et al. ISO 15189 all'ombra dell'Equatore. Descrizione dell'esperienza del North Kinangop Catholic Hospital Laboratory in Kenya. *Biochim Clin* 2020;44:239-48.
2. Africa Health Agenda International Conference. <https://ahaic.org> (ultimo accesso maggio 2020).
3. ISO 15189:2012 medical laboratories- requirements for quality and competence. Geneve 2012.

Gestire, integrare e comunicare l'informazione di laboratorio: il futuro della medicina di laboratorio

Davide Giavarina

Medicina di Laboratorio, AULSS 8 Berica, Vicenza

Da più 40 anni la Medicina di Laboratorio discute e lotta per trovare la propria dimensione, ruolo e riconoscimento, nella cura delle persone, nella scienza medica, nelle organizzazioni sanitarie. Potremmo forse dire che sia una storia antica, che origina di fatto fin dalla nascita della disciplina. Già nel discorso di apertura del nono congresso annuale dell'American Society of Clinical Pathologists (ASCP), nel 1930, l'allora presidente JH Black ironizzava sul valore economico di "prestazioni" di laboratorio, che potevano essere ottenute a basso costo, senza scomodare i "patologi clinici" da poco nati come professionisti, e su come invece seriamente discutesse della complessità che generava una espansione del portfolio delle competenze necessarie a questo nuova figura professionale (1).

Di fatto, la nostra disciplina pare essere costantemente presa in un perenne dualismo: da un lato ci sono i grandi progressi, tecnici e scientifici, ai vertici della modernità, dell'organizzazione, della gestione della qualità e del rischio clinico, da cui almeno una volta ogni tre anni derivano scoperte da premi Nobel; dall'altro, profonde crisi che, a partire dal mancato riconoscimento del ruolo fondamentale nel fornire un numero enorme di informazioni cliniche e scientifiche a colleghi medici pratici e ai pazienti, hanno visto i laboratori diminuire progressivamente di numero, di specialisti e di rilevanza, frequentemente in balia di organizzazioni sanitarie che alternativamente ne propongono riorganizzazioni in mega-center, in iper-consolidamenti, oppure svenduti come mera "commodity" per il finanziamento di ospedali in partecipazione pubblico-privato.

Invero, a fronte di una diagnostica sempre più specifica e di precisione, con un ruolo chiaramente determinante per le scelte e gli esiti dei pazienti, la funzione dei professionisti del laboratorio sembra perdersi tra la gestione delle tecnologie e la gestione dei processi burocratici, entrambi apparentemente lontani dalle diagnosi e dalle cure.

Vista dal punto di vista professionale, l'"invisibilità", come scrive Mario Plebani in questo numero (2), è forse il termine che meglio sintetizza questo sentimento che ha attraversato la nostra disciplina in tutti questi anni: la consapevolezza di esistere e di essere fondamentali, ma la parallela percezione di non riuscire quasi mai a farsi riconoscere e conseguentemente incidere, o per lo meno influire, significativamente nelle cure e nelle politiche sanitarie, ad ogni livello.

Eppure, il pensiero della "Medicina di Laboratorio" come disciplina clinica e non tecnica si è costruito e consolidato negli anni attraverso il pensiero di molti suoi illustri protagonisti, che hanno spostato l'attenzione dai fondamentali aspetti tecnici e qualitativi al versante diagnostico. Possiamo ricordare alcune pietre miliari. Dapprima è stata la definizione della logica diagnostica di Laboratorio, integrata nella semeiotica medica come una estensione-amplificazione dei sensi e del ragionamento clinico (3). Quasi parallelamente, il "brain to brain loop" di Lundberg ha prodotto una sintesi mirabile di molti argomenti: la centralità del ragionamento clinico, l'importanza del quesito clinico, il *continuum* dalla pre-pre-analitica alla post-post-analitica, la necessità di agganciare la diagnosi di laboratorio alla conseguente azione per il determinismo dell'outcome (4). La comunicazione dei risultati e delle informazioni da essi derivanti è quindi divenuta elemento centrale, al pari della necessità di sviluppare strutturate e continue attività di consulenza diagnostica (5). Infine, anche la Medicina di Laboratorio doveva trovare la propria dimostrazione di efficacia negli outcome dei pazienti, in una moderna visione di medicina basata sulle prove (EBM) (6).

In questo numero di BC, Mario Plebani aggiunge in altro tassello e propone per i giorni nostri un manifesto destinato a guidare il futuro della professione. Il documento in 10 punti richiama e riassume i temi consolidati negli anni che sono le fondamenta di ogni attività diagnostica biochimica e biomolecolare. La strutturazione di anni di pensiero per il ruolo della medicina di laboratorio in "Manifesto" offre ai professionisti, vecchi e nuovi, il grande vantaggio della sintesi, nonché di fungere da punto di repere, da faro, per orientarsi e ritrovarsi nei propri ambienti di lavoro in un continuo e costante mutamento. Ma il ragionamento proposto da questo manifesto non è solo una sintesi

Corrispondenza a: Davide Giavarina, Medicina di Laboratorio, AULSS 8 Berica, Vicenza, Tel 0444753254, E-mail davide.giavarina@aulss8.veneto.it

Ricevuto: 03.06.2020

Accettato: 03.06.2020

Pubblicato on-line: 26.08.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.066

del passato pensiero “forte”, ma aggiunge anche alcuni importanti elementi di novità: la valorizzazione del lavoro dei laboratori clinici, basato sul valore delle informazioni, rispetto all’esito per il paziente; l’importanza dell’insegnamento della disciplina, per la quale le competenze e le capacità sono in continua evoluzione; infine, forse l’elemento più innovativo, la necessità di uscire dal proprio specifico ambito tecnico specialistico integrando continuamente le proprie informazioni con quelle derivanti da altri servizi, in una diagnostica organica. Sono i progressi nella conoscenza biologica, biochimica e biomolecolare delle malattie umane e gli straordinari progressi tecnologici a creare le condizioni per una sempre maggiore opportunità e necessità di convergenze multidisciplinari nella diagnostica clinica.

Il consolidamento in un unico referto di informazioni diagnostiche derivanti da diverse specialità, finanche dalla diagnostica per immagini, sembra essere oggi necessario per un approccio moderno alla diagnosi. Il numero di informazioni e delle conoscenze necessarie è ormai superiore alle capacità del singolo specialista e necessiterà di supporti di intelligenza artificiale; ma al tempo stesso tutte le informazioni rilevanti per il singolo paziente devono essere contemporaneamente disponibili al momento della valutazione.

Di fatto, grandi sfide attendono i futuri professionisti della medicina di laboratorio. Essi saranno sempre meno numericamente e avranno grandi responsabilità nel destino dei pazienti. Avranno nel proprio armamentario grandi tecnologie analitiche, di automazione, informatiche, e proprio sotto o dietro questo imminente avvento rischiano di dissolversi e svanire, di non essere più visibili.

Il supporto informatico, digitale e presto di intelligenza artificiale non è solo una questione di scelta, ma anche una ricerca di soluzioni. Servono soluzioni tecniche, per superare i problemi infrastrutturali dei sistemi informativi, integrando gli attuali e sviluppandone di nuovi, che possano combinare le informazioni provenienti da laboratori diversi e dalla diagnostica per immagini; servono approcci di “Health Technology Assessment”, per affrontare e gestire i costi delle nuove tecnologie; serve aumentare l’attività di interpretazione integrata dei risultati, attraverso la collaborazione di gruppi multidisciplinari, il superamento dei confini culturali e professionali, l’utilizzo di sistemi esperti e reti neurali, nonché di algoritmi interdisciplinari (7).

Superare l’invisibilità si può fare in tre passi: capire profondamente il ruolo e gli obiettivi della professione (la cura dei pazienti), organizzare e focalizzare il proprio lavoro solo e solamente sugli obiettivi, propugnare ad ogni livello, nel laboratorio, nell’ospedale, nel territorio, nelle istituzioni, nelle società scientifiche e soprattutto con i pazienti, il nostro proprio ruolo di gestori di informazioni e di costruttori di conoscenze, di organizzatori di processi e sistemi diagnostici, di difensori degli interessi dei pazienti (8).

BIBLIOGRAFIA

1. Black JH. The biology of the clinical pathologist. *Am J Clin Pathol* 1931;1:1-6.
2. Plebani M. Il futuro della Medicina di Laboratorio: un Manifesto per i suoi professionisti. *Biochim Clin* 2020; 44:263-9
3. Burlina A. La logica diagnostica del laboratorio. Padova: Piccin editore, 1998
4. Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;245:1762-3.
5. Kratz A, Laposata M. Enhanced clinical consulting - moving toward the core competencies of laboratory professionals. *Clin Chim Acta* 2002;319:117-25.
6. Price CP. Application of the principles of evidence-based medicine to laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2003;333:147-54.
7. Lippi G, Plebani M. Integrated diagnostics: the future of laboratory medicine?. *Biochem Med (Zagreb)*. 2020;30(1):010501.
8. Kroft SH. The evolution of the clinical pathologist. *Am J Clin Pathol* 2018;150:283-4.

Il deficit di G6PD in Medicina di Laboratorio

Andrea Mosca^{1,2}, Renata Paleari^{1,2}, Ettore Capoluongo³

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

²Istituto di Tecnologie Biomediche, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ITB-CNR), Milano

³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche - DAI - Medicina di Laboratorio e Trasfusionale - AOU Federico II - CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli

ABSTRACT

G6PD deficiency in Laboratory Medicine.

Glucose 6-phosphate dehydrogenase has a key role in the production of the reducing power necessary to face oxidative stress and for providing ribose, which is a basic constituent of nucleic acids. It is therefore not surprising that the gene is present in all organisms, and that is also highly conserved during the evolution. The occurrence of G6PD mutants may have important consequences in carriers, depending on the class of the mutants, triggering events and various comorbidities. Acute and chronic hemolytic anemias are the most typical clinical hallmarks. The determination and characterization of G6PD can be achieved by qualitative tests, various quantitative catalytic activity determinations, and by molecular biology techniques. Sample collection and stability is not a critical problem, but some pre-analytical conditions *in vivo* (previous transfusions, recent blood losses) should be known by the laboratory before measuring G6PD. A number of quantitative methods is available and there is no consensus on the measuring temperature (30 or 37°C) and on the reference ranges. The consequence is that the state-of-the-art of the various methods is variable, as clearly proven from recent EQAS analyses. Moreover, analytical goals have not been defined yet. In conclusion, we believe that this test needs better attention from laboratory professionals in order to offer an improved service to patients with G6PD deficiency anemias and related complications.

INQUADRAMENTO GENERALE

La glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è un enzima citosolico la cui principale funzione è la produzione di NADPH, un agente riducente estremamente importante nella difesa contro gli agenti ossidanti ed un substrato fondamentale nella biosintesi riduttiva di molte molecole del nostro metabolismo (1). La carenza di questo enzima è stata riscontrata per la prima volta oltre sessant'anni fa (2), e prima di questa scoperta erano state trovate carenze di altri due enzimi importanti nel metabolismo dei globuli rossi, la catalasi (3) e la galattosio 1-fosfato uridiltransferasi (4). Tuttavia soltanto la carenza G6PD causava un disordine ematologico, in particolare una anemia emolitica in seguito all'assunzione di certi tipi di farmaci antimalarici (2). Oggi si stima che oltre 400 milioni di persone al mondo siano portatori di questo difetto enzimatico. In questo documento cercheremo di fornire precise indicazioni sul

ruolo importante che il laboratorio ha nella caratterizzazione dei soggetti con tale difetto ereditario. Varie importanti rassegne e linee guida sono state pubblicate su questo argomento (5,6,7), anche recentemente (8), a testimonianza di quanto questo tipo di difetto genetico sia meritevole di particolari attenzioni.

Aspetti storici

Il favismo, ovvero la crisi emolitica acuta che può capitare in persone carenti di G6PD, era stato descritto per la prima volta da Pitagora di Samo nel V secolo a.C. (9). Pitagora era un noto matematico piuttosto che un medico, ma aveva intuito che mangiare fave poteva essere pericoloso e anche letale per l'uomo. Pitagora non aveva però compreso che la crisi emolitica si poteva verificare solo in certe persone e non in altre, forse perché non aveva potuto raccogliere un numero sufficiente di osservazioni.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento Fisiopatologia MCT, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Tel. 0250330422, E-mail andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 26.03.2020

Revisionato: 27.03.2020

Accettato: 11.04.2020

Pubblicato on-line: 08.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.040

Nel 1926 Cordless et al (10) avevano riportato l'occorrenza di crisi emolitiche acute in alcuni soggetti che erano stati trattati per la malaria con farmaci contenenti derivati della chinolina. Tuttavia dovettero passare altri trent'anni perché i meccanismi dell'emolisi potessero essere capiti in pieno. È stato grazie a Sterling e Gray, che avevano messo a punto un metodo per marcare i globuli rossi con il Cromo 51 per misurare la massa eritrocitaria e quindi per stimare la sopravvivenza degli eritrociti (11), che si è potuto fare un significativo passo avanti.

Durante il periodo della seconda guerra mondiale e della guerra in Corea, gli americani avevano dovuto sviluppare nuovi farmaci antimalarici che potessero evitare le crisi emolitiche che avevano sfinito un grande numero di soldati precedentemente. Beutler, nella sua bellissima rassegna (5), ricorda che gli esperimenti cruciali che hanno permesso di capire i meccanismi della crisi emolitica ed in particolare il ruolo molto importante del glutathione ridotto nel far fronte allo stress ossidativo, furono eseguiti su volontari carcerati che erano rinchiusi nel penitenziario dello stato dell'Illinois. Le tappe cruciali che hanno potuto dimostrare il ruolo centrale della G6PD nelle crisi emolitiche sono stati: la prova che la sensibilità alla primachina era dovuta a un difetto intrinseco del globo rosso, e non ad un problema nel plasma, e che la sensibilità alla primachina era il risultato di un difetto della G6PD eritrocitaria.

Struttura e proprietà biochimiche

L'enzima G6PD possiede una struttura quaternaria composta da quattro subunità identiche, ognuna con peso molecolare di 53 KDa. C'è voluto tempo per arrivare ad identificare la struttura primaria della singola catena polipeptidica composta da 515 aminoacidi, molto

difficile da ottenere con le classiche tecniche di studio delle proteine, perché la quantità di enzima che si può purificare dal sangue intero è veramente minuscola (circa 30 mg per litro di sangue). I dati di sequenza sono stati quindi ottenuti esaminando il DNA codificante grazie a Persico et al. (12) che hanno avuto successo nell'isolare cloni di cDNA della G6PD. Non esiste un solo tipo di G6PD "wild type", ma almeno due tipi denominati A+ e B, diffusi rispettivamente in Africa e nel bacino mediterraneo/territori caucasici. Esse differiscono solo per un aminoacido, una asparagina al posto di un acido aspartico (13).

L'enzima è presente in tutte le cellule e catalizza la prima tappa del ciclo degli esosi fosfati, cioè l'ossidazione del glucosio 6-fosfato a 6-fosfogluconolattone, con contemporanea riduzione di NADP^+ a NADPH (Figura 1a). I globuli rossi che hanno una normale attività di G6PD e di 6-fosfogluconato deidrogenasi (6PGD) sono in grado di fornire una sufficiente quantità di NADPH indispensabile per mantenere il ferro dell'eme allo stato ridotto (attraverso l'enzima metemoglobina reductasi). Il NADPH viene anche utilizzato per la riduzione del glutathione ridotto ad opera della glutathione reductasi, ed il glutathione ridotto è in grado di ridurre l'acqua ossigenata che si forma dall'anione superossido con la superossidosimutasi in presenza di stress ossidativo (Figura 1b). Va anche ricordato che negli eritrociti, come in tutte le altre cellule, è anche presente il sistema della tioredossina, che rappresenta un'altra potente barriera difensiva contro lo stress ossidativo (Figura 1c) ed anch'esso, per poter funzionare, dipende dalle riserve di NADPH. Nei globuli rossi che hanno una ridotta attività di G6PD la produzione di NADPH è pertanto limitata ed insufficiente per "tamponare" le specie reattive dell'ossigeno mediante i meccanismi sopra descritti.

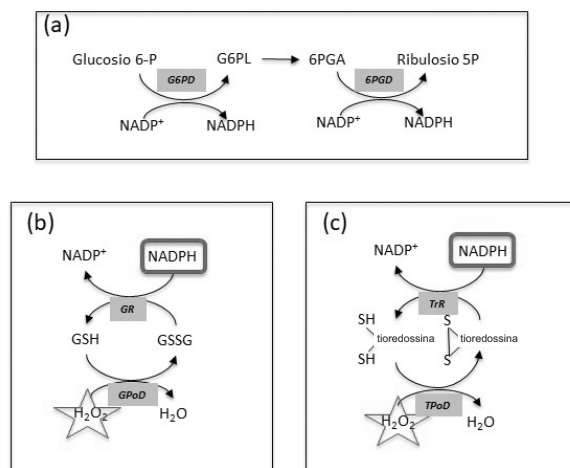


Figura 1

Schemi metabolici di formazione ed utilizzo del NADPH per fare fronte allo stress ossidativo, in particolare per la degradazione dell' H_2O_2 . (a): metabolismo del glucosio 6-P; (b): sistema del glutathione; (c): sistema della tioredossina.

6PGA, 6-fosfogluconato; 6PGD, 6-fosfogluconato deidrogenasi; G6PD, glucosio 6-fosfato deidrogenasi; G6PL, 6-fosfogluconolattone; GPoD, glutathione perossidasi; GR, glutathione reductasi; GSH, glutathione ridotto; GSSG, glutathione ossidato; TPoD, tioredossina perossidasi; TrR, tioredossina reductasi.

La forma attiva dell'enzima è un dimero od un tetramero, contenente due molecole di NADP⁺ per dimero. Le proprietà cinetiche dell'enzima sono state studiate approfonditamente, in base ad una serie di classici parametri biochimici (Km per i substrati naturali e per alcuni analoghi, optimum di pH, stabilità a diverse temperature, mobilità elettroforetica) (14), e questo ha portato ad individuare oltre 400 varianti alleliche, un numero più elevato del totale delle 185 mutanti di G6PD successivamente trovate mediante le analisi del DNA. In particolare, le varianti della G6PD sono state raggruppate in 5 differenti classi, in base all'attività enzimatica residua, rispetto ai soggetti non carenti, come illustrato nella Tabella 1 (15). La variante diffusa nel bacino mediterraneo, che ha prevalenza elevata in alcune regioni insulari italiane, è la variante mediterranea (G6PD^{Med}), che appartiene alla II classe, mentre la variante responsabile del deficit di G6PD in Africa (G6PD^A), appartiene alla III classe.

Genetica del deficit di G6PD

La codifica genica della G6PD si trova vicino alla regione telomerica del braccio lungo del cromosoma X (banda Xq28) in una regione che include i geni per l'emofilia A, discheratosi congenita e daltonismo. Il gene G6PD è costituito da 13 esoni e si estende su 18,5 Kb, con una regione del promotore molto ricca in guanina e citosina (GC) (12).

Essendo la modalità di trasmissione X-linked, i maschi portatori possono essere sia emizigoti normali che emizigoti carenti. Le femmine, invece, possono essere omozigoti normali, omozigoti carenti od eterozigoti. Una femmina eterozigote sarà un mosaico di cellule che esprimono l'enzima di tipo normale (wild-type) e di cellule che esprimono una variante carente. La proporzione variabile di globuli rossi normali e carenti, come conseguenza del fenomeno di inattivazione

casuale del cromosoma X (Lyonizzazione), rende la diagnosi in alcune donne eterozigoti difficile. Una frazione di globuli rossi negli eterozigoti (in media, 50%) è carente di enzimi come nei maschi emizigoti e quindi suscettibili all'emolisi. Questo fenomeno può acuirsi con l'età a causa di uno sbilanciamento della quota di inattivazione verso le cellule con l'allele non mutato (wild-type) e con conseguente sovraespressione di quello mutato. Le femmine eterozigoti sono di solito meno gravemente colpite delle femmine omozigoti o dei maschi emizigoti.

Le mutazioni più comuni del gene della G6PD sono mutazioni puntiformi "missenso", molto rare sono le delezioni, le mutazioni "nonsense", quelle del sito di "splicing" e quelle introniche. Sono stati anche descritti casi di doppie o triple mutazioni, quest'ultime molto rare. Le mutazioni generalmente causano un'alterata conformazione della molecola che ne produce instabilità ed aumentata suscettibilità alla degradazione proteolitica. Di conseguenza si assiste a una riduzione più o meno ampia dell'attività catalitica enzimatica, tipicamente rilevabile nei globuli rossi che, non avendo il nucleo, non sono in grado di sintetizzare la proteina una volta degradata. In taluni casi di varianti altamente instabili di classe I si può riscontrare anche un deficit di G6PD nei granulociti, con conseguenze aumentata suscettibilità alle infezioni, ed un quadro clinico analogo alla malattia granulomatosa cronica (16).

Minucci et al. (17) hanno pubblicato un accurato elenco di 186 mutazioni della G6PD, aggiornando un precedente database di Wulliams (18). Per ogni mutazione, il database riporta la posizione nucleotidica nel cDNA e nel gDNA, il codone, l'esone, la sostituzione aminoacidica, la posizione in struttura terziaria, la classe, la nazione di origine, lo score di conservazione (un indicatore di conservazione filogenetica) ed un enzima di restrizione utilizzabile per una digestione

Tabella 1

Classificazione delle varianti di G6PD secondo le raccomandazioni della Organizzazione Mondiale della Sanità (adattata da Gautham et al. rif 15).

Classe	Attività enzimatica residua ¹	Localizzazione della mutazione	Sintomi clinici caratteristici	G6PD varianti più rappresentative della classe
I	<1 %	Interfaccia tra i dimeri – sito del legame del NADP ⁺	Anemia emolitica cronica	Buenos Aires, Durban
II	<10 %	Interfaccia tra i dimeri – sito del legame del NADP ⁺	Anemia emolitica acuta (scatenata dall'assunzione di fave, farmaci o da altre cause)	Mediterranean, Cassano, Santamaria
III	10 – 60 %	Variabile	Anemia emolitica acuta (occasionalmente)	A-, Canton, Rignano, Seattle
IV	60 – 90 %	Zone neutre della proteina	asintomatico	Montalbano, Onissa
V	>110 %	Zone neutre della proteina – nel promotore	asintomatico	--

¹Rispetto al wildtype

endonucleasica, laddove il sito venga riconosciuto. Si tratta quindi di un database ricco di informazioni e molto completo, che si rifà a due database online, e che ci si augura venga regolarmente aggiornato, probabilmente anche mediante pubblicazioni su riviste scientifiche.

La maggior parte delle varianti della G6PD sono di tipo puntiforme: ad oggi, 217 sono state identificate sia nelle regioni trascritte (esoni) sia in quelle non tradotte (al 5' ed al 3' del gene).

L'analisi della sequenza del DNA unitamente alle analisi funzionali dei difetti molecolari dell'enzima ha dimostrato che le sostituzioni di singoli amminoacidi, per effetto di una mutazione puntiforme, portano principalmente ad una diminuzione della stabilità enzimatica od a riduzione dell'efficienza catalitica. La gravità della disfunzione dell'enzima rilevata nelle varianti è generalmente correlata alla gravità delle manifestazioni cliniche: pertanto la diagnostica molecolare svolge un ruolo fondamentale nella definizione del fenotipo clinico oltre che nella gestione del rischio familiare, in particolare per quanto attiene anche alla diagnostica prenatale o all'impiego di farmaci.

Contrariamente a quanto sembrerebbe, ed anche pubblicato su alcuni testi, la carenza di G6PD non è recessiva (7).

Aspetti clinici

Il deficit di G6PD nella maggior parte dei casi è asintomatico, i soggetti non sono anemici, non hanno emolisi né presentano alterazioni della morfologia delle cellule del sangue e solamente una ricerca della massa eritrocitaria con tecniche isotopiche può documentare una sensibile riduzione della vita media dei globuli rossi.

Tuttavia alcuni episodi di emolisi acuta sono principalmente alla base di diversi quadri clinici, che sono i seguenti:

- Anemia emolitica acuta indotta da infezioni, malattie, farmaci o altre sostanze esogene
- Favismo
- Ittero neonatale
- Anemia emolitica congenita non sferocitica

Anemia emolitica acuta

Questa è la manifestazione più tipica del deficit di G6PD, che si manifesta tipicamente nei soggetti portatori di varianti di classe II e III. In condizioni fisiologiche tali soggetti non presentano particolari manifestazioni cliniche od ematologiche, ma, in presenza di insulto ossidativo, scatenato dall'ingestione di farmaci ossidanti o per causa di infezioni di varia natura, sviluppano nell'arco dei 2-3 giorni successivi una emolisi acuta, caratterizzata da anemia, ittero ed emoglobinuria. L'esatto meccanismo per il quale si scateni l'emolisi non è chiaro, ma probabilmente i leucociti rilasciano specie reattive ossidanti durante la fagocitosi che possono causare un danno ossidativo agli eritrociti. I più comuni agenti infettivi che possono causare emolisi includono *Salmonella*, *Escherichia coli*,

Streptococchi beta-emolitici, *Rickettsie*, virus influenzale A (1).

Per quanto riguarda i farmaci (Tabella 2), è stata descritta una serie di farmaci anti-malarici che sicuramente possono essere responsabili di crisi emolitiche in soggetti con deficit di G6PD. Per altro, vi è consenso su una serie di altri farmaci che possono essere somministrati con sicurezza a soggetti con deficit di G6PD. Per vari altri farmaci non ci sono indicazioni specifiche in merito, emesse da due società [Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie, SITE (20); British Society for Haematology, BSH (21)]. Per quanto riguarda i farmaci anti-tumorali, non sono stati finora segnalati eventi emolitici in soggetti G6PD carenti, e lo stato di carenza di G6PD non deve influenzare la prima scelta terapeutica (mono o polichemioterapia) indicata dalle linee guida disponibili, con l'appropriata sorveglianza che normalmente si applica in questi casi di forte stress citotossico.

Tra le sostanze esogene infine, è noto che l'uso di henné naturale (di colore rosso-mattone, ottenuto da *Lawsonia inermis*) per tingere capelli, la pelle e le unghie, può indurre crisi emolitiche in portatori di difetti di G6PD (22,23). Oltre che per scopi cosmetici, nella medicina popolare di alcuni paesi orientali, lo henné viene anche impiegato nel trattamento di varie dermatosi (incluse infezioni fungine e psoriasi), per guarire le ulcere da decubito ed altro ancora. Va detto che, soprattutto nei paesi occidentali, era molto diffuso l'henné nero (black henna); tale colorante non esiste in natura e si ottiene con la aggiunta di para-fenilendiamina (PPD) che, per via topica è altamente sensibilizzante, a tal punto che in Europa e Nord America la concentrazione cosmetica è, da anni, assai limitata. Questo ha portato a considerare le sostanze naturali come assolutamente sicure. Ma ciò è un'illusione come hanno purtroppo dimostrato alcuni casi di intossicazione, anche fatale, in seguito ad applicazione topica dell'henné definito "naturale" che era stato applicato sulla cute di bambini (deficienti di G6PD) per motivi magico-religiosi (24,25).

In taluni soggetti (tipicamente portatori di varianti Mediterranea o Union) l'anemia può essere così grave da richiedere una terapia trasfusionale, mentre generalmente è più lieve nei pazienti con varianti di classe III.

L'associazione del deficit di G6PD con altre malattie è stata studiata in maniera non sistematica, ma recentemente sono stati pubblicati diversi lavori, in almeno due settori, quello del diabete e quello del cancro. È stato infatti descritto che soggetti con difetti di G6PD con episodi di acidosi diabetica od ipoglicemia, possono sviluppare una crisi emolitica (26,27). Per quanto riguarda l'interazione tra G6PD e diabete, varie indicazioni suggeriscono che l'attività media della G6PD nel diabete sia significativamente più bassa rispetto ai soggetti non diabetici ed anche che l'attività in presenza di dislipidemia sia più bassa rispetto alle condizioni di buon controllo lipidico (28). Ci sono invece dati

Tabella 2

Farmaci che possono scatenare l'emolisi in soggetti carenti di G6PD (modificata da linea guida BJH 2020, rif. 8 e raccomandazioni SITE, rif. 20).

Categoria	Principio attivo	Indicazioni BJH 2020	Indicazioni SITE 2018
Analgesici - FANS	Acetanilide ¹	nd	da evitare
	Acido acetil-salicylico	prescrivibile ²	prescrivibile ¹
	Fenazopiridina	da evitare	da evitare
Antibatterici - antibiotici	Chinolonic	da evitare	da evitare ³
	Cotrimoxazolo	da evitare	nd
	Nitrofurani	da evitare	da evitare
	Nitrofurazone	nd	da evitare
	Sulfadiazina	da evitare	nd
Sulfamidici e sulfoni	Dapsone	da evitare	da evitare
	Sulfapiridina	nd	da evitare
	Sulfadimidina	nd	da evitare
	Sulfoxone	nd	da evitare
Antielmintici	Beta-naftolo	nd	da evitare
	Niridazolo	nd	da evitare
Antimalarici	Cloroquina	(possibile emolisi)	(possibile emolisi) ⁴
	Dapsone	da evitare	nd
	Mefloquina cloridrato	nd	(no controindicazioni)
	Mepraqina	nd	(no controindicazioni)
	Primaquina	da evitare	(no controindicazioni) ⁵
	Tafenoquina	da evitare	nd
Vari	Acetilfenilidrazina	nd	da evitare
	Blu di metilene	da evitare	da evitare
	Blu di toluidina	da evitare	da evitare
	Dimercaprol	nd	da evitare
	Fenilidrazina	nd	da evitare
	Naftalina	nd	da evitare
	Rasburicasi	da evitare	(no controindicazioni)
	Sodio di-mercapto-sulfonato	nd	da evitare

¹Poco usato a causa di numerosi effetti collaterali

²Effetto emolitico ad alte dosi

³Possibilmente da evitare anche in soggetti non carenti di G6PD

⁴Evitare associazioni con altri farmaci potenzialmente emolitici

⁵Dose singola da 25 mg per eliminazione gametociti *P. falciparum*; dosaggio ridotto 15mg/die o 45 mg 2 volte/settimana per prevenzione delle ricadute da *P. vivax*)
nd, non determinato.

contrastanti che indicherebbero che la carenza G6PD possa avere un effetto causale nei confronti della retinopatia diabetica (29,30). Probabilmente il fatto di essere più sensibili ad insulti di tipo ossidativo, ed essendo da molti riconosciuto che il danno mitocondriale è alla base di varie complicanze del diabete (31), potrebbe spiegare perché pazienti diabetici con difetti di G6PD siano più prone a sviluppare complicanze rispetto ai non carenti. Una recente meta-analisi di fatto conferma l'associazione tra carenza di G6PD e rischio di diabete, con un rischio maggiore per i maschi rispetto alle femmine, ma saranno necessarie altre ricerche per

stabilire in che modo il deficit di G6PD possa interferire con le complicanze (32).

Per quanto riguarda il cancro, segnaliamo uno studio retrospettivo caso-controllo su quasi 4000 soggetti sardi, per valutare l'associazione tra difetto di G6PD e tumore del colon retto (33). I risultati dimostrano una riduzione del rischio del 43% nei soggetti carenti rispetto ai controlli, che rimane anche dopo aggiustamento delle covariate. Gli autori ipotizzano che nei soggetti carenti di G6PD, la riduzione del NADPH disponibile possa servire a rallentare la crescita delle cellule tumorali. Un altro studio in vitro ha di fatto provato che il silenziamento

genico della G6PD è associato ad una riduzione della proliferazione cellulare (34). Uno studio più recente effettuato su linee cellulari di tumore al seno, ha poi dimostrato che la inibizione della G6PD mediante un farmaco (Lapatinib) causerebbe un'alterazione dell'autofagia che potenzierebbe gli effetti del farmaco (35). In maniera complementare, altri ricercatori hanno dimostrato su modelli animali che l'up-regulation della via dei pentoso fosfati (in particolare la over-espressione della G6PD) è correlata a livelli maggiori di malignità in topi *Wistar* con tumori all'esofago (36).

Favismo

E' la condizione di gravi crisi emolitiche che può verificarsi nei soggetti portatori di deficit di G6PD, in seguito alla ingestione di fave. Essa è particolarmente frequente e più grave nei bambini con età tra 2 e 10 anni, che si presentano in Pronto Soccorso con pallore, ittero, dolori addominali, tremori e spesso febbre (7). I genitori riportano, se interrogati, che quasi sempre i loro figli hanno prodotto urine scure e che hanno mangiato le fave. L'esame dello striscio di sangue periferico colorato con May-Grünwald-Giemsa, evidenzia la presenza di emazie irregolarmente contratte, alcune nucleate, che indicano una eritropoiesi stimolata. Si osservano inoltre cellule a bolla ed "hemighosts"¹, caratteristici di una emolisi di tipo ossidativo. Da notare, che il favismo è stato anche riscontrato in neonati allattati al seno, le cui mamme avevano mangiato le fave (37).

La crisi è del tutto uguale a quella scatenata dall'ingestione di farmaci, ma non è assolutamente detto che tutti i portatori di G6PD sviluppino questa crisi. Molto dipende dalla quantità di fave ingerite, dal fatto se siano fresche o secche (quelle fresche sono le più pericolose), dai diversi *cultivar* e da altri fattori difficilmente prevedibili a priori (ad esempio dalla funzionalità del sistema del complemento). Naturalmente, tra i fattori determinanti, molto importante è il tipo di variante di G6PD (classicamente la Mediterranea, ma anche altre varianti come la A- e la Canton) (38).

I meccanismi che portano i globuli rossi dei soggetti con deficit di G6PD a venire lisati in seguito alla ingestione delle fave sono stati ben chiariti (7). Le fave sono ricche di due glicosidi, vicina e convicina, che vengono trasformate dalla β -glucosidasi della flora intestinale in due metaboliti attivi (divicina ed isouramile, rispettivamente) in grado di produrre radicali liberi ossidanti, che, se non neutralizzati dal glutatione ridotto, innescano reazioni a catena nei lipidi di membrana che esitano nella lisi cellulare. La crisi è in parte intravascolare, ma soprattutto extravascolare.

Ittero neonatale

E' una delle complicanze più gravi del difetto di G6PD, ed è forse la causa più frequente di ittero del

neonato, particolarmente se si tratta di neonati prematuri. L'ittero si manifesta generalmente in seconda o terza giornata e la bilirubina può salire anche a livelli superiori a 30 mg/dL. Si è notato che questo fenomeno ha una variabilità e gravità variabili in diverse popolazioni, verosimilmente per concause non completamente capite, sia per il tipo di variante presente, che per fattori ambientali (per esposizione della madre e/o del feto a erbe, o farmaci ossidanti) (39,40). Raramente l'ittero è di tipo emolitico, più tipicamente di natura epatica per un difetto di coniugazione, secondario ad un deficit di glucuronil-UDP transferasi (41). Può essere necessaria fototerapia od exsanguino-trasfusione. Se trascurato c'è un rischio elevato di kernittero e decesso.

Anemia emolitica congenita e cronica non sferocitica.

E' un quadro che si associa alle varianti di classe I, presente già alla nascita con iperbilirubinemia ed in seguito con splenomegalia. Generalmente riguarda soggetti maschi con mutazioni spontanee, anche se in alcuni casi la mutazione è presente in eterozigosi nella madre. Generalmente le manifestazioni sono lievi, ma possono arrivare a richiedere la trasfusione. Spesso i soggetti hanno ipersplenismo con emolisi cronica, ed eventualmente peggiorata in occasione di stress ossidativi. Non c'è consenso sul praticare la splenectomia, che oltre che a ridurre le difese immunitarie, non sempre ha effetti benefici (42).

Aspetti epidemiologici

Da molto tempo si supponeva che la significativa prevalenza del difetto di G6PD, così come di altri difetti eritrocitari quali l'anemia falciforme e le talassemie, potesse conferire una resistenza significativa nei confronti della malaria causata dal *Plasmodium falciparum* (43-45). Oggi di fatto viene universalmente riconosciuto che il difetto di G6PD, con il caratteristico polimorfismo genetico dell'eterozigote, offre un vantaggio selettivo nei confronti della malaria (46). La frequenza delle mutazioni varia molto tra le popolazioni, con la G6PD A- più prevalente nelle popolazioni africane e afro-americane, con una frequenza di circa 11%. La mutazione mediterranea (G6PD B-) è più frequente nei paesi attorno al bacino del mar Mediterraneo e le frequenze sono molto variabili da nazione a nazione, dal 2 fino al 20%. La più alta prevalenza di deficit di G6PD (70 %) è stata riportata negli ebrei curdi (47). La Figura 2 illustra la distribuzione del deficit di G6PD nel mondo, unitamente alla distribuzione del favismo, che si nota avere una distribuzione inferiore perché in alcune aree dove il deficit di G6PD è diffuso (soprattutto per la variante africana A-), quali l'Africa tropicale, il favismo non è stato descritto. Sempre per quanto riguarda la

¹Emazie nelle quali l'emoglobina si trova raggruppata ad un polo della cellula, lasciando la parte rimanente vuota

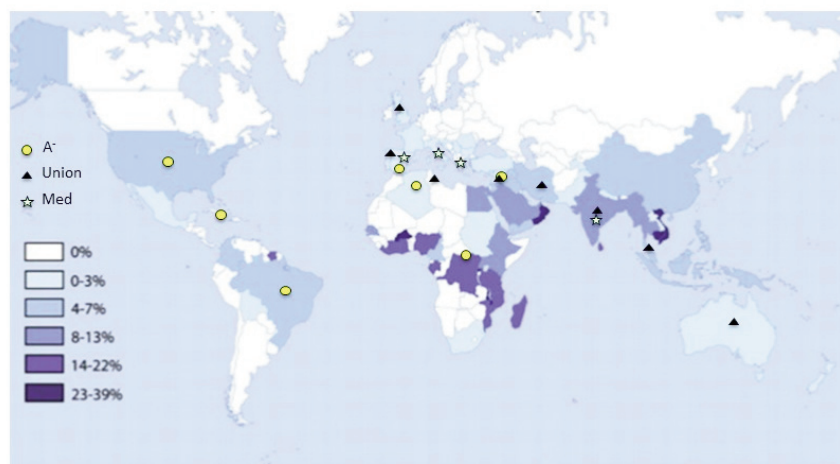


Figura 2

Prevalenza del deficit di G6PD (da Nkhoma et al, rif. 43) e distribuzioni delle principali varianti di G6PD associate a favismo (da Luzzatto et al, rif. 7). Altre varianti (Cairo, Cassano, Cosenza, Mahidol, Canton, Coimbra, Kaipling, Viangan, ed altre ancora) sono state ritrovate in tre Nazioni o meno.

prevalenza del favismo, l'informazione è lacunosa sotto alcuni aspetti, perché, ad esempio, il favismo è stato riportato in Russia ma non capita probabilmente sull'intero territorio di questa nazione (7).

Per quanto riguarda lo screening neonatale, dal 2015 lo screening generale è stato implementato in solo pochi paesi, tra i quali un paio di Stati negli USA, Grecia, Panama e sei paesi dell'Asia pacifica ed hanno preso l'avvio programmi di screening pilota in altre nove nazioni (48). Un recente studio condotto in Svezia ha permesso di conoscere ora quale è la prevalenza del deficit di G6PD in questo paese, dove su oltre 10 milioni di abitanti si contano più di 2 milioni di immigrati, molti dei quali provenienti da paesi dove il deficit di G6PD è endemico (49). I risultati ottenuti dimostrano che un neonato su 350 ha un'attività di G6PD $\leq 10\%$ rispetto ai wild-type e che, se si includono anche i neonati con un'attività $\leq 40\%$, la prevalenza arriva a circa lo 0,6% di tutti neonati, a riprova che questa condizione non è rara anche nei paesi del nord Europa.

DIAGNOSI DI LABORATORIO DEL DEFICIT DI G6PD

Indicazioni per la misura della G6PD

Aldilà delle indicazioni cliniche prima descritte (favismo, ittero neonatale, anemia emolitica congenita non sferocitica, emolisi causata da farmaci, infezioni od altre sostanze esogene) le condizioni per le quali è appropriato richiedere la misura della G6PD possono essere le seguenti (8):

nell'adulto

- prima della somministrazione di farmaci antimalarici o di altro tipo, potenzialmente ossidanti (Tabella 2)
- in presenza di morfologia eritrocitaria suggestiva di danno ossidativo o positiva per corpi di Heinz

- emoglobinuria
- anemia a cellule falciformi (HbSS, Sickle Cell Disease)
- sindromi talassemiche
- familiarità per deficit di G6PD e favismo
- iperuricemia da neoplasie (leucemie, linfomi) da trattare con rasburicasi
- emolisi acuta dopo trapianto di cellule staminali da donatore non precedentemente valutato per deficit di G6PD

nel neonato

- anemia emolitica non di tipo immune
- ittero neonatale grave o prolungato

L'emolisi causata da farmaci nei soggetti portatori della variante africana (A-) può essere molto pericolosa, anche letale, e quindi la tipizzazione del deficit di G6PD in questi casi può fornire informazioni preziose per curare l'emolisi con adeguata tempestività. Ovviamente la gravità ed il decorso clinico dipendono sia dal tipo di variante, che dal tipo e dalla durata dello stress ossidativo. Entrambi sono anche correlati all'età del soggetto e ad eventuali comorbidità. Nelle popolazioni dove il deficit di G6PD è prevalente si nota sovente anche una prevalenza significativa di sindromi talassemiche e di anemia falciforme, e sembrerebbe che la co-ereditarietà dell'anemia falciforme e del deficit di G6PD sia associata ad una anemia più grave ed a un maggior rischio di danno cerebrovascolare (50).

Raccolta e conservazione dei campioni

Il campione di sangue fresco raccolto in K₂-EDTA, litio eparina, ACD (acido citrico, citrato e destrosio), CPD (citrato, fosfato e destrosio) e sodio citrato è adatto per la misura quantitativa dell'attività catalitica, per il test di screening in fluorescenza e per l'analisi citochimica. La stabilità del campione è di quattro giorni a 4-8 °C e di

poche ore a temperatura ambiente. Dal momento che la G6PD è di per sé un enzima delicato per quanto riguarda la sua struttura quaternaria, ed è instabile nell'emolisato, è sconsigliato preparare e conservare emolisi eritrocitari sia a 4°C che a -20°C. Per le analisi di biologia molecolare si consiglia di usare sangue in K₃-EDTA o K₂-EDTA. Il campione di sangue deve essere dedicato e non deve essere lo stesso utilizzato per l'esame emocromocitometrico o per gli esami biochimici, al fine di evitare cross-contaminazioni attraverso gli aghi campionatori degli strumenti (effetto "carry-on") o la manipolazione con pipette non sterili o che usino puntali senza filtro.

Metodi analitici

Metodi di screening qualitativi

Sono disponibili numerosi test di screening basati sulla rilevazione diretta o indiretta del NADPH formato nella reazione della G6PD. In questi ultimi anni si è avuto anche un notevole incremento nella disponibilità di test rapidi di tipo POCT (51).

I metodi qualitativi sono in grado di evidenziare le carenze severe dell'enzima per cui permettono la diagnosi rapida dei soggetti emizigoti ed omozigoti ma non sono attendibili per l'identificazione degli eterozigoti. Sono particolarmente utili in occasione di controlli alla nascita o per lo screening nelle popolazioni con un'alta frequenza del difetto enzimatico. Ad esempio vengono utilizzati nei paesi dove la malaria è endemica per identificare i soggetti carenti prima della somministrazione di farmaci antimalarici.

Un metodo di screening molto utilizzato è il "fluorescent spot test" (52). Il metodo è basato sulla rilevazione della fluorescenza del NADPH formato nella reazione enzimatica che viene fatta avvenire su un dischetto di carta da filtro sul quale viene depositata la goccia di sangue e la miscela di reazione. L'avvenuta formazione di NADPH viene evidenziata mediante osservazione dello spot alla luce ultravioletta. Lo spot fluorescente è indice di non-carezza; al contrario, in caso di deficit, lo spot rimane scuro.

Un altro test di screening è quello di decolorazione ("dye reduction") (53). Il metodo è basato sul principio che il NADPH formato nella reazione della G6PD riduce un colorante presente nella miscela di reazione (Brillant Cresyl Blue, Diclorofenolo Indofenolo) con sviluppo di un composto incolore. La scomparsa del colore è valutata visivamente e fornisce una conferma dell'attività della G6PD, diversamente la permanenza del colore prova il deficit.

I dispositivi POCT utilizzano per la rilevazione del risultato metodi colorimetrici basati sulla comparsa di un composto colorato in seguito alla riduzione, ad opera del NADPH, di un sale di tetrazolio, incolore, a formare formazano di colore rosso. I metodi POCT sono particolarmente utili nei programmi di screening neonatali, per l'uso sul campo e in tutte le situazioni in cui è necessaria una risposta in tempi molto rapidi (54).

Metodo citochimico

Il metodo è stato descritto per la prima volta da Fairbanks (55) ed ha poi subito diverse modifiche per migliorarne l'affidabilità (56). L'esame è basato sulla capacità dell'emoglobina, a differenza della metaemoglobina (MetHb), di ridurre certi coloranti facendoli precipitare in forma di granuli. L'esame prevede una prima incubazione del campione di sangue con nitrito di sodio per ossidare l'emoglobina a MetHb, che è seguita da una seconda incubazione con la miscela di reazione contenente il colorante (MTT tetrazolio). Se il NADPH viene formato, questo riduce la MetHb a emoglobina ossigenata ed il colorante è convertito nella sua forma insolubile, visibile all'interno dei globuli rossi come una granulazione rosso scura. Le cellule incapaci di ridurre la MetHb a causa della carenza di G6PD non presentano granulazioni al loro interno.

La conta delle cellule con granuli al microscopio può fornire un risultato semi-quantitativo. A questo riguardo, sono stati sviluppati metodi in citofluorimetria per la valutazione delle cellule positive o negative al test (57). L'esame permette la rilevazione dell'attività della G6PD nei singoli eritrociti per cui risulta particolarmente utile per identificare la carenza nelle femmine eterozigoti. Presenta però lo svantaggio di essere piuttosto complesso, e di richiedere per la sua esecuzione personale esperto e di essere quindi poco applicabile all'uso in routine.

Metodi enzimatici quantitativi

I metodi enzimatici quantitativi prevedono la determinazione dell'attività enzimatica della G6PD nei globuli rossi e sono alla base della diagnosi biochimica del deficit enzimatico. Oltre al metodo spettrofotometrico in manuale originariamente sviluppato da Beutler (58), sono disponibili in commercio numerosi metodi, offerti da diverse aziende di diagnostici, che possono essere implementati sui principali analizzatori di chimica clinica.

La determinazione dell'attività enzimatica viene effettuata misurando l'incremento di assorbanza a 340 nm, dovuta alla riduzione del NADP⁺ a NADPH che si verifica nel corso della reazione riportata di seguito:



Poiché il 6PGA prodotto dalla reazione della G6PD viene utilizzato come substrato dalla 6-fosfogluconato deidrogenasi (6PGD) con formazione di molecole di NADPH aggiuntive, la metodica raccomandata dall'International Committee for Standardization in Haematology (ICSH) prevede che per una corretta misura dell'attività della G6PD venga sottratta l'attività della 6PGD che deve essere misurata separatamente (58). Alcune metodiche commerciali utilizzano inibitori della 6PGD (ad esempio maleimide) per prevenire questa interferenza.

Un altro punto di attenzione analitico è rappresentato dalla contaminazione leucocitaria dell'emolisato su cui

viene effettuata la misura. Nei leucociti l'attività della G6PD è molto maggiore che non negli eritrociti; per questo motivo la metodica indicata dalla ICSH prevede il completo allontanamento dei leucociti per mezzo della filtrazione su cellulosa del campione di sangue. Vista la scarsa praticabilità di questa procedura, viene ritenuta accettabile anche la semplice rimozione del "buffy coat" dopo centrifugazione (8).

I risultati dell'attività enzimatica sono convenzionalmente espressi in rapporto alla concentrazione di emoglobina o al numero di eritrociti. E' stato anche proposto di esprimere l'attività della G6PD in rapporto a quella di altri enzimi eritrocitari quali ad esempio la 6PGD o la piruvato chinasi (PK). L'attività della G6PD è strettamente legata alla vita eritrocitaria e decade progressivamente nel corso dell'invecchiamento degli eritrociti. Questo comporta che nei soggetti che per svariati motivi presentano una vita media eritrocitaria diminuita (ad esempio i portatori di α - o β -talassemia, i soggetti con anemia sideropenica o con reticolocitosi), l'attività della G6PD sia più alta. La normalizzazione dell'attività della G6PD con quella di un altro enzima eritrocitario che varia in parallelo in relazione all'età eritrocitaria, permette una migliore discriminazione dei soggetti con il deficit, in particolare delle femmine eterozigoti (59,60). Il problema è soprattutto rilevante nelle regioni ad alta prevalenza di talassemia come la Sardegna dove peraltro è alta anche la frequenza del deficit di G6PD.

I metodi enzimatici quantitativi sono in grado di identificare facilmente i maschi emizigoti e le femmine omozigoti che hanno attività enzimatiche molto ridotte. Per le femmine eterozigoti, a causa del mosaicismo, e quindi all'ampia variabilità dell'attività enzimatica che può variare da bassa a quasi normale, l'identificazione può essere più problematica. Criticità nella diagnosi si possono incontrare quando l'attività enzimatica viene misurata durante o immediatamente dopo una crisi emolitica per l'elevato numero di reticolociti. In queste cellule l'attività della G6PD è molto più alta che non negli eritrociti maturi e questo potrebbe comportare risultati di attività enzimatica ai limiti della normalità e mascherare una carenza. Difficoltà nella diagnosi possono anche insorgere nella valutazione dei neonati che hanno una popolazione eritrocitaria mediamente più giovane e nei casi in cui il deficit enzimatico è associato alla presenza di varianti molecolari con attività di poco ridotte.

Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento dipendono dal metodo che si usa, dalla temperatura di esercizio e da possibili altri fattori strumentali. Il metodo originalmente sviluppato da Beutler e quindi promulgato come metodo raccomandato da ICSH (58), prevedeva l'esecuzione della determinazione a 30°C, ma questa temperatura non può essere impostata su analizzatori automatici che invece operano (come anche per tutti gli altri enzimi della routine di laboratorio), a 37°C. Chi fa la misura in manuale può lavorare a 30°C usando i tradizionali bagni

termostatici e condizionando la temperatura del reparto cuvette dello spettrofotometro.

Per comodità riportiamo gli intervalli di riferimento per gli adulti, esprimendo le unità di G6PD in unità internazionali e rapportandole per grammo di emoglobina totale (8):

- a 37°C: 6,8 – 10,8 IU/g Hb (con correzione per l'attività della 6PGD)
- a 37°C: 10,0 – 14,2 IU/g Hb (senza correzione per l'attività della 6PGD)
- a 30°C: 7,0 – 10,4 IU/g Hb (senza correzione per l'attività della 6PGD)

Taluni esprimono le attività normalizzandole per numero fisso di eritrociti, ed in tal caso gli intervalli indicati a 37°C (metodica a 37 °C senza correzione per l'attività della 6PGD) sono 229 – 472 IU/10¹² eritrociti (61).

Le attività enzimatiche nei neonati e nei bambini sono significativamente più elevate che negli adulti, ed in particolare, nei neonati, possono essere circa 1,5 volte più alte rispetto agli adulti (62) .

Nei maschi enzimopenici l'attività è generalmente molto bassa (< 2 IU./g Hb operando a 30°C).

Refertazione

Il referto, che dovrebbe essere conforme allo standard ISO 15189:2012, dovrebbe riportare, per i metodi quantitativi, l'attività enzimatica, le unità di misura o l'eventuale rapporto con altra attività enzimatica. Andrebbe riportata anche la temperatura di determinazione e l'intervallo di riferimento utilizzato. Le linee guida inglesi raccomandano di riportare anche il numero di reticolociti (8). E' opportuno riportare anche un commento interpretativo al quesito clinico.

Nel caso dei test di screening il risultato dovrebbe essere riportato come "non portatore di deficit di G6PD", "carente" o "dubbio, esame da ripetere".

Stato dell'arte

Come riportato, sono a disposizione svariate metodiche per la misura dell'attività catalitica della G6PD. Purtroppo non tutti i produttori dichiarano apertamente il principio della misura, ed in alcuni casi la misura è apparentemente effettuata sulla base della sola attività della G6PD (Sentinel, Milano). In altri l'attività della 6PGD è inibita mediante maleimide (Mascia Brunelli, Milano; Pointe Scientific, Canton, MI, USA; Trinity, Wicklow, IR). Apparentemente nessun produttore sembra eseguire separatamente le due reazioni, per poi sottrarre l'attività della 6PGD. Una delle metodiche (Nurex, Sassari) prevede il rapporto delle attività G6PD/6PGD.

Il programma di VEQ coordinato dalla AOU Careggi (Firenze) prevede la distribuzione di 6 campioni per ogni ciclo, sotto forma di emolisati liofilizzati. Dai report esaminati relativi al ciclo 2019, 5 dei 6 campioni distribuiti erano da soggetti carenti di G6PD ed 1 da soggetto non carente. Su circa 60 partecipanti, il 95% ha risposto in maniera corretta nell'analisi di un soggetto fortemente carente (G6PD pari a 0,7 IU/g Hb), il 60%

circa nell'analisi di un soggetto carente (G6PD pari a 3,6 IU/g Hb), ed il 41% circa nell'analisi di un soggetto non carente (G6PD pari a 7,6 IU/g Hb).

Il programma di VEQ coordinato dall'UK NEQAS ha visto, nel 2019, la partecipazione di 212 laboratori, 103 dei quali residenti in UK. Anche in questo caso, erano state organizzate sei distribuzioni, con 2 campioni per volta. In totale, in 8 esercizi erano stati fatti circolare campioni di sangue umano (raccolti in CPD) non carenti di G6PD, 2 di soggetti carenti e 2 di sangue di pecora defibrinato (la pecora, dal punto di vista della G6PD, è equivalente ad un soggetto umano carente). I risultati ottenuti, divisi per metodiche di screening e metodiche quantitative (sia a 30 che a 37°C) sono simili a quelli raccolti in Italia. Il tasso di risposta corretta per le metodiche di screening era pari al 91,3%. Per le metodiche quantitative a 37°C, si riscontravano, su soggetti non carenti, variabilità inter-laboratorio attorno al 20-22%.

In conclusione, si ritiene che ci sia ampio spazio per significativi miglioramenti nella armonizzazione e nelle prestazioni analitiche delle metodiche attualmente maggiormente utilizzate per la misura della G6PD, sia a livello nazionale che a livello internazionale.

Diagnostica molecolare

L'analisi molecolare deve essere considerata o suggerita nei casi in cui una diagnosi precisa è necessaria per motivi clinici. L'analisi biochimica infatti non è risolutiva in caso di un paziente recentemente trasfuso, una femmina eterozigote o quando una carenza può essere mascherata da una reticolocitosi. Di contro, va sottolineato che l'analisi molecolare potrebbe non identificare tutte le varianti e che il risultato dell'indagine potrebbe non riflettere l'attività funzionale dell'enzima misurata in quello specifico momento, in quanto potrebbero essere presenti fattori di confondimento quali la concentrazione di reticolociti e la durata della vita degli eritrociti stessi.

Sebbene in letteratura siano stati pubblicati diversi metodi molecolari per semplificare la rilevazione delle varianti patogenetiche (VP) della G6PD, quali analisi mediante enzimi di restrizione (PCR-RFLP), mediante tecnica ARMS (amplification-refractory mutation system), o mediante elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE), cromatografia liquida ad alte prestazioni in ambiente denaturante (DHPLC), o in "reverse dot blot", tali tecnologie possono essere superate dall'impiego sia del metodo di Sanger che dalle tecnologie basate su realtime PCR-allele specifica.

Di fatto, il sequenziamento Sanger resta il gold standard per la genotipizzazione delle mutazioni note comuni, meno frequenti o per la ricerca di varianti nuove (63). Ciò soprattutto in considerazione del fatto che il miglioramento di efficienza e dei costi del sequenziamento del metodo Sanger ne permettono un utilizzo routinario, tanto più perché la notevole eterogeneità delle VP associate a carenza di G6PD, ne ha permesso un impiego routinario nella diagnostica dei

difetti molecolari di G6PD. Infatti, un risultato positivo derivante dall'analisi mediante Sanger può essere considerato come definitivamente diagnostico. Tuttavia, se non viene trovata una alterazione genetica, solo l'analisi biochimica quantitativa può stabilire una carenza di G6PD.

Per alleggerire il carico di lavoro dei laboratori con elevato numero di richieste (ad esempio i centri di riferimento regionali o nazionali) si potrebbero adottare due livelli di analisi:

- un primo livello, per lo screening delle VP più frequenti nella popolazione.

In tal caso, anche altri approcci per lo screening delle varianti note, come quelli basati sulla tecnica di "High Resolution Melting" (HRMA) possono ridurre i tempi di identificazione delle varianti più comuni in una specifica area geografica. Il nostro gruppo ha pubblicato ad esempio che in Italia le varianti più comuni di G6PD sono le seguenti: G6PD Mediterranean (c.563 C > T), G6PD Seattle (c.844 G > C), G6PD A-(c.202 G > A+ c.376A > G) e G6PD Cassano (c.1347 G > C) (59). Pertanto, un laboratorio con una competenza molecolare media, può agevolmente affrontare lo screening di tali varianti mediante PCR + HRMA, o con tecniche di sequenziamento che coprano solo le regioni di interesse diagnostico;

- in presenza, invece, di sospetto clinico o di alterazioni biochimiche suggestive di deficit di G6PD (indici di emolisi, in particolare) ed in assenza di VP determinate allo screening delle più frequenti, bisognerà approfondire l'analisi con un approccio di II livello, che consiste nel sequenziamento dell'intero gene e delle regioni di regolazione. A livello molecolare le varianti patogenetiche che colpiscono il gene G6PD si trovano nelle regioni del gene codificanti per domini strutturali direttamente coinvolti nell'attività catalitica, come gli esoni 10 e 11, codificanti per la regione di interfaccia del dimero attivo, e gli esoni 3 e 7, coinvolti rispettivamente nel legame del cofattore e del substrato. Ovviamente, nella donna portatrice, l'utilizzo del test diagnostico deve essere suggerito solo in pochi casi e precisamente:

- quando è necessario stabilire lo stato di portatore, particolarmente nell'ambito di famiglie nelle quali il padre della donna sia affetto da deficit di G6PD. Questo dato di deficit, che spesso sfugge all'indagine quantitativa classica, può servire soprattutto nella madre gestante di un feto maschio per pianificare le pratiche di svezzamento e di supplementazione post-natali dove, l'introduzione di alimenti contenenti fave o l'uso di vitamina K possono determinare crisi emolitiche nel bambino maschio.

- per escludere il deficit di G6PD in una donna con crisi emolitica che sia risultata negativa agli altri test diagnostici (diagnosi differenziale). Lo screening di routine delle donne non è indicato, se non nelle aree geografiche più a rischio, come l'Africa.

L'utilizzo delle indagini molecolari, alla stregua degli altri

esami di laboratorio, deve partire da livelli chiari di evidenza. Pertanto, l'analisi molecolare può essere effettuata nelle seguenti situazioni: se i risultati delle procedure diagnostiche sono equivoche o borderline, come accade nelle donne eterozigoti; nei maschi con sindrome di Klinefelter (XXY) dove si possono riscontrare livelli medi di G6PD simili a quelli delle femmine eterozigoti.

Anche per le tecniche di diagnostica molecolare dovrebbero essere fruibili programmi di VEQ, che al momento purtroppo non risultano disponibili.

Interpretazione

Il riconoscimento del difetto di G6PD è abbastanza semplice su soggetti di genere maschile, ma può presentare difficoltà nelle femmine, dovute al mosaicismo derivante dalla inattivazione di uno dei due cromosomi X. La definizione del difetto molecolare mediante analisi del DNA è di aiuto in questi casi, ed anche indispensabile nel caso di pazienti con crisi emolitiche o trasfusi.

Un conteggio elevato di reticolociti deve fare sospettare la presenza in circolo di globuli rossi più giovani, con attività enzimatiche che possono produrre un risultato falsamente normale. In tali casi, come anche in presenza di un episodio emolitico acuto, è consigliabile ripetere la determinazione a 2-3 mesi di distanza dopo la risoluzione della fase acuta. In queste situazioni è anche consigliabile esaminare la morfologia eritrocitaria su uno striscio di sangue periferico, nel quale si dovrebbero notare globuli rossi di forma molto irregolare, tipici di danno ossidativo, e si possono osservare entro due giorni dall'inizio dell'episodio emolitico.

In campioni con un contenuto intra-eritrocitario di emoglobina molto basso (<25 pg), che è possibile riscontrare in presenza di sindromi talassemiche, si possono riscontrare attività enzimatiche di G6PD al di sopra degli intervalli di riferimento. Infine, si ricorda che campioni con anemia od elevata conta leucocitaria possono dare risultati non affidabili con i test di screening. In questi casi, i problemi si possono risolvere eliminando il buffy coat ed effettuando le misure sui globuli rossi concentrati.

CONCLUSIONI

L'esame della G6PD, sia come misura dell'attività enzimatica, che come caratterizzazione genotipica, riveste tuttora un ruolo importante in Medicina di Laboratorio perché può essere richiesto in vari contesti, sia su neonati, che su soggetti adulti. Inoltre in talune aree, sia in Italia che all'estero, laddove la prevalenza del deficit di G6PD è significativamente più alta che altrove, sono state attivate campagne di screening di massa. Non ultimo, l'uso di farmaci anti-malarici nelle fasi precoci della pandemia da Coronavirus in essere al momento nel quale scriviamo questa rassegna, dovrebbe fare riflettere sul possibile rischio emolitico in

malati di Covid-19 portatori di deficit di G6PD e sull'opportunità di sottoporre a screening i pazienti prima della somministrazione di questo tipo di farmaci, o per lo meno di allertarli per porre attenzione ai sintomi tipici di emolisi (ad esempio comparsa di urine scure) (64).

La numerosità delle metodiche di determinazione dell'attività catalitica (sia semi-quantitative che quantitative) e la mancanza di materiali di riferimento spiegano una variabilità analitica ancora elevata, che unita alle fonti di variabilità sia pre-analitiche che post-analitiche, fanno sì che questo esame richieda ancora grande attenzione da parte dei professionisti di laboratorio.

Si raccomandano, tra i vari metodi disponibili, quelli basati sulla misura dell'attività catalitica: ogni laboratorio dovrà creare i propri intervalli di normalità sulla popolazione di riferimento. Per lo screening delle femmine (portatrici), è consigliabile l'espressione del risultato come rapporto tra le attività enzimatiche G6PD/6PGD. Per quanto riguarda la definizione del genotipo, questo esame andrebbe effettuato ad almeno due livelli diversi di competenza (laboratori di I o di II livello).

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano sentitamente il Dott. Alessandro Terreni (AOU Careggi, Firenze) per aver messo a disposizione i dati delle VEQ italiana, e la Dott.ssa Barbara De la Salle (UK NE-QAS Haematology, Watford, UK) per i dati dell'UK NEQAS, nonché il Prof. Carlo Gelmetti (Università degli Studi di Milano) per gli spunti di riflessione in ambito dermatologico, e la Dott.ssa Marina Paleari (Medico di base a riposo, ATS della Brianza) per aver supervisionato la parte relativa ai farmaci.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Luzzatto L, Mehta A. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In Scriver C.R, Beaudet A L, Sly W S, Valle D eds. *The Metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995:3367-98.
2. Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, et al. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956;124:484-5.
3. Takahara S, Miyamoto H. Three cases of progressive oral gangrene due to lack of catalase in the blood. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1948;51:163.
4. Isselbacher KJ, Anderson EP, Kurahashi E, et al. Congenital galactosemia, a single enzymatic block in galactose metabolism. *Science* 1956;123:635-6.
5. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood* 2008;111:16-24.
6. Capoluongo E, Giardina B, Minucci A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd Edition, Volume 3, ed.

- Elselvier 2013; doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00569-6.
7. Luzzatto L, Arese P. Favism and glucose-6-phosphatedehydrogenase deficiency. *N Engl J Med* 2018;378:60-71.
 8. Roper D, Layton M, Rees D, et al. on behalf of the British Society for Haematology. Laboratory diagnosis of G6PD deficiency. A British Society for Haematology Guideline. 2020; doi: 10.1111/bjh.16366.
 9. Belsey MA. The epidemiology of favism. *Bull World Health Organ* 1973;48: 1-13.
 10. Cordes W. Experiences with plasmochin in malaria. In: Anonymous. 15th Annual Report. Boston, MA: United Fruit Co; 1926:66-71.
 11. Sterling K, Gray SJ. Determination of the circulating red cell volume in man by radioactive chromium. *J Clin Invest* 1950;29:1614-9.
 12. Persico MG, Viglietto G, Martino G, et al. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucl Acids Res* 1986;14:2511-22.
 13. Yoshida A. A single amino acid substitution (asparagine to aspartic acid) between normal (B+) and the common negro variant (A+) of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;57:835-40.
 14. Aster JC. Red blood cell and Bleeding disorders, In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, eds. *Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2007: 627-8.
 15. Gautham K. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. History and diagnosis. *J Pathol Nepal* 2016;6:1034-9.
 16. Roos D, van Zwieten R, Wijnen JT et al. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase Volendam, leading to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 1999;94:2955-62.
 17. Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: Review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2012;48:154-65.
 18. Beutler E, Vulliamy T. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28:93-103.
 19. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994;84:3613-36.
 20. www.site-italia.org (ultimo accesso: aprile 2020).
 21. <https://b-s-h.org.uk> (ultimo accesso: aprile 2020).
 22. Kandil HH, al-Ghanem MM, Sarwat MA, et al. Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) inducing haemolysis among G6PD-deficient newborns. A new clinical observation. *Ann Trop Paediatr* 1996;16:287-91.
 23. Kök AN, Ertekin MV, Ertekin V, et al. Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) induced haemolytic anaemia in siblings. *Int J Clin Pract* 2004;58:530-2.
 24. Raupp P, Hassan JA, Varughese M, et al. Henna causes life threatening haemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 2001;85:411-2.
 25. Şik G, Çitak A. Fatal parafenilenediamine poisoning due to black henna. *Turk J Pediatr*. 2016;58:301-4.
 26. Shalev O, Eliakim R, Lugassy GZ et al. Hypoglycemia induced hemolysis in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Haematol* 1985;74:227-9.
 27. Vanelli M, Lucentini L, Picco R et al. Blood glucose normalization-induced haemolysis in three adolescents with type 1 diabetes mellitus at onset and unknown G6PD deficiency. *J Ped End Metabol* 1996;9:193-6.
 28. Rashidi H, Shafiei M, Hamidian R. Erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in diabetic patients. *Pak J Med Sci* 2009;25:665-8.
 29. Cappai G, Songini M, Doria A, et al. Increased prevalence of proliferative retinopathy in patients with type 1 diabetes who are deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Diabetologia* 2011;54:1539-42.
 30. Pinna A, Contini EL, Carru C, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and diabetes mellitus with severe retinal complications in a Sardinian Population, Italy. *Int J Med Sci* 2013;10:1907-13.
 31. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
 32. Lai YK, Lai NM, Lee SWH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol* 2017;96:839-45.
 33. Dore MP, Davoli A, Longo N, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of colorectal cancer in Northern Sardinia. A retrospective observational study. *Medicine* 2016; 95:44(e5254).
 34. De Preter G, Neveu MA, Danhier P, et al. Inhibition of the pentose phosphate pathway by dichloroacetate unravels a missing link between aerobic glycolysis and cancer cell proliferation. *Oncotarget* 2016;7:2910-20.
 35. Mele L, la Noce M, Paino F, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase blockade potentiates tyrosine kinase inhibitor effect on breast cancer cells through autophagy perturbation. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38:160-73.
 36. Munemoto M, Mukaisho K, Miyashita T, et al. Roles of the hexosamine biosynthetic pathway and pentose phosphate pathway in bile acid-induced cancer development. *Cancer Sci* 2019;110:2408-20.
 37. Kaplan M, Hammerman C. Severe neonatal hyperbilirubinemia: a potential complication of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Clin Perinatol* 1998;25:575-90.
 38. Galiano S, Gaetani GF, Barabino A et al. Favism in the African type of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency (A-). *BMJ* 1990;300(6719):236.
 39. Brown AK, Cevik N. Hemolysis and jaundice in the newborn following maternal treatment with sulfamethoxypyridazine (Kynex). *Pediatrics* 1965;36:742-4.
 40. Brown WR, Boon WH. Hyperbilirubinemia and kernicterus in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient infants in Singapore. *Pediatrics* 1968;41:1055-62.
 41. Meloni T, Costa S, Cuttillo S. Haptoglobin, hemopexin, hemoglobin and hematocrit in new-borns with erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Haematol* 1975;54:284-8.
 42. Luzzatto L, Metha A, Vulliamy T et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In Scriver CR ed. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. USA: Mc Graw-Hill Companies Inc., 2001:4517-53.
 43. Motulsky AG. Metabolic polymorphisms and the role of infectious diseases in human evolution. *Hum Biol* 1960;32:28-62.
 44. Allison AC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in red blood cells of East Africans. *Nature* 1960;186:531-2.
 45. Luzzatto L, Usanga FA, Reddy S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* 1969;164:839-42.
 46. Luzzatto L. G6PD deficiency: a polymorphism balanced by heterozygote advantage against malaria. *Lancet Haematol* 2015;2: e400-e401.
 47. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, et al. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood*

- Cells Mol Dis 2009;42:267-78.
48. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, et al. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol* 2015;39:171-87.
 49. Ohlsson A, Rehnholm K, Shubham K, et al. Incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among Swedish newborn infants. *Int J Neonatal Screen* 2019;5:38; doi:10.3390/ijns5040038.
 50. Rees DC, Lambert C, Cooper E, et al. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Blood* 2009; 114:742-3; author reply 743-4.
 51. Anderle A, Bancone G, Domingo GJ, et al. Point-of-Care Testing for G6PD deficiency: opportunities for screening. *Int J Neonatal Screen* 2018;4:34. doi:10.3390/ijns4040034.
 52. Beutler E, Mitchell M. Special modifications of the fluorescent screening method for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. *Blood* 1968;32:816-8.
 53. Motulsky AG, Kraut JM, Thieme WT, et al. Biochemical genetics of glucose-6-phosphate deficiency. *J Clin Res* 1959;7:89-90.
 54. Roca-Feltrer A, Khim N, Kim S, et al. Field trial evaluation of the performances of point-of-care tests for screening G6PD deficiency in Cambodia. *PLoS one* 2014; 9(12):e116143. doi: 10.1371/journal.pone.0116143.
 55. Fairbanks VF, Lampe LT. A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes: applications in the study of heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 1968;31:589-603.
 56. Van Noorden CJ, Vogels IM. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. II. Further improvements of the staining procedure and some observations with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol* 1985;60:57-63.
 57. Shah SS, Diakite SA, Traore K, et al. A novel cytofluorometric assay for the detection and quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Sci Rep* 2012, 2, 299; doi: 10.1038/srep00299.
 58. Beutler E, Blume KG, Kaplang JC, et al. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 1977;35:331-40.
 59. Mosca A, Paderi M, Sanna A, et al. Preliminary experience with the differential pH technique for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) measurement in whole blood: application to an area with high prevalence of thalassaemia and G6PD deficiency. *Haematologica* 1990;75:397-9.
 60. Tagarelli A, Piro A, Tagarelli A, et al. G6PD/PK ratio: a reliable parameter to identify glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency associated with microcytic anemia in heterozygous subjects. *Clin Biochem* 2004;37:863-6.
 61. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*. II edition. Philadelphia: WB Saunders, 1990.
 62. Oski FA. Red cell metabolism in the newborn infant. V. Glycolytic intermediates and glycolytic enzymes. *J Pediatr* 1969;44:84-91.
 63. Minucci A, Gentile L, Zuppi C, et al. Rapid and simple identification of the commonest glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Italian mutations: from DNA extraction to genotyping. *Clin Chim Acta*. 2012;413:1018-9.
 64. Capoluongo E, Amato F, Castaldo G. The friendly use of Chloroquine in the COVID-19 disease: a warning for the G6PD-deficient males and for unaware carriers of pathogenic alterations of G6PD-gene. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0442.

Effetti della restrizione calorica sullo stress ossidativo nell'obesità: sono miglioramenti transitori?

Andrea Bolner¹, Angiola Vanzo², Davide Giavarina³, Giampietro Nordera¹, Ottavio Bosello⁴

¹Centro Stress Ossidativo (CSOx), Vicenza

²Servizio di Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN), ULSS8 Berica, Vicenza

³Laboratorio Analisi Ospedale S. Bortolo, ULSS8 Berica, Vicenza

⁴Dipartimento di Medicina, Università di Verona

ABSTRACT

Effect of caloric restriction on oxidative stress in obesity: are these transient improvements?

Background: the effects of caloric restriction (CR) on oxidative stress in obesity has been previously studied using markers that not always were able to describe all the components of the oxidative-inflammatory picture.

Methods: in this study, the redox state of 20 obese was evaluated at baseline and after 30 and 60 days of CR using a complete panel of markers: the majority of them were determined using HPLC methods.

Results: before CR (V0), serum peroxides (dROMs) were very high, total antioxidant barrier (BAP) was at the lower limit of the reference interval and C-reactive protein (hsCRP) was increased; on the opposite, glutathione was well within the reference intervals in both total and reduced form. Despite the imbalance of the dROMs/BAP equilibrium, the markers of oxidative damage, such 3-nitrotyrosine (3NT) and 8-hydroxy-deoxyguanosine (8OHdG), index of a mild oxidative-inflammatory imbalance, were not particularly relevant.

After 30 days of CR (V30), in addition to the slight improvements of glucose, fructosamine and HOMA-IR, hsCRP was decreased, while BAP and total glutathione were increased, with consequent improvement of the oxidative stress-inflammatory balance (oxidative-inflammation). After 60 days of CR (V60) the improvements observed at V30 appeared to be slowing down for glucose and fructosamine, in slight inverse tendency for HOMA-IR and hsCRP, and decreasing for BAP and glutathione. The slight increase of inter-quartile range (IQR) of 3NT showed a lower counter-regulatory antioxidant response capacity, as if the ameliorative effects of CR in the first period had turned off.

Conclusion: the improvements of the oxidative-inflammatory equilibrium appear to be transient in the course of CR. The rearrangements of the gut microbiota during CR and the consequent epigenetic modulations could be responsible for this peculiar trend.

INTRODUZIONE

Numerosi studi hanno dimostrato che l'obesità è associata ad alterazioni dello stato infiammatorio e dell'equilibrio ossido-riduttivo, ovvero del bilanciamento fisiologico tra specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) e componenti della barriera antiossidante (1-7). Ipernutrizione ed elevato contenuto di carboidrati e grassi nella dieta, specialmente se saturi ed isomeri insaturi di tipo trans, possono infatti attivare vie metaboliche in grado di alterare l'omeostasi ed indurre stress ossidativo (8-10).

Lo squilibrio ossidativo sistemico e l'infiammazione subclinica, oltre che dell'obesità, sono condizioni tipiche anche delle malattie ad essa collegate, quali aterosclerosi, insulino-resistenza, diabete di tipo 2 e tumori, per le quali sono state indicate come cofattori patogenetici (11).

Secondo alcuni autori, la restrizione calorica (RC) e l'attività fisica, spesso utilizzate nell'obesità per ottenere calo ponderale e migliorare il quadro clinico, sarebbero efficaci proprio a motivo della loro capacità di contrastare l'alterazione dell'omeostasi ossidativa-infiammatoria (12-13). Pochi sono gli studi condotti in precedenza che

Corrispondenza a: Andrea Bolner, Centro Stress Ossidativo (CSOx) Vicenza, E-mail bolner.andrea@gmail.com

Ricevuto: 31.10.2019

Revisionato: 16.12.2019

Accettato: 09.01.2020

Publicato on-line: 6.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.016

hanno potuto caratterizzare adeguatamente gli elementi del quadro ossidativo-infiammatorio, ovvero le specie radicaliche, la barriera antiossidante endogena ed esogena ed i marcatori di infiammazione e di danno ossidativo (14).

Scopo di questo studio, pertanto, è stato quello di misurare con metodi ad elevata affidabilità analitica i marcatori dell'equilibrio ossidativo-infiammatorio in un gruppo di soggetti obesi sottoposti a RC e di valutare in quale misura la limitazione nutrizionale e l'attività fisica li avrebbero modificati nel corso di due mesi di osservazione. I soggetti in studio sono stati visitati prima dell'inizio del trattamento di RC e, successivamente, dopo 30 e 60 giorni. Ad ogni visita, oltre alle misure antropometriche ed agli indici plasmatici glicemici, lipidici ed infiammatori, sono stati misurati i perossidi totali (dROMs) e il potenziale biologico antiossidante (BAP). Inoltre, mediante HPLC, sono state eseguite le misure di glutazione totale e ridotto e dei marcatori specifici di danno ossidativo 3-nitrotirosina (3NT) e 8-idrossideossiguanosina (8OHdG). Soprattutto queste ultime misure sono state considerate cruciali per la valutazione degli effetti della RC in quanto la variazione del rapporto tra glutazione ridotto (GSH) e totale (GSH+GSSG) e la presenza dei marcatori di danno ossidativo 3NT e 8OHdG si sono già dimostrate in precedenza utili per descrivere l'alterazione dell'omeostasi, la sua tendenza al ripristino o all'eventuale aggravamento (15-16).

METODI

Pazienti

Sono stati arruolati 20 soggetti obesi (7 maschi e 13 femmine, di età compresa tra 26 e 65 anni) afferenti agli ambulatori nutrizionali del Servizio di Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN) di Vicenza. Il peso medio iniziale era di 97,1 (12,6) kg, la circonferenza vita di 110,0 (11,5) cm ed il body mass index (BMI) di 34,1 (7,3) kg/m². I criteri di arruolamento, oltre alla diagnosi di obesità, ammettevano alcune comorbidità tipiche: sindrome metabolica (n=5), patologie osteoarticolari (n=4) e cardiovascolari (n=5); erano invece escluse le patologie neoplastiche e neuropsichiatriche, i trattamenti antibiotici, l'assunzione di integratori alimentari e probiotici entro il mese precedente l'inizio dello studio, il consumo di bevande con contenuto di alcool superiore a 20 g/die e l'abuso di lassativi (oltre 2 volte/settimana). Alcuni dei soggetti in studio assumevano farmaci diuretici (n=1), antipertensivi (n=6), ipo-colesterolemizzanti (n=1), e tiroidei (n=2).

Dopo l'anamnesi e le valutazioni clinica ed antropometrica, alla visita basale (V0) è stata prescritta ai pazienti una dieta bilanciata definita secondo le linee guida 2003 dell'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN) (17): rispetto all'apporto energetico totale, la dieta era composta dal 55% di carboidrati, di cui non più del 10% zuccheri semplici, 15% di proteine e 30% di lipidi; le fibre assunte sono state pari a circa 30 g/die. Per ottenere in

60 giorni l'obiettivo di un calo ponderale pari al 5% rispetto al peso iniziale, la RC è stata fissata inferiore di 500 kcal rispetto al fabbisogno calorico individuale.

Durante il trattamento, ai pazienti è stata prescritta un'attività fisica moderata consistente in almeno 30 minuti di cammino/die per 5 giorni in settimana, secondo le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (18). Nel corso dello studio, approvato dal Comitato Etico per le Sperimentazioni Cliniche (CESC) di Vicenza, il personale del SIAN ha periodicamente verificato la compliance alla dieta e all'esercizio fisico, durante le visite mensili e mediante contatti telefonici settimanali.

Esami di laboratorio

Le raccolte dei campioni biologici (sangue ed urine) sono state eseguite il giorno precedente l'inizio del programma di RC (V0) e successivamente ripetute dopo 30 (V30) e 60 giorni (V60). I campioni di sangue sono stati raccolti in provette sottovuoto con EDTA, citrato di sodio o senza anticoagulante, secondo quanto richiesto dai singoli metodi analitici. Dopo il campionamento, le provette sono state immediatamente centrifugate a 3 500 rpm per 10 minuti a 4°C ed i campioni di plasma e siero sono stati congelati a -80°C fino all'analisi: con essi sono state stoccate anche aliquote delle seconde urine del mattino.

Le misure di glucosio, trigliceridi, colesterolo totale, HDL, LDL, fruttosamina, insulina, proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hsCRP) e creatinina urinaria sono state eseguite il giorno stesso della raccolta dei campioni con gli analizzatori AU 5 800 e DxI 800 (Beckman Coulter, Milano) e i reagenti ad essi dedicati, secondo le indicazioni del produttore. L'insulino-resistenza è stata calcolata mediante l'algoritmo Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance (HOMA-IR).

Gli esami del quadro ossidativo-infiammatorio sono stati condotti a fine studio su campioni conservati congelati a -80°C. Sono riportati in Tabella 1 gli esami eseguiti, il loro significato, i metodi di analisi utilizzati, il loro grado di imprecisione ed i relativi intervalli di riferimento (40).

Il GSH+GSSG e il GSH e la 3NT sono stati analizzati mediante HPLC utilizzando kit specifici (Eureka Lab Division, Chiaravalle, AN), mentre la 8OHdG è stata misurata con un metodo HPLC e rilevazione elettrochimica come precedentemente descritto (19).

Il sistema cromatografico, controllato da software Unipoint, era composto da due pompe Gilson (modello 306 e 307) e campionatore automatico (modello 234). Le colonne e le fasi mobili utilizzate erano quelle fornite nei kit, senza modifiche. Le misure del glutazione sono state effettuate con fluorimetro Jasco FL-1520, quelle di 3NT con spettrofotometro Jasco UV-875 e quelle di 8OHdG con rivelatore elettrochimico ESA Coulochem II e cella ad alta sensibilità 5 011.

La capacità ossidante del siero, intesa come contenuto totale di perossidi (dROMs), ed il potenziale

Tabella 1

Biomarcatori del quadro ossidativo-infiammatorio e loro significato: sono riportati i metodi di analisi utilizzati, le unità di misura e i rispettivi intervalli di riferimento (40).

Analita	Biomarcatore	Metodo	Precisione inter-saggio (CV%)	Unità di misura	Valori di riferimento
S-Perossidi totali circolanti (dROMs)	potenziale ossidante	colorimetrico	4,8	U carr	<300
S-Potenziale biologico antiossidante (BAP)	barriera antiossidante	colorimetrico	5,1	umol/L	>2200
Sg-Glutatione totale (GSH+GSSG)	barriera antiossidante	HPLC	2,3	umol/L	631-1251
Sg-Glutatione ridotto (GSH)	barriera antiossidante	HPLC	2,3	umol/L	523-1175
Rapporto Glutatione ridotto/totale	barriera antiossidante	calcolo	-	%	80-100
P-3-nitrotirosina (3NT)	ossidazione proteine	HPLC	3,1	ug/L	5-60
U-8-idrossi-deossiguanosina (8-OHdG)	ossidazione nucleobasi	HPLC	2,8	ug/g creat	12-82
S-Proteina C reattiva alta sensibilità (hsCRP)	infiammazione	nefelometria	6,2	mg/L	<1

biologico antiossidante, inteso come contenuto totale di specie antiossidanti (BAP), sono stati determinati con saggi colorimetrici specifici (Diacron, Grosseto), miniaturizzati per spettrofotometro Biohit ELX-800.

L'efficacia del trattamento di RC sul quadro ossidativo dei soggetti in studio è stata valutata in base agli andamenti ed alla significatività statistica delle variazioni dei marcatori di stress ossidativo rispetto al loro valore basale: sono stati considerati come "effetti positivi" gli incrementi di BAP e di glutatione totale, ridotto e rapporto ridotto/totale, e le diminuzioni di dROMs, 3NT e 8OHdG.

Analisi statistica

Per ciascun parametro sono stati calcolati media, deviazione standard, mediana e intervallo interquartile (IQR): a causa dell'evidente asimmetria nella distribuzione della maggior parte dei parametri, tutta la statistica descrittiva è stata riportata nel testo, per omogeneità, come mediana e IQR. Trattandosi di uno studio privo di gruppo di controllo, ciascun soggetto è stato considerato come controllo di sé stesso. I dati ottenuti sono stati valutati sia considerando l'andamento longitudinale degli scostamenti percentuali delle mediane ottenute alle visite V30 e V60 rispetto alla V0, sia mediante il confronto dei dati ottenuti per ciascun soggetto alle tre visite con test non parametrico di Friedman per misure ripetute; il limite di significatività è stato fissato al 5%.

RISULTATI

In condizioni basali, le mediane di tutti i biomarcatori del quadro ossidativo-infiammatorio rientravano negli intervalli di riferimento ad eccezione di hsCRP e dROMs (Tabelle 1 e 2); la mediana di questi ultimi era molto elevata mentre quella della barriera antiossidante BAP era al limite inferiore dell'intervallo. Entrambi i biomarcatori di danno ossidativo 3NT e 8OHdG erano invece nella norma. Dopo 60 giorni di RC, il calo ponderale dei soggetti in studio, pari al 2,3% rispetto al valore basale, è risultato statisticamente significativo e, con esso, anche le diminuzioni della circonferenza vita e del BMI. Nessun parametro biochimico invece, ad eccezione del solo colesterolo HDL, è variato in modo significativo nel corso delle tre visite.

Alla visita V30, le mediane di glucosio, fruttosamina, trigliceridi, hsCRP, GSH ed indice HOMA-IR erano univocamente in diminuzione rispetto a V0 (-4%, -3%, -17%, -27%, -7% e -10% rispettivamente), mentre BAP, dROMs e GSH+GSSG erano in aumento (+10%, +5% e +4%).

Alla successiva visita V60, gli andamenti tendenziali osservati nel primo mese apparivano in rallentamento rispetto a V30 per la fruttosamina (-0,3%) ed in tendenza inversa per glucosio (+2%), HOMA-IR (+7%) e hsCRP (+16%). Solo la mediana dei trigliceridi tendeva a un'ulteriore diminuzione (-6%). Anche BAP e GSH+GSSG erano in calo rispetto alla precedente visita (-5% e -7%) mentre le mediane dei marcatori di danno ossidativo 8OHdG e 3NT non mostravano tendenze tra

Tabella 2

Statistica descrittiva dei dati misurati prima dell'inizio (V0), dopo 30 (V30) e 60 giorni (V60) di Restrizione Calorica (RC); per ciascun parametro sono riportati i valori p ottenuti dal confronto dei dati ottenuti nelle tre visite, eseguito mediante test di Friedman per misure ripetute: sono evidenziate (*) le variazioni risultate significative.

	pre RC (V0)		dopo 30 giorni di RC (V30)		dopo 60 giorni di RC (V60)		p
	mediana	IQR	mediana	IQR	mediana	IQR	
Peso (kg)	97,1	12,6	94,7	14,8	94,9	18,6	0,044*
Circonferenza vita (cm)	110,0	11,5	108,0	12,0	103,3	11,9	0,021*
BMI (kg/m ²)	34,1	7,3	32,1	8,5	31,6	5,7	0,037*
Glucosio (mg/dL)	89,5	18,5	86,0	15,5	87,5	20,3	0,146
Fruttosamina (umol/L)	172,0	27,0	166,5	13,8	166,0	22,8	0,087
Insulina (mUI/L)	6,6	5,7	6,5	7,1	7,1	8,5	0,146
Colesterolo totale (mg/dL)	217,0	58,3	208,0	51,5	225,5	61,0	0,765
Trigliceridi (mg/dL)	114,5	84,3	95,0	58,0	89,5	76,8	0,211
Colesterolo HDL (mg/dL)	47,5	11,3	44,5	21,3	48,5	19,5	0,033*
Colesterolo LDL (mg/dL)	136,5	44,0	135,0	39,3	139,0	38,8	0,594
hsCRP (mg/L)	2,6	2,2	1,9	2,4	2,2	2,0	0,115
HOMA-IR	1,54	1,43	1,39	1,49	1,48	1,70	0,146
GSH+GSSG (umol/L)	842,5	117,8	872,4	197,0	812,2	243,2	0,411
GSH (umol/L)	816,5	152,7	757,3	223,5	767,2	127,8	0,486
GSH/GSH+GSSG (%)	95,5	9,0	90,1	22,7	94,6	13,7	0,801
BAP (umol/L)	2202,9	529,0	2421,8	487,2	2303,7	455,9	0,513
dROMs (U carr)	441,8	63,3	465,2	85,1	449,5	67,4	0,411
3NT (ug/L)	29,7	45,7	35,8	51,1	31,2	89,0	0,128
8OHdG (ug/g creat)	5,2	62,8	5,1	53,7	5,3	61,1	0,986

BMI, indice di massa corporea; hsCRP, proteina C reattiva ad alta sensibilità; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance; GSH+GSSG, glutazione totale; GSH, glutazione ridotto; BAP, potenziale biologico antiossidante; dROMs, perossidi totali; 3NT, 3-nitrotirosina; 8OHdG, 8-idrossi-deossiguanosina; IQR, intervallo interquartile.

V0 e V60; l'IQR di 3NT, invece, è progressivamente aumentato a causa dell'elevazione delle concentrazioni di questo biomarcatore oltre il limite superiore dell'intervallo di riferimento in 6 soggetti, sia alla V30 che alla V60.

DISCUSSIONE

E' noto che lo stress ossidativo può essere una conseguenza ma anche un fattore in grado di indurre l'obesità (20). Infatti, l'aumentata produzione di ROS ed RNS può stimolare la deposizione di tessuto adiposo bianco (21) ed alterare l'assunzione di cibo (22); a sua volta, lo stesso accumulo di grasso può aumentare i

ROS ed alterare l'equilibrio ossidativo sistemico (23).

Altri fattori possono contribuire alla modificazione dell'omeostasi redox dell'obeso, quali l'alterata produzione post-prandiale di ROS (24), l'iperleptinemia (25), l'infiammazione cronica (26), la disfunzione tissutale (27) e la diminuzione della barriera antiossidante (28).

Era già stato osservato che il calo ponderale diminuiva i marcatori di ossidazione, aumentava le difese antiossidanti e migliorava i rischi metabolici e cardiovascolari associati all'obesità (29). Abbastanza frequentemente però, le osservazioni erano basate su misurazioni di pochi marcatori effettuate con metodi analitici non sempre affidabili (41). Alcuni studi hanno

dimostrato che la carbonilazione delle proteine, la perossidazione dei lipidi ed i marcatori d'infiammazione si riducevano dopo un periodo di RC (30-31) e che la combinazione di una dieta ipoenergetica con un'attività fisica regolare era in grado di potenziare gli effetti positivi sul bilancio ossidoriduttivo (32). Il nostro studio, pur ripercorrendo il disegno di altri precedenti, ha voluto caratterizzare il quadro redox in corso di RC con l'ausilio di un pannello di marcatori più completo che comprendesse sia elementi del comparto ossidante, che di quello riducente, sia marcatori dello stato infiammatorio che di danno ossidativo. Questi ultimi, in particolare, essendo ormai certo il ruolo fisiologico svolto da ROS e RNS nell'ambito della rete informativa intra-ed inter-cellulare (33-34), se misurati con metodi analitici ad elevata affidabilità, possono fornire indicazioni molto utili sulla reale condizione dell'equilibrio redox. Infatti, concentrazioni di radicali liberi oltre i limiti di normalità o una barriera antiossidante poco rappresentata possono non bastare ad evidenziare la presenza e l'entità dello sbilanciamento omeostatico; la comparsa dei marcatori di danno, invece, la può rendere manifesta.

A conferma di quanto riportato da altri autori, il nostro studio ha dimostrato che in condizioni basali (V0), i perossidi totali dROMs, che esprimono indirettamente i livelli sierici di ROS, erano molto elevati. Al contempo, la barriera totale BAP, che esprime la totalità delle difese antiossidanti endogene ed esogene, era al limite inferiore dell'intervallo di riferimento, insufficiente per contrastare in modo efficace livelli di ROS ed RNS tanto elevati. Poiché il glutatione, che è il principale costituente delle difese antiossidanti endogene, era discretamente rappresentato in quasi tutti i soggetti in studio, sia nella forma totale che in quella ridotta, si è ipotizzato che il maggior deficit della barriera dipendesse principalmente dalla sua componente esogena, di prevalente origine alimentare. Nonostante l'evidente sbilanciamento basale dell'equilibrio dROMs/BAP, alla V0 non erano comunque misurabili danni ossidativi. La 3NT infatti, marcatore di nitrificazione irreversibile dei residui aminoacidici delle catene proteiche, per quanto superiore alla mediana della popolazione di riferimento (35), non eccedeva il limite superiore dell'intervallo (40). Analogamente, la 8OHdG, marcatore di danno ossidativo delle nucleobasi puriniche, non evidenziava alterazioni a carico degli acidi nucleici. A motivo della presenza di bassi livelli dei marcatori di danno, è stato così possibile evidenziare che, nonostante gli aumentati livelli di dROMs e hsCRP nella popolazione in studio, il grado di compromissione dell'equilibrio ossido-riduttivo a livello basale era di grado lieve.

Pur in assenza di significatività statistica, motivata probabilmente dalla bassa numerosità del campione, dopo 30 giorni di RC comparivano segni di miglioramento del metabolismo del glucosio, con univoche diminuzioni della fruttosamina, dell'HOMA-IR e del livello di infiammazione sub-clinica, come evidenziato dal netto calo percentuale della mediana di hsCRP. Non erano evidenti, invece, particolari effetti sui parametri del metabolismo lipidico, fatto salvo per la

diminuzione del valore della mediana dei trigliceridi. La barriera antiossidante endogena è risultata in miglioramento, con aumenti sia di BAP che di GSH+GSSG. Poiché la barriera totale BAP ha mostrato miglioramenti percentualmente superiori rispetto a quelli del glutatione, è probabile che l'aumento sia stato sostenuto soprattutto dalla composizione della dieta che ha garantito un maggior introito antiossidante rispetto all'alimentazione abituale dei soggetti in studio. Gli effetti sui dROMs, invece, non sono apparsi evidenti, forse a motivo della brevità del periodo di osservazione e del loro considerevole livello iniziale. L'attivazione del meccanismo contro-regolatorio di contrasto dei radicali liberi era tuttavia evidenziata dalla diminuzione dei livelli di GSH conseguenti ad un suo probabile maggiore consumo.

Alla V60, dopo altri 30 giorni di RC, non si è osservato ulteriore calo ponderale nonostante la discreta compliance riscontrata. La variazione ponderale complessiva a fine studio è risultata comunque statisticamente significativa, per quanto inferiore rispetto all'obiettivo inizialmente prefissato. Tra V30 e V60, la maggior parte dei parametri del quadro glucidico, lipidico ed infiammatorio ha evidenziato andamenti di segno opposto, peggiorativo, rispetto al primo mese. Tra i biomarcatori del quadro ossidativo-infiammatorio, anche GSH+GSSG e BAP, hanno mostrato un'inversione di tendenza rispetto a V30, con decrementi cui corrispondevano solo lievi diminuzioni dei dROMs. La diminuzione della barriera antiossidante, tanto endogena quanto esogena, poteva essere spiegata, anche in questo caso, con un maggiore consumo delle molecole capaci di neutralizzare le specie radicaliche. Tuttavia, considerato costante l'apporto alimentare antiossidante a motivo del regime dietetico seguito dai soggetti in studio, si poteva ipotizzare che alla V60 si fosse prevalentemente verificata una diminuzione della componente endogena della barriera antiossidante, rappresentata nel nostro studio dal glutatione. Gli incrementi del marcatore di danno nitrosativo 3NT in alcuni pazienti, evidenziati dall'aumento dell'IQR, tendevano proprio a confermare una diminuita capacità di risposta contro-regolatoria nonostante la permanenza del regime di RC, quasi che gli effetti migliorativi del quadro ossidativo-infiammatorio osservati nel primo periodo si fossero spenti. È interessante a tal proposito ricordare i risultati di uno studio condotto da Ott et al. su un gruppo di donne obese sottoposte per un mese ad un regime di RC fortemente ipocalorica (800 kcal/die) e ad un successivo periodo di 2 settimane di dieta per il mantenimento del peso (36). Analogamente a quanto osservato nel nostro studio, dopo un'iniziale diminuzione dell'indice HOMA-IR e della hsCRP, nel corso delle settimane di mantenimento del peso, questi parametri sono tornati ad elevarsi, pur senza significatività statistica. Diversamente dai nostri dati, invece, nello studio di Ott erano significativi tanto i decrementi di colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi nel periodo di RC quanto i loro successivi incrementi nel periodo di mantenimento. Poiché il microbiota dei soggetti in studio

non era significativamente cambiato durante la RC, Ott concludeva che la transitorietà degli effetti della dieta poteva essere attribuita al temporaneo miglioramento della permeabilità intestinale, come confermato dalle misure di zonulina prima e dopo ciascuno dei due programmi nutrizionali.

In un analogo studio precedente che comprendeva anche un gruppo di controllo e prevedeva periodi di trattamento maggiori, Heinsen et al. avevano misurato in un gruppo di obesi le variazioni del microbiota intestinale conseguenti alla RC (37). A differenza di Ott, Heinsen aveva dimostrato che la RC determinava significative variazioni nel microbiota, con miglioramenti dell'alterato rapporto Firmicutes/Bacteroidetes che però regredivano durante il periodo di mantenimento del peso con tendenza a ritornare al quadro microbico precedente alla RC.

E' interessante osservare che, pur nella diversità del disegno sperimentale e dei parametri misurati, anche nel nostro studio la RC si è dimostrata inizialmente efficace nell'introdurre elementi di miglioramento del quadro fisiopatologico dell'obesità, come del resto atteso sulle basi teoriche in precedenza ricordate. I parametri del metabolismo glucidico miglioravano e, con essi, anche alcuni marcatori dell'omeostasi ossidativa-infiammatoria: diminuiva infatti l'infiammazione e si potenziava la barriera antiossidante, tanto endogena quanto esogena. Tali effetti però, dopo il primo periodo, tendevano a regredire. Nei precedenti studi sopra citati, il fenomeno si era evidenziato dopo la sostituzione del programma di RC con quello di mantenimento del peso ed era correlato a regressioni della permeabilità intestinale (36) ed a rimodellamenti del microbiota intestinale (37). Nel nostro studio invece, la transitorietà degli effetti di miglioramento sui marcatori dell'equilibrio ossidativo-infiammatorio è apparsa evidente anche in assenza di variazioni del regime dietetico, particolarmente con diminuzioni della barriera antiossidante endogena.

Ipotizzando che i soggetti studiati abbiano osservato la RC tanto nella prima (V0-V30) quanto nella seconda fase dello studio (V30-V60), è al momento difficile spiegare la transitorietà degli effetti migliorativi del quadro ossidativo-infiammatorio. Considerati però i dati di Ott ed Heinsen, è suggestivo ipotizzare il coinvolgimento in questo fenomeno del microbiota intestinale. D'altra parte, l'esistenza di stretti legami tra alimentazione, microbiota ed epigenetica sono stati ripetutamente dimostrati. E' ben noto, infatti, che i geni influenzano la composizione del microbiota intestinale, che i geni microbici influenzano l'espressione dei geni umani, che il metabolismo di alcuni microbi intestinali influenza il metabolismo di altri microbi intestinali e che la dieta condiziona sia il microbiota che l'espressione dei geni umani (38-39). Pertanto, le diminuite produzioni di glutazione potrebbero conseguire a riarrangiamenti del microbiota ed a possibili conseguenti modulazioni epigenetiche dell'espressione degli enzimi di sintesi.

Se così fosse, poiché il peggioramento del quadro ossidativo-infiammatorio è intervenuto in corso di RC, si

potrebbe addirittura ipotizzare che il riarrangiamento del microbiota e la tendenza al ritorno allo stato originario non dipendano tanto dal mantenimento o meno della RC quanto, più semplicemente, dal tempo. Poiché questa è soltanto un'ipotesi, ulteriori approfondimenti si rendono oltremodo necessari.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Vanzo A, Bolner A, Nordera G, et al. Obesità, microbiota e stress ossidativo. *Biochimica Clinica* 2017;41:199-207.
2. Warolin J, Coenen KR, Kantor JL, et al. The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy black and white American youth. *Pediatr Obes* 2014;9:43-52.
3. Tran B, Oliver S, Rosa J, et al. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. *Exp Diabetes Res* 2012; doi:10.1155/2012/683680.
4. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, et al. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem* 2008;41:943-49.
5. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, et al. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:237-43.
6. Hermsdorff HH, Barbosa KB, Volp AC, et al. Gender-specific relationships between plasma oxidized low-density lipoprotein cholesterol, total antioxidant capacity, and central adiposity indicators. *Eur J Prev Cardiol* 2012;doi:10.1177/2047487312472420.
7. Karouzene N, Merzouk H, Aribi M, et al. Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: a comparison of older with young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:792-99.
8. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:969-72.
9. Dandona P, Ghanim H, Chaudhuri A, et al. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. *Exp Mol Med* 2010;42:245-53.
10. Serra D, Mera P, Malandrino MI, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 2012;doi:10.1089/ars.2012.4875.
11. Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, et al. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res* 2013;47:243-56.
12. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012;70:257-65.
13. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab* 2010;12:662-7.
14. Himbert C, Thompson H, Ulrich CM. Effects of intentional weight loss on markers of oxidative stress, DNA repair and telomere length: a systematic review. *Obes Facts* 2017;10:648-65.
15. Kato Y, Dozaki N, Nakamura T et al. Quantification of modified tyrosines in healthy and diabetic human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.

- J Clin Biochem Nutr 2008;44:66-78.
16. Sies H. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol* 2018;7:122-26.
 17. Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN). Linee guida per una sana alimentazione italiana (INRAN) rev. 2003. http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=652,01/2020. (ultimo accesso: novembre 2019).
 18. World Health Organization. Global recommendations on physical activity for health. WHO, Geneva, 2010. <https://www.who.int/dietphysicalactivity/global-PA-recs-2010.pdf,01/2020>. (ultimo accesso: novembre 2019).
 19. Bolner A, Pilleri M, De Riva V, et al. Plasmatic and urinary HPLC-ED determination of the ratio 8-OHdG/2-dG in Parkinson's disease. *Clinical Lab* 2011;57:859-66.
 20. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
 21. Lee H, Lee YJ, Choi H, et al. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 2009;284:10601-9.
 22. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: Roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:78-87.
 23. Higuchi M, Dusting GJ, Peshavariya H, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box o1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev* 2013;22:878-88.
 24. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4476-79.
 25. Bełtowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:168-78.
 26. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012;68:701-11.
 27. Serra D, Mera P, Malandrino MI, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 2012;doi:10.1089/ars.2012.4875.
 28. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:590-7.
 29. Bigornia SJ, Mott MM, Hess DT, et al. Long-term successful weight loss improves vascular endothelial function in severely obese individuals. *Obesity* 2010;18:754-9.
 30. Solá E, Navarro S, Medina P, et al. Activated protein C levels in obesity and weight loss influence. *Thromb Res* 2009;123:697-700.
 31. Kuennen MR. Interaction between race and weight loss intervention strategy: Effect on markers of inflammation and fat distribution in overweight women. *Obesity* 2012;20:1335-6.
 32. Gutierrez-Lopez L, Garcia-Sanchez JR, Rincon-Viquez Mde J, et al. Hypocaloric diet and regular moderate aerobic exercise is an effective strategy to reduce anthropometric parameters and oxidative stress in obese patients. *Obes Facts* 2012;5:12-22.
 33. Rogers KL, Moorthy B. Role of reactive oxygen species (ROS) in health and disease: mechanisms, target organ toxicities, and biomarkers. *Curr Opin Toxicol* 2018;7:37-43.
 34. Gasparovic AC, Zarkovic N, Bottari SP. Biomarkers of nitro-oxidation and oxidative stress. *Current Opinion Toxicol* 2018;7:73-80.
 35. Bolner A, D'Andrea G, Bosello O, et al. Oxidative stress in chronic headaches: old and new markers. *OAMS* 2015;doi:10.5455/oams.231115.or.091.
 36. Ott B, Skurk T, Hastriter L, et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. *Sci Rep* 2017;7:11955.
 37. Heinsen FA, Fangmann D, Muller N, et al. Beneficial effects of a dietary weight loss intervention on human gut microbiome diversity and metabolism are not sustained during weight maintenance. *Obes Facts* 2016;9:379-91.
 38. Komaroff AL. The microbiome and risk for obesity and diabetes. *JAMA* 2016;22:E1-E2.
 39. Fabbiano S, Suarez-Zamorano N, Chevalier C, et al. Functional gut microbiota remodeling contributes to the caloric restriction-induced metabolic improvements. *Cell Metab* 2018;28:907-21.
 40. Bolner A, Micciolo R, Bosello O, et al. A panel of oxidative stress markers in Parkinson's disease. *Clin Lab* 2016;62:105-12.
 41. McMurray F, Patten DA, Harper ME. Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity: recent findings and empirical approaches. *Obesity* 2016;24:2301-10.

ISO 15189 all'ombra dell'Equatore. Descrizione dell'esperienza del North Kinangop Catholic Hospital Laboratory in Kenya

Lucio Marchioro¹, Paul Ndonga Mwangi², Joseph Wairagu Njuru², Antonio Marchionne³

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

²North Kinangop Catholic Hospital Laboratory, Kenya

³Azienda USL Nord-Ovest, Regione Toscana

ABSTRACT

ISO 15189 in the shadow of the Equator. Description of the experience in the North Kinangop Catholic Hospital Laboratory (Kenya).

Introduction: it is nowadays recognized that, in low income countries, the development of quality-assured laboratory services is a major part of a greater framework of health system strengthening and that limited laboratory capacity represents a major barrier to implementation and sustainability of prevention, treatment and care programs. Acknowledging this need, the North Kinangop Catholic Hospital clinical laboratory (Kenya) pursued and obtained ISO 15189 accreditation in clinical biochemistry and haematology.

Methods: the present paper describes the steps that led to this accomplishment in January 2019, as a result of a three-year project. Methodological support was provided by the School of Medicine (Maryland University, USA) as part of an American government program aimed to reinforce laboratory services in resource-poor countries. The iterative plan-do-check-act method was applied.

Results: major changes in laboratory management were introduced to meet the requirements of the standard. Analytical quality issues were reviewed; Internal Quality Control and External Quality Assessment procedures were implemented; reorganization of laboratory areas was made. The North Kinangop Catholic Hospital Laboratory obtained ISO 15189 accreditation in January 2019, as a result of a process started in March 2016.

Conclusions: a key to the success was professional commitment, sharing of values and external support, although careful planning resulted to be the key issue; actually, in low income countries social, political and even logistical peculiarities pose unique challenges.

INTRODUZIONE

La norma ISO 15189 Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza (1), è una norma internazionale che specifica i requisiti riguardanti la qualità e la competenza per i laboratori di analisi mediche. In Italia, il percorso è avviato da qualche anno: ha riguardato inizialmente i laboratori già votati all'eccellenza e sta coinvolgendo via via tutte le strutture orientate al miglioramento continuo della qualità delle attività diagnostiche di laboratorio. La adesione alla norma ISO 15189 prevede una crescita culturale che coinvolge vari ambiti (2) che spaziano dalla formazione di tutte le figure professionali operanti in laboratorio, alla capacità di tradurre nella operatività quotidiana le

indicazioni delle linee guida, passando per una conoscenza approfondita della norma stessa. Se tale passaggio rappresenta una sfida per le strutture con percorsi di qualità già strutturati, è ragionevole aspettarsi che sia oltremodo impegnativo per quelle strutture che sono solo all'inizio di tali percorsi. Può apparire pertanto velleitario che realtà che si muovono in ambiti di risorse (umane, economiche, logistiche) limitate, nonché in situazioni socio-politiche non stabili, possano ambire al raggiungimento di standard di qualità così elevati.

Questo articolo riporta una esperienza che smentisce tale ipotesi e il cui spirito sta tutto in un proverbio Swahili che così recita "pole pole 'ndio mwendo" (piano piano la strada si apre) che ci ricorda

Corrispondenza a: Lucio Marchioro, Via Montà 98/d, 35136 Padova, Tel 3387821330, E-mail luma53@libero.it

Ricevuto: 08.12.2019

Revisionato: 13.01.2020

Accettato: 28.01.2020

Publicato on-line: 14.04.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.023

come, in tutti gli ambiti, i cambiamenti si realizzino a piccoli passi, assimilando progressivamente i nuovi concetti. Viene quindi descritto il percorso che ha portato all'ottenimento del Certificate Accreditation ISO 15189: 2012 dal Kenya Accreditation Service (KENAS), che si è potuto concretizzare grazie alla sinergia tra cultura locale e un incondizionato supporto esterno alla crescita.

Descrizione del contesto

Il North Kinangop Catholic Hospital (NKCH) è un ospedale situato in Kenya che dista 130 km dalla capitale Nairobi. È situato in posizione isolata, all'interno della contea del Nyandarwa e a molti chilometri dai centri più importanti (Naivasha a circa 40 km e Nakuru a oltre 100 km). La struttura è situata in una zona montagnosa, a circa 2400 metri sul livello del mare; la sua posizione isolata lo rende di difficile raggiungimento, specialmente durante le stagioni delle grandi e piccole piogge, con inevitabili ripercussioni sulla organizzazione dei servizi.

L'ospedale nasce nel 1965 a seguito di una donazione alla Diocesi di Nyeri da parte di una famiglia inglese. Il successivo intervento della Diocesi di Padova, in collaborazione con il Collegio Universitario Aspiranti Medici Missionari (CUAMM, Medici con l'Africa, Padova) ha portato alla effettiva realizzazione dell'ospedale (Figure 1 e 2) che serve un bacino di oltre 400 000 persone.

Attualmente l'ospedale presenta una certa complessità; è dotato di circa 330 posti letto distribuiti tra pronto soccorso, chirurgia (con 5 sale operatorie) di specialità (generale e microchirurgia, otorinolaringoiatria, urologia, plastica ricostruttiva, oculistica), medicina interna, ostetricia e ginecologia, pediatria e neonatologia (con 2 incubatrici) e una terapia intensiva con 2 letti di recente allestimento (3).

Vengono garantiti anche diverse prestazioni ambulatoriali e servizi diagnostici: oculistica, diabetologia, otorinolaringoiatria, odontoiatria con laboratorio odontotecnico, poliambulatorio medico e chirurgico, banca del sangue (annessa al laboratorio), servizio di counselling, farmacia con dispensario, radiologia e naturalmente laboratorio analisi. Le attività ambulatoriali, compresa quella di esecuzione dei prelievi di sangue e di raccolta di altri campioni biologici, non seguono orari specifici ma si modulano sui ritmi legati alla agricoltura e alla stagione delle piogge. L'attività giornaliera di accoglienza e di accettazione dei pazienti termina con l'esaurimento delle persone arrivate.

In Kenya non esiste uno stato sociale statale su modello occidentale e il sistema sanitario, si articola a vari livelli con forme di sanità pubblica, missionaria e privata. Quest'ultima risulta inaccessibile a quasi il 90% della popolazione che, quindi, si rivolge agli ospedali governativi e missionari. Il North Kinangop Catholic Hospital offre le proprie prestazioni in modalità gratuita o applicando dei ticket rapportati al livello economico della nazione. Esistono però forme di assicurazione privata (4) con tariffe alla portata di larghe fasce di popolazione.



Figura 1
Ingresso del North Kinangop Catholic Hospital



Figura 2
Foto aerea dell'intero complesso. Il compound comprende l'ospedale vero e proprio e le strutture di supporto: officina meccanica, falegnameria, "cava" per la preparazione di materiale da costruzione, fattoria, panificio e abitazioni del personale.

Il laboratorio analisi

Il North Kinangop Catholic Hospital Laboratory (NKCHL) si è sviluppato fin dalla fondazione dell'ospedale, grazie alle acquisizioni tecnologiche e alla progressiva assunzione di personale a ruolo. Il laboratorio comprende una sala attesa e accettazione (Figura 3), rinnovata di recente per rispondere ai requisiti ISO 15189, e le seguenti sezioni ognuna collocata in locali dedicati: biochimica, microbiologia, parassitologia, ematologia e citofluorimetria, e banca del sangue. È presente anche un locale magazzino e una stanza pausa per il personale.



Figura 3
North Kinangop Catholic Hospital Laboratory: nuova sala attesa e accettazione

Le prestazioni complessive del laboratorio per il 2017-2018 sono state 144.775 con un aumento pari al 33,8% rispetto al periodo precedente (2016-2017) mentre il numero di ricoveri per lo stesso periodo, sono stati 11.388 (+8,3%) con una occupazione media dei posti letto del 72% (-11,4%) (3).

La funzione di supervisione dello sviluppo del laboratorio è stata svolta, a partire dal 1997, da LM, tramite una/due missioni all'anno con permanenze attive in loco di 15-20 giorni.

La metodologia di lavoro utilizzata è stata quella del classico ciclo di Deming: Pianificare - Fare - Verificare - Agire. Al termine di ciascuna missione veniva pianificata la parte del programma da sviluppare (in Italia) e da realizzare in loco nella successiva permanenza.

Attualmente il personale del NKCHL è costituito da dieci tecnici di laboratorio compreso il coordinatore responsabile. Con adeguate turnazioni, viene garantita una operatività sulle 24 ore, 7 giorni la settimana.

La sezione di microbiologia, pur non avendo affrontato l'adeguamento alla norma ISO, si è evoluta parallelamente alle altre attività. Nel 2011 l'acquisto di una cappa a flusso laminare e la implementazione di procedure e protocolli specifici ha consentito di erogare prestazioni numericamente e qualitativamente adeguate alle necessità cliniche. Merita di segnalare in questo ambito l'identificazione di un ceppo di *Klebsiella pneumoniae* multiresistente isolato nella nursery che ha dato seguito alla sistematica esecuzione di tamponi rettali a tutti i neonati ed al controllo periodico microbiologico degli ambienti.

METODI

Lo sviluppo tecnologico del laboratorio nel corso degli anni è riassunto nella Tabella 1.

Il percorso che ha portato all'accreditamento, ISO 15189:2012, ratificato dal Kenya Accreditation Service (KENAS), delle sezioni di biochimica ed ematologia (Certificate Accreditation ISO 15189:2012 del 14/01/2019) è iniziato marzo del 2016. La analisi dei punti deboli (*gap analysis*) avente lo scopo di individuare gli ambiti all'interno dei quali i requisiti di norma non erano ancora presenti o non sufficientemente sviluppati, è stata condotta dalla School of Medicine University of Maryland (USA) nell'ambito di un progetto governativo americano destinato al miglioramento della qualità dei laboratori clinici africani (7). I punti che hanno richiesto maggior impegno da parte del personale del laboratorio sono riassunti nella Tabella 2.

L'Università del Maryland, con periodiche visite di suoi specialisti, ha seguito la formazione del personale ed ha fornito consulenza sia per l'estensione dei documenti che per l'applicazione delle azioni correttive a seguito degli audit periodici.

La Università del Maryland ha provveduto inoltre alla copertura di spese accessorie: personal computer, stampante, materiale di cancelleria ed infine anche alle spese di ospitalità dei suoi delegati e quelli dell'Ente Certificatore.

Il processo di accreditamento ha seguito lo schema riportato in Figura 4 che si è sviluppato secondo il diagramma di flusso di Figura 5.

RISULTATI

In estrema sintesi, il risultato del processo di Accreditazione e' rappresentato dal certificato riportato in Figura 6 dove viene riconosciuto l'importante contributo fornito dalla Maryland University.

In Tabella 3 vengono elencati le dotazioni strumentali, le metodologie analitiche e gli analiti (con i rispettivi limiti di riferimento) che sono stati accreditati per le sezioni di Biochimica Clinica ed Ematologia, così come sono inclusi nell'originale del Certificato di Accreditazione KENAS/ML/68 del 14 Gennaio 2019 (10).

Tra i risultati è interessante riportare anche un esempio di Indicatore (Figura 7) relativo ai campioni pervenuti al Laboratorio e ritenuti non idonei secondo i criteri riportati in Tabella 4.

La quantità e la tipologia delle non conformità del campione sono pressochè in linea con quanto si riscontra nei nostri laboratori; le cause più frequenti di campione non idoneo sono infatti emolisi, presenza di coagulo e quantità insufficiente.

Tabella 1*Tappe della acquisizione delle dotazioni strumentali nel laboratorio*

Periodo	Metodologia in uso	Nuova Acquisizione	Principio del Metodo	Note
1998-2000	-	ILyte Na/K (IL-Instrumentation Laboratory)	Ionospecifico	Analizzatore per sodio e potassio
	Microlab 200 Analyser (Merk Laboratory)	Reflotron (Roche Diagnostics)	Dry chemistry	Strumento di chimica clinica
	Aste graduate in vetro	VES	-	Sistema monouso
2000 (primi anni)	QBC (5) (Quantitative Buffy Coat Analysis)	Coulter ACT Diff (Beckman-Coulter)	-	Analizzatore automatizzato per ematologia
2005	Centrifuga	Centrifuge Universal 32 (Hettich)	-	Donazione ex USL 21 Padova
	Mixer orizzontale	Vortex Mixer	-	
2006	Siringa e riempimento provette di vetro	sistema VACUTAINER (Becton Dickinson)		
	-	Human Clot Junior (HUMAN)	-	PT e aPTT (esami di nuova introduzione)
2007	-	Smart 700/340 (DYAZIME)	Misura turbidimetrica della HbA1c a 700 nm	HbA1c (esame di nuova introduzione)
	Smart 700/340 (DYAZIME)	Epithod 616 (6) (DxGen)	Micrometodo di affinità cromatografica per HbA1c	da Luglio 2019 (seconda dotazione)
2008	Reflotron (Roche Diagnostics,)	ILab 300 Plus (IL-Instrumentation Laboratory)	-	Analizzatore automatizzato per chimica clinica
2011	Coulter ACT Diff (Beckman-Coulter)	Coulter ACT Diff (nuova versione)	-	Secondo analizzatore automatizzato per ematologia
2012	STAT Fax per ELISA test	Analizzatore di immunometria ELISA (HUMAN)	-	Utilizzato specialmente per HIV e TSH
2014	ILab 300 Plus (IL-Instrumentation Laboratory)	ILab Aries (IL-Instrumentation Laboratory)	-	Secondo analizzatore automatizzato per chimica clinica
2016	-	GEM3500 (IL-Instrumentation Laboratory)	-	Emogas analisi
2017	-	POCT Troponina I (Finechek)	metodo oro-colloidale	Anche per NT-proBNP e D-Dimero

Tabella 2
Requisiti ISO tecnici e gestionali che hanno richiesto particolare impegno.

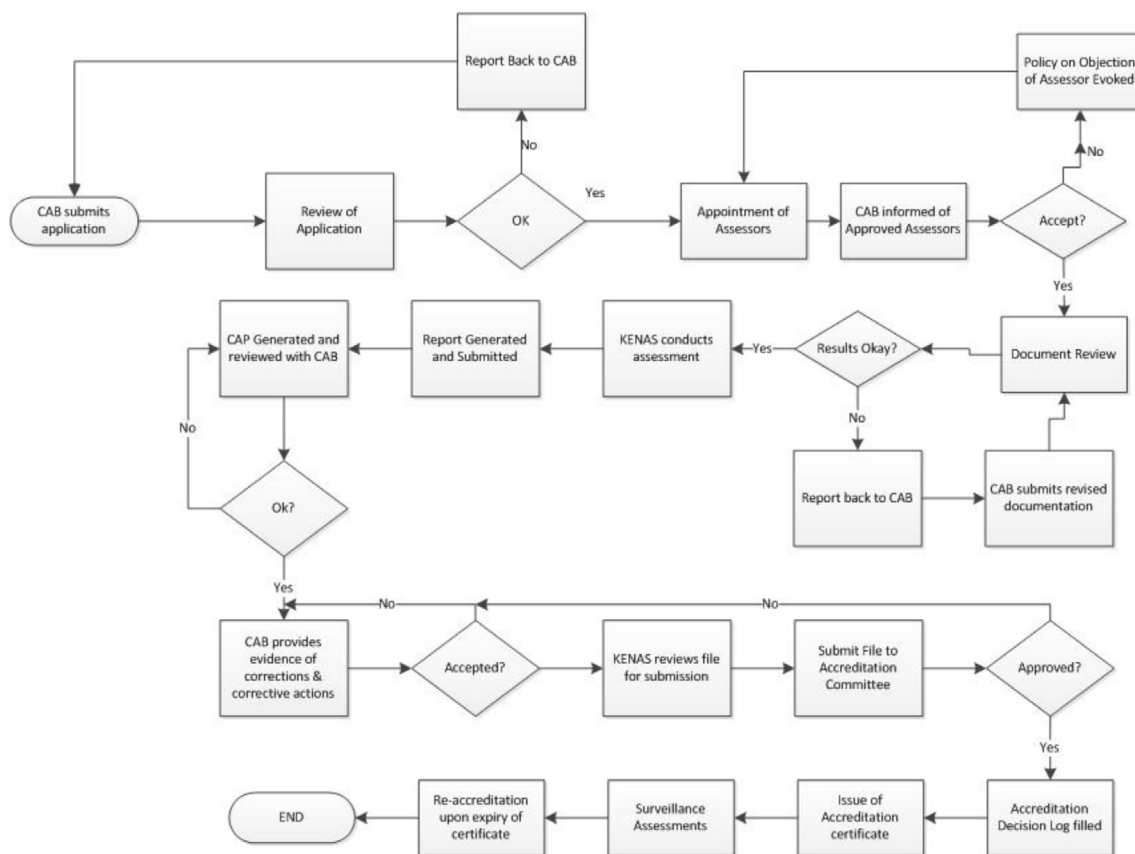
Requisiti ISO	Paragrafo	Necessità	Azione
Requisiti tecnici	5.2 Luogo di lavoro e condizioni ambientali	Riorganizzazione del flusso di lavoro per le fasi pre-analitica ed analitica. Miglioramento della sicurezza nei luoghi di lavoro	Divisione degli spazi fisici destinati ai prelievi di sangue e all'accettazione dei campioni dai reparti dalla fase analitica. Creazione della accettazione. Formazione del personale sull'utilizzo dei Dispositivi di Protezione Individuale. Procedure per la pulizia delle superfici
	5.6 Assicurazione di qualità degli esami	CQI: reperimento dei materiali; creazione di un sistema gestione CQI con regole; monitoraggio e verifica del sistema di regole. VEQ: reperimento dei materiali; gestione invio dati e monitoraggio dei dati di ritorno con eventuali azioni correttive.	CQI Biochimica clinica: SeraChem Control Level 1 and Level 2 (IL–Instrumentation Laboratory). Ematologia: Coulter 4C-Es Cell Control (Beckman Coulter) Abnormal Low, Normal and Abnormal High. Implementazione di regole per la cadenza della esecuzione dei CQI e per l'utilizzo di campioni da pazienti per CQI. VEQ. Adesione a ESfEQA (European Society for External Quality Assessment), Heidelberg (Germany) (8) per Biochimica ed Ematologia; produzione delle procedure per la revisione periodica dei dati di rientro della VEQ
		Allineamento strumentale	Definita la procedura in accordo con TAI (Recommended Total Allowable Error Limits – CLIA) (9) per gli analiti albumina, creatinina, transaminasi epatiche, urea, calcio e parametri dell'esame emocitometrico
Requisiti gestionali	4.14.7 Indicatori di qualità	Definizione di indicatori di qualità delle fasi pre-analitiche, analitiche e post-analitiche	- numero di campioni classificati come non idonei - classificazione delle cause di non idoneità dei campioni (vedi Tabella 4) - monitoraggio trimestrale - numero di risultati non accettabili in VEQ - definizione e monitoraggio trimestrale del tempo di risposta



Figura 4
Processo di Accreditamento del Kenya Accreditation Service (KENAS)

KENAS-Accreditation-Process-Flowmap

30/01/20, 10:33



KENAS ACCREDITATION PROCESS

Figura 5

Diagramma di flusso del processo di accreditamento del Kenya Accreditation Service (KENAS)
 CAB, Conformity Assessment Bodies; CAP, Conformity Assessment Product.
 Ovale: Inizio/Fine; Rettangolo: Attività o Operazione del Processo; Rombo: Decisione/Alternativa

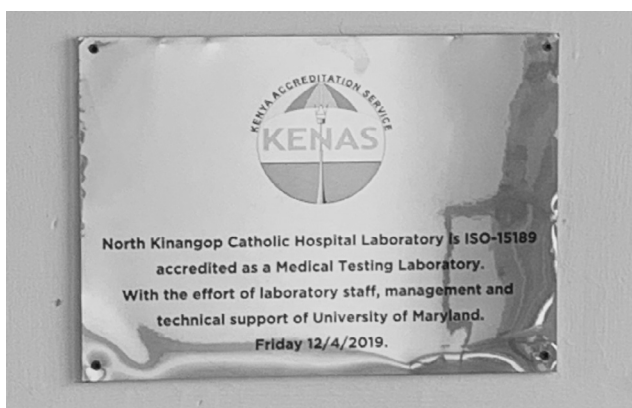


Figura 6

Certificato di Accreditamento del Kenya Accreditation Service (KENAS)

Tabella 3

Dotazioni strumentali ed esami accreditati delle sezioni di Ematologia e Biochimica

Ematologia	Analita Unità di misura	Metodo	Riferimento	Intervallo di misura
Campione: Sangue intero Strumenti: Coulter ACT Diff Coulter ACT Diff2 Ubicazione: Lab. Centrale	Leucociti x10 ³ cellule/uL	Impedenziometria	CLSI H20-A2 NKHL-TECH-040	0,01-10,5
	Eritrociti X10 ⁶ cellule/uL	Impedenziometria	CLSI H52-A2 NKHL-TECH-040	0,01-8,0
	Emoglobina g/dL	Fotometria	CLSI H15-A2 NKHL-TECH-040	1,1-25
	Piastrine x10 ³ cellule/uL	Impedenziometria	ICSH Expert Panel Citology NKHL-TECH-040	7-1000
Biochimica	Analita Unità di misura	Metodo	Riferimento	Intervallo di misura
Campione: Siero/plasma Strumenti: Analizzatori IL Ubicazione: Lab. Centrale	Creatinina umol/L	Spettrofotometria		5,0-2917
	Urea mmol/L	Spettrofotometria	Manuali applicativi ILab Aires e ILab 300 plus NKHL-TECH-054	0,2-45,8
	Calcio mmol/L	Spettrofotometria		0,05-2,5
	Sodio	Elettrodi ione selettivi		20-200
	Cloro mmol/L	Elettrodi ione selettivi	Manuale applicativo ILyte/ NKHL-TECH-054	25-200
	Potassio mmol/L	Elettrodi ione selettivi		0,2-40
	ALT U/L	Spettrofotometria		4,0-1600
	AST U/L	Spettrofotometria		6,0-1600
	Proteine Totali g/L	Spettrofotometria		0,1-110
	Bilirubina Diretta umol/L	Spettrofotometria	Manuali applicativi ILab Aires e ILab 300 plus NKHL-TECH-054	1,5-222
	Bilirubina Totale umol/L	Spettrofotometria		1,7-513
	Colesterolo HDL mmol/L	Spettrofotometria		0,03-6,5
	Colesterolo Totale mmol/L	Spettrofotometria		0,1-23,3
	Trigliceridi mmol/L	Spettrofotometria		0,07-11,3
Ac.Urico mmol/L	Spettrofotometria		6.0-1488	

CLSI, *Clinical & Laboratory Standards Institute*; NKHL-TECH-040, *North Kinangop Hospital Laboratory Documenti Sistema Qualità n°40 e 54*; ICSH, *International Committee for Standardization in Hematology*

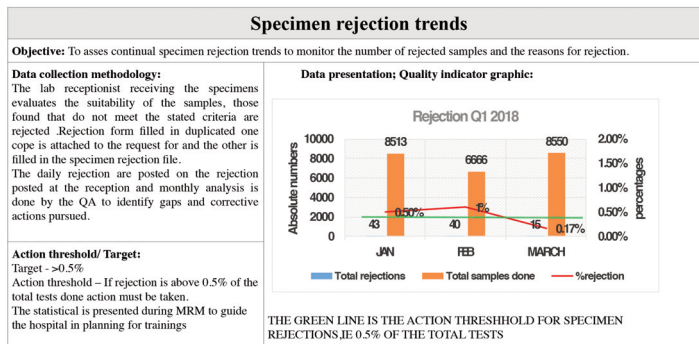


NORTH KINANGOP CATHOLIC HOSPITAL
 P.O. BOX 88 - 20118 NORTH KINANGOP - KENYA
 Tel. 056-50592 - Fax 056-50737
 Email: nkcinangop@gmail.com

DOCUMENT CONTROL NUMBER

NKCHL-FRM-080

Version: 1 INDICATOR MONITORING FORM Effective date 01/01/2017



Page 1 of 2

Figura 7

Monitoraggio dell'indicatore del numero dei campioni non idonei pervenuti al laboratorio nel primo trimestre del 2018

Tabella 4

Classificazione delle cause di non idoneità dei campioni.

- 1 Modulo di richiesta con anagrafica incompleta del campione
- 2 Campione con identificazione incompleta o mancante
- 3 Modulo di richiesta non correttamente compilato o incompleto
- 4 Mancanza del modulo di accompagnamento del campione
- 5 Quantità insufficiente di campione (prelievo scarso)
- 6 Provetta non congruente con l'esame richiesto
- 7 Contenitore del campione danneggiato o rotto con o senza fuoriuscita di materiale
- 8 Trasporto del campione non idoneo (ad esempio, in ghiaccio se richiesto)
- 9 Campione pervenuto in laboratorio dopo troppo tempo dall'esecuzione del prelievo
- 10 Campione coagulato
- 11 Campione emolizzato
- 12 Campione contaminato

Le cause della non idoneità dei campioni sono state classificate genericamente come riconducibili ad una impropria esecuzione del prelievo di sangue o trasporto del campione: le percentuali delle singole non-conformità non sono state dettagliate.

DISCUSSIONE

A partire dal 1997, nel NKCHL ha avuto inizio un percorso sistematico di sviluppo e di miglioramento della sua attività. La determinazione del potassio è stata il primo esame affrontato. Essa costituisce un esempio paradigmatico dei possibili errori metodologici in cui si può incorrere quando si vogliono trasferire, nei paesi a risorse limitate, i modelli occidentali senza una adeguata progettualità.

Il laboratorio (il cui organico, a quel tempo, era costituito da 4 persone prive di specifica formazione) era stato dotato di un analizzatore automatico di Biochimica Clinica, acquistato in Italia senza avere alcuna conoscenza delle specifiche tecniche minime. Come conseguenza, si è riscontrato che non era possibile misurare il potassio in sede per mancanza dell'elettrodo specifico. Né altre analisi potevano essere eseguite perché nessuno del personale (mancante di un percorso di formazione specifico) era in grado di far funzionare

l'analizzatore. Gli studi di fattibilità sono ovunque la necessaria premessa per l'avvio di un nuovo percorso e, a maggior ragione, devono esserlo quando ci si trova in situazioni di risorse limitate.

L'approvvigionamento dei materiali di consumo (ad esempio, contenitori monouso per la raccolta delle urine, sistema con provette sottovuoto per i prelievi di sangue) e della dotazione tecnologica è un altro aspetto cruciale cui porre la massima attenzione. L'eventuale acquisto può essere fatto in Italia, ma è importante che *in loco* ci sia la possibilità di avere l'assistenza tecnica necessaria per il buon funzionamento e uso dello strumento, come pure che esista la possibilità di stipulare un contratto di *service* che preveda anche la formazione del personale. A Nairobi, capitale del Kenya e sede di una delle più importanti facoltà di Medicina del continente africano, sono presenti sia agenzie che sedi di importanti compagnie che commercializzano sistemi diagnostici e attrezzature accessorie.

Sulla base dei concetti sopra esposti è stato portato avanti negli anni il potenziamento della strumentazione del laboratorio. Ad esempio, nel 2014 la scelta del secondo analizzatore di biochimica è caduta su ILab Aries (IL-Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA) in quanto, con esso, si manteneva inalterata la linea reagenti dello strumento già presente (ILab 300 Plus).

La modalità di acquisizione della tecnologia adottata negli anni ha reso così possibile rispondere in modo adeguato ai requisiti tecnici della norma ISO 15189 (paragrafo 5.3). Parimenti, il percorso relativo alla qualità delle determinazioni con l'introduzione del CQI, pratica fino ad allora completamente sconosciuta e intrapresa a partire dal 1998 e completata nel corso dei due anni successivi, ha rappresentato una pietra miliare per arrivare ad ottemperare ai requisiti ISO per l'assicurazione di qualità dei risultati delle analisi (paragrafo 5.6).

La partecipazione a programmi di VEQ è stata iniziata nel 2011 con l'iscrizione ai programmi di Biochimica (Basic Chemistry) e di Ematologia (Basic Hematology) del provider OneWorld Accuracy HUQAS, Kenya (11). Questa partecipazione acquista maggior valore se consideriamo i costi che in questa sede incidono in modo molto più significativo rispetto a quanto accade in Italia e in Europa. Si tratta tuttavia di un investimento doveroso, non solo nella prospettiva della qualità di misura (ovunque essa sia effettuata) ma, in senso più ampio, della equità delle cure (12).

Attualmente sta procedendo anche il progetto di informatizzare il laboratorio. Al momento la refertazione avviene sia con la trascrizione dei risultati su moduli prestampati che con la consegna di referti strumentali (esame emocromocitometrico ed esami di biochimica clinica). Con l'aggiornamento in corso del nuovo sistema informatico dell'Ospedale (NSI), attualmente per gran parte dedicato all'attività amministrativa, è prevista infatti l'informatizzazione di parte dell'attività di laboratorio per le operazioni di etichettatura delle provette, di collegamento on-line con le strumentazioni automatizzate, con la prospettiva futura di referti quanto

più possibile stampati informaticamente.

Il NKCHL non è l'unico laboratorio del Kenya che ha ottenuto un accreditamento. Infatti altri laboratori, sparsi un po' su tutto il territorio keniota, hanno conquistato importanti risultati in termini di qualità della loro attività. Inoltre hanno raggiunto l'accreditamento due laboratori in altri Paesi dell'Africa sub-Sahariana: Gambia e Uganda. (13).

Questi traguardi hanno come denominatore comune un nuovo indirizzo culturale che mette al centro la conversione al buon governo, l'attenzione al bene comune e le transizioni democratiche in Africa. La Dichiarazione di Maputo del 2008 (14) che, rivolta inizialmente al miglioramento dei servizi di diagnosi (e cura) per tubercolosi, malaria e HIV (15), ha visto via via ampliare i propri orizzonti e costituisce un vero e proprio manifesto del diritto alla salute delle donne e uomini in Africa.

L'esperienza del NKCHL indica quindi che è possibile costruire un percorso sistematico con obiettivi progressivi che, raggiunti nel tempo, consentono di arrivare a importanti risultati come questo, proprio come la saggezza popolare ci indica con il proverbio citato in Introduzione. Il traguardo raggiunto è anche frutto di una non scontata motivazione del personale, costantemente stimolata dal Coordinatore Responsabile, sia nel concretizzare la programmazione degli interventi previsti dal processo di accreditamento che nel mettere in atto tutte le osservazioni poste in evidenza durante le periodiche verifiche dell'Ente Certificatore.

Da non trascurare la preoccupazione per il mantenimento, da parte del NKCHL del livello di qualità raggiunto. Essa riguarda principalmente l'avvicendamento del personale. Questo si verifica non tanto per sopraggiunta disaffezione nei riguardi della struttura, ma è piuttosto causato da più allettanti possibilità di impiego in laboratori e ospedali pubblici kenioti offerte dal governo locale costantemente alla ricerca di personale qualificato.

CONCLUSIONI

L'attività di consulenza in un laboratorio a livello dell'equatore o dei tropici, se si decide di intraprenderla, non può e non deve passare attraverso eclatanti e immediate trasformazioni rispetto alle condizioni locali. Viene a proposito anche qui la citazione di un altro proverbio Swahili e cioè "*haraka haraka haina baraka*" (la fretta non è benedetta).

L'approfondimento delle conoscenze relative alla cultura e alle realtà locali, il rispetto degli operatori con i quali si viene a contatto, ma soprattutto il riconoscimento delle loro competenze e professionalità, sono alla base di una fruttuosa collaborazione.

Poche cose per volta, affrontate con la giusta tempistica, portano ai risultati che si desidera raggiungere.

Questa esperienza è una testimonianza ma al contempo uno stimolo per tutte quelle molteplici e varieguate iniziative che avvengono in terra d'Africa.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'Università del Maryland e la sua Scuola di Medicina per aver investito nel North Kinangop Catholic Hospital Laboratory e soprattutto per aver creduto nelle capacità professionali del suo Personale.

Si ringrazia inoltre la dott.ssa Martina Zaninotto per la consulenza ed i preziosi suggerimenti durante la stesura del testo.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. ISO 15189:2012 Medical Laboratories-Requirements for Quality and Competence. International Organization for Standardization: Geneva 2012.
2. Plebani M, Sciacovelli L. ISO 15189 Accreditation: navigation between quality management and patient safety. *J Med Biochem* 2017;36:225-30.
3. Official Annual Statistical Report. July 2017-June 2018 Evaluation. North Kinangop Catholic Hospital Administration (per gentile concessione dell'Amministrazione del NKCH)
4. NHIF (National Hospital Insurance Fund): <https://www.nhif.or.ke/healthinsurance/> (ultimo accesso: gennaio 2020)
5. Ahmed NH, Samantaray JC. Quantitative buffy coat analysis – an effective tool for diagnosis blood parasites. *J Clin Diagn Res* 2014. doi: 10.7860/JCDR/2014/7559.4258.
6. Principio del micrometodo HbA1c: <https://www.trinitybiotech.com/haemoglobins/boronate-affinity-chromatography> (ultimo accesso: gennaio 2020)
7. Nkengasong JN. Strengthening laboratory services and systems in resource-poor countries. *Am J Clin Pathol* 2009;131:774.
8. European Society for External Quality Assessment (ESFEQA): <https://www.esfeqa.eu/en/eqa-programs/> (ultimo accesso : gennaio 2020)
9. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA): <https://www.cdc.gov/clia/index/html> (ultimo accesso: gennaio 2020)
10. Certificato di accreditamento: <https://kenas.go.ke/wp-content/uploads/SCHEDULE-NORTH-KINANGOP-2023.pdf> (ultimo accesso: gennaio 2020)
11. Human Quality Assessment Services: <https://www.huqas.org/programs/> (ultimo accesso: gennaio 2020)
12. Gruppo di Studio PHASE-Lab. Responsabilità ed etica professionale nella medicina di laboratorio. *Biochim Clin* 2007;31:299-309.
13. Kenya Accreditation Service (KENAS): <https://kenas.go.ke/our-services/medical-laboratories/> (ultimo accesso: gennaio 2020)
14. The Maputo Declaration-The Maputo Declaration on Strengthening of Laboratory Systems. https://who.int/diagnostics_laboratory/Maputo-Declaration_2008.pdf (ultimo accesso: gennaio 2020)
15. Nkengasong JN, Mesele T, Orloff S, et. al. Critical role of developing national strategic plans as a guide to strengthen laboratory health systems in resource-poor settings. *Am J Clin Pathol* 2009;131:852-7.

Pharmacogenetic markers able to predict lipid-related parameters in a cohort of ritonavir treated patients

Jessica Cusato¹, Andrea Calcagno¹, Miriam Antonucci¹, Letizia Marinaro¹, Valeria Avataneo¹, Amedeo De Nicolò¹, Alice Palermi¹, Stefano Bonora¹, Giovanni Di Perri¹, Antonio D'Avolio^{1,2}

¹Department of Medical Sciences, University of Turin, Amedeo di Savoia Hospital, Turin, Italy.

²Interdepartmental Center for Clinical and Experimental Pharmacology (CIFACS), University of Turin

ABSTRACT

Introduction: Ritonavir (RTV) could cause lipodistrofy and body fat redistribution. Pharmacogenetics could explain part of variability in RTV treatment outcome, but few data are present in literature concerning its influence on lipid-associated parameters. For these reasons, aim of this study is to describe the role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in lipids and RTV transport and metabolism in affecting lipid-related biomarkers in a cohort of HIV-infected patients.

Methods: adult HIV-affected patients, being on RTV-containing antiretroviral treatment for at least 6 months, were enrolled at the "Amedeo di Savoia" hospital in Turin (Italy). Genotypes were assessed through real-time PCR.

Results: 99 patients were recruited for the study. The following associations were suggested: *ABCB1* 3435 TT on total cholesterol and triglycerides, *ABCB1* 2677 on viral load, *ABCC2* -1249 AA on glucose, *ABCC2* -24 GA/AA on total cholesterol, low density lipoproteins cholesterol and triglycerides, *ABCG2* 1194+928 CC on pancreatic amylase, *HNF4* 975 CG/GG on total cholesterol, low density lipoproteins cholesterol, *VEGF* -1154 AA on lactate dehydrogenase.

Discussion: This work was the first analyzing genetic polymorphisms affecting lipid-related markers in a cohort of RTV-treated patients. Further analyses are warranted to confirm these data and evaluate their influence on cardiovascular risk.

INTRODUCTION

Ritonavir (RTV) is one of the HIV-protease inhibitors (PIs) (1). It has a high bioavailability, that is increased if it is administered with meal (1). The drug is the cytochrome (CYP) 3A4 (the main isoenzyme responsible of PIs metabolism) inhibitor and it is able to reduce cellular transport of other PIs through P-glycoprotein (P-gp, encoded by ATP-binding cassette (*ABC*) *B1* gene) and multidrug resistance protein (MRP, encoded by *ABCC2* gene) transporters (2). RTV is eliminated in urine and feces and it is metabolized by CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5 and CYP2D6; furthermore, it inhibits several metabolizing and transporting enzymes (CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, UGT1A4, Pg-p, BCRP, MRP2, OCT1, OCT2, OATP1B1 and OATP2B1), while it may induce CYP3A4 and CYP1A2(3). Also cobicistat (COBI) is a CYP3A4 inhibitor, a weak one for CYP2D6

and it does not inhibit nor induce other CYP enzymes; moreover, it does not even induce glucuronyl transferase (UGT) or inhibit P-gp as strongly compared to RTV (4, 5). COBI has been introduced as a pharmaco-enhancer, co-formulated with atazanavir (ATV), darunavir (DRV) and elvitegravir (EVG).

RTV is not well tolerated; lipodistrofy and body fat redistribution have been frequently observed: active metabolites interacting with metabolic pathways (including GLUT-4 receptor) have been reported (6). Particularly, RTV seems to have an effect on peripheral glucose disposal through the direct inhibition of the GLUT4 activity (6).

In particular, RTV severe adverse effects were related to higher hepatocellular enzymes and triglycerides (TG) concentrations (7).

Pharmacogenetics could explain part of the variability in RTV treatment outcome, and consequent

Corrispondenza a: Jessica Cusato, Laboratory of Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics, University of Turin, Department of Medical Sciences, Amedeo di Savoia Hospital, Corso Svizzera 164 - 10149 Turin (Italy), Tel +39.011.4393867, E-mail jessica.cusato@unito.it.

Ricevuto: 21.01.2020

Revisionato: 09.03.2020

Accettato: 17.03.2020

Publicato on-line: 08.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.031

toxicity, but there are few data in the literature concerning this issue and lipid-related parameters plasma concentrations.

The study aim is to examine the role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in lipids and RTV transport and metabolism, in affecting lipid-related biomarkers in a cohort of HIV-infected patients.

METHODS

Patients were enrolled at the "Amedeo di Savoia" hospital in Turin (Italy) after obtaining the approval of the Ethics Committee (approval n° 20/2017); they gave written informed consent before entry in the study.

Inclusion criteria were: adult age, confirmed HIV positivity, being on RTV-containing antiretroviral treatment for at least 6 months, with evening intake. Concomitant use of statins, HCV or HBV infections were considered as exclusion criteria.

Plasma levels of total, low density lipoproteins (LDL), high density lipoproteins (HDL) cholesterol, triglycerides (TG), pancreatic amylase (AMY-P), glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), haemoglobin, white blood cells (WBC) and CD4 cell count and percentage and HIV viral load were evaluated at baseline (BL) and at 12, 24, and 48 weeks after treatment. Variables are presented as median and median delta (Δ), calculated as BL value minus the value at one specific timing).

Whole blood was withdrawn in EDTA tubes, genomic DNA was isolated from blood samples (MagnaPure Compact, Roche, Monza, Italy) and genotypes were assessed through real-time polymerase chain reaction allelic discrimination system (LightCycler 480, Roche, Monza, Italy) (8).

The following genes were chosen because of their involvement in RTV transport (9) or in lipid metabolism (10) or because they are transcription factors able to modulate the expression of the suggested genes (11, 12). Investigated SNPs were related to transporters, nuclear and vascular factors.

ABCB1 3435 C>T, 1236 C>T, 2677 G>T, *ABCG2* (encoding breast cancer resistance protein, BCRP); 421 C>A, *ABCG2* 1194+928 T>C, *ABCC2* 1249 G>A, *ABCC2-24* G>A were analyzed concerning transporters; hepatocyte nuclear factor alpha (*HNF4a*) 975 C>G, pregnane-X-receptor (*PXR*) 63396 C>T, *PXR* 7635 G>A, constitutive androstane receptor (*CAR*) 540 C>T) and vascular endothelial grow factors (*VEGFA*) -2578 A>C and *VEGFA* -1154 G>A were investigated respectively as nuclear and vascular-associated genes.

All the variables were tested for normality through the Shapiro-Wilk test. Non-normal variables were described as median values and interquartile range (IQR); categorical variables were described as numbers and percentages. Allele frequencies were tested for Hardy-Weinberg equilibrium. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for differences in continuous variables between genetic groups, considering the level of statistical significance (p-value) <0.05.

Tests were performed with IBM SPSS Statistics 25.0 for Windows (Chicago, Illinois, USA).

RESULTS

A number of 99 patients were enrolled: their characteristics are reported in Table 1. Males are 78 (78.8%) and median age is 45 years (IQR 41.3-48.8); 79 (79.8%) subjects are Caucasians and 97 (98%) have never been treated with other drugs (naïve patients).

Allelic variants were analyzed (Table 2) and the

Table 1

Baseline characteristics of the studied population

Characteristics	Values
Total number	99
Age (year), median [IQR]	45 [41.3-48.8]
Male sex, n (%)	78 (78.8)
Caucasians, n (%)	79 (79.8)
Viral Load (copies/mL), median [IQR]	152000 (36800-460000)
Nadir (cell/uL), median [IQR]	158 (59-282)
Naïve patients, n (%)	97 (98)
Patients treated with tenofovir, n (%)	82 (82.8)
Patients treated with lopinavir, n (%)	51 (51.5)
Patients treated with darunavir, n (%)	13 (13.1)
Patients treated with atazanavir, n (%)	29 (29.3)
Patients treated with emtricitabine, n (%)	78 (78.8)
Patients treated with lamivudine, n (%)	13 (13.1)

IQR, interquartile range

Hardy-Weinberg conditions were met for all the SNPs, with the exception for *ABCB1* 1236 C>T and *PXR* 63396 C>T.

In Table 3, SNPs able to affect different biochemical values at different timings of treatment were reported: best associations were *ABCB1* 3435 TT and total cholesterol at week 12 ($p=0.008$), *ABCB1* 2677 TT and viral load at BL ($p=0.030$), Δ week 12 ($p=0.013$) and Δ week 24 ($p=0.023$), *ABCC2* -1249 AA and glucose at BL ($p=0.025$) and Δ week 24 ($p=0.012$).

Furthermore, *ABCC2* -24 GA/AA affected total cholesterol at BL ($p=0.009$), week 24 ($p=0.003$) and week 48 ($p=0.009$), LDL at BL ($p=0.008$), week 24 ($p=0.004$) and week 48 ($p=0.010$) and TG (Figure 1) at BL ($p=0.041$) and week 48 ($p=0.025$), *ABCG2* 1194+928 CC was linked to AMIP at BL ($p=0.015$) and week 48 ($p=0.013$), *HNF4* 975 CG/GG to cholesterol at BL ($p=0.006$), week 12 ($p=0.001$) and week 24 ($p=0.009$) and LDL at BL ($p=0.001$), week 12 ($p=0.001$) and week 24 ($p=0.011$), *VEGF* -1154 AA to LDH at week 12 ($p=0.012$).

No other SNP was suggested to influence the considered parameters.

DISCUSSION

HIV infection has a deep impact on lipid and lipoprotein levels (dyslipidemia and lipodystrophy): it has been shown to increase lipogenesis in the liver and the presence of comorbidities and AIDS-related diseases increases substantially cardiovascular (CVD) risk (13).

Moreover, ARVs, particularly PI treatment, resulted in lipid abnormalities, especially hypertriglyceridemia: different factors involving genetic, virologic, immunologic, inflammatory and pharmacological

aspects could affect these parameters. RTV-boosted PIs are well known to increase total and LDL cholesterol levels compared to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, which are associated to higher HDL cholesterol levels (14).

Magenta et al. analyzed lipid changes in LPV/RTV treated patients (Swiss HIV Cohort Study): hypertriglyceridemia increased from 38% (BL) to 57% (second follow-up), LDL-apoB increased during the first year, but not beyond one year, LDL-cholesterol increased of 17 mg/dL during the first year; no higher CVD risk resulted from these lipid changes (15).

In the present study, the role of ABC transporters-related gene SNPs in predicting lipid-related biomarkers levels in a cohort of RTV-treated patients was suggested.

Considering that P-gp is encoded by *ABCB1* gene and evaluating pharmacogenetics, a paper showed that *ABCB1* 1236 and *ABCG2* 142 polymorphisms are not associated with different LDL-cholesterol levels in patients treated with atorvastatin, whereas *ABCB1* 3435 resulted as pharmacogenomic biomarker for statin therapy-associated response and myopathy risk (16, 17). *ABCB1* 3435 T allele was linked to decreased P-gp mRNA and protein concentrations (18). This SNP was associated to changes in lipids in patients following statin treatment: particularly, HDL-cholesterol levels were different between CC/CT versus TT genotype patients. Furthermore, decreased HDL-cholesterol concentrations in TT patients were related with a reduced response to statin treatment (19). *ABCB1* 3435 was related to increased total LDL and HDL-cholesterol levels, whereas *ABCB1* 2677 SNP to BL HDL-cholesterol in newly diagnosed hyperlipidemic individuals(20): it could be important to highlight that, in our study, its influence on

Table 2
Variant allele frequencies

Single Nucleotide Polymorphism	% HOMOZIGOUS WILD TYPE	% HETEROZYGOUS	% HOMOZYGOUS MUTANT
<i>ABCB1</i> 3435 C>T	35.4 CC	42.4 CT	22.2 TT
<i>ABCB1</i> 1236 C>T	33.3 CC	60.6 CT	6.1 TT
<i>ABCB1</i> 2677 G>T	38.4 CC	50.5 CT	11.1 TT
<i>ABCB11</i> 1131 T>C	20.2 TT	44.4 TC	35.4 CC
<i>ABCG2</i> 421 C>A	89.9 CC	9.1 CA	1.0 AA
<i>ABCG2</i> 1194+928 T>C	66.6 TT	28.3 TC	5.1 CC
<i>ABCC2</i> 1249 G>A	61.6 GG	34.3 GA	4.1 AA
<i>ABCC2</i> -24 G>A	69.7 GG	24.2 GA	6.1 AA
<i>HNF4α</i> 975 C>G	71.7 CC	25.3 CG	3.0 GG
<i>PXR</i> 7635 G>A	32.3 GG	45.5 GA	22.2 AA
<i>PXR</i> 63396 C>T	27.3 CC	39.4 CT	33.3 TT
<i>CAR</i> 540 C>T	46.5 CC	47.4 CT	6.1 TT
<i>VEGFA</i> -2578 A>C	16.2 AA	39.4 AC	44.4 CC
<i>VEGFA</i> -1154 G>A	64.6 GG	29.3 GA	6.1 AA

Table 3

Statistical significant of the influence of the genetic variants on biochemical data.

SNP	p-value	Timing and factor	Median concentrations (interquartile range)
<i>ABCB1</i> 3435 TT	0.044	BL TC	156 (127/169)
	0.008	W12 TC	173 (140/194)
	0.039	W24 TC	171 (154/216)
<i>ABCB1</i> 3435 TT	0.048	BL TG	83 (63.5/179)
	0.045	W12 TG	130.5 (97/186)
	0.049	W48 TG	108.5 (81.5/168.5)
<i>ABCB1</i> 2677 TT	0.030	BL viral load	34610 (18385/648198)
	0.013	Δ W12 viral load	-34521 (-648053/-18360)
	0.023	Δ W24 viral load	-34571 (-648125/-18366)
	0.046	Δ W48 viral load	-34571 (-648170/-18366)
<i>ABCC2</i> -1249 AA	0.025	BL glucose	97 (87/ -)
	0.031	Δ W12 glucose	-11 (-19/ -)
	0.012	Δ W24 glucose	-10 (-10/ -)
<i>ABCC2</i> -24 GA/AA	0.009		145.5 (1148/169)
	0.003	BL TC	169.5 (157.8/196.8)
	0.009	W24 TC W48 TC	182 (160.5/202)
<i>ABCC2</i> -24 GA/AA	0.008	BL LDL-C	88 (63/101.5)
	0.004	W24 LDL-C	99 (70/124.5)
	0.010	W48 LDL-C	101 (79.5/124)
<i>ABCC2</i> -24 GA/AA	0.041		91 (60/145)
	0.043	BL TG	144 (99.5/179)
	0.045	W12 TG W24 TG	126 (101.5/184)
	0.025	W48 TG	101 (80.5/181.5)
<i>ABCG2</i> 1194+928 CC	0.015	BL AMI-P	17 (14/20)
	0.033	W12 AMI-P	18 (15.8/18.8)
	0.039	W24 AMI-P	16 (14.3/19.3)
	0.013	W48 AMI-P	16.5 (13.8/17.8)
<i>HNF4α</i> 975 CG/GG	0.006		145 (115.5/160)
	0.001	BL TC W12 TC	158 (135/200)
	0.009	W24 TC	165 (146/184)
<i>HNF4α</i> 975 CG/GG	0.001	BL LDL-C	77.5 (52.3/91.3)
	0.001	W12 LDL-C	95 (68.3/117.8)
	0.011	W24 LDL-C	90.5 (61/104)
<i>VEGFA</i> -1154 AA	0.012	W12 LDH	289.5 (237.8/313.5)
	0.031	W24 LDH	287.5 (242.8/353.5)
	0.030	W48 LDH	276 (255.3/305.5)

BL, baseline; W12, W24, W48, after 12, 24 and 48 weeks of treatment; TC, total cholesterol, LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol, AMY-P, pancreatic amylase; LDH, lactate dehydrogenase

CVD risk before starting therapy (BL) was suggested. *ABCB1* 2677 variant is a triallelic SNP (2677T > G/A). Despite a large number of studies, different results were suggested concerning altered P-gp activity and expression: increase, decrease and no change in drug exposure and drug effect (21).

Concerning *ABCC2* genetic variants, in 2017, a study highlighted *ABCC2* 1249 SNP related to reduced total

and LDL-cholesterol levels in Korean individuals: particularly, GG genotype patients showed reduced analyzed markers concentration compared to GA genotype group ($p < 0.003$ and $p < 0.023$, respectively).

Related to *ABCC2* -24 variant, no association was evidenced with atorvastatin outcome; furthermore, nonetheless A allele Chilean males had decreased TG and TG/HDL ratio. In addition, authors suggest that

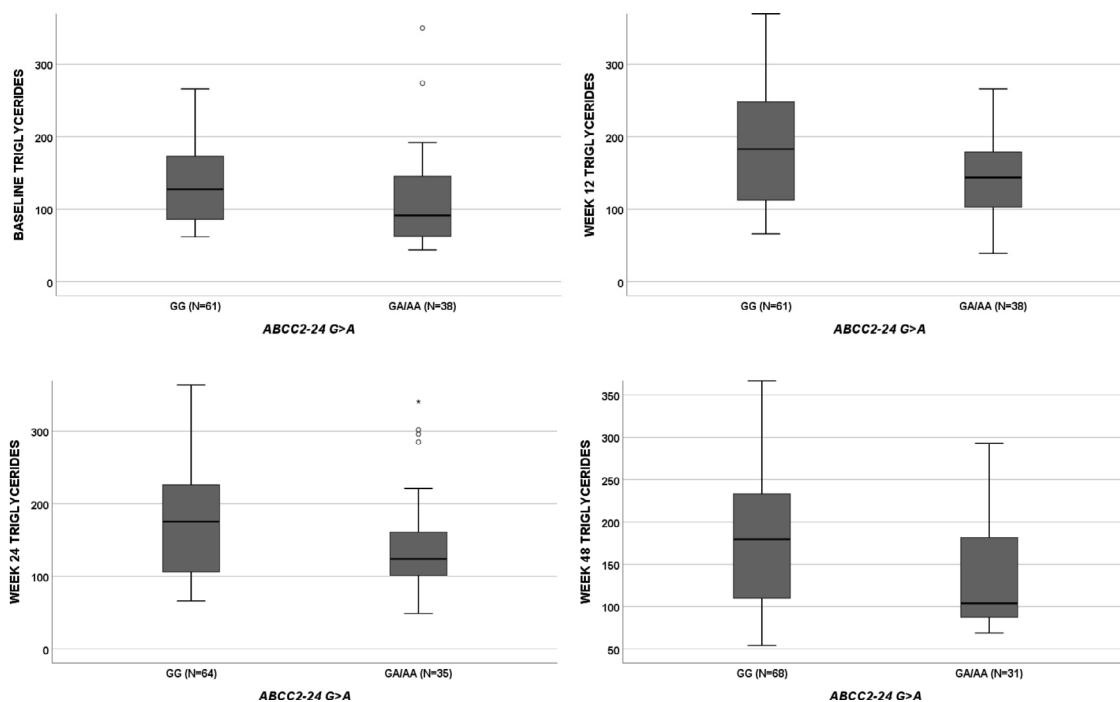


Figure 1
ABCC2-24 G>A single nucleotide polymorphism influence on triglycerides levels

males, but not females TG and TG/HDL ratio, were affected by *ABCC2* -24 variant (22). Another research suggested *ABCC2*-24 A allele association with dose decreases or switch to other cholesterol-lowering drugs during simvastatin and atorvastatin therapy (23). *ABCC2* -24 G>A SNP has been shown to decrease (24), increase (25) as well as have no effect on *ABCC2* expression (26); furthermore, studies reported A allele patients need decreased statin doses (22, 23).

Finally, *HNF4α* and *VEGFA* gene polymorphisms were able to affect cholesterol biomarkers in this work. In particular, *HNF4α* is a positive *CYP7A1* (cholesterol 7 alpha-hydroxylase) expression regulator-related to cholesterol metabolism. This enzyme belongs to the oxidoreductase class and converts cholesterol to 7-alpha-hydroxycholesterol, the first and rate limiting step in bile acid synthesis (27).

Regarding *VEGFA*, Stathopoulou et al. highlighted the relationship between a common genetic *VEGFA* variant and cholesterol homeostasis factors (28).

This is the first study analyzing different genetic variants affecting lipid-related markers in a cohort of HIV-infected patients treated with RTV; limitations are small sample size, only one analyzed cohort and lacking RTV drug quantification in patients.

Further studies are warranted in order to evaluate the influence of these genetic variants in affecting the cardiovascular risk.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

CONFLICT OF INTEREST

A.C. has received grants from Viiv, speaker's honoraria and consultancy fees from Viiv, Gilead, MSD and Janssen-Cilag. G.D.P. and S.B. have received grants, travel grants and consultancy fees from Abbvie, Boehringer-Ingelheim, BMS, MSD, Gilead, Janssen-Cilag, and Viiv. The other authors declare no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. J Ng, CE Klein, SJ Causemaker, et al. A Comparison of the Single Dose Bioavailability of a Ritonavir Tablet Formulation Relative to the Ritonavir Soft Gelatin Capsule in Healthy Adult Subjects XVII International AIDS Conference Mexico City 2008.
2. Zeldin RK, Petruschke RA. Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:4-9.
3. Ye L, Hou C, Liu S. The Role of Metabolizing Enzymes and Transporters in Antiretroviral Therapy. *Curr Top Med Chem* 2017;17:340-360.

4. Bonora S, Calcagno A, Trentalange A, Di Perri G. Elvitegravir, cobicistat, emtricitabine and tenofovir alafenamide for the treatment of HIV in adults. *Expert Opin Pharmacother* 2015;17:409-419.
5. Calcagno A, Simiele M, Motta I, et al. Elvitegravir/Cobicistat/Tenofovir/Emtricitabine Penetration in the Cerebrospinal Fluid of Three HIV-Positive Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2016;32:409-411.
6. Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:279-304.
7. Lenhard JM, Croom DK, Weiel JE, Winegar DA. HIV protease inhibitors stimulate hepatic triglyceride synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2625-2629.
8. Dieterle F, Marrer E. New technologies around biomarkers and their interplay with drug development. *Anal Bioanal Chem* 2008;390:141-154.
9. Bierman WF, Scheffer GL, Schoonderwoerd A, et al. Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines. *J Antimicrob Chemother* 2010;65: 1672-1680.
10. Heinonen SE, Kivela AM, Huusko J, et al. The effects of VEGF-A on atherosclerosis, lipoprotein profile, and lipoprotein lipase in hyperlipidaemic mouse models. *Cardiovasc Res* 2013;99:716-723.
11. Mbatchi LC, Brouillet JP, Evrard A. Genetic variations of the xenoreceptors NR112 and NR113 and their effect on drug disposition and response variability. *Pharmacogenomics* 2017;19:61-77.
12. Chan GN, Hoque MT, Bendayan R. Role of nuclear receptors in the regulation of drug transporters in the brain. *Trends Pharmacol Sci* 2013;34:361-372.
13. Melzi S, Carenzi L, Cossu MV, Passerini S, Capetti A, Rizzardini G. Lipid Metabolism and Cardiovascular Risk in HIV-1 Infection and HAART: Present and Future Problems. *Cholesterol* 2010;27:1504.
14. Rosenkranz SL, Yarasheski KE, Para MF, Reichman RC, Morse GD. Antiretroviral Drug Levels and Interactions Affect Lipid, Lipoprotein, and Glucose Metabolism in HIV-1 Seronegative Subjects: A Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis. *Metab Syndr Relat Disord* 2007;5:163-173.
15. Magenta L, Dell-Kuster S, Richter WO, et al. Lipid and lipoprotein profile in HIV-infected patients treated with lopinavir/ritonavir as a component of the first combination antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;27: 525-533.
16. Prado Y, Zambrano T, Salazar LA. Transporter genes ABCG2 rs2231142 and ABCB1 rs1128503 polymorphisms and atorvastatin response in Chilean subjects. *J Clin Pharm Ther* 2018;43:87-91.
17. Su J, Xu H, Yang J, et al. (2015) ABCB1 C3435T polymorphism and the lipid-lowering response in hypercholesterolemic patients on statins: a meta-analysis. *Lipids Health Dis* 14:122.
18. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:693-704.
19. Salacka A, Binczak-Kuleta A, Kaczmarczyk M, Hornowska I, Safranow K, Clark JS. Possible association of ABCB1:c.3435T>C polymorphism with high-density-lipoprotein-cholesterol response to statin treatment--a pilot study. *Bosn J Basic Med Sci* 2014;14:144-149.
20. Agapakis D, Panderi A, Gbandi E, et al. The ABCB1 2677G>T/A polymorphism is associated with baseline blood HDL-cholesterol levels in newly diagnosed hyperlipidemic patients. *Hellenic J Cardiol*, 2017.
21. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 2010;21:152-161.
22. Prado Y, Zambrano T, Salazar LA. Transporter genes ABCG2 rs2231142 and ABCB1 rs1128503 polymorphisms and atorvastatin response in Chilean subjects. *J Clin Pharm Ther* 2017;43:87-91.
23. Becker ML, Elens LL, Visser LE, et al. Genetic variation in the ABCC2 gene is associated with dose decreases or switches to other cholesterol-lowering drugs during simvastatin and atorvastatin therapy. *Pharmacogenomics J* 2011;13:251-256.
24. Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, et al. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J* 2007;7:56-65.
25. Anderson PL, Lamba J, Aquilante CL, Schuetz E, Fletcher CV. Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42: 441-449.
26. Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, et al. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1356-1359.
27. Prakash C, Zuniga B, Song CS, et al. Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Drug Response and Drug Interactions. *Nucl Receptor Res* 2, 2015.
28. Stathopoulou MG, Bonnefond A, Ndiaye NC, et al. A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *J Lipid Res* 2012;54:535-541.

A wide next-generation-sequencing panel improves the molecular diagnosis of dyslipidemias

Carola Giacobbe^{1,2}, Maria Donata Di Taranto^{1,2}, Daniela Palma^{1,2}, Giovanna Maione^{1,2}, Giovanna Cardiero^{1,2}, Gabriella Iannuzzo³, Alessio Buonaiuto³, Francesco Forte³, Ilenia Calcaterra³, Giuliana Fortunato^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

²CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli

³Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

ABSTRACT

Introduction: dyslipidemias are common clinical conditions associated to cardiovascular diseases. Among these, Familial Hypercholesterolemia (FH) and severe Hypertriglyceridemia (sHTG) are the most frequent ones. The aim of this study is to evaluate the possible use of a wide next-generation-sequencing (NGS) panel of 28 genes involved in lipid metabolism, to improve the molecular diagnosis of dyslipidemias.

Methods: a reanalysis of 25 patients (21 FH and 4 sHTG) previously analyzed for a few causative genes has been carried on. Patients bearing different types of variants [single nucleotide variants (SNVs) and copy number variations (CNVs)] in different genes, previously analyzed with Sanger sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) have been selected. DNA libraries have been prepared using Agilent SureSelect target enrichment protocol; the sequencing has been performed using Illumina MiSeq (V2 150x2 Micro). The results of the sequencing have been evaluated by Agilent SureCall and Agilent Alissa Align&Call and Intrepret pipelines.

Results: all previously identified SNVs and CNVs have been confirmed by NGS. Additional rare variants, not always associated with dyslipidemias, were found in 23/25 patients. An additional pathogenic variant in the *APOB* gene has been identified in a sHTG patient carrying only 1 pathogenic variant in the *APOA5* gene (causative of sHTG).

Conclusions: the NGS-method confirmed all the results obtained with direct sequencing and MLPA methodologies. Additional rare variants were detected, even if most of them turned out to be variant of uncertain significance (VUS). In conclusion, this NGS approach may enhance the molecular diagnosis of different types of dyslipidemias, thereby leading to a better understanding and detection of complex phenotypes.

INTRODUCTION

Dyslipidemias, especially hyperlipidemias, are a common clinical condition and a major risk factor for cardiovascular diseases (1,2). Dyslipidemias are usually due to genetic causes; however the presence of secondary factors (mainly the life style) can play an important role in their clinical manifestations (2). Among the different genetic forms of hyperlipidemias, Familial Hypercholesterolemia (FH) and Severe Hypertriglyceridemia (sHTG) are the most frequent and studied ones (3) and are characterized by elevated levels of cholesterol (CHOL) and triglycerides (TG), respectively.

FH shows an autosomal dominant pattern and is

considered the most common genetic dyslipidemia (4). FH is mainly due to the presence of loss-of-function variants in the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*), while loss-of-function variants in apolipoprotein B-100 (*APOB*) and gain-of-function variants in pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) are less frequent (5). Two forms of FH are known: heterozygous FH (HeFH), with a frequency of ~1:200 (6), characterized by the presence of a single pathogenic variant in one of its causative genes and homozygous FH (HoFH), much rarer than HeFH (~1:300.000) (7-9) characterized by the presence of one pathogenic variant at homozygous status or of two pathogenic variants at compound heterozygous status.

Corrispondenza a: Giuliana Fortunato, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, via S. Pansini 5, 80131 Napoli, Tel +39-081.746.4200; E-mail fortunat@unina.it

Ricevuto: 20.01.2020

Revisionato: 23.03.2020

Accettato: 08.04.2020

Pubblicato on-line: 08.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.038

More recently, two additional genes, the *APOE* and *STAP1* genes, encoding the apolipoprotein E and the signal-transducing adaptor family member 1, respectively, have been identified as being causative of autosomal dominant FH (5). Finally, several pathogenic variants in the low density lipoprotein receptor adaptor protein 1 (*LDLRAP1*) have been identified as causative of a recessive form of FH (ARH) (10). In a patient with clinical suspicion of FH but negative for pathogenic variants in the above genes, hypercholesterolemia could be due to the contemporary presence of multiple common variants in different genes; this form is known as polygenic hypercholesterolemia. Six single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are used to calculate the genetic risk score of polygenic hypercholesterolemia, known as the LDL-cholesterol (LDL-C) score (11).

sHTG, also known as familial chylomicronemia syndrome (FCS) is a very rare (~1:500.000/~1:1.000.000) inherited autosomal recessive disease characterized by TG levels higher than 10 mmol/L and recurrent pancreatitis (12); it is caused by the presence of biallelic (homozygous or compound heterozygous) pathogenic variants in *LPL* (lipoprotein lipase) and other genes encoding the proteins required for LPL activity, such as *APOC2* (apolipoprotein C2), *APOA5* (apolipoprotein A5), *GPIHBP1* (glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL binding protein 1), and *LMF1* (lipase maturation factor 1) (12,13). It has been reported that the phenotype of severe hypertriglyceridemia may be frequently caused either by the contemporary presence of heterozygosity for rare variants in causative FCS genes, or by the presence of rare or common functional variants in non-canonical triglyceride-raising genes or secondary factors. This latter condition is known as multifactorial chylomicronemia syndrome (MCS) (14). The aim of this study was to evaluate the possible use of a wide next-generation-sequencing (NGS) panel of 28 genes involved in lipid metabolism to improve the molecular diagnosis of dyslipidemias.

METHODS

Patients

25 patients have been analyzed: 21 with a clinical suspicion of FH and 4 of sHTG recruited at the Lipid Clinic of the University Hospital Federico II in Naples, that is the reference center for dyslipidemias of Campania Region.

Informed consent for the study was obtained from each patient. The study was performed according to the current version of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethical Committee of the University Hospital Federico II (Number 262/17, November 29, 2017).

FH adult patients were enrolled based on LDL-C levels above 4.9mmol/L and hypercholesterolemia or premature cardiovascular disease in first degree family members, while FH pediatric patients were enrolled as previously described (15).

sHTG patients have been enrolled according to the following criteria: TG serum levels >10 mmol/L, absence of secondary causes of hypertriglyceridemia, and at least one episode of pancreatitis.

Genetic screening

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using the ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA quantity was evaluated using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Twenty-one FH patients were genetically screened as previously described (15).

In 4 sHTG patients, genetic screening was performed by direct sequencing of the coding region and the exon-intron junctions of the *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1* and *LMF1* genes, while multiplex ligation-dependent probe amplification was performed to search for copy number variants (CNVs) in the *LPL* gene (16).

Identified variants were checked against pathogenic variants databases: the Leiden Open Variation Database (LOVD) and the Human Gene Mutation Database (HGMD). For variants not present in these databases or never reported in the literature as being causative of FH or sHTG, pathogenic evaluation was performed according to the American College of Medical Genetics and Genomics Guidelines (ACMG) (17). To verify the minor allele frequency (MAF), these variants were searched for in NGS databases: Exome Aggregation Consortium, Genome Aggregation Database, Exome Variant Server and 1000 genomes. Rare variants are defined as variants with a MAF lower than 1%. Variants are reported according to the Human Genome Variation Society nomenclature.

The results of the traditional screening performed in 25 patients used to validate this NGS panel are shown in Table 1.

Reanalysis with Next-Generation-Sequencing

We reanalyzed 25 patients, previously screened with traditional sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).

These patients were selected since they were carriers of different types of variants (missense variants, splicing variants, frameshift variants and CNVs) in different genes.

Patients without causative variants were also included in the present study in order to verify if they could carry a causative variant in other genes not previously analyzed with traditional sequencing and MLPA.

Table 1
Genotype of the 25 patients used for validation of the Next Generation Sequencing panel

Patients	Gene analyzed with direct sequencing	Gene analyzed with MLPA	Molecular diagnosis
sHTG1	<i>LPL, APOA5, APOC2, LMF1, GPIHBP1</i>	<i>LPL</i>	heterozygosity for 1 missense pathogenic variant in <i>LPL</i> gene (genetic data are not enough to make a molecular diagnosis)
sHTG2	<i>LPL, APOA5, APOC2, LMF1, GPIHBP1</i>	<i>LPL</i>	heterozygosity for 1 missense pathogenic variant in <i>LPL</i> gene (genetic data are not enough to make a molecular diagnosis)
sHTG3	<i>LPL, APOA5, APOC2, LMF1, GPIHBP1</i>	<i>LPL</i>	heterozygosity for 1 missense pathogenic variant in <i>APO5</i> gene (genetic data are not enough to make a molecular diagnosis)
sHTG4	<i>LPL, APOA5, APOC2, LMF1, GPIHBP1</i>	<i>LPL</i>	double heterozygosity for 1 missense likely pathogenic variant in <i>LPL</i> gene and 1 missense VUS in <i>APOA5</i> gene (genetic data are not enough to make a molecular diagnosis)
FH1	<i>LDLR, APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH2	<i>LDLR, APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH3	<i>LDLR, APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH4	<i>LDLR</i>	-	HeFH: heterozygosity for 1 null pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene
FH5	<i>LDLR</i>	<i>LDLR</i>	HoFH: compound heterozygosity for 1 CNV and 1 missense pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene
FH6	<i>LDLR</i>	<i>LDLR</i>	HeFH: heterozygosity for 1 CNV in <i>LDLR</i> gene
FH7	<i>LDLR, APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	double heterozygosity for 1 CNV in <i>LDLR</i> and 1 missense pathogenic variant in <i>PCSK9</i> gene
FH8	<i>LDLR</i>	-	HeFH: heterozygosity for 1 missense pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene
FH9	<i>LDLR, APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH10	<i>LDLR, APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH11	<i>LDLR, APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH12	<i>LDLR</i>	-	HeFH: heterozygosity for 1 missense pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene

Table 1
Continues

Patients	Gene analyzed with direct sequencing	Gene analyzed with MLPA	Molecular diagnosis
FH13	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH14	<i>LDLR</i>	-	HeFH: heterozygosity for 1 missense pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene
FH15	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH16	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH17	<i>LDLR</i>	-	HeFH: heterozygosity for 1 null pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene
FH18	<i>LDLR</i>	-	HeFH: heterozygosity for 1 null pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene
FH19	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found
FH20	<i>LDLR</i>	-	HeFH: heterozygosity for 1 missense pathogenic variant in <i>LDLR</i> gene
FH21	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> [exon 26 (c.9670_c.11916) and exon 29], <i>PCSK9</i>	<i>LDLR</i>	No rare variants found

sHTG, severe hypertriglyceridemia; *FH*, Familial Hypercholesterolemia; *MLPA*, Multiplex ligation-dependent probe amplification; *VUS*, variant of uncertain significance; *CNV*, copy number variants.

We designed a custom panel of genes involved in lipid metabolism and known in literature as being causative of or associated to different forms of dyslipidemia: *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1*, *LMF1*, *GPD1*, *CREBL3*, *APOC1*, *APOC3*, *APOC4*, *APOA1*, *APOA4*, *ANGPTL3*, *GCKR*, *LRP1*, *CYP27A1*, *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *APOE*, *STAP1*, *LIPA*, *ABCG5*, *ABCG8*, *MTTP*, *CH25H*, *HMGCR*. For each gene we included the coding regions, 50 bp in each of the intronic boundaries, the 5'UTR and the 3'UTR regions. The panel also included 6 SNPs (rs629301, rs1367117, rs4299376, rs6511720, rs429358 and rs7412) used to calculate the LDL-C genetic risk score as previously described (11).

gDNA was sheared and captured using the SureSelect QXT target enrichment system (Agilent, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions and 2 sequencing runs were performed with the micro v2 flow cell (300 cycles) on a MiSeq platform (Illumina Inc., SanDiego, CA, USA) with paired-end reads

(2x150 base pairs). In particular, two pools were prepared containing 13 libraries (12 samples and 1 reference sample) and 14 libraries (13 samples and 1 reference sample), respectively.

The obtained FASTQ files were aligned against the hg19 genome assembly (GenBank: GCA_000001405.1); variant alignment and calling was performed by Alyssa Align and Call (Alissa v5.2.6 - Agilent, Santa Clara, CA, USA) based on a quality score ≥ 30 , whereas variant filtering was performed by Alyssa Interpret software (Alissa v5.2.6 - Agilent, Santa Clara, CA, USA). The analysis of CNVs of the target region was performed by pair analysis with the SureCall software (Agilent, Santa Clara, CA, USA), comparing each DNA sample with a Human Reference DNA (Agilent, Santa Clara, CA, USA, cat.n. 5190-4371).

All additional rare variants identified with NGS analysis were confirmed by Sanger sequencing. The pathogenicity of rare variants identified was assessed according to the ACMG guidelines.

Statistical Analysis

The normality of variable distribution was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Parametric variables are reported as mean SD. Data were analyzed using the Predictive Analytics SoftWare 18.0 (SPSS Inc.).

RESULTS

This study included a total of 25 patients (21 FH and 4 sHTG). Their clinical and biochemical characteristics are shown in Table 2 and in Table 3, respectively. All SNVs and CNVs previously detected with Sanger sequencing and MLPA analysis were confirmed by NGS and the average read depth obtained was >200X in all samples; an average of 150 SNVs was found in each sample analyzed, most of these were common polymorphic variants with a MAF>1%. As for the analysis with traditional sequencing, 66 additional rare SNVs were detected with NGS analysis in 23 out of 25 reanalyzed patients, while no additional CNVs were

found. All the additional detected variants were present in genes or gene regions not previously analyzed. The complete list of additional rare SNVs and their pathogenicity classification is shown in Table 1S. In particular, we found 20 (30.3%) missense variants, 8 (12.1%) synonymous variants, 21 (31.8%) intronic variants, while the remaining 17 (25.8%) were found in the 5' UTR and 3'UTR regions (4 in 5'UTR and 13 in 3'UTR, respectively). Among these variants, 52 (78.8%) were classified as variants of uncertain significance (VUS), 13 (19.7%) as benign or likely benign, while only 1 (1.5%) was classified as likely pathogenic. This latter variant was a missense variant in the *APOB* gene c.10672C>T- p.(Arg3558Cys), found at heterozygous state in the sHTG3 patient.

NGS analysis allowed us to calculate the LDL-C score for diagnosing polygenic familial hypercholesterolemia in FH patients without causative variants; the resulting score was > 0.73 in 6 out of 11 FH patients without causative variants. The APOE genotype in the 4 sHTG patients was E2/E3 in 3/4 (75%) patients, while it was E3/E3 in the remaining ones.

Table 2

Demographic, anamnestic and biochemical features of the Familial Hypercholesterolemia (FH) reanalyzed patients divided by age.

Parameter	FH pediatric patients n=5	FH adult patients n=16
Age (year range)	1-11	24-67
Gender (n males and %)	4 (80.0%)	7 (43.8 %)
Total cholesterol (mmol/L)	8.4 (2.6)	10.8 (3.2)
LDL-cholesterol (mmol/L)	5.4 (3.7)	7.6 (2.1)
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.5 (0.1)	2.0 (0.7)
LDL/HDL ratio	4.6 (2.2)	4.4 (2.0)
Xanthomas n (%)	0 (0%)	2 (12.5%)
Premature CAD n (%)	0 (0%)	1 (6.3%)
Premature CAD in first degree relatives,n (%)	0 (0%)	2 (12.5%)
Hypercholesterolemia in first-degree relatives, n (%)	2 (40.0%)	4 (25.0%)

Values are reported as mean (SD)

CAD: coronary artery disease

Table 3

Demographic, anamnestic and biochemical features of the Severe Hypertriglyceridemia (sHTG) reanalyzed patients

Parameter	sHTG patient 1	sHTG patient 2	sHTG patient 3	sHTG patient 4
Age (years)	33	25	39	46
Gender	female	female	male	female
Tryglicerides (mmol/L)	16.4	33.9	16.2	28.0
Total cholesterol (mmol/L)	10.5	-	5.6	10.9
HDL-cholesterol (mmol/L)	0.5	-	0.3	0.6
Pancreatitis	yes	yes	yes	yes
Abdominal pains	yes	yes	yes	yes
Diabetes secondary to pancreatitis	yes	no	no	yes

The analysis of the 25 patients enrolled in this study using traditional approach (Sanger sequencing and MLPA analysis) required about 2 months, while the analysis by NGS required about 15 days.

DISCUSSION

In this study, we assess the great advantage of a wide custom NGS panel to enhance the molecular diagnosis of different forms of dyslipidemias. The genes included in our custom panel are genes known as being causative of FH, sHTG and other dyslipidemias such as Sitosterolemia, Cerebrotendinous Xanthomatosis, Hypobetalipoproteinemia and Lysosomal Acid Lipase Deficiency. Six SNPs used to obtain the LDL-C score and determine the risk of Polygenic hypercholesterolemia were also added.

This evaluation was carried out performing the reanalysis of 25 patients (21 FH and 4 sHTG), previously analyzed using Sanger sequencing for the detection of causative SNVs, and MLPA for the detection of CNVs.

All variants previously detected were confirmed and 66 additional rare SNVs were found in genes or regions not previously analyzed. The pathogenicity of these rare variants was evaluated according to the ACMG guidelines and 1 variant out of 66 was classified as likely pathogenic, while 65 were classified as VUS and benign/likely benign (52 and 13 respectively).

The only variant classified as likely pathogenic was the c.10672C>T- p.(Arg3558Cys) variant in the *APOB* gene, found at heterozygous state in sHTG3 patient. The presence of a likely pathogenic variant in the *APOB* gene, together with the pathogenic variant in the *APOA5* gene previously detected (18), could better define the genetic diagnosis of the patient. Actually, an accumulation of variants in lipid-related genes is considered to be the genetic basis of MCS (19). The *APOB* variant was described in the HGMD database as associated to Familial ligand-defective apolipoprotein B with incomplete penetrance (20,21), a phenomenon often observed for other *APOB* variants (22,23).

After performing NGS reanalysis, we inferred that all sHTG patients could be classified as MCS patients, since the presence of a rare causative variant, at heterozygous state, together with common variants in the *APOA5* gene associated to hypertriglyceridemia, and with presence of the E2 allele in the *APOE* gene, could contribute to the hypertriglyceridemic phenotype.

As for VUS, a functional study should be carried out to evaluate their potential impact on protein structure and function. Several studies have reported about the relevance of functional characterization of potentially causative rare variants, especially for assessing FH causative variants (24-28).

In FH patients without causative variants, 6 SNPs were used to calculate the LDL-C score, which was previously suggested linked to the presence of polygenic hypercholesterolemia (11). Eleven out of 21 FH reanalyzed patients in our study were negative for

causative variants of FH. Since 6 patients (54.5%) presented a LDL-C score >0.73, the hypercholesterolemic phenotype in these patients could be of polygenic origin. In the remaining 5 FH patients negative for causative variants and for the LDL-C score, the hypercholesterolemic phenotype may be due to causative variants in other genes not yet known as being associated to FH.

From the reported results, it may be concluded that:

- this genetic screening with NGS has proved to be a useful and reliable methodology to simultaneously analyze a panel of genes involved in lipid metabolism in a great number of patients, since FH and sHTG are extremely heterogeneous from a genetic point of view (29-31);
- this methodology allows us to genotype numerous interesting SNPs in a single reaction, thus saving time and costs compared to standard methodologies such as Sanger sequencing or real time Taqman (32-35);
- the used NGS panel also allows for the detection of causative variants in rare and severe dyslipidemias such as Cerebrotendinous Xanthomatosis and Lysosomal acid lipase deficiency, for which prenatal diagnosis could also be envisaged, in order to prevent clinical complications (36,37);
- NGS could enhance genetic diagnosis and, as a result, improve the clinical management of the affected patients. Furthermore, patients could be entered in nationwide registers used for identification of treatment gaps and for integration of clinical and genetic data (38-40).

This genetic workflow analysis could be used for the diagnosis of different types of dyslipidemias, leading to a better understanding and detection of complex phenotypes.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Kopin L, Lowenstein C. Dyslipidemia. *Ann Intern Med* 2017;167:ITC81-ITC96.
2. Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta* 2016;454:143-85.
3. Berberich AJ, Hegele RA. The role of genetic testing in dyslipidaemia. *Pathology* 2019;51:184-92.
4. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, et al. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *Int J Mol Sci* 2018;19.
5. Di Taranto MD, Giacobbe C, Fortunato G. Familial hypercholesterolemia: A complex genetic disease with variable phenotypes. *Eur J Med Genet* 2019;103831.
6. Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, et al. Familial Hypercholesterolemia in the Danish General Population: Prevalence, Coronary Artery Disease, and Cholesterol-Lowering Medication (vol 97, pg 3956). *J of Clin Endocrinol Metab* 2014;99:4758-9.

7. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2014;35:2146-57.
8. Sjouke B, Hovingh GK, Kastelein JJP, et al. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia: prevalence, diagnosis, and current and future treatment perspectives. *Curr Opin Lipidol* 2015;26:200-9.
9. Di Taranto MD, Giacobbe C, Buonaiuto A, et al. A Real-World Experience of Clinical, Biochemical and Genetic Assessment of Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Med* 2020;9.
10. Fellin R, Arca M, Zuliani G, et al. The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene* 2015;555:23-32.
11. Futema M, Shah S, Cooper JA, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem* 2015;61:231-8.
12. Chyzhyk V, Brown AS. Familial chylomicronemia syndrome: A rare but devastating autosomal recessive disorder characterized by refractory hypertriglyceridemia and recurrent pancreatitis. *Trends Cardiovasc Med* 2020;30:80-5.
13. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med* 2012;272:185-96.
14. D'Erasmo L, Di Costanzo A, Cassandra F, et al. Spectrum of mutations and long-term clinical outcomes in genetic chylomicronemia syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:2531-41.
15. Di Taranto MD, de Falco R, Guardamagna O, et al. Lipid profile and genetic status in a familial hypercholesterolemia pediatric population: exploring the LDL/HDL ratio. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:1102-10.
16. Peterfy M, Bedoya C, Giacobbe C, et al. Characterization of two novel pathogenic variants at compound heterozygous status in lipase maturation factor 1 gene causing severe hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol* 2018;12:1253-9.
17. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.
18. Evans D, Aberle J, Beil FU. Resequencing the apolipoprotein A5 (APOA5) gene in patients with various forms of hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2011;219:715-20.
19. Moulin P, Dufour R, Averna M, et al. Identification and diagnosis of patients with familial chylomicronaemia syndrome (FCS): Expert panel recommendations and proposal of an "FCS score". *Atherosclerosis* 2018;275:265-72.
20. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, et al. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* 1995;95:1225-34.
21. Olfson E, Cottrell CE, Davidson NO, et al. Identification of Medically Actionable Secondary Findings in the 1000 Genomes. *PLoS One* 2015;10:e0135193.
22. Garcia-Garcia AB, Ivorra C, Martinez-Hervas S, et al. Reduced penetrance of autosomal dominant hypercholesterolemia in a high percentage of families: importance of genetic testing in the entire family. *Atherosclerosis* 2011;218:423-30.
23. Ruotolo A, Di Taranto MD, D'Agostino MN, et al. The novel variant p.Ser465Leu in the PCSK9 gene does not account for the decreased LDLR activity in members of a FH family. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:e175-8.
24. Di Taranto MD, Benito-Vicente A, Giacobbe C, et al. Identification and in vitro characterization of two new PCSK9 Gain of Function variants found in patients with Familial Hypercholesterolemia. *Sci Rep* 2017;7:15282.
25. Di Taranto MD, D'Agostino MN, Fortunato G. Functional characterization of mutant genes associated with autosomal dominant familial hypercholesterolemia: integration and evolution of genetic diagnosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015;25:979-87.
26. Romano M, Di Taranto MD, D'Agostino MN, et al. Identification and functional characterization of LDLR mutations in familial hypercholesterolemia patients from Southern Italy. *Atherosclerosis* 2010;210:493-6.
27. Romano M, Di Taranto MD, Mirabelli P, et al. An improved method on stimulated T-lymphocytes to functionally characterize novel and known LDLR mutations. *J Lipid Res* 2011;52:2095-100.
28. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, et al. Validation of LDLr Activity as a tool to improve genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia: a retrospective on functional characterization of LDLr variants. *Int J Mol Sci* 2018;19.
29. Rubba P, Gentile M, Marotta G, et al. Causative mutations and premature cardiovascular disease in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Prev Cardiol* 2017;24:1051-9.
30. Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, et al. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atheroscler Suppl* 2017;29:17-24.
31. Bertolini S, Pisciotto L, Rabacchi C, et al. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis* 2013;227:342-8.
32. Di Taranto MD, Staiano A, D'Agostino MN, et al. Association of USF1 and APOA5 polymorphisms with familial combined hyperlipidemia in an Italian population. *Mol Cell Probes* 2015;29:19-24.
33. Calcagno G, Staiano A, Fortunato G, et al. A multilayer perceptron neural network-based approach for the identification of responsiveness to interferon therapy in multiple sclerosis patients. *Inform Sciences* 2010;180:4153-63.
34. Staiano A, Di Taranto MD, Bloise E, et al. Investigation of Single Nucleotide Polymorphisms Associated to Familial Combined Hyperlipidemia with Random Forests. *Smart Innovation, Systems and Technologies* 2013;19:169-78.
35. Labruna G, Pasanisi F, Fortunato G, et al. Sequence Analysis of the UCP1 Gene in a Severe Obese Population from Southern Italy. *J Obes* 2011;2011:269043.
36. Di Taranto MD, Gelzo M, Giacobbe C, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis, a metabolic disease with different neurological signs: two case reports. *Metab Brain Dis* 2016;31:1185-8.
37. Maruotti GM, Frisso G, Calcagno G, et al. Prenatal diagnosis of inherited diseases: 20 years' experience of an Italian Regional Reference Centre. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:2211-7.
38. Perez de Isla L, Alonso R, Mata N, et al. Predicting Cardiovascular Events in Familial Hypercholesterolemia: The SAFEHEART Registry (Spanish Familial Hypercholesterolemia Cohort Study). *Circulation* 2017;135:2133-44.

39. Averna M, Cefalu AB, Casula M, et al. Familial hypercholesterolemia: The Italian Atherosclerosis Society Network (LIPIGEN). *Atheroscler Suppl* 2017;29:11-6.
40. Amrock SM, Duell PB, Knickelbine T, et al. Health disparities among adult patients with a phenotypic diagnosis of familial hypercholesterolemia in the CASCADE-FH patient registry. *Atherosclerosis* 2017;267:19-26.

Il futuro della Medicina di Laboratorio: un Manifesto per i suoi professionisti

Mario Plebani

Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

ABSTRACT

Future of laboratory medicine: a Manifesto for laboratory professionals.

In the last decades, the landscape of clinical laboratories has experienced monumental changes due to both technological developments and new challenges. Laboratory medicine has been strongly influenced by technological developments, but also by a wide range of other issues such as the healthcare system organization, medical practice and, more recently, patient empowerment. In the coming decade, many and different trends will intersect, interact, and overlap each other, and with current laboratory practices. These dramatic innovations make of critical importance for leaders to prepare for a future with the understanding of possible collisions between linear trends and nonlinear external forces. The aim of the present paper is to discuss the future of clinical laboratories according to two different approaches: technological and professional viewpoints. In particular, a revised version of the “ten points manifesto” for the future of laboratory professionals is described, with a focus on the main drivers and efforts that should be done to demonstrate the added value and true role of laboratory medicine in modern health care systems. The main goal of the manifesto is to emphasize the central role and the vital contribution of clinical laboratories and their professionals to improved health care, patient safety and clinical outcomes.

INTRODUZIONE

Nelle ultime decadi, la medicina di laboratorio ha vissuto cambiamenti sostanziali e lo scenario nel quale opera è in continua evoluzione. Oggigiorno, i laboratori clinici sono parte integrale di tutti i sistemi sanitari poiché gli esami di laboratorio svolgono un ruolo sempre maggiore nella medicina moderna, fornendo informazioni fondamentali per l'identificazione del rischio, il mantenimento della salute e la prevenzione, la diagnosi precoce delle malattie, la guida delle terapie in modo mirato e personalizzato, e facilitando il monitoraggio e l'ottenimento di esiti clinici favorevoli (1). Lo sviluppo ed il progressivo utilizzo di tecniche innovative per la diagnostica molecolare, per l'adozione di terapie mirate capaci di declinare il concetto di medicina di precisione, ed ancora la progressiva implementazione di programmi di screening per l'identificazione di numerose malattie, hanno contribuito a rendere la medicina di laboratorio una parte sempre più importante della moderna medicina e del sistema sanitario. La diagnosi di numerose malattie infettive e la valutazione della resistenza agli antibiotici si basano su indagini *in vitro* (2), e l'innovazione tecnologica ha

ampliato gli scopi, la qualità e la complessità dei laboratori clinici determinando sicuri benefici sia per il processo decisionale clinico che per la salute dei pazienti e dell'intera comunità. Le analisi di laboratorio non sono effettuate solamente nei tradizionali laboratori clinici, ma sempre più in ambiti decentrati come avviene per analisi al letto del malato (near-patient testing), a domicilio (home testing), nelle farmacie, nelle ambulanze ed in contesti di urgenza-emergenza (3,4) grazie allo sviluppo di tecnologie efficienti per il point-of-care testing (POCT) che permettono la rapida diagnosi di molte condizioni cliniche, incluse malattie infettive e genetiche (5). Tuttavia, l'integrazione degli esami di laboratorio nei percorsi diagnostico-terapeutici rappresenta ancora una sfida aperta dato che l'evidenza di richieste inappropriate, l'interpretazione scorretta dei risultati e la visione degli esami come puri “numeri” compromette l'efficacia della disciplina nel migliorare il trattamento del paziente e gli esiti clinici (6). Alla fine degli anni '60, precorrendo la visione manageriale e la ricerca del profitto che successivamente si è estesa a tutto il mondo della medicina, il mondo del laboratorio clinico ha subito l'aggressione da parte di corporazioni “for-profit” e di

Corrispondenza a: Mario Plebani, Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Università di Padova
Via Giustiniani,2 - 35128 Padova, Tel 0498212792, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 03.03.2020

Revisionato: 04.03.2020

Accettato: 13.03.2020

Pubblicato on-line: 18.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.030

strategie aggressive per erogare sempre maggiori volumi e tipologie di esami. Si è così andata creando una crescente separazione fra laboratorio e clinica, e si sono sviluppati modelli organizzativi di consolidamento della fase analitica in “fabbriche” e megastrutture che hanno come obiettivi la diminuzione del costo per esame e l’aumento dell’efficienza grazie ad economie di scala: si è così creata la visione del laboratorio clinico come mera “commodity”, ossia un bene la cui unica caratteristica differenziale non è la qualità e l’impatto sulla gestione della salute, ma il costo (7). Nonostante l’attuale incredibile sviluppo di tecnologie innovative, comprese le scienze “omiche” e nuovi biomarcatori, predire il futuro dei laboratori clinici e dei loro professionisti rimane un’impresa difficile.

Questo contributo ricapitola e commenta i contenuti di due articoli recentemente pubblicati sull’argomento, presentando una versione rivisitata dei 10 punti del manifesto (8,9) con l’intento di coinvolgere più da vicino la comunità dei professionisti Italiani in questa riflessione e nella previsione del futuro della nostra disciplina.

QUESTIONI FONDAMENTALI SUL FUTURO DELLA MEDICINA DI LABORATORIO

Alcuni lavori recentemente pubblicati, hanno aperto un dibattito sul futuro dei laboratori prendendo in considerazione due diversi aspetti: tecnologico e professionale. Secondo il punto di vista tecnologico, i prerequisiti per il futuro SMART (Speed, Metrics, Automation, Remote Technologies) sono l’automazione, l’uso di droni per il trasporto dei campioni, l’integrazione di big-data e la gestione dei dati in tempo reale, nuove interfacce uomo-macchina, l’uso sempre più esteso di robots e stampanti 3D, la connettività di dispositivi (Internet of Things, IoT) e sensori (10). Questa predizione si basa sulle evidenze relative agli orientamenti di consolidamento dei laboratori, all’evoluzione verso reti integrate di cura, all’aumento del consumismo e di esami di laboratorio richiesti direttamente dai pazienti (direct-to-consumer testing, DTC).

Le maggiori perplessità su questo scenario futuribile derivano da una visione parziale e riduttiva del concetto di “brain-to-brain loop” per la quale il ruolo dei laboratori clinici dovrebbe concentrarsi quasi esclusivamente nella parte centrale del processo (fase intra-analitica) e quindi nelle decisioni che devono essere assunte in questa fase ed in quella post-analitica, con scarsa capacità di influire sulle fasi pre-pre e post-post analitiche. Secondo questa visione, con l’avvento dei DCT e dell’effettuazione dei prelievi a domicilio, l’esecuzione e l’interpretazione degli esami di laboratorio saranno sempre più frequentemente effettuati al di fuori dell’ambito specifico della medicina di laboratorio (10). Se questa fosse la reale aspettativa per il futuro, è evidente che la medicina di laboratorio non sarà più una disciplina accademica e professionale,

e gli esami di laboratorio saranno richiesti, eseguiti ed interpretati direttamente dal paziente e/o dai clinici. La visione del “brain-to-brain loop” quale discende dalla lettura del lavoro di Greaves et al. (10), infatti, mette in risalto la modesta capacità dei professionisti di laboratorio di intervenire e influire su componenti fondamentali del ciclo quali l’appropriatezza nella richiesta e nell’interpretazione/utilizzo dei risultati. Questa visione, quindi, riflette ed in qualche modo supporta l’opinione di chi sottostima il valore della medicina di laboratorio ed il suo ruolo nella moderna medicina.

Relativamente alla fase pre-pre analitica, Greaves et al. evidenziano l’attuale enfasi sugli esami richiesti direttamente dai pazienti (DCT) soprattutto nel caso di test genetici e sulla generale tendenza verso un “consumismo” per gli esami di laboratorio (10). Tuttavia, mentre il tradizionale modello clinico-centrico della richiesta degli esami e dell’interpretazione dei risultati si sta trasformando per “liberalizzare” la richiesta di esami senza l’intervento del clinico, deve essere posta crescente attenzione ai potenziali rischi che questo modello può comportare sulla sicurezza dei pazienti. L’uso eccessivo degli esami di laboratorio, infatti, può tradursi in trattamenti eccessivi (diagnosi e terapie eccessive) con conseguenti potenziali rischi per il paziente. Un modello recentemente introdotto, il cosiddetto “modello ibrido di analisi laboratorio” (11) vuole salvaguardare la centralità sia del paziente che del clinico, perchè facilita l’accesso ad esami per il paziente, ma è il clinico (che può essere il medico di famiglia del paziente, un medico messo a disposizione dal laboratorio o un professionista di laboratorio) che richiede l’esame e invia i risultati agli utilizzatori (sia al paziente che al medico). I potenziali benefici che derivano dal modello ibrido sono la maggiore accessibilità agli esami di laboratorio da parte dei pazienti, soprattutto quando l’esame non è rimborsato dalle assicurazioni e/o il paziente non ha un proprio medico o non intende autorizzare il medico alla richiesta dello specifico esame (ad esempio, test di gravidanza, HIV o un test genetico). Nel contempo, si evitano i rischi correlati all’auto-interpretazione dei risultati, si preclude la sottostima della qualità dei servizi di laboratorio e non si compromette la continuità delle cure. In accordo a questo modello innovativo, al laboratorio clinico viene richiesta una efficace collaborazione sia nel migliorare l’appropriatezza della richiesta che nell’interpretazione dei risultati (12-14) coinvolgendo quindi direttamente i professionisti di laboratorio nella gestione e cura dei pazienti. Questa strategia dovrebbe a sua volta produrre strumenti efficaci per confutare le attuali critiche relative al problema dell’inappropriatezza nella richiesta di esami ed utilizzo delle risposte, favorendo una cultura di utilizzo razionale delle informazioni di laboratorio.

IL PUNTO DI VISTA DEL PROFESSIONISTA

Il punto di vista del professionista mette in evidenza la necessità di una migliore integrazione degli esami di laboratorio nei percorsi di diagnosi e cura, che è l'unica strategia possibile per garantire che la medicina di laboratorio e i professionisti abbiano la giusta valorizzazione e visibilità, e che siano garantiti la qualità e la sicurezza del paziente. Questa visione si basa su una rivalutazione dei principi fondamentali del "brain-to-brain loop" (15) e sul riconoscimento fondamentale della necessità di assicurare stretta ed efficace interconnessione e inter-relazione tra le differenti fasi del ciclo che descrive l'attività di richiesta ed interpretazione degli esami di laboratorio promuovendo quindi un efficace coinvolgimento del laboratorio clinico (16). Gli autori del manifesto, che descrivono dieci punti a cui dovrebbero aderire i professionisti di laboratorio ora ed in futuro, focalizzano l'importanza dei professionisti del laboratorio clinico in un contesto di collaborazione efficace con i clinici per raggiungere gli obiettivi ottimali nel mantenimento della salute e della qualità delle cure (8,9). Il tema centrale del manifesto è la cooperazione e l'ottimizzazione del flusso operativo, il brain-to-brain-loop descritto per la prima volta da Lundberg nel 1981, che deve essere adottato dai clinici così come dagli esperti della medicina di laboratorio (17). L'elenco di dieci punti è riportato nella Tabella 1 (8,9).

Tabella 1

Professionisti di laboratorio: cosa dovrebbe essere fatto ora ed in futuro (14,15)

1. Trasformare i risultati in informazioni cliniche
2. Collaborare alla riduzione degli errori diagnostici
3. Sviluppare un' affidabile consulenza della medicina di laboratorio
4. Consolidare in un unico referto i risultati di tutte le sub-discipline del laboratorio e della diagnostica per immagini
5. Definire affidabili intervalli di riferimento e livelli decisionali
6. Collaborare per lo svolgimento di più efficienti lavori di squadra ed essere attivamente coinvolti in gruppi multidisciplinari
7. Promuovere la trasformazione da modelli di rimborso basati sui volumi a quelli basati sul valore clinico
8. Migliorare ed aggiornare le modalità di insegnamento della medicina di laboratorio
9. Non trascurare lo sviluppo di competenze amministrative e di altre attività
10. Promuovere il valore della professione

IL NUOVO MANIFESTO

Come sottolineato da Miller e Plebani in una Lettera all'Editore che commenta i dieci punti del Manifesto, l'armonizzazione e la standardizzazione dei processi di laboratorio sono essenziali per ottenere servizi di laboratorio di elevata qualità e dovrebbero quindi essere un pre-requisito per ogni ulteriore strategia adottata per promuovere il valore della medicina di laboratorio (18). Il nuovo manifesto contiene perciò una rivisitazione dei 10 punti (Tabella 2), che sono illustrati qui di seguito.

Tabella 2

I 10 punti del nuovo manifesto

1. Promuovere l'accuratezza e la confrontabilità delle informazioni di laboratorio attraverso programmi di armonizzazione e standardizzazione
2. Trasformare i risultati in informazioni
3. Sviluppare un'affidabile attività di consulenza
4. Facilitare un più efficiente lavoro di squadra e promuovere un attivo coinvolgimento nei gruppi multidisciplinari
5. Collaborare alla riduzione degli errori diagnostici
6. Consolidare in un unico referto i risultati di tutte le sub-discipline del laboratorio e della diagnostica per immagini
7. Promuovere lo sviluppo di nuovi modelli di rimborso basati sul valore delle informazioni di laboratorio
8. Promuovere l'innovazione nell'insegnamento della medicina di laboratorio
9. Sviluppare e valorizzare tutte le attività professionali
10. Promuovere lo sviluppo e la visibilità della professione (medicina di laboratorio)

1. Promuovere l'accuratezza e la confrontabilità delle informazioni di laboratorio attraverso programmi di armonizzazione e standardizzazione

La chiave fondamentale per evitare equivoci ed interpretazioni errate dei risultati degli esami di laboratorio, oltre al miglioramento della qualità analitica, è l'armonizzazione delle componenti preanalitiche quali la preparazione del paziente, la richiesta dell'esame ed il prelievo del campione come pure le componenti post-analitiche quali le unità di misura, gli intervalli di riferimento ed i commenti interpretativi che accompagnano i risultati. L'armonizzazione dei risultati è di per sé una criticità molto importante per la realizzazione di numerosi punti del manifesto (19-21). Quindi la prima e più importante attività dei professionisti di laboratorio dovrebbe promuovere la confrontabilità delle informazioni prodotte dallo stesso laboratorio nel tempo (risultati seriali) e quelle tra differenti laboratori. L'accuratezza e l'intercambiabilità (confrontabilità) delle informazioni di laboratorio sono il

prerequisito fondamentale per assicurare l'attendibilità della cartella clinica elettronica, la possibilità di adottare sistemi esperti, sistemi di apprendimento automatico ("machine learning") ed intelligenza artificiale per migliorare la richiesta degli esami e l'interpretazione dei risultati. L'armonizzazione dell'informazione di laboratorio diventa pertanto il primo punto del nuovo manifesto perché condiziona tutti i successivi.

2. Trasformare i risultati in informazioni cliniche

Il secondo punto mette in evidenza la necessità di considerare gli esami di laboratorio parte dei percorsi diagnostici e terapeutici, sottolineando come solamente una appropriata richiesta ed interpretazione in associazione all'accuratezza analitica, possano garantire benefici per il paziente ed esiti valorizzabili sotto il profilo clinico ed economico. Nella fase post-analitica, dovrebbero essere intrapresi ulteriori sforzi per garantire corrette unità di misura, adeguati intervalli di riferimento/livelli decisionali e corretti commenti interpretativi (19). Solamente in questo modo i risultati analitici potranno diventare informazioni di laboratorio da usare nei percorsi diagnostico-terapeutici (6,22).

3. Sviluppare una affidabile attività di consulenza

Il terzo punto, è strettamente connesso ai punti precedenti poiché l'obiettivo è assicurare valide informazioni di laboratorio per la diagnosi ed il trattamento del paziente. L'attività di consulenza - che trova miglior definizione nel termine anglosassone di *stewardship* - può essere riassunta nella capacità di fornire indicazioni basate sulle evidenze e supporti decisionali ai medici e professionisti della salute che richiedono ed interpretano i risultati di laboratorio (23,24). Le evidenze correnti sottolineano l'inaccettabile alto tasso di errori diagnostici causati da errori nella richiesta dell'esame e nell'interpretazione dei risultati come pure la scarsa confidenza dei clinici nell'interpretazione di esami di laboratorio complessi (quali esami di coagulazione, di autoimmunità, di allergologia) (25). Il contributo dei professionisti di laboratorio può quindi migliorare la comprensione dei test di laboratorio anche nelle aree diagnostiche più complesse, come riportato in Tabella 3.

Tabella 3

Consulenza di laboratorio: principali aree di intervento

1. Richiesta di esami (esami richiesti in maniera inappropriata)
2. Interpretazione dei risultati (errata interpretazione di risultati)
3. Utilizzo dei dati di laboratorio (inadeguata capacità di comprendere il reale valore dell'informazione e mancate azioni sulla base dei risultati)
4. Efficienza/efficacia dei servizi di laboratorio (evitare i costi non necessari)

4. Facilitare un più efficiente lavoro di squadra e promuovere un attivo coinvolgimento nei gruppi multidisciplinari

Il quarto punto riguarda la promozione della attività della medicina di laboratorio nei gruppi multidisciplinari. Evidenze sempre più numerose dimostrano che la cura del paziente necessita della gestione da parte di gruppi multidisciplinari per consentire una visione olistica del paziente e della sua condizione di salute (26). L'organizzazione dei laboratori clinici si è andata sempre più orientando verso modelli di consolidamento, talora con creazione di strutture enormi ed altamente automatizzate, frequentemente separate dagli ospedali e dai pazienti. La struttura organizzativa di questi nuovi servizi di laboratorio è sempre più simile ad un "silo" del tutto analogabile a strutture industriali e con scarsa attenzione ai percorsi clinici ed ai reali bisogni dei pazienti (27). I servizi di laboratorio dovrebbero da subito essere riorganizzati secondo una visione centrata sul paziente, dove la sostenibilità economica e la ricerca di esiti clinici devono integrarsi. I professionisti di laboratorio dovrebbero essere maggiormente coinvolti in gruppi multidisciplinari all'interno dei quali possano fornire le competenze e l'esperienza necessaria allo sviluppo di percorsi di cura più efficienti ed efficaci (22). Porter et al. hanno da tempo sostenuto la necessità di una progressiva transizione dal modello "silo" a sistemi di medicina clinica più integrati e centrati sul paziente (ad esempio con una maggiore attenzione ai percorsi dei pazienti) sottolineando la necessità di aggiungere valore nella cura del paziente, dove il termine valore va definito come "esito di salute per dollaro speso" (28). In modo coerente con questo approccio innovativo, il valore di un esame di laboratorio dovrebbe essere valutato non solo sulla base delle sue caratteristiche di prestazioni analitiche e diagnostiche ma dal suo reale impatto sulla gestione del paziente, poiché la reale valutazione della qualità dell'esame avviene valutando se e come modifica gli esiti clinici (29). Per attuare questo cambiamento, è necessario che i professionisti di laboratorio ricevano un'appropriata formazione ed educazione che consenta loro di partecipare all'attività di gruppi multidisciplinari, come previsto nell'obiettivo numero 1 del documento emanato da parte del National Academies of Sciences, Engineering and Medicine (26).

5. Collaborare alla riduzione degli errori diagnostici

Il quinto punto è strettamente legato al precedente. Dati statistici affidabili, infatti, dimostrano che gli errori diagnostici sono spesso causati dalla mancanza di guida e consulenza per il clinico da parte del personale di laboratorio nella richiesta "*dell'esame giusto al momento giusto, con le modalità di prelievo giuste*" come pure "*nella corretta interpretazione dei dati di laboratorio al momento giusto*". Il miglioramento della qualità delle cure può quindi essere attuato da un

efficiente lavoro di squadra tra clinici e professionisti di laboratorio (26). In quanto membri di “gruppi diagnostici multidisciplinari” (DMTS Diagnostic Management Teams), i laboratoristi dovrebbero partecipare a tutte le fasi del processo di richiesta ed interpretazione degli esami di laboratorio. I gruppi multidisciplinari, infatti, sono costituiti da laboratoristi e clinici con lo scopo di assicurare una appropriata richiesta ed un idoneo utilizzo degli esami di laboratorio, a garanzia che il clinico “richieda l'esame giusto al momento giusto al giusto paziente nelle modalità giuste”.

6. Consolidare in un unico referto i risultati di tutte le sub-discipline del laboratorio e della diagnostica per immagini

L'integrazione dei dati ottenuti da differenti sub-discipline (quali biochimica clinica, ematologia, coagulazione, diagnostica molecolare, microbiologia) rappresenta un passaggio fondamentale per migliorare la qualità delle informazioni di laboratorio fornendo un unico, coordinato e chiaro referto, che sia idoneo a migliorare le decisioni cliniche e la gestione del paziente. Recentemente, la necessità di un approccio integrato nella gestione degli esami diagnostici ha portato alla proposta dei cosiddetti “servizi di patologia e medicina di laboratorio (PALM)” (2). L'organizzazione e la struttura integrata di tali servizi tengono in considerazione il complesso gruppo di sub-discipline mediche che coprono tutti i test diagnostici necessari a supportare l'attuale e moderna cura della salute. Inoltre, poiché i professionisti di laboratorio ed i radiologi condividono una storia simile ed un destino comune, è stato ipotizzato che le loro specialità vengano unite per creare una singola entità denominata “informazione specialistica”, la cui responsabilità non è limitata ad estrarre informazioni cliniche dai dati di laboratorio e da quelli strumentali, ma anche a gestire le informazioni ottenute utilizzando l'intelligenza artificiale nel contesto clinico del paziente (30). L'uso di approcci diagnostici integrati che combinino analisi d'immagine, test di diagnostica molecolare, insieme all'uso crescente dell'intelligenza artificiale e di altre tecnologie, è già considerato un preciso obiettivo della medicina di laboratorio (31). Nel passato, la medicina di laboratorio ha prodotto numerosissime informazioni e dati su varie condizioni di salute senza peraltro attuare chiare strategie per valorizzare questi dati. L'attuale sviluppo di tecniche di intelligenza artificiale può colmare questa lacuna e dare supporto alla medicina di precisione. E' ormai tempo di sviluppare una robusta infrastruttura informatica e digitale che sia capace di sviluppare, nell'ambito clinico e nei percorsi decisionali, algoritmi basati su regole e sull' apprendimento automatico.

7. Promuovere lo sviluppo di nuovi modelli di rimborso basati sul valore delle informazioni di laboratorio

I meccanismi di finanziamento e di rimborso delle prestazioni della medicina di laboratorio hanno rappresentato e tuttora rappresentano un elemento cruciale per governi ed amministratori. In passato, veniva effettuata come unica valutazione economica il semplice conteggio del costo per esame e molti laboratori disponevano di una stima ragionevole di tale dato, ma pochi laboratori dispongono tuttora dei costi generali derivanti dalla gestione clinica attraverso la valutazione del costo per paziente e della sua relazione con gli esiti clinici. I soli dati del costo per esame non possono essere considerati un reale indicatore poiché invece di identificare un esito, dimostrano solo i costi derivanti dalla produzione di un risultato. Per ottenere una miglior conoscenza del valore reale di un servizio di laboratorio dovrebbe essere effettuata una valutazione economica più complessa e completa che includa i costi-beneficio, i costi-efficacia e i reali vantaggi clinici dal momento che lo scopo ultimo degli esami di laboratorio è promuovere una azione sul paziente e la conseguente analisi degli esiti (22). Questa evidenza dovrebbe ulteriormente incoraggiare l'evoluzione dei servizi di medicina di laboratorio verso modelli basati sul valore piuttosto che sui meri costi di produzione (19). In generale, i sistemi sanitari stanno evolvendo da un modello costruito sul rimborso in base ai volumi del servizio ad un modello di pagamento cumulativo orientato al rimborso comprensivo di tutte le variabili di costo che entrano a far parte dei percorsi diagnostici e terapeutici. Per pazienti in regime di ricovero, questo è avvenuto da tempo con l'introduzione del sistema “diagnosis related group” (DRG) (32). Anche per i pazienti ambulatoriali lo scenario sta evolvendo da un modello basato sui volumi e sul costo per esame in un sistema sempre più focalizzato sull'efficacia e sul valore dell'informazione di laboratorio. Questo cambiamento, a sua volta, dovrebbe rivoluzionare l'organizzazione dei servizi di laboratorio andando a valorizzare il valore dell'informazione di laboratorio nei percorsi clinici e l'impatto sugli esiti per il paziente piuttosto che i volumi ed i costi per esame (22).

8. Promuovere l'innovazione nell'insegnamento della medicina di laboratorio

Lo scenario in evoluzione della sanità e della medicina di laboratorio, associati al notevole miglioramento delle conoscenze delle basi molecolari e della fisiopatologia delle condizioni morbose, oltre che allo sviluppo di tecniche innovative e sempre più sofisticate, deve portare ad una sostanziale innovazione nell'insegnamento della medicina di laboratorio sia nel percorso di laurea in medicina, biologia e lauree affini (33) che delle specialità e dei corsi di laurea professionalizzanti per tecnici di laboratorio (34). I futuri professionisti di laboratorio devono sviluppare nuove

competenze e capacità che li rendano in grado di affrontare le sfide di un panorama sanitario in grande evoluzione.

9. Sviluppare e valorizzare tutte le attività professionali

I professionisti di laboratorio non hanno solo il compito di analizzare in maniera efficiente ed accurata i campioni biologici, ma sono ormai coinvolti in numerose attività amministrative che vanno oltre l'ottimizzazione del repertorio di analisi, l'eliminazione di indagini diagnostiche obsolete o ridondanti, l'adeguata educazione e formazione del personale, l'amministrazione delle risorse umane ed economiche, la gestione del budget e l'introduzione di nuove tecnologie (8, 9, 35). La maggior parte di queste attività richiedono esperienza clinica, ed adeguata formazione scientifica/metodologica, mentre sono necessarie competenze amministrative e gestionali per lo svolgimento di altre attività.

10. Promuovere lo sviluppo e la visibilità della professione (medicina di laboratorio)

I professionisti di laboratorio e le loro società scientifiche devono superare l'attuale "invisibilità" per promuovere una maggior visibilità generale e pubblica che sia in grado di supportare la sostanziale evoluzione del ruolo dei professionisti di laboratorio nella sanità. I pazienti finora sono stati abituati a ricevere risultati di esami di laboratorio che hanno ricadute importanti sulla loro salute, ma non vedono né parlano con i professionisti responsabili dell'esecuzione di questi esami. I professionisti di laboratorio e le loro associazioni, quindi, devono saper evidenziare maggiormente la centralità del loro contributo all'interno di una disciplina clinica che è realmente capace di migliorare la qualità delle cure e promuovere il mantenimento della salute (36): dovrebbero essere visti non solo come "coloro che eseguono esami", ma in senso più ampio e globale all'interno del sistema di diagnosi e cura. Questo concetto è sottolineato dall'affermazione "*Noi non siamo solo produttori di dati, da sottoporre sempre più numerosi ai nostri colleghi clinici. Noi gestiamo le informazioni e costruiamo conoscenza. Noi siamo apripista e consulenti. Noi costruiamo processi e sistemi. Noi siamo guardiani della qualità. Noi siamo uomini d'affari e dirigenti. Noi siamo leader nei gruppi e membri del gruppo. Noi siamo educatori e consulenti. Noi siamo "difensori dei pazienti"*" (37). Queste affermazioni evidenziano le numerose responsabilità dei professionisti di laboratorio il cui lavoro è diventato di recente sempre più complesso. E' fondamentale promuovere il valore della professione rendendo sempre più visibile ai pazienti, ai clinici e a tutte le persone interessate, il ruolo degli esami di laboratorio nel moderno sistema sanitario.

Recentemente, una lettura intelligente del "manifesto" ha portato ad una critica che è sintetizzata nella "mancanza dell'occhio del golfista", ossia la

capacità di vedere nitidamente e contemporaneamente vicino e lontano (38). In realtà, questa critica sembra evidenziare una sottostima, nel manifesto, dell'importanza del cambiamento dovuto all'introduzione sempre maggiore delle tecnologie digitali applicate alla sanità. Pur condividendo il ruolo delle tecnologie digitali, dell'utilizzo sempre maggiore di sensori e dispositivi indossabili (wearable devices), si ritiene che nei 10 punti del manifesto siano presenti tutti gli elementi per affrontare questa ulteriore sfida che, sinteticamente, si declina nella capacità di gestire, integrare e comunicare l'informazione di laboratorio a tutti i portatori di interesse (medici, pazienti e cittadini).

CONCLUSIONI

E tempo di fare un passo avanti verso una nuova visione del futuro della medicina di laboratorio tenendo in considerazione sia gli sviluppi tecnologici che l'evoluzione del ruolo dei professionisti nel moderno sistema sanitario. E' molto importante incoraggiare la formazione di una nuova generazione di professionisti di laboratorio e di figure di riferimento capaci di integrare specifiche competenze tecnico-scientifiche ed amministrative con una più ampia visione del sistema di cura che si focalizzi soprattutto sui pazienti e sui loro bisogni di salute.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro nasce dalla discussione e condivisione delle problematiche e della visione sul futuro della medicina di laboratorio con molti Colleghi, ed in particolare con Giuseppe Lippi e Michael Laposata che sono co-autori dei lavori sul Manifesto, e Martina Zaninotto che mi ha stimolato a preparare questa versione aggiornata ed in lingua italiana.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M, Lippi G. Improving diagnosis and reducing diagnostic errors: the next frontier of laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1117-8.
2. Wilson ML, Fleming KA, Kuti MA, et al. Access to pathology and laboratory medicine services: a crucial gap. *Lancet* 2018;391:1927-38.
3. Zaninotto M, Miolo G, Guiotto A, et al. Quality performance of laboratory testing in pharmacies: a collaborative evaluation. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1745-51.
4. Arboleda VA, Garner OB. Ensuring the Quality of Point-of-Care Testing in a Large and Decentralized Ambulatory Care Setting. *Am J Clin Pathol* 2017;148:336-44.
5. Jani IV, Peter TF. How point-of-care testing could drive innovation in global health. *N Engl J Med* 2013;368:2319-24.
6. Plebani M. System-related and cognitive errors in laboratory medicine. *Diagnosis (Berl)* 2018;5:191-6.

7. Plebani M. Quality and future of clinical laboratories: the Vico's whole cyclical theory of the recurring cycles. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:901-8.
8. Plebani M, Laposata M, Lippi G. Driving the route of laboratory medicine: a manifesto for the future. *Intern Emerg Med* 2019;14:337-40.
9. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019;489:49-52.
10. Greaves RF, Bernardini S, Ferrari M, et al. Key questions about the future of laboratory medicine in the next decade of the 21st century: A report from the IFCC-Emerging Technologies Division. *Clin Chim Acta* 2019;495:570-89.
11. Phillips KA, Trosman JR, Douglas MP. Emergence of hybrid models of genetic testing beyond direct-to-consumer or traditional labs. *JAMA* 2019;321:2403-4.
12. Morgan DJ, Malani P, Diekema DJ. Diagnostic stewardship-leveraging the laboratory to improve antimicrobial use. *JAMA* 2017;318:607-8.
13. Plebani M. Clinical laboratory: bigger is not always better. *Diagnosis (Berl)* 2018;5:41-6.
14. Plebani M. Laboratorio clinic: non sempre più grande è migliore. *Biochim Clin* 2019;43:156-61.
15. Plebani M, Laposata M, Lundberg GD. The brain-to-brain loop concept for laboratory testing 40 years after its introduction. *Am J Clin Pathol* 2011;136:829-33.
16. Plebani M. Towards a new paradigm in laboratory medicine: the five rights. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1881-91.
17. Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;245:1762-3.
18. Miller WG, Plebani M. Why harmonization is essential to realize the manifesto for the future of laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2019;495:76.
19. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: the complete picture. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:741-51.
20. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: more than clinical chemistry? *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1579-86.
21. Plebani M, Graziani MS, Tate JR. Harmonization in laboratory medicine: Blowin' in the wind. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1559-62.
22. Plebani M. Clinical laboratories: production industry or medical services? *Clin Chem Lab Med* 2015;53:995-1004.
23. Plebani M. The future of laboratory medicine: Navigating between technology and professionalism. *Clin Chim Acta* 2019;498:16.
24. Dickerson JA, Fletcher AH, Procop G, et al. Transforming laboratory utilization review into laboratory stewardship: guidelines by the PLUGS National Committee for Laboratory Stewardship. <http://jal.m.aaccjnl.org/content/jalm/early/2017/07/11/jalm.2017.023606.full.pdf> (ultimo accesso: marzo 2020)
25. Marques MB, Anastasi J, Ashwood E. The clinical pathologist as consultant. *Am J Clin Pathol* 2011;135:11-12.
26. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *Improving Diagnosis in Health Care*. Washington, DC: The National Academies Press, 2015.
27. Price CP, John AS, Christenson R, et al., Leveraging the real value of laboratory medicine with the value proposition. *Clin. Chim. Acta* 2016;462:183-6.
28. Porter ME. What is value in health care? *N Engl J Med* 2010;363:2477-81.
29. Plebani M. Charting the course of medical laboratories in a changing environment. *Clin Chim Acta* 2002;319:87-100.
30. Jha S, Topol EJ. Adapting to artificial intelligence: radiologists and pathologists as information specialists. *JAMA* 2016;316:2353-4.
31. Wilson ML. The future of pathology and laboratory medicine-again. *Am J Clin Pathol* 2018;150:93-5.
32. Srinivasan D, Desai NR. The impact of the transition from value to value on heart failure care: implications of novel payment models and quality improvement initiatives. *J Card Fail* 2017;23:615-20.
33. Laposata M. Insufficient teaching of laboratory medicine in US medical schools. *Acad Pathol* 2016 doi: 10.1177/2374289516634108.
34. Peerschke EI, Agrawal Y, Alexander CB, et al. Proposed research training guidelines for residents in laboratory medicine. *Clin Lab Med* 2007;27:241-53.
35. Branda JA, Dighe AS, Dzik W, et al. The practice of clinical pathology: a quantitative description of laboratory director activities at a large academic medical center. *Am J Clin Pathol* 2014;142:144-9.
36. Horton S, Sullivan R, Flanigan J, et al. Delivering modern, high-quality, affordable pathology and laboratory medicine to low-income and middle-income countries: a call to action. *Lancet* 2018;391:1953-64.
37. Kroft SH. The evolution of the clinical pathologist. *Am J Clin Pathol* 2018;150:283-4.
38. Cappelletti P. Manifesti per la Medicina di Laboratorio. *Riv Ital Med Lab* 2019;15:3-9.

Misura e identificazione delle componenti monoclonali plasmatiche: risultati di uno studio multicentrico internazionale

Michele Mussap

Unità di laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi, Cagliari

ABSTRACT

The measurement and the identification of plasma monoclonal proteins: results from an international multicentre study.

The measurement of monoclonal proteins (MP) is basic for diagnosis, risk stratification, and evaluation of the response to the therapeutic treatment of plasma cells dyscrasias and lymphoproliferative disorders. Quality specifications of the MP measurement have been evaluated in a multicentre study involving 14 clinical laboratories and 2 *In vitro* Diagnostics Companies across three continents. Aliquots of human serum pools with normal, hypo- and hyper γ -globulinemia spiked with different amounts of therapeutic monoclonal drugs migrating in the γ -globulin zone, mimicking a MP and serum aliquots with a MP migrating in β -globulin zone were distributed to participants. Two articles, published in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, reported detailed results emerging from the study; the most significant have been condensed in the present paper. The MP concentration, the amount of the co-migrating proteins, especially the polyclonal immunoglobulins background, and the MP migration pattern significantly affect accuracy and precision of the MP quantification. When MP is <1 g/L, the unacceptable imprecision and the loss of accuracy, strongly discourage to report any numeric data, even though the presence of MP in the serum protein electrophoresis (SPE) must be reported qualitatively. The two gating techniques, namely perpendicular drop (DP) and tangent skimming (TS), lead to overestimation and underestimation of small MP, respectively. All the tested SPE methods, two agarose gel- and one capillary zone electrophoresis, detected 100% of MP ≥ 1 g/L; as expected, the limit of detection of immunofixation and immunosubtraction were moderately more sensitive. The overall mean intra-laboratory coefficient of variation (CV) for MP ranging 1-10 g/L was found around 5.0%; thus, the monitoring of changes in MP level over time within the same laboratory is considered reliable provided that the intensity of the polyclonal background remains stable.

INTRODUZIONE

La misura di una componente monoclonale (CM) riscontrabile all'elettroforesi delle sieroproteine (ETF), o profilo proteico, è un dato di laboratorio di grande importanza clinica che comporta decisioni strategiche nella gestione delle discrasie plasmacellulari e delle malattie linfoproliferative, soprattutto in alcune fasi del percorso assistenziale come la diagnosi, la stratificazione del rischio e il monitoraggio terapeutico (1,2). Questa determinazione dev'essere considerata un esame specifico inserito nel contesto del profilo proteico, e richiede la massima attenzione del laboratorio per garantire un'elevata affidabilità dei risultati.

Nonostante esistano molte pubblicazioni e documenti di consenso sulle specifiche qualitative del profilo proteico, sia elettroforesi su supporto solido che elettroforesi capillare in fase liquida (3-6), solo nell'ultimo decennio si sono intensificate le valutazioni sulle prestazioni della misura delle CM al tracciato elettroforetico (7-9). Molti di questi contributi hanno purtroppo evidenziato la mancanza di standardizzazione del processo analitico e la conseguente mancanza di armonizzazione dei risultati (10,11). Le cause sono molteplici, ma la più rilevante deriva da scelte operative individuali piuttosto che da comprovate procedure in grado di garantire l'accuratezza e la riproducibilità dei dati. Ne consegue che i risultati sono scarsamente confrontabili sia intra-

Corrispondenza a: Michele Mussap, Unità di laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi, Cittadella Universitaria S.S. 554, 09042 Monserrato, Cagliari

Ricevuto: 25.03.2020

Revisionato: 30.03.2020

Accettato: 31.03.2020

Pubblicato on-line: 08.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.033

che inter-laboratori e l'inadeguatezza delle prestazioni peggiora quando si misurano le piccole CM che, come noto, rivestono importanza clinica uguale, se non maggiore, delle altre (12).

Per questi motivi, appaiono di estrema importanza due nuove pubblicazioni apparse sul numero di Marzo di *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*: si tratta di due contributi scientifici che riportano i risultati di uno studio multicentrico internazionale sullo stato dell'arte nella misura delle CM al tracciato elettroforetico (13,14). Scopo di questo contributo è presentare e commentare i risultati più salienti dello studio alla comunità professionale italiana.

Metodologia di lavoro

L'indagine ha coinvolto 16 laboratori (14 clinici e 2 di aziende commerciali) distribuiti in 3 continenti: Europa (Italia, con 4 laboratori, Francia, Gran Bretagna, Estonia e Olanda), Australia e Nuova Zelanda, Stati Uniti e Canada. Sono stati valutati i sistemi elettroforetici in gel d'agarosio delle ditte HELENA® (Helena Bioscience Europe) e SEBIA® (Sebia Inc, France) e il sistema in elettroforesi capillare zonale SEBIA® (Sebia Inc, France). I partecipanti hanno ricevuto il materiale da analizzare, come schematizzato in Tabella 1. Per verificare le prestazioni della misura di CM in varie condizioni (quantità e zona di migrazione della CM), si sono preparati tre tipi di materiali: tre pool ai quali sono state aggiunte quantità definite di daratumumab (anticorpo monoclonale umano IgG1 κ anti-CD38) che mima una CM posizionata in zona γ-globulinica, nei pressi del catodo (15); tre pool ai quali sono state aggiunte quantità definite di elotuzumab (anticorpo monoclonale umano IgG1 κ anti-SLAMF7, glicoproteina di superficie espressa dalle cellule mielomatose e dai linfociti NK) che mima una CM posizionata in zona γ-

globulinica, al centro in gel d'agarosio e nei pressi dell'anodo in capillare (16); un siero umano contenente concentrazioni decrescenti di una CM IgA λ migrante in zona β-globulinica (Tabella 1). I tre pool di sieri sono stati preparati rispettivamente con una zona gamma normo, ipo e iper-rappresentata (Tabella 1). Le quantità di anticorpo monoclonale aggiunte ai pool sono state considerate "valore vero" della concentrazione di CM. Tutti i partecipanti hanno eseguito le analisi in cieco, usando i metodi e le tecniche routinarie dei loro laboratori: l'ETF, la misura della CM al tracciato elettroforetico, l'immunofissazione su gel d'agarosio (IFE) l'immunosottrazione in elettroforesi capillare (ISE). Poiché, come noto, esistono due tecniche di misura della CM al tracciato elettroforetico (17,18), quella che integra l'area del picco delimitandola da due linee ortogonali tracciate dai punti di flesso alla linea base del grafico (PD, perpendicular drop in inglese) e quella che integra l'area del picco delimitandola con una linea tangente tra i due punti di flesso (TS, tangent skimming in inglese), i partecipanti sono stati invitati a segnalare, oltre al metodo elettroforetico, la modalità usata per calcolare la concentrazione di CM. Una recente indagine condotta in 38 Paesi ha riscontrato che il 77% dei laboratori usa la tecnica ortogonale e solo il 9% quella con tangente (19). Il rimanente 14% non effettua la misura della CM al tracciato elettroforetico, ma usa metodi immunometrici.

RISULTATI

Nell'analizzare i risultati riportati nello studio multicentrico, vale la pena di ricordare quali sono le maggiori criticità che influenzano il risultato della misura quantitativa di una CM al tracciato elettroforetico. La prima è il corretto riconoscimento di un'anomalia

Tabella 1

Materiale analizzato dai partecipanti all'indagine multicentrica

Lotto di 3 pool di sieri con CM IgG κ migrante in zona γ-globulinica in prossimità del catodo, ottenuti per aggiunta di quantità definite di Daratumumab (da 10 a 0,1 g/L)

- 11 frazioni di un pool di sieri umani caratterizzato da ipo γ-globulinemia (4 g/L)
- 11 frazioni di un pool commerciale caratterizzato da normo γ-globulinemia (11 g/L)
- 11 frazioni di un pool di sieri umani caratterizzato da iper γ-globulinemia (20 g/L)

Lotto di 3 pool di sieri con CM IgG κ migrante in zona γ-globulinica: al centro in gel d'agarosio e in prossimità dell'anodo in elettroforesi capillare. I materiali sono stati ottenuti per aggiunta di quantità definite di Elotuzumab (da 10 a 0,1 g/L)

- 11 frazioni di un pool di sieri umani caratterizzato da ipo γ-globulinemia (4 g/L)
- 11 frazioni di un pool commerciale caratterizzato da normo γ-globulinemia (11 g/L)
- 11 frazioni di un pool di sieri umani caratterizzato da iper γ-globulinemia (20 g/L)

Lotto di un siero umano con una CM IgA λ migrante in zona β-globulinica

- 9 frazioni con concentrazioni decrescenti della CM (da 25 a 0,5 g/L)

CM, componente monoclonale

morfologica riferibile ad una frazione proteica monoclonale. Una seconda criticità riguarda i carichi di lavoro e la formazione. Un congruo carico di lavoro ben distribuito nella giornata (è altamente improbabile che 500-600 ed oltre tracciati elettroforetici possano essere valutati in modo accurato da un solo professionista in una giornata che di norma comporta molti altri impegni) e un adeguato periodo di formazione qualificata e specifica per dirigenti e tecnici sulle tecniche elettroforetiche ridurrebbero significativamente la variabilità inter-operatore. Quest'ultima è per lo più correlata a scelte diverse tra i professionisti dell'area, come: le condizioni operative e di lettura dei tracciati elettroforetici, la tecnica di misura delle CM e di altre frazioni proteiche di particolare interesse (posizionamento dei limiti che circoscrivono l'area sottesa ad una CM) e l'interpretazione globale del quadro sieroproteico. Al di là di queste premesse, senza le quali è difficile parlare di qualificazione professionale specialistica, almeno 4 fattori critici possono influire negativamente sulla valutazione qualitativa di un profilo proteico e sull'accuratezza e riproducibilità delle misure di una CM:

- la "topografia" del picco, cioè la zona elettroforetica nella quale appare la CM;
- l'ampia variabilità dell'intervallo di concentrazione della CM riscontrata nella pratica clinica;
- la presenza di concomitanti aumenti di frazioni proteiche co-migranti con la CM, ad esempio condizioni di iper γ -globulinemia;
- la tecnica di misura dell'area sottesa alla CM.

Il picco monoclonale appare prevalentemente nella zona γ -globulinica, meno spesso nelle zone β_1 - e β_2 -globuliniche, raramente in zona α_2 -globulinica e occasionalmente in zona α_1 -globulinica. Tuttavia, fenomeni chimico-fisici, frequentemente osservabili nel caso di CM costituite da sole catene leggere immunoglobuliniche, e fenomeni biologici, talvolta correlati all'evoluzione della patologia e al trattamento terapeutico, possono nel tempo modificare anche lievemente la zona di migrazione del picco. Le possibili variazioni temporali della zona di migrazione della CM costituiscono una variabile che influenza la riproducibilità delle misure, soprattutto perché può sommarsi a variazioni di entità di altre componenti proteiche co-migranti con la CM. L'entità del picco monoclonale è estremamente eterogenea: oscilla da circa 0,5-1 g/L in alcuni pazienti, fino a oltre 30 g/L in altri; non è raro osservare concentrazioni di CM superiori a quella dell'albumina, con evidente inversione dei rispettivi picchi al tracciato elettroforetico. È evidente che le specifiche di qualità devono essere adeguate sia per le piccole CM che per quelle molto grandi, includendo tutto l'ambito di misura. L'aumento e i cambiamenti nel tempo di frazioni proteiche co-migranti con la CM rappresentano ulteriori variabili che possono influenzare significativamente le specifiche di qualità del metodo di misura della CM. Emblematici sono i casi di variazioni della concentrazione di transferrina che spesso co-migra con una CM in zona β_1 -globulinica, o di

variazioni importanti delle immunoglobuline policlonali che nel tempo possono mutare da una situazione di normo γ -globulinemia ad una di ipo- o iper γ -globulinemia. Infine, le due tecniche di misura dell'area che sottende la CM, precedentemente menzionate, sono scarsamente confrontabili, soprattutto in certi quadri elettroforetici sieroproteici, come appunto dimostrato dallo studio multicentrico.

Gli Autori dello studio hanno arbitrariamente fissato (come evidenziato da loro stessi) i limiti di accettabilità: per l'imprecisione un coefficiente di variazione (CV) $\leq 20\%$ e per l'accuratezza un recupero compreso nell'intervallo 80-120%. Dalla considerevole mole di dati riportati nel primo dei due articoli sono stati estratti in questa sede quelli maggiormente significativi, ovvero quelli riferiti ad ambiti di concentrazione della CM più frequentemente riscontrati nei nostri laboratori; per un'analisi completa si rimanda alla lettura delle pubblicazioni originali su CCLM (*libero accesso ai soci SIBioC in regola con la quota associativa*). Per quanto riguarda i dati di imprecisione, le due variabili che maggiormente influiscono nel fornire prestazioni insufficienti o inaccettabili sono l'iper γ -globulinemia e le basse concentrazioni di CM, soprattutto quelle < 1 g/L (Tabelle 2-4). Nel caso della CM IgG κ catodica (daratumumab), per concentrazioni comprese tra 5 e 1 g/L la tecnica di misura ortogonale dimostra una riproducibilità migliore in elettroforesi capillare, mentre la tecnica di misura con tangente tra i punti di flesso dimostra risultati controversi, senza un'apparente tendenza a favore di uno dei due metodi (agarosio o capillare, Tabella 2). Nel caso della CM IgG κ migrante al centro della zona γ -globulinica in gel d'agarosio e all'anodo in capillare (elotuzumab), si verifica un'inversione dei dati di imprecisione tra i due metodi a seconda della tecnica di misura della CM usata (Tabella 3). Infine, per la CM IgA λ migrante in zona β -globulinica la tecnica di misura TS è quella di scelta, anche se in capillare l'imprecisione diventa inaccettabile per concentrazioni di CM ≤ 5 g/L (Tabella 4). Sui dati di accuratezza, ho voluto focalizzare l'attenzione sulla condizione di iper γ -globulinemia. Quest'ultima comporta una notevole sovrastima della CM misurata con la tecnica PD, indipendentemente dalla zona di migrazione e dalla concentrazione della CM (Tabella 5); al contrario, la tecnica TS comporta la sottostima della CM a prescindere, anche in questo caso, dalla zona di migrazione e dalla concentrazione della CM (Tabella 6). I dati di accuratezza della CM IgA λ migrante in zona β -globulinica dimostrano da un lato che l'elettroforesi capillare è più accurata dei metodi in agarosio; d'altra parte, i dati mimano l'andamento di quelli riferiti all'imprecisione, dimostrando che la tecnica PD è del tutto sconsigliabile (Tabella 7). In tutti i casi, la conclusione più importante è che CM < 1 g/L non sono misurabili in modo affidabile con alcun metodo e tecnica di misura, perché gravate da un'inaccettabile imprecisione e scarsa accuratezza; pertanto devono essere sempre segnalate come CM < 1 g/L.

Tabella 2

Imprecisione, espressa come coefficiente di variazione medio (CV%), delle misure di componente monoclonale IgG κ migrante catodicamente valutata su 3 pool di sieri umani preparati per aggiunta di daratumumab. Risultati riferiti solo per alcune concentrazioni frequentemente osservate nella pratica routinaria. Elettroforesi eseguita con sistemi SEBIA® in fase solida su gel d'agarosio e in fase liquida in elettroforesi capillare. In grassetto i valori che eccedono i limiti predefiniti (CV% ≤20).

CM IgG κ	CV%, ipo γ-globulinemia		CV%, normo γ-globulinemia		CV%, iper γ-globulinemia	
	Agarosio	Capillare	Agarosio	Capillare	Agarosio	Capillare
Tecnica di misura ortogonale punti di fesso-linea base						
5,0 g/L	16,0	5,5	17,0	5,5	23,0	7,6
2,0 g/L	18,0	8,7	29,0	7,6	30,0	8,2
1,0 g/L	14,0	7,4	23,0	9,6	26,0	21,0
0,5 g/L	11,0	11,0	31,0	23,0	22,0	36,0
Tecnica di misura tangente tra i punti di flesso						
5,0 g/L	9,3	5,9	5,3	6,1	19,0	10,0
2,0 g/L	8,8	18,0	13,0	7,4	10,0	20,0
1,0 g/L	4,7	13,0	15,0	18,0	11,0	22,0
0,5 g/L	19,0	22,0	23,0	21,0	===	90,0

=== dato non fornito.

CM, componente monoclonale

Tabella 3

Imprecisione, espressa come coefficiente di variazione medio (CV%), delle misure di componente monoclonale IgG κ migrante al centro della zona γ-globulinica in gel d'agarosio e anodicamente in capillare. Valutazione su 3 pool di sieri umani preparati per aggiunta di elotuzumab. Risultati riferiti solo per alcune concentrazioni frequentemente osservate nella pratica routinaria. Elettroforesi eseguita con sistemi SEBIA® in fase solida su gel d'agarosio e in fase liquida in elettroforesi capillare. In grassetto i valori che eccedono i limiti predefiniti (CV% ≤20).

CM IgG κ	CV%, ipo γ-globulinemia		CV%, normo γ-globulinemia		CV%, iper γ-globulinemia	
	Agarosio	Capillare	Agarosio	Capillare	Agarosio	Capillare
Tecnica di misura ortogonale punti di fesso-linea base						
5,0 g/L	20,0	4,7	26,0	7,0	23,0	11,0
2,0 g/L	22,0	7,2	28,0	10,0	27,0	15,0
1,0 g/L	17,0	10,0	30,0	9,3	34,0	18,0
0,5 g/L	24,0	10,0	20,0	14,0	43,0	21,0
Tecnica di misura tangente tra i punti di flesso						
5,0 g/L	3,3	8,4	13,0	8,1	10,0	11,0
2,0 g/L	3,8	10,0	7,6	14,0	12,0	19,0
1,0 g/L	5,9	15,0	11,0	11,0	17,0	22,0
0,5 g/L	15,0	22,0	12,0	26,0	15,0	30,0

CM, componente monoclonale

Tabella 4

Imprecisione, espressa come coefficiente di variazione medio (CV%), delle misure di componente monoclonale IgA λ migrante in zona β -globulinica. Risultati riferiti solo ad alcune concentrazioni frequentemente osservate nella pratica routinaria. Elettroforesi eseguita con sistemi HELENA® e SEBIA® in fase solida su gel d'agarosio e SEBIA® in fase liquida in elettroforesi capillare. In grassetto i valori che eccedono i limiti predefiniti (CV% ≤ 20).

CM IgA λ	CV%, gel d'agarosio Helena®		CV%, gel d'agarosio Sebia®		CV%, capillare Sebia®	
	ortogonale	tangente	ortogonale	tangente	ortogonale	tangente
20,0 g/L	3,1	10,0	====	2,7	====	8,7
10,0 g/L	6,2	12,0	====	1,9	====	17,0
5,0 g/L	12,0	3,0	====	2,1	====	29,0
2,5 g/L	6,2	====	====	2,3	====	44,0
0,5 g/L	3,8	====	====	5,8	====	61,0

=== dato non fornito.

CM, componente monoclonale

Tabella 5

Influenza dell'iper- γ -globulinemia policlonale (20 g/L) sull'accuratezza della misura della componente monoclonale IgG κ ottenuta mediante la tecnica perpendicolare di delimitazione del picco monoclonale. Sono riportati i valori medi di recupero (%) rispetto al valore teorico di concentrazione della componente monoclonale. In grassetto i valori che eccedono i limiti predefiniti (recupero% 80-120).

Metodo elettroforetico (tecnica di misura ortogonale)	Valore teorico della componente monoclonale			
	10 g/L	5 g/L	2 g/L	1 g/L
Elettroforesi su gel d'agarosio HELENA®				
- Daratumumab (recupero medio, %)	116	165	311	536
- Elotuzumab (recupero medio, %)	150	217	388	678
Elettroforesi su gel d'agarosio SEBIA®				
- Daratumumab (recupero medio, %)	113	131	199	275
- Elotuzumab (recupero medio, %)	121	151	221	291
Elettroforesi capillare SEBIA®				
- Daratumumab (recupero medio, %)	122	176	286	410
- Elotuzumab (recupero medio, %)	141	194	322	486

Tabella 6

Influenza dell'iper- γ -globulinemia policlonale (20 g/L) sull'accuratezza della misura della componente monoclonale IgG κ , ottenuta mediante il calcolo dell'area delimitata dalla tangente tra i due punti di flesso del picco monoclonale. Sono riportati i valori medi di recupero (%) rispetto al valore teorico di concentrazione della componente monoclonale. In grassetto i valori che eccedono i limiti predefiniti (recupero% 80-120).

Metodo elettroforetico (tecnica di misura tangente)	Valore teorico della componente monoclonale			
	10 g/L	5 g/L	2 g/L	1 g/L
Elettroforesi su gel d'agarosio HELENA®				
- Daratumumab (recupero medio, %)	65	62	55	==
- Elotuzumab (recupero medio, %)	60	61	50	==
Elettroforesi su gel d'agarosio SEBIA®				
- Daratumumab (recupero medio, %)	90	75	83	32
- Elotuzumab (recupero medio, %)	80	78	74	77
Elettroforesi capillare SEBIA®				
- Daratumumab (recupero medio, %)	88	85	80	65
- Elotuzumab (recupero medio, %)	81	79	80	73

=== dato non fornito

Tabella 7

Accuratezza della misura di una componente monoclonale IgA λ valutata con sistemi HELENA® e SEBIA® in fase solida su gel d'agarosio e SEBIA® in fase liquida in elettroforesi capillare. Sono riportati i valori medi di recupero (%) rispetto al valore teorico di concentrazione della componente monoclonale. In grassetto i valori che eccedono i limiti predefiniti (recupero% 80-120).

Misura della componente monoclonale IgA λ migrante in zona β -globulinica	Valore teorico della componente monoclonale				
	20 g/L	10 g/L	5 g/L	2,5 g/L	0,5 g/L
Elettroforesi su gel d'agarosio HELENA®					
• Misura ortogonale (recupero medio, %)	107	120	151	180	811
• Misura dalla tangente (recupero medio, %)	48	41	43	==	==
Elettroforesi su gel d'agarosio SEBIA®					
• Misura ortogonale (recupero medio, %)	==	==	==	==	==
• Misura dalla tangente (recupero medio, %)	67	57	52	46	107
Elettroforesi capillare SEBIA®					
• Misura ortogonale (recupero medio, %)	==	==	==	==	==
• Misura dalla tangente (recupero medio, %)	87	79	78	76	173

=== dato non fornito

Il calcolo del limite di quantificazione (LoQ, limit of quantitation), definito come la concentrazione minima di CM rientrante negli intervalli di accettabilità dell'inaccuratezza (recupero 80-120%) e dell'imprecisione (CV \leq 20%) ha confermato che i fattori che maggiormente influenzano le due variabili sono l'ammontare delle immunoglobuline policlonali, che costituiscono un cosiddetto "rumore di fondo", e la zona di migrazione della CM. Il metodo HELENA® in gel d'agarosio ha evidenziato differenze molto significative tra i LoQ: da un lato, usando la tecnica di misura ortogonale della CM IgG κ catodica si sono ottenuti valori di LoQ compresi tra 3,0 e 10 g/L, con aumento direttamente correlato all'aumento delle immunoglobuline policlonali. D'altra parte, usando la tecnica di misura tangente tra i punti di flesso della CM non si è ottenuto nemmeno un valore di LoQ rientrante nei limiti di accettabilità. Analoghi risultati sono stati ottenuti per la CM IgG κ migrante in agarosio al centro della zona γ -globulinica, anche se in questo caso l'iper γ -globulinemia ha impedito un LoQ rientrante nei limiti di accettabilità anche per la tecnica di misura ortogonale. I risultati migliori sono quelli ottenuti in elettroforesi capillare, come riassunto in Tabella 8.

Lo studio riporta i limiti di rilevabilità (LoD, limit of detection) della CM per l'ETF, sia in gel d'agarosio che in capillare, per l'IFE e per l'ISE. In Tabella 9 sono riportati i risultati ottenuti per ETF in gel d'agarosio e IFE. Nella tabella si può chiaramente osservare che l'iper γ -globulinemia influisce negativamente sul LoD per l'ETF e per un metodo IFE con anticorpi monovalenti. Per quanto riguarda l'ETF capillare, il LoD è pari a 0,5 g/L per la CM IgG κ Daratumumab in tutti 3 i pool di sieri, oscilla tra 0,3 e 0,5 per la CM IgG κ

Elotuzumab (valore più basso per il pool con normo γ -globulinemia) ed è $<$ 0,5 g/L per la IgA λ migrante in zona β -globulinica. Per l'ISE sono stati ottenuti valori molto simili a quelli dell'ETF capillare; confrontati con i dati su IFE risultano mediamente superiori per i pool con ipo- e iper γ -globulinemia, mentre sono significativamente più bassi nel pool con iper γ -globulinemia.

Due ultimi risultati significativi dello studio multicentrico appaiono molto incoraggianti perché recano due conclusioni positive. La prima è che la variabilità intra-laboratorio della misura di una CM è soddisfacente. Su un totale di 1203 misure in duplicato di CM comprese in un ambito di concentrazione 1-10 g/L, è stato calcolato un CV medio globale pari al 5% (intervallo di confidenza al 95%: 4,7-5,4%). Anche in questo caso, l'entità del "rumore di fondo" costituito dalla presenza di immunoglobuline policlonali e l'entità della CM costituiscono le due variabili che influenzano maggiormente il confronto delle misure nel tempo, all'interno del medesimo laboratorio. Se consideriamo insieme le due variabili, scopriamo che lo studio ha rilevato un CV pari al 12,7% per CM = 1 g/L inserite in un quadro di iper γ -globulinemia policlonale, mentre ha trovato un CV pari al 2,6% per CM = 10 g/L inserite in un quadro di ipo γ -globulinemia. In definitiva, possiamo affermare che misure ripetute di una CM nello stesso laboratorio durante il monitoraggio del paziente con gammopatia monoclonale sono affidabili e adeguate alle esigenze cliniche, a patto che il quadro sieroproteico generale rimanga costante soprattutto nella zona γ -globulinica e che nel frattempo non si sia modificato il metodo elettroforetico. La seconda conclusione è riferita alla capacità di riconoscimento visivo di una CM al tracciato elettroforetico: per i pool

con normo- e ipo γ -globulinemia, concentrazioni di CM $\geq 0,5$ g/L sono state riconosciute dal 100% dei partecipanti sia in zona γ - che β -globulinica (Tabella 10). Per il pool con iper γ -globulinemia l'ETF capillare ha raggiunto il medesimo risultato, mentre non tutti i

partecipanti che hanno usato metodi elettroforetici su supporto solido hanno riconosciuto il 100% di una CM = 0,5 g/L.

Tabella 8

Limite di quantificazione (LoQ) in elettroforesi capillare zonale.

Componente monoclonale misurata in elettroforesi capillare zonale	Limite di quantificazione (LOQ), g/L	
	Tecnica di misura ortogonale	Tecnica di misura tangente
IgG κ catodica in zona γ -globulinica (Daratumumab)		
- pool ipo γ -globulinemia	2,0	1,0
- pool normo γ -globulinemia	5,0	5,0
- pool iper γ -globulinemia	NA	2,0
IgG κ anodica in zona γ -globulinica (Elotuzumab)		
- pool ipo γ -globulinemia	3,0	6,0
- pool normo γ -globulinemia	8,0	NA
- pool iper γ -globulinemia	NA	8,0
IgA λ migrante in zona β -globulinica	===	13,0

=== dato non fornito.

NA, non accettabile

Tabella 9

Limiti di rilevabilità (LoD) della componente monoclonale all'elettroforesi sieroproteica e all'immunofissazione eseguite in gel d'agarosio. L'immunofissazione è stata eseguita impiegando sia anticorpi monovalenti che pentavalenti.

	Elettroforesi in gel d'agarosio		Immunofissazione in gel d'agarosio			
	HELENA	SEBIA	Helena		Sebia	
			Ab monovalente	Ab pentavalente	Ab monovalente	Ab pentavalente
IgG κ Daratumumab						
- pool ipo γ -globulinemia	0,5	0,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
- pool normo γ -globulinemia	0,5	0,5	0,5	<0,1	0,5	0,3
- pool iper γ -globulinemia	1,0	1,0	<0,5	<0,5	1,0	<0,5
IgG κ Elozutumab						
- pool ipo γ -globulinemia	0,5	0,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
- pool normo γ -globulinemia	0,5	0,5	0,3	<0,1	0,5	<0,1
- pool iper γ -globulinemia	1,0	1,0	<0,5	<0,5	2,0	<0,5
IgA λ in zona β -globulinica	<0,5	<0,5	<0,5	==	<0,5	==

risultati espressi in g/L.

Ab, anticorpo

Tabella 10

Risultati parziali relativi alla capacità di riconoscimento della presenza di una componente monoclonale al profilo proteico da parte dei laboratori partecipanti allo studio multicentrico

CM rilevata alla elettroforesi	Valore atteso (recupero)					
	Pool con normo γ -globulinemia			Pool con ipo γ -globulinemia		
	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
IgG κ in zona γ (Daratumubab)						
- HELENA® agarosio	0%	25%	100%	0%	25%	100%
- SEBIA® agarosi	0%	38%	100%	61%	77%	100%
- SEBIA® capillare	0%	39%	100%	71%	100%	100%
IgG κ in zona γ (Elotuzumab)						
- HELENA® agarosio	0%	75%	100%	81%	87%	100%
- SEBIA® agarosio	38%	54%	100%	69%	85%	100%
- SEBIA® capillare	13%	100%	100%	67%	100%	100%
	Valore atteso (recupero), g/L					
	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,05
IgA λ in zona β -globulinica						
- HELENA® agarosio	100%	100%	100%	100%	100%	100%
- SEBIA® agarosio	100%	100%	100%	100%	100%	100%
- SEBIA® capillare	100%	100%	100%	100%	100%	100%

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio multicentrico sono di grande importanza perché permettono di affrontare con dati sperimentali il problema della scarsa standardizzazione in ETF e, più specificatamente, della misura delle CM al tracciato elettroforetico (20). Le evidenze più rilevanti sono:

- misurare una CM con tecnica PD in un contesto di aumento delle frazioni proteiche co-migranti (ad esempio iper γ -globulinemia policlonale, iper transferrinemia) comporta una sovrastima della misura, direttamente proporzionale all'entità dell'aumento della frazione co-migrante e inversamente proporzionale all'entità della CM;
- misurare una CM con tecnica TS comporta una sottostima della misura, inversamente proporzionale all'entità della CM;
- la misura di CM <1 g/L è sconsigliata. Ciò non significa ignorarla; in questi casi è necessario segnalarla sempre, riportando nel referto CM <1 g/L;
- occorre la massima attenzione nell'evitare risposte di falsi negativi per CM all'ETF e all'IFE, perché nel paziente trattato la presenza o l'assenza di una CM anche di piccola entità cambia la valutazione clinica da risposta parziale molto buona (CM presente) a risposta completa (CM assente).

Vorrei aggiungere che l'automazione, sempre più spinta e che include anche i sistemi analitici per ETF, IFE, ISE, non sostituisce le competenze di chi deve valutare un quadro sieroproteico, una tipizzazione della CM e la sua misura al tracciato. Semmai, deve servire a riconvertire il tempo guadagnato in attività di studio e formazione. Va inoltre sottolineato che non si deve confondere questo studio con una linea-guida: lo scopo primario è quello di definire lo stato dell'arte e di creare nel professionista specializzato nell'area della diagnostica proteica lo stimolo per definire le proprie specifiche di qualità, standardizzando il più possibile l'intero processo operativo. Tuttavia, i risultati di questo studio possono rappresentare una solida base di partenza per creare un documento di consenso che permetta di migliorare l'armonizzazione dei risultati. Non sembra invece possibile preparare una linea-guida universale che definisca il metodo ideale, la tecnica di delimitazione del picco ottimale e così via, a causa delle molteplici variabili coinvolte. Nonostante i riconosciuti limiti dello studio multicentrico (20), i risultati ottenuti sono solidi e "evidence-based", al punto che negli studi futuri sull'argomento dovrebbe essere obbligatoria la descrizione dettagliata del metodo elettroforetico e della tecnica di misura impiegati per la quantificazione della CM, allo scopo di armonizzare i risultati tra studi diversi. Ciò che più conta per il clinico è garantire l'accuratezza

delle misure delle CM e la loro riproducibilità nel tempo. Se si cambia il metodo analitico, per esempio da supporto solido a quello liquido in capillare o viceversa, è indispensabile gestire con il clinico l'armonizzazione tra risultati storici e risultati post-cambiamento, soprattutto per quanto riguarda le misure della CM (21). All'interno del laboratorio occorre azzerare le variazioni inter-individuali basate su scelte operative, per esempio le condizioni di lettura dei tracciati (alcuni strumenti propongono soglie di sensibilità diverse), sulla delimitazione delle CM, sull'interpretazione del quadro sieroproteico, creando un flusso operativo condiviso e stringente. In Italia la cultura della diagnostica proteica ha una tradizione prestigiosa fin dai tempi dei primi documenti di indirizzo del gruppo di studio proteine di SIBioC (22): leggendo i nomi di chi le scrisse non ci si può esimere dal voler proseguire una strada che fu tracciata molto tempo fa sul suolo della qualità e della conoscenza e che molti Colleghi hanno continuato a costruire per oltre 30 anni, tenuto conto che la disponibilità di documenti aggiornati e dei mezzi per la loro acquisizione sulla propria scrivania sono infinitamente più numerosi e rapidi di quelli a disposizione all'epoca.

RINGRAZIAMENTI

L'Autore desidera ringraziare la dott.ssa Diletta Onorato (Università degli Studi di Verona) per l'aiuto prestato nella compilazione delle tabelle.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Willrich MAV, Murray DL, Kyle RA. Laboratory testing for monoclonal gammopathies: Focus on monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Clin Biochem* 2018;51:38-47.
- Katzmann J, Keren D. Strategy for Detecting and Following Monoclonal Gammopathies. In: B D, 598 JL S, RG H. *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*. Washington, DC: ASM 599 Press, 2016:112-124.
- Tate J, Caldwell G, Daly J, et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012;49:242-56.
- Dolci A, Vernocchi A, per il Gruppo di Studio SIBioC Proteine. Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2012;36:84-9.
- Tate JR, Graziani MS, Mollee P, et al. Protein electrophoresis and serum free light chains in the diagnosis and monitoring of plasma cell disorders: laboratory testing and current controversies. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:899-905.
- Booth RA, McCudden CR, Balion CM, et al. Candidate recommendations for protein electrophoresis reporting from the Canadian Society of Clinical Chemists Monoclonal Gammopathy Working Group. *Clin Biochem* 2018;51:10-20.
- Vernocchi A, Dolci A, Ceriotti F, Lippi G. Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim. Clin* 2015;39:199-207.
- Keren DF, Schroeder L. Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:947-61.
- Tate JR. The Paraprotein – an Enduring Biomarker. *Clin Biochem Rev* 2019;40:5-22.
- Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701-5.
- Tate JR, Keren DF, Mollee P. A global call to arms for clinical laboratories – Harmonised quantification and reporting of monoclonal proteins. *Clin Biochem* 2018;51:4-9.
- Merlini G. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. *Biochim Clin* 2012;36:25-8.
- Turner KA, Frinack JL, Ettore MW, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part I: factors impacting limit of quantitation of serum protein electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:533-46.
- Jacobs JFM, Turner KA, Graziani MS, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part II: limit of detection and follow-up of patients with small M-proteins. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:547-59.
- McCudden C, Axel AE, Slaets D, et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1095-104.
- Tang F, Malek E, Math S, et al. Interference of Therapeutic Monoclonal Antibodies With Routine Serum Protein Electrophoresis and Immunofixation in Patients With Myeloma: Frequency and Duration of Detection of Daratumumab and Elotuzumab. *Am J Clin Pathol* 2018;150:121-9.
- Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, et al. Reliability of M protein quantification: comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:876-7.
- Obiols J, Dupuy AM, Bargnoux AS, et al. Monoclonal gammopathy <5 g/L: the interest of T/O ratio. *Ann Biol Clin (Paris)* 2016;74:286-92.
- Genzen JR, Murray DL, Abel G, et al. Screening and Diagnosis of Monoclonal Gammopathies: An International Survey of Laboratory Practice. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142:507-5.
- Plebani M. New insights on the analytical performances for detecting and quantifying monoclonal proteins. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:457-9.
- Mussap M, Pietrogrande F, Ponchia S, et al. Measurement of serum monoclonal components: comparison between densitometry and capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:609-11.
- Aguzzi F, Fenili D, Montalbetti N, et al. L'elettroforesi delle sieroproteine 2°. Raccomandazione provvisoria SIBioC. *Biochim Clin* 1985;9:1133-4.

Valutazione precoce del danno cardiaco da farmaci chemioterapici: importanza della misura delle troponine cardiache I e T con metodi ad alta-sensibilità analitica

Documento del Gruppo di Studio inter-societario delle Società Scientifiche Italiane di Medicina di Laboratorio SIBioC ed European Ligand Assay Society- Italia (ELAS), e della Associazione Nazionale Medici Cardiologi Ospedalieri (ANMCO)

Aldo Clerico¹, Daniela Maria Cardinale², Martina Zaninotto³, Nadia Aspromonte⁴, Maria Teresa Sandri⁵, Claudio Passino¹, Mario Plebani³, Marco Migliardi⁶, Marco Perrone⁷, Antonio Fortunato⁸, Andrea Padoan³, Tommaso Trenti⁹, Sergio Bernardini⁷, Laura Sciacovelli³, Furio Colivicchi¹⁰, Domenico Gabrielli¹¹

¹Scuola Superiore Sant'Anna e Fondazione CNR – Regione Toscana G. Monasterio, Pisa

²Unità di Cardioncologia, Istituto Europeo di Oncologia, I.R.C.C.S., Milano

³Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, e Dipartimento di Medicina - Università di Padova

⁴Dipartimento Scienze Cardiovascolari, Fondazione Policlinico Universitario "Agostino Gemelli" IRCCS, Roma.

⁵Unità Operativa Laboratorio Analisi, Humanitas Medical-Care, Rozzano (Milano).

⁶Struttura Complessa Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano, Torino

⁷Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma Tor Vergata, Roma

⁸U.O.C. Patologia Clinica, ASUR Marche Area Vasta 5, Ascoli Piceno

⁹Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Universitaria e Unità Sanitaria Locale di Modena, Modena

¹⁰Unità Operativa Complessa di Cardiologia, Presidio Ospedaliero San Filippo Neri - ASL Roma 1, Roma

¹¹Unità Operativa Complessa di Cardiologia, Ospedale Civile Augusto Murri, Fermo

ABSTRACT

High-sensitivity cardiac troponin I and T methods for the early detection of myocardial injury in patients on chemotherapy.

Important advances achieved in pharmacological cancer treatment have led progressively to a reduction in mortality from many forms of cancer, and increasing numbers of previously incurable patients can now hope to become cancer-free. Yet, to achieve these improved outcomes a high price has been paid in terms of untoward side effects associated with treatment, cardiotoxicity in particular. Several recent studies have reported that cardiac troponin assay using high-sensitivity methods (hs-cTn) can enable the early detection of myocardial injury related to chemotherapy or abuse of drugs that are potentially cardiotoxic. Several authors have recently suggested that changes in hs-cTn values enable the early diagnosis of cardiac injury from chemotherapy, thus potentially benefitting cancer patients with increased troponin values by initiating early cardioprotective therapy. However, large randomised clinical trials are needed in order to evaluate the cost/benefit ratio of standardised protocols for the early detection of cardiotoxicity using the hs-cTn assay in patients treated with chemotherapy.

SCOPO DEL DOCUMENTO DI CONSENSO

Fin dall'anno 2000, la misura delle troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) è considerata il gold standard dalle linee guida internazionali per la diagnosi

differenziale delle sindromi coronariche acute (SCA) (1-3). In questi ultimi anni si è assistito ad un progressivo miglioramento delle caratteristiche analitiche dei metodi di cTnI e cTnT che ha consentito di misurare i livelli circolanti del biomarcatore nella maggior parte dei

Questo documento è pubblicato congiuntamente dalle Società Scientifiche che hanno partecipato alla sua stesura e da Clin Chem Lab Med 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0362.

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Fondazione CNR Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 41, 56126 Pisa, E-mail clerico@ftgm.it

Ricevuto: 27.05.2020

Revisionato: 28.05.2020

Accettato: 28.05.2020

Pubblicato on-line: 09.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.062

soggetti adulti sani di entrambi i sessi (4-17). L'utilizzo di questi metodi, definiti ad alta sensibilità (hs-cTn), ha già cambiato nel corso degli ultimi anni la nostra visione della fisiopatologia dell'infarto del miocardio, dell'algoritmo diagnostico della diagnosi differenziale dell'infarto acuto del miocardio, ed anche il monitoraggio dei pazienti con SCA (1-3,5,18,19). In questo documento vengono presentate e discusse le evidenze sperimentali che riguardano l'utilizzo di metodi ad alta sensibilità per la misura delle troponine cardiache per evidenziare precocemente un danno miocardico dovuto all'uso terapeutico dei farmaci chemioterapici nei pazienti con neoplasie. Verranno anche fornite alcune indicazioni sul modo più corretto di utilizzare i metodi hs-cTn per il monitoraggio del danno cardiaco nei pazienti in trattamento con farmaci oncologici potenzialmente cardiotossici.

CARATTERISTICHE E PRESTAZIONI ANALITICHE DEI METODI DI MISURA AD ALTA SENSIBILITÀ DELLE TROPONINE CARDIACHE

Le linee guida internazionali raccomandano come valore di riferimento per la rilevazione del danno cardiaco in un paziente con sospetto di una malattia cardiaca, il 99° percentile della distribuzione nella popolazione di riferimento (URL) delle cTnI e cTnT (3). In particolare, il documento "Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction", pubblicato nel settembre del 2018, stabilisce che è sufficiente anche un solo valore al di sopra del 99° percentile URL per accertare la presenza di un danno cardiaco (myocardial injury). Inoltre, questo documento raccomanda che dovrebbero essere utilizzati metodi ad alta sensibilità per la misura delle cTn, perché essi sono in grado di misurare il 99° percentile URL con una imprecisione [espressa come coefficiente di variazione, (CV)] minore o uguale al 10% (1-3). Infine, questo documento stabilisce che il danno del

miocardio è definito acuto se presenta, nel corso di un certo periodo di tempo (in genere da 1 a 3 ore), una tendenza significativa verso la crescita e/o la diminuzione dei valori misurati del biomarcatore (1-3). Questa differenziazione tra danno acuto e cronico è fondamentale per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (1-3).

Nel 2018, il documento delle società internazionali American Association for Clinical Chemistry (AACC) e IFCC (2) ha stabilito che due criteri sono fondamentali per la definizione di alta sensibilità da applicarsi ai metodi per le cTn (hs-cTn), che sono attualmente raccomandati dalle linee guida sia per la valutazione del danno cardiaco, che per la diagnosi differenziale di SCA (1-3). Il primo criterio stabilisce che un metodo hs-cTn deve misurare il 99°percentile URL con una imprecisione (espressa come CV) $\leq 10\%$ (2). Il secondo criterio stabilisce che un metodo hs-cTn deve misurare livelli circolanti del biomarcatore al di sopra del valore della sensibilità del metodo [espressa come Limit of Detection (LoD), in ng/L] in una popolazione di riferimento, che includa individui apparentemente sani, costituita da almeno 300 donne e 300 uomini (2). Poiché le donne mostrano, in media, valori di cTn inferiori rispetto agli uomini di pari età, questo secondo criterio, in pratica, richiede come requisito fondamentale che un metodo hs-cTn sia in grado di misurare livelli del biomarcatore al di sopra del valore di LoD nella maggioranza di una larga popolazione (>600 individui apparentemente sani di entrambi i sessi) che includa almeno 300 donne.

RILEVANZA FISIOPATOLOGICA DEI LIVELLI CIRCOLANTI DI hs-cTn IN SOGGETTI DELLA POPOLAZIONE GENERALE

Da un punto di vista fisiopatologico e clinico è importante sottolineare che i metodi hs-TnI presentano valori di LoD generalmente compresi tra 1 e 2 ng/L (Tabella 1), che corrispondono alla quantità di biomarcatore contenuto in circa 5-8 mg di tessuto

Tabella 1

Caratteristiche analitiche e parametri di distribuzione dei valori nella popolazione italiana per la troponina cardiaca I, misurata con metodi ad alta sensibilità (hs-cTnI).

Metodi hs-cTnI	LoD, ng/L	LoQ 10%, ng/L	Mediana, ng/L (25°-75° percentile)	99° percentile URL, ng/L	Numerosità della popolazione
ARCHITECT	1,3	4,7	1,8 (1,2-2,8)	26,2	1463
ACCESS DxI	1,3	5,3	2,7 (1,9-4,0)	17,5	1460
ADVIA CENTAUR XPT	2,2	8,4	3,3 (1,8-4,9)	47,3	1411

LoD, sensibilità analitica (Limit of Detection); LoQ, valore di cTnI misurato con un errore uguale al 10% CV (Limit of Quantitation); 99° percentile URL, valore del 99° percentile per la popolazione di riferimento che include sia donne che uomini adulti con un rapporto femmine/maschi di 0,95 (intervallo di età 18-86 anni; età media: 51,5 anni; DS: 14,1 anni).

ARCHITECT, metodo Architect (Abbott Diagnostics) (10,16); ACCESS, metodo Access su piattaforma DXI (Beckman Coulter Diagnostics) (11,16); ADVIA Centaur, metodo ADVIA su piattaforma Centaur XPT (Siemens Diagnostics) (13,16).

I valori dei parametri analitici e della distribuzione della cTnI, riportati, sono stati valutati come riportato in dettaglio nelle referenze (10-13,16,36-39).

miocardico, mentre il valore del 99° percentile URL (cioè il valore soglia per diagnosi di danno miocardico) corrisponde al contenuto di circa 20-40 mg di tessuto miocardico (17-19). Evidentemente, una lesione miocardica che interessa pochi mg di tessuto è ben al di sotto del limite di rilevazione dei metodi ecocardiografici, come anche di altre tecniche di imaging cardiaco considerate più sensibili e perfezionate (come PET, TAC e NMR) (5,17-19). Per questo motivo, il documento internazionale Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction si basa sui metodi hs-cTn per la rilevazione del danno cardiaco (3). Nella pratica clinica, questo documento pone in primo piano la “certificazione” della presenza di un danno cardiaco che viene quindi ad assumere una valenza non solo clinica, ma anche anatomopatologica e medico legale. Di fatto, si raccomanda al clinico di eseguire la misura con metodi hs-cTn, in tutti i soggetti/pazienti in cui vi sia un sospetto di malattia cardiovascolare. La presenza di anche un solo valore di hs-cTn al di sopra del 99° percentile URL stabilisce la presenza clinica del danno cardiaco (3).

In accordo con queste considerazioni fisiopatologiche, molti Autori hanno suggerito che la misura delle cTnI e cTnT con metodi ad alta sensibilità debba essere considerata un affidabile indice del rinnovamento giornaliero (fisiologico o patologico) della cellula miocardica (cardiomyocyte renewal) (5,17-19). Infatti, i metodi hs-cTn hanno dimostrato che mediamente i soggetti adulti sani presentano un valore del 99° percentile URL, che è compatibile con un turnover cardiaco giornaliero di circa 30-40 mg, simile a quello determinato sperimentalmente in animali da esperimento e nell'uomo (5,17-20).

Recenti studi (incluse tre meta-analisi) hanno, inoltre, dimostrato che valori di hs-cTn, compresi nel terzo terzile della distribuzione dei soggetti apparentemente sani presentano un rischio cardiovascolare più elevato (circa del 30%) rispetto ai valori compresi entro il primo terzile dei valori della distribuzione del biomarcatore (21-29). È importante sottolineare che è stato possibile ottenere questi risultati solo utilizzando i metodi hs-cTn. Infatti, i metodi hs-cTn sono caratterizzati sia da una elevata sensibilità analitica (1-2 ng/L), che permette di misurare i livelli circolanti dell'analita nella maggior parte dei soggetti sani, sia da una minore variabilità biologica della misura della troponina intra-individuale (compresa tra il 4% e il 12%) rispetto alla variabilità tra soggetti (circa il 50%) (14-17,30-35). Per contro, la variabilità biologica intra-individuale degli altri biomarcatori cardio-specifici (cioè i peptidi natriuretici BNP e NT-proBNP) è molto maggiore essendo simile alla variabilità tra individui (cioè circa 40-60%) (30). Di fatto, la straordinaria prestazione analitica dei metodi hs-cTn, abbinata alla bassa variabilità biologica, permette di calcolare che la differenza critica tra due misure, effettuate in serie nello stesso soggetto con valori di hs-cTn entro l'intervallo di normalità, può

essere anche di soli 3-5 ng/L (16,36-39). Questa osservazione è in accordo con alcuni recenti studi che hanno dimostrato che un incremento progressivo anche di pochi ng/L, rilevato durante un monitoraggio di alcuni mesi in individui della popolazione generale, aumenta significativamente il rischio di mortalità per eventi avversi cardiovascolari (23,29). È da considerare che la distribuzione dei valori del biomarcatore nei soggetti normali è estremamente asimmetrica per cui il valore del 99° percentile URL risulta da 10 a 15 volte più elevato del valore mediano (compreso tra 1,8 e 3,5 ng/L per i metodi hs-cTnI riportati in Tabella 1) (5,16,30). In altre parole, il turnover fisiologico dei miocardiociti deve aumentare mediamente di circa 10-15 volte prima di superare il valore soglia per il danno miocardico in soggetti adulti sani (Tabella 1) (5,16,30).

VALUTAZIONE PRECOCE DEL DANNO CARDIACO CAUSATO DAL TRATTAMENTO CON FARMACI CHEMIOTERAPICI IN PAZIENTI NEOPLASTICI

È noto da molto tempo che i farmaci chemioterapici presentano un effetto cardiotossico nei pazienti in trattamento per una neoplasia (40-44). In questi pazienti, la rilevazione precoce di un danno cardiaco può indicare un alto rischio di un progressivo peggioramento della funzione cardiaca fino ad un quadro di scompenso cardiaco conclamato (43,44). Sono state proposte differenti definizioni di cardiotossicità, in genere basate sul rilievo della presenza di alterazioni e complicazioni a livello dell'apparato cardiovascolare, causate dalla terapia con chemioterapici, quali: disfunzione miocardica e scompenso cardiaco, sindromi coronariche acute, alterazioni morfo-funzionali delle valvole cardiache, aritmie, ipertensione arteriosa sistemica, ipertensione polmonare, complicazioni pericardiche, tromboembolia, ictus (46-48). Comunque, alcune di queste alterazioni sono spesso dovute non solo all'azione dei farmaci chemioterapici, ma anche al trattamento concomitante con agenti ionizzanti e agli effetti dannosi della malattia neoplastica (43,44).

Nel 2014, il documento di esperti delle Società Internazionali American Society of Echocardiography and European Association of Cardiovascular Imaging ha definito la presenza di una cardiotossicità come una diminuzione della funzionalità ventricolare sinistra (LVEF) maggiore del 10% rispetto ad un valore del 53% (considerato valore normale) (46). Comunque, questa diminuzione dovrebbe essere confermata con ripetuti esami ecocardiografici, considerata la riproducibilità abbastanza elevata della misurazione del LVEF, soprattutto se effettuata sullo stesso individuo in tempi diversi e da differenti operatori (49-52).

Un recente documento, pubblicato nel 2019 sotto l'egida di diverse Società Scientifiche Italiane (53),

definisce la tossicità cardiovascolare in relazione con le differenti manifestazioni cliniche (scompenso cardiaco, cardiopatia ischemica, ipertensione arteriosa, aritmie, trombo-embolia). In particolare, questo documento raccomanda che tutti i pazienti trattati con farmaci antineoplastici potenzialmente cardiotossici devono essere sottoposti ad una valutazione cardiologica preliminare (53). Questa valutazione dovrebbe includere: anamnesi (volta a rilevare sintomi di patologie cardiovascolari note o misconosciute), esame obiettivo cardiovascolare e misurazione della pressione arteriosa, elettrocardiogramma (ECG), correzione dei fattori di rischio (53). Inoltre, i pazienti sottoposti a trattamenti, che possono potenzialmente indurre disfunzione ventricolare, dovrebbero essere sottoposti a misurazione della funzione miocardica mediante un esame ecocardiografico (53). In particolare, queste raccomandazioni insistono sul fatto che l'indagine ecocardiografica sia esaustiva e debba includere la misurazione delle dimensioni delle camere cardiache, della frazione di eiezione con tecnica di Simpson biplana e se disponibile con tecnica 3D, la misurazione della funzione diastolica, lo studio delle valvole e del pericardio (53). Queste linee guida raccomandano anche la misurazione del "Global Longitudinal Strain" (GLS) allo scopo di evidenziare precocemente il danno miocardico. In alcuni casi potrebbe anche essere necessario un esame più approfondito mediante altre tecniche per monitorare la funzione miocardica come l'angiografia con radionuclidi, la risonanza magnetica cardiaca e la determinazione di biomarcatori, come la troponina, che consente di rilevare il danno subclinico (53).

Sebbene le raccomandazioni di queste linee guida nazionali di esperti di cardio-oncologia del 2019 (53) siano sostanzialmente in accordo con quelle internazionali, pubblicate negli anni precedenti (anni 2014-2017) (45-48), non prendono in considerazione le raccomandazioni dell'importante documento Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (3). Infatti, secondo queste linee guida, pubblicate sotto l'egida delle Società Scientifiche di Cardiologia Europee (European Society of Cardiology, ESC), Nordamericane (American College of Cardiology, ACC, American Heart Association, AHA) e mondiale (World Heart Federation, WHF), il danno cardiaco dovrebbe essere accertato mediante la misura delle cTnI o cTnT, utilizzando metodi ad alta sensibilità (3). Ulteriori esami di laboratorio e strumentali, come quelli di imaging o funzionali (ECG, ecocardiografia, test da sforzo, o esami radiologici e NMR) sono invece indispensabili per giungere ad una corretta diagnosi differenziale tra le molteplici condizioni fisiopatologiche e cliniche che possono produrre un danno cardiaco (1,3,18,19,54,55).

È importante analizzare in dettaglio quali sono le ragioni che consigliano di preferire l'esame di laboratorio della misura con metodi hs-cTn rispetto a test funzionali e/o di imaging cardiologica per la

valutazione della presenza di un danno cardiaco nei pazienti trattati con farmaci antitumorali potenzialmente cardio-tossici. La misura con metodi hs-cTn ha una sensibilità estremamente maggiore di qualsiasi tecnica di imaging, considerando che è in grado di valutare una necrosi di tessuto cardiaco inferiore a 40 mg, che è molto al di sotto del potere di risoluzione spaziale anche delle più potenti tecniche di imaging (5,18,56). Inoltre, la riproducibilità della misura (circa 5-10% CV) e la variabilità intra-individuale (circa 4-12%) con metodi hs-cTn è molto inferiore a quelle delle tecniche ecocardiografiche e non è dipendente dall'operatore. Infatti, tutti i metodi hs-cTn sono automatizzati per ogni sistema immunometrico disponibile per i laboratori clinici e la costanza della prestazione analitica è regolarmente monitorata con accurati e standardizzati programmi di controllo di qualità interni ed esterni (57). Infine, sia il costo (circa 10-20 euro, rispetto a 50-150 euro per una ecocardiografia e 100-500 euro per un esame NMR), che l'impegno per il paziente è molto inferiore (un semplice prelievo di sangue), rispetto ad un esame ecocardiografico completo, che può durare più di 30 minuti; mentre l'esame TAC o NMR con mezzo di contrasto non è esente da inconvenienti anche seri, e gli esami di imaging cardiologico non possono essere eseguiti in alcune tipologie di pazienti (58,59).

Ormai moltissimi studi hanno dimostrato che i metodi per la misura delle troponine, soprattutto se utilizzano metodi ad alta sensibilità, sono in grado di evidenziare precocemente un danno cardiaco in pazienti con tumori, trattati con agenti chemioterapici potenzialmente cardiotossici (60-71). Come recentemente puntualizzato da Sandoval et al. (71), lo straordinario miglioramento nella sensibilità analitica dei metodi delle cTnI e cTnT ha contribuito allo sviluppo di numerose ed innovative strategie per identificare rapidamente gli individui a basso e alto rischio sia nella popolazione generale, che nei pazienti ammessi al Pronto Soccorso. In particolare, l'utilizzo di metodi hs-cTn ha fornito l'opportunità di dimostrare la loro capacità di rilevare la presenza di un danno cardiaco nei pazienti in terapia con chemioterapici, come anche di evidenziare la loro utilità nella prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari nella popolazione generale (21-30).

I più recenti studi, che hanno utilizzato metodi hs-cTn (66) e cTnT (67), hanno chiaramente confermato che un aumento nel tempo dei livelli circolanti del biomarcatore durante più cicli di trattamento è il migliore indice di rimodellamento cardiaco e quindi di progressione verso lo scompenso clinicamente conclamato, rispetto al valore di un singolo campione, ottenuto dopo un ciclo di trattamento (60,61,72). Quindi, questi studi confermano che è indispensabile eseguire sempre un prelievo basale (cioè prima di iniziare il primo ciclo di terapia) su cui successivamente confrontare il possibile aumento del

biomarcatore nei cicli successivi. Infatti, i pazienti che presentano stabili livelli circolanti del biomarcatore durante tutto il periodo del trattamento non sviluppano una disfunzione cardiaca progressiva (60,61,72). D'altra parte, i pazienti che presentano un aumento dei livelli di hs-cTn durante il trattamento possono trarre beneficio da una terapia cardio-protettiva, ad esempio con un farmaco del gruppo degli inibitori dell'enzima convertitore della angiotensina II (ACE inibitori), oppure un bloccante dei recettori della angiotensina II (gruppo dei sartani) e/o un farmaco del gruppo dei beta-bloccanti (61,72).

Con il continuo miglioramento delle terapie anti-tumorali, la sopravvivenza dei pazienti con cancro è significativamente migliorata in questi ultimi anni e, quindi, sempre più pazienti vengono considerati liberi dalla malattia neoplastica. Tuttavia, in alcuni di questi pazienti, che sono trattati con farmaci cardio-tossici, si sviluppa nei mesi successivi alla fine del trattamento oncologico una insufficienza cardiaca dapprima asintomatica e successivamente sintomatica, che è attualmente considerata una malattia progressiva, spesso non responsiva ai convenzionali farmaci anti-scompenso e che in molti casi risulta irreversibile (64,72,73). La precocità del trattamento anti-scompenso si è dimostrata cruciale al fine di ottenere un recupero funzionale, parziale o completo (39-40,64,72,73). È importante ricordare che i pazienti con scompenso cardiaco all'ultimo stadio presentano una mortalità uguale o addirittura superiore a quella dei tumori più aggressivi (73).

In conclusione, l'utilizzo routinario della misura delle hs-cTn è in grado di determinare precocemente in un paziente trattato con farmaci chemioterapici la presenza un danno cardiaco. Il biomarcatore cardio-specifico può selezionare i pazienti ad alto rischio di sviluppare nel tempo una insufficienza cardiaca sintomatica. Questi pazienti possono essere protetti con una adeguata terapia, che può scongiurare una progressione verso lo scompenso cardiaco conclamato (39-41,61,64,72).

MONITORAGGIO DEL DANNO CARDIACO IN PAZIENTI CON TUMORE IN TRATTAMENTO CON FARMACI CHEMIOTERAPICI

È assolutamente indispensabile eseguire la misura della cTnI o cTnT prima dell'inizio del trattamento con farmaci chemioterapici, anche nei pazienti del tutto asintomatici e con storia negativa per malattie cardiache, allo scopo di stabilire un valore basale pre-trattamento del biomarcatore. Considerato che i valori di riferimento dei metodi hs-cTnI sono molto differenti tra di loro (Tabella 1 e Tabella 2), è anche assolutamente indispensabile che la misura del biomarcatore sia effettuata sempre durante tutto il monitoraggio del trattamento chemioterapico nello stesso laboratorio, utilizzando lo stesso metodo immunometrico per la misura. Al contrario, per la misura della cTnT esiste un solo metodo che utilizza un valore decisionale unico non distinto per sesso (valore del 99° percentile URL: 14 ng/L) (74).

Dal punto di vista clinico, è importante sottolineare che un valore di hs-cTn sopra il 75° percentile della popolazione di riferimento (anche se ancora al di sotto del 99° percentile URL) (Tabella 1) suggerisce che il paziente presenta un rischio cardiovascolare significativamente più elevato e quindi potrebbe essere più suscettibile a presentare un progressivo rimodellamento patologico dopo un ciclo di terapia con farmaci cardiotoxici (21-28). D'altra parte, un valore al di sopra del 99° percentile URL, in accordo con le linee guida (3), stabilisce la presenza di un danno cardiaco. Il clinico dovrebbe quindi accertare la possibile causa del danno cardiaco per mezzo di altri test di laboratorio (soprattutto la misura del BNP o NT-proBNP) ed altri esami strumentali o funzionali. La presenza di un danno cardiaco accertato richiede una terapia adeguata, considerando anche il fatto che questo paziente presenta un elevato rischio di sviluppare un rimodellamento cardiaco patologico con successiva progressione verso lo scompenso cardiaco (60,61,64). Considerata la cinetica *in vivo* del biomarcatore, una rivalutazione del valore della

Tabella 2

Intervalli di riferimento di alcuni metodi ad alta sensibilità per la cTnI attualmente disponibili in Italia, come suggerito dalle aziende produttrici.

	ARCHITECT (ng/L)	ACCESS (ng/L)	ADVIA Centaur (ng/L)
Popolazione Generale	26,2	17,5 (14,0 - 42,9)	47,3 (34,4 - 64,3)
Donne	15,6	11,6 (8,4 - 18,3)	37,0 (30,2 - 72,6)
Uomini	34,2	19,8 (14,0 - 42,9)	57,3 (38,6 - 90,2)
Numero di soggetti	1531	1089	2010

Tra parentesi sono riportati gli intervalli di confidenza al 95% per il valore del 99° percentile.

ARCHITECT, metodo Architect (Abbott Diagnostics) (10,16); ACCESS, metodo Access su piattaforma DXI (Beckman Coulter Diagnostics) (11,16); ADVIA Centaur, metodo ADVIA su piattaforma Centaur XPT (Siemens Diagnostics) (13,16).

cTnI o cTnT dovrebbe essere effettuato dopo circa 2-4 settimane dal termine del primo ciclo di terapia. Infatti, la somministrazione del farmaco cardiottossico determina quasi sempre un innalzamento dei livelli del biomarcatore (rispetto al valore basale) (60,61,64), soprattutto se si utilizzano per la misura metodi ad alta sensibilità (66). Tuttavia, i valori di hs-cTn dovrebbero ritornare a livello del valore basale (pre-trattamento) nell'arco di 2-4 settimane, nei pazienti trattati che non sono a rischio per l'evoluzione rapida verso lo scompenso cardiaco (60,61,64,72). Studi recenti hanno stabilito per i metodi hs-cTn che una variazione >30% tra due misurazioni in serie del biomarcatore nello stesso soggetto/paziente deve essere considerata significativa con un intervallo di confidenza del 95% (32-35). I valori di hs-cTn dovrebbero essere successivamente ri-controllati dopo ogni ciclo di chemioterapia. I pazienti trattati che mostrano un aumento progressivo dei valori del biomarcatore, anche se ancora al di sotto del 99°percentile URL del metodo, dovrebbero essere considerati a più alto rischio di progressione verso lo scompenso cardiaco (60,61,64,72).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La misura delle cTnI e cTnT con metodi ad alta sensibilità ha già cambiato nel corso degli ultimi anni la nostra visione fisiopatologica e l'approccio clinico delle sindromi coronariche acute (1-3,5,18,19,29). Il progressivo miglioramento delle prestazioni analitiche dei metodi hs-cTn sta aprendo anche nuove possibilità per la diagnosi precoce e la prevenzione di altre patologie cardiovascolari, come la valutazione precoce di un danno cardiaco causato da trattamento con farmaci o l'uso voluttuario di droghe che sono potenzialmente cardiottossiche.

Molte evidenze si sono accumulate in questi ultimi anni che dimostrano come l'utilizzo di metodi hs-cTn sia in grado di determinare precocemente in un paziente trattato con farmaci chemioterapici la presenza di un danno cardiaco (3). In questo modo, il biomarcatore cardio-specifico può selezionare i pazienti ad alto rischio di sviluppare una insufficienza cardiaca sintomatica. Come anche raccomandato dalle più recenti linee guida internazionali (2), una più stretta collaborazione tra gli esperti della Medicina di Laboratorio e i clinici è indispensabile per interpretare correttamente i risultati dei metodi hs-cTn, specialmente nelle condizioni cliniche che presentano un danno cardiaco acuto, ma non presentano una SCA (3,18,19,54,55). In particolare, per quanto concerne il monitoraggio dei pazienti in trattamento con farmaci chemioterapici, vi è tuttora un limitato numero di studi randomizzati e controllati che utilizzano un protocollo standardizzato di monitoraggio del trattamento in grado di proteggere i pazienti con elevati valori di hs-cTn dalla progressione verso lo scompenso cardiaco conclamato (43,44,60,61,64,72). Quindi sono

indispensabili ulteriori studi che tengano conto sia delle specifiche di qualità dei metodi immunometrici di misura, come anche delle caratteristiche biologiche delle troponine cardiache (in particolare, la variabilità intra ed inter-individuale e la cinetica *in vivo*).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
2. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
4. Clerico A, Fortunato A, Ripoli A, et al. Distribution of plasma cardiac troponin I values in healthy subjects: pathophysiological considerations. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:804-8.
5. Giannoni A, Giovannini S, Clerico A. Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1167-77.
6. Prontera C, Fortunato A, Storti S, et al. Evaluation of Analytical Performance of the Siemens ADVIA TnI Ultra Immunoassay. *Clin Chem* 2007; 53:1722-3.
7. Saenger AK, Beyrau R, Braun S, et al. Multicentre analytical evaluation of a high-sensitive troponin T assay. *Clin Chim Acta* 2011;412:748-54.
8. Venge P, James S, Jansson L, et al. Clinical performance of two highly sensitive cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2009; 55:109-16.
9. Krintus M, Kozinsk M, Boudry P, et al. European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT high sensitive troponin I immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2016;52:1657-65.
10. Caselli C, Cangemi G, Masotti S, et al. Plasma cardiac troponin I concentrations in healthy neonates, children and adolescents measured with a high sensitive immunoassay method: High sensitive troponin I in pediatric age. *Clin Chim Acta* 2016;458:68-71.
11. Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:492-501.
12. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e174-6.
13. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of the analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the

- measurement of cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e229-31.
14. Clerico A, Zaninotto M, Masotti S, et al. Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cardiac troponin I and T: from theory to laboratory practice. Joint document of SIBioC and European Ligand Assay Society. *Biochim Clin* 2018;42:152-4.
 15. Clerico A, Zaninotto M, Graziani MS, et al. Specifiche di qualità, terminologia e definizione dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T. *Biochim Clin* 2018;42:335-42.
 16. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: a multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 17. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli M, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology, and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
 18. Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
 19. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018;7:553-60.
 20. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 2015;161:1566-75.
 21. Sze J, Mooney J, Barzi F, et al. Cardiac troponin and its relationship to cardiovascular outcomes in community populations. A systematic review and meta-analysis. *Heart Lung Circ* 2016;25:217-28.
 22. van der Linden N, Klinkenberg LJ, Bekers O, et al. Prognostic value of basal high-sensitive cardiac troponin levels on mortality in the general population: a meta-analysis. *Medicine* 2016;95:e5703.
 23. Hughes MF, Ojeda F, Saarela O, et al. Association of repeatedly measured high-sensitivity-assayed troponin I with cardiovascular disease events in a general population from the MORGAM/BiomarCaRE Study. *Clin Chem* 2017; 63:334-42.
 24. Zellweger MJ, Haaf P, Maraun M, et al. Predictors and prognostic impact of silent coronary artery disease in asymptomatic high-risk patients with diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 2017;244:37-42.
 25. Sigurdardottir FD, Lynbakken MN, Holmen OL, et al. Relative prognostic value of cardiac troponin I and C-reactive protein in the general population (from the North-Trøndelag Health [HUNT] Study). *Am J Cardiol* 2018; 121:949-55.
 26. Willeit P, Welsh P, Evans JDW, et al. High-sensitivity cardiac troponin concentration and risk of first-ever cardiovascular outcomes in 154,052 participants. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:558-68.
 27. Welsh P, Preiss D, Shah ASV, et al. Comparison between high-sensitivity cardiac troponin T and cardiac troponin I in a large general population cohort. *Clin Chem* 2018;64:1607-16.
 28. Zhu K, Knuiman M, Divitini M, et al. High-sensitivity cardiac troponin I and risk of cardiovascular disease in an Australian population-based cohort. *Heart* 2018;104:895-903.
 29. Eggers KM, Venge P, Lindahl B, et al. Cardiac troponin I levels measured with a high-sensitive assay increase over time and are strong predictors of mortality in an elderly population. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61:1906-13.
 30. Passino C, Aimo A, Masotti S, et al. Cardiac troponins as biomarkers for cardiac disease. *Biomark Med* 2019;13:325-30.
 31. Aakre KM, Petersen PH, Svarstad E, et al. Weekly and 90-minute biological variations in cardiac troponin T and cardiac troponin I in hemodialysis patients and healthy controls. *Clin Chem* 2014;60:838-47.
 32. van der Linden N, Hilderink JM, Cornelis T, et al. Twenty-four-hour biological variation profiles of cardiac troponin I in individuals with or without chronic kidney disease. *Clin Chem* 2017;63:1655-6.
 33. Fournier S, Iten L, Marques-Vidal, et al. Circadian rhythm of blood cardiac troponin T concentration. *Clin Res Cardiol* 2017;106:1026-32.
 34. Meijers WC, van der Velde AR, Muller Kobold AC, et al. Variability of biomarkers in patients with chronic heart failure and healthy controls. *Eur J Heart Fail* 2017;19:357-65.
 35. Zaninotto M, Padoan A, Mion MM, et al. Short-term biological variation and diurnal rhythm of cardiac troponin I (Access hs-TnI) in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2020;504:163-7.
 36. Ndreu R, Musetti V, Masotti S, et al. Evaluation of the cTnT immunoassay using quality control samples. *Clin Chim Acta* 2019;495:269-70.
 37. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of reference change values for a hs-cTnI immunoassay using both plasma samples of healthy subjects and patients and quality control samples. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:e241-3.
 38. Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high-sensitivity cTnI method: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;493:156-61.
 39. Clerico A, Masotti S, Musetti V, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of the hs-cTnI method using ADVIA Centaur XTP platform: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;495:161-6.
 40. López-Sendón J, Álvarez-Ortega C, Zamora Añón P, et al. Classification, prevalence, and outcome of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: the CARDIOTOX registry. *Eur Heart J* 2020 doi: 10.1093/eurheartj/ehaa006.
 41. Chang HM, Moudgil R, Scarabelli T, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy best practices in diagnosis, prevention, and management: part 1. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:2536-51.
 42. Chang HM, Okwuosa TM, Scarabelli T, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy best practices in diagnosis, prevention, and management: part 2. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:2552-65.
 43. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy. Clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:213-20.
 44. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 2015;133:1981-8.
 45. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Munoz D, et al.; ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J* 2016;37:2768-801.
 46. Plana JC, Galderisi M, Barac A, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European

- Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2014;15:1063-93.
47. Lopez-Fernandez T, Martin Garcia A, Santaballa Beltran A, et al. Cardio-oncohematology in clinical practice. Position paper and recommendations. *Rev Esp Cardiol* 2017;70:474-86.
 48. Armenian SH, Lacchetti C, Barac A, et al. Prevention and monitoring of cardiac dysfunction in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncology* 2017;10:893-911.
 49. Chukwu EO, Barasch E, Mihalatos DG, et al. Relative importance of errors in left ventricular quantitation by two-dimensional echocardiography: insights from three-dimensional echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2008;21:990-7.
 50. Wood PW, Choy JB, Nanda NC, et al. Left ventricular ejection fraction and volumes: it depends on the imaging method. *Echocardiography* 2014;31:87-100.
 51. Suwatanaviroj T, He W, Pituskin E, et al. What is the minimum change in left ventricular ejection fraction, which can be measured with contrast echocardiography? *Echo Res Pract* 2018;5:71-7.
 52. Suwatanaviroj T, He W, Mirhadi E, et al. Variability of left ventricular volume and ejection fraction measurements using contrast echocardiography: The influence of the left ventricular length measurements in a large cohort of patients during monitoring cardiotoxic effects of chemotherapy. *Echocardiography* 2018;35:322-8.
 53. Gori S, Barbieri E, Barni S et al. Gruppo di lavoro cardio-oncologia 2019 AIOM – AICO – ARCA – ICOS – SIAARTI – SIBioC – SIE. *Cardio-Oncologia 2019. Raccomandazioni Pratiche*. Intermedia Editore, Brescia, 2019.
 54. Valentine CM, Tcheng JE, Waites T. Translating the Translation. What clinicians should know about the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2668-70.
 55. Thygesen K. What's new in the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction? *Eur Heart J* 2018;38:3757-8.
 56. Zhang S, Uecker M, Voit D, et al. Real-time cardiovascular magnetic resonance at high temporal resolution: radial FLASH with nonlinear inverse reconstruction. *J Cardiovasc Magn Reson* 2010; 12:39.
 57. Plebani M, Sciacovelli L, Bernardi D, et al. What information on measurement uncertainty should be communicated to clinicians, and how? *Clin Biochem* 2018;57:18-22.
 58. Braga L, Vinci B, Leo CG, et al. The true cost of cardiovascular imaging: focusing on downstream, indirect, and environmental costs. *Cardiovasc Ultrasound* 2013;11:10.
 59. Malik SB, Chen N, Parker RSrd, et al. Transthoracic echocardiography: Pitfalls and limitations as delineated at cardiac CT and MR imaging. *Radiographics* 2017;37:383-406.
 60. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004;109:2749-54.
 61. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, et al. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Circulation* 2006;114:2474-81.
 62. Cao L, Zhu W, Wagar EA, et al. Biomarkers for monitoring chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017;54:87-101.
 63. Gülgün M, Fidancı K, Genç FA, et al. Natriuretic peptide and cardiac troponin levels in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Anatol J Cardiol* 2016;16:299.
 64. Cardinale D, Biasillo G, Salvatici M, et al. Using biomarkers to predict and to prevent cardiotoxicity of cancer therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17:245-56.
 65. Kitayama H, Kondo T, Sugiyama J, et al. High-sensitive troponin T assay can predict anthracycline and trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Breast Cancer* 2017;24:774-82.
 66. Jones M, O'Gorman P, Kelly C, et al. High-sensitive cardiac troponin-I facilitates timely detection of subclinical anthracycline-mediated cardiac injury. *Ann Clin Biochem* 2017;54:149-57.
 67. Michel L, Rassaf T, Totzeck M. Biomarkers for the detection of apparent and subclinical cancer therapy-related cardiotoxicity. *J Thorac Dis* 2018;10 (Suppl35):S4282-S4295.
 68. Riddell E, Lenihan D. The role of cardiac biomarkers in cardio-oncology. *Curr Probl Cancer* 2018;42:375-85.
 69. Sarocchi M, Arboscello E, Bellodi A, et al. Serial Troponin for early detection of Nivolumab cardiotoxicity in advanced non-small cell lung cancer patients. *Oncologist* 2018;23:936-42.
 70. Simões R, Silva LM, Valle Mussi Cruz AL, et al. Troponin as a cardiotoxicity marker in breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy: A narrative review. *Biomed Pharmacother* 2018;107:989-96.
 71. Sandoval Y, Sharin K, Saenger AK, et al. Clinical use of cardiac troponin for acute cardiac care and emerging opportunities in the outpatients setting. *Minerva Med* 2019;110:139-56.
 72. Cardinale D, Ciceri F, Latini R, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: A multicenter randomised trial comparing two strategies for guiding prevention with enalapril: The International CardioOncology Society-one trial. *Eur J Cancer* 2018;94:126-37.
 73. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet* 2015;385:812-24.
 74. Franzini M, Lorenzoni V, Masotti S, et al. The calculation of the cardiac troponin T 99th percentile of the reference population is affected by age, gender, and population selection: A multicenter study in Italy. *Clin Chim Acta* 2015;438:376-81.

Il contributo del laboratorio alla corretta gestione del paziente in terapia ipolipemizzante: le raccomandazioni di EFLM e della Società Europea di Aterosclerosi (EAS)

Maria Stella Graziani

Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

I dati della Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) riportano che le malattie cardiovascolari (CVD) costituiscono la prima causa di morte, in tutti i continenti eccetto l'Africa; la maggior parte di queste patologie sono attribuibili ad un limitato numero di fattori di rischio modificabili (1). Tra questi, il ruolo del colesterolo LDL (LDL-C) è consolidato da molto tempo, come pure risulta ampiamente dimostrato che la riduzione di LDL-C è legata ad una importante diminuzione del rischio di sviluppare CVD (2). Tuttavia, la considerazione che le terapie oggi a disposizione consentono il raggiungimento di concentrazioni molto basse di LDL-C, determina una particolare attenzione verso il rischio lipidico residuo di CVD, presente in una parte non piccola dei pazienti in trattamento ipolipemizzante. Questa nuova sfida necessita che venga perseguita e raggiunta una armonizzazione tra i diversi laboratori nella determinazione e nella refertazione dei profili lipoproteici per consentire una corretta gestione dei pazienti.

Il documento di Consenso di EFLM e della Società Europea di Aterosclerosi (EAS) disponibile dai primi mesi di quest'anno (3) e di cui qui di seguito viene proposta la traduzione italiana, affronta specificamente questa problematica emanando raccomandazioni che dovrebbero essere fatte proprie dai laboratoristi. Il documento è stato preceduto da altre due raccomandazioni di consenso (sempre a cura di EFLM e EAS) fondamentali in questo ambito (4, 5) relative rispettivamente alla possibilità di misurare i profili lipidici anche in soggetti non a digiuno (4) e alle indicazioni per una corretta quantificazione dei profili lipidici (5). Le indicazioni anticipate in questi due documenti preliminari vengono qui riassunte e rafforzate fornendo ad esse una base ampia di evidenze, e includendo ogni fase del "total testing process" di laboratorio.

Il documento si articola in 9 quesiti per ognuno dei quali vengono fornite risposte e raccomandazioni specifiche; queste sono evidenziate in riquadri che rendono facile la loro lettura e comprensione anche da

coloro che desiderano dedicare all'intero documento solo una parziale attenzione.

In questa presentazione, desidero sottolineare e commentare alcuni dei punti salienti delle raccomandazioni, al fine di focalizzare la considerazione del lettore sulle azioni principali che occorrerebbe intraprendere all'interno dei laboratori clinici al più presto. È intuitivo infatti che solo l'armonizzazione dei percorsi intra-laboratorio può condurre ad una appropriata gestione del paziente con dislipidemia; questi percorsi sono d'altra parte semplici da attuare, considerato che per essi esistono raccomandazioni precise e affidabili e poco impegnative da assumere.

Raccomandazioni per la richiesta

Il profilo lipidico standard è costituito da colesterolo totale (CT), HDL (HDL-C), LDL-C, e trigliceridi (TG), con l'aggiunta del calcolo del colesterolo non HDL (non-HDL-C) in alcuni contesti clinici. Quest'ultimo parametro, che non richiede alcun costo aggiuntivo per il laboratorio e che può essere facilmente implementato nel sistema informativo di laboratorio, è utile alla definizione del rischio CVD e come obiettivo terapeutico secondario, in particolare nei pazienti con ipertrigliceridemia anche lieve; il non-HDL-C consente infatti di valutare il rischio aterogenico aggiuntivo rispetto al LDL-C, dovuto alla presenza del colesterolo contenuto nelle lipoproteine remnants.

La misura di apoB è superiore alla misura o alla stima di LDL-C e non-HDL-C quando si valuti l'esposizione di un individuo alle lipoproteine aterogene; in particolare nei pazienti con ipertrigliceridemia da lieve a moderata, (2-10 mmol/L; 177-890 mg/dL) (33). Valori di apoB elevati sia basali che durante il trattamento ipolipemizzante, aiutano ad identificare la presenza di una dislipidemia aterogenica correlata ai remnants e con particelle LDL piccole e dense, che non viene evidenziata dai valori di LDL-C e di non-HDL-C. Tuttavia, non ci sono prove di evidenza sufficientemente robuste per poter suggerire di misurare apoB al posto del LDL-C

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

Ricevuto: 02.08.2020

Accettato: 03.08.2020

Publicato on-line: 26.08.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.078

e/o non-HDL-C per guidare la terapia e non sono stati ancora fissati gli obiettivi terapeutici. La misura di apoB non è pertanto inclusa nel profilo lipidico standard.

La misura di Lp(a) dovrebbe essere effettuata almeno una volta nella vita di una persona adulta, in particolare nei pazienti con CVD precoce o con familiarità per CVD o con malattia ricorrente nonostante il trattamento con statine, ma non dovrebbe essere inclusa nella ripetizione dei profili lipidici dello stesso paziente perché mancano farmaci che elettivamente ne modifichino la concentrazione sierica.

Fase pre-analitica

Il digiuno non è necessario per l'esecuzione di un profilo lipidico iniziale; il digiuno potrebbe essere considerato se i TG del profilo non a digiuno risultassero >4,5 mmol/L (400 mg/dL). Questa indicazione potrebbe semplificare molto l'accesso al laboratorio e quindi incoraggiare più individui a sottoporsi all'esame; tuttavia essendo stato dimostrato che i valori dei parametri lipidici non cambiano in modo significativo se determinati su prelievi eseguiti a digiuno o meno (4), la determinazione del profilo lipidico può agevolmente essere inclusa nel prelievo eseguito a digiuno per altre indicazioni (ad esempio per la glicemia a digiuno o per parametri con uno specifico ritmo circadiano).

Fase analitica

I metodi diretti per la determinazione di LDL-C dovrebbero essere usati quando la concentrazione di TG è >4,5 mmol/L (400 mg/dL) negli altri casi è possibile utilizzare la stima del LDL-C con la formula di Friedewald [o di Martin-Hopkins, utile se LDL-C è particolarmente basso (<1,8 mmol/L; 70 mg/dL)]. È necessario peraltro essere consapevoli che anche i metodi diretti non assicurano maggiore accuratezza della misura in tutti i pazienti. La scelta se utilizzare i metodi diretti o la stima del LDL-C dipende dal singolo laboratorio (numerosità degli esami e risorse disponibili) in quanto entrambe le opzioni mostrano vantaggi e svantaggi non eliminabili, questi ultimi particolarmente presenti nei pazienti con ipertrigliceridemia.

A causa della scarsa accuratezza della misura e/o della stima del LDL-C e della variabilità riscontrata tra i metodi disponibili, è opportuno che il monitoraggio in corso di trattamento sia eseguito con lo stesso metodo e nello stesso laboratorio. Un valore di LDL-C prossimo alla soglia decisionale terapeutica, dovrebbe essere confermato con misure ripetute (almeno 2).

Refertazione

I referti dei profili lipidici dovrebbero contenere segnalazioni di allarme sulla base dei valori soglia per il rischio CVD e non sulla base dei valori di riferimento (opportuni solo per la popolazione pediatrica). A causa della diffusione di uno stile di vita poco salutare (specialmente nel mondo occidentale, ma non solo) nella maggior parte dei soggetti, i valori di riferimento

superiori di CT, LDL-C, e TG sono infatti elevati e molto al di sopra dei valori soglia di aumentato rischio; i valori di riferimento sul referto diventano di conseguenza inutili ed anche fuorvianti. Valori particolarmente elevati, come ad esempio quelli indicativi di ipercolesterolemia famigliare o di ipertrigliceridemia importante, dovrebbero essere segnalati con commenti specifici e appropriati.

CONCLUSIONI

La maggior parte delle raccomandazioni del documento erano già presenti, anche se a volte con una diversa declinazione, nelle raccomandazioni SIBioC del 2016 (6) che si dimostrano così ancora valide ed attuali, a conferma dell'interesse e dell'impegno della Società e dei suoi Gruppi di Lavoro dedicati all'argomento.

È necessario che i laboratori clinici si allineino al più presto alle indicazioni contenute nel documento, le sole in grado di garantire ai pazienti il corretto inquadramento diagnostico e un adeguato monitoraggio della terapia. La maggior parte di queste indicazioni non implica aumenti di costi né l'adozione di procedure più complicate di quelle esistenti. Di conseguenza, si possono intravedere poche motivazioni per una loro mancata e tempestiva adozione.

È stato recentemente dimostrato che in Europa l'aderenza alle linee-guida esistenti in questo campo non sia ottimale e come questo possa avere un impatto clinico negativo (7). Mi auguro fortemente che la pubblicazione della traduzione di queste raccomandazioni, che vanno nel segno di una consolidata tradizione della nostra Società, sia di sprone ai laboratoristi Italiani per migliorare questa situazione e costituire sperabilmente una "testa di ponte" italiana che serva a contribuire alla rilevanza della nostra disciplina in Europa.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organisation. Global Health Estimates 2016. Disease burden by cause, age, sex, Country and region. Geneva 2018. https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html (ultimo accesso: luglio 2020).
2. Catapano AL, Graham I, De Backer G, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis* 2016;253:281–344.
3. Langlois MR, Nordestgaard BG, Langsted A, et al. Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:496-517.
4. Børge G, Nordestgaard BG, Langsted A, Mora S et al. Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points—a joint consensus statement from the European Atherosclerosis

- Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur Heart J* 2016;37:1944–58.
5. Langlois MR, Chapman MJ, Cobbaert C et al. Quantifying atherogenic lipoproteins: current and future challenges in the era of personalized medicine and very low concentrations of LDL cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM. *Clin Chem* 2018;64:1006-33.
 6. Graziani MS, Ceriotti F, Zaninotto M et al. La diagnostica di laboratorio delle dislipidemie. *Biochim Clin* 2016;40:338-46.
 7. De Wolf HA, Langlois MR, Suvisaari J, et al. How well do laboratories adhere to recommended guidelines for dyslipidaemia management in Europe? The CARDiac MARKer Guideline Uptake in Europe (CAMARGUE) study. *Clin Chim Acta* 2020 doi: 10.1016/j.cca.2020.05.038.

Quantificazione delle lipoproteine aterogeniche per le terapie ipolipemizzanti: Raccomandazioni di Consenso della European Atherosclerosis Society (EAS) e di EFLM

Michel R. Langlois¹, Børge G. Nordestgaard², Anne Langsted², Pia R. Kamstrup², M. John Chapman^{3,4}, Kristin M. Aakre⁵, Hannsjörg Baum⁶, Jan Borén and Olov Wiklund^{7,8}, Eric Bruckert⁹, Alberico Catapano^{10,11}, Christa Cobbaert¹², Paul Collinson^{13,14}, Olivier S. Descamps^{15,16}, Christopher J. Duff¹⁷, Arnold von Eckardstein¹⁸, Angelika Hammerer-Lercher¹⁹, Genovefa Kolovou²⁰, Florian Kronenberg²¹

¹Department of Laboratory Medicine, AZ St-Jan, Ruddershove 10, B-8000 Brugge, Belgium

²Herlev and Gentofte Hospital, Copenhagen University Hospital, University of Copenhagen, Denmark

³National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Paris, France

⁴Endocrinology-Metabolism Service, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

⁵Hormone Laboratory, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

⁶Institute for Laboratory Medicine, Mikrobiologie und Blutdepot, Regionale Kliniken Holding RKH GmbH, Ludwigsburg, Germany

⁷Institute of Medicine, Sahlgrenska Academy at Göteborg University, Gothenburg, Sweden

⁸Wallenberg Laboratory for Cardiovascular and Metabolic Research, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Sweden

⁹Department of Endocrinology and Prevention of Cardiovascular Disease, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

¹⁰Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Milan, Italy

¹¹Multimedica, Milan, Italy

¹²Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

¹³Department of Clinical Blood Sciences, St George's University Hospitals NHS Foundation Trust and St George's University of London, London, UK

¹⁴Department of Cardiology, St George's University Hospitals NHS Foundation Trust and St George's University of London, London, UK

¹⁵Department of Internal Medicine, Centres Hospitaliers Jolimont, Haine-Saint-Paul, Belgium

¹⁶Department of Cardiology, UCL Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium

¹⁷Department of Clinical Biochemistry, University Hospitals of North Midlands NHS Trust, Stoke-on-Trent, UK

¹⁸Institute for Clinical Chemistry, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

¹⁹Kantonsspital Aarau AG, Institute for Laboratory Medicine, Aarau, Switzerland

²⁰Cardiology Department, Onassis Cardiac Surgery Center, Athens, Greece

²¹Department of Medical Genetics, Molecular and Clinical Pharmacology, Division of Genetic Epidemiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

Traduzione a cura di Martina Zaninotto (Padova) e Diletta Onorato (Verona)

Questo articolo è la traduzione di "Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: consensus-based recommendations from EAS and EFLM", Clin Chem Lab Med 2020;58:496-517. La versione originale è disponibile come materiale supplementare (1S).

This is an Italian translation of "Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: consensus-based recommendations from EAS and EFLM". The EFLM has not endorsed nor approved the content of the translation. The official version of the document is located at <https://www.eflm.eu/site/publications>. Users should cite this official version when quoting the document.

Ricevuto: 16.07.2020

Accettato: 16.07.2020

Pubblicato on-line: 26.08.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.078

ABSTRACT

The joint consensus panel of the European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) recently addressed present and future challenges in the laboratory diagnostics of atherogenic lipoproteins. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), LDL cholesterol (LDL-C), and calculated non-HDL-C (=total – HDL-C) constitute the primary lipid panel for estimating risk of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) and can be measured in the nonfasting state. LDL-C is the primary target of lipid lowering therapies. For on-treatment follow-up, LDL-C shall be measured or calculated by the same method to attenuate errors in treatment decisions due to marked between-methods variations. Lipoprotein(a) [Lp(a)]- cholesterol is part of measured or calculated LDL-C and should be estimated at least once in all patients at risk of ASCVD, especially in those whose LDL-C declines poorly upon statin treatment. Residual risk of ASCVD even under optimal LDL-lowering treatment should be also assessed by non-HDL-C or apolipoprotein B (apoB), especially in patients with mild-to-moderate hypertriglyceridemia (2–10 mmol/L). Non-HDL-C includes the assessment of remnant lipoprotein cholesterol and shall be reported in all standard lipid panels. Additional apoB measurement can detect elevated LDL particle (LDLP) numbers often unidentified on the basis of LDL-C alone. Reference intervals of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins are reported for European men and women aged 20–100 years. However, laboratories shall flag abnormal lipid values with reference to therapeutic decision thresholds.

INTRODUZIONE

In questa nuova era nella quale concentrazioni di colesterolo LDL (LDL-C) molto basse sono raggiungibili con nuove e più potenti terapie ipolipemizzanti, un'attenzione crescente viene rivolta alla valutazione del rischio residuo di malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD) legato ai lipidi, attraverso l'utilizzo di biomarcatori in aggiunta a LDL-C (1).

Un importante pre-requisito per indirizzare le sfide, presenti e future, nella prevenzione di ASCVD, è l'armonizzazione dei profili lipidici e lipoproteici sierici, ottenibili con esami e tecnologie di laboratorio sia consolidati che emergenti. A tal fine, il gruppo multidisciplinare di consenso della società Europea di Aterosclerosi (EAS) e EFLM hanno recentemente pubblicato le raccomandazioni per la quantificazione delle lipoproteine aterogeniche su campioni di sangue di soggetti sia digiuno che non a digiuno (1, 2). Questo articolo riassume le raccomandazioni di consenso di questo gruppo di esperti, che ha come scopo quello di fornire appropriate istruzioni sulle fasi preanalitica, analitica e post-analitica degli esami di laboratorio relativi alle lipoproteine aterogeniche. Le raccomandazioni principali sono elencate in Tabella 1. Nelle Tabelle 2 e 3 sono riportate le concentrazioni di riferimento per i lipidi e le apolipoproteine calcolate su 54 129 donne e 42 126 uomini europei, tra i 20 e 100 anni, ricavate dal "Copenhagen General Population Study" su prelievi effettuati non a digiuno ed in assenza di terapia ipolipemizzante (3).

I. QUALI LIPOPROTEINE ATEROGENICHE DOVREBBERO ESSERE MISURATE?

Particelle LDL

La determinazione di LDL-C è una componente chiave nella gestione del rischio di ASCVD (4-6). Le particelle circolanti LDL (LDL-Ps) sono altamente

aterogeniche ed esiste una relazione diretta e graduale tra la concentrazione di LDL-C e l'incidenza di ASCVD osservata negli studi controllati randomizzati, negli studi epidemiologici prospettici di coorte, e negli studi Mendeliani randomizzati (7,8).

Nonostante l'importante evidenza che le terapie dirette contro LDL-C riducono efficacemente ASCVD nella popolazione, molti individui manifestano eventi legati ad ASCVD o progressione di aterosclerosi malgrado non abbiano un LDL-C elevato o anche concentrazioni <1,8 mmol/L (<70 mg/dL) (9). Questo rischio residuo indica che l'attenzione esclusiva alla misura del LDL-C non è una strategia ottimale per tutti i pazienti; questo è in parte spiegato dal sempre maggiore numero di evidenze che dimostrano come il legame causale maggiore con ASCVD derivi dal numero di LDL-Ps, misurato con tecniche di subfrazionamento lipoproteico, piuttosto che dal contenuto di colesterolo delle particelle (9, 10).

Tutte le LDL-Ps sono aterogeniche, ma la loro concentrazione non è sempre correlata al valore di LDL-C perché il contenuto di colesterolo nelle singole particelle può variare ampiamente tra individui, a causa del continuo rimodellamento delle lipoproteine nel sangue (10). Le subfrazioni di LDL di piccole dimensioni, impoverite di lipidi, contengono meno colesterolo rispetto a quelle più grandi. Queste sono tipicamente presenti in grande quantità in pazienti con concentrazioni di trigliceridi (TG) moderatamente elevate o con patologie correlate, come diabete e sindrome metabolica, senza che si riscontrino necessariamente concentrazioni di LDL-C elevate (11). Queste LDL-Ps "compatte" derivano da particelle più grandi a densità molto bassa (VLDL), ricche in TG, e sono dovute allo scambio di TG con gli esteri del colesterolo (Figura 1). Contemporaneamente, si formano con questa modalità anche le particelle più piccole di lipoproteine ad alta densità (HDL), come si osserva tipicamente nella triade dislipidica aterogena composta da ipertrigliceridemia, aumento di LDL-P piccole e dense, e bassa

concentrazione di colesterolo HDL (HDL-C) (11).

Mentre studi precedenti hanno enfatizzato l'aterogenicità delle piccole LDL-Ps, è ora riconosciuto che tutte le LDL-Ps sono aterogeniche, indipendentemente dalla dimensione (10). Pertanto, la terapia dovrebbe concentrarsi sulla riduzione del numero delle LDL-Ps, senza bisogno di distinguere tra subfrizioni di LDL (1). La misura della apolipoproteina B (apoB), la maggior componente proteica delle LDL, o la misura di LDL-P (non ancora diffusamente disponibile) possono anche essere usate per valutare il numero di LDL-Ps (10,12).

Il rapporto tra colesterolo totale (CT) e HDL-C è stato

proposto come marcatore surrogato del numero di LDL-Ps associato a concentrazioni basse di HDL-C e pertanto ad un rapporto più alto CT/HDL-C negli individui con dislipidemia aterogenica (10). Il rapporto CT/HDL-C può essere considerato come un'alternativa alla misura di LDL-P per la valutazione del rischio, ma non per la diagnosi o come obiettivo decisionale terapeutico perché un valore basso del rapporto dovuto ad un HDL-C elevato può essere fuorviante: in questa evenienza si può infatti presumere un basso rischio anche se il paziente ha un elevato LDL-C. I componenti del rapporto, CT e HDL-C, devono essere valutati separatamente.

Tabella 1

Raccomandazioni principali EAS/EFLM per la misura delle lipoproteine aterogeniche (1,2)

Fase preanalitica (richiesta)

- Una valutazione completa delle lipoproteine aterogeniche dovrebbe includere determinazioni idonee a valutare il rischio derivante dalle particelle LDL, dai remnant e, in casi selezionati, da Lp(a).

Fase preanalitica (prelievo)

- Il digiuno non è abitualmente richiesto per valutare il profilo lipidico.
- Considerare di esaminare campioni prelevati a digiuno se i TG a digiuno sono >4,5 mmol/L (400 mg/dL); comunque questo non è un requisito indispensabile.
- Prelevare 2-3 campioni successivi di sangue, a distanza di almeno una settimana, per valutare la variabilità biologica (parametro importante quando i risultati degli esami sono vicini ai valori decisionali per il trattamento).^a

Fase analitica (misura degli analiti)

- Il monitoraggio di LDL-C, calcolato o misurato, e di non-HDL-C di un paziente, a partire dalla determinazione basale e per tutte le determinazioni da eseguire durante la terapia, dovrebbe essere idealmente effettuato con lo stesso metodo (e preferibilmente nello stesso laboratorio).^b
- I clinici dovrebbero essere avvisati quando il laboratorio cambia il metodo di misura per uno di questi esami.
- L'equazione di Martin-Hopkins può essere preferibile per il calcolo di LDL-C in pazienti con basse concentrazioni di LDL-C (<1,8 mmol/L; 70 mg/dL) e/o concentrazioni di TG 2,0-4,5 mmol/L (175-400 mg/dL), e in tutti i campioni prelevati non a digiuno.
- Il valore di LDL-C dovrebbe essere ottenuto con il metodo diretto quando la concentrazione dei TG è >4,5 mmol/L (400 mg/dL) e quando viene utilizzato per il calcolo del Remnant-C.
- Il LDL-C-corretto per Lp(a) dovrebbe essere determinato almeno una volta nei pazienti noti (o sospetti) per avere un livello elevato di Lp(a), o se il paziente dimostra una scarsa risposta alla terapia volta a diminuire LDL-C.
- La determinazione di apoB attualmente fornisce la misura più accurata del carico globale di particelle aterogeniche, sia a digiuno che non a digiuno.

Fase post-analitica (referto)

- I laboratori dovrebbero calcolare automaticamente e refertare in ogni profilo lipidico, il non-HDL-C.
- I referti di laboratorio dovrebbero evidenziare concentrazioni anomale di lipidi identificate sulla base dei valori soglia decisionali.
- Concentrazioni estremamente elevate oltre i limiti di riferimento, dovrebbero essere allarmate eventualmente attraverso un commento interpretativo indirizzato al clinico sul referto.

Fase post-post-analitica (interpretazione ed utilizzo dell'esame)

- LDL-C è il bersaglio principale della terapia ipolipemizzante.
- Quando l'obiettivo terapeutico per LDL-C viene raggiunto, nei pazienti con TG 2-10 mmol/L (175-890 mg/dL), con diabete, obesità e/o sindrome metabolica, si dovrebbero considerare quali obiettivi terapeutici secondari il non-HDL-C o l'apoB.

^a Evitare le determinazioni entro 2 mesi da un infarto miocardico acuto, trauma acuto, intervento chirurgico, infezione acuta o malattie infiammatorie, o gravidanza. I pazienti dovrebbero mantenere la loro dieta abituale nelle 2 settimane precedenti ed evitare esercizio fisico estremo.

^b Separare il siero dalle cellule (centrifugazione) entro 3 ore dal prelievo di sangue ed eseguire le determinazioni entro 1-2 giorni dal prelievo. Comunque, prima di essere analizzati, i campioni possono essere conservati a 4° C per 3 giorni, a -20° C per un mese, e a -80° C per 1-2 anni.

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

Tabella 2

Distribuzione della concentrazione di lipidi, lipoproteine, e apolipoproteine in campioni prelevati non a digiuno in 54 129 donne non in terapia ipolipemizzante, dal Copenhagen General Population Study.

Età del gruppo (anni)	Percentili									
	2,5		25		50		75		97,5	
	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL
Trigliceridi										
20-39	0,45	40	0,73	65	0,98	87	1,4	121	2,8	248
40-65	0,50	44	0,84	74	1,2	103	1,7	148	3,6	317
66-100	0,59	52	0,98	87	1,4	120	1,9	170	3,8	340
Colesterolo totale										
20-39	3,3	127	4,2	162	4,7	182	5,3	205	6,9	267
40-65	3,8	147	5,0	193	5,6	217	6,3	244	7,9	306
66-100	4,3	166	5,5	213	6,1	236	6,8	263	8,2	317
Colesterolo LDL										
20-39	1,4	54	2,1	81	2,6	101	3,1	120	4,4	170
40-65	1,7	66	2,6	101	3,2	124	3,8	147	5,3	205
66-100	1,9	73	3,0	116	3,5	135	4,1	159	5,5	213
Colesterolo dei remnants										
20-39	0,19	7,4	0,33	13	0,45	17	0,62	24	1,2	48
40-65	0,21	8,1	0,38	15	0,53	20	0,76	29	1,5	60
66-100	0,26	10	0,45	17	0,61	24	0,86	33	1,6	62
Colesterolo non-HDL										
20-39	1,7	67	2,6	99	3,1	118	3,7	142	5,3	203
40-65	2,1	82	3,1	121	3,8	147	4,6	176	6,3	242
66-100	2,4	93	3,5	137	4,2	162	4,9	190	6,5	251
Colesterolo HDL										
20-39	0,91	35	1,3	51	1,6	61	1,9	73	2,5	98
40-65	0,93	36	1,4	55	1,7	67	2,1	80	2,8	108
66-100	0,98	38	1,5	58	1,9	72	2,2	86	3,0	117
Lipoproteina (a)										
20-39	1,1	1,4	5,4	4,3	15	8,5	43	22	207	97
40-65	1,6	1,5	6,8	4,9	17	9,8	60	30	242	113
66-100	1,9	1,6	7,4	5,2	19	10	64	31	250	116
Apolipoproteina B										
20-39	0,51	51	0,69	69	0,82	82	0,98	98	1,47	147
40-65	0,59	59	0,83	83	1,00	100	1,21	121	1,79	179
66-100	0,67	67	0,94	94	1,11	111	1,31	131	1,87	187

I trigliceridi, il colesterolo totale, il colesterolo HDL e l'apolipoproteina B sono stati misurati su analizzatori automatizzati (Thermo Scientific Konelab, Vantaa, Finlandia). Il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula di Friedewald quando i trigliceridi erano <4 mmol/L (355 mg/dL) ed è stato misurato direttamente (Konelab) quando erano superiori a tale valore. Il colesterolo non-HDL è stato calcolato sottraendo il colesterolo HDL al colesterolo totale. Nei primi 5592 individui inclusi nello studio la lipoproteina (a) è stata misurata con metodi immunoturbidimetrici non sensibili alle diverse isoforme (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Germania), mentre nei rimanenti soggetti è stato utilizzato un metodo sensibile alle diverse isoforme di Lp(a) (Denka Seiken, Tokyo, Giappone) o il metodo Roche di seconda generazione sviluppato da Denka Seiken (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) (3).

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

Tabella 3

Distribuzione delle concentrazioni di lipidi, lipoproteine, e apolipoproteine in campioni prelevati non a digiuno in 42 126 uomini non in terapia ipolipemizzante, dal Copenhagen General Population Study.

Età del gruppo (anni)	Percentili									
	2,5		25		50		75		97,5	
	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL
Trigliceridi										
20-39	0,54	48	0,96	85	1,4	128	2,2	190	5,1	454
40-65	0,61	54	1,10	100	1,7	146	2,5	219	5,5	485
66-100	0,62	55	1,10	98	1,6	140	2,3	201	4,6	404
Colesterolo totale										
20-39	3,3	128	4,3	166	4,9	189	5,6	217	7,2	278
40-65	3,9	151	5,0	193	5,6	217	6,3	244	7,9	305
66-100	3,8	147	5,0	193	5,6	217	6,3	244	7,6	294
Colesterolo LDL										
20-39	1,5	58	2,4	93	2,9	112	3,5	135	5,0	193
40-65	1,8	70	2,8	108	3,4	131	4,0	155	5,4	209
66-100	1,8	70	2,7	104	3,3	128	3,9	151	5,0	193
Colesterolo dei remnants										
20-39	0,22	8,5	0,43	17	0,64	25	0,95	37	1,8	71
40-65	0,25	10	0,51	20	0,74	29	1,1	43	2,0	76
66-100	0,27	10	0,50	19	0,71	27	1,0	39	1,7	67
Colesterolo non-HDL										
20-39	2,0	76	3,0	115	3,6	140	4,4	170	6,2	238
40-65	2,4	92	3,6	137	4,3	164	5,5	213	6,6	255
66-100	2,3	89	3,4	133	4,1	158	4,8	184	6,1	237
Colesterolo HDL										
20-39	0,67	26	1,0	39	1,2	85	1,5	56	2,0	76
40-65	0,72	28	1,1	42	1,3	52	1,7	64	2,4	93
66-100	0,76	29	1,2	46	1,5	56	1,8	70	2,6	101
Lipoproteina (a)										
	nmol/L	mg/dL	nmol/L	mg/dL	nmol/L	mg/dL	nmol/L	mg/dL	nmol/L	mg/dL
20-39	1,0	1,2	5,5	4,3	14	8,3	49	24	219	102
40-65	1,1	1,4	5,8	4,4	15	8,9	51	25	226	105
66-100	1,1	1,4	6,2	4,6	17	9,5	50	25	211	99
Apolipoproteina B										
	g/L	mg/dL	g/L	mg/dL	g/L	mg/dL	g/L	mg/dL	g/L	mg/dL
20-39	0,56	56	0,81	81	0,99	99	1,22	122	1,86	186
40-65	0,67	67	0,96	96	1,16	116	1,41	141	2,04	204
66-100	0,66	66	0,93	93	1,11	111	1,32	132	1,86	186

I metodi per la misura dei parametri sono gli stessi indicati nella Tabella 2

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

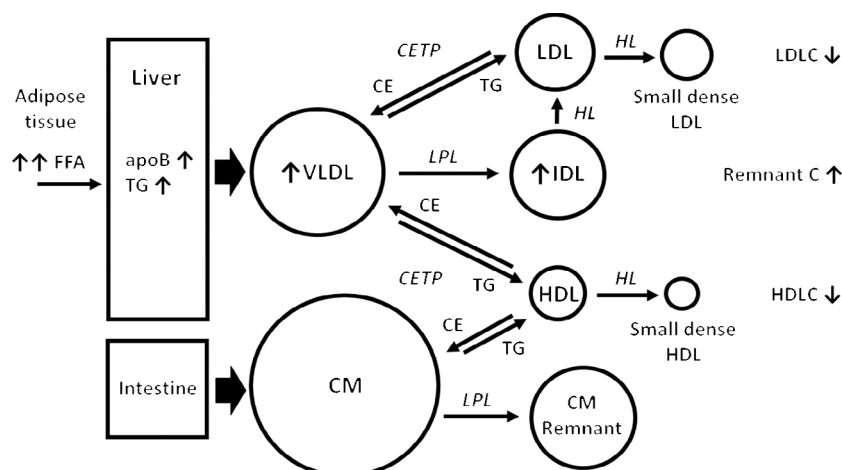


Figura 1

Rimodellamento intravascolare delle lipoproteine che contribuiscono al tipico profilo lipidico sierico della dislipidemia aterogena. I chilomicroni (CM) ricchi in trigliceridi (TG) secreti dall'intestino, e le VLDL secrete dal fegato, sono rimodellate in circolo principalmente per l'azione della lipoprotein-lipasi (LPL), della lipasi epatica (HL), e della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP). L'idrolisi di TG da parte di LPL, che porta alla liberazione di acidi grassi liberi (FFA), e all'acquisizione di esteri del colesterolo (CE) dalle HDL tramite la CETP, genera particelle remnant più piccole, arricchite di colesterolo, che sono impoverite di parte del loro contenuto di TG e contribuiscono all'aumento delle concentrazioni di Remnant-C misurate nel siero. L'elevata produzione di VLDL che risulta dal flusso di FFA al fegato, attiva la CETP, e porta ad un arricchimento in TG di HDL e LDL attraverso un aumentato scambio e trasferimento di TG ed esteri del colesterolo. Queste particelle LDL e HDL, impoverite di colesterolo, e ricche di TG vengono modificate anche da HL, producendo LDL e HDL più piccole e contribuendo a diminuire la concentrazione sierica di LDL-C e HDL-C rispettivamente, come si evidenzia tipicamente nel profilo lipidico sierico di un paziente con dislipidemia aterogena, frequentemente accompagnato da insulino-resistenza e da sindrome metabolica con aumentato

Particelle Remnant

L'accumulo post-prandiale di particelle remnant ricche di TG nel sangue è un fattore importante nell'aterogenesi (13,14). Queste lipoproteine presentano un contenuto elevato di colesterolo, che non viene rilevato nei classici profili lipidici eseguiti a digiuno. Profili lipidici eseguiti su campioni prelevati non a digiuno, pertanto, possono potenzialmente essere più rilevanti per la valutazione del rischio cardiovascolare individuale rispetto a quelli eseguiti a digiuno, poiché nella vita reale all'interno del nostro ritmo circadiano, lo stato postprandiale è preponderante (15,16). I chilomicroni, ricchi di TG secreti dall'intestino, e le VLDL secrete dal fegato, sono rapidamente depauperate in circolo di parte del loro contenuto di TG e acquisiscono esteri del colesterolo dalle HDL (Figura 1). Queste particelle remnant ricche di colesterolo possono entrare nell'intima delle arterie e contribuire all'aterosclerosi, mentre i chilomicroni nascenti e le particelle VLDL molto grandi non sono in grado di attraversare lo strato endoteliale (17). Studi con randomizzazione Mendeliana suggeriscono che perduranti elevate concentrazioni sieriche di lipoproteine ricche di TG o i loro remnant, sono causalmente associati con un aumentato rischio di ASCVD e di mortalità per tutte le cause (17-18).

Sono stati sviluppati metodi diretti "omogenei" per misurare specificamente il colesterolo nelle particelle remnant (Remnant-C) e alcuni di questi hanno mostrato associazioni significative di Remnant-C con ASCVD (19,

20). Un'alternativa è di calcolare il Remnant-C come $CT - HDL-C - LDL-C$, perché il Remnant-C corrisponde a tutto il colesterolo non-LDL e non-HDL, che si trova nelle VLDL e nelle lipoproteine a densità intermedia (IDL). Nello stato di non-digiuno, una quantità relativamente piccola di colesterolo può anche essere trovata nei remnant dei chilomicroni. Poiché sia i chilomicroni appena secreti che le VLDL vanno entrambi rapidamente incontro a lipolisi, ogni residuo circolante di chilomicroni e VLDL può essere considerato remnant (17). Nel calcolo di Remnant-C dovrebbe preferibilmente essere usata la misura diretta di LDL-C (dLDL-C); diversamente il Remnant-C equivale semplicemente a $TG/2,2$ (in mmol/L) o $TG/5$ (in mg/dL) quando si utilizzi il valore di LDL-C calcolato con la formula di Friedewald, [per esempio $CT - HDL-C - (CT - HDL-C - TG/2,2)$, se espressi in mmol/L] (o $TG/5$ se in mg/dL), e non aggiunge informazioni cliniche aggiuntive rispetto alla concentrazione di TG (1); comunque, questo metodo focalizza l'attenzione sul contenuto di colesterolo dei remnant piuttosto che sul contenuto di TG.

Il Remnant-C contribuisce anche al non-HDL-C che viene calcolato come $CT - HDL-C$ (1). Questo valore è indipendente dalla formula di Friedewald e pertanto non è così strettamente correlato con la concentrazione di TG calcolato come Remnant-C e rappresenta, di conseguenza, un ulteriore marcatore clinicamente utile. Il Remnant-C, misurato o calcolato, differisce dal non-

HDL-C perché quest'ultimo contiene il Remnant-C più LDL-C, e non è in grado di differenziare tra questi due fattori di rischio causali (1). Il non-HDL-C include anche il colesterolo della lipoproteina (a) [Lp(a)].

Particelle di Lipoproteina (a)

Lp(a) è una particella simile alle LDL con una molecola di apoB alla quale è legata un'ulteriore apolipoproteina, apo(a). Questa apolipoproteina mostra un considerevole polimorfismo relativamente alle sue dimensioni: è caratterizzata infatti da un numero variabile di sequenze ripetute *kringle* IV tipo 2 (KIV-2) di apo(a) (21, 22). Questo polimorfismo è il determinante più importante della quantità di Lp(a) prodotta dal fegato: la concentrazione sierica di Lp(a) e il numero di ripetizioni di KIV-2 sono inversamente correlati, originando marcate variazioni nella concentrazione di Lp(a) geneticamente determinata (21,22). Elevate concentrazioni di Lp(a) basali superiori all'80° percentile della popolazione generale (50 mg/dL; 105 nmol/L), in un paziente trattato con statine, costituiscono un importante fattore di rischio genetico per malattie cardiovascolari, indipendente da LDL-C (23,24). Questa condizione clinica è riconosciuta dai codici dell'“International Classification of Diseases” per concentrazioni di Lp(a) elevate e per anamnesi familiari di Lp(a) elevata, in risposta alle raccomandazioni dell'“US National Heart, Lung, and Blood Institute” [25]. Un'elevata concentrazione di Lp(a) dovuta ad un corrispondente basso numero di ripetizioni KIV-2 è anche associata ad un rischio maggiore di mortalità nella popolazione generale (3).

Una delle maggiori differenze tra Lp(a) e LDL-PS è che le LDL-PS sono efficacemente diminuite dalle statine, mentre Lp(a) è tipicamente resistente a questo trattamento [24]. Nei pazienti trattati con statine, il rischio associato a Lp(a) per ASCVD diventa un predittore migliore di rischio residuo, non appena il rischio associato a LDL si abbassa in seguito alla terapia con statine (24). Sebbene gli inibitori della “proprotein convertase subtilisin/kexin type 9” (PCSK9) e altre nuove terapie diminuiscano la concentrazione di Lp(a) e possano contribuire alla riduzione di ASCVD (26,27), non è ancora noto se la diminuzione di Lp(a) contribuisca per sé al beneficio clinico di queste nuove terapie (25). Sebbene gli studi recenti con gli inibitori di PCSK9 non siano stati appositamente disegnati per pazienti con elevate concentrazioni di Lp(a), hanno tuttavia consentito di osservare che i pazienti con concentrazioni basali di Lp(a) più elevate, ottengono le più significative riduzioni in valore assoluto di Lp(a) e quindi maggiori benefici clinici dalla azione di inibizione di PCSK9 (27,28). Per i nuovi farmaci che saranno disponibili e avranno Lp(a) come bersaglio specifico, con il potenziale di diminuire il valore dell'80% e più, dovrà essere verificato il beneficio di una diminuzione isolata di Lp(a) sulla riduzione del rischio di ASCVD.

Raccomandazione I

- Un profilo completo per le lipoproteine aterogeniche dovrebbe includere un biomarcatore, o un pannello di marcatori, per valutare il rischio di ASCVD associato non solo a LDL-PS, ma anche alle lipoproteine remnant e, in casi selezionati, alla lipoproteina Lp(a).

- Le raccomandazioni per la scelta degli esami da eseguire per le lipoproteine aterogeniche nei diversi contesti clinici sono riassunte in Tabella 4.

II. QUAL È IL PROFILO LIPIDICO STANDARD?

Il profilo lipidico tradizionale composto da CT, TG, HDL-C e LDL-C rimane l'approccio principale per la diagnosi e la classificazione del rischio di ASCVD (30). Una strategia con un rapporto costo-beneficio positivo è di misurare i tre marcatori (CT, TG, HDL-C) e da questi calcolare LDL-C e non-HDL-C. Anche i Remnant-C possono essere calcolati se LDL-C usato nell'equazione è misurato con metodi diretti. La misura di apoB non è solitamente inclusa nel profilo lipidico standard e nei modelli di valutazione del rischio di ASCVD. I disordini monogenici come l'ipercolesterolemia familiare (FH) possono essere facilmente identificati dal pannello lipidico standard senza bisogno di misurare apoB (31, 32). Nei pazienti con ipertrigliceridemia da lieve a moderata, (2-10 mmol/L; 177-890 mg/dL) (33), valori di apoB elevati sia basali che durante il trattamento, aiutano ad identificare la dislipidemia aterogenica correlata ai remnants e con LDL-PS piccole e dense, che non viene evidenziata dai valori di LDL-C e di non-HDL-C.

La misura di Lp(a) dovrebbe essere effettuata almeno una volta nella vita di una persona adulta per identificare coloro che hanno concentrazioni elevate di Lp(a) di origine genetica, in particolare tra i pazienti con ASCVD precoce, con FH, con anamnesi familiari di ASCVD precoce e/o di Lp(a) elevata, o con ASCVD ricorrente nonostante il trattamento con statine (22); la misura di Lp(a) potrebbe essere anche considerata in pazienti con stenosi della valvola aortica. Comunque, la misura di Lp(a) non dovrebbe essere inclusa nella ripetizione dei profili lipidici dello stesso paziente, dal momento che la concentrazione di Lp(a) subisce piccole variazioni nel corso della vita. Eccezioni a questa regola sono: il passaggio alla menopausa, la gravidanza, l'utilizzo di contraccettivi orali, l'insufficienza renale, o la somministrazione di una specifica terapia per diminuire Lp(a) (21). Le concentrazioni di Lp(a) non cambiano in risposta ad una normale assunzione di cibo e sono aumentate minimamente in corso di infiammazione, anche se è controversa l'influenza di una malattia acuta o di una reazione di fase acuta sulla concentrazione di Lp(a) (34).

Raccomandazione II

- Il profilo lipidico standard utilizzato per la predizione del rischio cardiovascolare include CT, TG, HDL-C, LDL-C, non-HDL-C, e opzionalmente – se il LDL-C è misurato con metodi diretti – il Remnant-C calcolato. Un profilo lipidico minimo, che include solo CT e TG può essere considerato in quei Paesi dove i costi sono un problema importante, come i Paesi in via di sviluppo (35).

- Un profilo lipidico esteso che includa Lp(a) o apoB dovrebbe essere utilizzato in casi selezionati (Tabella 4) (35). Profili lipidici più complessi come quelli che includono le sottoclassi delle lipoproteine e i profili di apolipoproteine, sono stati introdotti in alcuni laboratori, ma il loro valore aggiunto nel contesto clinico non è stato ancora validato (1).

III. QUANDO USARE CAMPIONI DI SANGUE DA PAZIENTI A DIGIUNO E NON A DIGIUNO?

Nel passato i prelievi a digiuno erano lo standard per la misura dei TG, poiché lo stato di digiuno riduce la variabilità delle concentrazioni di TG e permette una stima leggermente più standardizzata di LDL-C con l'equazione di Friedewald; ad ogni modo, un campione prelevato a digiuno non rispecchia il profilo lipidico aterogenico medio delle 24 ore (16).

Di conseguenza un digiuno prolungato (8-12 ore) non è più richiesto abitualmente per la determinazione di un profilo lipidico (2). I risultati ottenuti da studi di popolazione mostrano come, a parte un piccolo aumento

Tabella 4

Raccomandazioni per la richiesta della misura di lipidi e apolipoproteine (1, 4)

	Stima del rischio ASCVD	Caratterizzazione della dislipidemia	Scelta del trattamento	Obiettivo terapeutico
Esami di base				
Colesterolo totale ^a (CT)	Sì ^a	Opzionale ^b	Opzionale ^b	Opzionale ^b
Colesterolo HDL ^c (HDL-C)	Sì ^d	Sì	No	No
Trigliceridi (TG)	Sì	Sì	Sì	No
Colesterolo LDL (LDL-C)	Sì	Sì	Sì	Sì
Colesterolo dei Remnant ^e (Remnants-C)	Opzionale ^e	Opzionale ^e	No	Opzionale ^e
Colesterolo non-HDL ^a (non-HDL-C)	Sì	No	No	Sì ^g
Test aggiuntivi				
apoB ^h	Sì ^g	Sì ^g	No	Opzionale ^g
Lp(a)	Sì ⁱ	Sì ⁱ	Non ancora ⁱ	Non ancora ⁱ

^aIn campioni non a digiuno, questo includerà anche il colesterolo contenuto nei chilomicroni e nei loro remnants; comunque, nella maggioranza degli individui i chilomicroni sono rapidamente convertiti in remnants (entro 5-10 minuti) dopo il passaggio dai vasi linfatici al torrente ematico.

^bPuò essere considerato all'interno di un profilo lipidico minimo (solo CT e TG) o quando LDL-C non è disponibile.

^cOppure apoA-I, se disponibile.

^dIn combinazione con CT se HDL-C è inserito come variabile separata nel modello di stima del rischio. I rapporti di TC/HDL-C, non-HDL-C/HDL-C, o apoB/apoA-I che riflettono l'equilibrio tra lipoproteine aterogeniche e neutre, possono essere considerati come un'alternativa alla stima del rischio, ma non per la diagnosi o quali obiettivi terapeutici. I componenti del rapporto devono essere misurati separatamente.

^eIl Remnant-C calcolato come CT – HDL-C – LDL-C, è tutto il colesterolo trovato nelle lipoproteine VLDL e IDL, ricche di TG alle quali, se, non a digiuno, si aggiungono i remnants dei chilomicroni. Il Remnant-C è incluso nel non-HDL-C, ma questa stima non differenzia tra LDL-C e Remnant-C. Il Remnant-C è la parte di non-HDL-C che necessita di essere ridotta in alcuni pazienti. Per il calcolo del Remnant-C, si dovrebbe usare preferenzialmente il LDL-C misurato (con metodo diretto); in alternativa, il Remnant-C può essere misurato direttamente.

^fIl non-HDL-C, calcolato come TC – HDL-C, è tutto il colesterolo nelle proteine aterogeniche: LDL, remnants, e Lp(a). Nessuna delle iperlipidemie può essere caratterizzata da non-HDL-C perché i parametri usati per la sua stima non differenziano tra le frazioni di lipoproteine aterogeniche contenenti colesterolo.

^gNei pazienti con ipertrigliceridemia da lieve a moderata, 2-10 mmol/L (175-890 mg/dL), diabete, obesità o sindrome metabolica.

^hOppure la misura di LDL-P con metodi avanzati, se disponibile.

ⁱalmeno una volta nella vita in ogni persona adulta, specialmente nei pazienti con ASCVD prematura (uomini <55 anni, donne <60 anni), anamnesi familiare di ASCVD prematura e/o Lp(a) elevata, FH, ASCVD ricorrente nonostante un trattamento ottimale per diminuire i lipidi.

^jA meno che non sia disponibile un trattamento approvato per ridurre sostanzialmente la concentrazione di Lp(a) e il rischio legato a Lp(a).

ASCVD, malattia aterosclerotica cardiovascolare; FH, ipercolesterolemia familiare

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

postprandiale dei TG e di Remnant-C, le variazioni quantitative di altri lipidi, lipoproteine, e apolipoproteine in risposta ad una normale assunzione di cibo siano trascurabili nella maggior parte degli individui (2). Per i pazienti, per la medicina di laboratorio e per i clinici, l'uso dei profili lipidici non a digiuno rappresenta una semplificazione senza implicazioni negative significative per la prognosi, la diagnosi e la terapia di prevenzione di ASCVD (36). Ciononostante, può essere prudente consigliare ai pazienti di evitare un pasto ad alto contenuto di grassi o tipo "fast food" (ad esempio burger e patatine fritte) nelle 12 ore precedenti (37). I profili lipidici non a digiuno sono ora incoraggiati da diverse linee guida, comprese quelle emanate in Europa, UK, Canada, Brasile, e US (4-6, 35, 38). Le determinazioni a digiuno e non a digiuno dei profili lipidici devono essere considerate complementari e non mutuamente esclusive. Il digiuno non è certamente critico per un primo screening di base del rischio, o per diagnosticare un'ipercolesterolemia isolata come una FH o Lp(a) elevata senza aumento concomitante di TG (2). Il digiuno diventa un'opzione quando i TG non a digiuno sono >4,5 mmol/L (400 mg/dL), una concentrazione riscontrata in circa il 3-5% degli individui non a digiuno nella popolazione generale (Tabelle 2 e 3) (17), e per la diagnosi fenotipica o il monitoraggio terapeutico di una dislipidemia mista o di una ipertrigliceridemia isolata; comunque questo non è un prerequisito necessario e un prelievo random non a digiuno rifletterà meglio la concentrazione media di TG in uno specifico paziente. Il digiuno può essere raccomandato prima dell'inizio di un trattamento che può indurre ipertrigliceridemia grave (ad esempio con isotretinoina) in individui geneticamente predisposti, o in pazienti convalescenti dopo una pancreatite da ipertrigliceridemia, o quando siano richiesti altri esami che richiedono il digiuno o su campioni prelevati al mattino (ad esempio per la glicemia a digiuno, o per marcatori con specifico ritmo circadiano) (2). Il "Preanalytical Phase Working Group" di EFLM, ha recentemente pubblicato una guida su come standardizzare la raccolta di sangue a digiuno, se necessario (37, 39).

Raccomandazione III

- Il digiuno non è abitualmente richiesto per la determinazione del profilo lipidico.

- Nei pazienti con un iniziale profilo lipidico che presenti una concentrazione di TG >4,5 mmol/L (400 mg/dL), potrebbe essere eseguito un nuovo profilo lipidico per valutare la concentrazione di TG a digiuno; comunque, questo non è un requisito necessario.

IV. E' PIÙ AFFIDABILE LA MISURA O IL CALCOLO PER LA DETERMINAZIONE DI LDL-C?

Definizione operativa di LDL

La beta quantificazione, il metodo di riferimento per LDL-C raccomandato dall' "US Centers of Disease Control" (CDC), combina l'ultracentrifugazione per rimuovere le VLDL e i chilomicroni e la precipitazione con eparina-Mn²⁺ per separare le LDL-Ps, Lp(a) inclusa, dalle particelle HDL (40). Con la beta quantificazione, la frazione lipoproteica nell'intervallo di densità 1,006-1,063 g/mL è definita come LDL, e la frazione nell'intervallo di densità 1,063-1,21 g/mL è definita come HDL (40). Comunque, non è diffusamente riconosciuto che la frazione di LDL-C determinata con la beta quantificazione contenga anche il colesterolo delle IDL con densità 1,006-1,019 g/mL e Lp(a) con densità 1,04-1,13 g/mL. I metodi per la determinazione di LDL-C che misurano specificamente il colesterolo delle LDL potrebbero, pertanto, produrre risultati discordanti quando confrontati con il metodo di riferimento (41).

Metodi diretti per la misura di LDL-C e HDL-C

I metodi "omogenei" o "diretti" per LDL-C (dLDL-C) e HDL-C (dHDL-C) hanno ampiamente rimpiazzato le vecchie tecniche di ultracentrifugazione e precipitazione, in modo particolare per HDL-C, ma non è possibile genericamente assumere che queste misure forniscano le stesse informazioni cliniche (40-41). L'errore totale di una misura è la somma dell'errore sistematico (la distanza dal valore "reale") e dell'imprecisione casuale. Nonostante i progressi nella precisione analitica, ottenuti con l'automazione, i dati in letteratura dimostrano che i risultati possono variare in modo significativo tra metodi diversi per dLDL-C e dHDL-C e tra fornitori diversi di reagenti (41). La maggior parte delle discrepanze – con errori importanti tra i diversi metodi e i metodi di riferimento CDC – viene riscontrata in campioni di pazienti con ipertrigliceridemia >2 mmol/L (177 mg/dL), dislipidemia mista, o altre condizioni che determinano una alterata composizione e un rimodellamento lipoproteico, come il diabete e l'insufficienza renale cronica (41). I metodi diretti per dLDL-C e dHDL-C nei campioni normolipemici di solito raggiungono il traguardo dell'errore totale del <12% e <13% rispettivamente, come raccomandato dal National Cholesterol Education Program (NCEP); ma in uno studio che includeva diversi metodi con misure eseguite su campioni dislipidemici, l'errore totale variava da -26% a +32% per dLDL-C e da -20% a +36% per dHDL-C (42). La maggior parte delle discordanze nei campioni dislipidemici vengono riscontrate per concentrazioni basse di LDL-C (<1,8 mmol/L; 70 mg/dL) e HDL-C (<1,0 mmol/L; 38,6 mg/dL) (42). Queste discrepanze portano ad errori di classificazione nella valutazione del rischio di ASCVD e dipendono dal tipo di metodo, come evidenziato dalle indagini di VEQ che hanno incluso laboratori diversi ed utilizzato campioni con ipertrigliceridemia (43). Gli errori osservati nella misura

di dHDL-C rendono inaccurati i calcoli di LDL-C e non-HDL-C, poiché nelle formule per il loro calcolo viene utilizzato il valore di HDL-C (43).

Gli errori osservati nei metodi di misura dLDL-C e dHDL-C quando si analizzano campioni dislipidemici, suggeriscono che si verificano cross-reazioni non specifiche, e riflettono le difficoltà che si incontrano nella misura selettiva del colesterolo nelle lipoproteine LDL o HDL in presenza di lipoproteine atipiche. I metodi diretti di diversi produttori non misurano le stesse subfrazioni di LDL o HDL (40, 41). Questo errore di mancata selettività è particolarmente importante e causa gravi problemi analitici con ricadute sull'efficacia delle attuali terapie che consentono di raggiungere concentrazioni di LDL-C molto basse (<1,8 mmol/L; 70 mg/dL), in un momento storico in cui circa il 25% degli individui presenta TG >2 mmol/L (177 mg/dL) (Tabelle 2 e 3) (17) per l'aumentata prevalenza di obesità, sindrome metabolica e diabete mellito (11).

LDLC calcolato

Il LDLC stimato con la formula di Friedewald, [cLDLC= CT - HDL-C - colesterolo VLDL (VLDL-C)], presenta alcune limitazioni. L'equazione usa un rapporto fisso TG/colesterolo (TG/2,2 in mmol/L o TG/5 in mg/dL) per valutare il VLDL-C e presume un'assenza di chilomicroni che sono più ricchi di TG rispetto alle VLDL (44). Poiché il rapporto TG/colesterolo nelle lipoproteine ricche di TG aumenta progressivamente man mano che l'ipertrigliceridemia diventa più grave, in presenza di concentrazioni di TG elevate, l'equazione sovrastima VLDL-C e pertanto sottostima LDL-C (44). L'equazione è maggiormente inaccurata per concentrazioni di TG da 2,3 a 5 mmol/L (200-400 mg/dL) [44]. L'errore diviene inaccettabile per TG >4,5 mmol/L (400 mg/dL) secondo le linee guida NCEP e EAS o già per TG >4,0 mmol/L (355 mg/dL) secondo le raccomandazioni di consenso nazionali in alcuni paesi; in queste circostanze, dovrebbero essere usati campioni di sangue prelevati a digiuno (2).

Con TG <4,5 mmol/L (400 mg/dL), per il calcolo del cLDL-C con la formula di Friedewald, si possono usare indifferentemente campioni prelevati a digiuno o meno purché LDL-C non sia particolarmente basso.

Ad intervalli di concentrazione molto basse di LDL-C (<1,8 mmol/L; 70 mg/dL), il VLDL-C costituisce una frazione relativamente più grande di colesterolo ematico; in questi casi, la sovrastima di VLDL-C che si verifica a concentrazioni di TG >2,3 mmol/L (204 mg/dL) introduce un errore più significativo nel calcolo di cLDL-C (45). La sottostima di LDL-C che ne risulta, può tradursi in un'errata classificazione del paziente, in quanto le linee guida disponibili attualmente, raccomandano per i pazienti ad alto e ad altissimo rischio cardiovascolare, un obiettivo di 1,8 mmol/L (70 mg/dL) o di 1,4 mmol/L (54 mg/dL) rispettivamente (4). Questo potrebbe erroneamente escludere più del 20% dei pazienti dall'inizio o dall'intensificazione della terapia ipolipemizzante (45).

È stata sviluppata un'equazione modificata, denominata Martin-Hopkins; $cLDL-C = TC - HDL-C - TG/\text{fattore di aggiustamento}$, che corregge il rapporto TG/VLDL-C dinamicamente in base alle concentrazioni di TG e di non-HDL-C (46). Invece che dividere il valore dei TG con un fattore fisso pari a 5, l'equazione di Martin Hopkins richiede l'uso di una tabella a 180 celle per accoppiare i TG e il non-HDL-C di ogni paziente con 1 dei 180 fattori diversi che variano da 3,1 a 9,5, per fornire una valutazione più personalizzata di VLDL-C in mg/dL (46). Questi rapporti personalizzati TG/VLDL-C sono stati determinati da un confronto diretto delle concentrazioni di TG con il VLDL-C misurato direttamente dopo separazione lipoproteica con ultracentrifugazione, in >10⁶ individui americani dal "Very Large Database Of Lipids Study" (46). In questa raccolta di dati, TG e non-HDL-C erano le due variabili che spiegavano la maggior parte della variabilità del rapporto TG/VLDL-C (46).

La nuova formula di Martin-Hopkins migliora l'accuratezza di cLDL-C in varie condizioni, inclusi i campioni con LDL-C molto basso [<1,8 mmol/L (70 mg/dL)] e i campioni prelevati non a digiuno (47,48). Noi raccomandiamo di usarla preferibilmente in un intervallo di concentrazioni di TG tra 2,0 e 4,5 mmol/L (177-400 mg/dL) dove la formula di Friedewald è meno accurata (47). Comunque, non è affatto semplice installare questa complessa tabella formata da 180 celle all'interno dei sistemi informatici di laboratorio. È stata sviluppata un'applicazione da smartphone (LDL cholesterol calculator) per fornire il calcolo immediato di cLDL-C secondo la formula di Martin-Hopkins semplicemente inserendo i valori di CT, HDL-C, e TG del paziente, ricavabili dal profilo lipidico standard (49).

Il metodo diretto per la misura di LDL-C (dLDL-C) dovrebbe essere sempre utilizzato quando la concentrazione di TG è >4,5 mmol/L (400 mg/dL), che è il limite d'utilizzo della formula di Friedewald e dell'equazione di Martin-Hopkins (50), sebbene al di sopra di questa concentrazione anche il metodo diretto possa presentare discordanze con il metodo di riferimento CDC e risultare così non accurato in tutti i pazienti. Anche nei campioni normotrigliceridemici e in campioni con concentrazioni di TG moderatamente elevate 2,0-4,5 mmol/L (177-400 mg/dL), dLDL-C può non concordare sempre con cLDL-C secondo Friedewald e tradursi così in un rischio di misclassificazione sia negli individui a digiuno che non a digiuno (51). Dovrebbe anche essere sottolineato che la maggior parte delle sperimentazioni cliniche, che hanno costituito la base dell'evidenza dei benefici clinici derivanti dalla diminuzione di LDL-C, hanno utilizzato il cLDL-C ottenuto con la formula di Friedewald; pertanto non si può escludere che sia il dLDL-C piuttosto che il cLDL-C a classificare erroneamente il rischio (1). Comunque, il fatto che il cLDL-C calcolato con la formula di Friedewald o con l'equazione di Martin-Hopkins dipenda da tre diversi esami di laboratorio, ovvero TG, CT, e HDL-C, significa che sono coinvolti tre errori di misura, introducendo inevitabilmente una variabilità nel calcolo (Tabella 5).

Tabella 5

Esempio dell'incertezza rilevata tra laboratori nella misura di lipidi determinati con metodi diversi in un paziente ipertrigliceridemico

Esame	Errore totale previsto	Concentrazioni in un paziente tipo: mmol/L (mg/dL)	Intervallo di incertezza: mmol/L (mg/dL)
Colesterolo totale (TC)	9% ^a	5,2 (200)	4,7–5,7 (182-218)
Trigliceridi (TG)	15% ^a	2,8 (250)	2,4–3,3 (212-288)
Colesterolo HDL misurato (dHDL-C)	Da -20% a +36% ^b	1,0 (40)	0,8–1,4 (32-54)
Colesterolo non-HDL-C (non-HDL-C)	calcolato con TC, e dHDL-C	4,1 (160)	3,3–4,8 (128-186)
Colesterolo LDL stimato con formula di Friedewald (cLDL-C)	calcolato con TC, dHDL-C, e TG	2,8 (110)	1,8–3,7 (70-144)
Colesterolo LDL stimato con formula di Martin-Hopkins (cLDL-C)	calcolato con TC, dHDL-C, TG, e non-HDL-C	3,2 (122)	2,4–3,9 (91-151)
Colesterolo LDL misurato (dLDL-C)	-26% a +32% ^b	3,2 (122)	2,3–4,2 (90-161)

^aBasato sui criteri di prestazioni analitiche raccomandate dal National Cholesterol Education Program (NCEP) statunitense (41).

^bIntervallo per l'errore totale riportato da Miller et al. (42) con diversi metodi di dLDL-C e dHDL-C in campioni dislipidemici. L'errore totale combina l'errore sistematico e l'imprecisione casuale.

La tabella non è pertinente per il monitoraggio nel tempo di un paziente nello stesso laboratorio e con lo stesso metodo. In tale situazione l'errore sistematico rimane costante e solo l'imprecisione (inevitabile) è rilevante. Idealmente, il bias dovrebbe essere <4% per il LDL-C e <5% per il HDL-C per consentire ai metodi di soddisfare gli obiettivi di errore totale del NCEP, che sono <12% e <13%, rispettivamente.

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

Influenza del colesterolo di Lp(a) su LDL-C

Le equazioni per il cLDL-C e anche la maggior parte dei metodi diretti per il dLDL-C includono il colesterolo di Lp(a) (52). Considerando che una particella di Lp(a) è composta di colesterolo per circa il 30-45% del suo peso, nei soggetti con concentrazioni di Lp(a) elevate o molto elevate, questo provoca una sovrastima significativa della concentrazione di LDL-C (52); per esempio, in un soggetto con concentrazioni di LDL-C e di Lp(a) entrambe di 100 mg/dL, un LDL-C corretto per Lp(a) è solo circa 55-70 mg/dL.

Un LDL-C corretto per Lp(a) dovrebbe essere calcolato almeno una volta nei pazienti nei quali si sospetti una concentrazione di Lp(a) elevata, ad esempio negli afroamericani, nei pazienti con sindrome nefrosica, o in dialisi peritoneale, e in qualunque paziente che non risponda adeguatamente alla terapia con statine (1). Se una concentrazione elevata di Lp(a) è davvero la causa per un'apparente scarsa o mancata risposta di LDL-C alla terapia, allora l'aumento del dosaggio di statine non è utile (1). La correzione è la seguente:

$$\text{LDL-C corretto per Lp(a) (mg/dL)} = \text{LDL-C (mg/dL)} - [\text{Lp(a) (mg/dL)} \times 0,30]$$

$$\text{LDL-C corretto per Lp(a) (mmol/L)} = \text{LDL-C (mg/dL)} - [\text{Lp(a) (mg/dL)} \times 0,0078]$$

Non vengono qui fornite formule alternative per valori di Lp(a) espressi in nmol/L (sebbene sia stato proposto un fattore di conversione di x 2-2,5 per il passaggio da mg/dL a nmol/L) (25). È necessario riconoscere che una semplice conversione di Lp(a) da mg/dL a nmol/L o viceversa ha i suoi limiti in quanto probabilmente la maggior parte degli immunodosaggi non sono in grado di misurare Lp(a) in termini strettamente molari; questo a causa della eterogeneità di dimensione delle isoforme di apo(a) e dell'alta probabilità che gli anticorpi contro apo(a) riconoscano un epitopo ripetitivo KIV-2 di apo(a) (53).

Raccomandazione IV

- L'equazione di Martin-Hopkins modificata può essere preferibile per il calcolo di cLDL-C, soprattutto in pazienti con concentrazioni di LDL-C basse <1,8 mmol/L (70 mg/dL) e/o concentrazioni di TG 2,0-4,5 mmol/L (177-400 mg/dL) e nei campioni prelevati non a digiuno (6).

- I metodi dLDL-C dovrebbero essere usati per calcolare il Remnant-C e per la valutazione di LDL-C quando la concentrazione di TG è >4,5 mmol/L (400 mg/dL) (o >4 mmol/L; 355 mg/dL secondo i documenti di consenso nazionali in alcuni Paesi). Comunque, il metodo diretto non fornirà necessariamente una valutazione più accurata di LDL-C in tutti i pazienti.

- La correzione di LDL-C calcolato o misurato per il colesterolo contenuto in Lp(a) dovrebbe essere applicata ai pazienti con concentrazione di Lp(a) elevata nota o sospetta o se il paziente mostra una scarsa risposta alla terapia per diminuire il LDL-C.

V. GLI ERRORI NELLA DETERMINAZIONE DI LDL-C SONO CLINICAMENTE RILEVANTI?

L'incertezza di misura dei diversi metodi di determinazione di LDL-C non è trascurabile (Tabella 5). I valori di LDL-C di un determinato paziente, misurati o calcolati, possono presentare una ampia variazione tra laboratori intorno ai valori critici raccomandati dalle linee guida sui quali si basa la decisione dell' intervento terapeutico (Tabella 6). Le decisioni terapeutiche possono così essere diverse a seconda del metodo utilizzato per la determinazione di LDL-C; oppure può insorgere confusione se i campioni di un paziente vengono inviati a diversi laboratori che usano metodi differenti o quando un laboratorio cambia metodo durante il monitoraggio della risposta alla terapia. Accade frequentemente, che la diversità fra valori successivi di LDL-C di un paziente cada all'interno dell'intervallo di incertezza dovuto alla variazione del metodo di laboratorio e non sia dovuta all'intervento terapeutico (1).

Questi problemi sono meno rilevanti quando si tratta del monitoraggio temporale di un paziente effettuato nello stesso laboratorio e con lo stesso metodo. In questa situazione, l'errore di non-specificità rimane

costante nel tempo e conta solo l'imprecisione del metodo (errore casuale) e le variazioni da lotto a lotto, che potrebbero anche non essere importanti, dato che i clinici non hanno come scopo quello di raggiungere esattamente un preciso obiettivo, ma spesso concentrazioni inferiori all'obiettivo stesso. Attualmente, la percentuale di riduzione di LDL-C è più importante del raggiungimento di un valore specifico, e pertanto le recenti linee guida suggeriscono come fondamentale il raggiungimento di una riduzione del 50% della concentrazione di LDL-C, in pazienti con rischio elevato e molto elevato, indipendentemente dalla concentrazione di base (4).

Il rischio che errori nella misura o nel calcolo di LDL-C influenzino la decisione clinica viene ancora più attenuato dalla raccomandazione che prevede che la decisione di iniziare il trattamento, di aggiustare la terapia o di passare ad un altro trattamento, non dovrebbe essere presa sulla base di un unico valore di LDL-C, ma piuttosto dopo ripetute determinazioni (almeno due volte) per poter tenere conto della variabilità intra-individuale (biologica) (41). Il Working Group "Biological Variation" di EFLM ha recentemente rivisto i dati della variabilità biologica (54, 55).

Tabella 6

Obiettivi primari e secondari della terapia di prevenzione in base alle categorie di rischio di mortalità cardiovascolare valutate con il sistema SCORE (4)

Rischio (SCORE) ^a	Colesterolo LDL (LDL-C) mmol/L (mg/dL)	Colesterolo non-HDL (non-HDL-C) ^b mmol/L (mg/dL)	apoB ^b g/L (mg/dL)
Molto alto	<1,4 (55) e riduzione >50% di LDL-C	<2,2 (85) ^c	<0,65 (65) ^d
Alto	<1,8 (70) e riduzione >50% di LDL-C	<2,6 (100)	<0,80 (80)
Moderato	<2,6 (100)	<3,3 (130)	<1,00 (100)
Basso	<3,0 (115)		

^a Rischio cardiovascolare a 10 anni calcolato usando il punteggio Systematic COronary Risk Evaluation (SCORE) (4).

Rischio molto alto: ASCVD documentata, diabete con danno degli organi bersaglio (proteinuria, retinopatia, o neuropatia), o esordio precoce di diabete di tipo 1 da >20 anni, malattia renale cronica severa (GFR <30 mL/min/1.73 m²), SCORE >10%.

Rischio alto: TC > 8 mmol/L (310 mg/dL), LDL-C >5 mmol/L (190 mg/dL), ipercolesterolemia familiare, ipertensione >180/110 mmHg, diabete da >10 anni senza danno d'organo, malattia renale cronica moderata (GFR 30–59 mL/min/1.73 m²), SCORE tra > 5% e <10%.

Rischio moderato: pazienti giovani con diabete (tipo 1 <35 anni, tipo 2 <50 anni) da <10 anni, SCORE tra > 1% e <5%.

Rischio basso: SCORE <1%.

^b Obiettivo secondario in pazienti con ipertrigliceridemia da lieve a moderata, 2-10 mmol/L (175-890 mg/dL) inclusi quelli con obesità o sindrome metabolica, diabete, o malattia renale cronica.

^c La discordanza tra non-HDL-C elevato ed il raggiungimento di un obiettivo terapeutico ottimale per il LDL-C, riflette la presenza di Remnant-C >0,8 mmol/L (30 mg/dL).

^d La discordanza tra un valore di apo B elevato e il raggiungimento di un obiettivo terapeutico ottimale per LDL-C riflette la presenza di un numero elevato di particelle LDL piccole impoverite di colesterolo.

ASCVD, malattia aterosclerotica cardiovascolare.

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

Raccomandazione V

- I profili lipidici per il monitoraggio in corso di trattamento, dovrebbero essere eseguiti idealmente con lo stesso metodo (e preferibilmente nello stesso laboratorio) per minimizzare eventuali interpretazioni errate sull'efficacia del trattamento.

- I clinici dovrebbero essere avvisati dal laboratorio quando viene cambiato il metodo, ad esempio tramite comunicazioni scritte. Questo aumenterà la consapevolezza dei clinici sulla possibilità che il cambio di metodo possa essere una potenziale causa di risultati poco plausibili.

- I metodi e le loro limitazioni dovrebbero essere sempre descritti in qualsiasi pubblicazione di studi clinici o indagini epidemiologiche. Nelle meta-analisi di associazioni tra i valori lipidici e gli esiti, è fondamentale verificare la confrontabilità dei dati quantitativi del metodo utilizzato in ogni studio.

- Un valore di LDL-C di un paziente prossimo alla soglia decisionale terapeutica dovrebbe idealmente essere confermato da misure ripetute (>2) con lo stesso metodo e quindi utilizzata la media dei valori ottenuti. Spesso il valore della seconda ripetizione è più basso, probabilmente a causa dell'adozione da parte del paziente di un regime alimentare più salutare, se il paziente stesso è informato che il suo LDL-C è elevato; in questo caso, la decisione dovrebbe essere presa sulla base del secondo valore.

VI. ESISTONO ALTRE MISURE AFFIDABILI DI LIPOPROTEINE ATEROGENICHE ?

Colesterolo non-HDL

Il non-HDL-C, calcolato per sottrazione di HDL-C dal CT, rappresenta il colesterolo contenuto in tutte le particelle che causano malattie cardiovascolari, ovvero LDL, VLDL, IDL, e Lp(a); quando il soggetto non è a digiuno, questo include anche il colesterolo dei chilomicroni e delle loro particelle remnants (1). Il non-HDL-C fornisce una valutazione del rischio più ampia rispetto a LDL-C in alcuni individui con ipertrigliceridemia, perché aggiunge Remnant-C a LDL-C e, pertanto, tiene conto anche del potenziale aterogeno delle lipoproteine remnants (17). Comunque, il non-HDL-C non può sostituire il Remnant-C perché non distingue tra Remnant-C e LDL-C e il colesterolo legato a Lp(a). Alcuni individui con Remnant-C elevato presentano un LDL-C basso e pertanto avranno un non-HDL-C relativamente basso se anche la concentrazione di Lp(a) è bassa; inoltre, se si considera il non-HDL-C invece del Remnant-C, l'innalzamento di questo verrà mascherato (30).

Come LDL-C, anche non-HDL-C è suscettibile al trattamento con gli agenti ipolipemizzanti esistenti e i risultati delle meta-analisi e delle sperimentazioni cliniche con statine o altri farmaci ipolipemizzanti hanno dimostrato una evidente relazione diretta tra l'entità della diminuzione del non-HDL-C e la riduzione del rischio cardiovascolare (56, 57). Gli obiettivi terapeutici raccomandati dalle linee guida per il non-HDL-C sono arbitrariamente e comunemente fissati a 0,8 mmol/L (30 mg/dL), più elevati degli obiettivi per il LDL-C (Tabella 6); questo valore è basato sull'assunto che la

concentrazione "ottimale" di VLDL-C associato al valore soglia dei TG a digiuno (1,7 mmol/L; 150 mg/dL) sia 0,8 mmol/L (30 mg/dL), come stimato dalla formula di Friedewald [TG/2,2 (se espresso in mmol/L) e TG/5 (se espresso in mg/dL)] (1, 2).

Il non-HDL-C può essere determinato nel paziente non a digiuno e non richiede che i TG siano <4,5 mmol/L (400 mg/dL), ovvero il valore limite per il calcolo di cLDL-C (44). Comunque, gli errori di misura di dHDL-C nei campioni ipertrigliceridemicici interferiscono nel calcolo di non-HDL-C e la maggior parte dei metodi per dHDL-C ha come limite una concentrazione di TG <10 mmol/L (890 mg/dL). Nonostante questa limitazione, il non-HDL-C rende più accurata la classificazione del rischio cardiovascolare rispetto al cLDL-C ottenuto con la formula di Friedewald o anche al dLDL-C, e produce punteggi di rischio più coerenti di quelli ottenuti usando molti dei metodi disponibili per la misura del dHDL-C da utilizzare nel calcolo (58). Il non-HDL-C mostra una migliore correlazione e concordanza con il cLDL-C nei pazienti con una dislipidemia aterogenica, quando si usi per il calcolo la formula di Martin-Hopkins rispetto all'equazione di Friedewald (59). Quando il non-HDL-C viene confrontato con il cLDL-C, ottenuto con la formula di Martin-Hopkins, l'uso del non-HDL-C si traduce in un piccolo miglioramento nella classificazione del rischio, in grado di modificare la gestione clinica dei pazienti (nel 2% degli individui nella popolazione generale), sebbene questa discordanza e, come conseguenza, una sottostima del rischio, sia ancora molto presente (80-90%) nei pazienti con TG >4,5 mmol/L (400 mg/dL) (60).

Apolipoproteina B

A differenza della eterogeneità di LDL-C, apoB è un misurando chiaramente definito. È la proteina strutturale di tutte le lipoproteine non-HDL ed esiste in due isoforme: apoB100, l'isoforma contenuta nelle VLDL, IDL, LDL, e in Lp(a), e apoB48 che si trova nei chilomicroni e remnants dei chilomicroni (12). ApoB100 contiene il ligando per il recettore LDL. Dato che ogni particella aterogenica contiene una molecola di apoB, le concentrazioni di questa apolipoproteina sono considerate una misura diretta del numero totale di lipoproteine che causano una malattia cardiovascolare, che sono LDL, remnants e Lp(a) (12).

La quantificazione di apoB con metodi immunometrici automatizzati come l'immunonefelometria e l'immunoturbidimetria può essere applicata nei laboratori clinici molto facilmente. Questi metodi, che evitano l'uso di tecniche di subfrazionamento lipoproteico come la spettroscopia con la risonanza magnetica nucleare (RMN) o a mobilità ionica per quantificare le LDL-P, si sono dimostrati almeno equivalenti alla determinazione delle LDL-P nella predizione del rischio cardiovascolare. (61, 62). Comunque, apoB non può sostituire la misura della grandezza delle particelle basata sulla spettroscopia RMN o a mobilità ionica e non differenzia tra il numero di particelle LDL e VLDL (61, 62). Il maggior impedimento

alla determinazione delle LDL-P è la limitata disponibilità dei metodi nei laboratori clinici, il costo maggiore, e la mancanza di standardizzazione (63), sebbene questa misura fornisca informazioni aggiuntive rispetto alla determinazione di altre lipoproteine (VLDL e HDL).

ApoB può essere misurata non a digiuno perché il numero delle particelle di chilomicroni (che contengono apoB48) è di solito <1% negli individui sani, anche all'interno del picco postprandiale, e il numero di particelle VLDL (che contengono apoB100) è <10% del numero di particelle LDL (che pure contengono apoB100) (12). Pertanto, anche quando nei metodi utilizzati è presente una cross-reattività con apoB48 nelle misurazioni non a digiuno, la quantificazione di apoB è essenzialmente una stima del numero di LDL-P se le concentrazioni di TG e Lp(a) sono basse (1). La maggior parte delle misure nefelometriche o turbidimetriche dimostra limitazioni in presenza di TG >10 mmol/L (890 mg/dL) per l'interferenza della diffrazione della luce o per l'assorbimento causata dai chilomicroni e dalle grandi VLDL; questo valore di TG è molto più alto rispetto a 4,5 mmol/L (400 mg/dL) che è il valore limite di TG per la misura del cLDL-C. Una concentrazione di TG >10 mmol/L in campioni di soggetti non a digiuno è presente solamente in circa lo 0,1% degli individui della popolazione generale (17). Nonostante questo, è prudente suggerire una determinazione di apoB a digiuno, quando la concentrazione di TG nei campioni non a digiuno è >4,5 mmol/L (400 mg/dL) (2).

L'IFCC e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), hanno sviluppato il materiale di riferimento SP3 per apoB, con valore assegnato utilizzando l'immunonefelometria come metodo di riferimento ad interim (64). La calibrazione con materiale di riferimento IFCC/WHO SP3 ha ridotto la variabilità tra i laboratori delle misure di apoB da >19% a <10%, sebbene esistano ancora problemi sulla variabilità tra metodi immunometrici e sulla confrontabilità di queste determinazioni con la misura di apoB100 con RMN o altre metodologie (65-67). La quantificazione di apolipoproteine basata sulla spettrometria di massa tandem con cromatografia liquida (LC-MSMS) ha il potenziale di migliorare ulteriormente la standardizzazione di apoB100 e la comparabilità tra metodi (67). L'IFCC ha pertanto iniziato lo sviluppo di raccomandazioni per LC-MSMS come metodo di riferimento definitivo candidato per apoB (67). Un altro vantaggio di LC-MSMS è che consente la misurazione simultanea di altre apolipoproteine, in aggiunta ad apoB100, in una singola seduta analitica, rendendo pertanto possibile ottenere il profilo apolipoproteico globale di un paziente, includendo anche le apolipoproteine associate ad HDL e VLDL per una caratterizzazione completa delle dislipidemie (68). Sebbene attualmente la produttività di LC-MSMS sia bassa se paragonata a quella dei metodi immunometrici, si stanno sviluppando sistemi analitici LC-MSMS automatizzati che diventeranno disponibili per l'utilizzo nei laboratori clinici ad elevato carico di lavoro..

Considerati i miglioramenti nella standardizzazione iniziati da IFCC (69), la determinazione di apolipoproteine ha il potenziale di soddisfare i criteri di prestazioni analitiche necessari per l'introduzione nella pratica clinica, inclusi l'accuratezza, l'armonizzazione tra i laboratori, la definizione univoca del misurando, nonché risultati accurati nei sieri sia normo che dislipidemic; tali prerequisiti sono di notevole rilevanza per l'utilizzo clinico di un esame che non può essere sostituito dalla misura o dalla stima di LDL-C e di non-HDL-C.

Raccomandazione VI

- La misura di apoB è superiore alla misura o alla stima di LDL-C e non-HDL-C, per la valutazione dell'esposizione del soggetto alla quantità di particelle lipoproteiche aterogene in circolo.

- La misura di apoB è raccomandata per la valutazione del rischio e, se disponibile, può essere preferibile al non-HDL-C, in persone con ipertrigliceridemia da lieve a moderata (2-10 mmol/L; 177-890 mg/dL), diabete, obesità o sindrome metabolica, o LDL-C molto basso <1,8 mmol/L (70 mg/dL) (4).

- Analogamente al non-HDL-C, apoB può sempre essere misurata non a digiuno e la sua misura non è influenzata dalla variabilità biologica dei TG.

VII. LA MISURA DI APOB PUO' SOSTITUIRE IL PROFILO LIPIDICO STANDARD PER IL MONITORAGGIO DELLE TERAPIE IPOLIPEMIZZANTI?

Sebbene il profilo lipidico tradizionale di CT, TG, HDL-C, e LDL-C rimanga essenziale per la diagnosi di dislipidemia e la classificazione del rischio ASCVD, la rilevanza di LDL-C quale obiettivo terapeutico può essere messa in discussione dalle prestazioni analitiche dei metodi per apoB. Tuttavia, la determinazione di apoB non è ancora stata completamente validata per questo scopo clinico secondo i criteri essenziali definiti dal Working Group "Test Evaluation" di EFLM (70) (prestazioni cliniche efficacia clinica, rapporto costo-beneficio positivo) che sono da valutare oltre alla prestazione analitica, prima che l'esame possa essere definito clinicamente utile (Tabella 7).

Prestazioni cliniche– Valutazione Del Rischio

I dati e le meta-analisi degli studi prospettici di coorte condotti sulla popolazione (71-74) e le sperimentazioni cliniche con statine (75-76), suggeriscono che le prestazioni cliniche di apoB e di non-HDL-C, sebbene superiori a quelle di LDL-C in alcuni studi, sono mediamente comparabili con quelle di dLDL-C e di cLDL-C calcolato con la formula di Friedewald o di Martin-Hopkins, per predire nella popolazione il rischio di ASCVD fatale o non fatale. Le associazioni con il rischio sono simili negli studi di popolazione eseguiti su soggetti a digiuno e non a digiuno (72-74).

Per la maggioranza di pazienti in cui la misura di

Tabella 7

Evidenze attuali per un utilizzo clinico appropriato di: LDL-C, non-HDL-C, apoB, e LDL-P sulla base delle caratteristiche essenziali dell'esame (1).

Caratteristiche dell'esame	Colesterolo LDL (LDL-C)	Colesterolo non HDL (non-HDL-C)	apoB	Particelle LDL (LDL-P)
Caratteristiche analitiche^a				
Precisione del metodo	Sì	Sì	Sì	Sì
Accuratezza del metodo	No	No	Sì	No
Possibilità di determinazione non a digiuno	cLDL-C se TG < 4,5 mmol/L (400 mg/dL)	Sì	Sì	Sì
Metodi ampiamente disponibili	Sì	Sì	Sì	No
Costi operativi ragionevoli	Sì	Nessuna misurazione aggiuntiva	Sì	Non ancora
Caratteristiche cliniche^b				
Associazione robusta con l'incidenza di ASCVD?	Sì	Sì	Sì	Sì
Informazioni aggiuntive rispetto ai marcatori esistenti?	è il riferimento	Sì	Sì	Sì
Soglie decisionali validate?	No	No	No	No
Efficacia clinica^c				
Superiorità rispetto agli esami esistenti?	è il riferimento	Probabile	Probabile	Probabile
Associazione con il rischio modificabile (obiettivo terapeutico)?	Sì	Sì	Sì	Sì
La terapia basata sull'esame riduce il rischio ASCVD?	Sì	Probabile	Probabile	Sconosciuto
Costo-beneficio^d				
La terapia basata sull'esame permette di risparmiare spese sanitarie?	Sì	Non noto	Non noto	Non noto

Caratteristiche degli esami definite dal Working Group "Test Evaluation" di EFLM (70):

^aValidità analitica: abilità degli esami di rispondere a specifiche di qualità predefinite per misurare il marcatore di interesse.

^bAccuratezza diagnostica o prognostica: abilità dell'esame di discriminare in maniera consistente i pazienti con aumentato rischio da quelli con basso rischio di sviluppare ASCVD.

^cUtilità clinica: abilità dell'esame di migliorare gli esiti dei pazienti all'interno di cure sanitarie standard.

^dVantaggi sanitario-economici della introduzione dell'esame nella pratica medica (rapporto costo/beneficio).

ASCVD, malattia aterosclerotica cardiovascolare.

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

apoB correla con LDL-C, la determinazione dei parametri lipidici tradizionali dovrebbe essere sufficiente per valutare il rischio. Comunque, nel 20% degli individui in cui apoB è più elevata dei percentili di LDL-C nella popolazione, il rischio cardiovascolare correla con apoB, suggerendo che sostituire LDL-C con apoB consentirebbe di identificare un numero maggiore di individui con aumentato rischio di ASCVD (74). Questo implica una migliore prestazione di apoB rispetto ad

LDL-C in questo piccolo sotto-gruppo di individui .
Efficacia Clinica – Riduzione del Rischio

Il sostanziale rischio residuo che persiste nei trattamenti che hanno come obiettivo terapeutico LDL-C anche con valori <1,8 mmol/L (70 mg/dL), ha acceso il dibattito sulla opportunità di usare apoB piuttosto che LDL-C come obiettivo terapeutico. Le meta-analisi delle sperimentazioni cliniche con farmaci ipolipemizzanti,

hanno dimostrato che le statine e le altre terapie che diminuiscono le lipoproteine circolanti contenenti apoB tramite l'up-regulation dell'espressione del recettore per LDL come gli inibitori di PCSK9, riducono il rischio cardiovascolare proporzionalmente alla diminuzione delle concentrazioni di apoB osservate (77,78). Inoltre, gli studi randomizzati mendeliani hanno dimostrato che la riduzione del rischio cardiovascolare associato alla variabilità genetica nella clearance e nel metabolismo delle lipoproteine contenenti apoB, incluse le LDLPs, come pure VLDL ricche di TG e i loro remnant, era correlata alla modifica della concentrazione di queste particelle misurata da apoB piuttosto che con la quantità di colesterolo veicolata dalle stesse particelle misurata da LDL-C (79,80). Questi risultati suggeriscono un potenziale ruolo di apoB come obiettivo terapeutico.

Rapporto costo/beneficio

L'implementazione della misura di apoB nel monitoraggio delle terapie ipolipemizzanti imporrebbe ai sistemi sanitari e ai pazienti costi annuali aggiuntivi, sebbene si possa ipotizzare di sostituire il profilo lipidico standard (necessario per calcolare LDL-C e non-HDL-C) con una singola misura (apoB) per diminuire i costi. La misura di apoB avrebbe un rapporto costo/beneficio positivo se questa determinazione servisse a ridurre i costi sanitari di ASCVD in misura maggiore rispetto alla terapia standard guidata da LDL-C; tuttavia le evidenze in questo senso sono ancora incomplete (Tabella 7). Per valutare il costo beneficio della strategia terapeutica guidata da apoB, dovrebbero essere disegnati studi clinici randomizzati nei quali i pazienti venissero scelti in maniera casuale per la misura di apoB *versus* la determinazione standard di LDL-C; dovrebbero poi essere valutati i risultati economico-sanitari dell'identificazione e del trattamento di un numero maggiore di pazienti ad alto rischio (ad esempio pazienti non identificati o non trattati con la misura di LDL-C) (1).

Raccomandazione VII

- Al momento, gli studi di esito non hanno fornito evidenze sufficienti del vantaggio derivante dalla sostituzione del profilo lipidico standard (con le stime di cLDL-C e non-HDL-C) con una misura singola di apoB, per guidare le terapie ipolipemizzanti

- L'efficacia clinica della gestione del rischio cardiovascolare guidata da LDL-C ha una base di evidenza più forte (7,8). Tutte le linee guida concordano che LDL-C resta l'obiettivo principale delle strategie ipolipemizzanti per prevenire ASCVD (4,6). Rimane estremamente importante abbassare LDL-C a concentrazioni inferiori all'obiettivo di 1,8 mmol/L (70 mg/dL) in pazienti ad alto rischio cardiovascolare o 1,4 mmol/L (55 mg/dL) in pazienti a rischio molto elevato (o >50% della concentrazione basale se questi obiettivi non possono essere raggiunti) (4).

VIII. DOVREMMO USARE NON-HDL-C O APOB COME ESAMI AGGIUNTIVI A LDL-C NELLE STRATEGIE IPOLIPEMIZZANTI?

Colesterolo non-HDL

I dati ottenuti dalle analisi di concordanza/discordanza suggeriscono che, nel predire ASCVD, il calcolo di non-HDL-C è altrettanto valido della misura o del calcolo di LDL-C nella popolazione generale e nei pazienti in trattamento con statine; può anche essere superiore a LDL-C soprattutto quando le concentrazioni di LDL-C sono normali o basse e negli individui ipertrigliceridemicici, perché include il Remnant-C (81-83). LDL-C non fornisce una predizione incrementale del rischio di ASCVD in confronto a non-HDL-C (81-83). L'unico problema è la concentrazione soglia scelta in alcuni studi: a fare la differenza, potrebbe essere la maggiore sensibilità derivante dal valore soglia selezionato per non-HDL-C confrontata con quello di LDL-C, piuttosto che il biomarcatore *per sé*. I valori soglia per il non-HDL-C presenti nelle linee guida, sono stati definiti, arbitrariamente, per consenso di un gruppo di esperti, basato sulla convinzione che esiste una concentrazione di VLDL-C normale quando i TG sono <1,7 mmol/L (150 mg/dL) (che è stimato <0,8 mmol/L; 30 mg/dL nella formula di Friedewald). Abbassare la soglia di non-HDL-C porta a una riclassificazione verso l'alto dei pazienti (se l'obiettivo è di ridurre il sotto-trattamento), mentre valori soglia più alti portano ad una ri-classificazione verso il basso (se l'obiettivo è ridurre il sovra-trattamento). I valori soglia devono essere validati in studi clinici, disegnati per valutare quali valori classificano più accuratamente i pazienti all'interno delle categorie di rischio (70). Attualmente, la combinazione di non-HDL-C con cLDL-C stimato con la formula Martin-Hopkins, può essere considerata una strategia appropriata per guidare la terapia; questi parametri possono essere calcolati dal profilo lipidico standard (1). Questo può compensare la sotto e sovra-stima di LDL-C in termini di decisione clinica, data l'incertezza delle misure di dLDL-C o del calcolo con la formula di Friedewald nei campioni dislipidemicici, quando la riduzione di LDL-C si avvicina a 1,4 mmol/L (55 mg/dL), e il non-HDL-C può essere utilizzato se i TG sono >4,5mmol/L (400 mg/dL). Comunque, la minore accuratezza dei metodi per il dHDL-C nei campioni ipertrigliceridemicici riduce il beneficio di usare il non-HDL-C nei soggetti nei quali una determinazione di apoB o LDL-P potrebbe essere clinicamente utile.

Apolipoproteina B

I dati ottenuti in base alle analisi di concordanza/discordanza di ampi studi caso-controllo come pure studi prospettici di coorte, dimostrano che l'aggiunta di apoB a LDL-C e anche il non-HDL-C, consente di migliorare la predizione del rischio grazie all'identificazione di più individui ad alto rischio (74,84-86). Questo è coerente con l'evidenza che il rischio di ASCVD è più direttamente correlato al numero di

particelle contenenti apoB (come evidenziato dalla misura di apoB) rispetto al contenuto di colesterolo delle lipoproteine (10). L'implicazione di un LDL-C discordante *versus* apoB (uno normale, l'altro elevato) è più evidente in pazienti che presentano concentrazioni ottimali di CT e di LDL-C con predominanza di LDL-Ps piccole, povere di colesterolo. Questo è un profilo lipidico comune soprattutto negli individui con sindrome metabolica o diabete, e in coloro che assumono farmaci quali statine e anti-PCSK9, che riducono LDL-C in misura maggiore rispetto ad apoB (87-89). Tutto ciò produce inevitabilmente una quantità di particelle LDL-P e VLDL più alta rispetto a quanto prevedibile dal concomitante monitoraggio della misura di LDL-C e può spiegare parte del rischio residuo nei pazienti trattati con statine (62,90).

Nei pazienti con una classe di rischio moderato, in particolare quelli con fattori di rischio metabolici aggiuntivi, la misura di apoB (o LDL-P) può essere utile come "fattore incrementale di rischio" (6). La presenza di fattori che aumentano il rischio, incluso apoB, può spostare l'equilibrio di una decisione condivisa medico-paziente verso un inizio precoce di terapia farmacologica, soprattutto in prevenzione primaria, se i risultati non possono essere raggiunti tramite modifiche dello stile di vita (6).

Bersaglio terapeutico secondario: non-HDL-C o apoB?

Le linee guida suggeriscono di usare il non HDL-C o apoB come obiettivo terapeutico secondario nella gestione dei pazienti con ipertrigliceridemia da lieve a moderata (2-10 mmol/L; 177-890 mg/dL), includendo i pazienti con diabete (4, 5). Se l'obiettivo principale, e cioè il valore di LDL-C, è raggiunto, ma non-HDL-C o apoB sono ancora elevati, il raggiungimento di tutti e tre gli obiettivi richiederà terapie ipolipemizzanti più intense, interventi più decisi sullo stile di vita, e/o farmaci per abbassare i TG (ad esempio fibrati o acidi grassi omega-3) [4]. L'aggiunta degli inibitori di PCSK9 alla terapia statinica permette a più pazienti di raggiungere gli obiettivi relativi a non-HDL-C e apoB e abbassare così il rischio di ASCVD, senza attenuazione del beneficio che si ottiene a concentrazioni inferiori (88).

Quale parametro scegliere come obiettivo secondario: non-HDL-C o apoB? Sebbene apoB dimostri prestazioni cliniche competitive rispetto a non-HDL-C, non c'è ancora evidenza di un beneficio economico-sanitario per la popolazione, derivante dalla intensificazione di un intervento farmacologico mirato a ridurre ulteriormente apoB in presenza di concentrazioni molto basse di LDL-C (1). Per ora, e finché questo problema non sarà chiarito, non-HDL-C è una scelta accettabile e può essere usato senza spese o misure di laboratorio aggiuntive.

Raccomandazione VIII

- L'uso di non-HDL-C o apoB dovrebbe essere considerato come un indicatore dell'efficacia di una terapia che ha come obiettivo LDL-C. A questo fine, tutti i referti dei profili lipidici dovrebbero automaticamente aggiungere il non-HDL-C. Questo approccio presenta anche vantaggi pratici nel monitoraggio della terapia, che migliorano il benessere e l'adesione alla terapia del paziente, in quanto questa misura può essere eseguita anche su campioni prelevati non a digiuno (2).

- A concentrazioni di TG >4,5mmol/L (400 mg/dL), una condizione nella quale non è raccomandato l'utilizzo della stima di cLDL-C ottenuto con entrambe le formule (Friedewald o Martin-Hopkins), e in cui anche il dLDL-C è probabilmente inaccurato, può essere considerato l'impiego del calcolo per non-HDL-C in sostituzione della misura del dLDL-C per valutare la risposta terapeutica.

IX. COME REFERTARE I PROFILI LIPIDICI ATEROGENICI?

Valori soglia

Si raccomanda che i referti di laboratorio evidenzino le concentrazioni alterate del profilo lipidico con allarmi basati sui valori soglia definiti dalle linee guida, ad esempio i valori soglia decisionali per iniziare la terapia o per identificare un rischio aumentato di ASCVD (Tabella 8). Per campioni prelevati non a digiuno, i laboratori dovrebbero evidenziare una alterazione della concentrazione di TG per valori >2 mmol/L (177 mg/dL) in accordo con lo "Women's Health Study", che ha indicato questo valore come ottimale per la predizione di ASCVD (91). Il valore soglia per i TG a digiuno è 1,7 mmol/L (150 mg/dL) ed è 0,3 mmol/L (27 mg/dL) più basso rispetto ai TG non a digiuno, e che corrisponde all'aumento medio massimo della concentrazione di TG che si verifica in seguito all'introito abituale di cibo (2). I valori soglia non a digiuno corretti per Remnant-C e, di conseguenza anche per non-HDL-C, potrebbero essere considerati opzionali (Tabella 8). Nel caso in cui il periodo postprandiale del paziente nelle 12 ore precedenti il ricevimento del campione in laboratorio sia sconosciuto, potrebbe essere prudente applicare i valori soglia a digiuno, che sono più bassi, per attirare l'attenzione su un potenziale rischio cardiovascolare.

Per il LDL-C, il valore soglia decisionale per iniziare un intervento terapeutico varia con la classe di rischio individuale (Tabella 6) (4). Questo tipo di referto personalizzato con soglie ottimali per lo specifico paziente è difficile da implementare nei referti del laboratorio perché di solito le condizioni cliniche ed i fattori di rischio di ogni paziente non sono noti al personale del laboratorio. Pertanto, viene proposta una semplificazione, basata su un unico allarme per la soglia di basso rischio (3 mmol/L; 115 mg/dL); il referto potrebbe essere completato da informazioni più dettagliate sui valori stratificati per rischio con note a piè di pagina o da rimandi a fonti di informazioni autorevoli presenti sul web (2).

Tabella 8

Allarmi per concentrazioni di lipidi e apolipoproteine alterati in base ai valori soglia di predizione del rischio e per concentrazioni estremamente alterate (2).

Parametro	Valore Soglia	Commento interpretativo
Trigliceridi (TG) ^a	Digiuno >1,7 mmol/L (150 mg/dL) Non a digiuno >2 mmol/L (175 mg/dL)	>10 mmol/L (890 mg/dL): ipertrigliceridemia grave ad alto rischio di pancreatite acuta
Colesterolo totale (CT)	>5 mmol/L (190 mg/dL)	
Colesterolo LDL (LDL-C)	>3 mmol/L (115 mg/dL)	>13 mmol/L (500 mg/dL): considerare FH in omozigosi >5 mmol/L (190 mg/dL): considerare FH in eterozigosi
Colesterolo delle particelle remnants (Remnant-C)	Digiuno >0,8 mmol/L (30 mg/dL) Non a digiuno >0,9 mmol/L (35 mg/dL)	
Colesterolo non-HDL (non-HDL-C)	Digiuno >3,8 mmol/L (145 mg/dL) non a digiuno >3,9 mmol/L (150 mg/dL)	
apoB	>1 g/L (100 mg/dL)	<0,1 g/L (10 mg/dL): a-betalipoproteinemia genetica
Colesterolo HDL (HDL-C)	Uomini <1 mmol/L (40 mg/dL) Donne <1,2 mmol/L (45 mg/dL)	
apoA-I	Uomini <1,2 g/L (120 mg/dL) Donne <1,4 g/L (140 mg/dL)	<0,1 g/L (10 mg/dL): ipoalfalipoproteinemia genetica
Lp(a)	>50 mg/dL (>105 nmol/L) ^{b,c}	>120 mg/dL (>258 nmol/L): rischio molto alto di infarto miocardico e stenosi valvolare aortica

^aSoglia di TG basata sui metodi con correzione per il glicerolo endogeno. La concentrazione di glicerolo libero in un campione, di solito 1 mg/dL equivalente a circa 0,11 mmol/L (10 mg/dL) di TG, può essere ignorata. Concentrazioni basali più elevate di glicerolo si possono trovare in pazienti con diabete o malattia renale cronica e durante infusione lipidica per via endovenosa; i TG possono essere erroneamente allarmati in questi pazienti, a meno che non venga usato un metodo per TG corretto per glicerolo.

^bI valori soglia per Lp(a) dovrebbero essere >80° percentile del metodo per Lp(a) specifico per la popolazione.

^cNon esiste un consenso sui valori soglia in mmol/L utilizzabili per Lp(a); la conversione della concentrazione di Lp(a) da mg/dL a nmol/L, è stata effettuata su 13930 individui dallo Copenhagen General Population Study nei quali Lp(a) è stata misurata sia in mg/dL che nmol/L con metodo Denka Selken distribuito da Roche Diagnostics (Rotkreuz, Switzerland). La correlazione è stata ottenuta tramite regressione lineare con un valore di R² di 0,996, e la conversione è stata effettuata usando la seguente equazione: Lp(a), nmol/L = 2,18 x Lp(a), mg/dL - 3,83 (3).

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi

Data l'incertezza delle misure e delle stime per LDL-C con i diversi metodi disponibili ed in diversi laboratori, nei pazienti con ipertrigliceridemia i valori soglia decisionali potrebbero non essere sempre applicabili universalmente (1). I valori soglia per LDL-C raccomandati dalle linee guida sono basati su valori di cLDL-C ottenuti con la formula di Friedewald e con il HDL-C misurato con i vecchi metodi di precipitazione, che differiscono dai metodi per dHDL-C usati attualmente. La situazione può costituire una criticità per i metodi di nuova generazione in quanto per adeguarsi alle attuali regolamentazioni sui metodi diagnostici in vitro, si richiede l'evidenza delle prestazioni cliniche del nuovo metodo (70).

Valori di riferimento

Nei referti di laboratorio, i risultati della maggior parte degli esami vengono usualmente evidenziati quando sono al di sotto o al di sopra dell'intervallo di riferimento

specifico per età e sesso (2,5°- 97,5° percentile). A causa del diffuso stile di vita poco salutare, nella maggior parte delle popolazioni i valori di riferimento superiori di CT, LDL-C, e TG sono elevati e molto al di sopra dei valori soglia di aumentato rischio ASCVD (Tabella 2 e 3, Figura 2). Pertanto, la segnalazione di profili lipidici alterati negli adulti non dovrebbe essere basata sui valori di riferimento (2). In un contesto pediatrico, può essere importante riportare gli intervalli di riferimento per età e sesso per l'identificazione precoce di una iperlipidemia associata ad aterosclerosi prematura, soprattutto FH (32).

I valori di riferimento dei parametri lipidici misurati non a digiuno negli adulti, ricavati dal "Copenhagen General Population Study" sono riportati nelle Tabelle 2 e 3. Sono disponibili anche gli intervalli di riferimento nei bambini e negli adolescenti che sono stati ricavati da studi di coorte sulla popolazione generale e da banche dati (92-94). I Paesi devono essere incoraggiati a stabilire gli intervalli di riferimento nelle popolazioni

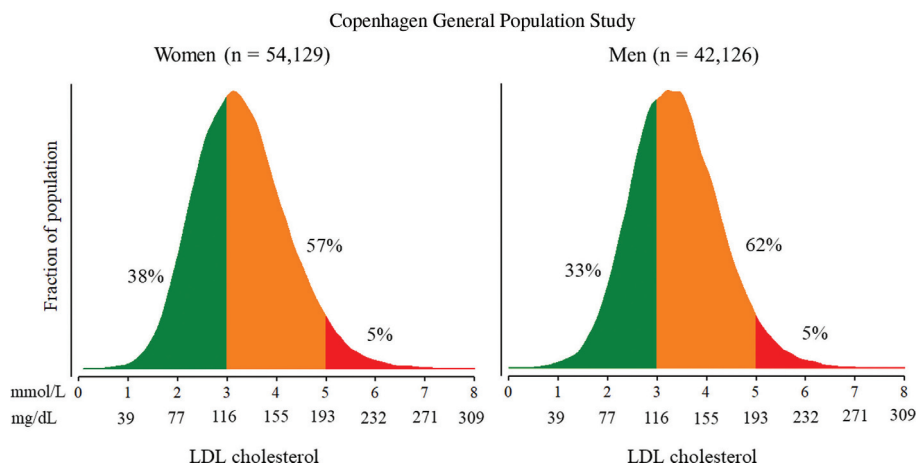


Figura 2

Distribuzione della concentrazione di LDL-C su campioni prelevati non a digiuno in uomini e donne non in terapia ipolipemizzante, dal Copenhagen General Population Study.

I valori di TG, CT, e HDL-C sono stati determinati su analizzatori automatizzati (Thermo Scientific Konelab, Vantaa, Finland). LDL-C è stato calcolato con l'equazione di Friedewald quando i TG erano <4 mmol/L (355 mg/dL) ed è stato misurato direttamente (Konelab) quando i TG erano >4 mmol/L (3). Le due popolazioni di uomini e donne sono state suddivise secondo i valori di LDL-C: superiori a 5 mmol/L (195 mg/dL) (circa il 95° percentile al di sopra del quale dovrebbe essere considerata una FH), tra 3 e 5 mmol/L (115-195 mg/dL), e <3 mmol/L (115 mg/dL) (il valore soglia raccomandato dalle linee guida). Dal momento che l'utilizzo degli allarmi sul referto basati sugli intervalli di riferimento non segnalerebbe la maggioranza di valori di LDL-C (~60%) associati ad un aumentato rischio di ASCVD, questa tipologia di allarme dovrebbe essere evitata. I dati di LDL-C stratificati per età si possono trovare in Tabella 2 e 3.

FH, ipercolesterolemia famigliare; ASCVD, malattia aterosclerotica cardiovascolare.

Per trasformare i valori in mmol/L da mg/dL, dividere per 38,6 i valori riferibili al colesterolo (totale, LDL e HDL) e per 88,8 i valori dei trigliceridi.

locali, in modo da tener conto delle differenze negli stili di vita e dei fattori di rischio esistenti nelle diverse regioni europee. In teoria, questi intervalli di riferimento dovrebbero essere regolarmente aggiornati perché si possono verificare modificazioni significative nelle concentrazioni dei parametri lipidici della popolazione a causa del diffondersi nel tempo di stili di vita poco salubri e dell'obesità nonché dai cambiamenti dei metodi analitici (95-97). Se il laboratorio clinico decide di adottare valori di riferimento ricavati dalla letteratura che riportino i dati di variabilità biologica ed analitica, questi valori dovrebbero essere verificati utilizzando i propri metodi analitici su almeno 20 campioni presi dalla popolazione locale adottando condizioni preanalitiche confrontabili (96, 97). Se <2 su 20 valori ($<10\%$) cadono al di fuori dell'intervallo di riferimento, allora l'intervallo può essere adottato (96, 97). Per i valori soglia relativi alla decisione clinica non è necessaria una validazione nel singolo laboratorio (97).

Valori di allerta

La segnalazione nel referto dei valori dei parametri lipidici basata sui valori soglia decisionali avrà come conseguenza la generazione di molti profili lipidici allarmati, ad esempio $>50\%$ dei risultati di LDL-C (Figura 2). C'è il rischio che un referto con molti asterischi impedisca ai clinici di notare concentrazioni veramente elevate, distraendo così dalla identificazione di

dislipidemie severe, specialmente quando gli esami di laboratorio vengono utilizzati nello screening di popolazione, tipicamente nelle cure primarie. Considerando questo rischio, abbiamo suggerito di evidenziare con segnali di allerta solo valori "estremi" che richiedono una notifica speciale e una specifica reazione del laboratorio (2).

I risultati "estremi" dovrebbero essere segnalati con notifiche di allerta specifiche al fine di consentire al clinico di procedere velocemente con ulteriori azioni diagnostiche e possibilmente terapeutiche (Tabella 8). Per esempio, i pazienti con ipertrigliceridemia >10 mmol/L (890 mg/dL) e con chilomicronemia hanno un elevato rischio di pancreatite acuta, ma di solito non sviluppano aterosclerosi precoce, probabilmente perché i chilomicroni e le grandi VLDL non attraversano la barriera vascolare endoteliale (33). Lp(a) superiori al 97,5° percentile (>120 mg/dL, a seconda del metodo), dovrebbero essere segnalate per l'elevato rischio di infarto miocardico e di stenosi valvolare aortica (2). Qualsiasi valore di LDL-C >5 mmol/L (200 mg/dL) nell'adulto o >4 mmol/L (155 mg/dL) nel bambino, dovrebbe portare ad indagini per escludere FH e, se la diagnosi di FH è confermata, intraprendere lo screening familiare (31, 32). Nei pazienti con iperlipidemia mista non sono raccomandati test genetici di routine (33). Esami di approfondimento possono essere di aiuto ai clinici per escludere le comuni cause secondarie di iperlipidemia impiegando ulteriori esami di laboratorio

come ad esempio la determinazione di tirotropina, emoglobina A1c, enzimi epatici, e creatinina/eGFR, se non già noti (98).

Raccomandazione IX

- La segnalazione di profili lipidici alterati sui referti di laboratorio dovrebbe sempre essere basata sui valori soglia. Nei bambini è rilevante riportare gli intervalli di riferimento.

- Concentrazioni estremamente elevate dovrebbero generare allarmi automatici specifici per dar corso a ulteriori immediate indagini diagnostiche

CONCLUSIONI E FUTURE PRIORITÀ DI RICERCA

Le raccomandazioni di consenso di EAS e EFLM forniscono indicazioni per l'utilizzo delle determinazioni oggi disponibili di lipidi, lipoproteine, e apolipoproteine con lo scopo di assistere i clinici nelle strategie di prevenzione di ASCVD (1,2). Queste raccomandazioni prendono in considerazione i punti di forza e di debolezza di questi esami di laboratorio basandosi sui criteri essenziali che identificano esami clinicamente utili, come definito dal gruppo di lavoro Working Group "Test Evaluation" di EFLM (70).

Il calcolo di non-HDL-C e di Remnant-C aggiunti al profilo lipidico standard, un profilo "espanso" comprendente la determinazione di apoB e Lp(a), nonché determinazioni "avanzate" come le LDL-P hanno il potenziale di soddisfare le necessità cliniche non soddisfatte dalla misura del solo LDL-C e possono essere eseguite in campioni prelevati non a digiuno. La priorità della ricerca è di indagare se le informazioni diagnostiche fornite dai profili lipidici espansi o avanzati possono modificare sostanzialmente la gestione clinica del paziente al fine di ridurre il rischio (e i costi) di ASCVD rispetto all' approccio standard focalizzato su LDL-C.

Il diabete e l'obesità addominale, condizioni che sono alla base della espressione clinica di dislipidemie complesse senza aumento di LDL-C, stanno raggiungendo proporzioni epidemiche (11). Pertanto, rilevare e misurare queste lipoproteine "aggiuntive" diventerà probabilmente sempre più utile in futuro. Tutto questo sottolinea la necessità di standardizzare ed approvare questi esami lipoproteici "avanzati", che utilizzano spettroscopia NMR o a mobilità ionica per la determinazione del numero e della dimensione delle LDL-P o delle VLDL (62, 63) e metodi in LC-MSMS per la determinazione dei profili apolipoproteici (68), che possono diventare esami clinici diffusamente disponibili (99). Queste nuove tecnologie forniscono informazioni diagnostiche complementari riguardanti le complesse basi molecolari delle dislipidemie e, come tali, possono essere usate per esplorare e valutare nuovi approcci di "medicina di precisione" al fine di identificare migliori ed individualizzate strategie terapeutiche per i pazienti a rischio elevato di ASCVD (99).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Langlois MR, Chapman MJ, Cobbaert C, Mora S, Remaley AT, Ros E, et al. European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Joint Consensus Initiative. Quantifying Atherogenic Lipoproteins: Current and Future Challenges in the Era of Personalized Medicine and Very Low Concentrations of LDL Cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM. *Clin Chem* 2018;64:1006–33.
- Nordestgaard BG, Langsted A, Mora S, Kolovou G, Baum H, Bruckert E, et al. European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Consensus Panel. Fasting is not routinely required for a lipid profile: Clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points – a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur Heart J* 2016;37:1944–58.
- Langsted A, Kamstrup PR, Nordestgaard BG. High lipoprotein(a) and high risk of mortality. *Eur Heart J* 2019;40:2760–70.
- Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2019 doi: 10.1093/eurheartj/ehz455 [Epub ahead of print].
- Anderson TJ, Grégoire J, Pearson GJ, Barry AR, Couture P, Dawes M, et al. 2016 Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult. *Can J Cardiol* 2016;32:1263–82.
- Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018 AHA/AAC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APHA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:e285–350.
- Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2017;38:2459–72.
- Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N, et al. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 2010;376:1670–81.
- Mudd JO, Borlaug BA, Johnston PV, Kral BG, Rouf R, Blumenthal RS, Kwiterovich PO Jr. Beyond low-density lipoprotein cholesterol: defining the role of low-density lipoprotein heterogeneity in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1735–41.
- Mora S. Advanced lipoprotein testing and subfractionation are not (yet) ready for routine clinical use. *Circulation*

- 2009;119:2396–404.
11. Miller M, Stone J, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:2292–333.
 12. Contois JH, McConnell JP, Sethi AA, Csako G, Devaraj S, Hoefner DM, et al. Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Disease Working Group on Best Practices. *Clin Chem* 2009;55:407–19.
 13. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano AL, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011;32:1345–61.
 14. Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet* 2014;384:626–35.
 15. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting lipids and apolipoproteins for predicting incident cardiovascular events. *Circulation* 2008;118:993–1001.
 16. Nordestgaard BG. A test in context: lipid profile, fasting versus non-fasting. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:1637–46.
 17. Nordestgaard BG. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology. *Circ Res* 2016;118:547–63.
 18. Thomsen M, Varbo A, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Low nonfasting triglycerides and reduced all-cause mortality: a Mendelian Randomization Study. *Clin Chem* 2014;60:737–46.
 19. Varbo A, Nordestgaard BG. Remnant lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2017;28:300–7.
 20. Varbo A, Freiberg JJ, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol and myocardial infarction in normal weight, overweight, and obese individuals from the Copenhagen General Population Study. *Clin Chem* 2018;64:219–30.
 21. Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med* 2013;273:6–30.
 22. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Boren J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010;31:2844–53.
 23. Nordestgaard BG, Langsted A. Lipoprotein(a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology. *J Lipid Res* 2016;57:1953–75.
 24. Willeit P, Ridker PM, Nestel PJ, Simes J, Tonkin AM, Pedersen TR, et al. Baseline and on-statin treatment lipoprotein(a) levels for prediction of cardiovascular events: individual patient-data meta-analysis of statin outcome trials. *Lancet* 2018;392:1311–20.
 25. Tsimikas S, Fazio S, Ferdinand KC, Ginsberg HN, Koschinsky ML, Marcovina SM, et al. NHLBI Working Group Recommendations to Reduce Lipoprotein(a) – Mediated Risk of Cardiovascular Disease and Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:177–92.
 26. Tsimikas S. A test in context: lipoprotein(a): diagnosis, prognosis, controversies, and emerging Therapies. *J Am Coll Cardiol* 2017;69:692–711.
 27. O'Donoghue ML, Fazio S, Guigliano RP, Stroes ESG, Kanevsky E, Gouni-Berthold I, et al. Lipoprotein(a), PCSK9 inhibition and cardiovascular risk: insights from the FOURIER Trial. *Circulation* 2019;139:1483–92.
 28. Ray KK, Vallejo-Vaz AJ, Ginsberg HN, Davidson MH, Louie MJ, Bujas-Bobanovic M, et al. Lipoprotein(a) reductions from PCSK9 inhibition and major adverse cardiovascular events: pooled analysis of alirocumab phase 3 trials. *Atherosclerosis* 2019;288:194–202.
 29. Viney NJ, van Capelleveen JC, Geary RS, Xia S, Tami JA, Yu RZ, et al. Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. *Lancet* 2016;388:2239–53.
 30. Langlois MR, Nordestgaard BG. Which lipids should be analyzed for diagnostic workup and follow-up of patients with hyperlipidemias? *Curr Cardiol Rep* 2018;20:88.
 31. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013;34:3478–90a.
 32. Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, Chapman MJ, Ginsberg HN, Cuchel M, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J* 2015;36:2425–37.
 33. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:655–66.
 34. Langsted A, Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Lipoprotein(a): fasting and nonfasting levels, inflammation, and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2014;234:95–101.
 35. Langsted A, Nordestgaard BG. Nonfasting versus fasting lipid profile for cardiovascular risk prediction. *Pathology* 2019;51:131–41.
 36. Mora S, Chang CL, Moorthy MV, Sever PS. Association of nonfasting vs fasting lipid Levels with risk of major coronary events in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-lipid lowering arm. *J Am Med Assoc Intern Med* 2019;179:898–905.
 37. Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, Lippi G, Nybo M. Standardization of collection requirements for fasting samples: for the Working Group on Preanalytical Phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clin Chim Acta* 2014;432:33–7.
 38. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). NICE Guidance. Cardiovascular disease: risk assessment and reduction, including lipid modification. NICE CG181. Updated 2016. Available at <https://www.nice.org.uk/guidance/cg181>. Accessed 30 January 2019.
 39. Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC, et al. Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:2015–38.
 40. Ramasamy I. Update on the laboratory investigation of dyslipidemias. *Clin Chim Acta* 2018;479:103–25.
 41. Contois JH, Warnick GR, Sniderman AD. Reliability of lowdensity lipoprotein cholesterol, non-high density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B measurement. *J Clin Lipidol* 2011;5:264–72.
 42. Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin Chem* 2010;56:977–86.
 43. Langlois MR, Descamps OS, van der Laarse A, Weykamp C, Baum H, Pulkki K, et al. Clinical impact of direct HDLc and LDLc method bias in hypertriglyceridemia. A simulation study of the EAS-EFLM Collaborative Project

- Group. *Atherosclerosis* 2014;233:83–90.
44. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem* 2002;48:236–25.
 45. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Brinton EA, Toth PP, McEvoy JW, et al. Friedewald-estimated versus directly measured lowdensity lipoprotein cholesterol and treatment implications. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:732–9.
 46. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, Jones SR. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *J Am Med Assoc* 2013;310:2061–8.
 47. Sathiyakumar V, Park J, Golozar A, Lazo M, Quispe R, Guallar E, et al. Fasting versus nonfasting and low-density lipoprotein cholesterol accuracy. *Circulation* 2018;137:10–19.
 48. Martin SS, Giugliano RP, Murphy SA, Wasserman SM, Stein EA, Ceška R, et al. Comparison of low-density lipoprotein cholesterol assessment by Martin/Hopkins estimation, Friedewald estimation, and preparative ultracentrifugation: insights from the FOURIER trial. *J Am Med Assoc* 2018;3:749–53.
 49. Johns Hopkins Medicine. Johns Hopkins medical apps. LDL Cholesterol Calculator. Available at <https://www.hopkinsmedicine.org/apps/all-apps/ldl-cholesterol-calculator>. Accessed 26 August 2019.
 50. Palmer MK, Barter PJ, Lundman P, Nicholls SJ, Toth PP, Carlson BW. Comparing a novel equation for calculating low-density lipoprotein cholesterol with the Friedewald equation: a VOYAGER analysis. *Clin Biochem* 2019;64:24–9.
 51. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Comparison of LDL cholesterol concentrations by Friedewald calculation and direct measurement in relation to cardiovascular events in 27,331 women. *Clin Chem* 2009;55:888–94.
 52. Yeang C, Witztum JL, Tsimikas S. 'LDLC' = LDL-C + Lp(a)-C: implications of achieved ultra-low LDL-C levels in the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 era of potent LDL-C lowering. *Curr Opin Lipidol* 2015;26:169–78.
 53. Tsimikas S, Fazio S, Viney NJ, Xia S, Witztum JL, Marcovina SM. Relationship of lipoprotein(a) molar concentrations and mass according to lipoprotein(a) thresholds and apolipoprotein(a) isoform size. *J Clin Lipidol* 2018;12:1313–23.
 54. Aarsand AK, Díaz-Garzón J, Fernández-Calle P, Guerra E, Locatelli M, Bartlett WA, et al. European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Biological Variation. 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.
 55. Díaz-Garzón J, Fernández-Calle P, Minchinela J, Aarsand AK, Bartlett WA, Aslan B, et al. Biological variation data for lipid cardiovascular risk assessment biomarkers. A systematic review applying the biological variation data critical appraisal checklist (BIVAC). *Clin Chim Acta* 2019;495:467–75.
 56. Robinson JG, Wang S, Smith BJ, Jacobson TA. Meta-analysis of the relationship between non-high-density lipoprotein cholesterol reduction and coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:316–22.
 57. Silverman MG, Ference BA, Im K, Wiviott SD, Giugliano RP, Grundy SM, et al. Association between lowering LDL-C and cardiovascular risk reduction among different therapeutic interventions: a systematic review and meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2016;316:1289–97.
 58. van Deventer HE, Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, et al. Non-HDL-cholesterol shows improved accuracy for cardiovascular risk score classification compared to direct or calculated LDL cholesterol in a dyslipidemic population. *Clin Chem* 2011;57:490–501.
 59. Mehta R, Reyes-Rodríguez E, Bello-Chavolla OY, Guerrero-Díaz AC, Vargas-Vázquez A, Cruz-Bautista I, et al. Performance of LDL-C calculated with Martin's formula compared to the Friedewald equation in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2018;277:204–10.
 60. Sathiyakumar V, Park J, Quispe R, Elshazy MB, Michos ED, Banach M, et al. Impact of novel low-density lipoprotein cholesterol assessment on the utility of secondary non-highdensity lipoprotein-cholesterol and apolipoprotein B targets in selected worldwide dyslipidemia guidelines. *Circulation* 2018;138:244–54.
 61. Cole TG, Contois JH, Csako C, McConnell JP, Remaley AT, Devaraj S, et al. Association of apolipoprotein B and nuclear magnetic resonance spectroscopy-derived LDL particle number with outcomes in 25 clinical studies: assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin Chem* 2013;59:752–70.
 62. Mora S, Caulfield MP, Wohlgenuth J, Chen Z, Superko HR, Rowland CM, et al. Atherogenic lipoprotein subfractions determined by ion mobility and first cardiovascular events after random allocation to high-intensity statin or placebo. The Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) Trial. *Circulation* 2015;132:2220–9.
 63. Clouet-Foraison N, Gaie-Levrel F, Gillery P, Delatour V. Advanced lipoprotein testing for cardiovascular diseases risk assessment: a review of the novel approaches in lipoprotein profiling. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1453–64.
 64. Marcovina SM, Albers JJ, Kennedy H, Mei JV, Henderson LO, Hannon WH. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. IV. Comparability of apolipoprotein B values by use of International Reference Material. *Clin Chem* 1994;40:586–92.
 65. Cao J, Steffen BT, Guan W, Remaley AT, McConnell JP, Palamalai V, et al. A comparison of three apolipoprotein B methods and their associations with incident coronary heart disease risk over a 12-year follow-up period: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Clin Lipidol* 2018;12:300–4.
 66. Grundy SM, Vega GL, Tomassini JE, Tershakovec AM. Comparisons of apolipoprotein B levels estimated by immunoassay, nuclear magnetic resonance, vertical auto profile, and non-highdensity lipoprotein cholesterol in subjects with hypertriglyceridemia (SAFARI Trial). *Am J Cardiol* 2011;108:40–6.
 67. Delatour V, Clouet-Foraison N, Gaie-Levrel F, Marcovina SM, Hoofnagle AN, Kuklennyik Z, et al. Comparability of lipoprotein particle number concentrations across ES-DMA, NMR, LC-MS/MS, immunonephelometry, and VAP: in search of a candidate reference measurement procedure for apoB and non-HDL-P standardization. *Clin Chem* 2018;64:1485–95.
 68. van den Broek I, Romijn FP, Nouta J, van der Laarse A, Drijfhout JW, Smit NP, et al. Automated multiplex LC-MS/MS assay for quantifying serum apolipoproteins A-I, B, C-I, C-II, C-III, and E with qualitative apolipoprotein E phenotyping. *Clin Chem* 2016;62:188–97.
 69. Contois JH, Delatour V. Apolipoprotein B measurement: need for standardization. *J Clin Lipidol* 2018;12:264–5.

70. Horvath AR, Lord SJ, St John A, Sandberg S, Cobbaert CM, Lorenz S, et al. From biomarkers to medical tests: the changing landscape of test evaluation. *Clin Chim Acta* 2014;427:49–57.
71. Sniderman AD, Williams K, Contois JH, Monroe HM, McQueen MJ, de Graaf J, et al. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2011;4:337–45.
72. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al. Emerging Risk Factors Collaboration. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *J Am Med Assoc* 2009;302:1993–2000.
73. Di Angelantonio E, Gao P, Pennells L, Kaptoge S, Caslake M, Thompson A, et al. Emerging Risk Factors Collaboration. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *J Am Med Assoc* 2012;307:2499–506.
74. Welsh C, Celis-Morales CA, Brown R, Mackay DF, Lewsey J, Mark PB, et al. Comparison of conventional lipoprotein tests and apolipoproteins in the prediction of Data from UK Biobank. *Circulation* 2019;140:542–52.
75. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, Pedersen TR, LaRosa JC, Nestel PJ, et al. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2012;307:1302–9.
76. Robinson JG, Wang S, Jacobson TA. Meta-analysis of comparison of effectiveness of lowering apolipoprotein B versus low-density lipoprotein cholesterol and non high-density lipoprotein cholesterol for cardiovascular risk reduction in randomized trials. *Am J Cardiol* 2012;110:1468–76.
77. Thanassoulis G, Williams K, Ye K, Brook R, Couture P, Lawler PR, et al. Relations of change in plasma levels of LDL-C, non-HDL-C and apoB with risk reduction from statin therapy: a meta-analysis of randomized trials. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e000759.
78. Khan SU, Khan MU, Valavoor S, Khan MS, Okunrintemi V, Mamas MA, et al. Association of lowering apolipoprotein B with cardiovascular outcomes across various lipid-lowering therapies: systematic review and meta-analysis of trials. *Eur J Prev Cardiol* 2019. doi:10.1177/2047487319871733 [Epub ahead of print].
79. Ference BA, Kastelein JJP, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nicholls SJ, Ray KK, et al. Association of genetic variants related to CETP inhibitors and statins with lipoprotein levels and cardiovascular risk. *J Am Med Assoc* 2017;318:947–56.
80. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, Ginsberg HN, Chapman MJ, Packard CJ, et al. Association of triglyceride-lowering LPL variants and LDL-C-lowering LDLR variants with risk of coronary heart disease. *J Am Med Assoc* 2019;321:364–73.
81. Arsenault BJ, Rana JS, Stroes ES, Després JP, Shah PK, Kastelein JJ, et al. Beyond low-density lipoprotein cholesterol: respective contributions of non-high-density lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, and the total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio to coronary heart disease risk in apparently healthy men and women. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:35–41.
82. Masana L, Ibarretxe D, Heras M, Cabré A, Ferré R, Merino J, et al. Substituting non-HDL cholesterol with LDL as a guide for lipid-lowering therapy increases the number of patients with indication for therapy. *Atherosclerosis* 2013;226:471–5.
83. Elishazly MB, Martin SS, Blaha MJ, Joshi PH, Toth PP, McEvoy JW, et al. Non-high-density lipoprotein cholesterol, guideline targets, and population percentiles for secondary prevention in 1.3 million adults: the VLDL-2 study (very large database of lipids). *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1960–5.
84. Mora S, Buring JE, Ridker PM. Discordance of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol with alternative LDL-related measures and future coronary events. *Circulation* 2014;129:553–61.
85. Lawler PR, Akinkuolie AO, Ridker PM, Sniderman AD, Buring JE, Glynn RJ, et al. Discordance between circulating atherogenic cholesterol mass and lipoprotein particle concentration in relation to future coronary events in women. *Clin Chem* 2017;63:870–9.
86. Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB. Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. *Circulation* 2005;112:3375–83.
87. Wong ND, Chuang J, Zhao Y, Rosenblit PD. Residual dyslipidemia according to low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B among statin-treated US adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009–2010. *J Clin Lipidol* 2015;9:525–32.
88. Ray KK, Ginsberg HN, Davidson MH, Pordy R, Bessac L, Minini P, et al. Reductions in atherogenic lipids and major cardiovascular events: a pooled analysis of 10 ODYSSEY trials comparing alirocumab with control. *Circulation* 2016;134:1931–43.
89. Rosenson RS, Jacobson TA, Preiss D, Djedjos CS, Dent R, Bridges I, et al. Efficacy and safety of the PCSK9 inhibitor Evolocumab in patients with mixed hyperlipidemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 2016;30:305–13.
90. Lawler PR, Akinkuolie AO, Chu AY, Shah SH, Kraus WE, Craig D, et al. Atherogenic lipoprotein determinants of cardiovascular disease and residual risk among individuals with low low-density lipoprotein cholesterol. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e005549.
91. White KT, Moorthy MV, Akinkuolie AO, Demler O, Ridker PM, Cook NR, et al. Identifying an optimal cutpoint for the diagnosis of hypertriglyceridemia in the nonfasting state. *Clin Chem* 2015;61:1156–63.
92. Dathan-Stumpf A, Vogel M, Hiemisch A, Thiery J, Burkhardt R, Kratzsch J, et al. Pediatric reference data of serum lipids and prevalence of dyslipidemia: results from a population-based cohort in Germany. *Clin Biochem* 2016;49:740–9.
93. Balder JW, Lansberg PJ, Hof MH, Wiegman A, Hutten BA, Kuivenhoven JA. Pediatric lipid reference values in the general population: the Dutch Lifelines cohort study. *J Clin Lipidol* 2018;12:1208–16.
94. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem* 2012;58:854–68.
95. Ichihara K, Ozarda Y, Barth JH, Klee G, Shimizu Y, Xia L, et al. Committee on Reference Intervals and Decision Limits, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and Science Committee, Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry. A global multicenter study on reference values: 2. Exploration of sources of variation across the countries. *Clin Chim Acta* 2017;467:83–97.
96. Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009;46:8–17.
97. Henny J, Vassault A, Boursier G, Vukasovic I, Mesko Brguljan P, Lohmander M, et al. Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) of the EFLM. Recommendation for the review of biological

- reference intervals in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1893–900.
98. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease. *Endocrine Practice* 2017;23(Suppl 2):1–87.
 99. Ruhaak LR, van der Laarse A, Cobbaert CM. Apolipoprotein profiling as a personalized approach to the diagnosis and treatment of dyslipidaemia. *Ann Clin Biochem* 2019;56:338–56.

Il ruolo del laboratorio di Biochimica Clinica nell'organizzazione di un evento sportivo internazionale: la XXX Universiade Estiva

Renato de Falco¹, Luigi Fotia¹, Cristina Mazzaccara^{1,2,3}, Giulia Frisso^{1,2,3}, Giuliana Fortunato^{1,2,3}

¹Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica e Biochimica Clinica, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

²Dipartimento Assistenziale Integrato di Medicina di Laboratorio e Trasfusionale, A.O.U. Federico II, Napoli

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

Caro Editore,

l'organizzazione di un grande evento sportivo, quale la XXX Universiade, svoltasi a Napoli dal 26 giugno al 16 luglio 2019, richiede l'impiego di risorse specifiche in grado di assicurare non solo la logistica ma anche la perfetta gestione sanitaria dell'evento.

Le Universiadi sono un evento sportivo con cadenza biennale i cui protagonisti sono unicamente gli atleti delle varie università presenti su un territorio internazionale. In occasione della XXX Universiade sono stati costituiti un Villaggio Olimpico principale nella città di Napoli, sei Villaggi Olimpici accessori, dislocati in tutta la Campania, ed è stata nominata una Commissione responsabile della sorveglianza sanitaria e delle cure mediche dei partecipanti. A tutti gli atleti è stato consentito di potersi sottoporre ad esami ematochimici, su richiesta del personale medico presente nei Villaggi, con esecuzione *in loco* dei prelievi ematici.

La Commissione Sanitaria ha individuato nella Unità Operativa Complessa (UOC) di Biochimica Clinica ed Emergenze dell'Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Federico II di Napoli, il laboratorio di riferimento per le analisi ematochimiche, in quanto ha ritenuto opportuno che la gestione sanitaria di un evento che coinvolgeva atleti universitari di tutto il mondo fosse garantita da una struttura universitaria. In fase organizzativa la UOC di Biochimica Clinica ha dovuto: stabilire una procedura operativa per la corretta esecuzione degli esami ematochimici, dalla fase pre-pre-analitica a quella post-post-analitica; individuare le tipologie di prestazioni analitiche richiedibili da parte dei medici dei Villaggi Olimpici; effettuare una stima della numerosità delle potenziali prestazioni.

Tra l'ipotesi di allestire un laboratorio di indagini ematochimiche presso il Villaggio Olimpico principale, che avrebbe consentito di processare rapidamente almeno i campioni prelevati in tale sede, e la possibilità di inviare i campioni biologici presso la UOC di Biochimica Clinica ed Emergenze dell'AOU Federico II, in cui il Total Testing Process è già collaudato secondo le più recenti linee guida (1), è stata preferita la seconda ipotesi. Questa soluzione innegabilmente garantiva un elevato livello di qualità analitica, pur necessitando di organizzare logisticamente la fase pre-analitica, con particolare riguardo al trasporto dei campioni biologici provenienti da tutte le sedi dei Villaggi Olimpici, dislocati nell'intero territorio della Regione Campania. A tale scopo è stata incaricata, mediante gara d'appalto, una ditta di trasporto dei materiali biologici, che garantisse il completo rispetto delle raccomandazioni della Federazione Italiana delle Società di Medicina di Laboratorio (FISMeLab) per il trasporto del materiale biologico (2). La scelta delle prestazioni analitiche richiedibili è stata ispirata da quanto riportato nel lavoro relativo ai Giochi Olimpici di Rio de Janeiro del 2016 (3), in quanto non sono disponibili in letteratura relazioni su precedenti Universiadi. I sintomi più comunemente riscontrati dagli atleti durante le Olimpiadi di Rio de Janeiro del 2016 sono stati: dolore addominale o toracico (40%), diarrea (15%) e dispnea (14%). Di conseguenza, abbiamo selezionato le prestazioni analitiche che, secondo le più recenti linee guida, potessero essere considerate biomarcatori di primo livello per le sintomatologie sopra indicate e le possibili patologie associate.

Il modulo di richiesta indagini in uso presso la UOC di Biochimica Clinica dell'AOU Federico II è stato modificato, con l'introduzione di un riquadro ove specificare l'etnia del paziente.

Corrispondenza a: Giulia Frisso, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Via Pansini 5, 80131, Napoli. Tel +39 081 7462405, E-mail gfrisso@unina.it

Ricevuto: 27.03.2020

Revisionato: 30.03.2020

Accettato: 20.04.2020

Pubblicato on-line: 09.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.044

Seguendo le indicazioni di Soligard et al. (3) e considerando la variabilità dei principali marcatori biochimici ed ematologici durante e dopo la pratica dell'attività sportiva (4, 5), le indagini richiedibili sono state suddivise in quattro pannelli: Biochimiche (Tabella 1); Ematologiche (Tabella 2); danno cardiaco (troponina I ad alta sensibilità) e parametri coagulativi (tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale attivata, fibrinogeno, D-Dimero). Il pannello biochimico proposto include alcune indagini che potrebbero essere considerate ridondanti, ma che è stato ritenuto opportuno inserire in considerazione dell'eterogeneità culturale del personale medico che accompagnava gli atleti, che avrebbe potuto comunque richiederle espressamente. Il pannello di indagini biochimiche risulta molto utile anche per la valutazione dello stato di idratazione, poiché il bilancio idrico condiziona l'attività gastrointestinale e può essere correlato a disturbi della motilità intestinale (5, 6).

Soligard et al (3) riportano che il 5,4% degli atleti delle Olimpiadi di Rio de Janeiro ha avuto bisogno di sottoporsi ad esami ematochimici. Pertanto, è stato stimato che circa 430 atleti degli 8000 partecipanti avrebbero avuto necessità di eseguire indagini di laboratorio, nel periodo compreso tra il loro arrivo e la partenza. Tale stima è stata comunque effettuata "per eccesso", considerando che la UOC di Biochimica Clinica ed Emergenze non avrebbe dovuto eseguire indagini in emergenza (le sedi di Pronto Soccorso *in loco* avrebbero risposto a questa esigenza, garantendo tempi di risposta (Turn Around Time – TAT) adeguati a questa esigenza clinica), e che l'età degli atleti partecipanti alle Universiadi, generalmente inferiore rispetto a quella degli atleti olimpici, lasciava prevedere un minor numero di eventi patologici, rispetto a quello riportato nelle Olimpiadi.

La fase analitica è stata svolta secondo le procedure analitiche e di controllo del processo, standardizzate nel laboratorio, e non ha evidenziato alcuna non-conformità né criticità.

La principale problematica della fase post-analitica che la UOC di Biochimica Clinica ed Emergenze ha dovuto risolvere è stata l'eterogeneità etnica degli 8000 atleti partecipanti, che provenivano da 116 Nazioni diverse. Si è reso, pertanto, necessario diversificare gli intervalli di riferimento, in considerazione della variabilità biologica di alcuni analiti all'interno delle diverse etnie. A tal fine abbiamo utilizzato il report NHANES 2011-12 del Centers for Disease Control and Prevention (7), riferito ad una popolazione americana multi-etnica. Sono state identificate quattro etnie: caucasica, afroamericana, ispanica e asiatica, e sono state allegate al referto due tabelle (Tabelle 1-2) che

Tabella 1

Intervalli di riferimento del profilo biochimico, divisi per sesso ed etnia

Analiti biochimici	Maschi				Femmine			
	Caucasica	Nera	Ispanica	Asiatica	Caucasica	Nera	Ispanica	Asiatica
Sodio, mEq/L	136 – 145	135 – 143	135 – 143	135 – 143	136 – 145	135 – 143	135 – 142	134 – 143
Potassio, mEq/L	3,5 – 5,1	3,3 – 4,6	3,4 – 4,6	3,4 – 4,7	3,5 – 5,1	3,2 – 4,5	3,4 – 4,4	3,3 – 4,6
Calcio, mmol/L	2,1 – 2,55	2,2 – 2,53	2,2 – 2,53	2,2 – 2,53	2,1 – 2,55	2,18 – 2,55	2,18 – 2,5	2,15 – 2,5
Cloro, mEq/L	97 – 113	99 – 109	99 – 108	98 – 108	97 – 113	99 – 110	100 – 110	98 – 108
Magnesio, mmol/L	0,66 – 1,07	0,66 – 1,07	0,66 – 1,07	0,66 – 1,07	0,66 – 1,07	0,66 – 1,07	0,66 – 1,07	0,66 – 1,07
Glucosio a digiuno, mmol/L	3,8 – 5,5	3,8 – 5,5	3,8 – 5,5	3,8 – 5,5	3,8 – 5,5	3,8 – 5,5	3,8 – 5,5	3,8 – 5,5
Glucosio, mmol/L	3,6 – 8,9	3,8 – 12,2	3,9 – 11,7	3,7 – 10,7	3,8 – 6,1	3,8 – 9,8	3,8 – 7,7	3,6 – 7,8
Albumina, µmol/L	32 – 46	38 – 49	39 – 51	40 – 51	32 – 46	35 – 47	35 – 48	37 – 49
Creatinina, mmol/L	0,06 – 0,11	0,06 – 0,13	0,57 – 0,12	0,06 – 0,11	0,05 – 0,10	0,04 – 0,10	0,04 – 0,09	0,04 – 0,08
Alanina aminotrasferasi, U/L	0 – 55	11 – 64	12 – 102	12 – 76	0 – 55	9 – 41	10 – 62	10 – 47
Aspartato aminotrasferasi, U/L	0 – 34	0 – 64	0 – 61	0 – 65	0 – 34	0 – 43	0 – 38	0 – 38
Lattico deidrogenasi, U/L	125 – 243	87 – 206	83 – 170	87 – 183	125 – 243	89 – 188	85 – 174	83 – 171
Creatininchinasi, U/L	30 – 200	82 – 997	62 – 805	56 – 1008	29 – 168	45 – 487	38 – 317	31 – 227
Sideremia, µmol/L	11,6 – 31,3	6,1 – 31,3	7,2 – 34,4	7,7 – 31,0	8,9 – 30,4	3,0 – 25,2	3,0 – 25,8	5,5 – 29,9
Urea, mmol/L	2,3 – 7,0	1,5 – 5,4	4,6 – 6,0	1,5 – 5,7	2,7 – 5,5	1,1 – 5,5	1,5 – 6,0	1,5 – 5,0
Bilirubina Totale, µmol/L	0 – 21	7 – 29	7 – 26	7 – 27	3 – 21	5 – 21	5 – 21	5 – 21
Bilirubina Diretta, µmol/L	0 – 9	0 – 9	0 – 9	0 – 9	0 – 9	0 – 9	0 – 9	0 – 9
Amilasi, U/L	25 – 125	25 – 125	25 – 125	25 – 125	25 – 125	25 – 125	25 – 125	25 – 125
Lipasi, U/L	8 – 78	8 – 78	8 – 78	8 – 78	8 – 78	8 – 78	8 – 78	8 – 78
Proteine Totali, g/L	64 – 83	65 – 86	65 – 83	65 – 82	64 – 83	64 – 82	63 – 80	64 – 82
Proteina C-Reattiva, nmol/L	0 – 47,6	0 – 47,6	0 – 47,6	0 – 47,6	0 – 47,6	0 – 47,6	0 – 47,6	0 – 47,6

Tabella 2*Intervalli di riferimento dell'esame emocromocitometrico, divisi per sesso ed etnia*

Emocromo	Maschi				Femmine			
	Caucasica	Nera	Ispanica	Asiatica	Caucasica	Nera	Ispanica	Asiatica
Leucociti, x10 ⁹ /L	4,8 – 10,8	3,4 – 10,6	3,8 – 12,3	3,8 – 11,7	4,8 – 10,8	3,4 – 11,4	3,9 – 12,0	3,9 – 10,8
Eritrociti, x10 ¹² /L	4,2 – 5,6	3,99 – 5,79	4,14 – 5,68	4,06 – 5,97	4 – 5,4	3,55 – 5,16	3,71 – 5,06	3,66 – 5,05
Emoglobina, mmol/L	120 – 175	120 – 164	135 – 170	122 – 169	120 – 160	96 – 146	102 – 148	105 – 149
Ematocrito	0,37 – 0,54	0,36 – 0,50	0,39 – 0,50	0,37 – 0,50	0,35 – 0,48	0,30 – 0,44	0,31 – 0,44	0,32 – 0,44
MCV, fL	80 – 97	74,1 – 99,1	82,3 – 98,4	69,9 – 99,8	80 – 97	66,8 – 97,8	72,1 – 96,4	67,8 – 97,8
MCH, pg	25,0 – 34,0	24,2 – 34,2	27,3 – 34,2	22,3 – 34,0	25,0 – 34,0	21,0 – 33,7	23,2 – 33,7	22,1 – 33,8
MCHC, g/L	320 – 380	314 – 358	324 – 358	318 – 360	320 – 380	311 – 356	323 – 357	323 – 358
RDW	0,11 – 0,17	0,11 – 0,16	0,12 – 0,14	0,11 – 0,15	0,11 – 0,17	0,12 – 0,19	0,12 – 0,19	0,11 – 0,16
Piastrine, x10 ⁹ /L	130 – 400	134 – 349	138 – 343	152 – 325	130 – 400	153 – 402	160 – 386	139 – 370
Volume Medio Piastrine, fL	7,1 – 10	6,9 – 10,8	6,9 – 10,5	6,6 – 10,0	7,1 – 10	7,1 – 10,6	7,0 – 10,4	6,8 – 10,0
Linfociti, x10 ⁹ /L	1,2 – 3,5	1,2 – 3,1	1,3 – 3,2	1,4 – 3,5	1,2 – 3,6	1,0 – 3,4	1,3 – 3,3	1,2 – 3,3
Monociti, x10 ⁹ /L	0,25 – 0,66	0,19 – 0,69	0,24 – 0,61	0,24 – 0,68	0,18 – 0,78	0,16 – 0,62	0,21 – 0,58	0,18 – 0,53
Eosinofili, x10 ⁹ /L	0,07 – 0,49	0,03 – 0,56	0,05 – 0,48	0,07 – 0,58	0,01 – 0,43	0,04 – 0,31	0,03 – 0,45	0,06 – 0,42
Basofili, x10 ⁹ /L	0,02 – 0,10	0,02 – 0,13	0,02 – 0,10	0,01 – 0,15	0,01 – 0,09	0,01 – 0,11	0,01 – 0,11	0,01 – 0,10
Linfociti, %	20 – 45	16,8 – 54,2	15,6 – 47,8	16,5 – 48,8	20 – 45	17,1 – 51,3	15,2 – 46,1	16,7 – 49,6
Monociti, %	3 – 10	3,4 – 12,0	4,4 – 12,6	3,8 – 11,1	3 – 10	3,3 – 12,5	3,3 – 11,0	3,3 – 10,6
Eosinofili, %	0 – 6	0,6 – 9,6	0,7 – 7,7	0,7 – 8,9	0 – 6	0,6 – 6,9	0,5 – 7,4	0,6 – 8,3
Basofili, %	0 – 1,5	0,0 – 3,2	0,1 – 2,2	0,0 – 2,0	0 – 1,5	0,0 – 3,0	0,0 – 1,7	0,1 – 1,8

riportavano gli intervalli di riferimento degli analiti richiedibili, suddivisi per sesso e per etnia, in modo da consentire l'interpretazione del risultato secondo intervalli di riferimento applicabili al singolo caso in esame. Questo criterio di partizione non è stato impiegato per i parametri coagulativi, poiché non è riportata in letteratura una variabilità di tali biomarcatori in relazione all'etnia. Per quanto riguarda la troponina I ad alta sensibilità, invece, nonostante sia riconosciuta una variabilità degli intervalli di riferimento (8), in particolar modo un 99esimo percentile più alto per l'etnia afroamericana, non sono ancora disponibili intervalli di riferimento validati per tale etnia, anche a causa dell'aumento delle troponine cardiache a seconda dell'età del soggetto (9-11). Di conseguenza è stato deciso di utilizzare gli intervalli di riferimento dell'etnia caucasica, pur riconoscendo la possibilità di poter ottenere qualche falso positivo.

Il processo organizzato dalla UOC di Biochimica Clinica ed Emergenze dell'AOU Federico II per questo evento si è rivelato efficace: non si sono verificati imprevisti in nessuna delle fasi del ciclo di Lundberg. Questa esperienza ha creato l'occasione per la nostra UOC per riflettere sulla necessità di implementare intervalli di riferimento suddivisi per etnia anche nella quotidianità lavorativa. La percentuale di pazienti di etnia non caucasica diventa più alta di anno in anno, e l'utilizzo di intervalli di riferimento per esclusiva etnia caucasica può indurre all'errore il sanitario che andrà ad interpretare i risultati. Per questo motivo, è attualmente in esame la possibilità di riferire l'etnia del paziente nella fase pre-analitica e di riportare gli intervalli di riferimento anche per etnia in fase post-analitica.

In conclusione, la corretta gestione del ciclo diagnostico implementato in occasione della XXX Universiade ha rinforzato la validità del Total Testing Process in vigore presso la UOC di Biochimica Clinica ed Emergenze, contribuendo altresì al miglioramento del ciclo lavorativo, con particolare riferimento all'interfaccia Laboratorio-Clinica, affinché la corretta gestione del paziente sia effettivamente al centro del ciclo di generazione dell'informazione medica a lui dedicata.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Cappelletti P. Brain-to-brain loop: is the Lunberg concept useful in 2020? *Riv Ital Med Lab* 2017;13:127-33.
2. Zaninotto M, Brando B, Cenci AM et al. Raccomandazioni della Federazione Italiana delle Società di Medicina di Laboratorio (FISMeLab) per il trasporto del materiale biologico. *Biochim Clin* 2019;43:187-99.
3. Soligard T, Steffen K, Palmer D, et al. Sports injury and illness incidence in the Rio de Janeiro 2016 Olympic Summer Games: A prospective study of 11274 athletes from 207 countries. *Br J Sports Med* 2017;51:1265-71.
4. Scudiero O, Gentile L, Ranieri A, et al. Physical activity and thrombophilic risk in a short series. *J Blood Med* 2020;11:39-42.
5. Zito FP, Gala A, Genovese D, et al. Mild dehydration in dyspeptic athletes is able to increase gastrointestinal symptoms: Protective effects of an appropriate hydration. *Neurogastroenterol Motil* 2019;31:e13520.
6. Oppliger RA, Bartok C. Hydration testing of athletes. *Sports Med* 2002;32:959-71.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Health Statistics (NCHS). Hyattsville MUSDoHaHS, Centers for Disease Control and Prevention. National Health and Nutrition Examination Survey Data. 2011-12. <https://wwwn.cdc.gov/nchs/nhanes/ContinuousNhanes/Default.aspx?BeginYear=2011> (ultimo accesso: marzo 2020)
8. Gore MO, Seliger SL, Defilippi CR, et al. Age- and sex-dependent upper reference limits for the high-sensitivity cardiac troponin T assay. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1441-8.
9. Boeddinghaus J, Nestelberger T, Twerenbold R, et al. Impact of age on the performance of the ESC 0/1h-algorithms for early diagnosis of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2018;39:3780-94.
10. Monneret D, Gellerstedt M, Bonnefont-Rousselot D. Determination of age- and sex-specific 99th percentiles for high-sensitive troponin T from patients: an analytical imprecision- and partitioning-based approach. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:685-96.
11. Fortunato G, Carandente Giarrusso P, Martinelli P, et al. Cardiac troponin T and amino-terminal pro-natriuretic peptide concentrations in fetuses in the second trimester and in healthy neonates. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:834-6.

Il sedimento urinario: atlante per immagini

Davide Negrini e Silvia Zuin
Piccin Editore, Padova 2020
€ 35,00

Il valore di questo nuovo Atlante del sedimento urinario si coglie immediatamente aprendo le pagine del volume e scorrendo le immagini.

Alla prima lettura, sono rimasto colpito ed incredulo che due specializzandi ai primi anni del corso avessero messo assieme un'iconografia così bella, con una casistica così ricca di immagini e casi "rari" tanto che sono andato immediatamente a cercarli per chiedere loro: ma davvero tutte queste fotografie le avete fatte voi, in questo laboratorio ed in uno spazio temporale così ristretto? La risposta fu non solo rassicurante, ma degna della tradizione di una delle più antiche Scuole di Medicina e Chirurgia del mondo: *"la casistica deriva dal complesso case-mix di pazienti e utenti che seguiamo nell'Azienda Ospedale-Università di Padova"*, mi confermarono i due giovani Colleghi. E allora, ho iniziato nuovamente a leggere, approfondire e studiare l'intero volume, riprendendo un aforisma di Johann Wolfgang von Goethe che ho voluto citare all'inizio della mia prefazione a questo Atlante e che recita *"l'occhio vede ciò che la mente conosce"*.

E, in effetti, l'apprezzamento migliore che va a questo volume è che i due giovani specializzandi hanno saputo vedere e riconoscere dei quadri che potevano passare inosservati o non "catalogati", specialmente nel caso di un esame, quello delle urine, che sembra spesso dimenticato, banalizzato e che alcuni hanno voluto discutere solo per mettere in evidenza il possibile spreco economico legato all'esame generalizzato del sedimento urinario.

E' vero peraltro che, all'inizio della mia carriera un anziano tecnico di laboratorio, vedendomi sbuffare nel corso della lettura al microscopio del centesimo sedimento, mi ricordò che *"fa più diagnosi quello che stai facendo, se lo fai bene, che tanti esami di biochimica clinica"*. Era una provocazione, ma nascondeva una profonda verità. Ed oggi, gli sviluppi della peptidomica e metabolomica permettono di pensare all'urina come una possibile "biopsia liquida", se indagata correttamente e con l'occhio di chi ha competenza e professionalità.

Il secondo importante motivo per raccomandare la lettura del volume è salutare l'operato dei due giovani specializzandi e sottolineare come il futuro della medicina di laboratorio sia in buone mani, nonostante i tanti gufi che predicano la morte della disciplina. Se due giovani colleghi riescono a costruire un Atlante così ricco e complesso, è segno che in medicina di laboratorio c'è ancora spazio per insegnare ed apprendere.

Il terzo motivo è ricordare a tutti noi il valore dell'immagine. L'immagine entra immediatamente nel cervello del medico e si traduce subito in informazione, mentre un risultato numerico deve essere "trattato", messo a confronto con il valore di riferimento, con un risultato precedente, o con un livello decisionale prima di essere realmente "informativo". L'immagine del sedimento è e rimane non solo informazione clinica ma anche fonte di insegnamento, materia di arricchimento professionale e motivo per andare a rivedere sui "sacri testi" il significato di quadri rari, anomali e inaspettati.

Inoltre, come ho ricordato nelle poche righe della prefazione, è bene sottolineare che per il cosiddetto "esame standard dell'urina" valgono le stesse, o forse ancor maggiori, raccomandazioni per assicurare sicurezza e qualità nella fase pre-analitica, tema spesso dimenticato e relegato solamente ad uno degli esami sul campione di urina: l'urinocoltura. Molti elementi figurati, cilindri ialini e cellulari e altri quadri vengono fortemente danneggiati da procedure di campionamento e trasporto inadeguate tanto da dare risultati clinicamente fuorvianti.

Alla fine della prefazione al volume, ho ricordato una frase di Arthur Conan Doyle, scritta nel contesto di indagini poliziesche, ma che, tradotta nel nostro settore del laboratorio clinico, assume particolare significato *"il fatto è che lei vede ma non osserva: qui sta la differenza!"*. I due specializzandi hanno saputo non solo vedere, ma anche osservare, comprendere e raccogliere molti quadri di interesse clinico.



Nella visione del laboratorio clinico come fabbrica di dati e come generazione di grandi volumi di risultati, può essere colpevolmente tralasciata la cura del singolo paziente, del singolo dato e questo Atlante dimostra, invece, come i casi che meritano attenzione siano numerosi e vadano visti uno per uno, per essere poi raccolti e messi a disposizione di tutta la comunità scientifica.

Mario Plebani

Professore Ordinario di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università di Padova

Direttore, Dipartimento "Servizi di diagnostica integrata", Azienda Ospedale-Università di Padova

In ricordo di Jan-Olof Jeppsson

È recentemente mancato, all'età di 84 anni, il Professor Jan-Olof Jeppsson, docente a riposo dell'Università di Lund (Svezia), già Direttore del Dipartimento di Chimica Clinica dell'Ospedale Universitario di Malmö, notissimo ed apprezzatissimo ricercatore a livello internazionale. Ha svolto lavori pionieristici nella caratterizzazione di soggetti con deficit di alfa-1 antitripsina, ha portato un contributo enorme allo sviluppo di metodi per l'abuso alcolico, in particolare per la transferrina povera di carboidrati (CDT), ed è stato uno dei padri del sistema di riferimento dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}). In Svezia era molto impegnato nell'accreditamento dei laboratori, ed in tutte le tematiche della sicurezza di qualità.

Uno di noi (AM) ha conosciuto il Professor Jeppsson attorno al 1995, quando ha avuto l'opportunità di inserirsi nel gruppo di lavoro della IFCC per la standardizzazione dell'HbA_{1c}. A quel tempo non era ancora stato sviluppato un metodo di riferimento, ma Jeppsson aveva messo a punto in Svezia un metodo in isoelettrofocalizzazione ad alta risoluzione, ed aveva saputo implementare una rete di calibrazione dei vari metodi allora in uso, inviando campioni di sangue a vari laboratori ed ambulatori sparsi per tutta la nazione. Aveva anche sviluppato un sistema di valutazione esterna di qualità con il quale monitorava regolarmente lo stato dell'arte, e riportava alle società cliniche svedesi l'evolversi delle tecnologie. All'interno del gruppo di lavoro era ammirato per il suo acume e la sua preparazione (sempre di sera si attardava al computer a studiare la letteratura), ma era da tutti estremamente stimato per i suoi modi molto garbati, signorili, eleganti. Nessuno poteva mai irritarsi in sua presenza, il suo carisma non permetteva che nascessero dissapori.

VB, lo vide la prima volta a Milano, intorno all'anno 2000, quando venne ad un convegno organizzato dal Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME). Presentava anche in quella occasione, metodologia e risultati riguardanti la standardizzazione della misura dell'HbA_{1c}.

VB ricorda: mai e poi mai avrei immaginato che il Professor Jeppsson fosse così: rigoroso e didattico ma al contempo semplice, di quella semplicità che solo chi conosce profondamente una materia può dimostrare. Naturalmente fui felicissima quando mi accettò nel gruppo di lavoro per la standardizzazione della transferrina carboidrato carente. Ho imparato molto dalle sue parole, consigli e raccomandazioni e, senza nulla togliere alla sua figura di Mentore, lo ricordo e lo ricorderò sempre per la sua umanità. I suoi occhi si illuminavano quando parlava di sua nipote o quando raccontava di una sua casetta per l'estate nell'isola di Götland dove si prendeva cura del giardino, sua grande passione. A Natale, per alcuni anni, mandò le fotografie delle sue orchidee fiorite. Amava il nostro Paese, in particolare le Isole Borromee, che aveva visitato con la moglie. Mi piace ricordare anche lei, una gentile signora dal sorriso aperto, e la sua casa a Malmö, un edificio semplice, con le travi del sottotetto vecchie di secoli, ed il piccolo giardino. Era molto generoso, in tutti i sensi, un grande esempio di scienziato e di uomo.

Jan-Olof, *Sit tibi terra levis.*

Andrea Mosca
Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti
Università degli Studi di Milano

Vincenza Bianchi
Dirigente chimico, a riposo



52° Congresso Nazionale: Virtual Edition

Carissimi Soci,

la 52° edizione del Congresso annuale organizzato dalla Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBIOC), inizialmente prevista presso la Fiera del Levante di Bari, verrà realizzata in versione virtuale, nei giorni 6-8 ottobre 2020.

Il Congresso Nazionale SIBioC rappresenta sempre un momento di grande incontro e condivisione per tutta la Medicina di Laboratorio italiana, sia dal punto di vista scientifico sia personale. Siamo consapevoli che la modalità virtuale non potrà che sacrificare gli aspetti relazionali, tuttavia, il Consiglio Direttivo ritiene di aver adottato una scelta di piena responsabilità, valutando l'attuale situazione di incertezza dovuta all'epidemia da SARS-CoV-2 e la necessità di misure comportamentali all'insegna della prudenza, tenendo conto che anche gli eventi congressuali debbano garantire la piena sicurezza dei partecipanti.

Non abbiamo comunque voluto rinunciare al nostro incontro annuale, perché siamo convinti sia importante continuare a condividere scienza, idee ed esperienze in un contesto ad ampio respiro. È nostra convinzione che il Congresso virtuale possa fornire, a tutti i Soci SIBioC, informazione e formazione, ma con la necessaria interattività che garantisca ad ogni partecipante di essere parte attiva del Congresso.

Il Programma dell'evento virtuale non subirà variazioni rispetto a quello residenziale. Saranno create sale virtuali ed i Soci potranno seguire da remoto le sessioni, collegandosi online dal proprio PC, tablet o smartphone alla piattaforma predisposta e sarà possibile interagire con i relatori e confrontarsi con gli altri partecipanti tramite chat, mantenendo così vivo l'interesse e la partecipazione. Tutti i contenuti dell'evento *live* saranno poi disponibili *on demand* sul sito web della Società per un anno.

Il programma copre molte aree della nostra disciplina ma, nel rispetto del tema del Congresso, sarà focalizzata l'importanza della collaborazione interdisciplinare e della condivisione degli obiettivi con tutti gli indispensabili interlocutori della nostra disciplina. Saranno trattate tematiche emergenti ed i professionisti più giovani avranno la possibilità di portare i risultati dei loro lavori in comunicazioni orali e sessioni poster, che verranno discussi con moderatori esperti.

La Segreteria Organizzativa si sta adoperando affinché la grande zona espositiva dedicata alle Aziende del Diagnostico, che avrebbe dovuto essere realizzata nel centro congressi, possa essere riproposta in modalità virtuale offrendo la possibilità di seguire percorsi tematici (*live* e *on demand*), consultare documenti e presentazioni aziendali, ma anche di svolgere incontri con gli espositori.

Ci auguriamo possa essere per tutti non solo un'esperienza nuova, necessaria a causa di una situazione così imprevedibile ed inattesa, ma l'occasione per incontrarsi con una modalità diversa, dialogare e condividere gli aspetti della nostra professione che più ci coinvolgono e per trovare spunti per nuovi progetti futuri.

Ancora una volta abbiamo l'opportunità di rendere sempre più "comprensibile" il valore della nostra disciplina e l'importanza della nostra professione che, ancor più durante l'epidemia da COVID-19, ha dato dimostrazione della sua indispensabilità.

Vi aspettiamo tutti e numerosi e Vi ricordiamo che saranno disponibili grant educazionali per partecipare all'evento.

Un caro saluto

Laura Sciacovelli
(Presidente SIBioC)

Giuseppe Lippi
(Referente Congresso Nazionale)

Tommaso Trenti
(Coordinatore Divisione Scientifica)

L'Emogasanalizzatore Stat Profile® Prime Plus aiuta la gestione dei pazienti critici COVID-19 grazie all'esclusivo menu di test di point-of-care

L'analisi EmoGas puo' aiutare la gestione dei pazienti critici COVID-19. L' Emogasanalizzatore Nova Stat Profile Prime Plus è la strumentazione ideale per i reparti di terapia intensiva e semi-intensiva in quanto, oltre ai parametri standard, permette con un unico campionamento, la possibilità di eseguire altri esami aggiuntivi utili alla lotta al Covid-19 quali:

- Urea (Bun),
- Creatinina (Creat),
- Magnesio Ionizzato (iMg)

Menù:

pH, PCO_2 , PO_2 , Na^+ , K^+ , Cl^- , iCa, Glu, Lac, Hct, TCO_2 , $SO_2\%$, O_2Hb , COHb, MetHb, HHb, tBil, tHb, HbF

...più Urea (BUN), Creat e iMg



Complicanze del paziente critico COVID-19	Parametri Point of Care
Sindrome da distress respiratorio acuto	PO_2 , PCO_2 , pH, HCO_3^- , SaO_2 , PO_2/FiO_2 , OI
Insufficienza respiratoria di tipo I.	PO_2 , PCO_2 , pH, HCO_3^- , SaO_2 , PO_2/FiO_2 , OI
Lesioni cardiache acute: • Con anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari • Senza anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari	iCa, K^+ , iMg
Insufficienza cardiaca • Con anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari • Senza anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari	iCa, K^+ , iMg
Sepsi	Lattato, Glucosio, BUN/Creatinina, iCa, K^+ , iMg
Acidosi	PCO_2 , pH, HCO_3^-
Alcalosi	PCO_2 , pH, HCO_3^-
Lesione renale acuta	BUN/Creatinina, iCa, K^+ , iMg
Equilibrio elettrolitico	Na^+ , K^+ , iCa, iMg, Cl^- , Gap Anionico
Shock	Lattato
Lesione epatica acuta	Bilirubina

Adattato da Chen T et al. BMJ 2020;368:m1091 | doi: 10.1136/bmj.m1091

Iscriviti al Webinar On Demand e scopri come l'Emogasanalizzatore Nova Stat Profile Prime Plus aiuta la gestione dei pazienti critici COVID-19





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*.