
BC

biochimica clinica

In questo numero:

FARMACOTOSSICOLOGIA

vedi pag. 330, 335, 367

RIFLESSIONI SUL METODO SCIENTIFICO

vedi pag. 333, 380, 386



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

T-SPOT[®].TB



Il Test per la Diagnosi di Tubercolosi Latente più **Sensibile** e **Specifico** presente sul Mercato è ora anche **Automatizzabile**^{1,2}

Ancora più vantaggi:

- **Flussi di lavoro ottimizzati**
- **Logistica dei campioni semplificata**
- **Risparmio di tempo per i tecnici**

Sensibile | Specifico | Affidabile
Ora Automatizzabile

T-Cell Select[™]

Per maggiori informazioni: <http://go.oxfordimmunotec.com/auto.it>

1 Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. Clin Infect Dis. Published online December 8, 2016:ciw694. doi:10.1093/cid/ciw694

2 T-SPOT.TB package insert - PI-TB-IVD-IT-V3

Il test T-SPOT e il logo Oxford Immunotec sono marchi registrati di Oxford Immunotec Ltd.
T-Cell Select è un marchio di Oxford Immunotec Ltd.
© 2020 Oxford Immunotec. Tutti i diritti riservati.
TS-IT-AD-MPN473-0001 V1

 **Oxford
Immunotec**

sommario



EDITORIALI

327

Il premio Nobel 2020 per la Chimica: dal “gene editing” al “gene drive”
F. Salvatore, M. Nunziato

330

Due sfide di grande attualità in farmacotossicologia analitica
R. Pacifici

333

Il metodo scientifico come strumento efficace per una rigorosa interpretazione degli studi
P. Pezzati

RASSEGNE

335

Farmacotossicologia e metodologie di analisi dell'acido gamma-idrossibutirrico nel laboratorio clinico e forense
E. Marchei, MC. Rotolo, S. Graziano, M. Pellegrini, A. del Rio

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

351

Il “Libro Bianco” dei Giovani Professionisti di Medicina di Laboratorio in Italia: risultati dell'indagine del Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists
C. Bellini, S. Nannini, M. Berardi, A. Mosca, S. Bernardini, G. Sancesario, per il gruppo di Studio SIBioC Young Scientists

359

Polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2*: rischio di cancro alla prostata, aggressività della neoplasia e livelli sierici dell'Antigene Prostatico-Specifico
D. Bozzato, CF. Zambon, A. Padoan, M. Pelloso, A. Aita, S. Moz, F. Navaglia, T. Prayer Galetti, F. Zattoni, D. Basso, M. Plebani

367

Titolazioni dei preparati galenici oleosi a base di cannabis in Regione Liguria: progetto sperimentale dei laboratori di riferimento regionale
G. Cangemi, P. Bucchioni, G. Tripodi, S. Barco, P. Franceschini, IM. Sbarbaro, G. Petriccioni, L. Barbagallo, A. Maffia, E. Livoti, C. Cannas, E. Russo, B. Rebesco, F. Lillo

374

Serial measurements of oxidative stress markers after ozone autohemotherapy
A. Bolner, L. Chiamenti, G. Nordera, O. Bosello

OPINIONI

380

Un mondo senza significatività statistica?
L. Zanolla

386

La scienza riproducibile
M. Vidali

DOCUMENTI SIBioC

397

Consensus 2019 per l'analisi genetica in Fibrosi Cistica: presentazione del Documento
M. Lucarelli, A. Angioni, M. Baffico, C. Bombieri, A. Bonizzato, G. Borgo, G. Castaldo, C. Castellani, C. Centrone, A. Coiana, MR. D'Apice, C. Di Girgenti, S. Egiziano, M. Favarato, A. Ferlisi, P. Melotti, L. Minicucci, E. Pelo, A. Ragusa, A. Ravani, G. Savoldi, M. Seia, L. Termini

sommario

LETTERE ALL'EDITORE

400

Documento congiunto di SIBIOC, della Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS), della Sezione Italiana della European Ligand Assay Society (ELAS), e della Associazione Medici Endocrinologi (AME) relativo alla nota AIFA 96 sulla prescrivibilità dei farmaci per la carenza di Vitamina D, e raccomandazioni per la refertazione
R. Dittadi, S. Corbetta, G. Banfi, F. Bertoldo, S. Migliaccio, S. Gonnelli, M. Rossini, M. Migliardi, A. Fortunato, F. Vescini, A. Palermo, C. Vassalle, S. Gelsumini, G. Lombardi

407

Determinazione delle mutazioni del gene isocitrato deidrogenasi 2 nella leucemia mieloide acuta: utilizzo della tecnica Digital Droplet PCR "Drop-Off" per diagnosi e monitoraggio.
S. Grassi, F. Guerrini, S. Salehzadeh, E. Ciabatti, S. Galimberti, MR. Metelli

RECENSIONI

410

Medicina nel laboratorio. Gli esami: quando, come e perché
M. Plebani

CASI CLINICI

e30

Una complicata valutazione della risposta alla terapia in un paziente con malattia da deposito di catene leggere libere
J. Ripepi, M. Basset, P. Milani, M. Nuvolone, A. Foli, M. Bozzola, T. Bosoni, R. Albertini, G. Palladini

e34

Assenza di bande monoclonali liquorali e positività del rispettivo indice siero-liquor: una discrepanza da indagare attentamente
M. Lamonaca, F. Passarelli, R. Serino, M. Riggi, MG. Sulas, E. Saliva, G. Bellomo, U. Dianzani, I. Crespi

e37

Monitoraggio molecolare di Isocitrato Deidrogenasi 2 in paziente con Leucemia Mieloide Acuta recidivata
S. Salehzadeh, S. Grassi, E. Ciabatti, A. Di Vita, C. Domenichini, F. Guerrini, G. Tarrini, E. Benedetti, F. Caracciolo, S. Galimberti, MR. Metelli

StatStrip® GLU/KET

Sistema di monitoraggio di glucosio e chetoni per uso ospedaliero

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



Misuratore StatStrip Xpress® 2

Misuratore con connettività StatStrip® per uso ospedaliero

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

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

Connettività wireless con LIS/HIS



nova[®]
biomedical

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

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

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

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

Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

Deputy Director

Martina Zaninotto

Associate Editors

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

International Advisory Board

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

Editorial Secretary

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

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

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

SIBioC Executive Board 2020-2021

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

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

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



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

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

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

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

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

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

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



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

Volume 44

Numero 4 - Dicembre 2020

Il premio Nobel 2020 per la Chimica: dal “gene editing” al “gene drive”

Francesco Salvatore^{1,2}, Marcella Nunziato^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche - Università di Napoli Federico II

²CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli

Non è la prima volta che le Scienze Biochimiche vengono premiate con il premio Nobel per la Chimica, indicando così che certamente esse sono branche della grande madre “Chimica” che producono ricerca scientifica di valore per l'umanità. Quel che più colpisce la mente degli studiosi, quasi con piacere, è che questa volta il Premio più ambito nel mondo scientifico è stato attribuito solo pochi anni dopo la scoperta (2012) delle due giovani ed illustri scienziate che hanno ovviamente dato il maggior contributo all' “invenzione” del processo di “gene editing” anche basandosi su scoperte e studi svolti in precedenza (1). Jennifer A. Doudna a Berkeley in USA ed Emmanuelle Charpentier (nata in Francia), in Svezia (ma ha lavorato anche in Austria, Germania, USA, ed è attualmente a capo del Dipartimento di Microbiologia ed Immunologia all'Istituto Max Planck di Berlino) incontrandosi, sembra ad un Congresso in Svezia, decidono insieme di approfondire questo argomento. Le studiose riuscirono già nel 2012, in un lavoro pubblicato su *Science*, che è, e diventerà, storico, a definire il processo e i suoi dettagli (Figura 1) nonché le modalità di utilizzo del sistema su quasi ogni possibile sequenza di DNA, così modificandola secondo opportunità o necessità (1).

Un altro studioso, Jing Zhang del Massachusetts Institute of Technology (MIT) di Boston (USA) subito si dedicò all'argomento, anche perché aveva già ideato in precedenza un sistema con simili finalità, dando interessanti contributi sull'argomento (2).

Già nel 2014, attraverso l'uso di CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein 9) si era riusciti a correggere una mutazione a livello del gene *FAH* (Fumarylacetoacetate Hydrolase) nel topo e creare così un metodo capace putativamente di curare anche una malattia ereditaria umana, nell'esempio la tirosinemia di tipo I. Il meccanismo molecolare è proprio quello dell'ingegneria genetica, scoperto oltre quarant'anni prima e basato allora essenzialmente sugli enzimi di restrizione, sulla cui base si sono sviluppati i più importanti studi di biologia molecolare, sia nel campo della genetica batterica, che poi in quella eucariotica. La Figura 1 (ripresa e modificata da quella originaria del lavoro del 2017 di Jiang e Doudna) (2) riassume le varie tappe del meccanismo d'azione molecolare del sistema CRISPR-Cas9. Da notare, tra l'altro, che praticamente in quasi tutte le specie batteriche e in quelle degli *archaea* sono presenti i sistemi di tipo CRISPR-Cas.

È ovvio che se tutto questo complesso meccanismo funzionasse bene ed in modo preciso, ci sarebbe la possibilità di riaggiustare qualsiasi molecola di DNA danneggiata, ma ovviamente ciò non è ancora possibile, sia poiché c'è la possibilità di bersagliare, senza volerlo, il DNA “off-target” cioè in siti non voluti, e quindi potenzialmente produrre alterazioni del DNA portando all'insorgenza di malattie gravi ed anche tumori, sia per la difficoltà di giungere *in vivo* a tutte le cellule alterate nel DNA (ad esempio tutte le cellule dove sono presenti mutazioni somatiche o “drivers”, come nei tumori). Se invece si tenta di modificare il DNA a livello dello zigote (cellula embrionale da cui deriverà poi tutto l'organismo nella riproduzione sessuata) questa “correzione del DNA” si verificherà in tutte le cellule dell'organismo, e di qui anche nella discendenza, e il processo si chiama “gene drive”. Nel regno animale, il processo sta già avendo notevoli successi, ad esempio nell'allevamento aviario, anche di tipo industriale (polli di allevamento) (3), nonché nella selezione inversa/distruzione di insetti nocivi per l'uomo (4). Nell'uomo la tecnologia del “gene drive” ha trovato solo nel 2018 un'applicazione da parte di uno studioso cinese che è riuscito ad ottenere due sorelle con modificazioni del gene *CCR5* allo scopo di produrre resistenza all'infezione da HIV (Human Immunodeficiency Virus). Tuttavia questo successo scientifico è stato seguito da condanna in prigione dello scienziato, e alla condanna altresì da parte di tutta la comunità scientifica mondiale inclusa quella cinese, per violazione delle norme di bioetica (5).

Corrispondenza a: Francesco Salvatore, Professore di Biochimica Umana, Emerito, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche-Università di Napoli Federico II, CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli (Fondatore e Principal Investigator)

Ricevuto: 09.11.2020

Accettato: 11.11.2020

Pubblicato on-line: 24.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.099

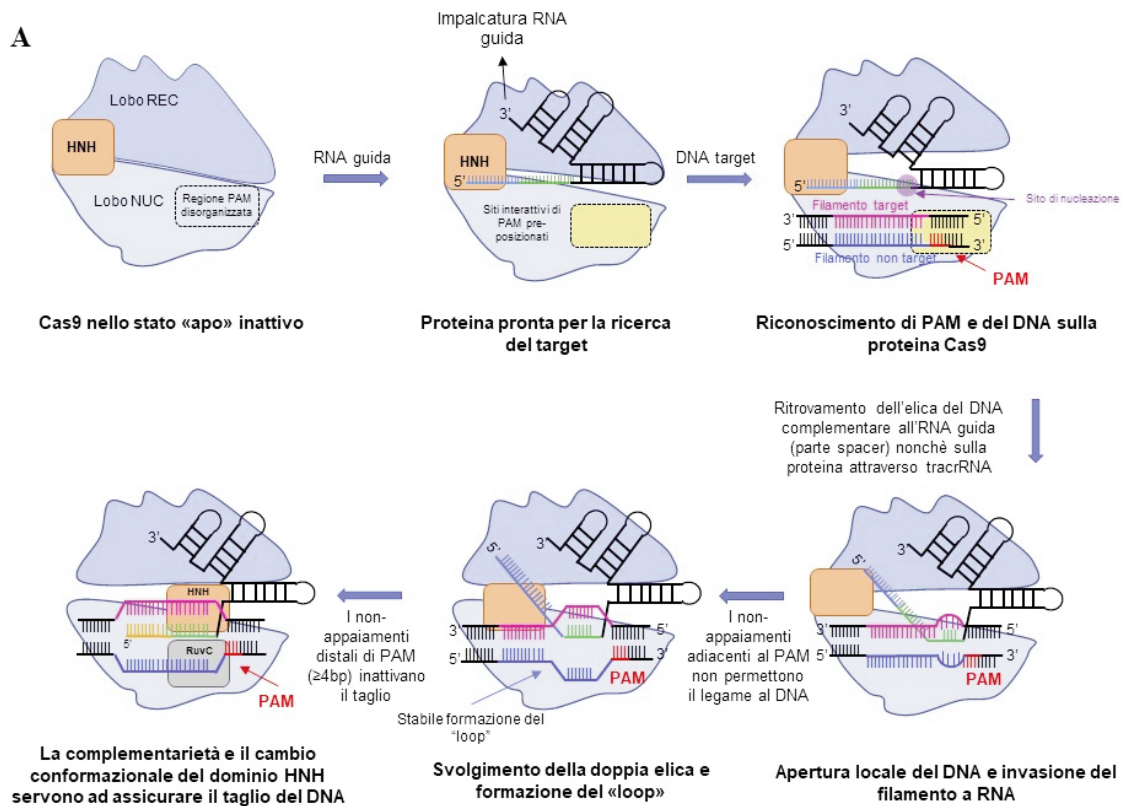


Figura 1. Le tappe fondamentali del meccanismo molecolare del "gene editing"

Pannello A. La sequenza delle tappe (da sinistra in alto indicate dalle frecce) di questo meccanismo molecolare è innanzitutto legata al riconoscimento e al legame del "Target DNA" che si vuole tagliare. Il ricercatore per iniziare a compiere una sperimentazione attraverso il sistema CRISPR-Cas9 in una cellula deve munirsi:

- di un RNA guida con 20 nucleotidi complementari (Watson-Crick) al target DNA da tagliare; l'RNA guida è in realtà la fusione del RNA CRISPR (crRNA) e tracrRNA (trans-activating crRNA); quest'ultimo serve da ponte tra il crRNA e la Cas. Tecnicamente quindi l'RNA guida non è solo la porzione complementare (la porzione complementare del crRNA si chiama spacer). Per maggiori dettagli consultare il pannello B;

- di una proteina Cas9 (o altra tra le tante già esistenti) dotata della migliore attività nucleasica in dipendenza della tasca adatta a raccogliere PAM (Protospacer Adjacent Motif) sul DNA target da tagliare.

L'intervento di un RNA a singola elica è necessario (RNA guida) e serve per produrre un cambiamento conformazionale della proteina Cas, determinando così la formazione di una tasca che è in grado di accogliere sia PAM, cioè sequenze sul DNA target (vedi avanti) nonché la sequenza dell'RNA guida creata dal ricercatore per poter visualizzare lo strand target del DNA in modo complementare (Watson-Crick base pairing) (prime due tappe). Il processo, pertanto, iniziando con il riconoscimento della sequenza PAM, e dell'RNA guida, nella tappa seguente porta ad uno svolgimento della doppia elica del DNA target con un appaiamento di una di essa con l'RNA guida (terza tappa). A questo punto la doppia elica del DNA si svolge ancor di più e si espande il loop-R verificandosi così un cambiamento conformazionale nel dominio HNH (dominio proteico caratterizzato da tre residui di istidina-asparagina-istidina) e assicurando un concertato taglio del DNA (quarta e quinta tappa). Da notare altresì che la proteina Cas è costituita da 2 lobi (uno per il riconoscimento dell'RNA guida e l'altro per l'attività nucleasica), dove sono presenti in modo significativo il dominio HNH e il dominio RuvC essenziali per il taglio preciso e concertato del DNA a doppia elica (ognuno taglia uno strand, se ne può inattivare uno nel qual caso si fa un nick), mentre il sito PAM (per la proteina Cas9 costituito da una sequenza di 3 basi - NGG) è importante per il riconoscimento del DNA da parte della nucleasi Cas ed è da ritrovarsi a -3 nucleotidi, "down-stream" dal sito del taglio.

Susseguenti ulteriori processi di riparo del DNA che contiene alla fine le modificazioni di sequenza prodotte e desiderate dal ricercatore, avvengono attraverso meccanismi presenti nella cellula nella quale si riaggiusta il DNA. Aggiuntivi esperimenti possono portare alla delezione del gene target (knock-out), oppure, se il ricercatore somministra alle cellule un DNA esogeno, può avvenire l'inserzione dello stesso (Knock-in, Knock-out condizionale con inserzione delle sequenze loxP, già attraverso noti processi di ingegneria genetica e biologia molecolare).

Figura modificata da ref 2.

bp, coppia di basi; NUC, lobo nucleasi; PAM, Protospacer adjacent motif; REC, lobo di riconoscimento; HNH, dominio proteico contenente residui istidina-asparagina-istidina; RuvC, dominio endonucleasico coinvolto nel riparo del danno al DNA.

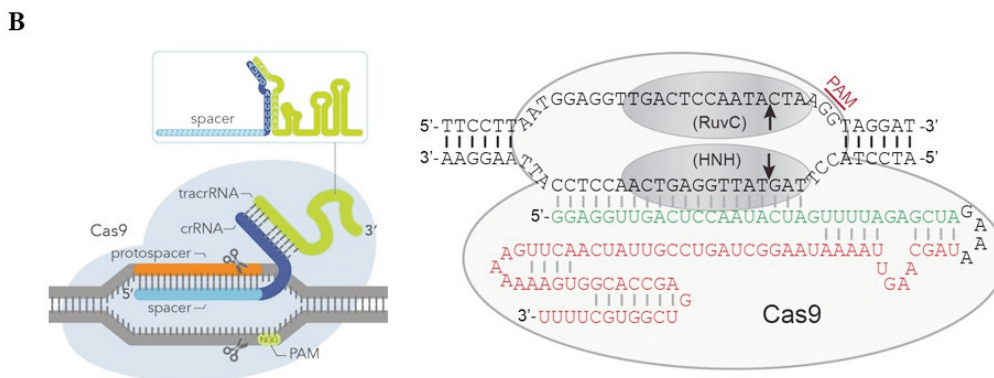


Figura 1. Le tappe fondamentali del meccanismo molecolare del "gene editing"

Pannello B. Dettaglio degli elementi essenziali del processo CRISPR-Cas9 in cui sono evidenziate le due parti di cui è costituito l'RNA guida [crRNA, che determina la sequenza del DNA bersaglio e trans-activating RNA (tracrRNA) che attiva il sistema e, pertanto, serve da ponte tra il crRNA e la Cas], i domini HNH e RuvC della proteina Cas9, e il sito della sequenza PAM (per la proteina Cas9 il PAM = NGG).

Schemi modificati da: <https://eu.idtdna.com/pages/support/faqs/what-is-a-pam-sequence-and-where-is-it-located>; e <https://web.science.uu.nl/developmentalbiology/boxem/CRISPR.html>.

PAM, Protospacer adjacent motif; HNH, dominio proteico contenente residui istidina-asparagina-istidina; RuvC, dominio endonucleasico coinvolto nel riparo del danno al DNA.

Ciò è dovuto, dunque, non solo ai potenziali rischi della tecnologia (specie l'"off-target" non controllabile), ma anche alla possibilità di poter portare a modificazioni genetiche del carattere degli individui o aspetti, o altre qualità della persona umana, che non sono ad oggi ancora permesse, forse anche perchè non considerate come terapie. È necessario, quindi, per la linea germinale umana attendere giorni o epoche più propizie, quando il termine terapia sarà regolamentato anche per questa tecnologia dalla legge (speriamo a livello internazionale), per farla rientrare nella definizione, che a mio parere (F.S.) deve essere come tutte le altre terapie basata essenzialmente, per essere approvata, sul rapporto costi-beneficio (anche l'aspirina può far male!) e sul ragionevole generalizzato sentimento di bioetica, purchè normato da legge e/o accettato dal più largo numero di popolazione.

Attraverso l'uso di molteplici serie di meccanismi molecolari (ecco le Scienze Biochimiche!) molto numerosi e variegati nella loro complessità, si potranno ottenere tagli nelle posizioni volute e ci potranno essere benefici particolarmente utili e significativi per la vita e la sostenibilità della specie umana (che, è bene ricordare, raggiungerà nel 2050 i 9,5 miliardi di esseri umani sulla nostra sfera terrestre, con molteplici problemi da risolvere, tra cui la nutrizione ed il benessere).

Ed ecco perché dobbiamo essere grati, come studiosi delle Scienze della vita, ed anche come cittadini, alla "Royal Swedish Academy of Sciences" per aver conferito il premio Nobel della Chimica a due ricercatrici che fattivamente hanno "rotto un vetro" importante di una porta ancora chiusa per portare a livello del metodo e della cultura scientifica una serie di prospettive di grande valore nel campo del DNA ricombinante e dell'ingegneria genetica, dimostrando ancora una volta che questa tecnologia ha sempre più grande ed attuale valore nelle Scienze della Vita anche per la specie umana e che lo avrà ancor più nel futuro.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la prof. C. Missero per la Figura 1 (Pannello B) e la discussione sul meccanismo molecolare del "gene editing".

BIBLIOGRAFIA

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337:816–21.
2. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* 2017;46:505–29.
3. Chojnacka-Puchta L, Sawicka D. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications. *J Appl Genet* 2020;61:221–9.
4. Gantz VM, Akbari OS. Gene editing technologies and applications for insects. *Curr Opin Insect Sci* 2018;28:66–72.
5. Krimsky S. Ten ways in which He Jiankui violated ethics. *Nat Biotechnol* 2019;37:19–20.

Due sfide di grande attualità in farmacotossicologia analitica

Roberta Pacifici

Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel presente fascicolo di *Biochimica Clinica* appaiono due contributi nell'ambito della farmacotossicologia analitica relativi ad argomenti di grande interesse nell'attualità: uno studio originale che affronta la tematica dell'analisi qualitativa dei preparati galenici della cannabis per uso medico e una rassegna narrativa sulla farmacologia dell'acido gamma-idrossibutirrico e la sua determinazione nelle matrici biologiche convenzionali e non convenzionali a fini clinici e forensi.

La Cannabis medica, più propriamente detta cannabis per uso medico, è costituita dalle infiorescenze femminili derivanti da piante con profilo genetico stabile, prodotte in ambienti controllati che forniscono un contenuto di principio attivo in delta-9 tetraidrocannabinolo (THC) e cannabidiolo (CBD) costante e dichiarato. Il suo utilizzo non può essere considerato una terapia propriamente detta per il dolore neuronale o le altre patologie a cui si applica, bensì un trattamento sintomatico di supporto ai trattamenti standard, quando questi ultimi non abbiano prodotto gli effetti desiderati, o abbiano provocato effetti secondari non tollerabili, o necessitino di incrementi posologici suscettibili di determinare la comparsa di effetti collaterali. Le preparazioni magistrali di origine vegetale a base di cannabis al momento vengono allestite in farmacia dietro presentazione di prescrizione medica non ripetibile.

Con il Decreto Ministeriale del 9 novembre 2015 (GU Serie Generale n.279 del 30-11-2015) è stato avviato un progetto pilota per la produzione nazionale di sostanze e preparazioni di origine vegetale a base di cannabis nello Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare di Firenze Al momento detto stabilimento produce due varianti di cannabis per uso medico: FM2 con quantitativo di THC di circa 5,8% e CBD di circa 8,1% e FM1 con quantitativo THC di circa 14% e CBD di circa 0,1% (1,2).

Sebbene il sopracitato decreto preveda soltanto la preparazione di un decotto, studi sperimentali hanno evidenziato la poca biodisponibilità dei fitocannabinoidi in ambiente acquoso e l'estrema instabilità del decotto dopo la sua preparazione (1-3). Pertanto la comunità scientifica internazionale (medici prescrittori, farmacisti, ecc.) si è orientata verso la preparazione di estratti oleosi che presentano una maggiore efficienza estrattiva dei fitocannabinoidi dalle infiorescenze ed una maggiore stabilità a breve e lungo termine (2). In ogni modo, poiché queste preparazioni galeniche presentano rese variabili, per assicurare la qualità del prodotto, il Decreto Ministeriale suddetto richiede da parte dei farmacisti la titolazione del/i principio/i attivo/i per ciascuna preparazione magistrale con metodologie sensibili e specifiche quali la cromatografia liquida o gassosa accoppiate alla spettrometria di massa. A tal proposito, molti laboratori di farmacotossicologia clinica e forense hanno messo a punto e validato metodologie di analisi per eseguire le titolazioni di prodotti galenici oleosi.

Il contributo di Cangemi et al. (4) riporta i risultati di un progetto sperimentale nella regione Liguria proprio per la titolazione di questi prodotti. Tale progetto ha visto coinvolti il Laboratorio di Tossicologia-Levante Ligure di Sarzana e il Laboratorio Analisi dell'Ospedale Gaslini di Genova-Sezione di spettrometria di massa, e rappresenta un esempio di ottimizzazione delle risorse in ambito regionale e di consolidamento di indagini sfruttando le competenze offerte da equipe specializzate. Questo modello organizzativo che ha messo insieme diverse professionalità dal Laboratorista al Farmacista, ha permesso la condivisione di un protocollo che ha visto concentrare le analisi delle preparazioni oleose a base di cannabis in un "cannabis day" comune a tutte le farmacie della regione e contemporaneamente definire una unica reportistica con un comune modello di risposta così come una comune tempistica di refertazione. Questo modello unico nel suo genere, oltre ad essere una dimostrazione di ottimizzazione delle risorse a livello regionale può proporsi come un modello organizzativo "esportabile" in diversi ambiti della diagnostica di laboratorio farmacotossicologico.

Il secondo contributo di Marchei et al. (5) è una rassegna narrativa relativa alla farmacotossicologia e alle metodologie di analisi dell'acido gamma-idrossibutirrico (GHB).

Corrispondenza a: Roberta Pacifici, Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161, Roma, E-mail roberta.pacifici@iss.it

Ricevuto: 18.09.2020

Accettato: 20.09.2020

Pubblicato on-line: 24.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.091

Sebbene attualmente le nuove sostanze psicoattive (NPS) siano le sostanze psicotrope che più attirano l'attenzione dei media e dei laboratori di farmacotossicologia clinica e forense (6), l'acido gamma-idrossibutirrico, comunemente noto come GHB, per i molteplici contesti d'uso rappresenta un "evergreen" della tossicologia clinica e forense, con numerosi problemi analitici ed interpretativi, che questa rassegna si propone di chiarire.

Il GHB, neuromodulatore endogeno metabolita e precursore dell'acido gamma-amminobutirrico, è anche un prodotto farmaceutico prescritto per il trattamento dei disturbi del sonno e per alleviare la sindrome da astinenza alcolica, il cui uso scorretto e abuso si sono diffusi in forma crescente in ambito ricreazionale (discoteche e "rave party") e recentemente nell'ambito del "ChemSex", termine anglosassone coniato per definire il sesso accompagnato all'uso di sostanze psicoattive e non, praticato soprattutto in contesti di rapporti omosessuali tra più partner. Inoltre tale sostanza, incolore ed inodore è spesso implicata in casi di violenza sessuale facilitata da somministrazione di sostanze psicotrope (7).

Nella rassegna, gli Autori hanno evidenziato le attuali applicazioni terapeutiche del GHB come sale sodico nel trattamento della narcolessia associata a cataplessia (Xirem®) e come adiuvante nel trattamento della dipendenza cronica da alcol etilico (Alcover®) (8). Tuttavia gli usi illegali del GHB e dei suoi precursori, in particolar modo il gamma-butilrolattone sono quelli che generano problemi di salute pubblica per il numero di intossicazioni acute e morti correlate all'uso di tale sostanza assunta singolarmente o in associazione ad altre droghe, in primis NPS della famiglia dei catinoni sintetici (mefedrone, etilone etc.) soprattutto nel fenomeno del "ChemSex" (9,10). Tenuto conto della natura endogena del GHB, la sfida dei laboratori di farmacotossicologia clinica e forense è riuscire a discriminare tra le concentrazioni endogene normalmente rilevabili nei liquidi biologici *ante-* e *post-mortem* ed una eventuale esposizione cosciente e non cosciente esogena. Sono stati messi in evidenza dagli Autori i molteplici approcci analitici attualmente utilizzati per l'analisi di matrici biologiche sia convenzionali (5-7) che alternative (11-13). Nell'interpretazione delle risultanze analitiche è quindi fondamentale l'applicazione dei valori soglia attualmente in uso, come riportato nel lavoro. Tali valori soglia hanno un ruolo cruciale soprattutto nel *post-mortem*, poiché dal punto di vista forense è di fondamentale importanza discriminare concentrazioni esogene dai valori endogeni e in quest'ultimo caso risulta particolarmente importante valutare se l'ingestione della sostanza sia avvenuta prima della morte del soggetto o se i valori riscontrati derivino da una sintesi postmortale.

I due contributi presentati ci portano a riflettere sulle vecchie e nuove sfide dei laboratori di farmacotossicologia clinica. La nuova sfida riguarda, come visto, la titolazione dei prodotti oleosi della cannabis ad uso medico che rappresentano i preparati galenici al momento più richiesti per un sempre crescente utilizzo di tale preparato in numerose patologie (14). Ma c'è anche la sfida sempre in atto dell'analisi del GHB al fine di individuarne l'assunzione, l'abuso acuto e/o cronico, in quanto tale analisi richiede non solo metodologie specifiche e sensibili ma anche un corretto utilizzo dei valori soglia e dell'interpretazione del risultato clinico o forense da parte dei professionisti del laboratorio di farmacotossicologia analitica.

In conclusione, saluto con favore la pubblicazione di questi due contributi di farmacotossicologia analitica e mi auguro che siano i primi di una lunga serie che i professionisti di questa disciplina vorranno condividere con tutti i lettori di *Biochimica Clinica*.

BIBLIOGRAFIA

1. Pacifici R, Marchei E, Salvatore F et al. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1555-63.
2. Pacifici R, Marchei E, Salvatore F et al. Evaluation of long-term stability of cannabinoids in standardized preparations of cannabis flowering tops and cannabis oil by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:94-6.
3. Citti C, Ciccarella G, Braghiroli D et al. Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *JPBA* 2016;128:201-9.
4. Cangemi G, Bucchioni P, Tripodi G et al. Titolazioni dei preparati galenici oleosi a base di cannabis in regione Liguria: progetto sperimentale dei laboratori di riferimento regionale. *Biochim Clin* 2020;44:367-73.
5. Marchei E, Rotolo MC, Graziano S, et al. Farmacotossicologia e metodologie di analisi del GHB nel laboratorio clinico e forense. *Biochim Clin* 2020;44:335-50.
6. Zaami S, Busardò FP, Pichini S et al. The value of toxicological and forensic analyses in the global challenge to health risks caused by new psychoactive substances. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23:6008-10.
7. Busardò FP, Jones AW. Interpreting γ -hydroxybutyrate concentrations for clinical and forensic purposes. *Clin Toxicol (Phila)* 2019;57:149-63.
8. Busardò FP, Kyriakou C, Napoletano S, et al. Clinical applications of sodiumoxybate (GHB): from narcolepsy to alcohol withdrawal syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19:4654-63.
9. Busardò FP, Gottardi M, Tini A et al. Replacing GHB with GBL in Recreational Settings: A New Trend in ChemSex. *Curr Drug Metab* 2018;19:1080-5.
10. Pichini S, Marchei E, Pacifici R, et al. ChemSex intoxication involving sildenafil as an adulterant of GHB. *Drug Test Anal* 2017; 9: 956-9.

11. Busardò FP, Bertol E, Vaiano F et al. Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples. *Forensic Sci Int* 2014;243:144-8.
12. Busardò FP, Mannocchi G, Giorgetti R et al. Stability of endogenous GHB in vitreous humor vs peripheral blood in dead bodies. *Forensic Sci Int* 2017;274:64-9.
13. Busardò FP, Pichini S, Zaami S et al. Hair testing of GHB: an everlasting issue in forensic toxicology. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:198-208.
14. Brunetti P, Pichini S, Pacifici R et al. Herbal preparations of medical cannabis: a vademecum for prescribing doctors. *Medicina* 2020;56:237-52.

Il metodo scientifico come strumento efficace per una rigorosa interpretazione degli studi

Paola Pezzati

SOD Sicurezza e Qualità, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi Firenze

Nella cultura di stampo umanistico che caratterizza l'Italia, il timore o la semplice mancanza di confidenza verso la statistica medica parte da lontano e fa sì che l'argomento sia percepito, generalmente, più come una nicchia per pochi che come uno strumento di utilizzo quotidiano per l'interpretazione della realtà.

Gli studenti delle scuole superiori spesso concludono il percorso senza aver affrontato la materia e, se intraprendono un corso di laurea scientifica, si confrontano solo brevemente con questa branca del sapere. Le scuole universitarie di specializzazione in Patologia Clinica e Biochimica Clinica propongono, al primo anno del percorso, moduli di Statistica Medica. Difficilmente durante le poche ore, in genere meno di dieci, dedicate allo studio della statistica medica, possono essere proposti programmi molto articolati. Il professionista di Medicina di Laboratorio, tuttavia, svolgendo un lavoro che si basa in larga misura su misure, confronti, valutazioni ed inferenze, percepisce come prioritario riuscire a fornire interpretazioni corrette dei dati prodotti e sviluppare competenze in questo ambito.

La diffusione della Evidence Based Medicine (EBM), ha senz'altro contribuito ad avvicinare molti noi, se non proprio alla statistica, almeno all'attenta lettura e alla corretta interpretazione dei dati scientifici; l'applicazione dei principi ispiratori della EBM alla Medicina di Laboratorio ha contribuito a stimolare un ripensamento sul corretto uso degli esami di laboratorio, sulla appropriatezza della richiesta e più in generale, ha contribuito ad aumentare la consapevolezza su come "dietro ai numeri" ci fossero i fatti concreti relativi alla salute dei pazienti, anzi come "i numeri", o meglio, le "evidenze", potessero e dovessero indirizzare le scelte in ambito sanitario.

Tuttavia, a smorzare gli entusiasmi sul nuovo paradigma, sono intervenuti, in ambiti clinici specifici, sorprendenti disaccordi fra gruppi di studio (1), proprio nel campo della metodologia e della interpretazione della significatività dei dati, con dibattiti tecnico-scientifici trasformati anche spesso in scontri mediatici. Non si è ancora spento, ad esempio, l'eco della controversa vicenda relativa alla efficacia dello screening mammografico (2) o della vaccinazione HPV (3,4). Alessandro Liberati, direttore del Centro Cochrane Italiano dal 1994 al 2012, riconosceva come le sfide della EBM "*si sono rivelate assai più complesse di quanto alcuni dei suoi iniziatori avessero previsto*" (5) e poneva la difficile questione del rapporto tra metodologia e complessità del fenomeno in studio.

La nostra società scientifica ha da sempre riconosciuto la centralità di tale tematica ed i bisogni formativi connessi e, negli anni, ha fornito rilevanti contributi all'approfondimento delle conoscenze in questo ambito.

SIBioC può infatti vantare vari Gruppo di studio attivi sugli aspetti metodologici della ricerca, nonché la presenza di un vivace Gruppo di Studio, "Statistica per il Laboratorio". Quest'ultimo, oltre a produrre lavori originali, collabora in modo trasversale con i gruppi societari ed intersocietari e, tramite la Scuola di Formazione permanente della Società, propone regolari corsi di Statistica di Laboratorio aperti a tutti i soci.

Alla luce di questo impegno societario, va accolta con molto favore la pubblicazione su questo numero di Biochimica Clinica di ben due lavori che affrontano aspetti di statistica. Il primo a cura di L. Zanolta (6) tratta il tema della "Significatività Statistica", suggerendo una interpretazione consapevole delle limitazioni del concetto statistico per eccellenza, la significatività; il secondo lavoro di M. Vidali, "Riproducibilità della scienza" (7), propone una articolata riflessione sul fondamento stesso della ricerca scientifica.

Zanolta, riprendendo un commento apparso su Nature in cui gli Autori chiedevano provocatoriamente di abbandonare il concetto di significatività statistica, contestualizza le motivazioni alla base della richiesta, presenta in modo puntuale il dibattito in corso in letteratura e riporta una serie di proposte per mantenere l'uso dei valori di P derivanti dai test statistici. Come l'Autore commenta, non è lo strumento in sé che deve essere abbandonato, ma il suo uso in forma dicotomica e la dicotomica interpretazione che necessariamente ne deriva. Un ulteriore spunto di

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

Ricevuto: 14.11.2020

Accettato: 17.11.2020

Pubblicato on-line: 24.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.101

riflessione in questo ambito è presente anche nell'articolato contributo di Vidali, in cui viene anche sottolineata l'importanza della valutazione dell'intervallo di confidenza. La lettura delle Revisioni sistematiche ci ha in effetti abituati a tenere in considerazione sia i valori di P che gli Intervalli di Confidenza delle stime puntuali, per non perdere contenuto informativo.

E' lecito supporre che il tema della riproducibilità della scienza, presentato chiaramente da Vidali, continuerà ad essere dibattuto negli anni a venire: si tratta della condizione basilare del metodo scientifico, e come sottolinea l'Autore, costituisce *"il criterio più importante per separare ciò che è scienza da ciò che è coincidenza"*. Come tale, si comprende come meriti la messa a punto di una cornice metodologica specifica (che è specificamente e proficuamente descritta nel lavoro), in grado di garantire la solidità delle evidenze.

I due contributi di Biochimica Clinica propongono al lettore una sorta di salto di qualità: un po' come accade in tutti i percorsi di crescita culturale, in cui, una volta interiorizzati le nozioni e gli strumenti di base, il passo successivo prevede l'utilizzo circostanziato e critico dei concetti acquisiti e, in alcuni casi, la rielaborazione innovativa dei medesimi, superando il "timore reverenziale" nei confronti di concetti assunti come assiomi.

Sicuramente questi temi ci invitano a prendere coscienza e riflettere sulla complessità della moderna Medicina di Laboratorio, e sulla necessità di decodificarne i vari elementi senza perdere la ricchezza dell'insieme. I due contributi costituiscono quindi una lettura altamente raccomandabile per i professionisti della Medicina di Laboratorio ed è augurabile che facciano da apripista ad ulteriori contributi su queste tematiche all'interno della Società e sul suo Giornale.

Tuttavia, per chi, come la scrivente, possa sentirsi un po' sovrastato dalla contemplazione della complessità dell'argomento e cerchi di recuperare il sorriso, suggerisco la rinfrescante lettura, o rilettura, della "Guida Galattica per gli autostoppisti" (8) in cui si proclama che *"la risposta a tutte le domande della vita e dell'Universo è: 42"*.

BIBLIOGRAFIA

1. Partecipasalute https://www.partecipasalute.it/cms_2/node/6676 (ultimo accesso: novembre 2020)
2. Kaniklidis C. Beyond the mammography debate: a moderate perspective. *Curr Oncol* 2015;22:220-9.
3. Arbyn M, Xu L, Simoons C, et al. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. *Cochrane Database Syst Rev* 2018 doi: 10.1002/14651858.CD009069.pub3.
4. Jørgensen L, Gøtzsche PC, Jefferson T. The Cochrane HPV vaccine review was incomplete and ignored important evidence of bias. *BMJ EvidBasedMed* 2018;23:165-8.
5. Liberati A. Etica, Conoscenza e sanità. Evidence-based medicine fra ragione e passione. Roma: Il Pensiero Scientifico Ed, 2009.
6. Zanolli L. Un mondo senza significatività statistica? *Biochim Clin* 2020;44:380-5.
7. Vidali M. La scienza riproducibile. *Biochim Clin* 2020;44:386-96.
8. Adams D. Guida galattica per autostoppisti. Roma: Arnoldo Mondadori Editore, 2014.

Farmacotossicologia e metodologie di analisi dell'acido gamma-idrossibutirrico nel laboratorio clinico e forense

Emilia Marchei¹, Maria Concetta Rotolo¹, Silvia Graziano¹, Manuela Pellegrini¹, Alessandro del Rio²

¹Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

²Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Forensi e Ortopediche, Sapienza Università, Roma

ABSTRACT

Pharmacotoxicology and analytical issues of gamma-hydroxybutyric acid in clinical and forensic laboratory.

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) can be considered both an endogenous metabolite and a precursor of the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) acting within the central nervous system as a neuromodulator. Pharmacologically, GHB is classified as a central nervous system depressant and its mechanism of action involves interaction and binding with GABA-B receptors.

With the generic name of sodium oxybate, the sodium salt of GHB, is sold as a pharmaceutical product under the trade name of Xyrem® when prescribed for the treatment of people with narcolepsy and with the name of Alcover® when used to relieve alcohol withdrawal syndrome and treat alcohol dependence.

Between the end of the 90s of the twentieth century and the beginning of the twenty-first one, the abuse of GHB became increasingly widespread in the recreational field. The substance, often consumed in combination with alcohol, cannabis, ecstasy (3,4-Methylenedioxymethamphetamine, MDMA), ketamine, has been converted in one of the most used "club drugs", becoming one of the most serious health issues in the emergency department of many European and extra-European Countries because of the initial difficult clinical management of the growing number of cases of intoxication. At the same time, there was an increase of cases of sexual assaults of victims who were unaware they had been given GHB as odourless and colourless sedative substance.

In this narrative review, the three different aspects of GHB as endogenous neuromodulator, as prescription drug and as substance of abuse are illustrated. The main methods for qualitative and quantitative analysis in conventional and non-conventional biological matrices for clinical and forensic purposes are also described.

INTRODUZIONE

L'acido gamma-idrossibutirrico (acido 4-idrossibutanoico, GHB) è un acido grasso a catena corta composto da quattro atomi di carbonio e un singolo gruppo idrossile (-OH) legato al C-4, naturalmente presente nell'organismo. Il GHB può essere considerato sia un metabolita endogeno che un precursore del neurotrasmettitore acido gamma-amminobutirrico (GABA) e agisce sul sistema nervoso centrale come neuromodulatore. Inoltre, si può formare nei tessuti periferici umani da due precursori esogeni, il gamma-butilrolattone (GBL) e il 1,4-butandiolo (BD) (Figura 1) (1).

Farmacologicamente, il GHB è classificato come depressore del sistema nervoso centrale e il suo meccanismo d'azione coinvolge l'interazione e il legame con i recettori del GABA, in particolare con il complesso GABA-B (2). Questo meccanismo differisce da quello di altri sedativi-ipnotici, quali l'etanolo, i barbiturici e le benzodiazepine, che agiscono attraverso il legame con il recettore GABA-A e il suo canale ionico del cloro (3).

Il GHB è stato sintetizzato per la prima volta nel 1874 dal chimico russo Alexander Mikhaylovic Zaytsev, ma l'interesse e gli studi sistematici sul GHB sono iniziati negli anni '60 del ventesimo secolo quando il medico francese Henri Laborit (1914-1995), si interessò allo studio dei suoi effetti fisiologici. Laborit aveva osservato

Corrispondenza a: Manuela Pellegrini, Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma, Tel +39 06 49903026, E-mail manuela.pellegrini@iss.it

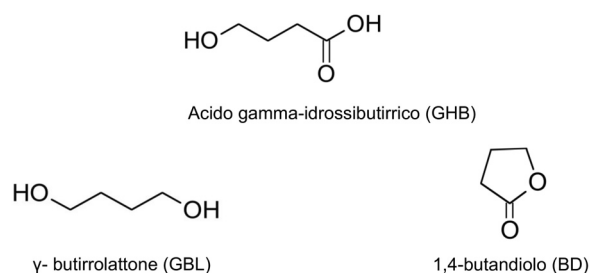
Ricevuto: 22.08.2020

Revisionato: 04.09.2020

Accettato: 11.09.2020

Publicato on-line: 16.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.086

**Figura 1**

Strutture molecolari dell'acido γ-idrossibutirrico (GHB) e dei suoi precursori, il γ- butirrolattone (GBL) e il 1,4-butandiolo (BD)

che il GHB era un analogo strutturale del GABA e, a differenza di quest'ultimo, era attivo per via orale, in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e penetrare nel cervello (4).

Gli esperimenti di Laborit avevano dimostrato che il GHB era un potente agente farmacologico creando così un interesse per il suo uso come anestetico per via endovenosa, poiché la sostanza aveva effetti minimi di depressione cardiovascolare e respiratoria e la funzione epatica e renale sembravano rimanere inalterate. Tuttavia, in seguito, il GHB si rivelò deludente come anestetico, poiché il farmaco possedeva un effetto analgesico insufficiente e la dose corretta era difficile da stimare e controllare. Dopo l'osservazione che in alcuni pazienti la sua somministrazione induceva il vomito mentre in altri si producevano convulsioni, i test medici del GHB in anestesologia furono abbandonati in favore di agenti anestetici endovenosi molto più sicuri (ad esempio ketamina, propofol). Nonostante ciò, il GHB è stato registrato in Germania per l'uso come anestetico endovenoso (Somsanit®) a dosi di 60-80 mg/kg di peso corporeo alla fine degli anni '60 (5).

Con il nome generico di sodio oxibato, il sale sodico del GHB (sodio 4-idrossibutirrico), è un prodotto farmaceutico prescritto con il nome commerciale Xyrem® per il trattamento di disturbi del sonno, come la narcolessia e con il nome commerciale Alcover® per alleviare la sindrome da astinenza da alcol e trattarne la dipendenza (6).

Durante gli anni '70 e '80 del secolo scorso, il GHB è divenuto popolare come integratore alimentare di libera vendita tra i culturisti con la supposizione, mai comprovata scientificamente, che il GHB aiutasse a "bruciare i grassi", sviluppare muscoli e che stimolasse la produzione dell'ormone della crescita (7).

Tra la fine degli anni '90 del ventesimo secolo e l'inizio del ventunesimo, l'uso scorretto e l'abuso di GHB si sono diffusi in forma crescente in ambito ricreazionale (ad esempio nelle discoteche, e nei "rave parties"): la sostanza, spesso consumata in combinazione con alcol, cannabis, 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA, ecstasy), ketamina, è diventata tra le più usate "club drugs", divenendo una delle maggiori problematiche nei Dipartimenti di Emergenza di molti Paesi europei ed extraeuropei per la iniziale difficoltà della gestione clinica

del crescente numero di casi di intossicazione (8, 9). Contemporaneamente, si è osservato un aumento di casi di violenza sessuale nei quali alle vittime era stato somministrato inconsapevolmente GHB e/o i suoi due precursori GBL e BD come sedativi, in quanto sostanze inodori ed incolori. (10,11). Pertanto, l'uso illecito del GHB e il suo potenziale uso come "droga dello stupro" ha indotto la Food and Drug Administration (FDA) statunitense a rendere dal 2000, il GHB una sostanza controllata, sebbene sia anche inserito nella tabella dei farmaci che richiedono prescrizione medica.

Il GHB e i suoi precursori GBL e BD sono sotto controllo, secondo la convenzione delle Nazioni Unite sulle sostanze psicotrope del 1971 (<https://antidroga.interno.gov.it/wp-content/uploads/2019/04/Convenzioni-stupefacenti-del-1971.pdf>), nella maggior parte dei paesi dell'Unione Europea. In Italia, il GHB ed il suo precursore GBL sono sostanze incluse nella Tabella IV del Decreto del Presidente della Repubblica 309/90, come modificato dalla Legge n.79 del 2014, e quindi poste sotto controllo della vigente normativa in materia di stupefacenti (http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3729&area=sostanzeStupefacenti&menu=vuoto). Il GHB è anche presente nella sezione B della Tabella dei Medicinali, presente nello stesso decreto.

In questa rassegna narrativa, vengono illustrati i tre aspetti differenti del GHB quale neuromodulatore endogeno, farmaco e sostanza d'abuso e sono descritte le principali metodologie di analisi quali-quantitative della sostanza a fini clinici e forensi, riportando le esperienze della Unità di Farmacotossicologia del Centro Nazionale Dipendenze e Doping dell'Istituto Superiore di Sanità.

L'ACIDO GAMMA-IDROSSIBUTIRRICO COME NEUROMODULATORE ENDOGENO

Il GHB interferisce con la neurotrasmissione GABAergica e può essere considerato un agonista del recettore GABA (12). I neuroni che rilasciano il GABA sono localizzati principalmente nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale e nell'amigdala. I recettori per il GHB si trovano in questi siti, nelle cellule pre- e post-sinaptiche e mostrano un'elevata affinità per le proteine G accoppiate a questi recettori (13). In Figura 2 sono riportati la biosintesi ed il metabolismo del GHB endogeno.

A differenza della maggior parte degli altri depressori del sistema nervoso centrale (ad esempio alcol etilico, benzodiazepine) che agiscono tramite il complesso recettoriale GABA-A per attenuare l'attività neuronale, il GHB esercita la maggior parte dei suoi effetti da agonista debole legandosi al complesso recettoriale GABA-B (14), sebbene alcuni studi su animali ipotizzino il suo intervento anche sulla neurotrasmissione della dopamina e della serotonina (15).

Il GHB agisce inizialmente come un inibitore del rilascio di dopamina, sebbene con l'aumento della dose consumata, il turnover di dopamina possa essere

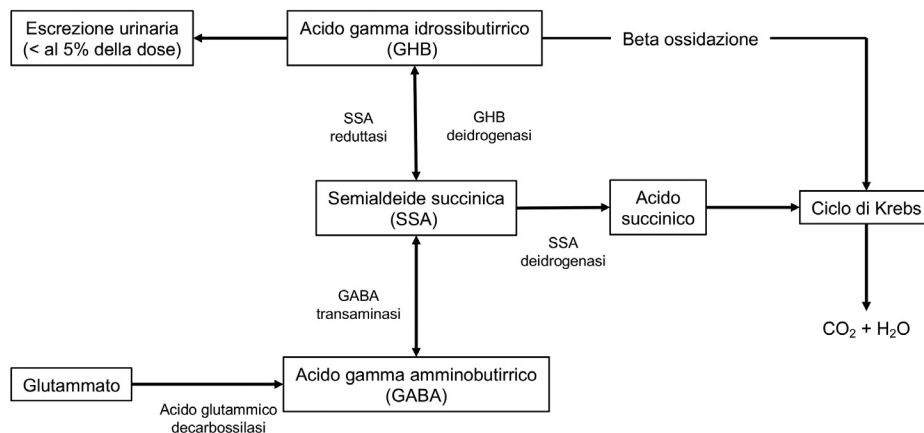


Figura 2
Biosintesi e metabolismo dell'acido γ -idrossibutirrico (GHB) endogeno

successivamente stimolato (16). Si è anche ipotizzato che il coinvolgimento dei recettori dell'*N*-metil-D-aspartato (NMDA) spiegasse la cataplessia indotta da GHB negli studi sugli animali (17). L'esistenza di siti di legame del recettore ad alta affinità per GHB distinti dal GABA-B è stata postulata per spiegare alcuni degli effetti farmacologici depressori prodotti da questa sostanza (18).

L'ACIDO GAMMA-IDROSSIBUTIRRICO COME FARMACO

Tattamento della narcolessia di tipo 1

La narcolessia di tipo 1 (NT1) è una malattia neurologica causata dalla perdita dei neuroni dell'orexina (ipocretina) nell'ipotalamo laterale, probabilmente a causa di un meccanismo autoimmune. È caratterizzata da eccessiva sonnolenza diurna con attacchi di sonno, episodi di cataplessia, cioè perdita improvvisa del tono muscolare, allucinazioni ipnagogiche, paralisi del sonno e disturbi del sonno notturno (19, 20).

Il sodio oxibato, il sale sodico del GHB, è il trattamento di prima linea dei sintomi indotti dalla NT1 ed è altamente efficace nel migliorare l'architettura del sonno, riducendo il sonno notturno frammentato, diminuendo l'eccessivo sonno diurno e la frequenza degli attacchi cataplettici (20). Nel luglio 2002 il sodio oxibato, con il nome commerciale di Xyrem® è stato approvato dalla FDA come sostanza per il trattamento della cataplessia nei pazienti narcolettici e nel novembre 2005 il suo uso è stato approvato dalla FDA per il trattamento della sonnolenza diurna eccessiva in pazienti affetti da narcolessia (11). Questo farmaco è stato approvato anche dalla European Agency Medicine ed è attualmente disponibile in Europa per il trattamento della narcolessia con cataplessia nei pazienti adulti (21).

Il GHB viene rapidamente assorbito dall'intestino e anche rapidamente eliminato dal corpo con una emivita ($t_{1/2}$) di 30-50 minuti. Ciò significa che dopo 150-250

minuti ($5 \times t_{1/2}$), le concentrazioni di GHB nel plasma sono appena misurabili (8). La dose giornaliera di Xyrem® deve essere assunta immediatamente prima di coricarsi e il rapido assorbimento e la breve emivita di eliminazione assicurano che il mattino successivo solo quantità insignificanti del farmaco rimangano nel sangue.

Una recente revisione sistematica e una metanalisi della letteratura internazionale sull'uso del GHB nella narcolessia degli adulti, esaminando 15 differenti studi clinici per un totale di 2104 pazienti, ha concluso che il GHB migliora la narcolessia con cataplessia e i sintomi correlati, negli adulti (20). Gli autori hanno inoltre messo in luce che l'efficacia del GHB su molti aspetti della narcolessia è dipendente dalla dose e/o dall'orario di somministrazione (20). È stato anche evidenziato che effetti collaterali riportati dai pazienti trattati come vertigini, enuresi e nausea o vomito hanno provocato tassi elevati di astinenza dose-dipendente. Una dose di 6-9 g di GHB può migliorare significativamente la sonnolenza diurna soggettiva e il sonno a onde lente. È interessante notare che questi risultati supportano anche il ruolo del GHB nel migliorare le alternanze di sonno e il sonno REM. Nonostante ciò, il margine tra efficacia e tossicità nel trattamento con il GHB è un problema critico per i pazienti con narcolessia. È necessario quindi stimare l'equilibrio tra benefici e rischi quando si prendono decisioni sulle dosi di farmaco e sul numero di somministrazioni giornaliere (20).

Anche il nostro gruppo di ricerca si è interessato dell'uso del GHB nella narcolessia negli adulti con uno studio pilota sulla farmacocinetica del farmaco in tre soggetti con NT1 a cui sono state somministrate basse dosi (2,5, 3 e 7 g/die; Xyrem® in due somministrazioni) (21). Studi precedenti avevano già indagato la farmacocinetica del GHB, ma avevano fornito risultati in parte contrastanti riguardo la linearità della cinetica del GHB (8, 22-24). Inoltre, nessuno aveva indagato la presenza nel sangue del suo glucuronide (GHB-Gluc) (25).

I dati ottenuti hanno evidenziato una farmacocinetica non lineare del GHB plasmatico e la presenza di GHB-Gluc in tracce sia prima che dopo il trattamento farmacologico.

Inoltre, per la prima volta in letteratura, il GHB è stato misurato insieme al suo glucuronide in campioni *ante-mortem* di liquido cerebrospinale (a disposizione poiché raccolto per la misura dell'orexina) nei pazienti narcolettici afferenti a questo studio (25). Mentre il GHB somministrato superava la barriera ematoencefalica e la sua concentrazione aumentava nel liquido cerebrospinale in funzione della dose, questo non si verificava per il metabolita glucuronato. Questo risultato, insieme alle concentrazioni minime di glucuronide nel plasma, indicava che tale metabolita non era un biomarcatore significativo della somministrazione esogena di GHB (25).

Fra gli effetti secondari dell'uso del GHB nella terapia della narcolessia, c'è il rischio di possibile intossicazione di lattanti da parte di donne narcolettiche in trattamento durante l'allattamento. Il monitoraggio del GHB nel latte materno di donne narcolettiche che allattano viene eseguito al fine di calibrare la dose di farmaco necessaria per il sonno notturno della madre, riducendo però al minimo il rischio che venga escreto nel latte che il neonato consuma. Il primo studio pilota su un singolo caso ha dimostrato che dopo l'assunzione di una dose di 4,5 g di GHB, la sua concentrazione nel latte materno ha seguito la stessa cinetica di quella nel sangue, con una concentrazione massima di farmaco (23,19 mg/L), una ora dopo la somministrazione di sodio oxibato e la minima (0,99 mg/L) 5 ore dopo l'assunzione. Sebbene le concentrazioni nel latte materno fossero dal 70 all'80% inferiori a quelle del sangue e non siano riportati valori di GHB nel latte non tossici per il lattante, gli autori dello studio raccomandavano alle madri in trattamento con sodio oxibato di allattare al seno almeno 5 ore dopo l'ultima somministrazione di GHB (26). Un ulteriore studio ha dimostrato che dopo due dosi notturne di GHB (2,25 e 3 g), i valori basali del neuromediatore si raggiungono rispettivamente dopo 6 e 10 ore dalla somministrazione e poiché il GHB viene generalmente somministrato di notte, l'allattamento mattutino dovrebbe essere evitato (27). Questi dati, ottenuti comunque su singoli soggetti, richiedono una attenta interpretazione, soprattutto quando si valutano farmacocinetiche in matrici particolari come il latte materno nelle quali non si conosce la stabilità della molecola (28).

Sebbene nella maggior parte dei pazienti NT1 si sviluppi durante l'infanzia, non esistono trattamenti approvati in ambito pediatrico. Nonostante ciò, il sodio oxibato è stato ampiamente utilizzato "off-label" per trattare i sintomi della NT1 nei bambini e negli adolescenti in studi non controllati, mostrando un profilo di sicurezza e una risposta terapeutica simili a quella nei pazienti adulti. Pertanto, al momento, la terapia pediatrica si basa solo su dati osservazionali condivisi tra i medici dei disturbi del sonno (29).

Trattamento della astinenza da alcol

Il GHB con il nome commerciale di Alcolver® è autorizzato per il trattamento da alcol in Austria e in Italia (30).

La sindrome da astinenza da alcol (SSA) è una condizione clinica che si manifesta in pazienti alcol-dipendenti circa 6-24 ore dopo la brusca interruzione o la drastica riduzione dell'assunzione di alcol e di solito la sua durata varia tra le 48-72 ore. Non esiste una relazione specifica tra il periodo di abuso di alcol e la gravità dei segni clinici di astinenza e la variabilità nella gravità dei sintomi si può osservare nello stesso individuo in diversi episodi di astinenza. La sindrome da astinenza da alcol è caratterizzata da iperattività autonoma, tremore, ansia e irrequietezza (31). I trattamenti farmacologici, che sono stati utilizzati fino ad ora e che sono considerati efficaci nella cura e nella prevenzione della SAA includono benzodiazepine, alcol etilico per via endovenosa, clonidina, clometiazolo, aloperidolo e infine GHB (19, 32).

Attraverso l'aumento dell'attività inibitoria dei recettori GABA, l'alcol agisce come un agente depressivo riducendo le risposte eccitatorie del SNC. Dopo un abuso di etanolo a lungo termine, si verifica una riduzione del numero di recettori GABA che favorisce lo sviluppo della tolleranza. Questa condizione richiede un aumento dell'assunzione di etanolo per ottenere gli effetti euforici precedenti. Poiché l'etanolo agisce anche come antagonista del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA), l'abuso di etanolo a lungo termine causa l'aumento dei recettori NMDA e la sovrapproduzione compensatoria di glutammato. La brusca interruzione dell'alcol produce una sovraeccitazione del sistema nervoso centrale dovuta alla sovrapproduzione di glutammato con conseguenti segni clinici di astinenza sotto forma di iperattività autonoma come tachicardia, tremori, sudorazione, delirio e convulsioni (33). Un altro neurotrasmettitore coinvolto nelle manifestazioni cliniche dell'astinenza da etanolo è la dopamina, il cui aumento contribuisce all'iperattività autonoma e alle allucinazioni (34).

Le prime evidenze cliniche sull'efficacia del GHB nel trattamento dell'alcolismo sono state studiate a partire dal 1999 con un primo studio randomizzato in doppio cieco che ha indagato i potenziali effetti terapeutici di 50 mg/kg GHB sulla sindrome da astinenza da alcol in comparazione con le benzodiazepine (35). Si è poi giunti ad uno studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, condotto nel 2014 per valutare l'efficacia del GHB rispetto all'oxazepam in 126 soggetti alcolisti (36). Questo studio ha confermato che il GHB è efficace nel ridurre i sintomi della sindrome da astinenza da alcol e che produce effetti vantaggiosi paragonabili a quelli delle benzodiazepine o del clometiazolo.

Il periodo prolungato di astinenza da alcol sta emergendo come un fattore chiave che influenza sia il desiderio improvviso e incontrollabile di assumere la sostanza ("craving") che la ricaduta nei pazienti alcol-dipendenti (37).

Per quanto riguarda invece la terapia della dipendenza da alcol, attualmente, solo i farmaci acamprosato, disulfiram e naltrexone sono stati approvati per il trattamento.

Tuttavia, il GHB si è dimostrato efficace nel mantenimento dell'astinenza da alcol e nel ridurre il desiderio di alcol. A questo proposito, la letteratura internazionale riporta cinque studi clinici per valutare gli effetti del GHB nel mantenimento dell'astinenza da alcol. In primo luogo, è stato dimostrato che con 50 mg/kg/die di GHB (diviso in tre dosi giornaliere) per un periodo di tre mesi, il desiderio di alcol durante il periodo di trattamento si riduceva nell'80% dei pazienti alcol dipendenti. (38). Inoltre, il GHB era più efficace del naltrexone nel mantenere l'astinenza da alcol in un periodo di trattamento di tre mesi, ma non altrettanto nel ridurre le ricadute (39). Infine, 50 mg/kg di GHB tre volte al giorno o 50 mg/die di naltrexone o 200 mg/die di disulfiram hanno dimostrato uguale efficacia nel ridurre l'assunzione di alcol e nel mantenere l'astinenza per i 12 mesi di trattamento (40). Tuttavia, un'ulteriore indagine ha mostrato che alla fine di un trattamento di tre mesi con GHB o con naltrexone o con la combinazione dei due farmaci, solo 8 pazienti (40%) del gruppo trattato con solo GHB, 13 pazienti (72,2%) del gruppo trattato con la combinazione GHB più naltrexone e di un paziente nel gruppo trattato solo con naltrexone aveva mantenuto l'astinenza (41). Al contrario, la combinazione di 50 mg/die di naltrexone più 75 mg/kg di GHB e 20 mg/die di escitalopram è risultata la più efficace nel prevenire le ricadute nei pazienti alcol dipendenti (42).

Nel loro insieme, gli studi clinici sopra descritti sugli effetti del GHB nel mantenimento dell'astinenza da alcol indicano che il farmaco è superiore al placebo e al naltrexone nell'aumentare il numero di pazienti astinenti da alcol e nel diminuire l'assunzione di alcol in soggetti non astinenti. Tuttavia, non è efficace nel ridurre le ricadute nei forti bevitori, come fa il naltrexone. Secondo i risultati degli studi clinici, la combinazione naltrexone/GHB/escitalopram sembra essere il trattamento più efficace nella prevenzione delle ricadute nei pazienti alcol dipendenti.

Valutazioni simili a quelle fatte sulla SSA sono state effettuate nei casi di dipendenza da GHB (43,44). Un primo studio (43) ha evidenziato che dopo l'adattamento del dosaggio del GHB, i pazienti hanno manifestato un basso livello di sintomi da astinenza. Durante la riduzione graduale, questi sintomi sono diminuiti significativamente e nessun paziente ha sviluppato delirio o psicosi. Questa procedura di disintossicazione si è dimostrata sicura e conveniente nei pazienti con dipendenza da GHB da moderata a grave.

Più recentemente (44) uno studio multicentrico osservazionale è stato condotto in sei centri di trattamento delle dipendenze nei Paesi Bassi. In pazienti ricoverati dipendenti da GHB (229 pazienti unici, 274 ricoveri) è stato effettuato un adattamento del dosaggio del GHB che poi è stato gradualmente ridotto (DeTiTap). La disintossicazione è stata raggiunta in 12,5 giorni nell'85% dei casi. La procedura DeTiTap si è dimostrata

fattibile e ha ridotto significativamente i sintomi di astinenza e il "craving" sperimentati ($p < 0,001$). Durante la disintossicazione, i sintomi psicologici come depressione, ansia e stress sono diminuiti ($p \leq 0,05$), mentre le principali complicanze erano l'ipertensione e l'ansia. La maggior parte dei pazienti (69%) ha avuto una ricaduta entro tre mesi dalla disintossicazione. La procedura DeTiTap che utilizza GHB farmaceutico sembra un'alternativa sicura alle benzodiazepine come procedura di disintossicazione da GHB. Tuttavia, gli alti tassi di ricaduta giustificano ulteriori indagini.

Infine, il GHB nella forma di sodio oxibato ha dimostrato una certa efficacia nel trattamento della schizofrenia (45), del disturbo da stress post-traumatico (46), dei disturbi affettivi e dell'umore (47), dell'eccessiva sonnolenza diurna nella fibromialgia (48) e della malattia di Parkinson (49).

L'ACIDO GAMMA-IDROSSIBUTIRRICO COME SOSTANZA D'ABUSO

L'utilizzo del GHB come sostanza psicotropa è stato segnalato alla fine del secolo scorso, quando iniziò ad essere usato come droga ricreazionale e ha causato una serie di morti per overdose (50). È commercializzato con vari nomignoli quali "biberon, gamma g, midnight blue, liquid x, liquid e, liquid ecstasy, easy lay, g, vita-g, g-juice, georgia home boy, great hormones, soap, gook, gamma". Si tratta infatti di un liquido incolore e inodore, che da un punto di vista farmacodinamico e per gli effetti soggettivi che produce nulla ha a che fare con la MDMA (ecstasy). Infatti, differentemente dall'ecstasy che agisce sulla ricaptazione della serotonina, permettendo una elevata concentrazione di questo neuromodulatore negli spazi intersinaptici, come sopra riportato, il GHB agisce principalmente come agonista sui recettori GABAergici e del NMDA (24).

Il GHB ha una azione rapida sul SNC. I suoi effetti psicoattivi si manifestano entro 5-20 minuti dall'assunzione (con picco dopo 30-60 minuti) e possono persistere sino a 7 ore in funzione della dose (51). La durata degli effetti, inoltre, è influenzata dalla combinazione con altre sostanze psicotrope assunte contestualmente (52).

Il GHB mostra un modello di azione misto stimolante-sedativo con un profilo temporale bifasico come descritto per altri sedativi quali alcol o cannabis (53, 54). Gli effetti psicostimolanti sono predominanti nella prima ora dopo l'assunzione mentre gli effetti sedativi iniziano più lentamente e predominano nella seconda fase (24). In riferimento al suo abuso, il GHB induce euforia, benessere, effetti piacevoli ed effetti di empatia che sono alla base del suo uso come droga ricreativa o "club drug", mentre gli effetti di sedazione si manifestano con diminuzione delle prestazioni psicomotorie, atassia ed esoforia. A dosi crescenti compaiono i sintomi dell'intossicazione acuta (Tabella 1) (55).

Tuttavia, va sottolineato che gli effetti descritti sono lunghi dall'essere universalmente applicabili. Una stessa dose può avere effetti molto diversi tra individui e lo

Tabella 1*Effetti clinici avversi osservati dopo l'assunzione di dosi crescenti di acido gamma-idrossibutirrico (GHB)*

Dose assunta di GHB	Effetti clinici
Dosi basse: 10 mg/Kg (0,5 – 0,75 g)	Disinibizione, ipotonia, aumento della libido
Dosi medio/alte: 20–30 mg/Kg (1,5 -2,5 g)	Sonnolenza, nausea, vomito, amnesia
Dosi elevate: 50-70 mg/Kg (4-5 g)	Convulsioni, amnesia, bradicardia, depressione cardio-respiratoria, coma
Dosi >70 mg/Kg (>5 g)	Collasso cardio-respiratorio

stesso individuo può reagire in modo diverso al consumo di GHB in differenti occasioni (56). Inoltre la variabilità negli effetti del GHB può essere connessa anche ai diversi gradi di purezza delle preparazioni offerte dal mercato clandestino (ad esempio internet, palestre, rave party o altro), e come sopra riportato, gli effetti psicotropi ed eventuali intossicazioni sono acuiti dall'uso di alcol e di altre sostanze d'abuso sia deprimenti (benzodiazepine, oppiacei), sia stimolanti (amfetamine, cocaina) (24). Infine, a proposito della variabilità interindividuale degli effetti soggettivi e delle intossicazioni, c'è da sottolineare che una ulteriore ragione potrebbe essere la recente diffusione nell'ambiente ricreativo del profarmaco (o anche precursore esogeno) del GHB, il GBL, più economico e più facile da ottenere in ragione delle sue diverse applicazioni industriali legali (57, 58).

Come si evidenzia nella Tabella 1, la differenza tra la dose a uso ricreativo di GHB e la dose tossica o letale è piuttosto ridotta e comunque soggettiva e questo spiega molte morti da overdose accidentale che coinvolgono questo farmaco (59). Anche singole dosi a partire dai 20 mg/kg possono causare vertigini, sonnolenza, nausea, vomito e perdita di coscienza. Questi sintomi, legati al fatto che gli intossicati da GHB soffrono di amnesia anterograda, sono i motivi principali per cui questo farmaco viene utilizzato nei casi di violenza sessuale facilitata da somministrazione di sostanze psicotrope (51).

Rispetto ai molteplici e sempre più aggiornati studi epidemiologici sulle più comuni sostanze d'abuso, sul GHB sono disponibili informazioni limitate e datate riguardo ai suoi modelli di consumo e alla sua diffusione nella popolazione generale (60, 62). La prevalenza dell'abuso di GHB è piuttosto bassa in confronto a quella delle droghe classiche (come oppiacei, cocaina, cannabinoidi, amfetamine) nella maggior parte delle nazioni europee ed extraeuropee sebbene risulti essere più alta in aree specifiche (ad esempio il Regno Unito e Londra in particolare) e più popolare tra i frequentatori di rave party e luoghi di incontri omosessuali per uomini (62).

L'abuso di GHB in Europa si è diffuso tra il 1994 e il 2002, con un picco all'inizio del ventunesimo secolo, legato soprattutto al suo utilizzo nelle discoteche della

costa brava spagnola e delle isole Baleari come alternativa all'MDMA e in quelle gay del Regno Unito (8).

L'utente medio del consumo ricreativo del GHB è abbastanza giovane, tra i 15 e i 22 anni, anche se altri iniziano più tardi nella vita, in funzione della loro precedente storia di uso di droga, delle influenze del gruppo di appartenenza e della loro situazione economica, come accade ad esempio nelle comunità gay maschili che lo utilizzano anche nei rapporti sessuali (63).

Nel 2000, anno in cui il GHB è stato dichiarato illegale, la prevalenza di consumo della sostanza nella popolazione generale è stata dell'1%. Successivamente si è notato un calo costante del consumo di questa sostanza, con un ritorno all'aumento del suo uso nell'ultimo quinquennio nell'ambito del cosiddetto "ChemSex": l'uso di più sostanze psicoattive per facilitare il sesso ed aumentare la durata degli incontri soprattutto tra uomini che cercano sesso con altri uomini, con l'intenzione di ottenere un aumento di vigore e della libido, facilitando il rilassamento muscolare, fornendo maggiore sicurezza di sé e in generale facilitando i comportamenti disinibiti (65). A tal proposito, come già menzionato, il mercato illecito si è recentemente orientato sulla vendita illegale di GBL e BD, inizialmente alternative legali al GHB ed entrambe precursori del GHB. Con il passare degli anni tuttavia, i due precursori sono stati inclusi tra le sostanze controllate, sebbene in tempi e con modalità differenti nei diversi paesi dell'Unione Europea.

LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO GAMMA-IDROSSIBUTIRRICO NEL LABORATORIO CLINICO E FORENSE

Matrici biologiche convenzionali e non convenzionali.

La misura delle concentrazioni del GHB in matrici biologiche convenzionali e non convenzionali è di primaria importanza nell'ambito dell'uso della sostanza per scopi ricreazionali.

Tale ambito è sia clinico, quando si tratta di accertamenti di primo e secondo livello in caso di intossicazioni acute o di dipendenza cronica, sia forense

quando una intossicazione diventa fatale, o quando si richiede la verifica di una violenza sessuale in cui ci sia sospetto di somministrazione di sostanze incapacitanti oppure infine nella verifica della guida sotto l'influenza di tale sostanza. Nell'interpretare le concentrazioni di GHB determinate nel sangue e in altri fluidi corporei è essenziale considerare la triplice natura di questa sostanza, metabolita endogeno, farmaco e droga d'abuso ricreativa.

Sebbene il GHB sia stato rilevato con successo nelle urine e nel sangue dei consumatori, la sua misurazione (8,52,65) nei fluidi biologici per valutarne il consumo volontario e involontario presenta alcuni inconvenienti.

In primo luogo, il GHB viene eliminato dall'organismo rapidamente, rendendo l'identificazione estremamente dipendente dal tempo che intercorre tra il consumo e la raccolta della matrice biologica. Questo ha indirizzato le analisi quali-quantitative a fini clinici e/o forensi verso l'uso di matrici biologiche con finestre temporali per il rilevamento di farmaci più ampie del sangue e delle urine, come i capelli (66-68). In secondo luogo, una difficoltà ulteriore risiede nel fatto che GHB è un composto endogeno, presente nel corpo umano con concentrazioni basali misurabili sia nel sangue che nelle urine. Pertanto, diversi autori hanno proposto concentrazioni "soglia" per identificare l'esposizione esogena di GHB (69, 70). Infine, diversi studi hanno sottolineato che le concentrazioni di GHB endogene possono essere elevate sia in *ante-mortem* che in campioni biologici *post-mortem* dovute alle condizioni di conservazione del corpo e agli enzimi responsabili della biotrasformazione del GHB nell'organismo.

Concentrazioni di GHB da <0,5 a 5 mg/L sono misurabili in diversi tipi di campioni biologici anche senza alcuna precedente esposizione al farmaco. Queste concentrazioni endogene non sembrano dipendere dal sesso, l'etnia o dal tipo di alimentazione del soggetto (71,72). Le concentrazioni endogene di GHB tendono ad essere più elevate nel sangue raccolto durante autopsia rispetto al sangue prelevato da soggetti viventi, e questo dovrebbe essere considerato quando i risultati tossicologici devono essere interpretati (73). In corpi decomposti, alcuni studi hanno riportato concentrazioni di GHB superiori a 100 mg/L in campioni di sangue centrale (cuore) (70,74).

A causa della natura endogena del GHB, una buona pratica di laboratorio, soprattutto in ambito tossicologico-forense, richiede l'adozione di valori soglia analitici, così da distinguere i campioni realmente positivi dai campioni con concentrazioni basali. Questa è una salvaguardia per evitare di segnalare risultati falsi positivi con conseguenti false accuse di uso o abuso di GHB (75). Questi valori soglia analitici sono superiori alla concentrazione endogena più alta e sono stati determinati da una revisione della letteratura e dalla esperienza da casi di routine forense. La Tabella 2 mostra i valori soglia analitici raccomandati per determinare la positività al GHB esogeno nelle diverse matrici biologiche (76).

La situazione con i campioni autoptici è più

complicata ed è necessario considerare il sito di prelievo (nel caso del prelievo di sangue: vena cardiaca o femorale), l'intervallo *post-mortem*, l'eventuale stato di decomposizione del corpo nonché l'aggiunta di fluoruro come inibitore enzimatico nella provetta di raccolta. Trovare che la concentrazione di GHB nel sangue venoso femorale è appena al di sopra della soglia di 30 mg/L (Tabella 2) potrebbe essere coerente con l'assunzione di GHB durante la vita, ma questa conclusione è maggiormente avvalorata con livelli elevati trovati in un campione alternativo, come l'urina, umor vitreo o liquido cerebrospinale (70).

Nei corpi che sono gravemente decomposti è necessaria una notevole cautela prima che vengano riportate concentrazioni positive di GHB quando misurate nel sangue centrale (74).

La determinazione del GHB nel sangue *ante-mortem* si utilizza principalmente nelle intossicazioni acute dopo utilizzo ricreazionale e l'intervallo di concentrazioni misurate riportate dalla letteratura internazionale varia tra 10 e 840 mg/L, laddove nel caso di guida sotto l'effetto della sostanza l'intervallo delle concentrazioni si abbassa tra 90 e 270 mg/L quando il GHB è l'unica sostanza rilevata o fino a 340 mg/L quando sono presenti altre sostanze psicoattive (77).

Nel sangue *post-mortem* le concentrazioni si elevano a valori tra 0,29 e 2,2 mg/L anche a causa di una dimostrata formazione di GHB *post-mortem* e dell'intervallo trascorso tra morte ed esecuzione della autopsia (73).

L'utilizzo nel sangue per verificare una singola somministrazione di GHB nel caso di violenza sessuale droga-correlata è molto limitata a causa della rapidissima escrezione della molecola dal sangue. Sarebbe necessario raccogliere il sangue nelle primissime ore dopo l'evento, ma questo non accade quasi mai in quanto il GHB agisce sulla memoria anterograda del soggetto che ha involontariamente ingerito la sostanza ed esso ricorda l'accaduto solo molte ore dopo o addirittura molti giorni dopo il fatto.

In ogni caso, in generale, il GHB è una molecola con un assorbimento e una eliminazione molto rapidi e con un tempo di emivita tra i 30 e i 50 minuti (78) e quindi sarebbe necessario un tempestivo campionamento di sangue qualora questa matrice venisse utilizzata per indagini che riguardano reati legati alla droga e/o a vittime di violenza sessuale e infine nella guida sotto l'influenza di tale sostanza. Quando si interpretano le concentrazioni di GHB negli incidenti stradali, è importante considerare che in media trascorrono 30-90 minuti (con una media 60 minuti) dopo l'arresto di un guidatore e prima che venga prelevato un campione di sangue. Nei conducenti infortunati, il ritardo potrebbe essere molto più lungo (77,78). In questo contesto, è bene ricordare che dopo la somministrazione orale, il GHB viene rapidamente assorbito dall'intestino raggiungendo le concentrazioni di picco nel plasma (Cmax) da 36 a 54 minuti dopo la somministrazione. Dopo l'assunzione di basse dosi terapeutiche, i profili concentrazione-tempo del GHB sono meglio descritti da

Tabella 2

Comparazione tra la concentrazione endogena di acido gamma-idrossibutirrico (GHB) in campioni biologici ante-mortem (AM) e pos-mortem (PM) e valori soglia raccomandati da usare nell'interpretazione analitica del dato

Campioni ante-mortem o post-mortem	Concentrazione endogena (mg/L)	Valori soglia raccomandati ^a (mg/L)	Utilizzo clinico o forense della misura del GHB nelle differenti matrici biologiche
Sangue (AM)	<1	5	Intossicazione acuta, monitoraggio terapeutico nella narcolessia e nella sindrome di astinenza alcolica, guida sotto l'effetto, violenza sessuale
Sangue (PM)	1-30	30-50 ^b	Conferma di morte GHB correlata
Urine (AM)	1-10	15	Intossicazioni acute, violenza sessuale, guida sotto l'effetto
Urine (PM)	1-30	30	Conferma di morte GHB correlata
Umor vitreo (PM)	0,5-39	30	Conferma di morte GHB correlata
Latte materno (AM)	0,13-1,03	5	Verifica intossicazione del lattante
Capelli (AM)	0-12 ng/mg	Misura del GHB nel segmento temporalmente corrispondente al momento della presunta violenza	Violenza sessuale, consumo cronico
Capelli (PM)	0-12 ng/mg	Non sono indicati valori soglia	Conferma di morte GHB correlata
Saliva	0,15-3,33	5	Intossicazione acuta (in alternativa al sangue)
Liquido cerebrospinale (AM)	<1	5	Monitoraggio passaggio barriera ematoencefalica nella narcolessia
Liquido cerebrospinale (PM)	0,5-24	10	Conferma di morte GHB correlata
Unghie della mano (AM)	0,3-3,8 ng/mg	Non sono indicati valori soglia	Uso ricreazionale e nel ChemSex
Unghie del piede (AM)	0,3-2,4 ng/mg	Non sono indicati valori soglia	Uso ricreazionale e nel ChemSex

^a non c'è un consenso generale relativo al valore soglia per verificare l'assunzione esogena di GHB. I valori riportati nella tabella derivano da lavori di letteratura internazionale e dalla nostra esperienza di lavoro nel trattare casi di natura forense.

^b il valore soglia di 50 mg/L deve essere considerato in caso di intervallo postmortem lungo con inizio di uno stato di decomposizione del corpo. Il valore soglia di 30 mg/mL può essere utilizzato per un periodo postmortem breve e nel caso di sangue venoso femorale.

una cinetica di primo ordine, mentre dopo un abuso la cinetica di ordine zero sembra la più appropriata per descrivere la farmacocinetica del farmaco, poiché i substrati degli enzimi metabolizzanti sono apparentemente saturati dalle alte concentrazioni (78).

Alcuni studi sulla possibilità di utilizzare la saliva come matrice alternativa al sangue nella misura del GHB, hanno dimostrato che, data la natura debolmente acida della molecola (pKa intorno a 5), quest'ultima non viene escreta in maniera significativa nella matrice suddetta, che è più acida del sangue (pH intorno a 6). Pertanto, nella saliva vengono misurate concentrazioni che sono tra un terzo e un quarto del valore misurato negli stessi intervalli di tempo nel sangue e ciò rende questa tipologia di campione non idonea né nella verifica della guida sotto l'influenza del GHB né nei casi di intossicazione.

Solo circa l'1-2% della dose somministrata viene

escreta immodificata nelle urine e può venire determinata fino ad massimo di 3-10 ore dopo la somministrazione (51,79). Pertanto l'analisi del GHB nell'urina *ante-mortem* è limitato a studi di clearance in studi clinici di diverso tipo, ma l'utilizzo di questa matrice è invece molto diffuso nel caso di verifica della presenza della molecola in morti GHB correlate. Le concentrazioni di GHB nei campioni di urina *post-mortem* sono inferiori rispetto al sangue con una media di 5,5 mg/L (intervallo 0-18 mg/L, N = 39) senza fluoruro e 4,8 mg/L (intervallo 0-10 mg/L, N = 15) con fluoruro (80). Altri Autori hanno verificato che l'urina è meno suscettibile alla sintesi *post-mortem* di GHB e questo è il motivo per cui si misurano valori soglia più bassi in questo fluido (51,81).

A differenza di sangue e urina prelevati *post-mortem*, varie ricerche hanno evidenziato che la concentrazione di GHB nell'umor vitreo è stabile anche dopo parecchie ore dalla morte e pertanto la misurazione della sostanza

in questa matrice biologica permette in maniera assai più accurata la diagnosi di morte correlata ad un'assunzione cosciente od incosciente (82).

Similmente, anche l'analisi del GHB nel liquido cerebrospinale *post-mortem* permette una accurata diagnosi (83) di morte droga-correlata perché anche in questa matrice le concentrazioni della sostanza non variano per molte ore dopo il decesso. La misura del GHB nel liquido cerebrospinale è stata utilizzata anche nel caso di soggetti narcolettici in trattamento con il GHB per verificare il passaggio del farmaco attraverso la barriera ematoencefalica (21). Considerando concentrazioni <1 µg/L quale valore endogeno del GHB, sono state misurate concentrazioni da 5,6 a 21,1 µg/L in funzione di dosi crescenti del farmaco da 2,5 a 9 g/die. Le concentrazioni relativamente basse di GHB nel liquido cerebrospinale dei pazienti trattati con Xyrem® possono essere spiegate dal catabolismo che si verifica nell'intervallo di tempo che intercorre tra l'assunzione del farmaco e il campionamento del liquido cerebrospinale (83).

Un discorso a parte merita la misura del GHB nel capello. L'utilizzo di questa matrice biologica per la determinazione del GHB è ideale per documentare una singola esposizione precedente, nei casi in cui vi sia un lungo ritardo tra l'assunzione o la somministrazione del farmaco e la raccolta e quando fluidi e tessuti convenzionali danno risultati negativi (66, 84). Supponendo che i capelli crescano a una velocità media di 1 cm al mese (intervallo 0,7–1,4 cm), ciò rende possibile tornare indietro al momento in cui si è verificato un presunto attacco o aggressione GHB correlato. In questo contesto, l'analisi sui capelli per stabilire una singola esposizione al GHB è stata e continua ad essere il gold-standard per dimostrare una violenza sessuale con somministrazione di GHB. La segmentazione del capello in porzioni di 0,5 cm o meno (fino a 0,3 cm) e l'uso di metodi analitici sensibili può rivelare la presenza di GHB esogeno (68,85) e permettere una cronologia di un eventuale esposizione attiva o passiva. Alcuni studi hanno dimostrato che le concentrazioni di GHB nei capelli variano in relazione al colore dei capelli e all'etnia e sono generalmente comprese tra 0 e 5 ng/mg (66). Il segmento di capelli più vicino al cuoio capelluto non dovrebbe essere utilizzato nell'analisi del GHB, a causa di una possibile contaminazione da parte del sudore, che può elevare le concentrazioni endogene fino a 20 ng/mg di capelli (86). Pertanto, l'elevata variabilità della concentrazione di GHB nei capelli non consente la proposta di un valore soglia affidabile che possa essere applicato unanimemente per discriminare in modo significativo tra GHB endogeno ed esogeno. Per semplificare l'interpretazione dell'analisi del GHB nei capelli, è stato proposto che ogni soggetto funga da controllo di sé stesso, confrontando i valori di GHB nei diversi segmenti analizzati (85). La maggior parte degli studi ha rilevato valori di GHB più elevati nel segmento di capelli più vicino al cuoio capelluto (parte prossimale), dimostrando il contributo del sudore anche quando i capelli sono stati correttamente decontaminati. Alla luce

di questo evento, almeno i primi 0,5 cm della parte prossimale dovrebbe essere escluso dall'analisi per evitare conclusioni errate.

Gli studi che hanno indagato sulla determinazione di GHB nei capelli dopo una singola somministrazione, tranne quello di Kintz (86) dove viene presentato un approccio diverso, indicano che è necessario attendere un ragionevole lasso di tempo per la raccolta dei capelli (da un minimo di 7 giorni fino a 1 mese o più) (66).

Le linee guida emesse dall'Ufficio delle Nazioni Unite contro la droga e il crimine (UNODC), indicano che se la concentrazione di GHB in un segmento di capelli relativo al momento di una possibile violenza sessuale è 10 volte superiore rispetto a un segmento limitrofo precedente o seguente, allora questa è una prova convincente dell'assunzione esogena o della somministrazione surrettizia di questo farmaco ([https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_oth_er_criminal_acts.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf)). Tuttavia, una differenza di 10 a 1 potrebbe essere troppo conservativa, perché alcuni studi supportano un rapporto più basso, ad esempio 3 a 1 come prova dell'assunzione di GHB (87). Questi rapporti proposti sono stati ottenuti da campioni di capelli raccolti 1 e 2 mesi dopo una singola somministrazione di GHB. Successivamente i rapporti numerici tra un segmento positivo e uno negativo al GHB potrebbero diminuire. A questo proposito, monitorando la concentrazione di picco di GHB nel segmento di capelli target dopo una singola somministrazione per un periodo di 12 mesi e calcolando il rapporto mese per mese tra il valore di GHB nei segmenti target e quello negli altri, il rapporto diminuisce progressivamente da 5,56 al 1° mese a 2,84 al 12° mese (68). La diminuzione di questo rapporto nel tempo può essere spiegata dal decadimento della concentrazione di GHB nei capelli. Inoltre, a differenza di altre droghe d'abuso, non è stata riscontrata alcuna migrazione significativa del GHB nel fusto del capello (68).

Infine, l'analisi sui capelli è uno strumento utile in tossicologia per verificare l'esposizione *ante-mortem* al GHB, perché i capelli sono meno inclini alle adulterazioni, come quelle associate alla decomposizione e alla diffusione lungo il capello (88). Le concentrazioni di GHB nei capelli sono quindi più stabili e hanno meno probabilità di aumentare in relazione all'intervallo *post-mortem* e ad altri fattori, come i processi di putrefazione dell'autolisi (89).

Metodi analitici

I metodi attualmente disponibili per lo screening e l'analisi quantitativa del GHB in campioni biologici sono stati recentemente oggetto di una revisione della letteratura internazionale (90) che documenta un'ampia varietà di metodi analitici per la determinazione del GHB nelle urine e nel sangue, nonché in matrici alternative quali saliva (91), umor vitreo (82,92,93), gocce di sangue secco (dried blood spots, DBS) (94,95) e capelli (85,96-98).

Sono disponibili numerosi metodi enzimatici di screening semplici ed economici per l'analisi del GHB nei fluidi biologici (99-101). Questi metodi sfruttano l'ossidazione con l'enzima GHB deidrogenasi e il cofattore NAD⁺ che viene ridotto a NADH. In un caso, ad esempio, la reazione enzimatica è stata adattata per l'autoanalizzatore Thermo Scientific MGC-240 (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA) fornendo un metodo rapido per la determinazione del GHB nel sangue, nell'umor vitreo e nelle urine (99). Sebbene queste determinazioni siano semplici da eseguire, fornire una specificità sufficiente rimane un problema critico e viene pertanto raccomandato sempre di effettuare una verifica di tutti i risultati positivi con metodiche in cromatografica liquida o gassosa accoppiate alla spettrometria di massa.

Altre tecniche di screening riportate in letteratura includono l'elettroforesi capillare in grado di rilevare elevate concentrazioni di GHB nelle urine (102, 103) e nel plasma (104), dopo semplice diluizione con acqua.

Per l'identificazione e la conferma della presenza di GHB nei fluidi biologici, la gas cromatografia sia accoppiata a un rivelatore a ionizzazione di fiamma, o meglio ancora ad uno spettrometro di massa (GC-MS), rimane la tecnica di separazione più utilizzata, nonostante la natura di molecola piccola e polare del GHB, che richiede la conversione in GBL o la derivatizzazione in una forma più volatile e stabile (105-110). Tuttavia, le applicazioni basate su GC-MS e soprattutto alla MS tandem stanno suscitando sempre più interesse, perché hanno il vantaggio di una preparazione più semplice del campione (ad esempio non è necessaria nessuna derivatizzazione) e la possibilità del semplice trattamento di "diluizione e iniezione" (dilute-and-shoot) (111-116). Queste procedure sono altamente sensibili, accurate, precise e specifiche per gli scopi previsti e si sono dimostrate utili per effettuare un rapido screening e analisi di verifica del GHB in campioni tossicologici.

Tra le metodiche in gas cromatografia, in letteratura viene riportato un semplice metodo in GC accoppiata ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma in cui la determinazione della concentrazione di GHB avviene dopo la sua conversione in GBL a pH acido (105). La preparazione del derivato GBL ha il vantaggio di una più facile estrazione in solventi organici e di garantire migliori proprietà di separazione cromatografica con picchi netti e buona linearità su un ampio intervallo di concentrazioni: 5-1000 mg/L (105).

È stata anche descritta una procedura che ha consentito l'analisi simultanea di diversi glicoli e del GHB nel plasma e nelle urine mediante GC-MS (110). La possibilità di eseguire lo screening di multi-tossine in una singola sessione è particolarmente utile in tossicologia clinica e medicina d'urgenza.

Un articolo recente ha descritto un metodo per determinare GHB, GBL, beta-idrossibutirrato e pregablin nello stesso campione biologico mediante un metodo in cromatografia liquida ad ultraprestazione accoppiata alla MS, altamente sensibile e specifico (111).

LE ESPERIENZE DEL CENTRO NAZIONALE DIPENDENZE E DOPING DELL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Gli studi sul GHB del Centro risalgono al 2006 quando, in collaborazione con un gruppo di ricerca di neurofarmacologia dell'Institut Municipal d'Investigació Mèdica di Barcellona, fu condotta la prima sperimentazione clinica sulla farmacodinamica e la farmacocinetica del GHB in volontari sani a cui venivano somministrati da 40 a 72 mg/kg della sostanza (24). Le analisi del GHB sul plasma sono state eseguite nel nostro laboratorio di farmacotossicologia con una metodica in GC-MS che analizzava il GHB estratto dal plasma con acetonitrile e derivatizzato con N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamide + 1% trimetilclorosilano (BSTFA-1% TMCS). Questa sperimentazione ha avvalorato il fatto che il GHB produceva cambiamenti negli effetti soggettivi dose-correlati e mostrava effetti ambivalenti stimolanti-sedativi, con segnalazione di aumenti nella sensazione soggettiva di euforia all'inizio della somministrazione, seguita da sintomi di sedazione lieve-moderati con compromissione delle prestazioni e dell'equilibrio. Gli effetti fisiologici e soggettivi mediati dal GHB correlati alle sue concentrazioni plasmatiche, suggeriscono un alto rischio di abuso nella gamma di dosi che solitamente vengono consumate (24).

Applicando la stessa metodologia di analisi, nell'anno successivo, il 2007, lo stesso gruppo di ricerca italo-spagnolo per la prima volta ha esaminato la cinetica di una singola dose di 50 mg/kg di GHB non solo nel sangue e nell'urina, ma anche nella saliva e nel sudore di un gruppo di cinque volontari sani confermando un effetto farmacologico misto, sedativo-stimolante con effetti soggettivi, che raggiungeva il picco tra 1 e 1,5 ore dopo la somministrazione della sostanza e che perdurava nelle due ore successive (117). Data la natura debolmente acida della molecola, le concentrazioni nella saliva e nel sudore, matrici biologiche più acide del sangue, erano significativamente minori di quelle nel plasma, rendendo nessuna delle due matrici non convenzionali idonee per il monitoraggio del consumo di GHB (117,118).

Infine nel 2010, lo stesso gruppo italo-spagnolo si è interessato all'impatto del GHB sul sistema immunitario (119). Singole dosi di 40 mg/kg o 60 mg/kg di GHB somministrate a dieci volontari sani hanno modificato in modo significativo l'assetto linfocitario e diminuito la reattività funzionale dei linfociti alla stimolazione mitogenica. Questi risultati hanno evidenziato per la prima volta che l'assunzione di GHB in un contesto ambientale ben definito e controllato altera lo stato immunologico (119).

Dopo questi primi studi, per alcuni anni il nostro Centro non si è occupato del GHB che sembrava essere uscito dalla scena delle "club drugs". Nell'ultimo quinquennio, invece, la sostanza è tornata di interesse sia come "ChemSex drug", che per il suo uso crescente come farmaco ma anche a causa di un aumento di intossicazioni acute e morti GHB correlate.

Poiché nello stesso tempo, il laboratorio si è dotato di una strumentazione di ultima generazione, quale la cromatografia liquida ad ultra prestazione associata alla spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS), con tale strumentazione è stato messo a punto un metodo per la determinazione non solo del GHB ma anche del GABA del GBL, quali rispettivamente precursori endogeno ed esogeno e del glucuronide del GHB quale metabolita di fase 2 in plasma, urine, liquido cerebrospinale e capelli come possibili biomarcatori di una esposizione acuta e cronica al GHB. Inoltre si è ricercato il GBL in preparazioni sequestrate provenienti dal mercato illecito (120). Dopo una semplice e veloce estrazione con acetonitrile di queste sostanze dai fluidi biologici o dai reperti non biologici (essenzialmente preparazioni liquide) e dopo digestione in tampone VTA-M3® (Comedical, Trento, Italia) nel caso dei capelli, la separazione cromatografica è stata ottenuta a temperatura ambiente utilizzando una colonna in fase inversa e un'eluizione isocratica con due solventi: acido formico allo 0,1% in acqua e metanolo puro. Il metodo, dopo validazione, è stato applicato con successo a campioni reali di casi forensi (un campione di urina *post-mortem* prelevato per un caso di intossicazione fatale da GHB) o clinici (campioni di liquido cerebrospinale, plasma e capelli raccolti da pazienti narcolettici in trattamento con sodio oxibato) (21). Infine, sono stati esaminati anche i preparati illeciti, sequestrati dalle forze dell'ordine, per verificare la quantità di GHB al loro interno e l'eventuale presenza del profarmaco GBL.

Sempre nel 2017, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Forensi e Ortopediche dell'Università La Sapienza di Roma, e il Dipartimento di Medicina Legale dell'Università Politecnica delle Marche, abbiamo verificato la stabilità del GHB in campioni di sangue periferico di umore vitreo e di *post-mortem*, prelevati da 22 cadaveri in due tempi diversi: all'esame esterno del corpo sul luogo del decesso e poi durante l'autopsia (121). È stato sviluppato e validato un metodo ad hoc per la rilevazione e la quantificazione del GHB nell'umor vitreo mediante GC-MS, con una buona linearità compresa tra 0,1 e 50 mg/L. Differentemente dalla concentrazione del GHB nel sangue periferico, che dalla prima raccolta al momento dell'autopsia ha subito un aumento del 102%, nel caso dell'umor vitreo l'aumento del valore del GHB era solo del 19%, dimostrando l'utilità di questa matrice alternativa più stabile rispetto al sangue periferico per la determinazione *post-mortem* del GHB endogeno (121).

Questo studio e i precedenti del gruppo di ricerca dell'Università La Sapienza sui valori soglia da applicare per la distinzione tra il GHB endogeno e quello esogeno nelle matrici biologiche *ante-mortem* e *post-mortem* ci hanno portato a ripensare ai valori soglia precedentemente stabiliti (122). Pur concordando sui valori soglia di GHB nei campioni biologici per differenziare tra produzione endogena ed esposizione esogena (55), è necessario ribadire che questi valori limite non possono essere applicati universalmente e

che è necessario prestare particolare attenzione quando si interpretano valori di GHB nelle autopsie per la possibilità della produzione *post-mortem* associati a fenomeni di azione microbica e autolisi/putrefazione (123). Pertanto qualsiasi proposta di valore limite deve essere scientificamente e statisticamente supportata con un numero non trascurabile di casi esaminati in condizioni standardizzate. Inoltre nelle analisi *post-mortem*, quando si interpretano le concentrazioni di GHB, è sempre consigliabile prendere in considerazione l'intervallo prima dell'autopsia, insieme ad ulteriori dati, compreso il grado di decomposizione del corpo. (123)

Aver dimostrato la stabilità della concentrazione *post-mortem* del GHB nell'umor vitreo è stato di primaria importanza per risolvere un caso di sospetta morte per violenza sessuale con possibile somministrazione di GHB in una giovane donna, trovata senza vita in una via cittadina del Sud Italia (80). Sono stati raccolti due campioni di sangue periferico e due di umor vitreo dal cadavere per l'analisi del GHB a due diversi intervalli *post-mortem*: circa 2 e 36 ore dopo la morte. I risultati ottenuti hanno mostrato che nell'intervallo tra i due tempi di raccolta si era verificato un aumento delle concentrazioni di GHB nel sangue periferico e nell'umor vitreo del 66,3% e dell'8,1% rispettivamente. Questo caso è stato la prima evidenza della produzione *post-mortem* di GHB nel sangue cadaverico, dimostrando che l'umor vitreo era esente da una significativa produzione *post-mortem* di GHB. Il valore rilevato nel sangue periferico a 36 ore dalla morte (53,4 mg/L) aveva superato il valore soglia proposto e se interpretato da solo avrebbe portato a conclusioni errate. Questo non è stato il caso dell'umor vitreo il cui minimo aumento di GHB *post-mortem* ha permesso di escludere un'esposizione alla sostanza. Una ampia indagine forense ha in seguito provato che la causa della morte era dovuta a una vasculite eosinofila polmonare responsabile di un'insufficienza respiratoria fatale (80).

Il nostro Laboratorio, sempre nel 2017, è stato incaricato di analizzare matrici biologiche relative a casi di intossicazione da GHB utilizzato nell'ambito del "ChemSex". Tra i tanti casi interessanti, uno ha meritato una pubblicazione come caso clinico (124). Nel caso suddetto, due giovani omosessuali consumatori abituali di GHB dopo l'utilizzo di una dose in polvere, ottenuta da uno spacciatore conosciuto, disciolta in una bevanda alcolica, avevano accusato crescente malessere, fino a dover ricorrere ad un ricovero in Pronto Soccorso per dolore al petto, forte mal di testa e tachicardia, mancanza di respiro e vertigini. Dopo uno screening negativo alle droghe classiche e l'esclusione di ebbrezza alcolica, le analisi tossicologiche eseguite su sangue e urina in UHPLC-MS/MS dei due soggetti hanno mostrato la presenza non solo del GHB (55,1 e 37,8 mg/L nel sangue e 37,7 e 15,5 mg/L in urina), ma anche del sildenafil (0,34 mg/L e <0,05 mg/L nel sangue e 1,2 mg/L nelle urine di entrambi) e del suo metabolita; entrambe le sostanze parenti erano presenti nel residuo della bevanda consumata. Quando i risultati sono stati segnalati agli intossicati, essi hanno negato l'uso

contemporaneo di GHB e sildenafil. Successivamente lo spacciatore ha ammesso l'adulterazione del GHB con il sildenafil nell'intenzione di aumentare gli effetti sessuali attesi dal solo GHB. L'effetto sinergico delle due sostanze a concentrazioni non note nella preparazione illecita ha quindi causato una intossicazione acuta in utenti ignari di tale adulterazione, che in generale può rappresentare una minaccia per la salute dei consumatori cronici di GHB, così come di tutte le sostanze abusate per l'effetto psicotropo (124, 125).

Laddove l'effetto sinergico del GHB e del sildenafil ha portato ad una intossicazione acuta, non trascurabile ma comunque risolvibile, il consumo simultaneo del GHB con un catinone sintetico, il 4-metilmetcatinone, nell'ambito sempre del "ChemSex", ha causato una intossicazione fatale (126). Le prime prove sulla scena del crimine erano evocative di una morte associata a un consumo multiplo di droghe poiché una bottiglia di vetro contenente un liquido incolore e inodore insieme a una siringa con i residui di un liquido incolore è stata trovata vicino al corpo esaminate di un giovane omosessuale. Il nostro laboratorio ha identificato e quantificato il GHB e 4-metilmetcatinone mediante GC-MS in fluidi biologici *post-mortem* (rispettivamente 150,8 mg/L, 115,4 mg/L e 5800 mg/L di GHB in campioni di sangue periferici e centrali e urina, e rispettivamente 15,5 µg/L, 10,6 µg/L e 20 µg/L di 4-metilmetcatinone nel sangue periferico e centrale e nelle urine) mentre nel flacone di vetro vicino al cadavere è stato identificato il GBL e nella siringa il 4-metilmetcatinone. Questo caso non è stato il primo in cui il consumo simultaneo di GBL o GHB con il 4-metilmetcatinone nell'ambito del "ChemSex" ha portato sia ad una intossicazione acuta severa poi risolta (300 mg/L e 1000 mg/L di GHB e 353 µg/L e 100 µg/L di 4-metilmetcatinone in sangue e urina otto ore dopo il consumo) (127) sia ad una morte causata da una polintossicazione, misurata nel sangue periferico *post-mortem* di alcol etilico (0,58 g/l), GHB (172 mg/L) e 4-metilmetcatinone (507 µg/L) (128).

Nel 2018, in collaborazione con i colleghi del Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Forensi e Ortopediche, della Università La Sapienza di Roma, e l'Institut de Médecine légale, Strasbourg, France, abbiamo redatto una revisione critica della letteratura internazionale riguardante l'analisi sui capelli per la misura del GHB endogeno, delle concentrazioni nei consumatori cronici e dei valori misurati dopo una singola esposizione al GHB nei casi di violenza sessuale esaminando inoltre il ruolo del glucuronide del GHB, un metabolita recentemente identificato (66). Abbiamo quindi proposto un protocollo operativo pratico da applicare in tutti i casi sospetti di violenza sessuale facilitata dal GHB, ricordando che quando si vogliono dimostrare degli effetti farmacologici o dovuti all'ingestione involontaria di GHB, è sempre necessario verificare oggettivamente l'esposizione al GHB. Sebbene la rapida clearance del GHB non consenta la rilevazione di questa sostanza né nel sangue né nelle urine dopo circa 4-8 ore dall'ingestione, i capelli possono essere presi in considerazione come matrice alternativa

e/o complementare in grado di documentare l'esposizione a lungo termine alla sostanza nei viventi e nei morti (66).

Negli ultimi due anni, infine, ci siamo nuovamente concentrati su casi di consumo del GHB nell'ambito del "ChemSex", utilizzando una matrice cheratinica non ancora presa in considerazione, le unghie (129-131). La metodica prevede un processo estrattivo del GHB molto semplice e veloce dalle unghie che sono lasciate per un'ora a 100 °C in tampone VMA-TM3® (Comedical, Trento) e una estrazione in fase solida (Oasis PRiME HLB, Waters, Milano) e successivamente una determinazione tramite UHPLC-MS/MS. Con questa metodologia di analisi abbiamo in primo luogo misurato i valori endogeni del GHB nelle unghie di non consumatori (0,3-3,8 ng/mg di unghia) per poi analizzare diversi casi di "ChemSexers" che utilizzavano miscele di GHB e sostanze d'abuso classiche e nuove sostanze psicoattive (132). È stato condotto uno studio pilota per quantificare le più comuni droghe d'abuso, cannabinoidi sintetici, cationi sintetici e GHB nelle unghie delle mani e dei piedi di individui che presumibilmente consumavano queste sostanze nell'ambito del "ChemSex" (128). Sono state individuate cocaina, benzoilecgonina, cocaetilene, delta-9-tetraidrocannabinolo, amfetamina, metamfetamina, MDMA, 3,4-metilendioksamfetamina, ketamina, norketamina, mefedrone, metilone, 4-metilmetcatinone, GHB e GBL. Le sostanze maggiormente presenti nelle unghie erano MDMA e GHB seguite da cocaina e ketamina. Il GHB era presente in un ampio intervallo di concentrazioni (0,61-165,1 ng/mg). La presenza simultanea di GBL (0,03-50,4 ng/mg) insieme al GHB hanno confermato l'uso di questo precursore nel "ChemSex", in quanto più economico e più facile da ottenere a causa delle diverse applicazioni in ambito industriale (57).

CONCLUSIONI

Sebbene al momento le Nuove Sostanze Psicoattive (NPS) siano le sostanze psicotrope che più attirano l'attenzione dei media e interessano i laboratori di farmacotossicologia clinica e forense, il GHB continua a rappresentare un problema di salute pubblica nell'ambito dell'uso, uso scorretto e abuso delle sostanze psicotrope.

Il GHB è una sostanza peculiare per i suoi tre aspetti: è un componente endogeno del nostro organismo, è un farmaco utilizzato in situazioni particolari quali la narcolessia e nell'astinenza e dipendenza da alcol, (che è una sostanza d'abuso esso stesso) e infine è una sostanza ricreazionale a doppia azione inebriante e sedante. Proprio per questo ultimo aspetto, le intossicazioni dopo uso cosciente o inconsapevole sono frequenti, così come non trascurabili le morti per overdose. Per questa ragione sarebbe auspicabile inserire la determinazione di questa sostanza nella routine di laboratorio proprio in ragione di eventuali richieste che dovessero pervenire dai Dipartimenti di Emergenza delle Aziende Ospedaliere.

Pertanto, i professionisti clinici e forensi devono apprezzare le difficoltà nell'interpretare le concentrazioni di GHB ed essere in grado di differenziare valori endogeni da quelli esogeni e in questo ultimo caso di discriminare una ingestione *ante-mortem* da una sintesi *post-mortem*. I valori soglia internazionali presenti negli studi che sono stati illustrati in questa rassegna devono ricevere il consenso delle Società Scientifiche di medicina di laboratorio clinico e forense ed essere quindi considerati nelle linee guida delle buone pratiche dei laboratori stessi.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Beck R, Matanović SM, Zibar L. Gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol addiction: a serious health threat. *Arh Hig Rada Toksikol* 2019;70:149-50.
- Wong CG, Chan KF, Gibson KM, et al. Gammahydroxybutyric acid: neurobiology and toxicology of a recreational drug. *Toxicol Rev* 2004;23:3-20.
- Whiting PJ. GABA-A receptor subtypes in the brain: A paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* 2003;8:445-50.
- Bessman SP, Fishbein WN. Gamma-hydroxybutyrate, a normal brain metabolite. *Nature* 1963;200:1207-8.
- Vickers MD. Gamma hydroxybutyric acid. *Clinical pharmacology and current status. Proc R Soc Med* 1968; 61:821-4.
- Busardò FP, Kyriakou C, Napoletano S, et al. Clinical applications of sodium oxybate (GHB): from narcolepsy to alcohol withdrawal syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19:4654-63.
- Takahara J, Yunoki S, Yakushiji W, et al. Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;44:1014-17.
- Busardò FP, Jones AW. GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Curr Neuropharmacol* 2015;13:47-70.
- Marinelli E, Beck R, Malvasi A, et al. Gamma-hydroxybutyrate abuse: pharmacology and poisoning and withdrawal management. *Arh Hig Rada Toksikol* 2020;71:19-26.
- Stillwell ME. Drug-facilitated sexual assault involving gammahydroxybutyric acid. *J Forensic Sci* 2002; 47: 1133-4.
- Abramowitz MZ. GHB and date rape. *Br J Psychiatry* 2004;185:176-7.
- Carai MA, Colombo G, Brunetti G et al. Role of GABA(B) receptors in the sedative/hypnotic effect of gamma-hydroxybutyric acid. *Eur J Pharmacol* 2001;428: 315-21.
- Snead OC, 3rd. Evidence for a G-protein coupled gammahydroxybutyric acid receptor. *J Neurochem* 2000;75:1986-96.
- Tyacke RJ, Lingford-Hughes A, Reed LJ, et al. GABA-B receptors in addiction and its treatment. *Adv Pharmacol* 2010;58:373-96.
- Kamal RM, van Noorden MS, Franzek E, et al. The neurobiological mechanisms of gamma-hydroxybutyrate dependence and withdrawal and their clinical relevance: a review. *Neuropsychobiology* 2016;73:65-80.
- Feigenbaum JJ, Howard SG. Gamma hydroxybutyrate is not a GABA agonist. *Prog Neurobiol* 1996;50:1-7.
- Koek W, France CP. Cataleptic effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and baclofen in mice: Mediation by GABA(b) receptors, but differential enhancement by N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;199:191-8.
- Bay T, Eghorn LF, Klein AB, et al. GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites. *Biochem Pharmacol* 2014;87:220-8.
- Boscolo-Berto R, Viel G, Montagnese S, et al. Narcolepsy and effectiveness of gamma-hydroxybutyrate (GHB): a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 2012;16:431-43.
- Xu XM, Wei YD, Liu Y, et al. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) for narcolepsy in adults: an updated systematic review and meta-analysis. *Sleep Med* 2019;64:62-70.
- Tittarelli R, Pichini S, Pedersen DS, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of GHB, GHB-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of narcoleptic patients under sodium oxybate treatment. *Forensic Sci Int* 2017;274:70-4.
- Palatini P, Tedeschi L, Frison G, et al. Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1993;45:353-6.
- Brenneisen R, Elshohly MA, Murphy TP et al. Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *J Anal Toxicol* 2004;28:625-30.
- Abanades S, Farré M, Segura M et al. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1074:559-576.
- Marchei E, Tini A, Pirani F, et al. Is GHB-glucuronide useful as a biomarker for the exogenous use of GHB? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23:2311-3.
- Busardò FP, Bertol E, Mannocchi G et al. Determination of GHB levels in breast milk and correlation with blood concentrations. *Forensic Sci Int* 2016;265:172-81.
- Barker EC, Puchowicz M, Letterio J et al. GHB levels in breast milk of women with narcolepsy with cataplexy treated with sodium oxybate. *Sleep Med* 2017;36:172-7.
- Busardò FP, Pichini S. GHB concentration in breast milk of narcoleptic women treated with sodium oxybate. How important it is to be careful when interpreting values. *Sleep Med* 2017;40:129.
- Moresco M, Pizza F, Antelmi E, et al. Sodium oxybate treatment in pediatric type 1 narcolepsy. *Curr Drug Metab* 2018;19:1073-9.
- Mannucci C, Pichini S, Spagnolo EV, et al. Sodium oxybate therapy for alcohol withdrawal syndrome and keeping of alcohol abstinence. *Curr Drug Metab* 2018;19:1056-64.
- Jesse S, Bräthen G, Ferrara M, et al. Alcohol withdrawal syndrome: mechanisms, manifestations, and management. *Acta Neurol Scand* 2017;135:4-16.
- Williams D, McBride AJ. The drug treatment of alcohol withdrawal symptoms: a systematic review. *Alcohol* 1998;33:103-15.
- Kattimani S, Bharadwaj B. Clinical management of alcohol withdrawal: A systematic review. *Ind Psychiatry J* 2013;22:100-8.
- Koob GF. Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. *Handb Clin Neurol* 2014;125:33-54.
- Addolorato G, Balducci G, Capristo E et al. Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in the treatment of alcohol

- withdrawal syndrome: a randomized comparative study versus benzodiazepine. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1596-604.
36. Caputo F, Skala K, Mirijello A et al. Sodium oxybate in the treatment of alcohol withdrawal syndrome: a randomized double-blind comparative study versus oxazepam. The GATE 1 trial. *CNS Drugs* 2014;28:743-52.
37. Sinha R, Li CS. Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. *Drug Alcohol Review* 2007;26:25-31.
38. Gallimberti L, Ferri M, Ferrara SD, et al. gamma-Hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol dependence: a double-blind study. *Alcohol Clin Exp Res* 1992;16:673-6.
39. Caputo F, Addolorato G, Lorenzini F, et al. Gamma-hydroxybutyric acid versus naltrexone in maintaining alcohol abstinence: an open randomized comparative study. *Drug Alcohol Depend* 2003;70:85-91.
40. Nava F, Premi S, Manzato E, et al. Comparing treatments of alcoholism on craving and biochemical measures of alcohol consumptions. *J Psychoactive Drugs* 2006;38:211-7.
41. Caputo F, Addolorato G, Stoppo M et al. Alcohol Treatment Study Group. Comparing and combining gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and naltrexone in maintaining abstinence from alcohol: an open randomised comparative study. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007;17:781-9.
42. Stella L, Addolorato G, Rinaldi B et al. An open randomized study of the treatment of escitalopram alone and combined with gamma-hydroxybutyric acid and naltrexone in alcoholic patients. *Pharmacol Res* 2008;57:312-7.
43. de Jong CA, Kamal R, Dijkstra BA et al. Gamma-hydroxybutyrate detoxification by titration and tapering. *Eur Addict Res* 2012;18:40-45.
44. Dijkstra BA, Kamal R, van Noorden MS et al. Detoxification with titration and tapering in gamma-hydroxybutyrate (GHB) dependent patients: The Dutch GHB monitor project. *Drug Alcohol Depend* 2017;170:164-73.
45. Kantrowitz JT, Citrome L, Javitt DC. A review of tolerability and abuse liability of gamma-hydroxybutyric acid for insomnia in patients with schizophrenia. *Clin Ther* 2009;31:1360-73.
46. Schwartz TL. Gamma hydroxy butyric acid and sodium oxybate used to treat posttraumatic stress disorder. *CNS Spectr* 2007;12:884-6.
47. Berner JE. A case of sodium oxybate treatment of tardive dyskinesia and bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 2008;69:862.
48. Scharf MB, Baumann M, Berkowitz DV. The effects of sodium oxybate on clinical symptoms and sleep patterns in patients with fibromyalgia. *J Rheumatol* 2003;30:1070-4.
49. Ondo WG, Perkins T, Swick T, et al. Sodium oxybate for excessive daytime sleepiness in Parkinson disease: an open-label polysomnographic study. *Arch Neurol* 2008;65:1337-40.
50. Timby N, Eriksson A, Bostrom K. Gamma-hydroxybutyrate associated deaths. *Am J Med* 2000;108:518-9.
51. Busardò FP, Jones AW. Interpreting γ -hydroxybutyrate concentrations for clinical and forensic purposes. *Clin Toxicol (Phila)* 2019;57:149-63.
52. Brailsford AD, Cowan DA, Kicman AT. Pharmacokinetic properties of γ -hydroxybutyrate (GHB) in whole blood, serum, and urine. *J Anal Toxicol* 2012;36:88-95.
53. Davidson D, Hutchison K, Dagon C, et al. Assessing the stimulant effects of alcohol in humans. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72:151-6.
54. Heishman SJ, Arasteh K, Stitzer ML. Comparative effects of alcohol and marijuana on mood, memory, and performance. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:93-101.
55. Corkery JM, Loi B, Claridge H, et al. Gamma hydroxybutyrate (GHB), gamma butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD; BDO): A literature review with a focus on UK fatalities related to non-medical use. *Neurosci Biobehav Rev* 2015;53:52-78.
56. Teter CJ, Guthrie SK. A comprehensive review of MDMA and GHB: two common club drugs. *Pharmacotherapy* 2001;21:1486-513.
57. Busardò FP, Gottardi M, Tini A, et al. Replacing GHB with GBL in recreational settings: a new trend in chemsex. *Curr DrugMetab* 2018;19:1080-5.
58. Tini A, del Rio A. Has GBL replaced GHB in recreational settings? *Arh Hig Rada Toksikol* 2020;71:167-168.
59. Kugelberg FC, Holmgren A, Eklund A, et al. Forensic toxicology findings in deaths involving gamma-hydroxybutyrate. *Int J Legal Med* 2010;124:1-6.
60. Mccambridge J, Mitcheson L, Winstock A, et al. . Five year trends in patterns of drug use among people who use stimulants in dance contexts in the United Kingdom. *Addiction* 2005;100:1140-9.
61. Wood DM, Nicolaou M, Dargan PI. Epidemiology of recreational drug toxicity in a nightclub environment. *Subst Use Misuse* 2009;44:1495-502.
62. Talbert JJ. Club drugs: Coming to a patient near you. *Nurse Pract* 2014;39:25-6.
63. Brennan R, Van Hout MC. Gamma-hydroxybutyrate (GHB): a scoping review of pharmacology, toxicology, motives for use, and user groups. *J Psychoactive Drugs* 2014;46:243-51.
64. Busardò FP, Zaami S, Baglio G et al. Assessment of the stability of exogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) in stored blood and urine specimens. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19:4187-94.
65. Giorgetti R, Tagliabracci A, Schifano F et al. When "Chems" Meet Sex: A rising phenomenon called "ChemSex". *Curr Neuropharmacol* 2017;15:762-70.
66. Busardò FP, Pichini S, Zaami S et al. Hair testing of GHB: an everlasting issue in forensic toxicology. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:198-208.
67. Kyriakou C, Pellegrini M, Garcia-Algar O et al. Recent trends in analytical methods to determine new psychoactive substances in hair. *Curr Neuropharmacol* 2017;15: 663-81.
68. Busardò FP, Vaiano F, Mannocchi G et al. Twelve months monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault. *Drug Test Anal* 2017:953-6.
69. Jones AW, Holmgren A, Kugelberg FC et al. Relationship between postmortem urine and blood concentrations of GHB furnishes useful information to help interpret drug intoxication deaths. *J Anal Toxicol* 2018;42:587-91.
70. Kintz P, Villain M, Cirimele V et al. GHB in postmortem toxicology. Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens. *Forensic Sci Int* 2004;143:177-81.
71. Raknes G, Aronsen L, Fuskevåg OM. Urinary concentrations of gamma-hydroxybutyric acid and related compounds in pregnancy. *J Anal Toxicol* 2010;34:394-9.
72. Andresen H, Sprys N, Schmoltdt A, et al. Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations. *Forensic Sci Int* 2010;200:93-9.
73. Nishimura H, Moriya F, Hashimoto Y. Mechanism of gamma-hydroxybutyric acid production during the early postmortem period. *Forensic Toxicol* 2009;27:55-60.

74. Korb AS, Cooper G. Endogenous concentrations of GHB in post-mortem blood from deaths unrelated to GHB use. *J Anal Toxicol* 2014;38:582-8.
75. Biedermann A, Taroni F, Bozza S, et al. Critical analysis of forensic cut-offs and legal thresholds: A coherent approach to inference and decision. *Forensic Sci Int* 2018;288:72-80.
76. Andresen-Streichert H, Jensen P, Kietzerow J, et al. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in *post-mortem* specimens and further recommendation for interpretative cut-offs. *Int J Legal Med* 2015;129:57-68.
77. Busardo FP, Pichini S, Pellegrini M, et al. Correlation between blood and oral fluid psychoactive drug concentrations and cognitive impairment in driving under the influence of drugs. *Curr Neuropharmacol* 2018;16:84-96.
78. Jones AW, Holmgren A, Kugelberg FC. Driving under the influence of gamma-hydroxybutyrate (GHB). *Forensic Sci Med Pathol* 2008;4:205-11.
79. Liechti ME, Quednow BB, Liakoni E, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gamma-hydroxybutyrate in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2016;81:980-8.
80. Elliott SP. Further evidence for the presence of GHB in postmortem biological fluid: implications for the interpretation of findings. *J Anal Toxicol* 2004;28:20-6.
81. Busardò FP, Bertol E, Vaiano F, et al. Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples. *Forensic Sci Int*. 2014;243:144-8.
82. Busardò FP, Portelli F, Montana A et al. When a death apparently associated to sexual assault is instead a natural death due to idiopathic hypereosinophilic syndrome: The importance of gamma-hydroxybutyric acid analysis in vitreous humor. *Leg Med (Tokyo)* 2017;26:92-7.
83. Moriya F, Hashimoto Y. Site-dependent production of gamma-hydroxybutyric acid in the early postmortem period. *Forensic Sci Int* 2005;148:139-42.
84. Wang X, Linnert K, Johansen SS. Development of a UPLC-MS/MS method for determining gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. *Forensic Toxicol* 2016;34:51-60.
85. Kintz P, Cirimele V, Jamey C, et al. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J Forensic Sci* 2003;48:195-200.
86. Kintz P. A novel approach to document single exposure to GHB: hair analysis after sweat contamination. *J Anal Toxicol* 2016;40: 563-4.
87. Bertol E, Mari F, Vaiano F, et al. Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases. *Drug Test Anal* 2015;7:376-84.
88. Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int* 2004;142:127-34.
89. Castro AL, Tarelho S, Dias M, et al. Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the post mortem interval. *Int J Legal Med* 2016;130:959-65.
90. Ingels AS, Wille SM, Samyn, N et al. Screening and confirmation methods for GHB determination in biological fluids. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:3553-77.
91. De Paoli G, Walker KM, Pounder DJ et al. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid concentrations in saliva determined by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2011;35:148-52.
92. Marinetti LJ, Isenschmid DS, Hepler BR et al. Analysis of GHB and 4-methyl-GHB in postmortem matrices after long-term storage. *J Anal Toxicol* 2005;29:41-7.
93. Mazarr-Proo S, Kerrigan S. Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose. *J Anal Toxicol* 2005;29:398-400.
94. Stove CP, Ingels AS, Lambert WE. Quantitation of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots in newborn screening. *Mol Genet Metab* 2013;110:95.
95. Ingels AS, Lambert WE, Stove CP. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots using a simple GC-MS method with direct "on spot" derivatization. *Anal Bioanal Chem* 2010;398:2173-82.
96. Bertol E, Argo A, Procaccianti P et al. Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: Validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case. *J Pharm Biomed Anal* 2012;70:518-22.
97. Mion G, Tourtier JP, Diraison Y. Gamma-hydroxybutyric acid in hair. *N Engl J Med* 2006;354:96-7.
98. Goulle JP, Cheze M, Pepin G. Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J Anal Toxicol* 2003;27:574-80.
99. Grenier V, Huppe G, Lamarche M et al. Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices. *J Anal Toxicol* 2012;36:523-8.
100. Hasan L, Jermann TM, Weber JM et al. An enzymatic method to determine gamma-hydroxybutyric acid in serum and urine. *Ther Drug Monit* 2011;33:757-65.
101. Bravo DT, Harris DO, Parsons SM. Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *J Forensic Sci* 2004;49:379-87.
102. Gottardo R, Bortolotti F, Trettene M et al. Rapid and direct analysis of gamma-hydroxybutyric acid in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1051:207-11.
103. Baldacci A, Theurillat R, Caslavská J et al. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection and confirmation with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003;990:99-110.
104. Bortolotti F, De Paoli G, Gottardo R et al. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biological fluids by using capillary electrophoresis with indirect detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;800:239-44.
105. Lebeau MA, Montgomery MA, Miller ML et al. Analysis of biofluids for gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by headspace GC-FID and GC-MS. *J Anal Toxicol* 2000;24:421-8.
106. Couper FJ, Logan BK. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000;24:1-7.
107. Ingels AS, Neels H, Lambert WE et al. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biofluids using a one-step procedure with "in-vial" derivatization and headspace-trap gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013;1296:84-92.
108. Elian AA. GC-MS determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in blood. *Forensic Sci Int* 2001;122:43-7.
109. Blair S, Song M, Hall B et al. Determination of gamma-hydroxybutyrate in water and human urine by solid phase microextraction-gas chromatography quadrupole ion trap spectrometry. *J Forensic Sci* 2001;46:688-93.

110. Meyer MR, Weber AA, Maurer HH. A validated GC-MS procedure for fast, simple, and cost-effective quantification of glycols and GHB in human plasma and their identification in urine and plasma developed for emergency toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:411-4.
111. Dahl SR, Olsen KM, Strand DH. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4-BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;885:37-42.
112. Elian AA, Hackett J. Anion exchange SPE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in GHB analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;879:3752-8.
113. Sorensen LK, Hasselstrom JB. A hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of gamma-hydroxybutyrate and its precursors in forensic whole blood. *Forensic Sci Int* 2012;222:352-9.
114. Stout PA, Simons KD, Kerrigan S. Quantitative analysis of gamma-hydroxybutyrate at endogenous concentrations in hair using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Forensic Sci* 2010;55:531-7.
115. Johansen SS, Windberg CN. Simultaneous determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its analogues (GBL, 1,4-BD, GVL) in whole blood and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2011;35:8-14.
116. Kaufmann E, Alt A. Determination of GHB in urine and serum by LC/MS using a simple one-step derivative. *Forensic Sci Int* 2007;168:133-7.
117. Abanades S, Farré M, Segura M et al. Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2007;29:64-70.
118. Gentili S, Mortali C, Mastrobattista L, et al. Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers. *J Pharm Biomed Anal* 2016;129: 282-7.
119. Pichini S, Farré M, Abanades S et al. Immunomodulating properties of gamma-hydroxybutyrate (GHB), flunitrazepam and ethanol in 'club drugs' users. *Addict Biol* 2010;15:336-45.
120. Busardò FP, Kyriakou C, Marchei E et al. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. *J Pharm Biomed Anal* 2017;137:123-31.
121. Busardò FP, Mannocchi G, Giorgetti R et al. Stability of endogenous GHB in vitreous humor vs peripheral blood in dead bodies. *Forensic Sci Int* 2017;274:64-9.
122. Busardò FP, Pichini S. The everlasting issue of GHB cut-offs in biological samples: How important it is to be careful when interpreting values. *Forensic Sci Int* 2017;279: e14-e15.
123. Busardò FP, Kyriakou C. GHB in biological specimens: which cut-off levels should be taken into consideration in forensic toxicological investigation? *Recent Patent Biotechnol* 2014;8:206-14.
124. Pichini S, Marchei E, Pacifici R et al. Chemsex intoxication involving sildenafil as an adulterant of GHB. *Drug Test Anal* 2017;9:956-9.
125. Barbera N, Busardò FP, Indorato F, et al. The pathogenetic role of adulterants in 5 cases of drug addicts with a fatal outcome. *Forensic Sci Int* 2013;227:74-6.
126. Pellegrini M, Bolino G, Vari MR et al. A fatal chemsex case involving γ -butyrolactone and 4-methylethcathinone. *Drug Test Anal* 2019;11:1465-70.
127. Turcant A, Boels D, Helfer AG, et al. Acute combined poisoning with the new designer drug 4-methyl-N-ethylcathinone (4-MEC) and gammabutyrolactone (GBL): a case report with different analytical approaches for identification of some metabolites. *Toxicol Anal Clin* 2014;6:119-27.
128. Ameline A, Blanchot A, Arbouche N et al. Aspect toxicologique d'un phénomène en plein essor: le chemsex. Description d'un cas médico-légal aux conséquences fatales, impliquant la 4-MEC. Toxicological aspect of a booming phenomenon: Chemsex. Description of a fatal medico-legal case involving 4-MEC. *Rev Méd Lé* 2019;10:104-7.
129. Busardò FP, Gottardi M, Tini A et al. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry assay for determination of endogenous GHB and GHB-Glucuronide in nails. *Molecules* 2018;23:2686.
130. Busardò FP, Gottardi M, Pacifici R et al. Nails analysis for drugs used in the context of chemsex: A Pilot Study. *J Anal Toxicol* 2020;44:69-74.
131. Marinelli S, Berretta P, Pacifici R et al. Sex enhancers: challenges, threats and the need for targeted measures. *Clin Ter* 2019;170:e181-3.
132. Zaami S. New psychoactive substances: concerted efforts and common legislative answers for stemming a growing health hazard. *EurRevMed Pharmacol Sci* 2019;23:9681-90.

Il “Libro Bianco” dei Giovani Professionisti di Medicina di Laboratorio in Italia: risultati dell’indagine del Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists

Claudia Bellini¹, Serena Nannini², Margherita Berardi³, Andrea Mosca⁴, Sergio Bernardini^{5,6}, Giulia Sancesario^{7,8},
per il gruppo di Studio SIBioC Young Scientists

¹Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università di Siena

²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Microbiologiche, Ospedale S.Stefano, Prato

³Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA), Firenze

⁴Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano

⁵Biochimica Clinica e di Biologia Molecolare Clinica, Università di Roma Tor Vergata

⁶Società Italiana Biochimica Clinica, SIBioC

⁷Centro Risorse Biologiche, Biobanca, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

⁸Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, via del Fosso di Fiorano, Roma

ABSTRACT

“The white paper” of young Laboratory Medicine professionals in Italy: results from a survey by the SIBioC - Young Scientists Working Group

Introduction: Laboratory Medicine is continuously changing because of the advent of new technologies and perspectives, such as automation, Big Data and omics sciences. Professionals’ profiles are changing concurrently, developing the new technological, clinical and management skills required nowadays. In order to assess training needs as well as education and working conditions, the SIBioC Young Scientists Working Group (YS-WG) promoted a questionnaire directed to professionals ≤40 years old.

Methods: the questionnaire was prepared using Survey Monkey and was sent to the 587 SIBioC members ≤40 years old; it was also diffused via the YS-WG social media pages, and through personal e-mails with the help of Specialty School Offices. The questionnaire included 54 questions examining different aspects: participation in SIBioC activities, scientific interests, working conditions, evaluations of training and education experiences, expectations for the future professional life.

Results: during three months, 282 responses have been collected. The most represented professionals are Biologists (PhD) (46%), followed by Medical Doctors (24%). 33% of participants has an open-ended contract, 15% temporary, 17% freelance and 17% has a scholarship/research grant; 46% of them do not receive any remuneration. Around 60% work in public institutions (Universities or Hospitals); 52% are involved in clinical area, 29% in research. Residents’ evaluation on educational quality of Specialty Schools is rather heterogeneous. Among the 193 SIBioC members, 35% is actively participating in at least one of the society’s Working Group. Most of the participants are regular readers of the SIBioC official journal (Biochimica Clinica), consult LabTestsOnline web site, and participate to SIBioC scientific events and/or to the Society e-learning courses.

Conclusions: the results of the survey are a key point for the Society, allowing to understand the young laboratory professionals needs, so that they can be accompanied and encouraged in a full development of their future professional life.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni il panorama della Medicina di Laboratorio (MdL) è stato profondamente modificato dall’avvento di nuove tecnologie e da una spinta crescente verso l’automazione. Inoltre sono emerse

nuove opportunità di sviluppo come le scienze “omiche” e l’utilizzo dei Big Data (1). La diagnostica di laboratorio ha vissuto un’accelerazione non solo nella capacità di rispondere rapidamente e accuratamente alla necessità clinica, ma anche nello sviluppo di metodologie che incontrano nuove esigenze e permettono il progresso

Corrispondenza a: Claudia Bellini, Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università di Siena, E-mail claudia.bellini@dbm.unisi.it

Ricevuto: 20.03.2020

Revisionato: 23.03.2020

Accettato: 17.04.2020

Pubblicato on-line: 08.09.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.042

verso la medicina di precisione. I professionisti che operano nel campo della MdL hanno quindi conosciuto un cambiamento sia nelle attività da svolgere che nelle competenze richieste (2). Dall'appropriatezza della richiesta fino all'interpretazione dei risultati nel contesto clinico, tutte le attività devono essere attentamente pianificate e monitorate per rispondere a rigorosi standard di qualità. La norma di Accreditamento per i laboratori clinici ISO 15189 prevede come requisito cogente la valutazione delle competenze del personale, che deve essere adeguatamente formato e aggiornato (3). Nell'ottica di favorire il reciproco riconoscimento delle qualifiche professionali nell'ambito dell'Unione Europea, sono stati definiti i requisiti essenziali per la formazione e l'addestramento post-laurea degli specialisti in MdL all'interno del Syllabus della European Federation of Laboratory Medicine (EFLM) (4-6).

In questo contesto in rapida evoluzione, è importante soprattutto per i giovani professionisti saper cavalcare le onde di questi cambiamenti, sviluppando le competenze necessarie in ambito scientifico, clinico, tecnologico e manageriale e cercare di modificare il proprio percorso in base alle richieste specifiche (7). Nel 2017 è stato istituito il Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists (GdS-YS), con lo scopo di favorire la formazione e la crescita professionale dei giovani e la condivisione di esperienze attraverso la creazione di una rete di professionisti. Il gruppo raccoglie circa 100 giovani soci SIBioC, italiani e non, che lavorano in Italia o all'estero, e ha promosso una serie di iniziative a carattere scientifico in collaborazione con la Task Force "Young Scientists" di IFCC (8,9).

Nel tempo, è emersa la necessità di avere una fotografia il più possibile ampia e chiara su quali siano i reali profili dei giovani professionisti della MdL, sui principali percorsi formativo-professionali, e su quali competenze possano essere considerate determinanti nel favorire l'affermazione professionale. A questo scopo, il GdS-YS ha promosso un questionario rivolto ai giovani di età inferiore ai 40 anni, con l'obiettivo di valutare i percorsi formativi e la condizione lavorativa di questi professionisti, nonché le aspettative dei giovani ancora in formazione presso le Scuole di Specializzazione o Dottorato di Ricerca (10). I risultati di questa indagine, interna alla SIBioC, ma estesa anche ai giovani non soci, rappresentano una sorta di "Libro Bianco" dei giovani professionisti della MdL ed il punto di partenza per un processo di miglioramento della condizione di questi professionisti sia durante la formazione che all'inizio e durante lo sviluppo della carriera lavorativa.

METODI

Nella redazione delle domande l'attenzione è stata posta sulla rilevazione dei contenuti professionali ritenuti più importanti e sulle criticità nei percorsi di formazione e di introduzione nel mondo del lavoro, tenendo conto delle differenze tra le diverse figure

professionali del settore.

Il questionario, composto da 54 domande, è suddiviso in 7 sezioni:

- Anagrafica/Generalità (6 domande): raccoglie i dati anagrafici e i titoli di studio per delineare i profili di formazione e professionali, nonché la distribuzione geografica e anagrafica dei partecipanti.
- SIBioC: attività e opportunità societarie (9 domande): compilabile solo dai soci SIBioC, per verificare il grado di conoscenza della Società, delle attività da essa proposte e valutare quanto i giovani si sentano coinvolti all'interno della stessa.
- Interessi/Competenze/Attività Professionali (9 domande): indaga le aree di competenza/interesse professionale e la produttività scientifica individuale.
- Condizione Lavorativa (6 domande): si focalizza sulle opportunità lavorative per i giovani nel settore pubblico e privato, sulle tipologie di contratto prevalenti e sulle competenze ritenute necessarie dai giovani.
- Giovani Professionisti Specializzati e Specializzandi (quinta e sesta sezione: rispettivamente 9 e 10 domande): esplorano il percorso formativo affrontato (specialisti) o in atto (specializzandi), analizzandone le caratteristiche principali e chiedendo ai partecipanti una valutazione complessiva, con eventuali proposte di miglioramento.
- Grado di soddisfazione e percezione del proprio futuro (5 domande): indaga il livello di soddisfazione professionale ed evidenzia le aspettative future dei giovani intervistati.

Il questionario è stato elaborato utilizzando SurveyMonkey (SurveyMonkey Inc.) e diffuso attraverso la mailing list della Società a tutti i soci SIBioC di età inferiore ai 40 anni, ed agli specializzandi grazie alla collaborazione dei Direttori delle Scuole di Specializzazione italiane. Inoltre, per favorire la massima diffusione tra gli operatori del settore esterni alla Società, il questionario è stato proposto anche attraverso i canali social del GdS-YS (in particolare sulle pagine Facebook e Instagram "Young SIBioC" e sulla pagina Twitter "LabTestsOnline"). I dati sono stati raccolti nel periodo febbraio-maggio 2019. L'elaborazione è stata eseguita con i software gestionali forniti dalla piattaforma SurveyMonkey e con Microsoft Excel.

RISULTATI

Anagrafica/Generalità

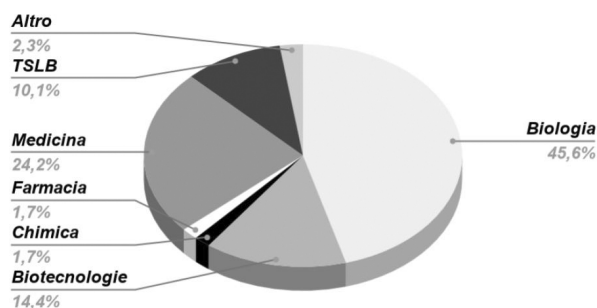
Sono state raccolte in totale 282 risposte. La maggior parte dei partecipanti ha un'età compresa tra i 31 e 35 anni (46%) e tra i 36 e 41 anni (32%), mentre i giovani <30 anni sono solo il 22%. In tutte le tre categorie, le donne rappresentano la maggioranza rispetto agli uomini (70%). Sono pervenute risposte in modo eterogeneo da tutte le regioni, intese come sede di lavoro o studio, ad eccezione della Valle

d'Aosta; si evidenzia che più del 50% delle risposte proviene da tre regioni, Toscana, Lombardia e Campania (Tabella 1). Abbiamo considerato il percorso universitario del campione preso in esame (Figura 1). Circa la metà dei partecipanti (51%) ha conseguito la laurea da 5-10 anni, mentre le due restanti categorie (<5 anni e >10 anni) sono equamente rappresentate. Analizzando le percentuali delle tre categorie sulla base del titolo di studio, si nota come vi sia tra i più giovani un incremento dei laureati in Medicina e una diminuzione dei Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico (TSLB) e dei laureati in Biotecnologie (Tabella 2).

Tabella 1

Distribuzione geografica per Regione della sede di lavoro o di studio.

Regione	No.	%
Toscana	58	20,6%
Lombardia	53	18,8%
Campania	34	12,1%
Lazio	23	8,2%
Veneto	21	7,4%
Puglia	17	6,0%
Piemonte	11	3,9%
Abruzzo	10	3,5%
Emilia Romagna	10	3,5%
Marche	10	3,5%
Sardegna	9	3,2%
Sicilia	7	2,5%
Calabria	4	1,4%
Molise	4	1,4%
Basilicata	3	1,1%
Liguria	3	1,1%
Trentino Alto-Adige	3	1,1%
Friuli Venezia Giulia	1	0,4%
Umbria	1	0,4%
Valle d'Aosta	0	0,0%

**Figura 1**

Distribuzione del campione per titolo di Laurea.

TSLB, Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico.

Tabella 2

Distribuzione del campione per anzianità associata al titolo di Laurea.

Laurea conseguita da	Titolo di Laurea			
	Biologia	Medicina	TSLB	Biotecnologie
Meno di 5 anni	20%	40%	5%	10%
Tra 5 e 10 anni	60%	50%	60%	60%
Più di 10 anni	20%	10%	35%	30%

TSLB, Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico.

SIBioC: attività e opportunità societarie

Tra gli intervistati, oltre due terzi sono Soci SIBioC (n=193; 68%), di cui la maggioranza (70%) ha conosciuto la società tramite colleghi, superiori o professori; il 13% tramite eventi/congressi di ambito sanitario, il 10% attraverso internet o i social media. Il 70% ha partecipato ad almeno un corso SIBioC di Formazione a Distanza (FAD) e/o Residenziale nell'ultimo anno, consulta abitualmente la rivista societaria "Biochimica Clinica" e conosce il sito LabTestOnline. Per valutare il coinvolgimento e la percezione da parte dei giovani soci della Società scientifica, è stato proposto il seguente quesito specifico: "Conosci le opportunità per i giovani all'interno della società (InnovaSIBioC, GdS YS, premi ecc.)?". Il 27% dei giovani soci ha risposto positivamente e ha partecipato anche a qualche iniziativa, il 44% ne ha sentito parlare, mentre il 29% non ne è a conoscenza.

Tra i giovani soci, il 35% è iscritto ad almeno un gruppo di studio; di questi, 40 soci hanno aderito al GdS SIBioC Young Scientists, mentre gli altri sono distribuiti in modo variabile negli altri GdS, con presenze da 1 a 8 in alcuni gruppi.

Riguardo le aspettative e necessità espresse dal campione preso in esame, il 39% dei partecipanti auspicherebbe un "Sostegno nella collocazione lavorativa" da parte della Società, il 36% ritiene utile l'organizzazione di "Corsi di formazione mirati", il 22% si aspetta un "Maggiore coinvolgimento nei gruppi di studio" per favorire una preparazione maggiormente specialistica in settori chiave della MdL. Circa la metà si sente coinvolta "Poco" (24%) o "Molto Poco" (33,9%), mentre il 30,1% si sente "Abbastanza" coinvolto, "Molto" (9,3%) o "Moltissimo" (2,7%) nelle attività societarie.

Interessi/Competenze/Attività Professionali

Questa sezione, aperta a tutti i partecipanti al sondaggio, è stata compilata dalla grande maggioranza dei partecipanti (262 su 282). Come si evince dalla Tabella 3, che riassume questi dati, sono stati inclusi i principali settori della Medicina di Laboratorio, le tecnologie emergenti, gli aspetti normativi e bioetici, dando la possibilità di esprimere

Tabella 3*Aree di competenza e/o interesse.*

Area di Competenza e/o Interesse (selezionabili più risposte)	No.	%
Proteine	86	7,1%
Tumori e marcatori di neoplasia	79	6,5%
Emostasi e trombosi	78	6,4%
Urine	77	6,3%
Controllo di qualità, Valutazione esterna di qualità	75	6,2%
Immunometria	70	5,8%
Genetica, farmacogenetica, citogenetica	67	5,5%
Autoimmunità	62	5,1%
Emergenza/Urgenza	56	4,6%
Ormoni e endocrinologia	56	4,6%
Citometria a flusso	48	3,9%
Lipidi, lipoproteine, metabolismo	48	3,9%
Enzimi	40	3,3%
Tossicologia	40	3,3%
Spettrometria di massa	38	3,1%
Norme di certificazione e accreditamento	33	2,7%
Diabete	31	2,5%
Elettroliti	31	2,5%
Informatica, matematica, statistica, bioinformatica	28	2,3%
POCT	26	2,1%
Medicina basata sulle evidenze e linee guida	24	2,0%
Aspetti legislativi e normativi della professione	22	1,8%
Metabolismo osseo	22	1,8%
Ematologia	15	1,2%
Standardizzazione, metrologia	15	1,2%
Emogasanalisi	11	0,9%
Sicurezza del paziente e fase extra analitica	10	0,8%
Biologia Molecolare	6	0,5%
Etica	6	0,5%
Microbiologia	6	0,5%
Immunoematologia/Medicina TrASFusionale	4	0,3%
Sierologia	3	0,2%
Allergologia	2	0,2%
Citologia	1	0,1%

POCT, point of care test. Più scelte selezionabili.

preferenze multiple. Come indicatore di multidisciplinarietà ed internazionalizzazione dei giovani, è importante osservare che 63 fra i partecipanti sono soci anche di altre di Società Scientifiche Nazionali o Internazionali, sia relative alla Medicina di Laboratorio, che ad altre discipline cliniche.

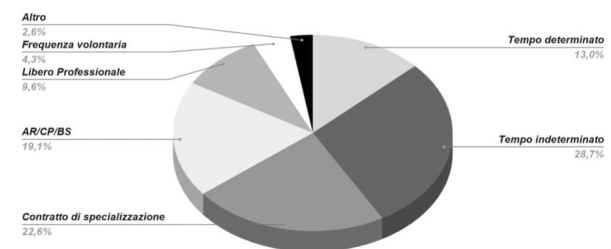
Il 46% dei partecipanti ha prodotto nell'ultimo anno almeno una pubblicazione su una rivista scientifica e il 62% ha presentato almeno un poster o una comunicazione orale ad un Convegno Scientifico.

Solo il 27% ha partecipato al precedente Congresso Nazionale SIBioC (Napoli, 16-18 Ottobre

2018), di cui 2/3 usufruendo di una sponsorizzazione totale o parziale fornita dall'università (36%), direttamente da un'azienda (24%), tramite MedTech (18%), grazie al programma SIBioC per i giovani (16%) o ad altre modalità (6%). Fra coloro che invece non hanno partecipato al congresso (73%), il 49% ha motivato l'assenza per questioni lavorative, il 32% per mancanza di sponsorizzazione o per un costo troppo elevato, mentre il restante 19% per motivi personali.

Condizione lavorativa

Quasi tutti i giovani intervistati prestano servizio, anche con contratto di formazione specialistica, in ambito sanitario (95%). La maggior parte lavora in strutture pubbliche (65%), ospedaliere territoriali o ospedaliero-universitarie, mentre il 22% è occupato presso ospedali, case di cura o laboratori privati. Il 7% lavora all'interno di Università e poco più del 3% presso aziende private del settore sanitario. Le tipologie di contratto sono per la maggior parte a tempo determinato (Figura 2).

**Figura 2***Distribuzione dei partecipanti per tipologia di contratto.**AR, assegno di ricerca; CP, contratto a progetto; BS, borsa di studio.*

Il 15% del campione ha conseguito il Dottorato di Ricerca e il 4% frequenta attualmente una Scuola di Dottorato. In questo ultimo gruppo erano presenti 25 biologi, 16 biotecnologi, 1 chimico e 4 medici. La maggioranza degli intervistati (80%) ha scelto di conseguire la Specializzazione in un ambito della Medicina di Laboratorio; di questi, il 30% è attualmente in formazione specialistica. In Tabella 4 sono riportate le risposte relative alle competenze ritenute più utili nella attuale posizione lavorativa (era possibile selezionare una sola risposta). Si evidenzia che le competenze considerate più frequentemente determinanti per favorire una inclusione nel lavoro sono nel settore dell'ematologia e nel campo delle nuove tecnologie, come la biologia molecolare, la spettrometria di massa e la Next Generation Sequencing (NGS).

Tabella 4*Competenze ritenute utili rispetto alla posizione lavorativa.*

Quali competenze ritieni siano più utili per la tua attuale posizione lavorativa? (una sola risposta selezionabile)	No.	%
Ematologia	57	22,6%
Biologia Molecolare, Spettrometria di Massa, NGS	55	21,8%
Microscopia (ottica, immunofluorescenza...)	17	6,7%
Proteine	16	6,3%
Analisi Statistica	15	5,9%
Immunometria	15	5,9%
Microbiologia	13	5,1%
Citofluorimetria	11	4,3%
Farmacotossicologia	11	4,3%
Analisi Big Data	9	3,5%
Sierologia	9	3,5%
Omics	7	2,7%
Cromatografia	2	0,7%
Enzimologia	1	0,4%

NGS, next generation sequencing.

Giovani Professionisti Specializzati

La Sezione Specialisti ha interessato 124 partecipanti: 74 biologi, 16 biotecnologi, 4 chimici, 2 farmacisti e 28 medici. La maggioranza (85%) ha conseguito la Specializzazione in Patologia Clinica e Biochimica Clinica (ed equipollenti), l'8% in Microbiologia e Virologia e i restanti in altre Specialità (Genetica Medica, Medicina Interna, Oncologia, Medicina Generale, Scienza dell'Alimentazione). Il 40% ha concluso il corso meno di due anni fa, il 40% da 2-5 anni e il 20% da più di 5 anni. Ai giovani specializzati è stato chiesto di valutare la propria formazione, attribuendo un punteggio alla qualità del percorso svolto (Tabella 5) e nel dettaglio esprimere una o più preferenze su quali aspetti migliorare, come ad esempio la partecipazione attiva alla produzione del referto e l'interazione con i clinici ("attività clinica"); l'opportunità di fare esperienza nelle diverse sezioni diagnostiche, indicata come "possibilità di ruotare nei settori" (ematologia, coagulazione, chimica clinica, urine, ...); il "tutoraggio" oppure "corsi più mirati sulla medicina di laboratorio". Nella voce "altro" è stata suggerita più volte una maggiore sinergia tra le attività teoriche e quelle pratiche e una maggiore interazione con altri laboratori (anche non di Biochimica Clinica), per favorire una maggiore versatilità nella futura collocazione lavorativa, oltre a una maggiore conoscenza sulle tecnologie più innovative.

Circa la metà ha percepito una retribuzione durante il periodo della formazione specialistica attraverso un contratto legato alla Scuola oppure borse di studio e/o partecipazione a progetti (Tabella 6).

Tabella 5*Valutazione del percorso formativo e proposte per il miglioramento nelle Scuole di Specializzazione (solo Specialisti).*

Come valuti il tuo percorso formativo da specializzando?	No.	%
Ottimo	14	11%
Buono	34	27%
Intermedio	38	31%
Scarso	25	20%
Molto scarso	13	11%
Totale	124	100%

Cosa miglioreresti nella formazione? (selezionabili più risposte)	No.	%
Migliore tutoraggio	34	15%
Maggiore coinvolgimento nell'attività clinica	63	27%
Maggiore possibilità di ruotare nei settori	63	27%
Corsi più mirati sulla Medicina di Laboratorio	66	28%
Altro	8	3%
Totale	234	100%

Tabella 6*Forme di retribuzione durante il periodo di formazione specialistica (solo Specialisti).*

Hai percepito uno stipendio durante la specializzazione?	No.	%
No	56	46%
Sì tramite contratti a progetto, borse di studio, assegni di ricerca ecc...	38	31%
Sì, avevo un contratto di specializzazione retribuito	28	23%
Totale	122	100%

La ricerca di un impiego dopo la specializzazione, ha visto i giovani Specialisti agire su più fronti contemporaneamente (in questa domanda erano selezionabili più caselle): concorsi per la dirigenza sanitaria (44%), laboratori privati (26%), bandi per la ricerca (13%), bandi per il dottorato di ricerca (10%), aziende private del settore (7%). Il 77% ha partecipato almeno una volta ad un concorso per la dirigenza sanitaria. Tra questi il 36% è riuscito ad accedere ad una graduatoria per un contratto a tempo indeterminato, il 34% in una per il tempo determinato e il 30% non è risultato idoneo. Di coloro che invece hanno dichiarato di non aver mai partecipato ad un concorso per la dirigenza sanitaria (23%), il 70% ha dichiarato che "non sono stati banditi concorsi nella regione/zona di interesse", il 17% ha un altro contratto in corso e il 6% ha ritenuto i bandi troppo specifici.

Specializzandi

La sezione dedicata ai giovani specializzandi ha interessato 76 partecipanti: 32 medici, 29 biologi, 13 biotecnologi, 1 chimico, 1 farmacista. La maggior parte (95%) frequenta la Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica e Biochimica Clinica, mentre il restante 5% si divide tra Microbiologia e Virologia e Genetica Medica. Gli Specializzandi che hanno partecipato all'indagine, frequentano per lo più il primo (24%) o il secondo anno (49%) di corso, mentre un numero inferiore frequenta gli anni successivi. La valutazione del proprio percorso di formazione mostra giudizi eterogenei, sia riguardo la soddisfazione generale sulla propria Scuola di Specializzazione, che rispetto ai contenuti e modalità di svolgimento dei corsi ed il giudizio sul tutoraggio (Tabella 7).

Tabella 7

Valutazione degli Specializzandi sulla formazione specialistica.

Come giudichi la tua scuola di specializzazione?	No.	%
Ottima	6	8%
Buona	19	25%
Intermedia	27	36%
Scarsa	19	25%
Pessima	4	6%
Totale	75	100%

Quanto sei soddisfatto dei contenuti/ modalità di svolgimento dei corsi?	No.	%
Moltissimo	7	9%
Molto	10	14%
Abbastanza	21	28%
Poco	17	23%
Molto Poco	19	26%
Totale	74	100%

Quanto sei soddisfatto del livello di tutoraggio?	No.	%
Moltissimo	14	19%
Molto	13	17%
Abbastanza	16	21%
Poco	23	31%
Molto Poco	9	12%
Totale	75	100%

La valutazione dell'esperienza di tirocinio durante la formazione specialistica, relativamente alla attività professionalizzante nelle varie discipline e ai compiti dello specializzando nelle attività del laboratorio mostra una partecipazione attiva nella maggior parte dei casi, estesa ai diversi settori della MdL, mentre le differenze principali si osservano riguardo alla partecipazione all'attività clinica (Tabella 8).

Tabella 8

Esperienze di tirocinio degli Specializzandi.

Durante il tirocinio, hai avuto modo di frequentare e conoscere vari settori diagnostici nei quali è suddiviso il Laboratorio ?	No.	%
Sì, apprendendo i principali aspetti di ciascun settore	42	59%
Sì, ma con assegnazione prevalente in un solo settore	23	32%
No	6	9%
Totale	71	100%

Che tipo di partecipazione ti è possibile? (selezionabili più caselle)	No.	%
Partecipazione attiva nell'attività clinica	51	52%
Partecipazione attiva nell'attività di ricerca	29	29%
Solo come osservatore	19	19%
Totale	99	100%

Se partecipi attivamente all'attività clinica, con che ruolo? (selezionabili più caselle)	No.	%
Esecuzione degli esami diagnostici ma senza validazione	34	37%
Esecuzione e validazione tecnica	28	30%
Validazione clinica	20	21%
Controllo di qualità	11	12%
Totale	93	100%

Riguardo le forme di retribuzione degli Specializzandi, il 41% ha un contratto di Specializzazione retribuito, il 25% ha un assegno di ricerca, una borsa di studio o un contratto libero professionale, mentre il 31% non percepisce alcuna forma di retribuzione, il 3% riceve un compenso attraverso altre fonti non legate alla Scuola di Specializzazione.

L'ultima domanda rivolta agli specializzandi ha voluto indagare le ambizioni e le aspettative professionali: "Cosa preferiresti fare dopo la Specializzazione?". Il 63% degli attuali specializzandi ambisce a lavorare nel Servizio Sanitario Nazionale, l'11% vorrebbe proseguire gli studi conseguendo il Dottorato, l'8% vorrebbe lavorare in ambito accademico, il 5% preferirebbe un laboratorio privato, il 4% il mercato dei diagnostici, mentre il 9% ha altre prospettive (conseguire una seconda Specializzazione o il Diploma di Formazione Specifica in Medicina Generale; lavorare con Organizzazioni Non Governative in ambito sanitario; lavorare nelle Forze Armate).

Grado di soddisfazione e percezione del futuro

L'ultima sezione del questionario era accessibile a tutti i partecipanti ed è stata compilata da 243 giovani. Il grado di soddisfazione percepito in relazione alla

posizione lavorativa attuale, si colloca nella maggior parte dei casi ad un livello intermedio o molto buono. La maggior parte dei giovani ha un grado di fiducia nel futuro professionale intermedio o buono, mentre solo un terzo ha scarsa fiducia (Tabella 9).

Alla domanda "Con quale tipo di contratto ti immagini tra 5 anni?", 161 giovani (66%) si vedono con un contratto a tempo indeterminato, 41 (17%) con uno a tempo determinato, 14 (6%) con un contratto libero-professionale, 12 (5%) senza alcun tipo di contratto in ambito sanitario, 8 (4%) con una borsa di studio/assegno di ricerca/contratto a progetto. Per quanto riguarda la sede lavorativa, 143 (59%) immaginano di lavorare ancora nella attuale sede/regione, 31 (13%) in un'altra sede/regione, 59 (24%) non sanno ancora dove preferirebbero lavorare, mentre 10 (4%) vorrebbero fare una esperienza lavorativa all'estero.

Al termine del questionario era presente uno spazio per rilasciare dei commenti liberi: diversi giovani auspicano che questa indagine possa essere un primo passo verso un miglioramento delle condizioni e prospettive lavorative ed anche dell'offerta formativa.

Tabella 9

Risultati relativi alla soddisfazione dei giovani alle aspettative future.

Quanto sei soddisfatto della tua attuale posizione?	No.	%
Moltissimo	21	8%
Molto	55	23%
Abbastanza	86	35%
Poco	43	18%
Molto Poco	38	16%
Totale	243	100%

Come giudichi il tuo grado di fiducia nel futuro (professionale)?	No.	%
Ottimo	16	7%
Buono	57	23%
Intermedio	80	33%
Scarso	46	19%
Molto Scarso	44	18%
Totale	243	100%

DISCUSSIONE

Il questionario ha avuto un buon riscontro di interesse rispetto agli argomenti presi in esame, testimoniato dalla numerosità di risposte. Il questionario è stato divulgato tramite newsletter a 587 indirizzi, corrispondenti al totale dei soci SIBioC di età inferiore o uguale a 40 anni, di cui il 30% ha partecipato attivamente (193 risposte). 89 risposte sono state ottenute attraverso la diffusione presso le Scuole di Specializzazione o la risonanza sui Social

Networks. Il campione è rappresentativo di una porzione dei giovani, e questo sottolinea la necessità di incrementare le iniziative di divulgazione e promozione della partecipazione a sostegno dei giovani soci.

SIBioC e le attività societarie formative e associative, comprese quelle specifiche per i giovani, sono ben conosciute e frequentate. Il modo più frequente di iscrizione alla Società è attraverso colleghi, quindi tramite esperienza diretta: questo è un successo per la Società Scientifica in quanto ciascun socio è chiamato a promuovere la società e le attività da essa proposte (11). I giovani partecipano agli eventi formativi SIBioC, ai GdS e alle opportunità di SIBioC per i giovani, consultano la rivista della Società e LabTestsOnline. Ciononostante la maggioranza di loro non si sente particolarmente coinvolta nelle attività societarie. Come spunti di miglioramento, dal questionario emerge che i giovani si aspettano dalla Società Scientifica, in ordine di priorità, un maggiore sostegno nella collocazione lavorativa, corsi di formazione più mirati e maggiore coinvolgimento nei GdS. Tuttavia, il sostegno nella collocazione lavorativa, che emerge come problematica tra i giovani intervistati, non rientra generalmente tra i principali scopi delle società scientifiche, che si occupano primariamente di migliorare la preparazione culturale dei soci, di fornire supporto alla formazione e all'aggiornamento professionale e di promuovere la ricerca scientifica.

Molti sono iscritti anche ad altre Società Scientifiche Nazionali e Internazionali e tale vivacità culturale è confermata anche dalla partecipazione attiva ai congressi, con presentazione di poster e comunicazioni orali, e dal contributo al progresso scientifico, testimoniato dalla produzione di articoli su riviste (50% dei partecipanti).

I giovani professionisti hanno confermato il cambiamento negli interessi e nelle competenze in linea con le tendenze attuali, dando rilevanza non solo alle discipline classiche della MdL (ematologia, diagnostica proteica, marcatori tumorali, emostasi e urine), ma anche ad altri aspetti importanti come il miglioramento della qualità, i sistemi di accreditamento e le tecnologie innovative (biologia molecolare, Next Generation Sequencing, spettrometria di massa).

La condizione lavorativa generale è discreta, sebbene si evidenzia che solo un terzo dei partecipanti (anche fra quelli di età superiore a 35 anni) lavora con un contratto a tempo indeterminato, mentre una buona parte di giovani si trova in condizioni di precarietà lavorativa.

Il giudizio sulle Scuole di Specializzazione è molto eterogeneo sia nel gruppo degli Specialisti che in quello degli Specializzandi, segno di una non completa soddisfazione generale nel percorso affrontato che riflette differenze a livello didattico ed organizzativo. Per gli Specialisti, gli aspetti da migliorare sono legati alle lezioni, ritenute poco mirate

alla professione, alla scarsa possibilità di rotazione nei vari settori diagnostici del Laboratorio e di partecipazione nell'attività clinica, mentre un numero minore chiede un miglioramento nel tutoraggio. Anche gli Specializzandi attuali sono poco soddisfatti dei corsi, ma affermano di poter frequentare diverse tipologie di laboratori (Biochimica Clinica, Microbiologia, Diagnostica Molecolare), di partecipare alla produzione del referto, anche se solo il 22% partecipa alla validazione clinica del dato. Permangono disparità nelle possibilità di accesso a contratti o borse di studio durante la formazione, in quanto il 46% degli Specialisti e il 31% degli Specializzandi dichiara di aver affrontato o di affrontare il percorso di Specializzazione senza alcuna forma di retribuzione.

La maggioranza degli intervistati che sta frequentando un corso di Specializzazione vorrebbe trovare un impiego nel Servizio Sanitario Nazionale. Tra i giovani specializzati, la maggioranza ha partecipato ad almeno un concorso per la Dirigenza Sanitaria, ma la ricerca di lavoro si è diversificata anche su bandi per la ricerca, sulla sanità privata e su aziende del settore.

L'ultima sezione del questionario, che indagava il grado di soddisfazione lavorativa e di fiducia nel futuro, ha evidenziato che la maggioranza dei partecipanti è abbastanza soddisfatta della attuale posizione lavorativa. Il 63% dei giovani ha una fiducia intermedio-alta nel futuro professionale e quasi il 70% immagina se stesso con un contratto a tempo indeterminato in un lasso di tempo di 5 anni, principalmente nella propria sede/regione di attività attuale.

Nella sezione specializzandi dobbiamo sottolineare come la maggior parte dei partecipanti appartenga al primo o secondo anno di corso per cui è possibile che abbia una visione non completa del proprio percorso, anche se può comunque riportare la propria esperienza: questo probabilmente è legato non tanto ad una scarsa partecipazione al questionario degli specializzandi degli anni successivi ma ad una effettiva maggiore numerosità degli iscritti ai primi anni, dovuta sia alla riapertura dei bandi di concorso per l'accesso alle Scuole di Specializzazione di indirizzo tecnico, sia ad una certa percentuale di abbandono della Specialità da parte di medici che scelgono indirizzi differenti.

CONCLUSIONI

L'indagine ha messo in evidenza alcuni aspetti della situazione formativa e professionale dei giovani specialisti di MdL, il rapporto con SIBioC, le loro aspettative e la percezione del futuro. I risultati di questa indagine, oltre a costituire un "Libro Bianco" del Professionista di MdL, rappresentano il punto di partenza per stimolare ed accompagnare la crescita dei giovani nella Medicina di Laboratorio degli anni futuri.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare la Società Biomedica, Claudia Agosta e Federica Vergani per il supporto nella divulgazione della Newsletter e nella elaborazione dei dati.

Questo lavoro è dedicato alla memoria del compianto Prof. Giorgio Federici.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Manrai AK, Patel CJ, Ioannidis JPA. In the era of precision medicine and big data, who is normal? *JAMA* 2018;319:1981-2.
2. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019;489:49-52.
3. International Organization for Standardization. ISO 15189:2012: Medical laboratories: particular requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2012. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-3:v2:en> (ultimo accesso: aprile 2020).
4. Mosca A, Graziani MS. Il Syllabus di EFLM per la formazione post-laurea dei professionisti Europei: una preziosa opportunità per la definizione a livello europeo dello Specialista in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2018;42:189-90.
5. Jassam N, Lake J, Dabrowska M, et al. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 – 2018. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1846-63.
6. Jassam N, Lake J, Dabrowska M, et al. Il Syllabus EFLM per la formazione post-laurea per specialisti in Medicina di Laboratorio: versione n 5 (2018). *Biochim Clin* 2018;42:247-62.
7. Zerah S, McMurray J, Horvath AR. Our profession now has a European name: specialist in laboratory medicine. *Biochem Med (Zagreb)* 2012;22:272-3.
8. Sancesario G, Perrone MA, Pellegrini C, et al. La medicina di laboratorio: gli specialisti di domani. *Biochim Clin* 2019;43:424-34.
9. Sancesario G, Perrone MA, Aita A, et al. Education and training for young scientists: Two years' experience of the Italian Society of Clinical Chemistry Young Scientists Working Group (SIBIOC YS-WG). *Clin Chim Acta* 2019;493:S311-6.
10. Bellini C, Berardi M, Nannini S et al. Il "libro bianco" dei giovani professionisti di medicina di laboratorio: risultati dell'indagine del gruppo di studio (GdS) SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2018;43:S141.
11. Statuto SIBioC - Medicina di Laboratorio (Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica. <https://www.sibioc.it/go/chisiamo/11/sibioc/Statuto> (ultimo accesso: aprile 2020).

Polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2*: rischio di cancro alla prostata, aggressività della neoplasia e livelli sierici dell'Antigene Prostatico-Specifico

Dania Bozzato¹, Carlo-Federico Zambon², Andrea Padoan¹, Michela Pelloso³, Ada Aita³, Stefania Moz¹, Filippo Navaglia³, Tommaso Prayer Galetti⁴, Filiberto Zattoni⁴, Daniela Basso¹, Mario Plebani¹

¹Dipartimento di Medicina e Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università di Padova, Italia

²Dipartimento di Scienze Biomediche e Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università di Padova, Italia

³Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università di Padova, Italia

⁴Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche, Università di Padova, Italia

ABSTRACT

Polymorphisms of *KLK3*, *RASA1* and *NAALADL2* genes: prostate cancer risk, aggressiveness of neoplasia and serum PSA levels.

Background: prostate cancer (Pca) is the second most common cancer among men and the sixth leading cause of death due to cancer among men worldwide. We aimed to verify if serum PSA levels and Pca risk/aggressiveness are modulated by polymorphisms of *KLK3*, *RASA1* and *NAALADL2* genes.

Methods: 1058 men have been studied; they consecutively underwent prostate biopsy for clinical suspicion of Pca. Pca was histologically diagnosed in 401 and ruled out in 657 men. Gleason score in Pca patients was ≤ 6 in 261, 7 in 83 and >7 in the remaining 57 Pca. tPSA and f/tPSA levels were determined. Four polymorphisms were studied: rs35148638 (*RASA1*), rs78943174 (*NAALADL2*), rs2735839 and rs17632542 (*KLK3*).

Results: Pca diagnosis was significantly predicted by the *KLK3* rs17632542 polymorphism ($p < 0.001$), tPSA ($p < 0.001$) and f/tPSA ($p < 0.001$). Carriers of the *KLK3* rs17632542C rare allele had a significantly higher risk of Pca ($p < 0.001$) (OR 2.1, 95% CI 1.40-3.19). Gleason score >7 was associated with increased tPSA ($p < 0.001$), decreased f/tPSA ($p = 0.003$) and the *KLK3* rs2735839 A rare allele ($p = 0.004$). In controls, tPSA was significantly lower in subjects bearing *NAALADL2* rs78943174T rare allele ($p = 0.029$). f/tPSA was higher in subjects with the *KLK3* rs17632542C rare allele ($p < 0.001$) and with the *RASA1* rs35148638 C/C genotypes ($p = 0.009$). In Pca subjects, tPSA was not associated with the polymorphisms studied.

Conclusions: *KLK3* rs17632542 and rs2735839 polymorphisms were significantly associated with the risk and aggressiveness of Pca respectively. *NAALADL2*, *KLK3* rs17632542 and *RASA1* polymorphisms were correlated with tPSA and f/tPSA serum levels, suggesting a genetically-based PSA expected values in absence of tumor. These results suggest a potential role of these polymorphisms as biomarkers for Pca in association with the diagnostic and prognostic indexes currently recognized.

INTRODUZIONE

Nel 2019, sono stati registrati negli Stati Uniti 1762450 nuovi casi di cancro e 606880 morti per carcinoma della prostata (Pca) (1). I Registri Tumori rilevano un aumento dell'incidenza di Pca che attualmente rappresenta il tumore più frequente nel sesso maschile in molti paesi occidentali (1-3).

In Italia il Pca è ad oggi la neoplasia più frequente tra i maschi e costituisce oltre il 20% di tutti i tumori diagnosticati a partire dai 50 anni di età (4).

L'antigene prostatico-specifico (PSA) rappresenta il marcatore biochimico principalmente utilizzato nell'ambito della diagnostica del tumore prostatico e il suo impiego nella pratica clinica ha portato ad un aumento del tasso di tumori resecabili ed alla riduzione di diagnosi di carcinomi negli stadi più avanzati. Restano ancora discutibili gli effetti della sua determinazione sul tasso di mortalità e sul rischio di diagnosi non corrette e trattamenti non adeguati (5-7). Il PSA presenta limitazioni in termini di sensibilità e di specificità (8) in parte migliorabili con la valutazione della frazione del

Corrispondenza a: Dania Bozzato, Medicina di Laboratorio Azienda Ospedaliera di Padova, Via Gustiniani 2, 35128 Padova
Tel 0498212801 E-mail dania.bozzato@unipd.it

Ricevuto: 12.03.2020

Revisionato: 20.04.2020

Accettato: 25.04.2020

Pubblicato on-line: 09.09.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.045

PSA (fPSA) che circola libera rispetto al PSA totale sierico (tPSA). Non tutti i PCa secernono PSA e livelli elevati di PSA non necessariamente indicano la presenza di tumore.

Nella popolazione generale, la variabilità dei livelli sierici del PSA dipende per il 40% da fattori ereditari (9). Numerosi polimorfismi del gene *KLK3*, codificante per il PSA, sono associati con variazioni dei livelli di PSA e/o rischio di tumore alla prostata (10-13). È stato dimostrato come la determinazione combinata di parametri biochimici, rapporto f/tPSA, parametri genetici, e analisi del gene *KLK3*, permetta di aumentare sensibilità e specificità diagnostiche (14).

L'aggressività del PCa viene valutata mediante l'indice istologico di Gleason, non essendo ad oggi disponibili parametri biochimici non invasivi in grado di affiancare nella pratica clinica la valutazione biptica. In letteratura, uno studio di associazione dell'intero genoma ha individuato l'associazione di ulteriori due polimorfismi con il Gleason score: il primo, rs35148638, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5 (5q14.3) parte del gene *RAS p21 protein activator 1 (RASA1)* e il secondo, rs78943174, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q26.31) parte del gene *N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase Like 2 (NAALADL2)*. Il gene *RASA1* codifica per la proteina Ras GTPase-activating protein 1 (RasGAP) mentre il gene *NAALADL2* codifica per la proteina N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like protein 2 (NAALADase L2) appartenente alla famiglia delle glutammato carbossipeptidasi II (15).

Nel presente lavoro si è voluto verificare se i livelli del PSA sierico, il rischio e l'aggressività del PCa siano modulati dai polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2*.

METODI

Pazienti

Sono stati studiati 1058 maschi italiani, con un'età mediana di 67 anni [range interquartile (IQR) 61-72], sottoposti ad agobiopsia della prostata per sospetto clinico di PCa. All'istologia, il tumore era presente in 401 soggetti con un'età mediana di 69 anni (IQR 64-74) e assente in 657 soggetti (gruppo di riferimento) con un'età mediana di 65 anni (IQR 60-71).

Il Gleason score era G3 in 6 casi, G4 in 28, G5 in 30, G6 in 197, G7 in 83, G8 in 44 e G9 in 13. In accordo con la dichiarazione di Helsinki rivista nel 2013, ogni paziente ha firmato un consenso informato scritto e il comitato etico locale ha approvato il protocollo di ricerca.

Marcatori sierici

Prima di ogni manipolazione prostatica, ciascun paziente ha effettuato un prelievo di sangue raccolto in EDTA K2 per l'analisi del DNA e senza anticoagulante per le analisi biochimiche. Il siero ottenuto dopo centrifugazione per 10 minuti a 1600 rpm è stato

utilizzato per misurare i livelli di tPSA e fPSA mediante immunodosaggio chemiluminescente (Architect, Abbott S.R.L., Germany). L'indice derivato f/tPSA è stato ottenuto calcolando il rapporto fra fPSA e tPSA.

Analisi genetica

Sono stati studiati quattro polimorfismi a singolo nucleotide (SNP): rs35148638 (gene *RASA1*), rs78943174 (gene *NAALADL2*), rs2735839 e rs17632542 (gene *KLK3*). Il DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico mediante lo strumento King Fisher (ml-Thermo Lab systems, Finlandia) usando il kit BioSprint® 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germania). I polimorfismi sono stati studiati mediante saggio di discriminazione allelica TaqMan® e sistema di rilevamento di sequenza ABI Prism® 7900 HT: rs35148638 (assay ID C_3298775_10), rs78943174 (assay ID C_100181755_10), rs17632542 (assay ID C_25602481_20), rs2735839 (16). Per tutti gli SNP l'analisi è stata eseguita utilizzando 50-100 ng di DNA in un volume finale di reazione pari a 15 µL con 2X di TaqMan® Universal PCR Master Mix e 40X TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystem, Foster City, California, Stati Uniti) contenente i primer e la sonda specifici. Il ciclo di amplificazione era il seguente: 50°C per 2 minuti e 95°C per 10 minuti seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

Analisi statistica

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il programma Stata® 10 and SPSS® for Windows®, version 9. La valutazione statistica dei risultati è stata effettuata mediante il test del chi quadro di Pearson, il test di Fisher, il test di Kruskal-Wallis, il test di Wilcoxon e l'analisi di regressione logistica. Per l'analisi di regressione logistica multivariata è stato utilizzato il test di ipotesi lineari di Wald.

L'equilibrio di Hardy-Weinberg e il calcolo del "linkage disequilibrium" sono stati valutati con il software Arlequin, version 2.000 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>).

RISULTATI

I polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* sono in equilibrio di Hardy-Weinberg

Le frequenze genotipiche e alleliche dei polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* rilevate nelle serie dei casi e dei controlli studiati sono riportate nella Tabella 1. Tutti i polimorfismi risultano essere in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Tabella 1

Frequenze genotipiche e alleliche dei polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2*. Le frequenze sono state valutate nei pazienti con tumore della prostata (casi) e nei controlli, considerati sia separatamente che complessivamente.

<i>KLK3</i> rs2735839	Genotipo (frequenza)			Alleli (frequenza)		Equilibrio di Hardy-Weinberg (Test esatto di Fisher)
Controlli + casi (n=1058)	G/G (0,756)	G/A (0,232)	A/A (0,012)	G (0,872)	A (0,128)	p=0,271
Controlli (n=657)	G/G (0,776)	G/A (0,209)	A/A (0,015)	G (0,880)	A (0,120)	p=0,852
Casi (n=401)	G/G (0,724)	G/A (0,269)	A/A (0,007)	G (0,858)	A (0,142)	p=0,394
<i>KLK3</i> rs17632542	Genotipo (frequenza)			Alleli (frequenza)		Equilibrio di Hardy-Weinberg (Test esatto di Fisher)
Controlli + casi (n=1058)	T/T (0,904)	T/C (0,095)	C/C (0,001)	T (0,952)	C (0,048)	p=0,508
Controlli (n=657)	T/T (0,930)	T/C (0,068)	C/C (0,002)	T (0,964)	C (0,036)	p=0,574
Casi (n=401)	T/T (0,863)	T/C (0,137)	C/C (-)	T (0,931)	C (0,069)	p=0,240
<i>RASA1</i> rs35148638	Genotipo (frequenza)			Alleli (frequenza)		Equilibrio di Hardy-Weinberg (Test esatto di Fisher)
Controlli + casi (n=1054)	A/A (0,557)	A/C (0,388)	C/C (0,055)	A (0,751)	C (0,249)	p=0,249
Controlli (n=655)	A/A (0,556)	A/C (0,395)	C/C (0,049)	A (0,754)	C (0,246)	p=0,139
Casi (n=399)	A/A (0,557)	A/C (0,378)	C/C (0,065)	A (0,745)	C (0,255)	p=1,000
<i>NAALADL2</i> rs78943174	Genotipo (frequenza)			Alleli (frequenza)		Equilibrio di Hardy-Weinberg (Test esatto di Fisher)
Controlli + casi (n=1054)	C/C (0,978)	C/T (0,022)	T/T (-)	C (0,989)	T (0,011)	p=1,000
Controlli (n=655)	C/C (0,979)	C/T (0,021)	T/T (-)	C (0,989)	T (0,011)	p=1,000
Casi (n=399)	C/C (0,977)	C/T (0,023)	T/T (-)	C (0,989)	T (0,011)	p=1,000

Il polimorfismo rs17632542 del gene *KLK3* aumenta il rischio di carcinoma prostatico

È stata valutata la possibile associazione tra i singoli polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* e la diagnosi di PCa. All'analisi di regressione logistica

univariata solo il polimorfismo rs17632542 del gene *KLK3* risultava essere significativamente associato alla diagnosi di PCa, mentre il polimorfismo rs2735839 dello stesso gene non risultava essere significativo. I pazienti portatori dell'allele raro C del polimorfismo rs17632542 presentano un rischio significativamente più elevato di

sviluppare il tumore ($p < 0,001$) (OR 2,1; 95% CI 1,40-3,19) (Tabella 2).

Polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* e variabilità del PSA

È stata valutata la possibile associazione tra i marcatori biochimici di PCa, tPSA e f/tPSA con i polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2*.

Per ciascun polimorfismo sono stati valutati i tre possibili modelli di trasmissione genetica del tratto: dominante, co-dominante e recessivo. Nell'intera popolazione studiata non è stata registrata alcuna associazione significativa.

Nel gruppo dei soggetti di controllo i livelli sierici di tPSA risultavano essere significativamente inferiori tra portatori dell'allele raro T del polimorfismo rs78943174 del gene *NAALADL2* ($p = 0,029$). Il rapporto f/tPSA risultava invece significativamente associato con i polimorfismi del gene *KLK3* e del gene *RASA1*. Tale rapporto era più elevato nei soggetti portatori dell'allele C del polimorfismo rs17632542 del gene *KLK3* ($p < 0,001$) mentre era più basso nei portatori dell'allele C in omozigosi del polimorfismo rs35148638 del gene *RASA1* ($p = 0,009$) (Figura 1).

Nel gruppo dei soggetti con diagnosi di PCa né i livelli del tPSA né il rapporto f/tPSA risultano associati ai polimorfismi studiati.

Diagnosi di cancro della prostata, PSA sierico e variabilità dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2*

Poiché i livelli sierici del tPSA totale e del rapporto f/tPSA risultano associarsi ad alcuni polimorfismi dei geni studiati, è stata valutata la predittività diagnostica combinata dei parametri biochimici e genetici. In modelli di regressione logistica multivariata la diagnosi di PCa risultava significativamente correlata dal tPSA e f/tPSA e dal solo polimorfismo rs17632542 C del gene *KLK3* (Tabelle 3 e 4).

Aggressività del tumore, livelli di PSA sierico e variabilità dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2*

La definizione della classe di rischio del paziente e la corretta scelta terapeutica si avvalgono della valutazione dello score di Gleason.

Ai fini delle successive valutazioni statistiche, in accordo con la proposta validata dallo Scandinavian Prostate Cancer Group Study, i 401 casi sono stati raggruppati in tre classi: Gleason score ≤ 6 ($n = 261$); Gleason score = 7 ($n = 83$) e Gleason score > 7 ($n = 57$).

I livelli di tPSA risultavano progressivamente e significativamente crescenti all'aumentare dello score di Gleason ($p < 0,001$). I valori di f/tPSA erano significativamente più bassi nei pazienti con Gleason ≥ 7

Tabella 2

Analisi di regressione logistica univariata. Variabile di esito: diagnosi di tumore della prostata. Variabili predittive: polimorfismi rs17632542 e rs2735839 del gene *KLK3*, rs35148638 del gene *RASA1* e rs78943174 del gene *NAALADL2*. I valori di significatività sono stati corretti con il metodo di Bonferroni.

<i>KLK3</i> rs17632542 Portatore allele C	OR (95% IC) 2,11 (1,40-3,19)	$p < 0,001$
<i>KLK3</i> rs2735839 Portatore allele A	OR (95% IC) 1,33 (0,99-1,77)	$p = 0,208$
<i>RASA1</i> rs35148638 Portatore allele C	OR (95% IC) 1,00 (0,78-1,29)	$p = 0,999$
<i>NAALADL2</i> rs78943174 Portatore allele T	OR (95% IC) 1,06 (0,45-2,46)	$p = 0,999$

OR, odds ratio; 95% IC, intervalli di confidenza al 95%.

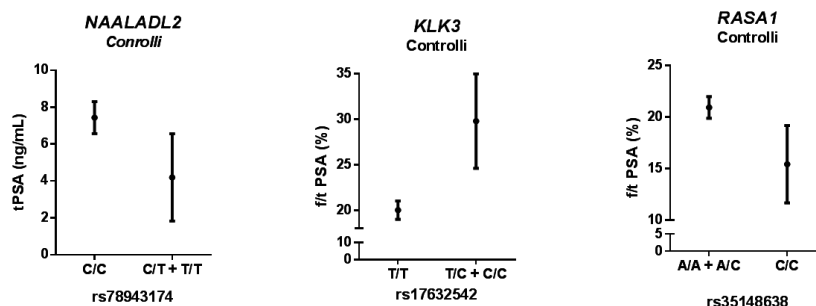


Figura 1

Livelli sierici di PSA totale (tPSA) e rapporto PSA libero/PSA totale (f/tPSA) e variabilità dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* nei soggetti di controllo. I grafici riportano la media e la deviazione standard dei parametri. Le numerosità dei gruppi sono: *NAALADL2* C/C=641, C/T + T/T=14; *KLK3* T/T= 611, T/C + T/T= 46; *RASA1* A/A + A/C=623, C/C=32. Gli assi delle ordinate nei grafici di *KLK3* e *RASA1* sono interrotti.

Tabella 3

Analisi di regressione logistica multivariata. Variabile di esito: diagnosi di tumore della prostata. Variabili predittive: PSA totale, età e polimorfismo rs78943174 del gene NAALADL2.

	OR (95% IC)	Significatività
PSA totale (ng/mL)	1,02 (1,01-1,03)	p<0,001
età (anni)	1,05 (1,03-1,07)	p<0,001
NAALADL2 rs78943174 Portatore allele T	1,19 (0,50-2,83)	p=0,689

OR, odds ratio; 95% IC, intervalli di confidenza al 95%.

Tabella 4

Analisi di regressione logistica multivariata. Variabile di esito: diagnosi di tumore della prostata. Variabili predittive: rapporto PSA libero/PSA totale (f/tPSA), età, e polimorfismi rs17632542 del gene KLK3 e rs35148638 del gene RASA1.

	OR (95% IC)	Significatività
f/tPSA (%)	0,92 (0,90-0,93)	p<0,001
età (anni)	1,08 (1,06-1,10)	p<0,001
KLK3 rs17632542 Portatore allele C	3,21 (1,79-5,76)	p<0,001
RASA1 rs35148638 Omozigoti C/C	1,28 (0,71-2,32)	p=0,413

OR, odds ratio; 95% IC, intervalli di confidenza al 95%.

(p=0,003) (Figura 2).

Successivamente sono state prese in considerazione le possibili associazioni tra polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* e lo score di Gleason. Il solo polimorfismo rs2735839 del gene *KLK3*

risultava significativamente associato allo score di Gleason: i pazienti portatori dell'allele raro A presentavano più frequentemente un PCa aggressivo (Gleason ≥7) (p=0,004) (Figura 3).

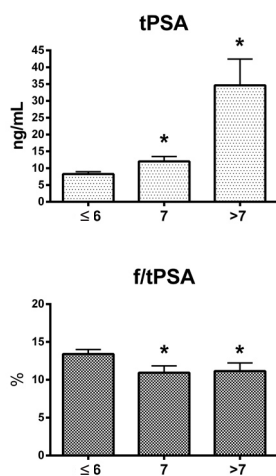


Figura 2

Correlazione fra i livelli sierici di PSA totale (tPSA), rapporto PSA libero/PSA totale (f/tPSA) e lo score di Gleason. Gli asterischi indicano la significatività statistica rispetto al gruppo di riferimento rappresentato dai pazienti con Gleason ≤6. In figura sono riportate la media e la deviazione standard.

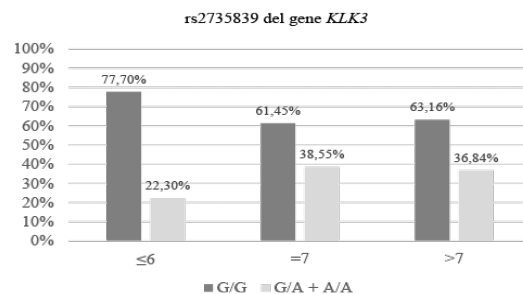


Figura 3

Distribuzione dei genotipi del polimorfismo rs2735839 del gene *KLK3* in associazione allo score di Gleason.

DISCUSSIONE

La diagnosi di PCa prevede l'approccio combinato della valutazione clinica e della determinazione dei livelli sierici del PSA trovando la sua definizione finale nell'indagine istologica da parte dell'anatomopatologo. Poiché le caratteristiche diagnostiche della determinazione sierica del tPSA presentano limiti di sensibilità e specificità (8), ampi spazi di miglioramento sono possibili e auspicabili nella diagnostica di laboratorio del PCa come ad esempio la definizione e validazione di nuovi biomarcatori non invasivi che singolarmente o insieme al PSA possano migliorare complessivamente il riconoscimento della patologia e il miglioramento delle caratteristiche diagnostiche del PSA stesso.

Interessante è la definizione di assetti genetici che da un lato possono determinare la variabilità interindividuale dei livelli sierici del PSA e dall'altro possono predire il rischio di PCa.

Va nuovamente sottolineato che il 40% della variabilità interindividuale del PSA sierico nella popolazione generale è geneticamente determinata (9) e come in letteratura siano stati descritti numerosi polimorfismi genici che risultano associarsi ad un aumento significativo del rischio di insorgenza del PCa (17-18).

Il presente studio ha valutato alcuni polimorfismi dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* precedentemente descritti essere associati al rischio di PCa in generale o alle sue forme più aggressive (17).

L'analisi genetica nelle serie dei casi e dei controlli ha evidenziato una associazione tra i polimorfismi del gene *KLK3* (codificante per il PSA) e la diagnosi di PCa. Tale associazione era altamente significativa per il polimorfismo rs17632542 e non significativa per il polimorfismo rs2735839. Questi risultati confermano in parte quanto descritto precedentemente in letteratura (19,20) ma si contrappongono a osservazioni successive (21). Nel nostro studio i soggetti portatori, in omozigosi o eterozigosi, degli alleli rari rs17632542 C e rs2735839 A presentavano un rischio relativo di avere una diagnosi di PCa rispettivamente pari a 2,1 e 1,33. Il polimorfismo rs2735839 cade in una regione non codificante al 3' del locus *KLK3* (19,22,23) mentre il polimorfismo rs17632542 si trova nella regione codificante del gene e determina la sostituzione di una isoleucina con una treonina in posizione 179 del PSA (Ile179Thr). I due polimorfismi sono in stretto "linkage" essendo associati tra loro gli alleli rari rs2735839A e rs17632542C. Allo stato attuale non è possibile formulare ipotesi sul nesso causale tra tali polimorfismi e l'aumentato rischio di adenocarcinoma della prostata, né in letteratura sono presenti ipotesi al riguardo.

Successivamente, è stato verificato se i polimorfismi oggetto di studio concorrono nella definizione della variabilità interindividuale dei livelli di PSA. Tale analisi è stata condotta separatamente nel gruppo dei casi e in quello dei controlli per poter definire eventuali effetti genetici specifici per l'una o l'altra popolazione.

Nel gruppo dei soggetti di controllo i livelli sierici di tPSA risultavano essere significativamente inferiori tra i portatori dell'allele raro rs78943174 T del polimorfismo del gene *NAALDAL2*. Tale osservazione non risulta essere mai stata descritta prima in letteratura.

Il gene *NAALDAL2* si localizza nel braccio lungo del cromosoma 3 e codifica per la proteina N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like protein 2 (NAALADase L2) appartenente alla famiglia delle glutammato carbossipeptidasi. Il *NAALADL2* promuove un microambiente pro-migratorio e pro-metastatico: una sua aumentata espressione nell'ambito tumorale è stata associata ad un più elevato punteggio di Gleason e ad una scarsa sopravvivenza in seguito a prostatectomia radicale (15). Il polimorfismo rs78943174 si trova a livello dell'introne 22 del gene e non è stata descritta ad oggi alcuna variazione funzionale dello stesso. Non è possibile pertanto avanzare ipotesi circa i meccanismi causali di tale osservazione. È possibile ipotizzare anche che questo polimorfismo non sia funzionalmente rilevante ma sia prossimo e in "linkage" con un'altra variante genetica funzionale ad oggi non nota.

Il rapporto f/tPSA risultava essere più basso nei soggetti omozigoti rs35148638C/C del gene *RASA1*. Questo gene si localizza nel braccio lungo del cromosoma 5 e codifica per la proteina Ras GTPase-activating protein 1 (RasGAP). *RASA1* sopprime la funzione RAS, aiuta a regolare la proliferazione e la differenziazione cellulare e controlla la crescita dei vasi sanguigni. Le mutazioni rare nel gene *RASA1* portano a malformazioni capillari, arterovenose e linfatiche che potrebbero fornire una spiegazione all'aggressività del cancro (15). Il polimorfismo rs35148638 si trova a livello dell'introne 1 del gene e non è stata descritta ad oggi alcuna variazione funzionale dello stesso. Non è possibile pertanto avanzare ipotesi circa i meccanismi causali di tale osservazione. È possibile anche che questo polimorfismo non sia funzionalmente rilevante ma sia prossimo e in "linkage" con un'altra variante genetica funzionale.

Il rapporto f/tPSA risultava essere più alto nei soggetti portatori degli alleli rari rs2735839A e rs17632542C del gene *KLK3*. Tale osservazione è in accordo con quanto descritto da Klein et al. (24). I due polimorfismi sono in stretto "linkage" essendo associati tra loro gli alleli rari rs2735839A e rs17632542C. Sulla base di tali considerazioni è possibile ipotizzare, in accordo con altri autori (25,26), che il polimorfismo rs2735839 sia solamente un marcatore del polimorfismo rs17632542 che causativamente determina un aumento del f/tPSA. La sostituzione Ile179Thr potrebbe determinare un cambiamento conformazionale della proteina a cui si associa una ridotta affinità del fPSA per le proteine sieriche in grado di complessarlo o, in alternativa, una aumentata affinità verso gli anticorpi monoclonali utilizzati per la sua determinazione su siero.

Contrariamente a quanto descritto per i controlli, nel gruppo dei soggetti con diagnosi di PCa i livelli del tPSA e i valori di f/tPSA sembravano essere svincolati dai fattori genetici considerati. Poiché i livelli di tPSA e

f/tPSA risultavano associarsi alla diagnosi e ai polimorfismi rs78943174 di *NAALADL2*, rs17632542 di *KLK3* e rs35148638 di *RASA1*, è stata valutata la predittività diagnostica combinata dei parametri genetici e biochimici. La diagnosi di PCa risultava significativamente e indipendentemente predetta dai livelli di tPSA e f/tPSA e dal solo polimorfismo rs17632542 di *KLK3*.

A seguito della prima diagnosi, il percorso diagnostico del PCa prevede la stratificazione dei pazienti in classi di rischio diverse che si associano a schemi di monitoraggio/trattamento specifici. La definizione del rischio di recidiva riconosce come fattori predittivi i livelli di PSA, il Gleason Score sulla biopsia prostatica e lo stadio clinico (27). L'introduzione nella pratica clinica della determinazione del PSA con funzione di screening mirato ha aumentato il tasso di identificazione di cancro in stadio iniziale, tuttavia l'impatto sul tasso di mortalità è stato inferiore alle attese aumentando al contempo il rischio di sovra-diagnosi e di trattamento clinico non necessario (28,7).

Questi fenomeni trovano una valida spiegazione nella eterogeneità biologica del PCa che riconosce un'ampia variabilità nell'aggressività della neoplasia che va dai tumori altamente aggressivi alle forme indolenti. Pur di estrema rilevanza, la valutazione dello score di Gleason non è in grado di definire completamente tale variabilità biologica. Molte attese sono riposte nello sviluppo di nuove indagini molecolari utilizzabili come valutazioni aggiuntive agli score prognostici in uso (29-31).

In questo studio è stata presa in considerazione la possibile associazione tra i polimorfismi genetici dei geni *KLK3*, *RASA1* e *NAALADL2* e l'aggressività della neoplasia determinata mediante lo score di Gleason. Il solo polimorfismo rs2735839 del gene *KLK3* risultava associarsi significativamente alle forme più aggressive del tumore. I soggetti portatori dell'allele raro rs2735839 A risultavano essere il 22,3% e il 36,84% dei pazienti con Gleason score =6 e Gleason score ≥7 rispettivamente. Questa osservazione risulta in accordo con precedenti pubblicazioni (32) ma in contrasto con successive valutazioni (33). I polimorfismi dei geni *RASA1* e *NAALADL2* non risultavano associarsi alle classi di Gleason score. Questo risultato non conferma quanto descritto inizialmente in letteratura per questi due polimorfismi (15) ma è in accordo con i risultati di un successivo studio di associazione dell'intero genoma (GWAS) (33).

Una limitazione di queste valutazioni è costituita dalla mancanza di dati di monitoraggio clinico per i pazienti selezionati e pertanto non è stato possibile utilizzare come esiti clinici nelle valutazioni statistiche né il rischio di recidiva né la sopravvivenza.

In conclusione, il presente lavoro dimostra come il rischio di sviluppare cancro della prostata e la sua aggressività presentino una variabilità interindividuale su base genetica legata rispettivamente ai polimorfismi rs17632542 e rs2735839 del gene *KLK3*. Analogamente, in assenza della neoplasia, i livelli sierici del tPSA e f/tPSA risultano geneticamente modulati

rispettivamente dal polimorfismo rs78943174 del gene *NAALADL2* e dai polimorfismi rs17632542 del gene *KLK3* e rs35148638 del gene *RASA1*. Questi risultati inducono a procedere ad ulteriori studi al fine di valutare la possibile utilità clinica di tali marcatori possibilmente in associazione con gli indici diagnostici e prognostici attualmente riconosciuti.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403.
3. Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *Eur J Cancer* 2015;51:1164-87.
4. Associazione Italiana Oncologia Medica (AIOM), Linee Guida Carcinoma della Prostata, 2019. aiom.it/linee-guida-aiom-carcinoma-della-prostata-ottobre-2019/ (ultimo accesso: aprile 2020)
5. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL3rd et al. Mortality results from a randomized prostate- cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009;360:1310-9.
6. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ et al. Screening and prostate-cancer mortality in a ran- domized European study. *N Engl J Med* 2009;360:1320-8.
7. Ilic D, O'Connor D, Green S et al: Screening for prostate cancer: an updated Cochrane systematic review. *BJU Int* 2011;107:882-891.
8. Lilja H, Ulmert D and Vickers AJ: Prostate specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008;8:268-278.
9. Pilia G, Chen WM, Scuteri A, et al. Heritability of cardiovascular and personality traits in 6,148 Sardinians. *PLoS Genet* 2006;2:e132.
10. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008;40:316-21.
11. Penney KL, Schumacher FR, et al. Association of *KLK3* (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis*. 2011;32:853-9.
12. Parikh H, Wang Z, Pettigrew KA, et al. Fine mapping the *KLK3* locus on chromosome 19q13.33 associated with prostate cancer susceptibility and PSA levels. *Hum Genet*. 2011;129:675-85.
13. Kote-Jarai Z1, Amin AI Olama A, et al. Identification of a novel prostate cancer susceptibility variant in the *KLK3* gene transcript. *Hum Genet* 2011;129:687-94.
14. Zamboni CF, Prayer-Galetti T, Basso D, et al. Effectiveness of the combined evaluation of *KLK3* genetics and free-to-total prostate specific antigen ratio for prostate cancer diagnosis. *J Urol* 2012;188:1124-30.
15. Berndt SI, Wang Z, Yeager M et al. Two susceptibility loci identified for prostate cancer aggressiveness. *Nat Commun* 2015;6:6889.
16. Klein RJ, Halldén C, Cronin AM et al., Blood biomarker levels to aid discovery of cancer-related single-nucleotide polymorphisms: kallikreins and prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3:611-9.

17. Helfand BT, Roehl KA et al. Associations of prostate cancer risk variants with disease aggressiveness: results of the NCI-SPORE genetics working group analysis of 18,343 Cases. *Hum Genet* 2015;134:439–50.
18. Sullivan J, Kopp R, Stratton K et al. An analysis of the association between prostate cancer risk loci, PSA levels, disease aggressiveness and disease-specific mortality. *Br J Cancer* 2015;113:166–72.
19. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008;40:316-321.
20. Xu J, Isaacs SD, Sun J et al. Association of prostate cancer risk variants with clinicopathologic characteristics of the disease. *Clin Cancer Res* 2008;14:5819-5824.
21. Hoffmann TJ, Passarelli MN, Graff RE et al. Genome-wide association study of prostate-specific antigen levels identifies novel loci independent of prostate cancer. *Nat Commun* 2017;8:14248.
22. Ahn J, Berndt SI, Wacholder S et al. Variation in KLK3 genes, prostate-specific antigen and risk of prostate cancer. *Nat Genet* 2008;40:1032.
23. Lindstrom S, Schumacher F, Siddiq A et al. Characterizing associations and SNP-environment interactions for GWAS-identified prostate cancer risk markers-results from BPC3. *PLoS One* 2011;6:e17142.
24. Klein RJ, Halldén C, Cronin AM et al. Blood biomarker levels to aid discovery of cancer-related single-nucleotide polymorphisms: Kallikreins and prostate cancer. *Cancer Prev Res* 2010;3:611-619.
25. Parikh H, Wang Z, Pettigrew KA et al. Fine mapping the KLK3 locus on chromosome 19q13.33 associated with prostate cancer susceptibility and PSA levels. *Hum Genet* 2011;129:675-685.
26. Kote-Jarai Z, Amin AI, Olama A, Leongamornlert D et al. Identification of a novel prostate cancer susceptibility variant in the KLK3 gene transcript. *Hum Genet* 2011;129: 687-694.
27. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998;280:969-74.
28. Andriole GL, Crawford ED, Grubb 3rd RL et al. Mortality results from a randomized prostate cancer screening trial. *N Engl Med* 2009;360:1310-1319.
29. Capoluongo E, Zambon CF, Basso D et al. PCA3 score of 20 could improve prostate cancer detection: results obtained on 734 Italian individuals. *Clin Chim Acta* 2014; 429:46-50.
30. Sun J, Tao Sha, Gao Y et al. Genome-wide association study identified novel genetic variant on SLC45A3 gene associated with serum levels prostate-specific antigen (PSA) in a Chinese population. *Hum. Genet* 2013; 132:423–9.
31. Jin G, Zheng SL, Lilja H et al. Genome-wide association study identifies loci at ATF7IP and KLK2 associated with percentage of circulating free PSA. *Neoplasia* 2013;15: 95–101.
32. Helfand BT, Catalona WJ and Xu J. A Genetic-based approach to personalized prostate cancer screening and treatment. *Curr Opin Urol* 2015;25:53-8.
33. Teerlink CC, Leongamornlert D, Dadaev T et al. Genome-wide association of familial prostate cancer cases identifies evidence for a rare segregating haplotype at 8q24.21. *Hum Genet*. 2016;135:923-38.

Titolazioni dei preparati galenici oleosi a base di cannabis in Regione Liguria: progetto sperimentale dei laboratori di riferimento regionale

Giuliana Cangemi¹, Paolo Bucchioni², Gino Tripodi¹, Sebastiano Barco¹, Paolo Franceschini², Isa Mavi Sbarbaro², Gianfranco Petriccioni², Laura Barbagallo¹, Angelo Maffia¹, Eugenia Livoti⁴, Clara Cannas⁴, Eleonora Russo³, Barbara Rebesco⁴, Flavia Lillo⁵

¹Laboratorio Centrale di Analisi, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

²Laboratorio di Tossicologia, Ospedale San Bartolomeo, ASL5 Spezzino, Sarzana

³Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Genova

⁴Struttura Complessa Politiche del Farmaco, A.Li.Sa (Agenzia Ligure Sanitaria), Regione Liguria

⁵MacroArea dei laboratori, DIAR dei servizi Trasfusionale, Laboratori e Diagnostica Clinica per Immagini, A.Li.Sa (Agenzia Ligure Sanitaria), Regione Liguria

*Per conto del gruppo di lavoro "Titolazione delle preparazioni galeniche oleose a base di cannabis" di A.Li.Sa (Agenzia Ligure Sanitaria) composto da: Barbara Rebesco, Maria Susanna Rivetti, Gabriella Paoli, Flavia Lillo, Eleonora Russo, Paolo Bucchioni, Gino Tripodi, Giuliana Cangemi, Paola Barabino, Valentina Iurilli, Marinella Bedo, Sara Macis, Simona Peri, Clara Cannas.

ABSTRACT

Analysis of cannabinoids concentration in cannabis oil galenic preparations in the Liguria Region: experimental project of the regional reference laboratories.

Introduction: the medical use of cannabis is increasingly being applied in the treatment and support of several diseases and syndromes. In the Liguria Region, olive oil galenic preparations are mainly prepared by hospital pharmacies, according to common standard procedures. The preparations must be analyzed in order to establish the concentration of the two main active compounds (delta-9 tetrahydrocannabinol, THC and cannabidiol, CBD) thus allowing the correct setting of the therapeutic prescription. Liguria Region is at the forefront in the use of medical cannabis with a high number of patients treated (>1000). The aim of this work is to describe the organization of the titration activity centralized at the two regional reference laboratories (Central Laboratory of Analyses of Giannina Gaslini Institute, Genova and Toxicology Laboratory of Sarzana, La Spezia), coordinated by the inter-hospital department (DIAR) of the Laboratories Area.

Methods: the phases of the analytical process (pre-analytical, analytical and post-analytical) have been identified and described. The analysis of the workflow has been carried out including the methods to prepare cannabis oil in the pharmacies, the intervals and production volumes, the medical-legal handling requirements and operational responsibilities. The definition of the pre-analytical phase foresees the methods of packaging, transport and recording of the samples and related responsibilities.

Results: the analytical phase included the development and validation of the analytical method Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry, (UHPLC-MS/MS) in the two laboratories, with common procedures and the comparison of results conducted both on reference material and real samples of olive oil galenic preparations. The definition of the post-analytical phase included the reporting procedures.

Discussion: the experimental phase has been concluded at the end of 2019 and the implementation phase of the project has started in march 2020.

Corrispondenza a: Giuliana Cangemi, Laboratorio Centrale di Analisi, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Via Gerolamo Gaslini 5, 16147 Genova, Tel +39 (0)1056362835, E-mail giulianacangemi@gaslini.org

Ricevuto: 15.04.2020

Revisionato: 11.05.2020

Accettato: 20.05.2020

Publicato on-line: 15.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.061

INTRODUZIONE

L'indicazione all'utilizzo medico della *Cannabis sativa* (in Italia oggetto di specifica regolamentazione dalla fine del 2015) prevede alcuni specifici impieghi: nel dolore cronico e in quello associato a sclerosi multipla e a lesioni del midollo spinale; nella nausea e vomito causati da chemioterapia, radioterapia, terapie antiretrovirali; come stimolante dell'appetito nella cachessia, anoressia, perdita dell'appetito in pazienti oncologici o affetti da AIDS e nell'anoressia nervosa; per l'effetto ipotensivo nel glaucoma; per la riduzione dei movimenti involontari del corpo e facciali nella sindrome di Gilles de la Tourette (Decreto Ministeriale 9/11/2015) (1).

Le due molecole principali, presenti nel fitocomplesso costituito da oltre 500 sostanze, che sono alla base dell'attività terapeutica e presenti nelle infiorescenze della *Cannabis sativa* L 1753 sono il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC) e il cannabidiolo (CBD) che derivano rispettivamente dai loro precursori acidi: acido tetraidrocannabinolico (THC-A) e acido cannabidiolico (CBD-A), in seguito ad ossidazione dovuta all'esposizione alla luce, all'aria e per riscaldamento diretto (2). THC-A e CBD-A derivano da un precursore comune, l'acido cannabigerolico (CBG-A) (Figura 1).

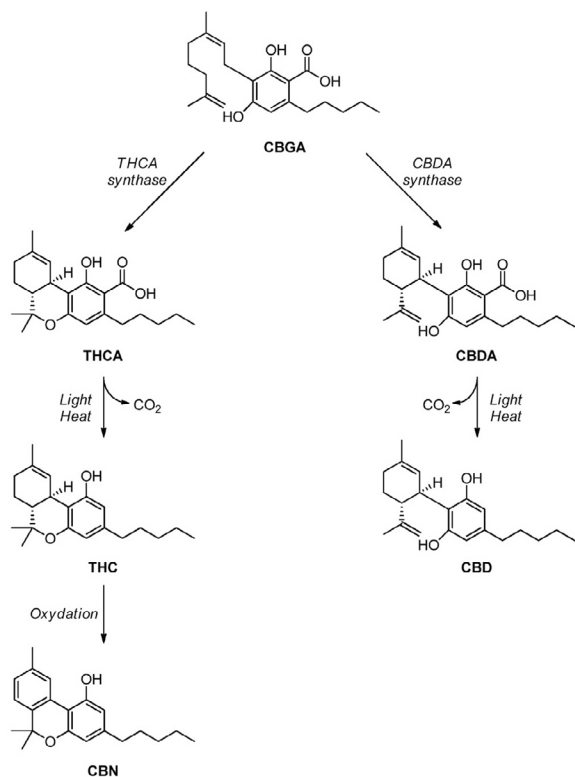


Figura 1

Principali cannabinoidi oggetto delle titolazioni (modificata *J Pharm Biomed Anal* 2018;147:565-79)

Altri cannabinoidi presenti nel fitocomplesso sono il cannabinolo (CBN), che origina dall'ossidazione del THC, il cannabichromene (CBC) e il cannabigerolo (CBG) (3).

Il THC e il CBD possiedono proprietà farmacologiche distinte: il THC ha un'attività prevalentemente psicotropa mentre il CBD ha attività analgesica e antiossidante ed è in grado di mitigare gli effetti collaterali del THC (4-7).

La combinazione dei due cannabinoidi THC e CBD con gli altri componenti del fitocomplesso è probabilmente alla base dell'efficacia degli estratti medicinali e della bassa incidenza di effetti collaterali rispetto ai farmaci sintetici con analoga indicazione terapeutica (8).

Il Decreto del Ministero della Salute del 9 novembre 2015 (1), autorizza l'Istituto Chimico e Farmaceutico Militare di Firenze (ICFM) alla coltivazione/produzione autonoma della cannabis medica, e da gennaio 2017 l'ICFM ha reso disponibili i primi lotti di prodotto denominato Cannabis FM2, con concentrazioni standardizzate di THC (5-8% w/w) e CBD (7,5-12% w/w). Da luglio 2018 è disponibile una seconda varietà di prodotto denominata FM1 con un contenuto dichiarato di THC del 13-20% w/w e CBD <1% w/w (9).

FM1 ed FM2 vengono distribuiti alle farmacie autorizzate per l'allestimento di preparazioni galeniche magistrali cioè dietro presentazione di prescrizione medica.

Le quote di produzione della Cannabis FM1 e FM2 di ICFM tengono conto del consumo degli ultimi due anni e del suo incremento annuale. I dati del Ministero della Salute dimostrano una progressiva crescita del consumo nazionale di cannabis che nel 2018 è stato di circa 578 tonnellate di materia grezza. Per far fronte al crescente fabbisogno, la produzione viene integrata con l'importazione di prodotti olandesi a base di Cannabis non registrati, in relazione alla disponibilità ad esportare dell'Office of Medicinal Cannabis, che applica le direttive del Ministero della Salute, Welfare e Sport olandese in materia di esportazione di tali prodotti (10). Le varietà di Cannabis importate in Italia dall'Olanda sono il Bedrocan (concentrazioni medie di THC 22% w/w e CBD <1%), il Bedrobinol (13,5% THC e <1% CBD), il Bediol (6,5% THC e 8% per CBD) e il Bedrolite (0,4% THC e 9% CBD w/w).

La Regione Liguria, insieme alla Toscana, all'Emilia Romagna, alla Puglia, alla Lombardia ed al Piemonte è tra le regioni con il maggior utilizzo di cannabis; a dicembre 2019 è stato stimato in Regione, un numero di pazienti trattati pari a 1056, la maggior parte dei quali adulti. Per quanto riguarda i pazienti pediatrici, presso l'Istituto Pediatrico Giannina Gaslini (IGG) di Genova, nel 2017 è stato avviato uno studio clinico su bambini, adolescenti e giovani adulti (18-35 anni) affetti da patologie neurologiche e degenerative in regime di cura palliativa che ha coinvolto ad oggi 13 soggetti (11).

Le modalità consigliate di somministrazione della cannabis medica sono la preparazione per decozione e l'estratto oleoso in gocce, più raramente il fumo o la

vaporizzazione con modalità di preparazione stabilite a livello nazionale.

È stato dimostrato, tuttavia, che il recupero dei differenti principi attivi nel decotto è molto limitato e con rapporti variabili tra THC e CBD. Inoltre, la stabilità dei cannabinoidi in soluzione acquosa è molto bassa e questo rende possibile l'utilizzo solo di preparazioni estemporanee.

Le preparazioni oleose sono invece caratterizzate da un rapporto THC/CBD più elevato, conseguente ad un recupero migliore di THC e una maggiore stabilità del preparato nel tempo, con una flessione della concentrazione del principio attivo inferiore al 20% nei primi giorni dalla preparazione ed una sostanziale stabilità a lungo termine e fino ad un anno a temperatura ambiente (9, 12, 13).

I diversi metodi per l'allestimento delle preparazioni galeniche sono riportati nella letteratura scientifica (13-15), tuttavia l'assenza di standardizzazione sembra essere alla base della notevole variabilità nelle concentrazioni dei principi attivi che vengono riscontrate (16). Le preparazioni galeniche oleose vengono prodotte in Liguria dalle farmacie ospedaliere delle Aziende sanitarie ASL2, ASL3, ASL4 e IRCCS Gaslini e da alcune farmacie private convenzionate in ottemperanza agli "Standard tecnici deliberati dalla Azienda Ligure Sanitaria", sanciti con delibera della Azienda Ligure Sanitaria (A.Li.Sa) n.78 del 2018 (17).

La titolazione dei principi attivi, è richiesta in alcune nazioni, tra cui l'Italia, per ciascun lotto di olio di cannabis prodotto. Infatti, in base al contenuto di cannabinoidi carbossilati e decarbossilati, i decotti e l'olio di cannabis hanno mostrato differenti proprietà farmacocinetiche e conseguenze cliniche sugli individui trattati (18).

Il Decreto Ministeriale 9 novembre 2015, per assicurare la qualità del prodotto e consentire l'impostazione corretta del protocollo terapeutico, indica che le preparazioni galeniche oleose a base di cannabis *"devono essere titolate ossia deve essere determinata la concentrazione dei principi attivi per ciascuna preparazione magistrale con metodologie sensibili e specifiche quali la cromatografia liquida o gassosa accoppiate alla spettrometria di massa"*.

In Liguria, le procedure di titolazione dei preparati galenici hanno previsto, ad oggi, l'invio ad un laboratorio certificato esterno (CoQua Lab, Torino)

Dato l'alto numero di pazienti residenti in regione Liguria in terapia con derivati della cannabis, è stata valutata l'opportunità di implementare l'attività di titolazione, in considerazione del fatto che due laboratori regionali il Settore Cromatografia del Laboratorio Analisi dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini (Genova) (Laboratorio 1) e il Laboratorio di Tossicologia di Sarzana (La Spezia), (Laboratorio 2) sono stati identificati come riferimento regionale.

Nell'ambito di un tavolo di lavoro regionale organizzato dal Dipartimento Interaziendale Regionale dell'area di Laboratorio, si è proceduto allo sviluppo del protocollo di gestione del processo.

METODI

Il progetto è stato suddiviso in due fasi sperimentali: la prima fase ha avuto luogo tra gennaio e settembre 2019 e la seconda fase tra ottobre e dicembre 2019.

Nella prima fase si è proceduto al censimento delle attività produttive delle diverse farmacie, somministrando, a tutti i responsabili delle Unità Operative Complesse coinvolte nella preparazione del galenico, un apposito questionario (Figura 2) in cui veniva richiesto di descrivere: intervalli e volumi di produzione e modalità di invio dei campioni per la titolazione. L'analisi dell'attività produttiva delle farmacie ha mostrato volumi di lavoro differenti e variabili che vanno da una/due preparazioni al mese di IGG e ASL4 a 2 preparazioni alla settimana di ASL2.

È stata pertanto concordata la sincronizzazione dell'attività attraverso la definizione di un "drug day" settimanale e l'invio dei preparati galenici ai due laboratori di riferimento a settimane alterne (settimana pari al laboratorio n 1 e settimana dispari al laboratorio n 2).

Nella seconda fase delle attività si è proceduto alla standardizzazione del processo al fine di armonizzare le procedure e rendere i laboratori di riferimento perfettamente interscambiabili. La fase pre-analitica, analitica e post-analitica sono state quindi individuate e definite. La fase pre-analitica pertiene al confezionamento, al trasporto dalle farmacie ai laboratori di riferimento e all'accettazione dei campioni oleosi nel sistema informatico dei laboratori (LIS).

La fase analitica corrisponde alla messa a punto della metodica di misurazione e dei controlli di qualità. La metodologia scelta per questo progetto è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa a triplo quadrupolo (LC-MS/MS) che garantisce elevata specificità e sensibilità (16) e consente la determinazione delle forme decarbossilate ed acide dei principi attivi (THC, CBD, THC-A e CBD-A rispettivamente). Nella seconda fase sperimentale del progetto sono inoltre state effettuate valutazioni comparative dei risultati ottenuti dai due laboratori di riferimento sui preparati galenici prodotti in ASL 2, ASL4 e IGG provvedendo ad inviare in triplicato non solo ai laboratori prima citati ma anche ad un laboratorio esterno, nello specifico a CoQua Lab di Torino, allo scopo di confrontare ed armonizzare i risultati prodotti. I risultati sono stati valutati mediante analisi statistica utilizzando la regressione lineare di Passing Bablok ed il software MedCalc (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium). La fase post-analitica descrive le modalità di refertazione e la trasmissione dei risultati alle farmacie invianti.

Nel dicembre 2019, entrambi i laboratori hanno partecipato ad un programma di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) per la titolazione dei cannabinoidi nei preparati oleosi della cannabis organizzato dal Centro Nazionale Dipendenze e Doping dell'Istituto Superiore di Sanità con esiti positivi (all'interno dei livelli di accettabilità).

	QUESTIONARIO FARMACIE OSPEDALIERE TITOLAZIONI PREPARAZIONI GALENICHE OLIO DI CANNABIS	MOD.... Rev del.....
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------

<u>Farmacia richiedente</u>	
Farmacia Ospedaliera: _____	
Farmacia Privata -Ragione Sociale: _____	
Indirizzo _____	
Partita Iva _____	Codice Fiscale _____
tel _____	email _____
Referente _____	Qualifica _____

Gentili colleghi, nell'ottica di realizzare un progetto regionale di standardizzazione delle modalità di titolazione delle preparazioni galeniche di olio di cannabis, il gruppo di lavoro nominato da ALISA ha predisposto il seguente questionario volto alla raccolta del maggior numero di informazioni relative alle attuali modalità di gestione di questa fase del processo. Vi chiediamo quindi di compilarlo in tutte le sue parti ed eventualmente di integrare informazioni che riteniate rilevanti per la buona riuscita del progetto

Il responsabile del progetto
Dr.ssa Flavia Lillo

- 1) Numero mensile preparazioni galeniche olio cannabis effettuate attualmente presso la Vostra struttura

- 2) Qual è attualmente la cadenza delle preparazioni? (es. una volta/mese, una volta/settimana) _____
- 3) Descrivere la strumentazione utilizzata per la preparazione galenica (inclusi modelli e marche)

- 4) Elencare le differenti tipologie di cannabis che vengono preparate (es. FM2, bedrocan, bediol, bedrolite): _____
- 5) Quali sono le molecole per cui attualmente richiedete la titolazione (es. THC, CBD...) _____
- 6) Quante differenti tipologie di preparazioni possono essere effettuate nella stessa seduta? _____
- 7) C'è un giorno specifico della settimana in cui vengono attualmente effettuate le titolazioni? _____
- 8) Numero di pazienti attualmente trattati presso la Vostra istituzione: _____
- 9) Numero massimo di pazienti trattabile con ciascuna preparazione: _____
- 10) Quanto tempo impiegate per l'allestimento di ciascuna preparazione? _____
- 11) Laboratorio di riferimento cui vengono inviate attualmente le richieste di titolazione: _____
- 12) Con quale mezzo (aziendale, corriere, etc) vengono inviati i campioni e quanto costa l'invio? _____
- 13) Costo attuale delle titolazioni richieste al/ai laboratori di riferimento (costo/campione) _____
- 14) Indicate il tempo reale di restituzione del referto da parte del laboratorio che attualmente effettua le titolazioni per la Vostra farmacia, dal momento dell'invio del campione al momento della ricezione del referto (es. 24 ore/48 ore/72 ore/96 ore) _____
- 15) Elencate eventuali criticità riscontrate riguardanti le titolazioni: _____

Figura 2

Questionario sottoposto alle farmacie ospedaliere della Liguria

RISULTATI

Fase pre-analitica

Le modalità di confezionamento, trasporto e accettazione in catena di custodia sono state definite nel dettaglio mediante una procedura operativa standard denominata "Titolazione delle preparazioni galeniche oleose a base di cannabis: modalità di conferimento dei campioni ai laboratori di riferimento e refertazione", allegato sub 1 alla delibera A.Li.Sa n. 68/2020 (19) conforme alle indicazioni del Sistema Gestione Qualità ISO 9001/2015.

Le procedure per il confezionamento prevedono che il preparato galenico oleoso a base di cannabis, preparato secondo gli standard tecnici A.Li.Sa (Delibera ALISA n.78 dell'11 aprile 2018 (17), subito dopo la preparazione debba essere miscelato e omogeneizzato tramite accurata agitazione meccanica. Per ciascuna preparazione deve essere prelevata un'aliquota di 0,2 mL in un contenitore di vetro ambrato e conservata in un intervallo di temperatura tra +2° a +8°C fino all'invio.

Le procedure prevedono l'invio dei campioni ai laboratori rispettando la catena di custodia. L'invio dei campioni avviene utilizzando sistemi di tracciatura della temperatura e dei percorsi. In Regione Liguria le farmacie ospedaliere e i laboratori si sono dotati di sistemi di "data logger" mediante gara regionale, ed è pertanto possibile una tracciatura puntuale e informatizzata.

L'accettazione dei campioni avviene in ogni laboratorio utilizzando i propri sistemi informatici (LIS del laboratorio), secondo standard identificativi della farmacia inviante, del numero di lotto e data di produzione della preparazione galenica.

Fase analitica

Il pannello analitico considerato comprende: THC, CBD e le rispettive forme acide (THC-A e CBD-A).

I due laboratori di riferimento hanno sviluppato e validato il metodo analitico mediante LC-MS/MS utilizzando le strumentazioni disponibili nei rispettivi laboratori: TSQ Quantiva accoppiato a Ultra High Performance Liquid Chromatography(UHPLC) Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific) e Agilent 6430 Triple Quad, accoppiato ad HPLC Agilent 1200 series.

Il metodo analitico è stato condiviso, tra i due laboratori, in particolare riguardo alla scelta delle condizioni cromatografiche (colonna UHPLC: Zorbax Eclipse Plus C18 2.1x50 mm, 1.8 µm), delle modalità di analisi mediante MS, oltre alle modalità di preparazione dei calibratori a partire dallo standard, e della preparazione del campione.

Il campione di olio viene preparato con la stessa procedura di diluizione 1:20000 in alcool isopropilico ottenuta mediante due diluizioni scalari successive e con aggiunta degli standard interni deuterati (CBD -d3 e THC -d3). Le transizioni multiple reaction monitoring (MRM) scelte sono state le seguenti: ionizzazione positiva, CBD THC 315,2 →123, 135,1, 193,1; CBD -d3 THC -d3 318,2

→ 196,1, 262: ionizzazione negativa, CBD-A THC-A 357.2 →245.1.

Per ogni seduta analitica è prevista una curva di calibrazione ad 8 punti e 3 controlli di qualità preparati per diluizione dello standard certificato in isopropanolo.

L'analisi LC-MS/MS consente una buona separazione cromatografica dei 4 analiti (Figura 3) e una identificazione accurata mediante le specifiche transizioni.

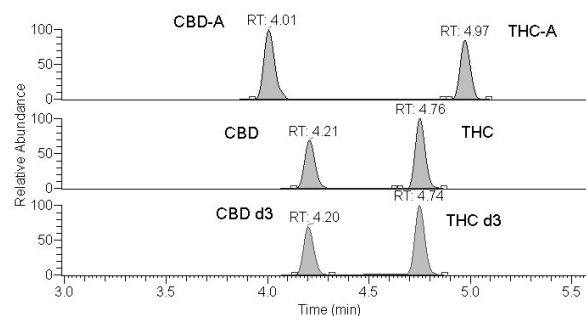


Figura 3

Esempio di cromatogramma ottenuto iniettando un calibratore alla concentrazione di 1 mg/dL

Ciascun laboratorio ha quindi eseguito la validazione del proprio metodo analitico (nell'intervallo 0,05- 8 mg/dL) seguendo le proprie procedure standard e in ottemperanza alle linee guida sulla validazione dei metodi bioanalitici cromatografici quantitativi (20, 21). Nella prima fase sperimentale, i due laboratori hanno provveduto a scambiare tra di essi calibratori e controlli di qualità per allineare le metodiche, successivamente sono stati analizzati i preparati galenici prodotti presso la farmacia dell'IGG. Dopo un primo confronto, i laboratori hanno ulteriormente agito sull'armonizzazione dei dati ottenuti analizzando in sinergia tutte le possibili fonti di variabilità.

Nella seconda fase le farmacie ospedaliere di ASL2, ASL4 e IGG hanno provveduto ad inviare campioni in triplicato ai due laboratori di riferimento regionale e al laboratorio di riferimento esterno per poter effettuare un'analisi comparativa su campioni reali.

I risultati prodotti hanno mostrato un buon livello di armonizzazione, raggiunto tra i due laboratori di riferimento (Figura 4), e questo ottimo traguardo ha dato la possibilità di redigere procedure operative standard (Standard Operative Procedure, SOP) in ottemperanza ai rispettivi sistemi di qualità vigenti (ISO, JCI).

Fase post-analitica

Per quanto riguarda le modalità e le tempistiche di refertazione, anch'esse definite nella SOP sono state definite procedure comuni, che riporteranno l'identificativo della farmacia inviante, il numero di lotto e la data della preparazione, la data di accettazione e il metodo analitico impiegato (LC-MS/MS). Il referto è

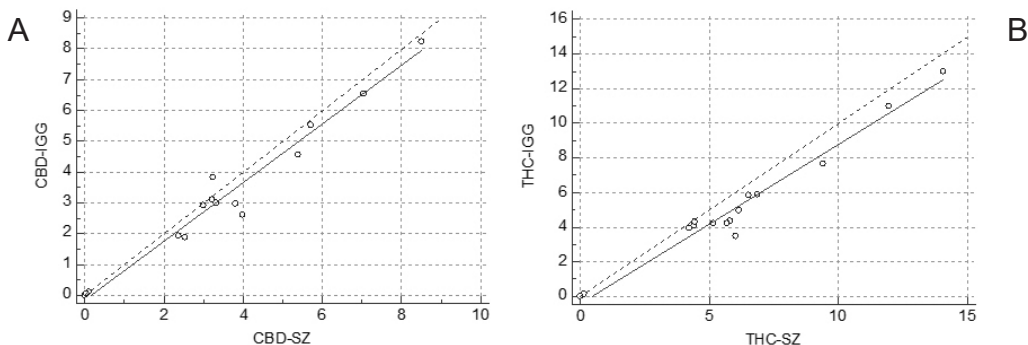


Figura 4
 Confronto dei risultati prodotti dai due laboratori mediante grafici “Passing Bablok” per CBD (A) e THC (B) rispettivamente. La pendenza e l’intercetta e i rispettivi intervalli di confidenza (95%CI) sono 0,9602 (0,8877-1,0327) e -0,1920 (-0,5187-0,1347) per CBD e 0,9233 (0,8188-1,0279) e -0,4555 (-1,1933- 0,2823) per THC. I grafici indicano buone correlazioni tra i risultati prodotti dai due laboratori sia per CBD che per THC

firmato digitalmente dai responsabili e inviato, a mezzo posta elettronica, entro 48 ore dal ricevimento del campione alle farmacie che hanno inviato il campione.

Lo schema generale della procedura è riportato nella Figura 5.

DISCUSSIONE

L’attuale normativa in materia di cannabis ad uso medico prevede che ciascun lotto di olio venga titolato per il contenuto di principi attivi per mezzo di strumentazione specifica (cromatografia liquida o gassosa accoppiata alla spettrometria di massa). In

particolare, la LC-MS/MS, presente in Liguria in alcuni laboratori clinici certificati che svolgono attività routinarie in ambito tossicologico e di monitoraggio terapeutico dei farmaci, garantisce elevata specificità ed accuratezza e una maggiore riproducibilità dei risultati. La conoscenza dell’esatto contenuto di cannabinoidi nelle preparazioni galeniche è importante per orientare correttamente i clinici nelle prescrizioni della terapia e per i farmacisti per valutare e assicurare la qualità della preparazione.

Il progetto sperimentale ha consentito di organizzare questa delicata attività presso due laboratori di riferimento regionale garantendo elevati standard di qualità e procedure certificate.

La realizzazione di questo progetto porta a numerosi vantaggi. Innanzitutto si ottiene una standardizzazione delle procedure di titolazione da parte delle farmacie ospedaliere che sono in questo modo tutte uniformate con un singolo protocollo operativo. Inoltre, i campioni possono essere trasportati in giornata dal personale delle ASL stesse con notevole risparmio sulle spese di trasporto e sulle tempistiche. Uno svantaggio potrebbe essere rappresentato dal fatto che una singola farmacia produttiva potrebbe dover spedire alternativamente ai due laboratori di riferimento anziché sempre allo stesso, come avveniva in precedenza, ma questo svantaggio viene ovviato dall’armonizzazione tra i due laboratori e la costante verifica della qualità che riduce al minimo la variabilità analitica inter-laboratorio.

Il protocollo di gestione del rischio adottato nel progetto può essere utilizzato come modello per altri progetti regionali e può essere esportato ad altre realtà extra-regionali.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

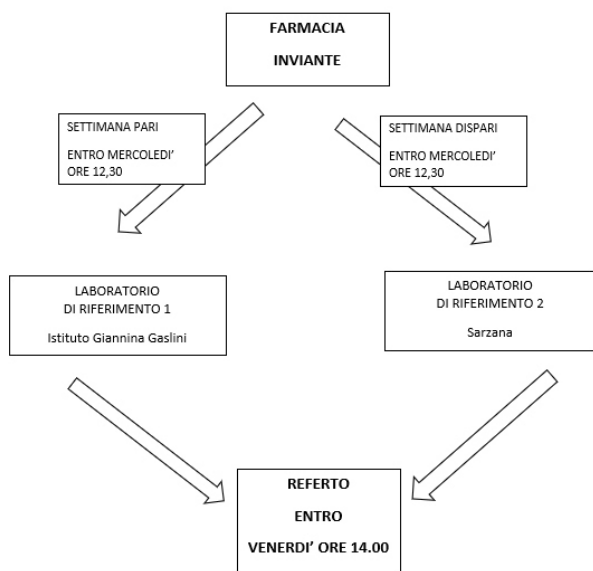


Figura 5
 Schema generale dei flussi di lavoro e tempistiche di refertazione

BIBLIOGRAFIA

- Decreto Ministeriale 9 novembre 2015. Funzioni di organismo statale per la cannabis previsto dagli articoli 23 e 28 della convenzione unica sugli stupefacenti del 1961, come modificata nel 1972. (15A08888). Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.279 del 30-11-2015). [https://www.epicentro.iss.it/farmaci/pdf/Decreto%20uso%20medico%20Cannabis%20\(GU%2030.11.2015\)%20.pdf](https://www.epicentro.iss.it/farmaci/pdf/Decreto%20uso%20medico%20Cannabis%20(GU%2030.11.2015)%20.pdf) (ultimo accesso: aprile 2020).
- Degenhardt F, Stehle F, Kayser O, et al. The biosynthesis of cannabinoids. In: Handbook of cannabis and related pathologies: biology, pharmacology, diagnosis, and treatment. Preedy VR (Ed). Academic Press, Elsevier, London, UK, 2017.
- Elsohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 2005;78:539-48.
- Russo EB. Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. *Ther Clin Risk Manag* 2008;4:245-59.
- Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol* 2011;163:1344-64.
- Russo EB, McPartland JM. Cannabis is more than simply delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;165:431-32.
- Huestis MA, Solimini R, Pichini S et al. Cannabidiol adverse effects and toxicity. *Curr Neuropharmacol* 2019;17:974-99.
- Mannucci C, Navarra M, Calapai F et al. Neurological aspects of medical use of cannabidiol. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2017;16:541-53.
- Gurney SM, Scott KS, Kacinko S et al. Pharmacology, toxicology, and adverse effects of synthetic cannabinoid drugs. *Forensic Sci Rev* 2014;26:53-78.
- Pacifici R, Marchei E, Salvatore F et al. Evaluation of long-term stability of cannabinoids in standardized preparations of cannabis flowering tops and cannabis oil by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:94-6. http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_5.jsp?lingua=italiano&area=sostanzeStupefacenti&menu=organismo (ultimo accesso: aprile 2020).
- Barco S, Fucile C, Manfredini L, et al. A UHPLC-MS/MS method for the quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in decoctions and in plasma samples for therapeutic monitoring of medical cannabis. *Bioanalysis* 2018 doi: 10.4155/bio-2018-0184.
- Pacifici R, Marchei E, Salvatore F et al. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1555-63.
- Pacifici R, Marchei E, Salvatore F et al. Stability of cannabinoids in cannabis FM1 flowering tops and oil preparation evaluated by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:e165-e168.
- Romano, LL, Hazekamp A. Cannabis oil: Chemical evaluation of an upcoming cannabis- based medicine. *Cannabinoids* 2013;1:1-11.
- Società Italiana Farmacisti Preparatori (SIFAP). (2016). Estratto oleoso di infiorescenze femminili di Cannabis. <https://www.sifap.org/procedure/estrazione-oleosa-di-infiorescenze-femminili-di-cannabis>. (ultimo accesso: maggio 2020).
- Carcieri C, Tomasello C, Simiele M, et al. Cannabinoids concentration variability in cannabis olive oil galenic preparations. *J Pharm Pharmacol* 2018; 70: 143-9.
- Delibera Regionale dell'Agenzia Ligure Sanitaria n.78/2018 dell'11/04/2018. https://www.alisa.liguria.it/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=339&Itemid=116&limitstart=70 (ultimo accesso maggio 2020).
- Citti C, Braghieri D, Vandelli MA et al. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *J Pharm Biomed Anal* 2018;147:565-79.
- Delibera Regionale dell'Azienda Ligure Sanitaria della Regione Liguria. 68/2020 del 4/3/2020. https://www.alisa.liguria.it/index.php?option=com_docman&view=docman&Itemid=116&limitstart=60 (ultimo accesso maggio 2020).
- A. D'Avolio, M. Cantù, J. Gervasoni et al. per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "La spettrometria di massa: applicazioni e innovazioni diagnostiche" Bioanalytical method validation of quantitative mass spectrometry based assay: Experimental protocols and regulations. *Biochim Clin* 2018;42:51-61.
- EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on bioanalytical method validation. E M E A / C H M P / E W P / 1 9 2 2 1 7 / 2 0 0 9 . https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (ultimo accesso maggio 2020).

Serial measurements of oxidative stress markers after ozone autohemotherapy

Andrea Bolner¹, Luigi Chiamenti², Giampietro Nordera¹, Ottavio Bosello³

¹Oxidative Stress Centre (CSOx), Verona, Italy

²Specialist in dentistry and physiotherapy, Garda, Verona, Italy

³Department of Medicine, University of Verona, Italy

ABSTRACT

Background: the ozone autohemotherapy (O₃-AHT) is an alternative medical practice where an aliquot of patient's blood is treated with an ozone-oxygen mixture (O₃/O₂), and reinfused to induce an hormetic effect, that is to obtain a mild oxidative stress that empowers the antioxidant response and improves the oxidative balance. The customization of the ratio O₃/O₂ and the amount of blood is a crucial aspect of this therapy. The measure of some biomarkers of oxidative balance may be useful to calibrate the treatment and avoid damages.

Methods: O₃-AHT was performed on 9 volunteers healthy subjects, treating 150 g of blood with 30 µg/mL O₃/mL O₂/g. Aliquots of blood and urine were collected before therapy (t₀), and 4, 8, 24 and 48 hours (t₄-t₄₈) after reinfusion to measure the derivatives of reactive oxygen metabolites (dROMs), the biological antioxidant potential (BAP), the single components of antioxidant barrier coenzyme Q10, and glutathione in both total (GSH+GSSG) and reduced (GSH) forms, the oxidative biomarkers homocysteine (Hcy), 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) and 2-deoxyguanosine (2-dG) and the nitrative biomarker 3-nitrotyrosine (3-NT).

Results: within the first 4-8 hours after O₃-AHT, as dROMs increased, the median of GSH had an initial considerable decrease (-20% at t₈ versus t₀) followed by a final net increase (+12% at t₄₈). In a similar way, 3-NT had an initial decrease (-19% at t₄) followed by a remarkable increase at t₈ and t₂₄ (+28% and +57% respectively) and a subsequent important decrease at t₄₈ (-44%), which led to final nitration levels lower than the one observed at t₀.

Conclusions: When used in correct concentrations, O₃ induces a moderate oxidative stress which initially consumes antioxidant species and produces nitrative damages. Within 24-48 hours however, the beginning of a virtuous counter-regulatory response that increases the reducing power (particularly GSH levels) and decreases molecular damages, improving the redox balance, can be observed. Serial measurements of GSH and 3-NT, allow to monitor that the induced oxidative stress causes only moderate and transient damages, and help the physician to choose the more effective O₃ therapeutic concentrations.

INTRODUCTION

One hundred and eighty years after discovery, despite initial suspicions due to its known oxidizing power (1), ozone (O₃) is employed today in medical field in some therapies for acute and chronic ailments (2-6). One of these treatments is the autohemotherapy (O₃-AHT) where the patient's blood is treated with an ozone/oxygen mixture (O₃/O₂) in order to obtain, after reinfusion, an hormetic effect when a mild oxidative stress stimulates and empowers a physiological counter-regulatory antioxidant response (7). The customization of the ratio between O₃/O₂ and the amount of blood, according the concept of "up-dosing system" (*start slow*,

go slow) (3), remains nevertheless a crucial aspect that requires careful medical control (6).

The reported beneficial effects of O₃-AHT span from immunoregulatory and anti-inflammatory properties to antioxidant activity, antimicrobial effect, analgesic and vasodilatory roles, blood flow and oxygenation promotion, modulation of regenerative processes and epigenetic modifications (8-9). The hormetic action of O₃, also indicated as "oxidative preconditioning" (10), arises from a functional cross-talk where several biochemical pathways and modulators as the (erythroid-derived 2)-like 2 nuclear factor (Nrf2) (11), the nuclear factor κB (NFκB) (12) and signalling molecules as 4-hydroxynonenal (4-HNE) interact (13).

Corrispondenza a: Andrea Bolner, CSOx Verona, E-mail bolner.andrea@gmail.com

Ricevuto: 03.05.2020

Revisionato: 07.05.2020

Accettato: 06.06.2020

Publicato on-line: 15.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.069

Since the therapeutic success of O₃-AHT depends on the modulation of these metabolic pathways, it is of great interest to evaluate the biochemical modifications *in vivo*, together with the clinical effects, in order to verify that the inflammatory pathway mediated by NFκB does not prevail over the antioxidant response activated by Nrf2. For this purpose, we have proposed the measurement of some relevant biomarkers (14-15), in order to describe their reciprocal variations and the interactions between the biochemical processes involved during the first 48 hours after therapy. The analysis of the oxidative damage markers, particularly, may be useful in choosing the most appropriate O₃ concentrations to obtain the desired results, avoiding the appearance of permanent oxidative alterations.

METHODS

Subjects

Nine volunteers healthy subjects, 4 male and 5 females, aged between 60 and 68 were enrolled for this study. Their health status was confirmed by previous clinical-anamnestic visits and measurements of routine biochemical tests. Although they were subjects that in the past years have underwent occasional O₃-AHT, they subscribed before the therapy, an informed consent for personal data treatment, in accordance with the General Data Protection Regulation (GDPR). The study was carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans (16).

Autohemotherapy protocol

150 g of blood have been drawn, treated with O₃ and subsequently reinfused in a fast procedure according to the 2015 Recommendations of the International Scientific Committee of Ozone Therapy (ISCO₃) (17). The blood was flowed directly into a certified bag. Without detaching the sampling needle from the subject, a special device introduced a gaseous mixture of oxygen and ozone into the bag and mixed it with the blood. The tourniquet was then removed from the arm, the bag was lifted and blood flowed back into the patient. The O₃ generator was a HAB Medozon Compact, Herrmann (Elsfeld, Germany). The treatment was performed with a concentration of 30 µg O₃/mL O₂/g, and each blood reinfusion has been completed in 7-10 minutes.

Biological samples

Blood samples were collected before (t0) and 48 hours (t48) after O₃-AHT, in vacuum sealed tubes with EDTA, sodium citrate or without anticoagulant, as required by each analytical method. After sampling, the tubes were immediately centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes at 4 °C and plasma and serum samples were frozen at -80 °C, until analysis. Spot urines aliquots were also collected at both times and frozen. The blood collections were repeated at 4, 8, and 24 hours (t4, t8 and t24) after reinfusion.

Laboratory tests

At t0 and t48, a complete panel of oxidative biomarkers was performed. The oxidative balance was evaluated through the serum measurements of derivatives of reactive oxygen metabolites (dROMs) and total biological antioxidant potential (BAP). Moreover, EDTA whole blood total (GSH+GSSG) and reduced (GSH) glutathione and plasma coenzyme Q10 were analysed as specific components of the antioxidant endogenous barrier. To feature the oxidative distress plasma 3-nitrotyrosine (3-NT), as marker of irreversible nitration on proteins, and urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) and 2-deoxyguanosine (2-dG), as marker of oxidative damage on nucleobases (18) were measured. These latter analytes were expressed both as creatinine ratio (8-OHdG/creatinine, 2-dG/creatinine), and as their ratio (8-OHdG/2-dG). Plasmatic homocysteine (Hcy) was also measured as independent marker of cardiovascular risk, partially related to the free radicals increases (19). The redox balance (Index) was calculated by an experimental algorithm that relates the values of the d-ROMs and BAP between them and with their respective cut-off:

$$(BAP/BAP_{cut-off})/(d-ROM_{cut-off}/d-ROMs)$$

The amount of the blood reductive environment was expressed as the percentage of reduced *versus* total glutathione (GSH%). At the intermediate times t4, t8, and t24, the measurements of GSH+GSSG, GSH, GSH%, 3-NT, BAP, dROMs and Index were also performed.

Glutathione and Hcy were analyzed by high performance liquid chromatography and fluorometric detection (HPLC-FL). Q10 and 3-NT by ultraviolet detection (HPLC-UV), using commercial kits from Eureka Lab Division (Chiaravalle, Italy). The markers of oxidative damage on nucleobases, 8-OHdG and 2-dG were measured in urines with a HPLC method and electrochemical detection, as previously reported (20).

The Gilson HPLC system, controlled by Unipoint software, consisted of two pumps (models 306 and 307), and a 234 autosampler; the columns and the mobile phases are those provided with the kits. The detections were performed with 875 UV photometer, 1520 fluorometer Jasco and with electrochemical detector Coulochem II ESA, fitted with a model 5011 high-sensitivity cell.

The oxidizing capacity of plasma, expressed as total content of peroxides (dROMs), and the biological antioxidant potential (BAP), expressed as total content of antioxidant species, were determined with two colorimetric end-point assays from Diacron (Grosseto, Italy) and a microplates ELX-800 spectrophotometer (Biohit). Urine creatinine was measured on AU-5800 Beckman Coulter analyzer.

Statistics

For each parameter, mean, standard deviation, median and interquartile range (IQR) were calculated;

due to the asymmetry in the distribution of some parameters, the data used for discussion were median and IQR only. As this was a study without control group, all the data were evaluated both considering the longitudinal trend of the median percentage deviations compared to t0, and comparing the data obtained for each subject at different times with Friedman's non-parametric test for repeated measurements as well. The processing was performed with STATA program (version 13.1) and the significant threshold was fixed at 5% (p-value <0.05). The deviations of medians from the baselines were also evaluated comparing them with the critical delta values (CDVs), calculated from biological and analytical variabilities of each biomarker, as previously reported (15,21).

RESULTS

At basal conditions (t0), the medians of dROMs were above the upper limit of reference range (ULRR), while those of the antioxidant barrier biomarkers Q10 and BAP were close to the limits of the lower reference range (LLRR) (Figure 1). Consequently, the calculated Index was <1 (the reference value has been settled to 1), showing a redox imbalance of medium grade (Table 1). Total and reduced glutathione, on the contrary, were well represented with median values fully in the range. The oxidative biomarkers Hcy, 3-NT, 8OHdG and 2dG were also at normal levels.

After 48 hours from O₃-AHT, the median of GSH+GSSG compared to the baseline was almost

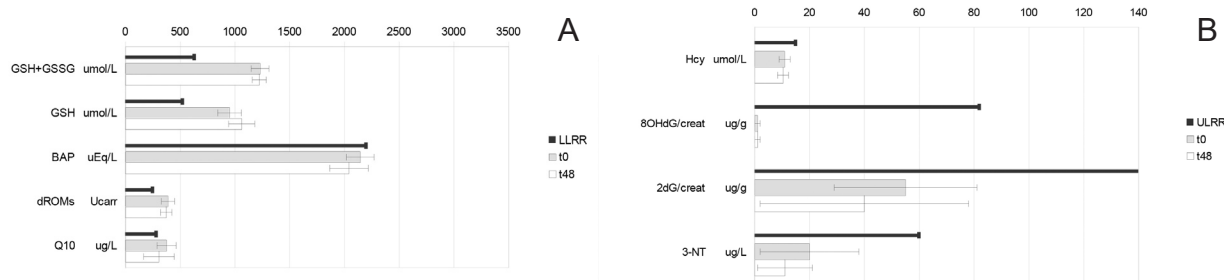


Figure 1
Levels of oxidative biomarkers at t0 and t48: each parameter is reported as median of the relative concentration ± IQR. Since the pathophysiological significance is different for each analyte, in the panel A the black line represents the lower limit (LLRR), and in B the upper limit of reference range (ULRR).
IQR, interquartile range; GSH, reduced glutathione; GSH+GSSG, total glutathione; BAP, biological antioxidant potential; dROMs, derivatives of reactive oxygen metabolites; Q10, coenzyme Q10; Hcy, homocysteine; 3-NT, 3-nitrotyrosine; 8OHdG, 8-hydroxy-deoxyguanosine; 2dG, 2-deoxyguanosine

Table 1
Descriptive statistics of the parameters measured before (t0) and after (t48) ozone autohemotherapy (O₃-AHT); for each analyte the p values obtained by comparison between times with Friedman test are reported: * indicates the significant values (p<0.05)

	Before O ₃ -AHT (t0)				After O ₃ -AHT (t48)				p value
	mean	SD	median	IQR	mean	SD	median	IQR	
GSH+GSSG (umol/L)	1207	164	1229	161	1201	149	1222	128	0.017*
GSH (umol/L)	977	176	950	215	1013	169	1061	238	0.004*
GSH%	81	9	81	13	85	14	87	15	0.033*
BAP (umol/L)	2205	288	2145	252	2121	219	2041	352	0.048*
dROMs (U carr)	398	80	388	120	383	70	372	104	0.048*
Index	0,77	0,13	0,80	0,15	0,77	0,13	0,78	0,13	0.249
Q10 (ug/L)	365	153	375	175	355	185	306	279	0.706
Hcy (umol/L)	11,8	4,7	10,9	4,9	12,3	5	10,3	3,7	0.789
3-NT (ug/L)	30	24	20	43	20	14	11	25	0.001*
8OHdG (ug/g creatinine)	3	2	1	3	3	3	1	5	1.000
2dG (ug/g creatinine)	91	126	55	51	79	84	40	91	0.683
8OHdG/2dG (ng/ug)	43	20	49	16	50	41	49	14	0.414

SD, standard deviation; IQR, interquartile range; GSH, reduced glutathione; GSH+GSSG, total glutathione; BAP, biological antioxidant potential; dROMs, derivatives of reactive oxygen metabolites; Index, redox balance; Q10, coenzyme Q10; Hcy, homocysteine; 3-NT, 3-nitrotyrosine; 8OHdG, 8-hydroxy-deoxyguanosine; 2dG, 2-deoxyguanosine.

unchanged (-1%), the Q10 median showed a decrease (-19%) while those of GSH and GSH% were increased (+12%, +7%, respectively). Since both BAP and dROMs were simultaneously decreased (-5% and -4%), the Index was only slightly decreased (-2%).

Among oxidative biomarkers, Hcy, 3-NT and 2-dG were decreased at t48 (-6%, -44% and -27% respectively), 8OHdG was slightly increased (+13%), while 8OHdG/2dG ratio was unchanged. None of the variations observed between t0 and t48 were higher than the critical delta value (CDV) calculated for each parameter (Figure 2).

The measurements performed from t4 to t24 showed that both GSH+GSSG and GSH were decreased in the first hours, followed by a subsequent recovery that resulted in the net increase in GSH observed at t48. This trend was highlighted by the changes of GSH%: -3% and -17% at the early times t4 and t8; -4% at t24 and +7% at t48 (Figure 2). On the contrary, both BAP and dROMs had an initial tendency to increase at the intermediate times, but nevertheless the calculated Index, initially increased, declined at t48 with a return almost to the baseline (-2%). At the same times, the median of 3-NT showed a large variation: an initial decrease (-19%) was followed by a remarkable increase (+28% and +57% at t8 and t24) and a subsequent important decrease at t48 (-44%), which led to final nitration levels lower than baseline. All the variations of the measurements of glutathione, BAP, dROMs and 3-NT through the five time points were statistically significant (Table 1).

DISCUSSION

It is well known that O₃ dissolve rapidly in the aqueous component of plasma and react both with polyunsaturated fatty acids and water, producing peroxides and finally derivatives such 4-HNE and

reactive oxygen species (ROS). Therefore, O₃ treatment may causes pro-oxidant, pro-inflammatory and pro-apoptotic effects on blood and endothelial cells (12). Instead, provided that the O₃ concentration chosen for the therapy is optimal, the mild oxidative-inflammatory stress induced by activation of the transcription factor NfKB, turns on a counter-regulatory antioxidant response. The cytoplasmatic factor Nrf2 dissociates from its inhibitor Keap-1, moves into the nucleus and promotes the transcription of the so-called antioxidant response elements (ARE), enzymes such superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and heme oxygenase-1 (HO-1) that are radical scavenger and contrast the transient oxidative stress caused by O₃. In particular, HO-1 acts by degradating heme in iron, carbon monoxide (CO) and biliverdin, (a precursor of bilirubin); CO then plays an inhibiting role within the inflammation pathway started by NFKB, while bilirubin has a direct role as lipophilic antioxidant of biological barrier.

Previous studies have already shown that O₃-AHT may reduce lipid and protein oxidation markers, decrease lipofuscin deposition and restore GSH levels (10); timed measurements of these analytes after treatment were however rarely done (4), preventing thus the description of the respective dynamics.

Our study could demonstrate that, in the 8 hours following O₃-AHT, an initial decrease in both total and reduced forms of glutathione occurs; it can be postulated that this was a consequence of a consumption of GSH acting as scavenger towards the ROS formed in the early stages of treatment. Actually, the total peroxydes dROMs showed an increase, both at t4 and t8. The subsequent progressive rise of GSH+GSSG concentrations at t24, with a complete restore at t48, indicate that, after the initial loss, there was probably an activation of glutathione neo-synthesis but, above all, an

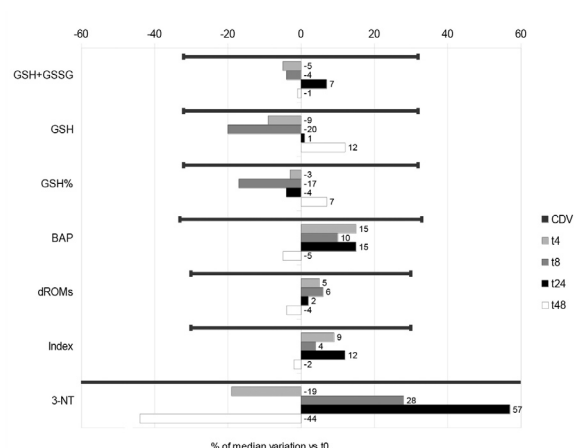


Figure 2
Trends of the redox balance, antioxidant barrier and nitrate damage biomarkers at times t4 to t48; for each parameter, the variations are reported as percentage of the medians versus t0. The black line represents the respective calculated critical delta value (CDV) GSH, reduced glutathione; GSH+GSSG, total glutathione; GSH%, reduced versus total glutathione percentage; BAP, biological antioxidant potential; dROMs, derivatives of reactive oxygen metabolites; Index, redox balance; 3-NT, 3-nitrotyrosine.

improvement of the reducing environment highlighted by the final levels of GSH and GSH%. On the other hand, we observed a parallel decrease of dROMs already at t24 and a subsequent decrease at final values lower than those observed at t0.

Despite the initial increase of dROMs, the antioxidant barrier BAP at t24 was persistently higher than the initial one: this increase may be partly attributed to the action of HO-1 that, activated by O₃, degraded the heme and produced bilirubin which, together with uric acid and other reducing species, composes the total antioxidant barrier. After 48 hours, the initial enhancement of BAP was however exhausted, due to the probable consumption of antioxidant species in the non-enzymatic contrast of ROS, as confirmed also by the decrease of Q10.

Among the biomarkers of oxidative damage measured, Hcy showed no variation between t0 and t48. The basal values of 8OHdG and 2dG observed in our population were close to the LLRR, and showed the same pattern; specific comments are consequently not possible. Otherwise, the variations of the nitration marker 3-NT over times are rather interesting. It should be first remembered that 3-NT is considered a redox imbalance marker since the nitration of tyrosine follows the reaction between nitrogen monoxide (NO) with the free radical superoxide anion ($\bullet\text{O}_2$). By exceeding the physiological levels, NO and $\bullet\text{O}_2$, form peroxynitrite, a non radical oxygen species with cytotoxic action. It is also known that NO acts physiologically as second messenger in numerous signalling pathways, many of these in the bloodstream, involving the cardiovascular system. By activating guanylyl-cyclase, NO induces the conversion of guanosine-5'-triphosphate (GTP) to cyclic guanosine-monophosphate (cGMP) (22) and controls vascular smooth muscle tone, inhibition of platelet aggregation, adhesion of leukocytes to the endothelium (23), cardiac reserve and hearth function (24).

The synthesis of NO by conversion of arginine to citrulline is catalyzed by specific synthases, two physiologically active, neuronal (nNOS) and endothelial (eNOS), and one inducible isoform (iNOS) (22). Because, among its multiple effects, O₃ is a powerful activator of iNOS, O₃-AHT may increase the NO production improving the blood perfusion of tissue. At same time, the tissues oxygenation is also increased, as O₃ activates the erythrocyte glycolysis, increases the synthesis of 2,3 diphosphoglycerate and promotes the release of O₂ from hemoglobin. However, an excessive up-regulation of iNOS, that may occur in consequence of stimuli like the release of inflammatory cytokines and consequent production of ROS such $\bullet\text{O}_2$, can cause increases of NO concentrations beyond physiological levels with formation of peroxynitrite and consequent rising of 3-NT (24).

Our data show that after O₃-AHT, 3-NT initially decreases at t4, and then sharply increases at t8 and t24 (Figure 2). While the increments of 3-NT at t8 and t24 may be attributed to the O₃ activation of iNOS, it can be

assumed that the initial decrease was caused by an inhibition of one NO synthase, and/or by a scavenging action on NO. It has been previously shown, that bilirubin produced by action of HO-1 activated by O₃, acts both as antioxidant, direct NO scavenger (25) and inhibitor of nNOS (26). It can be postulated that this inhibition could be carried out even towards eNOS. Unfortunately, the sole analysis of plasma 3-NT cannot distinguish the origin of NO and previously reported data were not univocal in this regard. Indeed, in consequence of stimuli that induce iNOS, some studies *in vitro* showed a contemporary decrease of eNOS (23,27), and some others an increase (4,28). Anyhow, it is interesting to underline that the measurements of 3-NT allowed us to monitor the up-regulation of iNOS between t8 and t24 and to demonstrate, thanks to the therapeutic concentration of O₃ employed, that the nitration level did not exceed ULRR (Figure 1). The benefits obtained with the O₃-AHT have been clearly showed at t48 by the overall decrease of nitrate damage that, together with the rise of the reducing power of GSH, allowed to highlight the substantial success of the therapy in improving the redox balance in bloodstream.

CONCLUSIONS

When O₃ is administered in appropriate concentrations, it induces within a few hours a transient oxidative unbalance in which ROS increases, reducing equivalents are consumed and moderate nitrate damages appear. Immediately after, within 24-48 hours, the cross-talk between the metabolic pathways activated by the same ROS, starts a virtuous counter-regulatory response that increases the reducing power, decreases oxidative damage, and improves the initial redox conditions of patients.

Even within the limits due to the sample size, our data show that the measurement of an adequate panel of oxidative biomarkers, in close temporal succession, allows to follow step by step the reversibility of the induced oxidative stress. In particular, the measurements of GSH and 3-NT can be proposed as an aid for the physician to customize the therapy and choose the more effective concentrations of O₃ for the treatment.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCE

1. Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med* 1994;17:451-65.
2. Bocci V. Ozone as a bioregulator. *Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today*. *J Biol Regul Homeost Agents* 1996;10:31-53.
3. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, et al. Studies on the biological effects of ozone: 8. effects on the total

- antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediators Inflamm* 1998;7:313-17.
4. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm* 2000;9:271-6.
 5. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, et al. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev* 2009;29:646-82.
 6. Clavo B, Rodriguez-Esparragon F, Rodriguez-Abreu D, et al. Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: review and prospects. *Antioxidants (Basel)* 2019;8:588.
 7. Di Mauro R, Cantarella G, Bernardini R, et al. The biochemical and pharmacological properties of ozone: the smell of protection in acute and chronic diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:634.
 8. Travagli V, Zanardi I, Bernini P, et al. Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. *Int J Toxicol* 2010;29:165-74.
 9. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol* 2018;56:235-41.
 10. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, et al. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res* 2017;7:212-19.
 11. Galiè M, Covi V, Tabaracci G, et al. The role of Nrf2 in the antioxidant cellular response to medical ozone exposure. *Int J Mol Sci* 2019;20:4009.
 12. Scassellati C, Ciani M, Galoforo AC, et al. Molecular mechanisms in cognitive frailty: potential therapeutic targets for oxygen-ozone treatment. *Mech Ageing Dev* 2020;186:111210.
 13. Chapple SJ, Cheng X, Mann GE. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol* 2013;1:319-31.
 14. Bolner A, Micciolo R, Bosello O, et al. A panel of oxidative stress markers in Parkinson's disease. *Clin Lab* 2016;62:105-12.
 15. Bolner A, Berizzi C, Benedetto S, et al. Marked differences in redox status of professional soccer players depending on training types. *AJRMS* 2016;6:8-20. <http://www.ajrms.com/?mno=48465> (last access: april 2020).
 16. Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. <http://www.healthscience.net/resources/declaration-of-helsinki/> (last access: april 2020).
 17. Madrid declaration on ozone therapy. International Scientific Committee of Ozone Therapy (ISCO3). <https://isco3.org/wp-content/uploads/2015/09/Update-May-2015-for-ISCO3.pdf> (last access: april 2020).
 18. Bolner A, Pilleri M, Bosello O, et al. Oxidative damage on nucleobases and Hoehn-Yahr stage in Parkinson's disease. *AJRMS* 2018;3:36-47. <https://www.ajrms.com/?mno=297974> (last access: april 2020).
 19. Ientile R, Curro M, Ferlazzo N, et al. Homocysteine, vitamin determinants and neurological diseases. *Front Biosci* 2010;2:359-72.
 20. 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. *Clin Lab* 2011;57:859-66.
 21. Fraser CG. Reference change values. *Clin Chem Lab Med* 2011;50:807-12.
 22. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 2013;1:244-57.
 23. Albrecht EW, Stageman CA, Tiebosch AT, et al. Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *Am J Transplant* 2002;2:448-53.
 24. Liu YH, Carretero OA, Cingolani OH, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H2616-23.
 25. Barone E, Trombino S, Cassano R, et al. Characterization of the S-denitrosylating activity of bilirubin. *J Cell Mol Med* 2009;13:2365-75.
 26. Mancuso C, Capone C, Ranieri SC, et al. Bilirubin as an endogenous modulator of neurotrophin redox signaling. *J Neurosci Res* 2008;86:2235-49.
 27. Wartenberg M, Schallenberg M, Hescheler J, et al. Reactive oxygen species-mediated regulation of eNOS and iNOS expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer* 2003;104:274-82.
 28. Zhang YQ, Ding N, Zeng YF, et al. New progress in roles of nitric oxide during hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2017;23:2505-10.

Un mondo senza significatività statistica?

Luisa Zanolla

Università di Verona

ABSTRACT

A word without statistical significance?

A recently published comment (Nature, 2019), proposing to give up the use of the P value in scientific literature, spurred several contributions on the topic. The main target was the need to avoid the dichotomization of P, with $p < 0.05$ identifying the statistically significant results. A first proposal was to lower the threshold value to 0.005, labeling as “suggestive” results previously classified as significant but not meeting the new threshold. A more radical suggestion was to suppress the use of P, allowing its presence only in a descriptive sense. At the time of writing, only one journal took such a radical position, and this choice gave rise to problems in the interpretation of studies’ results. To avoid p-hacking and other inappropriate uses of P, the most sensible strategy would be to mandate the pre-publication of the study protocol, including the statistical analysis. The authors should then be required to adhere to their original published plan. This rule could be of great help for pragmatic trials, but does not apply to exploratory studies, which are more frequent in life sciences. It could also be imposed to report the P value only for sufficiently large sample sizes, reporting otherwise only descriptive statistics. Moreover, the term “statistical significance” could be replaced by “statistical accuracy,” in order to avoid the common confusion with “clinical significance”. This debate probably will not lead to the abandonment of P, but it may help to improve the quality of the statistical analysis of trials’ results.

INTRODUZIONE

Per milioni di articoli scientifici la probabilità di essere pubblicati, da molti decenni, dipende dall’aver ottenuto valori di $p < 0,05$ nei test statistici impiegati, per dimostrare la “significatività” dei risultati. L’uso di questa pratica è però da tempo messo in discussione, e il tema è nuovamente balzato all’attenzione del mondo scientifico quando, sul numero di *Nature* del 21 marzo 2019 (1), è stato pubblicato un commento nel quale si richiede, forse provocatoriamente, l’abbandono del concetto di “significatività statistica”. Gli Autori del lavoro avevano preliminarmente sottoposto la bozza dell’articolo ad altri accademici; più di 800 scienziati, statistici, clinici e ricercatori medici da più di 50 paesi l’avevano sottoscritta.

La richiesta lascia perplesso il lettore delle ricerche in ambito biomedico, dove la significatività statistica compare come misura della credibilità dei risultati di uno studio. Ma quello che gli Autori e i sottoscrittori invocano, innanzitutto, non è letteralmente l’abbandono del test statistico e del valore di P che ne deriva, ma soprattutto quello del suo uso in forma dicotomica, per

cui una P di poco inferiore a 0,05 individua uno studio significativo, mentre un valore di poco superiore consente di asserire che “*non vi sono differenze significative*” tra i gruppi. È quello che Senn chiama “*la comune abitudine di trasformare le sfumature di grigio in bianco e nero*” (2). Il problema, insomma, non è nel metodo, ma, come Ioannidis JPA sottolinea (3), è il modo in cui il metodo è utilizzato.

Una conseguenza negativa di questa pratica è il fenomeno noto come *p-hacking* (4) o *inflation bias*: si osserva quando lo sperimentatore prova diverse analisi statistiche e/o criteri di inclusione, fino ad individuare e a presentare quello che produce risultati significativi; quando i dati vengono analizzati durante il corso dello studio, che viene interrotto quando il risultato è significativo; quando vengono raccolte più variabili di risposta e riportata solo quella che risulta significativa; quando vengono modificati i criteri di esclusione per ottenere una casistica che dia un risultato significativo.

Il test statistico di verifica d’ipotesi rappresenta la tecnica più utilizzata nella letteratura in ambito biomedico, delle scienze sociali e della fisica (5). La maggior parte di questi ambiti usa un valore soglia di P

Corrispondenza a: Luisa Zanolla, Via Albere 73, 37138 Verona, E-mail luisa.zanolla@univr.it

Ricevuto: 14.04.2020

Revisionato: 14.04.2020

Accettato: 06.05.2020

Pubblicato on-line: 19.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.051

di 0,05; vi sono alcuni campi in cui vengono usati valori soglia diversi, quali $p \leq 5 \times 10^{-8}$ nell'epidemiologia genetica (6), ma si tratta di situazioni limitate e selettive.

In epoca antecedente alla diffusione dei computer, la significatività statistica veniva verificata confrontando il valore di P con le tabelle statistiche; poiché queste riportavano i valori di P per un numero limitato di valori (ad esempio 0,05, 0,02, 0,01 e 0,001) era invalso l'uso di riportare il valore di P come $p < 0,05$ o $p < 0,01$, o addirittura in forma di asterischi, un asterisco per $p < 0,05$, due per $p < 0,01$. Attualmente vi è un consenso unanime sul fatto che tale modo di presentare i valori di P, che ancora si riscontra, non sia ottimale, e che sia preferibile (come indicato da Biochimica Clinica, nelle sue Norme per gli Autori) riportare i numeri esatti, facilmente ottenibili dai software statistici.

Il numero di articoli che riportano il valore di P è aumentato progressivamente nel tempo.

L'INTERPRETAZIONE DI P E I SUOI LIMITI

Secondo Fisher RA, uno dei grandi padri della statistica contemporanea, la definizione corretta del valore P è "la probabilità del valore osservato (della statistica test), o di risultati più estremi, se l'ipotesi nulla è vera". Questa è la definizione più citata, ma una definizione più completa (7) richiede che non solo l'ipotesi saggiata sia vera, ma che ogni assunzione dell'intero modello allo studio sia corretta. Più basso è il valore di P, tanto più i dati sono incompatibili con l'ipotesi nulla, se tutte le assunzioni del modello sono corrette. Un basso valore di P, però, non è informativo se sia l'ipotesi saggiata a risultare non plausibile, o un altro assunto del modello ad essere errato.

L'aspetto probabilmente più complesso, infatti, soprattutto per chi statistico non è, risulta costituito dalla corretta interpretazione del significato di P.

Occorre avere ben chiaro che il valore di P è principalmente la risultante di due componenti (8): l'entità dell'effetto e la precisione della stima. Se le due componenti non sono riportate separatamente, l'informazione pertinente non può essere dedotta dal valore di P. È quindi importante che siano presentati gli intervalli di confidenza e la stima degli effetti, anche come complemento informativo, non necessariamente come alternativa a P.

Ad esempio, immaginiamo due studi, ciascuno dei quali confronta un nuovo farmaco con un farmaco standard, per il quale la percentuale di *responders* è del 50%: il primo studio non risulta statisticamente significativo ($p=0,09$), mentre il secondo dà un risultato statisticamente significativo ($p=0,005$). Sulla base di P soltanto, si sarebbe portati a concludere che il primo farmaco non sia superiore al farmaco standard, mentre il secondo sì. Disponendo di tutte le informazioni, però, scopriamo che il primo nuovo farmaco ha una percentuale di *responders* del 62% (ben superiore quindi al farmaco standard), ma lo studio è stato condotto su 200 pazienti soltanto, mentre il secondo nuovo farmaco ha una percentuale di *responders* del

50,2% (quindi di poco superiore al farmaco standard) ma lo studio è stato condotto su 2 milioni di pazienti. Il riportare l'intervallo di confidenza non è utile solo per informare sulla precisione della stima; occorre infatti che il lettore sia consapevole che non solo il valore della stima puntuale ma tutto l'intervallo rappresenta una gamma di valori possibili come esito dello studio (date le assunzioni statistiche utilizzate per il calcolo dell'intervallo).

Ad esempio, nello studio ODISSEY OUTCOMES (9) la mortalità totale risultava ridotta del 15%, come indicato da un hazard ratio (HR) di 0,85, con il trattamento con alirocumab e statina, rispetto al trattamento con sola statina. L'intervallo di confidenza dell'HR, però, spaziava da 0,73 a 0,98, indicando che anche l'ultimo valore rientrava nell'intervallo dei valori possibili secondo la stima intervallare, e quindi che una riduzione del 2% solo, era tra i possibili esiti del trattamento.

Lo studio non è statisticamente significativo ($p > 0,05$)

Il concetto che un risultato non statisticamente significativo non "dimostra" l'ipotesi nulla (cioè che non vi sono differenze tra i gruppi confrontati) è stato sottolineato dagli statistici da lunga data. Come Altman e Bland avevano sintetizzato (10), "l'assenza di evidenza non è evidenza di assenza", ovvero "lo studio non ha dimostrato una differenza" piuttosto che "lo studio ha dimostrato che non c'è una differenza". Il lettore potrebbe obiettare che questa erronea interpretazione è stata così ripetutamente stigmatizzata dalle riviste da dover essere quasi scomparsa; tuttavia, gli Autori dell'articolo di *Nature*. (1) hanno riportato la sintesi di quattro articoli metodologici (11-14), che riscontravano nel 51% di 791 articoli, tale problema.

Il primo fattore da considerare, quando uno studio risulti non statisticamente significativo, è l'influenza della dimensione del campione. Vediamo come esempio lo studio PREDIMED Plus (15). La riduzione nei trigliceridi a 6 mesi nel gruppo sottoposto all'intervento sullo stile di vita non era statisticamente significativa ($p=0,12$), come evidenziato dal fatto che l'intervallo di confidenza include il valore di non effetto, cioè lo zero. Se la numerosità del gruppo fosse raddoppiata (654 soggetti), la stessa differenza sarebbe risultata significativa ($p=0,03$) e l'intervallo di confidenza non includerebbe lo zero (Figura 1).

In ogni caso, anche uno studio negativo ha un significato, un valore ed un impatto, in quanto riduce la verosimiglianza dell'esistenza del fenomeno studiato.

Lo studio è statisticamente significativo ($p \leq 0,05$)

Il primo aspetto su cui fissare l'attenzione davanti ad un risultato statisticamente significativo è il concetto, più volte sottolineato, che la significatività statistica non implica una significatività o rilevanza clinica. Uno studio

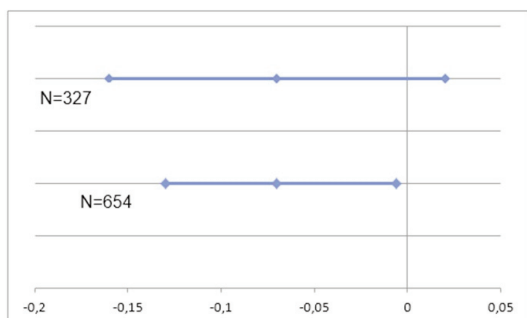


Figura 1

La variabile riduzione nei trigliceridi a 6 mesi (media e intervallo di confidenza) nello studio PREDIMED (14), nel gruppo sottoposto all'intervento sullo stile di vita non era statisticamente significativa ($p=0,12$). Se la numerosità del gruppo fosse raddoppiata (654 soggetti), la stessa differenza sarebbe risultata significativa ($p=0,03$).

condotto con metodologia accurata su una casistica di numerosità elevata può arrivare a dimostrare la significatività statistica di variazioni così piccole da risultare prive di rilevanza nella pratica clinica.

Inoltre, anche con questo risultato più "favorevole", c'è il problema che non conosciamo la reale prevalenza di studi nei quali l'ipotesi nulla sia falsa. L'epidemiologo Lash TH (16) chiarisce bene questo concetto usando l'analogia con gli esami di laboratorio. L'errore di I tipo, usualmente indicato con α , rappresenta un errore di falso positivo. Infatti, rifiutando l'ipotesi nulla, si dichiara esistente una differenza che nella realtà, che non conosciamo ma sulla quale stiamo inferendo, non esiste. L'errore di II tipo, indicato con β , è il complemento ad 1 della potenza fissata durante il disegno dello studio, e rappresenta un errore di falso negativo.

Lash propone di pensare il valore di P come il risultato di un esame diagnostico, per cui i valori inferiori ad α rappresentano i test positivi e quelli superiori ad α i test negativi. In questa concettualizzazione, il complemento di α (ad esempio $1-0,05=0,95$) può essere interpretato come la proporzione di soggetti sani che per i quali l'esame ha dato esito negativo, cioè i veri negativi; dato che stiamo utilizzando proporzioni, esso rappresenta la specificità dell'esame diagnostico. La potenza dello studio (il complemento di β) può essere interpretata come la proporzione di soggetti con malattia per i quali l'esame ha dato esito positivo, quindi i veri positivi, il che espresso in proporzione costituisce la sensibilità dell'esame diagnostico.

Ma davanti al risultato positivo di un esame di laboratorio, per il clinico non è di grande utilità conoscerne specificità e sensibilità; quello che interessa è sapere qual è la probabilità che il paziente abbia veramente la patologia considerata, cioè il valore

predittivo positivo dell'esame. A parità di specificità e sensibilità, l'utilità predittiva dell'esame, descritta dal valore predittivo positivo, aumenta al crescere della prevalenza della patologia nella popolazione considerata: ad esempio, gli esami di screening hanno più utilità predittiva nelle popolazioni ad alto rischio. Nel caso del test d'ipotesi, invece, ci scontriamo con il fatto che non conosciamo lo stato di realtà dell'ipotesi nulla, cioè non sappiamo quanti siano i casi in cui l'ipotesi nulla sia vera e quanti quelli in cui sia falsa.

Si immagini una situazione di ricerca altamente innovativa, nella quale gli studi per cui esiste nella realtà una differenza tra i gruppi (cioè per cui si può realmente rifiutare l'ipotesi nulla) siano l'1% del numero totale di studi; su 10 000 studi, solo 100 potranno realmente rifiutare l'ipotesi nulla. Con una potenza dell'80% ($\beta=0,20$), 80 di questi 100 studi risulteranno statisticamente significativi, costituendo i veri positivi. Vi saranno 9 900 studi nei quali l'ipotesi nulla è vera; con $\alpha=0,05$, vi saranno 495 studi ($9\,900 \times 0,05$) che forniranno un risultato statisticamente significativo, costituendo i falsi positivi. Il valore predittivo positivo di uno studio che risulti statisticamente significativo sarà quindi approssimativamente del 14% [$80 / (80+495)$].

Immaginiamo situazioni di ricerca più comuni, nelle quali gli studi per i quali l'ipotesi nulla sia realmente tale siano il 50% del numero totale; il valore predittivo positivo di uno studio che risulti statisticamente significativo sarà quindi approssimativamente del 94%. L'andamento del valore predittivo positivo in funzione della percentuale di studi in cui l'ipotesi nulla sia vera è riportato in Figura 2. Il problema è che, in pratica, non disponiamo di informazioni su quale sia la percentuale di studi in cui effettivamente non ci sia differenza tra i gruppi; in altre parole, non conosciamo lo stato reale dell'ipotesi nulla.

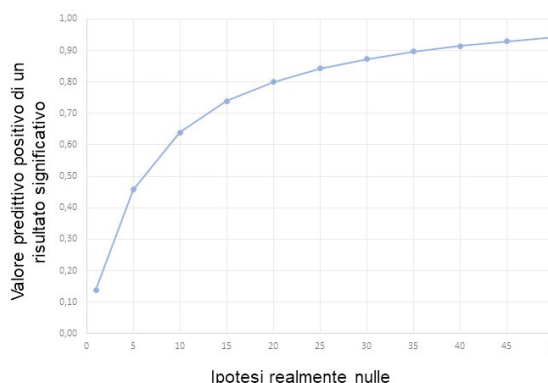


Figura 2

Andamento del valore predittivo positivo di uno studio che risulti statisticamente significativo, con $\alpha=0,05$ e $\beta=0,20$, in funzione della percentuale di studi in cui l'ipotesi nulla sia vera.

Di conseguenza, poiché è particolarmente importante evitare i falsi positivi, si potrebbe ipotizzare che il modo più prevedibile di condurre uno studio sia di studiare ipotesi su cui le differenze siano già note, almeno in parte; è difficile però pensare che tale strategia porti ad un sostanziale progresso della scienza. Quindi la vera informazione che serve allo sperimentatore (ma anche al lettore della letteratura scientifica) è: quando rifiutiamo o non riusciamo a rifiutare l'ipotesi nulla, quanto spesso è vera l'ipotesi alternativa? Non esiste modo di determinare queste risposte senza postulare la frequenza con cui l'ipotesi nulla e l'ipotesi alternativa sono vere (17).

ALLA RICERCA DI SOLUZIONI

L'argomento dell'uso di P e del suo significato riscuote un notevole interesse, se il 20 marzo 2019 la rivista *American Statistician* dedica un intero numero al problema (18). La medesima rivista, nel 2016, aveva pubblicato un documento sull'uso di P (19), che sottolineava i seguenti principi:

- il valore di P indica quanto i dati sono incompatibili con un definito modello statistico, costruito con una serie di assunzioni, insieme alla cosiddetta "ipotesi nulla";
- il valore di P non misura la probabilità che l'ipotesi allo studio sia vera, o che i risultati siano prodotti per solo effetto del caso;
- le conclusioni scientifiche e le decisioni non devono essere basate sul fatto che il valore P superi una data soglia;
- un processo inferenziale corretto richiede trasparenza e completezza dei risultati; va insomma evitato di riportare solo quelli che risultino statisticamente significativi;
- un valore di P o una significatività statistica non misurano l'entità di un effetto o l'importanza di un risultato;
- il valore di P, di per sé, non fornisce una buona misura dell'evidenza rispetto ad un modello o ad una ipotesi.

Il quinto punto è di particolare importanza per il lettore di uno studio, che deve sempre ricordare che una elevata significatività statistica non implica necessariamente un risultato clinicamente rilevante.

La precisazione di *American Statistician* era il risultato di un lavoro collegiale di tre mesi del comitato editoriale della rivista, e nello stesso numero della rivista, era commentato in modo eterogeneo da 21 Autori. Ma l'impatto di un simile sforzo è risultato minimo, se non nullo, tanto che nel 2019 la medesima rivista ha ripreso l'argomento in un supplemento monotematico "*Statistical inference in the 21st century: A world beyond $p < 0.05$* " (18). La critica metodologica va anche al di là dell'interpretazione del valore di P, ed arriva a coinvolgere la filosofia del test d'ipotesi statistica; diventa un dibattito per addetti ai lavori, il cui contenuto esula dagli scopi di questa nota.

Soluzioni proposte: alzare l'asticella?

Una soluzione proposta da più voci per risolvere il problema di P e del suo uso improprio è stata quella di mantenere il test di ipotesi, ma rendere più difficile la significatività statistica, riducendo il valore soglia a $p < 0,005$ (20). I risultati che attualmente sarebbero etichettati come "significativi" ma che non raggiungono la nuova soglia, verrebbero descritti come "suggestivi".

L'utilità di un abbassamento dei valori soglia è soprattutto evidente per gli studi epidemiologici di larghe dimensioni, sempre più frequenti con la crescente disponibilità di ampi database elettronici, e per le cosiddette "umbrella reviews", cioè revisioni sistematiche di altre rassegne e meta-analisi: con numerosità campionarie particolarmente elevate, i livelli attualmente ritenuti convenzionali di significatività statistica possono essere raggiunti facilmente anche per differenze troppo piccole per avere significato clinico. È stato quindi proposto per questo tipo di studi di usare una $p < 10^{-6}$ come valore soglia.

Per studi di normali dimensioni, un abbassamento del valore soglia di P a 0,005 ridurrebbe i "falsi positivi" (dichiarare una differenza che non esiste) al prezzo di un aumento dei "falsi negativi" (mancare di dichiarare una differenza che esiste).

I fautori di questa soluzione ritengono che forse la richiesta di un valore di P più basso avrebbe anche come effetto indiretto il forzare gli sperimentatori a disegnare studi con dimensione campionaria più elevata, e auspicabilmente con un miglior disegno sperimentale.

Occorre non dimenticare, tuttavia, che il terzo principio dell'*American Statistical Association* (19) asserisce che conclusioni scientifiche e le decisioni non devono essere basate sul fatto che il valore P superi una data soglia, a prescindere da quale sia tale soglia.

Una soluzione più radicale: abbandonare il concetto di "significatività statistica"

Una soluzione più radicale è quella proposta nell'articolo di *Nature* (1), cioè l'abbandono del concetto di significatività statistica.

L'obiettivo è quello di trovare un modello che rappresenti la forza dell'evidenza scientifica prodotta da uno studio, ma non vi è certezza che questo risultato sarebbe conseguito semplicemente eliminando i valori di P; questa operazione, infatti, non produrrebbe automaticamente un miglioramento del disegno scientifico, una qualità migliore delle misurazioni, una analisi in grado di dare risposta al quesito scientifico.

L'obiezione più comunemente posta contro l'abbandono del "statisticamente significativo" è la sua utilità nel prendere decisioni binarie, del tipo sì/no, ad esempio nelle decisioni degli enti regolatori. L'alternativa in questo ambito potrebbe essere una analisi più globale dei costi, dei benefici e di tutte le possibili conseguenze, piuttosto che una decisione basata soltanto sulla significatività statistica.

I fautori dell'abbandono del concetto di

“significatività statistica” sostengono che gli sperimentatori possono continuare a calcolare P , gli intervalli di confidenza ed altre misure statistiche, ma non ad utilizzarli come criterio per dividere gli studi non conclusivi da quelli statisticamente significativi. Lo sperimentatore ma anche il lettore, nella loro visione, devono imparare a convivere con l'incertezza. A tale scopo, gli Autori del lavoro di *Nature* (1) propongono di abbandonare la dizione di “intervallo di confidenza” per quello di “intervallo di compatibilità”: la stima intervallare, infatti, fornisce l'intervallo dei valori possibili dello stimatore statistico calcolato, consentendo auspicabilmente all'autore di descrivere le implicazioni pratiche di tutti i valori nell'intervallo, non soltanto della stima puntuale.

Vi sono però obiezioni decise ad una scelta così radicale come quella di abolire l'uso dei valori di P . Quando le colonne d'Ercole del $p < 0,05$ fossero rimosse, infatti, ogni Autore potrebbe dichiarare importante e significativo qualsiasi risultato.

C'è anche qualche rivista che ha applicato le posizioni radicali che appaiono sottese su *Nature*: dal 2015 *Basic and Applied Social Psychology* ha bandito l'uso del test d'ipotesi basato sull'ipotesi nulla e degli intervalli di confidenza (21), consentendo solo l'uso di statistica descrittiva. Una revisione sugli articoli pubblicati nella rivista durante tutto l'anno successivo (22) evidenziava come vi fossero ripetute affermazioni di risultati che i dati non avrebbero supportato se fossero stati usati i valori di P , o qualche altra forma di inferenza statistica.

Resta molto forte il dubbio che la proposta di mantenere i valori di P ma bandire il concetto di significatività statistica sia suscettibile di generare ancor più confusione e problemi nell'interpretazione dei risultati.

COSA POSSIAMO CONCLUDERE?

Perché eliminare P sembra così difficile? Probabilmente la risposta è banale: perché tutti lo usano.

D'altro canto P rappresenta l'elemento centrale di una serie di regole che costituiscono la barriera contro una scienza basata sul preteso ruolo dell'esperienza, senza validazione da parte dei dati. Questa considerazione può forse anche rendere in parte ragione della difficoltà ad accettare i metodi Bayesiani, spesso percepiti come una scappatoia per reintrodurre quel margine di soggettività che i metodi statistici convenzionali mirano a contrastare.

In un quadro così articolato occorre trovare dei punti fermi che consentano di superare, anche se parzialmente, i limiti del modello di test di ipotesi, ma soprattutto della sua applicazione. Innanzitutto è necessario che le analisi statistiche siano pianificate a priori, al momento della definizione del protocollo di studio. Dato che al momento attuale pubblicare preliminarmente il disegno di uno studio, o almeno

inserirlo in una delle banche dati dedicate, quali l'*EU Clinical Trials Register* (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/>) o *ClinicalTrials.gov* (<https://clinicaltrials.gov/>), è prassi molto diffusa, sarebbe auspicabile che il piano dell'analisi statistica fosse estensivamente descritto, e vincolante per la pubblicazione dei risultati. Se tale regola può sembrare rigida, occorre ricordare che in un recente sondaggio (23), condotto su 390 consulenti statistici, un'ampia percentuale degli intervistati aveva ammesso di aver ricevuto richieste inappropriate di analizzare i dati con metodi che fornissero i risultati desiderati.

Anche la proposta di obbligare alla pubblicazione preliminare del protocollo di studio, comprensivo di programma di analisi statistica, proposta che pare molto ragionevole, si scontra con considerazioni di tipo pratico; essa è fattibile solo per un studio clinico di conferma (o pragmatico).

In effetti, una larga parte della ricerca scientifica è esplorativa, e prevede flessibilità nel disegno dello studio, nella condotta e nell'analisi statistica. Il prezzo di questa flessibilità è la debolezza di ogni inferenza statistica che ne derivi. Anche le linee guida dell'*International Conference on Harmonisation* (ICH) (24) separano con chiarezza gli studi esplorativi (tipicamente studi di fase II) da quelli con obiettivi di conferma (studi di fase III). Questi ultimi sono finalizzati alla decisione per l'autorizzazione di un farmaco, e prevedono la definizione preliminare (prima di raccogliere qualunque dato) del protocollo di studio, stretta aderenza al protocollo, alle procedure operative standard, e al piano di analisi statistica.

Una proposta ragionevole per garantire la qualità scientifica delle analisi parrebbe essere quella espressa da Correia et al. (25), cioè mantenere l'uso di P , assumendo però i seguenti accorgimenti:

- descrivere il valore di P solo quando lo studio abbia una adeguata dimensione campionaria. In caso contrario, riportare in modo descrittivo i risultati, senza test di ipotesi. Secondo gli Autori (25), il valore mediano di potenza degli studi in ambito biomedico è soltanto del 20%;
- non riportare il valore di P nelle analisi secondarie;
- nelle analisi dei sottogruppi (che hanno solo finalità esplorativa) riportare solo il valore di P dell'interazione, evitando i valori di P risultanti dal confronto tra i sottogruppi;
- sostituire il termine “significatività statistica” con “accuratezza statistica”. Tale termine evita la confusione tra la significatività statistica e la significatività clinica.

In conclusione, la rivoluzione che sarebbe implicata dall'abolizione di P non è imminente e, probabilmente, non è neppure necessaria, purché ad ogni livello abbiamo presente che il problema principale non sono i valori di P , ma il modo in cui sono usati. E' indispensabile che non solo il ricercatore, ma anche il lettore di articoli scientifici, approfondiscano la propria formazione statistica, per comunicare i risultati del

proprio lavoro e leggere criticamente il lavoro altrui.

Altrimenti potremmo finire per giustificare una provocazione umoristica, quale quella della “Legge di Williams e Holland” (26):

“Se si raccolgono abbastanza dati, qualsiasi cosa può essere dimostrata con metodi statistici”.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Amrhein V, Greenland S, McShane B. Retire statistical significance. *Nature* 2019;567:305-7.
- Senn SJ. Falsificationism and clinical trials. *Stat Med* 1991;10:1679-92.
- Ioannidis JPA. What have we (not) learnt from millions of scientific papers with P values? *Am Stat* 2019;73,suppl.1:20-5.
- Head ML, Holman L, Lanfear R, et al. The extent and consequences of p-hacking in science. *PLoS Biol* 2015;13:e1002106.
- Zanolla L, Graziani MS. Come interpretare correttamente il valore di P? *Biochim Clin* 2016;40:40-4.
- Panagiotou OA, Ioannidis JPA, for the Genome-Wide Significance Project. What should the genome-wide significance threshold be? Empirical replication of borderline genetic associations. *Int J Epidemiol* 2012;41:273-86.
- Greenland S, Senn SJ, Rothman K, et al. Statistical tests, P-values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *Eur J Epidemiol* 2016;31:337-50.
- Lang J, Rothman KJ, Cann CI. That confounded P-Value. *Epidemiology* 1998;9:7-8.
- Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, et al. Effect of Alirocumab on mortality after acute coronary syndromes. *Circulation* 2019;140:103-12.
- Altman DG, Bland JM. Absence of evidence is not evidence of absence. *BMJ* 1995;311:485.
- Schatz P, Jay KA, McComb J, et al. Misuse of statistical tests in Archives of Clinical Neuropsychology publications. *Arch Clin Neuropsychol* 2005;20:1053-9.
- Fidler F, Burgman MA, Cumming G, et al. Impact of criticism of null-hypothesis significance testing on statistical reporting practices in conservation biology. *Conserv Biol* 2006;20:1539-44.
- Hoekstra R, Finch S, Kiers HA, et al. Probability as certainty: dichotomous thinking and the misuse of p values. *Psychon Bull Rev* 2006;13:1033-7.
- Bernardi F, Chakhaia L, Leopold L. ‘Sing me a song with social significance’: The (mis)use of statistical significance testing in European sociological research. *Eur Sociol Rev* 2017;33:1-15.
- Salas-Salvadó J, Díaz-López A, Ruiz-Canela M, et al. Effect of a lifestyle intervention program with energy-restricted Mediterranean diet and exercise on weight loss and cardiovascular risk factors: one-year results of the PREDIMED-Plus Trial. *Diabetes Care* 2019;42:777-88.
- Lash TL. The harm done to reproducibility by the culture of null hypothesis significance testing. *Am J Epidemiol* 2017;186:627-35.
- Poole C. Low P-Values or narrow confidence intervals: which are more durable? *Epidemiology* 2001;12:291-4.
- Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA. Moving to a world beyond “p < 0,05”. *Am Stat* 2019;73:1-19.
- Wasserstein RL, Lazar NA. The ASA’s Statement on p-values: context, process, and purpose. *Am Stat* 2016;70:129-33.
- Benjamin DJ, Berger JO, Johannesson M, et al. Redefine statistical significance. *Nat Hum Behav* 2018;2:6-10.
- Trafimow D, Marks M. Editorial. *Basic Appl Soc Psych* 2015;37:1-2.
- Fricke RD Jr., Burke K, Han X, et al. Assessing the statistical analyses used in basic and applied social psychology after their p-value ban. *Am Stat* 2019;73:s374-84.
- Wang MQ, Yan AF, Katz RV. Survey of consulting biostatisticians. Researcher requests for inappropriate analysis and reporting: a US survey of consulting biostatisticians. *Ann Intern Med* 2018;169:554-8.
- European Medicines Agency (EMA). ICH E9. Note for guidance on statistical principles for clinical trials. 2006. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-9-statistical-principles-clinical-trials-step-5_en.pdf (ultimo accesso aprile 2020).
- Correia LCL, Bagano GO, de Melo MHV. Should we retire statistical significance? *BrJP* 2019 doi.org/10.5935/2595-0118.20190037.
- Bloch A. La legge di Murphy. Milano: Longanesi, 1977.

La scienza riproducibile

Matteo Vidali

Laboratorio analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italia

ABSTRACT

The reproducible science

Many studies in different areas of scientific research suggest that we are currently facing a deep reproducibility crisis. To illustrate the significance of the problem, results of some pivotal reproducibility projects of both social, economic and biomedical sciences are reported. Terminology proposed by different authors is presented and compared. The paper, according to a new lexicon for research reproducibility recently adopted, offers hints for discussion on possible causes and solutions for reproducibility of methods, results and inferential reproducibility as well. Moreover, open tools for reproducibility are briefly described. Reproducibility requires a new way to structure and organize a project, deeper understanding of the scientific process, mature statistical knowledge and the implementation of good existing policies and practices. These resource consuming activities are worth the effort, since they may contribute to establish a solid basis to build upon.

INTRODUZIONE

Al cuore del metodo scientifico vi è un concetto tanto semplice quanto critico: la replicazione dei risultati, cioè la possibilità che ricercatori diversi ripetano lo stesso esperimento ottenendo risultati concordi. Sebbene non sia sempre possibile ripetere esattamente lo stesso esperimento, per la sua unicità o per la sua durata o per i costi proibitivi, la replicazione dei risultati rimane un criterio importante per separare ciò che è scienza da ciò che è coincidenza, variabilità statistica o errore.

In questi ultimi anni dubbi sulla riproducibilità della ricerca scientifica sono stati sollevati da più parti e in diversi ambiti scientifici e numerosi studi hanno evidenziato l'impossibilità di replicare una buona parte dei risultati pubblicati su riviste scientifiche anche prestigiose (1-2). Basse percentuali di replicazione dei risultati sono stati, infatti, riportate nel campo delle scienze sociali (3), economiche (4), degli studi psicologici (5-6) e della ricerca biomedica (7).

UNA QUESTIONE DI TERMINOLOGIA

Parte della confusione relativa agli studi di riproducibilità è dovuta alla terminologia utilizzata (8). Termini come ripetibilità (repeatability), replicabilità

(replicability) e riproducibilità (reproducibility) sono spesso utilizzati in modo intercambiabile e affiancati a termini come affidabilità (reliability), credibilità (credibility), robustezza (robustness), generalizzabilità (generalizability), standardizzazione (standardization), scienza aperta (open science), trasparenza (transparency), rigore (rigor) e integrità (integrity).

Uno dei primi ad utilizzare i termini riproducibilità e ricerca riproducibile (applicati, invero, alle scienze computazionali) è stato Jon Claerhout (9). L'idea di Claerhout era quella di pubblicare vari tipi di documenti scientifici (pubblicazioni scientifiche, appunti o report di laboratorio, attività per studenti) combinando risultati e codice di programmazione: in qualunque momento, anche a distanza di mesi o anni, lo stesso ricercatore o altri avrebbero potuto generare gli stessi risultati (inclusi grafici e tabelle) semplicemente ri-eseguendo il codice di programmazione messo a disposizione. Nella terminologia di Claerhout riprodurre (riproducibilità) uno studio significa quindi ri-eseguire lo stesso software (o lo stesso codice di programmazione) sugli stessi dati ottenendo gli stessi risultati. Nelle scienze computazionali, replicare (replicabilità) uno studio significa invece scrivere un nuovo software o codice, sulla base di un modello computazionale o di un metodo

Corrispondenza a: Matteo Vidali, Laboratorio analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Via Francesco Sforza, 28 - 20122 Milano, E-mail matteo.vidali@policlinico.mi.it

Ricevuto: 08.09.2020

Revisionato: 19.10.2020

Accettato: 21.10.2020

Pubblicato on-line: 24.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.094

descritto nello studio originale, ottenendo risultati simili o compatibili. La maggior parte degli studi presenti in letteratura utilizza, anche per gli altri ambiti scientifici, i termini replicabilità e riproducibilità in modo simile alle scienze computazionali (10-12). Infatti, generalizzando, ci si riferisce a replicabilità quando un ricercatore ottiene gli stessi risultati di uno studio precedente tramite un esperimento indipendente (raccolgendo nuovi dati ma utilizzando lo stesso disegno sperimentale). Uno studio si dice quindi replicato quando i risultati, ottenuti tramite un esperimento indipendente, sono consistenti con quelli dello studio originale (simile dimensione dell'effetto, concordanza nella significatività statistica, misure compatibili entro i limiti dell'incertezza). Si parla invece di riproducibilità quando un ricercatore ottiene gli stessi risultati di uno studio precedente rianalizzando gli stessi dati grezzi con gli stessi metodi statistici e/o computazionali. Per riprodurre uno studio è ovviamente imperativo che i dati originali, il codice sorgente, e tutto il materiale eventualmente necessario, siano liberamente accessibili e che tutti i metodi utilizzati siano descritti in dettaglio (in questo senso si parla di trasparenza dei dati). Secondo la Fondazione Nazionale per la Scienza degli Stati Uniti (NSF) la riproducibilità è considerata un requisito minimo perché un risultato sia credibile. Questa distinzione tra replicabilità e riproducibilità viene in genere riportata come definizione di Claerbout/Donoho/Peng (perché è stata ripresa e diffusa ulteriormente da questi ultimi due autori).

Tuttavia, in altri studi i due termini sono stati utilizzati indifferentemente [si veda ad esempio i progetti di riproducibilità del Center for Open Science (COS) riportati nel paragrafo successivo] o perfino scambiati (13).

Un utilizzo della terminologia in contrasto con quello presentato sopra è stato inoltre adottato recentemente dall'Association of Computing Machinery (ACM) (10). Basandosi sui concetti propri delle scienze sperimentali di condizioni di ripetibilità o riproducibilità di una misura e delle definizioni ISO, l'ACM ha proposto di utilizzare per gli esperimenti computazionali i termini di ripetibilità (quando lo stesso ricercatore autore dello studio rianalizza i propri risultati ottenendo uguali risultati), replicabilità (quando un altro ricercatore o gruppo, rianalizzando gli stessi dati con gli stessi metodi, ottiene gli stessi risultati dello studio originale) e riproducibilità (quando un altro ricercatore o gruppo indipendente ottiene gli stessi risultati dello studio originale utilizzando però metodi propri). Come il lettore ha potuto notare, il significato dei termini riproducibilità e replicabilità utilizzati dall'ACM è opposto rispetto a quello di Claerbout/Donoho/Peng.

Per una maggiore uniformità di linguaggio, e conseguente migliore e più accurata interpretazione degli studi di riproducibilità, Goodman recentemente ha proposto un nuovo lessico più inclusivo nell'ambito della riproducibilità della ricerca biomedica (ma estendibile anche ad altre scienze), utilizzando le definizioni di riproducibilità dei metodi, riproducibilità dei risultati e

riproducibilità inferenziale (2).

Il concetto di riproducibilità dei metodi è sovrapponibile a quello di riproducibilità di Claerbout/Donoho/Peng, utilizzabile quando un ricercatore utilizza esattamente gli stessi metodi sperimentali e computazionali, gli stessi dati, codice sorgente e software per ottenere gli stessi risultati dello studio originale.

La definizione di riproducibilità dei risultati è simile a quella data in precedenza per replicabilità, dove un ricercatore, seguendo lo stesso disegno e gli stessi metodi sperimentali, arriva agli stessi risultati, corroborando in modo indipendente i risultati dello studio originale.

La terza definizione è quella di riproducibilità inferenziale, quando il ricercatore giunge alle stesse conclusioni dello studio originale, tramite uno studio indipendente o una rianalisi dei dati. È probabilmente il tipo di riproducibilità meno conosciuta e più complessa ma importante e inclusiva. La tabella 1 confronta le tre terminologie fin qui descritte.

Tabella 1
Confronto tra le varie terminologie nell'ambito della riproducibilità (modificato da Plesser, 2018, rif 8).

Claerbout/Donoho/Peng (9)	ACM (10)	Goodman (2)
	Ripetibilità	
Riproducibilità	Replicabilità	Riproducibilità dei metodi
Replicabilità	Riproducibilità	Riproducibilità dei risultati
		Riproducibilità inferenziale

ACM, Association of Computing Machinery.

LA CRISI DELLA RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI SCIENTIFICI

A fini esemplificativi, e per il lettore che volesse approfondire il complesso problema della riproducibilità nei diversi ambiti della ricerca scientifica, riportiamo alcuni casi significativi descritti recentemente in letteratura.

Come descritto nel paragrafo precedente, la terminologia dei vari autori è estremamente eterogenea. Tuttavia, indipendentemente dal titolo o dall'acronimo (che talvolta contiene il termine riproducibilità, mentre altre quello di replicazione), tutti i progetti riportati in questo paragrafo corrispondono a studi replicati, nel senso di riproducibilità dei risultati, cioè a nuovi studi indipendenti finalizzati a riprodurre i risultati degli studi originali.

Nel 2015 sono stati pubblicati i risultati del primo progetto di riproducibilità (The Reproducibility Project: Psychology o RPP), condotto dal COS,

un'organizzazione senza scopo di lucro avente come obiettivo l'aumento della trasparenza, l'integrità e la riproducibilità della ricerca scientifica. Più di 250 ricercatori hanno replicato 100 studi psicologici sperimentali e correlazionali, pubblicati nel 2008 su tre importanti riviste del settore. Gli studi replicati, rispetto agli originali pubblicati, hanno evidenziato sia una percentuale più bassa di risultati statisticamente significativi (36% *versus* 97%), sia una dimensione dell'effetto (effect size) inferiore (6).

Risultati simili sono stati descritti anche nel 2016 nel primo progetto sistematico di replicazione di studi sperimentali di economia (Experimental Economics Replication Project, EERP) dove gli autori hanno tentato di replicare 18 studi sperimentali pubblicati tra il 2011 e il 2014 su due importanti riviste del settore: solo in 11 (61,1%) studi replicati è stato evidenziato un effetto statisticamente significativo nella stessa direzione dei lavori originali; inoltre, la dimensione dell'effetto era pari al 66% dell'originale (4).

Nel 2018, alcuni ricercatori hanno tentato di riprodurre 21 studi delle scienze sociali i cui risultati erano stati pubblicati su Science e Nature tra il 2010 ed il 2015 (Social Science Reproducibility Project, SSRP). Utilizzando vari criteri, i risultati non sono stati confermati in un terzo degli studi (8/21) e nei restanti 13 l'effetto era inferiore rispetto a quello originariamente riportato (3).

In questi ultimi anni sono stati anche pubblicati i dati dei cosiddetti progetti Many Labs (ML), studi su larga scala con decine di migliaia di partecipanti, finalizzati a replicare i risultati di numerosi studi psicologici. A fronte di una percentuale di replicazione (intendendo come replicato un effetto statisticamente significativo) pari al 10/13 (77%) dello studio ML1 (14), sono state osservate tuttavia percentuali minori, rispettivamente 14/28 (50%) nello studio ML2 (15), fino al 3/10 (30%) dello studio ML3 (16).

Combinando i dati dei 6 progetti di replicazione sopra descritti (RPP, EERP, SSRP, ML1, ML2, ML3), relativi a 190 studi replicati, si ottiene per le scienze sociali ed economiche una frequenza di replicazione non elevata e pari a 90/190 (47%).

Risultati sovrapponibili ai precedenti sono stati ottenuti anche nei progetti di replicazione condotti nell'ambito della ricerca biomedica. Tra i numerosi progetti, è necessario ricordare il progetto Reproducibility Project: Cancer Biology (RPCB), collaborazione tra il COS e Science Exchange, con il fine di replicare 50 dei più importanti lavori sperimentali preclinici pubblicati tra il 2010-2012 su riviste di alto profilo nel campo della biologia del cancro. I singoli studi replicati sono stati organizzati utilizzando la piattaforma aperta Open Science Framework (OSF) ed i risultati resi disponibili in un database liberamente consultabile presso il sito web dell'organizzazione senza scopo di lucro eLife (17). Alla data attuale, dei 16 studi replicati, 5 hanno riprodotto parti importanti dei lavori originali, 6 hanno riprodotto alcune parti ma contengono anche risultati in disaccordo con gli studi originali, 2 non sono

interpretabili (per varie problematiche metodologiche) e 3 non hanno riprodotto i risultati degli studi originali (7, 17-18). Risultati sovrapponibili erano stati riportati in precedenza anche da Begley (19).

I risultati di questi progetti di replicazione e di alcuni spiacevoli episodi di frode, pubblicati o verificatisi nell'ultima decade, hanno profondamente influenzato l'opinione pubblica e sono stati oggetto di intenso dibattito all'interno della comunità scientifica (20). A questo riguardo un recente sondaggio del 2016, somministrato da Nature a 1576 ricercatori di diversi ambiti scientifici, ha evidenziato che fino al 52% dei partecipanti riteneva di essere in presenza di una significativa crisi della riproducibilità dei dati scientifici; inoltre, una larga maggioranza ha riferito di non essere riuscita a riprodurre almeno un esperimento proprio o di altri (21). Tra le cause considerate più importanti per spiegare la non riproducibilità dei risultati, i ricercatori hanno indicato il reporting selettivo, la pressione a pubblicare, la bassa potenza statistica, l'insufficiente replicazione degli esperimenti in laboratorio e la scarsa supervisione o tutoraggio. È interessante notare che un terzo dei partecipanti al sondaggio ha dichiarato, tuttavia, che il proprio laboratorio negli ultimi 5 anni ha stabilito procedure per migliorare la riproducibilità dei propri risultati (21).

Quale lezione forniscono i risultati di questi progetti di replicazione? In effetti, l'interpretazione di queste esperienze è piuttosto complessa, come è stato evidenziato dagli stessi responsabili dei progetti e da numerosi altri autori. Inoltre, questi studi sollevano numerosi interrogativi:

- sull'interpretazione: uno studio non replicato è necessariamente falso? (dove con falso, nell'accezione più ampia, si intende uno studio in cui l'effetto trovato non corrisponde a quello originariamente pubblicato). Uno studio non replicato suggerisce sempre una frode? La replicazione dei risultati assicura sempre la bontà dei risultati?;
- sulla metodologia: come replicare uno studio? Eseguire un nuovo studio indipendente utilizzando lo stesso disegno sperimentale oppure rianalizzare gli stessi dati grezzi con le stesse metodologie statistiche utilizzate dagli autori?;
- sulle cause: quali sono i fattori più importanti della non riproducibilità? Gli studi di riproducibilità possono essere utilizzati per identificare dati manipolati?;
- sulle possibili soluzioni: cosa può essere fatto per migliorare la riproducibilità? Come diffondere la cultura della trasparenza dei dati?

La non riproducibilità dovuta a frode: il caso dell'Università Duke

Può essere interessante per il lettore ricordare uno degli esempi più emblematici di non riproducibilità nell'ambito della ricerca biomedica di questi ultimi anni, ovvero il caso di Anil Potti dell'Università Duke (North Carolina, USA). Nel 2006, Potti propose un metodo per predire la risposta di un paziente ad un determinato

chemioterapico, combinando dati di sensibilità di note linee cellulari con profili di espressione genica tramite microarrays. I risultati preliminari erano così innovativi e promettenti che attirarono l'attenzione di molti ricercatori, tra i quali alcuni gruppi di ricerca dell'Anderson Cancer Center che chiesero ai colleghi biostatistici Baggerly e Coombes di esaminare la metodologia utilizzata, al fine di valutarne la riproducibilità. A differenza dei progetti riportati sopra, in cui la riproducibilità era valutata tramite la ripetizione indipendente degli studi, in questo caso la riproducibilità fu valutata rianalizzando i dati originali forniti dai ricercatori della Duke al fine di ottenere i medesimi risultati (si tratta quindi di riproducibilità dei metodi). In assenza di una descrizione dettagliata dei metodi (una delle criticità del lavoro di Potti), i due statistici impiegarono tecniche di bioinformatica forense, dove partendo dai dati grezzi e dai risultati ottenuti si tenta di ricostruire l'approccio statistico utilizzato. Baggerly e Coombes rianalizzando i dati, individuarono fin da subito numerosi errori, alcuni banali mentre altri difficili da spiegare. A seguito di una fitta corrispondenza tra i due gruppi rivelatosi improduttiva, i due ricercatori decisero di presentare le discrepanze osservate in una lettera pubblicata su *Nature Medicine* nel 2007 (22), evidenziando la non riproducibilità dei risultati del gruppo di Potti. In replica, Potti ammise apertamente alcune inesattezze, corrette poi online, sostenendo però che tali errori non inficiassero in alcun modo i risultati pubblicati in precedenza (22). Utilizzando la stessa metodologia, il gruppo di Potti continuò a pubblicare lavori scientifici su riviste prestigiose; inoltre, alcuni studi clinici, basati su questi modelli previsionali, furono avviati (nonostante le continue critiche del gruppo dell'Anderson Cancer Center e nonostante un rapporto inviato all'amministrazione della Duke da parte di Bradford Perez, collaboratore di Potti, contenente critiche sulla metodologia utilizzata). La sconcertante scoperta che alcuni studi clinici fossero già stati avviati e in fase di arruolamento, spinse Baggerly e Coombes a pubblicare un lavoro su *Annals of Applied Statistics* contenente tutti gli errori riscontrati, dichiarando che, secondo la loro rianalisi dei dati di Potti, i pazienti arruolati negli studi clinici fossero ad alto rischio di ricevere un trattamento chemioterapico non efficace (23). A seguito della pubblicazione, la Duke sospese temporaneamente gli studi clinici, successivamente ripresi dopo che una commissione esterna dichiarò sorprendentemente che i risultati di Potti erano sostanzialmente validi (il rapporto della commissione fu inizialmente secretato dalla Duke). Alcuni eventi successivi hanno determinato la chiusura definitiva degli studi clinici: l'impossibilità di riprodurre i risultati di Potti da parte di altri gruppi indipendenti, tra cui il National Cancer Institute, la pubblicazione del rapporto precedentemente secretato della commissione di valutazione della Duke in cui si esprimevano alcuni dubbi sulla metodologia utilizzata, la scoperta da parte di *The Cancer Letter* di dichiarazioni false contenute nel curriculum vitae di Potti e infine un documento redatto

da più di 30 personalità tra statistici e clinici in cui i firmatari chiedevano ai vertici della Duke di sospendere gli studi sulla base del fatto che il rapporto della commissione esterna aveva dichiarato che le informazioni pubblicate in letteratura e/o fornite da Potti non fossero sufficienti a validare il modello. Potti fu prima posto in congedo amministrativo e successivamente si dimise. Numerosi lavori del suo gruppo furono quindi ritirati (al 2018 i lavori ritirati erano 11 e numerosi altri sono stati corretti). L'ammissione che alla commissione esterna non erano stati forniti i dati grezzi originali, ma dati intenzionalmente manipolati ha poi spiegato anche la sorprendente dichiarazione favorevole della commissione esterna della Duke.

Successivamente a quanto accaduto e su richiesta del National Cancer Institute, l'Accademia Nazionale di Medicina Statunitense ha istituito un comitato scientifico multidisciplinare per formulare raccomandazioni per lo sviluppo, la validazione ed il trasferimento di test basati sulle scienze omiche dalla ricerca alla pratica clinica. Nel rapporto finale, il Comitato ha sottolineato, in particolare, l'importanza della trasparenza dei dati, cioè la pubblicazione dei risultati ottenuti unitamente ai dati grezzi, metadati, codice di programmazione e di tutto il materiale utilizzato e liberamente accessibile necessario per riprodurre e confermare i risultati (24).

CAUSE DI NON RIPRODUCIBILITÀ E POSSIBILI SOLUZIONI

A fini didattici, e in accordo con la recente letteratura, può essere utile utilizzare il nuovo lessico di Goodman per descrivere le principali cause di non riproducibilità della ricerca scientifica e presentare alcune soluzioni.

Riproducibilità dei metodi

Per riproducibilità dei metodi (o riproducibilità nella terminologia di Claerbout/Donoho/Peng) si intende la possibilità di ottenere gli stessi risultati, utilizzando gli stessi dati e lo stesso codice (o software) dello studio originale. Questa verifica può essere effettuata dagli stessi autori, prima della pubblicazione del lavoro scientifico, oppure da ricercatori indipendenti (come è avvenuto nello scandalo della Duke). Questo processo può essere considerato come un requisito minimo per ogni risultato o insieme di risultati pubblicati. Concettualmente la riproducibilità dei metodi si situa a metà strada tra la non riproducibilità e la riproducibilità dei risultati. Tuttavia, la riproducibilità dei metodi non garantisce la correttezza delle conclusioni degli autori, come sarà illustrato anche nei paragrafi dedicati alla riproducibilità dei risultati e inferenziale. Inoltre, essa non può identificare tutti i casi di frode; infatti, se dati manipolati (intendendo dati falsificati) sono resi disponibili al posto dei dati originali, non è possibile identificare il tentativo di frode.

La riproducibilità dei metodi è un requisito sempre più importante, particolarmente nell'era dei Big Data, dove quotidianamente sono prodotte massive quantità di dati sottoposti ad analisi computazionali sempre più complesse, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie biomediche e informatiche.

Quali sono gli elementi necessari per condurre uno studio di riproducibilità dei metodi? Peng definisce quattro elementi fondamentali: i dati, il codice, la documentazione relativa ai dati e al codice e l'accessibilità delle informazioni. Per comprendere bene questi concetti è utile citare quella che lo stesso autore (25) chiama la "*data science pipeline*", cioè la sequenza di attività o fasi che inizia dalla raccolta di dati ed esita nella presentazione dei risultati.

Dati

In genere non si tratta di dati grezzi ma di dati già organizzati o strutturati in un database e pronti per essere elaborati. Infatti, raramente vi sarà la disponibilità dei dati grezzi originali, perché essi possono derivare da fonti multiple (report strumentali, cartelle cliniche, sondaggi e questionari, altri database) ed essere raccolti da vari supporti (cartaceo, informatico, elettronico). Occorre quindi tenere in considerazione che nella fase in cui i dati grezzi sono raccolti in un database si possono verificare errori di inserimento, trascrizione e codifica involontari (disattenzione) oppure volontari (frode). Generalmente questi errori non sono rintracciabili a meno che siano stati inseriti dati non compatibili con i valori che può assumere una determinata variabile (ad esempio variabili biologiche con dati negativi o incompatibili con la vita). Queste incompatibilità possono essere rilevate durante la fase esplorativa dell'analisi, quando i dati sono inizialmente riassunti con indici statistici, grafici e tabelle per avere un'idea preliminare delle variabili in studio e delle loro relazioni.

Generalmente, i dati raccolti da varie fonti in un database, prima di essere sottoposti all'analisi statistica, devono, essere preventivamente trattati. Queste modifiche possono includere, ad esempio, una codifica, la trasformazione da variabile quantitativa a qualitativa (continua-ordinale, continua-dicotomica) o da variabile qualitativa ordinale a variabile dicotomica, una trasformazione matematica (logaritmo, standardizzazione), la creazione di ulteriori variabili combinando variabili già presenti nel database, il trattamento dei dati mancanti.

Codice

Comprende tutte le istruzioni scritte in un linguaggio di programmazione, per elaborare i dati del database in dati pronti per essere analizzati (codice per il trattamento o processing code), il codice per analizzare i dati e ottenere modelli (codice per analizzare o analytical code) ed il codice per presentare i dati tramite indici descrittivi, tabelle e grafici (codice di

presentazione o presentation code). Si parla di codice, cioè istruzioni scritte, perché l'alternativa, rappresentata dai software con i comandi organizzati in menù e sottomenù selezionati dal click del mouse, non è documentabile. Infatti, l'idea alla base della riproducibilità dei metodi è che il ricercatore dovrebbe poter ottenere gli stessi risultati semplicemente eseguendo il codice sui dati del database. Ovviamente, questo richiede che tutte le fasi, dal pretrattamento dei dati, all'analisi e alla presentazione dei risultati, siano codificate in istruzioni. Non è sufficiente, ai fini della riproducibilità, riportare i metodi utilizzati di statistica descrittiva e inferenziale. Si consideri, ad esempio, il calcolo dei quantili: in alcuni software, come il Linguaggio R, è possibile utilizzare fino a nove algoritmi differenti per il loro calcolo. Il codice utilizzato consente di comprendere quali librerie di funzioni (insieme di funzioni) e comandi sono stati utilizzati e come sono stati settati i vari parametri delle singole funzioni.

Può essere utile fare qualche esempio relativo alla Medicina di Laboratorio. Se nel database (DB) il paziente alla riga 200 presenta un valore inferiore al limite di sensibilità per l'analita ALT (<9 U/L) e si vuole sostituire al testo "<9", fornito dallo strumento, il valore 9 (così da consentire di includere questo dato nei calcoli successivi), piuttosto che modificare il contenuto della cella con un software come Microsoft Excel (che non lascerebbe traccia), è preferibile scrivere una linea di codice. In R, ad esempio, l'istruzione sarebbe `DB$ALT[200]=9`. Se fosse necessario applicare una trasformazione logaritmica in base 10 ai valori di TSH dello stesso database, piuttosto che inserire una nuova colonna e utilizzare la funzione matematica con l'indicazione delle celle contenenti i valori originali di TSH (che non consentirebbe ad altri di controllare la correttezza del calcolo), è preferibile digitare la linea di codice `DB$LOGTSH=log10(DB$TSH)`, dove LOGTSH è una nuova variabile che conterrà i logaritmi della variabile TSH. Allo stesso modo, se si volessero calcolare i percentili 2,5 e 97,5 della variabile GLUCOSE si utilizzerebbe l'istruzione `quantile[DB$GLUCOSE, probs=c(0,025, 0,975), type=8]`. Nell'istruzione precedente sono specificati i percentili da calcolare e l'algoritmo (il numero 8) da utilizzare (i lettori potrebbero così risalire anche all'algoritmo specifico utilizzato). In sintesi: tutte queste istruzioni di codice, inserite in un semplice file di testo, consentono ad eventuali altri autori non solo di comprendere le procedure utilizzate dagli autori dello studio originale ma di ottenere esattamente gli stessi risultati. Per ottenerli, infatti, sarebbe sufficiente aprire, o caricare, il database nel software R ed eseguire il file di testo (o script) contenente tutte le istruzioni.

Documentazione

I dati ed il codice devono essere resi disponibili unitamente a informazioni dettagliate. Le fonti da cui provengono i dati grezzi (strutturate o non strutturate) devono essere descritte, così come ogni variabile

presente nel database. Esso deve essere inoltre accompagnato da un dizionario che permetta di comprendere cosa rappresenta ogni variabile ed eventuali codifiche dei dati. Il codice deve essere commentato. Questa particolare forma di commento è pratica comune dei programmatori esperti, che nel proprio codice alternano istruzioni, o comandi, con commenti che illustrano lo scopo di quel particolare comando e la scelta dei valori dei parametri delle funzioni. Se nel trattamento dei dati o nella successiva analisi è stato utilizzato un generatore di numeri casuali (ad esempio alcuni metodi per i dati mancanti, simulazioni con alcune distribuzioni, bootstrap), è necessario riportare il seme (senza scendere eccessivamente nei dettagli, i numeri casuali, o meglio pseudo-casuali, sono generati utilizzando un algoritmo deterministico che produce una sequenza a partire da un valore chiamato seme; inizializzando il generatore con lo stesso seme, si ottengono gli stessi numeri casuali e con essi, ad esempio, lo stesso intervallo di confidenza calcolato con la tecnica del bootstrap). Inoltre è necessario riportare le versioni di tutti gli applicativi (software, pacchetti, estensioni o moduli) utilizzati: una versione differente del software potrebbe interpretare e quindi eseguire il codice in modo diverso o non previsto; oppure quella particolare funzione utilizzata potrebbe non essere più presente perché rinominata o sostituita da un'altra. Tuttavia, grazie alla disponibilità del codice commentato, l'eventuale ricercatore potrà comprendere il problema e modificare il codice, ottenendo gli stessi risultati.

Accessibilità

Questo elemento indica la necessità di distribuire i dati, il codice e la documentazione in modo standardizzato, perché esso sia facilmente accessibile.

In accordo a quanto detto, è interessante ricordare che lo stesso documento "Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward", redatto dall'Accademia Nazionale di Medicina nel 2012, raccomanda, in particolare per i test clinici basati sulle scienze omiche, di rendere disponibili in formato standard dati, metadati e codice e di documentare tutte le procedure utilizzate (24).

Appare chiaro che, a parte i tentativi di frode, la causa della non riproducibilità dei metodi (o dell'impossibilità di verificare che uno studio sia riproducibile) debba essere imputata alla mancanza di informazioni (dati, codice, documentazione) o quantomeno a documentazione non completa o accurata. Le ragioni di tali comportamenti possono essere numerose, tra queste la scarsa conoscenza di specifici strumenti informatici. Tuttavia, altri fattori possono giocare un ruolo importante: dati "non open" (il ricercatore potrebbe essere riluttante nel pubblicare i propri dati, temendo di non aver ancora estratto tutte le informazioni possibili dagli stessi; oppure potrebbe trattarsi di dati di proprietà di terzi), tempo (organizzare tutto il materiale necessario per riprodurre uno studio

richiede molto tempo; il ricercatore, perché pressato dal responsabile del Laboratorio o perché vincolato, in un percorso di studi, a raggiungere un certo numero di pubblicazioni, potrebbe preferire passare ad un altro progetto), risorse economiche (ad esempio per mantenere un server per la conservazione dei dati).

Si ritiene utile, in particolare per il Laboratorista, riportare brevemente alcune modalità operative e alcuni strumenti informatici gratuiti che possono essere utilizzati per strutturare uno studio riproducibile.

Una delle decisioni iniziali da prendere è stabilire un'opportuna struttura di "directories" che conterranno i file prodotti; tutti i files e le directories devono avere nomi autoesplicativi (self-explanatory). Un possibile suggerimento è quello di prevedere:

Directory per i dati, con sottodirectories per

- i dati grezzi (ad esempio report strumentali, scansioni di questionari, database preliminari);
- i dati originali strutturati in un database insieme ad un file di metadati (ad esempio il classico file REAME.txt) con l'indicazione dell'origine dei dati, la codifica e i possibili valori;
- i dati elaborati (database dopo pulizia), il trattamento dei dati mancanti.

Il database non deve essere in un formato proprietario (meglio un file di testo o CSV) per facilitare la lettura; per costruire il database è possibile servirsi di software proprietari come Microsoft Excel o i cloni gratuiti (OpenOffice, LibreOffice); tuttavia, ogni modifica dei dati originali dovrà essere codificata come blocco di istruzioni in uno script.

Quando possibile, ai fini della riproducibilità, i dati dovrebbero essere resi FAIR, acronimo che traduce i principi secondo i quali strutturare i dati riusabili: F-Findable, i dati dovrebbero essere reperibili, cioè identificati con appropriati metadati e identificativi univoci e persistenti e conservati per diversi anni, preferibilmente in molteplici copie, in archivi interrogabili; A-Accessible, i dati dovrebbero essere accessibili, attraverso un protocollo di comunicazione standardizzato, aperto (open), gratuito (free), che consenta, qualora fosse necessario per dati particolari, una procedura di autenticazione; infatti dati accessibili non significa dati aperti; I-Interoperable, per essere interoperabili, i dati dovrebbero essere salvati in formati non proprietari, ad esempio XML, CSV; R-Reusable, per poter essere riusabili, i dati dovrebbero essere rilasciati con una documentazione adeguata e una licenza d'uso. I dati possono essere resi disponibili, depositandoli in un archivio aperto, ad esempio Zenodo (<https://zenodo.org>) o Dryad (<https://datadryad.org>), oppure come materiale supplementare di una pubblicazione. L'invio ad un archivio aperto è tuttavia preferibile in quanto, dopo il caricamento dei dati e la verifica, i dati ricevono un identificativo (ad esempio DOI).

Directory per il codice contenente gli script commentati utilizzati per processare, analizzare e generare i report; per facilitare il processo di riproducibilità è raccomandabile l'utilizzo di software gratuiti o "opensource". Due

possibili alternative a tale scopo sono i linguaggi R (<https://www.r-project.org>) e Python (<https://www.python.org>). Entrambi questi linguaggi si sono ormai notevolmente diffusi in ambito Data Science. Si rimandano i lettori ai siti web relativi per ulteriori approfondimenti.

Directory per i risultati, in genere contenente file di testo con l'output, tabelle e grafici.

Directory contenente i files di testo per la stesura del lavoro.

Un'ulteriore possibilità per produrre report riproducibili che si sta sempre più diffondendo è quella del "Literate programming", paradigma di programmazione introdotto da Donald Knuth. Esso può essere utilizzato per scrivere interi libri, articoli o rapporti preliminari, anche interattivi, per condividere i risultati. L'idea è quella di creare un unico file o documento, combinando blocchi di codice finalizzati a caricare i dati, calcolare i risultati e presentarli in grafici e tabelle, con blocchi di testo che descrivono, commentano e interpretano l'output prodotto. Il documento viene analizzato da un opportuno software che lo processa attraverso due componenti, il tangle (intrecciare) e il weave (tessere). In gergo tecnico si dice che un unico file sorgente può essere "weaved", o tessuto, per produrre un documento stampabile, perfettamente comprensibile da un essere umano e ben formattato, oppure "tangled", o intrecciato, per creare un documento leggibile da una macchina combinando i blocchi di codice. L'output finale è in genere un file pdf oppure html. Il Literate programming ha l'indubbio vantaggio di unire insieme, nello stesso file, i risultati e il codice utilizzato per ottenerli, consentendo una più facile manutenzione. Attualmente tra gli strumenti informatici più utilizzati per il Literate programming troviamo R Markdown (<https://rmarkdown.rstudio.com>), R Notebook e Jupyter Notebook (<https://jupyter.org>).

È consigliabile inoltre utilizzare un sistema di controllo versione come Git (<https://git-scm.com>), in grado di tenere traccia delle successive modifiche dei file di un progetto.

Riproducibilità dei risultati

Per riproducibilità dei risultati si intende la possibilità di condurre nuovi esperimenti, solitamente utilizzando gli stessi metodi, ottenendo risultati consistenti con quelli dello studio originale. Lo scopo di uno studio di riproducibilità dei risultati è quello di corroborare quanto evidenziato in studi precedenti. L'interpretazione di un tale studio è tuttavia più complessa. Infatti, riprodurre i risultati di un singolo studio non garantisce la correttezza delle conclusioni dello studio originale; allo stesso modo un singolo insuccesso non ne prova in modo definitivo l'infondatezza. Inoltre, è importante comprendere che mentre in uno studio di riproducibilità dei metodi ci aspettiamo di ottenere esattamente gli stessi risultati, analizzando gli stessi dati con gli stessi metodi e lo stesso codice sorgente o software, in uno studio di riproducibilità dei risultati non sono attesi

risultati identici, anche se le conclusioni dello studio originale sono corrette. Queste differenze dipendono principalmente da tre fattori:

- la variabilità casuale (random variation), non eliminabile e propria di ogni fenomeno naturale;
- la complessità del sistema in studio (elevato numero di variabili, di cui alcune non controllabili e/o non identificate);
- differenze tra lo studio originale e quello nuovo (popolazione, dimensione campionaria, strumenti, condizioni, metodi di analisi).

La non riproducibilità dei risultati, al pari della non riproducibilità dei metodi, può ovviamente dipendere da frode, cioè da dati e/o risultati creati o manipolati artificialmente. Un'altra causa di non riproducibilità dei risultati è il cosiddetto bias di pubblicazione (publication bias), cioè la preferenza a pubblicare studi con risultati statisticamente significativi rispetto a quelli non significativi; gli studi pubblicati non rappresenterebbero in questo caso tutta l'evidenza disponibile relativamente a quella particolare ipotesi scientifica. Alcune metodologie possono essere utilizzate per sospettare o identificare il bias di pubblicazione (funnel plots, P-Curve, Test of Excess Significance) (11). Alla luce di quanto detto sopra, valutare la riproducibilità dei risultati significa definire quando i risultati di due studi indipendenti, pur non identici, sono tuttavia da considerare compatibili e consistenti (26-27).

Attualmente non vi è accordo sui metodi per valutare la riproducibilità dei risultati, ma sono state proposte diverse misure basate su: significatività statistica e intervalli di confidenza della variabile di risposta (outcome); dimensione dell'effetto; intervallo di soggettività della dimensione dell'effetto; valutazione soggettiva; approccio con metanalisi; intervalli di previsione (prediction interval) (6, 27). Si veda (11) per le applicazioni di alcune di queste misure negli studi di riproducibilità dei risultati. Negli studi pubblicati, generalmente, l'approccio seguito è quello di combinare diverse misure di riproducibilità (6). Tuttavia, alcuni di questi metodi sono stati criticati da più autori ed è importante che il ricercatore ne conosca i limiti (28). Di seguito sono riportate alcune considerazioni sulle misure elencate sopra.

In generale, utilizzando il valore di P, si considera riproducibile (riproducibilità dei risultati) uno studio quando l'effetto riprodotto ha la stessa direzione dell'effetto originale e il valore di P è $< 0,05$. Alcuni autori confrontano il valore di P dello studio originale con quello del nuovo studio. Tuttavia, l'utilizzo del valore di P come metodo per valutare la riproducibilità dei risultati di uno studio presenta alcune criticità. Il valore di P fornisce informazioni molto limitate sulla riproducibilità dei risultati di uno studio; infatti, a causa del campionamento, è molto probabile ottenere valori di P molto differenti tra i nuovi studi indipendenti e quello originale o tra i diversi nuovi studi indipendenti, anche con elevate dimensioni campionarie (29). Occorre, inoltre, non commettere quella che Kline chiama la

“fallacia della replicazione” (replication fallacy), cioè il ritenere che $(1-P)$ indichi la probabilità che uno studio venga riprodotto o la probabilità che lo studio riprodotto risulti statisticamente significativo (30). Come mostrato da Cumming, uno studio originale con $P=0,03$ non implica una probabilità del 97% che lo studio sia riprodotto o che risulti statisticamente significativo; infatti, si può dimostrare che in questo caso la probabilità che lo studio riprodotto risulti statisticamente significativo ($P<0,05$) è di molto inferiore e pari a 56,1% (29). Occorre, infine, ricordare che il valore di P dipende dalla dimensione campionaria: sarebbe possibile quindi dichiarare uno studio con elevata dimensione campionaria come “riproducibile” con un P significativo ma un effetto prossimo a zero (corrispondente in pratica a nessun effetto o comunque ad un effetto trascurabile e privo di interesse), oppure considerare uno studio con bassa dimensione campionaria, con un effetto identico all’originale (e quindi in sostanza corroborante lo studio originale), “non riproducibile” perché avente un $P > 0,05$.

Se, come raccomandato ormai da diversi anni nella letteratura scientifica, la variabile di risposta (media, differenza tra medie, rischio, etc.) di uno studio originale non fosse riportata unicamente come valore di P , ma anche come intervallo di confidenza, non solo l’intervallo di confidenza costruito intorno alla risposta potrebbe dare informazioni relative al vero parametro della popolazione, ma potrebbe anche consentire di fare una previsione sulla variabile di risposta del successivo eventuale nuovo studio indipendente. Cumming ha infatti dimostrato che vi è una probabilità dell’83% che la variabile di risposta ottenuta in uno studio indipendente (con la stessa dimensione campionaria) cada all’interno dell’intervallo di confidenza al 95% costruito intorno alla variabile di risposta dell’esperimento originale (31). L’intervallo di confidenza dello studio originale viene quindi utilizzato per avere informazioni utili sulla riproducibilità.

È interessante, inoltre, ricordare altre misure che possono essere utilizzate per fare previsioni rispetto agli studi riproducibili. Killeen nel 2005 ha proposto il calcolo della probabilità di replicazione (prep), definita come la probabilità di ottenere in un nuovo studio indipendente un effetto dello stesso segno (direzione) di quello dello studio originale (32). Come puntualizzato da Cumming e da altri autori, tuttavia, l’implementazione di prep nell’ambito delle scienze psicologiche ha presentato numerosi problemi, sia dovuti a errori di calcolo, sia per la frequente confusione nello scambiare prep (probabilità di ottenere un effetto della stessa direzione o segno) con psprep, cioè la probabilità di ottenere in un nuovo studio un effetto della stessa direzione e statisticamente significativo (33-34). Da notare che prep non è nemmeno la probabilità di ottenere un effetto identico a quello originale.

Una possibile alternativa per valutare il successo del nuovo studio è quello di comparare la direzione e la dimensione degli effetti dello studio originale e del nuovo studio indipendente, oppure, verificare che l’effetto dello studio originale sia compreso

nell’intervallo di confidenza costruito intorno all’effetto del nuovo studio. Simonsohn, per superare i limiti delle strategie precedenti, ha introdotto un differente approccio denominato “small telescopes”, combinando la dimensione dell’effetto, la significatività e la potenza statistica. Questa metodologia, piuttosto che concludere che l’effetto riportato nello studio originale sembra non esistere (difficile da dimostrare), consente di valutare quanto l’effetto ottenuto nel nuovo studio è compatibile con un effetto sufficientemente grande da essere evidenziabile nello studio originale (35). Se il nuovo studio indipendente con una numerosità maggiore, e quindi una maggiore potenza statistica (“large telescope”), evidenzia un effetto molto piccolo, prossimo a zero, quindi trascurabile da un punto di vista teorico, si può concludere che lo studio originale non è riprodotto, perché il “vero” effetto è troppo piccolo per poter essere stato realisticamente osservato nello studio originale, con una numerosità minore e quindi con una minore potenza statistica (“small telescope”). In altre parole, un effetto non osservato in uno studio con maggior potenza statistica contraddice i risultati originali ottenuti con una minore potenza statistica, perché, seguendo la metafora astronomica, ciò che è osservato o visto con un telescopio piccolo (studio originale con minor potenza statistica) dovrebbe essere anche osservato con un telescopio grande (nuovo studio indipendente con maggior potenza statistica) (35).

Recentemente Patil et al. hanno proposto un’ulteriore misura, cioè un intervallo per predire (predicting interval) l’effetto del nuovo studio a partire dall’effetto osservato nello studio originale (27). È da notare che questa tipologia di intervallo, a differenza di altre misure alternative, incorporando nella formula la numerosità campionaria sia dello studio originale che di quello nuovo indipendente, considera la variabilità insita in entrambi (27).

Infine, è utile ricordare l’approccio proprio della metanalisi al problema della riproducibilità dei risultati: combinando i dati di tutti gli studi considerati, si accumula evidenza a favore o contro una certa ipotesi (l’effetto stimato utilizzando tutti i dati disponibili generalmente è più attendibile di una stima basata su un unico studio). Inoltre, è possibile anche stimare l’eterogeneità degli effetti: un’eterogeneità significativamente diversa da 0, o maggiore di una soglia selezionata, suggerirà effetti sufficientemente diversi e quindi scarsa riproducibilità dei risultati. Per una completa trattazione e relative applicazioni si veda Hedges et al. (36) e Braver et al. (37).

Riassumendo, numerosi fattori sono alla base delle differenze attese in termini di effetti tra uno studio originale e altri studi indipendenti, come la complessità del sistema in studio, la variabilità casuale insita nei fenomeni naturali, la conoscenza del numero e delle relazioni tra le variabili considerate, la capacità di controllare le variabili dell’esperimento, la stabilità del fenomeno in studio, l’incertezza del sistema di misura. A queste si aggiungono altre cause come frode e varie forme di bias (selettivo, di pubblicazione). Inoltre, tanto

meno il disegno dello studio è dettagliato (popolazione, sottogruppi, condizioni sperimentali, trattamento dati, analisi dati), tanto numerose saranno le differenze tra lo studio originale e quelli nuovi indipendenti e maggiore il rischio di non riproducibilità. Infine, numerose sono le misure proposte per valutare la riproducibilità dei risultati di uno studio; sebbene ci sia sufficiente accordo sulle criticità di alcune di queste, molte altre necessitano ancora di essere verificate e validate con ulteriori studi. Inoltre, alcuni lavori hanno evidenziato non solo una scarsa conoscenza di queste misure ma in particolare una loro errata interpretazione.

Riproducibilità inferenziale

Come anticipato in precedenza, per riproducibilità inferenziale si intende giungere a conclusioni simili utilizzando gli stessi dati o raccogliendone di nuovi (studio indipendente). Delle tre tipologie di riproducibilità rappresenta quella più importante, ma richiede una valutazione più complessa, maggiore capacità di ragionamento, una conoscenza approfondita dello specifico campo di ricerca e della statistica. In effetti, non è tanto interessante se il singolo studio è riproducibile o quanti studi sono in accordo, quanto piuttosto raggiungere una visione generale e condivisa su una particolare questione scientifica. Lo stesso Goodman sottolinea il fatto che la riproducibilità dei metodi e la riproducibilità dei risultati non garantiscono le stesse conclusioni; infatti, i ricercatori possono giungere alle stesse conclusioni tramite risultati e/o dati diversi o giungere a conclusioni differenti pur disponendo degli stessi dati e/o risultati (2). La scarsa conoscenza di questo tipo di riproducibilità da parte della maggior parte della comunità scientifica è testimoniata dal numero estremamente ridotto dei lavori pubblicati su questo argomento.

Secondo Goodman, due delle cause principali della non riproducibilità inferenziale, e quindi del motivo per il quale pur utilizzando gli stessi dati e/o risultati si possa giungere a conclusioni diverse, sono la probabilità a priori dell'ipotesi e la scelta di come analizzare i dati, presentare e/o discutere i risultati (2).

Secondo l'approccio bayesiano, la probabilità che una certa ipotesi sia vera, dopo aver condotto un esperimento, dipende dalla forza dell'evidenza scientifica dei risultati sperimentali e dalla probabilità a priori, cioè la probabilità che l'ipotesi fosse considerata vera prima della conduzione dell'esperimento. Da questo si comprende che: due ricercatori, pur disponendo degli stessi risultati, possono pervenire a conclusioni diverse, se la loro probabilità a priori è diversa (ad esempio per diversa conoscenza degli studi di settore o la diversa confidenza attribuita ai risultati degli studi precedenti); che riprodurre uno studio non ha lo scopo di rigettare o accettare una precedente ipotesi ma quello di accumulare evidenza a favore o meno di una certa ipotesi; infine, se un'ipotesi sembra inizialmente non plausibile o poco probabile (bassa

probabilità a priori), sarà necessario raccogliere maggiori evidenze (cioè eseguire numerosi studi indipendenti ottenendo risultati concordi), rispetto ad un'ipotesi ritenuta maggiormente plausibile (ad esempio perché ipotesi maggiormente condivisa dalla comunità scientifica, oppure perché meglio si adatta ad altre osservazioni e/o evidenze). La ripetizione di studi con simili risultati si traduce in una sempre più forte evidenza a favore o contro l'ipotesi.

Un secondo fattore responsabile della non riproducibilità, frequentemente combinato a descrizione insufficiente dei metodi, viene generalmente indicato come molteplicità. Si parla di molteplicità in molte situazioni:

- molteplicità di ipotesi: quando il ricercatore saggia molte ipotesi in un unico esperimento o la stessa ipotesi in molti esperimenti (ad esempio quando vengono saggiate numerose condizioni differenti come concentrazione e temperatura). Per effetto del caso il ricercatore potrà ottenere un risultato statisticamente significativo;
- molteplicità di variabili di risposta (outcomes): per un'unica tipologia o dominio di variabile di risposta, il ricercatore può raccogliere dati utilizzando differenti metodi di misurazione (differenti strumenti, scale di misura), differenti punti temporali, differenti modi di aggregare i dati (qualitativi, semiquantitativi);
- molteplicità di analisi: quando il ricercatore esegue numerose analisi statistiche (metodi statistici diversi, diversi modelli, diversi metodi per gestire i dati mancanti) fino ad ottenere un risultato statisticamente significativo (P-hacking);
- molteplicità di fonti: quando il ricercatore riporta i risultati degli studi in più pubblicazioni, presentando talora informazioni e dati contraddittori.

La molteplicità complica e può ostacolare l'aggregazione di studi. Inoltre, la presentazione selettiva dei risultati (selective reporting), cioè riportare solo i risultati statisticamente significativi, può condurre a decisioni errate (38).

Il problema della molteplicità negli studi clinici è ben conosciuta e numerosi metodi statistici possono essere utilizzati per aggiustare i risultati quando necessario. La dettagliata descrizione di questi richiederebbe un eccessivo spazio e dettagli tecnici. Tuttavia, si segnala che alcuni Enti, come la Food and Drug Administration (FDA) e l'Agenza Europea per i Medicinali (EMA) hanno pubblicato specifiche linee guida sull'impatto della molteplicità negli studi clinici e le possibili soluzioni. Inoltre, il lettore interessato può consultare l'interessante revisione di Dmitrienko et al. (39).

In una recente pubblicazione, Khan et al., analizzando 511 studi clinici randomizzati in ambito cardiovascolare pubblicati su 6 riviste ad alto impact factor tra il 2015 e il 2018, hanno evidenziato la presenza di qualche forma di molteplicità in 300 (58,7%), ma solo in 85 di questi (28,3%) era stata utilizzata qualche forma di correzione o aggiustamento (40). Questo lavoro suggerisce che, sebbene si discuta di molteplicità negli studi clinici da diversi anni, le

soluzioni proposte in letteratura sono ancora poco conosciute e/o implementate.

Una possibile soluzione al problema della molteplicità è rappresentata dalla pre-registrazione dello studio, similmente a quanto avviene già per gli studi clinici (41); in pratica, utilizzando alcune piattaforme, ad esempio l'Open Science Framework, il ricercatore deposita in anticipo il protocollo sperimentale ed il piano delle analisi. La pre-registrazione presenta numerosi vantaggi tra cui il fatto che rimane traccia anche di studi con risultati non significativi e non pubblicati (publication bias). Inoltre, con un piano di analisi può risultare chiaramente evidente quali erano le ipotesi e le analisi statistiche iniziali e quali quelle eseguite successivamente: questo dovrebbe rendere pratiche come il p-hacking e l'HARKing (Hypothesising After Results are Known) più difficili. Il modello della pre-registrazione è stato adottato da numerose riviste; l'idea è che il ricercatore invii il proprio lavoro alla rivista in due fasi separate: in una prima fase, prima della raccolta dei dati, sottopone alla revisione dei pari introduzione, ipotesi, disegno dello studio e piano delle analisi; i revisori possono rigettare lo studio o eventualmente suggerire modifiche al disegno sperimentale (piuttosto che limitarsi, come avviene attualmente, a revisionare il lavoro a raccolta dati ed analisi già terminate). Il manoscritto completo con risultati e discussione è inviato successivamente alla rivista, a lavoro terminato, per una seconda revisione. Attualmente sono più di 250 le riviste scientifiche che utilizzano il formato di pubblicazione dei report registrati.

Alle due cause principali di non riproducibilità inferenziale sopra riportate (differente probabilità a priori e molteplicità), Avidan et al. (42) aggiungono anche la scarsa qualità della sezione Discussione nelle pubblicazioni scientifiche, intendendo, in particolare, come errate pratiche: il non riferirsi alla letteratura rilevante del settore specifico (ad esempio revisioni sistematiche), il citare unicamente le precedenti pubblicazioni che concordano con i risultati dello studio, l'eccessiva (over-interpretation) o errata (mis-interpretation) interpretazione dei risultati (talvolta dovuta a scarsa conoscenza della statistica) e il non riportare le limitazioni dello studio. Una possibile soluzione proposta da questo autore è l'aggiunta di una seconda discussione redatta indipendentemente da un altro ricercatore (42). L'approccio suggerito, sebbene interessante e potenzialmente implementabile, presenta alcune criticità, tra cui la scelta del secondo ricercatore e il ritardo che si creerebbe nella pubblicazione.

Per riassumere, i fattori che più contribuiscono alla riproducibilità inferenziale, e quindi ad una più accurata traduzione dei risultati in conoscenza, sono rappresentati da una migliore conoscenza della statistica e dei metodi per correggere per la molteplicità, una presentazione dei dati non selettiva, una completa descrizione di tutte le fasi dello studio (disegno, metodi, risultati), fattore importante anche per gli altri tipi di riproducibilità, e una discussione bilanciata dei risultati.

CONCLUSIONI

La non riproducibilità, riportata da molti autori in diversi campi della ricerca scientifica, riconosce diverse cause. Alcune possibili soluzioni, descritte brevemente in questo lavoro, richiedono al singolo ricercatore una maggiore comprensione del processo scientifico, una migliore organizzazione del lavoro, una più approfondita conoscenza della statistica (metodi e ragionamento), la familiarizzazione e l'utilizzo dei numerosi strumenti informatici open source disponibili e l'implementazione di linee guida e buone pratiche già presenti in letteratura. Tuttavia, il problema della riproducibilità necessita di un approccio globale con il coinvolgimento di diversi stakeholders.

Di seguito un elenco di possibili azioni:

- gli Istituti di ricerca, le Università e le Società Scientifiche dovrebbero prevedere un percorso formativo specifico relativo alle metodologie e agli strumenti utili per migliorare la qualità scientifica e la riproducibilità dei risultati;
- le riviste scientifiche dovrebbero promuovere una maggiore trasparenza della ricerca, richiedendo la registrazione del disegno dello studio, una completa descrizione di ogni fase sperimentale, il codice di programmazione ed i dati (accessibili ma eventualmente protetti se necessario);
- gli Enti finanziatori dovrebbero tenere in considerazione il problema della riproducibilità dei risultati nello stabilire i criteri per l'assegnazione delle risorse.

Tutte queste attività, sebbene onerose in termini di tempo e risorse economiche, non sono vane ma fondamentali nel contribuire a stabilire solide fondamenta sulle quali la ricerca scientifica possa avanzare.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Begley CG, Ioannidis JPA. Reproducibility in science: Improving the standard for basic and preclinical research. *Circ Res* 2015;116:116-26.
2. Goodman SN, Fanelli D, Ioannidis JP. What does research reproducibility mean? *Sci Transl Med* 2016;8, 341ps12:1-7.
3. Camerer CF, Dreber A, Holzmeister F et al. Evaluating the replicability of social science experiments in Nature and Science between 2010 and 2015. *Nat Hum Behav* 2018;2:637-44.
4. Camerer CF, Dreber A, Forsell E et al. Evaluating replicability of laboratory experiments in economics. *Science* 2016;351:1433-6.
5. Alexander A, Barnett-Cowan M, Bartmess E et al. An open, large-scale, collaborative effort to estimate the reproducibility of psychological science. *Perspect Psychol Sci* 2012;7:657-60.
6. Open Science Collaboration. PSYCHOLOGY. Estimating the reproducibility of psychological science. *Science*

- 2015;349:943-51.
7. Wen H, Wang H-Y, He X et al. On the low reproducibility of cancer studies. *Nat Sci Rev* 2018;5:619–24.
 8. Plesser HE. Reproducibility vs. Replicability: a brief history of a confused terminology. *Front Neuroinform* 2018;11:76.
 9. Claerbout J, Karrenbach M. Electronic documents give reproducible research a new meaning, in Proceedings of the 62nd Annual International Meeting of the Society of Exploration Geophysics, New Orleans, USA, 25 to 29 October 1992 (<https://library.seg.org/doi/abs/10.1190/1.1822162>; ultimo accesso Ottobre 2020).
 10. Barba LA. Terminologies for reproducible research. [arXiv:1802.03311] 2018;1-18.
 11. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Reproducibility and Replicability in Science. Washington, DC: The National Academies Press. 2019.
 12. Peng RD, Dominici F, Zeger SL. Reproducible epidemiologic research. *Am J Epidemiol* 2006;163:783-9.
 13. Drummond C. Replicability is not reproducibility: nor is it good science. Proceedings of the Evaluation Methods for Machine Learning Workshop at the 26th ICML 2009 (<http://cogprints.org/7691/>; ultimo accesso Ottobre 2020).
 14. Klein RA, Ratliff KA, Vianello M et al. Investigating variation in replicability: A “many labs” replication project. *Soc Psychol* 2014;45:142-52.
 15. Klein RA, Vianello M, Hasselman F et al. Many Labs 2: Investigating variation in replicability across samples and settings. *AMPPS* 2018;1:443-90.
 16. Ebersole CR, Atherton OE, Belanger AL et al. Many Labs 3: Evaluating participant pool quality across the academic semester via replication. *J Exp Soc Psychol* 2016;67:68-82.
 17. Reproducibility Project: Cancer Biology. Investigating reproducibility in preclinical cancer research. <https://elifesciences.org/collections/9b1e83d1/reproducibility-project-cancer-biology> (ultimo accesso: settembre 2020).
 18. Reproducibility in Cancer Biology: The challenges of replication. <https://elifesciences.org/articles/23693> (ultimo accesso: settembre 2020).
 19. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 2012;483:531-3.
 20. Baker M, Dolgin E. Reproducibility project yields muddy results. *Nature* 2017;541:269-70.
 21. Baker M, Penny D. Is there a reproducibility crisis? *Nature* 2016;533:452-4.
 22. Coombes KR, Wang J, Baggerly KA. Microarrays: Retracing steps. *Nat Med* 2007;13:1276-7.
 23. Baggerly KA, Coombes KR. Deriving chemosensitivity from cell lines: forensic bioinformatics and reproducible research in high-throughput biology. *Ann Appl Stat* 2009;3:1309-34.
 24. Institute of Medicine. Evolution of Translational Omics: lessons learned and the path forward. Washington, DC: The National Academies Press, 2012.
 25. Peng RD. Report writing for data science in R. eds. LeanPub, 2016.
 26. Leek JT, Patil P, Peng RD. A Glass half full interpretation of the replicability of psychological science. [arXiv:1509.08968] 2015;1-6.
 27. Patil P, Peng RD, Leek JT. What should researchers expect when they replicate studies? A statistical view of replicability in psychological science. *Perspect Psychol Sci* 2016;11:539-44.
 28. Gilbert DT, King G, Pettigrew S et al. Comment on “Estimating the reproducibility of psychological science.” *Science* 2016;351:1037.
 29. Cumming G. Replication and p Intervals: P values predict the future only vaguely, but confidence intervals do much better. *Perspect Psychol Sci* 2008;3:286-300.
 30. Kline RB. Beyond significance testing: Reforming data analysis methods in behavioral research. Washington, DC: American Psychological Association, 2004.
 31. Cumming G, Williams J, Fidler F. Replication and Researchers' Understanding of Confidence Intervals and Standard Error Bars. *Understanding Statistics* 2004;3:299-311.
 32. Killeen PR. An alternative to null-hypothesis significance tests. *Psychol Sci* 2005;16:345–53.
 33. Cumming G. Understanding the average probability of replication: Comment on Killeen (2005). *Psychol Sci* 2005;16:1002-4.
 34. Lecoutre B, Lecoutre MP, Poitevineau J. Killeen's probability of replication and predictive probabilities: how to compute, use, and interpret them. *Psychol Methods* 2010;15:158-71.
 35. Simonsohn U. Small telescopes: detectability and the evaluation of replication results. *Psychol Sci* 2015;26:559-69.
 36. Hedges LV, Schauer JM. Statistical analyses for studying replication: Meta-analytic perspectives. *Psychol Methods* 2019;24:557–70.
 37. Braver SL, Thoemmes FJ, Rosenthal R. Continuously cumulating meta-analysis and replicability. *Perspect Psychol Sci* 2014;9:333-42.
 38. Li T, Mayo-Wilson E, Fusco N et al. Caveat emptor: the combined effects of multiplicity and selective reporting. *Trials* 2018;19:497.
 39. Dmitrienko A, D'Agostino R Sr. Traditional multiplicity adjustment methods in clinical trials. *Stat Med* 2013;32:5172-218.
 40. Khan MS, Khan MS, Ansari ZN et al. Prevalence of multiplicity and appropriate adjustments among cardiovascular randomized clinical trials published in major medical journals. *JAMA network open* 2020;3:e203082.
 41. Reproducibility and reliability of biomedical research: improving research practice. Symposium report, October 2015. The Academy of Medical Sciences (<https://acmedsci.ac.uk/viewFile/56314e40aac61.pdf>; ultimo accesso Ottobre 2020).
 42. Avidan MS, Ioannidis JPA, Mashour GA. Independent discussion sections for improving inferential reproducibility in published research. *Brit J Anaesth* 2019;122:413-20.

Consensus 2019 per l'analisi genetica in Fibrosi Cistica: presentazione del Documento

Marco Lucarelli^{1,2,3}, Adriano Angioni^{3,4}, Maria Baffico^{3,5}, Cristina Bombieri^{3,6}, Alberto Bonizzato^{3,7}, Graziella Borgo^{3,8}, Giuseppe Castaldo^{3,9}, Carlo Castellani^{3,10}, Claudia Centrone^{3,11}, Alessandra Coiana^{3,12}, Maria Rosaria D'Apice^{3,13}, Caterina Di Girgenti^{3,14}, Sarah Egiziano^{3,15}, Mosè Favarato^{3,15}, Annalisa Ferlisi^{3,16}, Paola Melotti^{3,17}, Laura Minicucci^{3,10}, Elisabetta Pelo^{3,11}, Angela Ragusa^{3,18}, Anna Ravani^{3,19}, Gianfranco Savoldi^{3,20}, Manuela Seia^{3,21}, Lisa Termini^{3,16}

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale

²Istituto Pasteur Italia, Fondazione Cenci Bolognetti, Sapienza Università di Roma

³Gruppo di lavoro per la revisione del documento Consensus 2019 per l'analisi genetica in fibrosi cistica della Società italiana per lo studio della fibrosi cistica (SIFC)

⁴Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

⁵U.O.C. Laboratorio di Genetica Umana, I.R.C.C.S. Giannina Gaslini, Genova

⁶Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona

⁷Laboratorio analisi, A.O.U. Integrata, Verona

⁸Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, Verona

⁹CEINGE-Biotecnologie avanzate, Napoli; Dipartimento di Biologia Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II

¹⁰Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, I.R.C.C.S. Giannina Gaslini, Genova

¹¹S.O.D. Diagnostica Genetica, A.O.U. Careggi, Firenze

¹²Laboratorio di Genetica e Genomica, Ospedale Pediatrico Microcitemico "A. Cao" - A.O. Brotzu, Cagliari; Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università di Cagliari

¹³Laboratorio di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma

¹⁴U.O.s.d. Genetica Molecolare, Dipartimento di Pediatria, ARNAS Civico G. Di Cristina Benfratelli, Palermo

¹⁵U.O.S. Diagnostica Molecolare - U.O.C. Laboratorio Analisi, Dipartimento di Patologia Clinica e Medicina Trasmfusionale, Azienda ULSS 3 Serenissima

¹⁶Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, ISMEP II Pediatria, ARNAS Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo

¹⁷Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, A.O.U. Integrata di Verona

¹⁸Laboratorio Centralizzato, Sezione di Genetica Molecolare, A.O.U. Policlinico Vittorio Emanuele, Catania

¹⁹Laboratorio di Genetica Molecolare, U.O. Genetica Medica, A.O.U. S. Anna, Ferrara

²⁰Sezione Specializzata di Citogenetica e Genetica Medica, U.O. Anatomia Patologica, Spedali Civili, Brescia

²¹Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

ABSTRACT

Presentation of the Consensus Document 2019 on the genetic analysis of Cystic Fibrosis.

The causative gene of Cystic Fibrosis (CF) is the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR). Although monogenic, CF has a complex genotype – phenotype relationship mainly originated by the high number of CFTR variants, the challenging mutational analysis, the incomplete functional knowledge and the variable clinical outcome of most variants, the action of modifier genes. This complexity affects diagnosis, prognosis and precision

A cura della Società italiana per lo studio della fibrosi cistica (SIFC) e approvato da: Società italiana di andrologia e medicina della sessualità (SIAMS), Società italiana di biochimica clinica e biologia molecolare clinica (SIBioC), Società italiana di genetica umana (SIGU).

Corrispondenza a: Marco Lucarelli; Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma; c/o AOU Policlinico Umberto I, Edificio 42 (Malattie Infettive), piano -1, Viale Regina Elena 324 - 00161 Roma, Tel 06-49970458, E-mail marco.lucarelli@uniroma1.it

Ricevuto: 20.06.2020

Accettato: 20.06.2020

Publicato on-line: 07.08.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.074

therapy. A correct and complete genetic analysis is crucial for all these aspects. The Consensus Document 2019 on the genetic analysis of CF (1S) provides a guidance to practitioners for the appropriate request and proper use of genetic testing in CF, as well as for the correct interpretation of the test result. It is to be hoped that the broad sharing achieved between the scientific societies involved can standardize the approach at national level and can improve the usefulness of the information provided to users, as part of a continuous process of improvement.

INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC; Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM - 219700) è una frequente malattia genetica della popolazione Caucasica (1, 2). Il modello di ereditarietà monogenico, autosomico e recessivo è apparentemente semplice. Tuttavia, una sempre più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari causativi, dipendenti dal gene Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR; 7q31.2; RefSeq NG_016465.4) (3, 4) ha svelato un'insospettata complessità con ricadute diagnostiche, prognostiche e terapeutiche (5-7). Riguardo a quest'ultimo aspetto, la corretta caratterizzazione genetica risulta fondamentale per l'applicazione di protocolli di medicina di precisione, ormai una realtà nel trattamento della FC. La grande variabilità delle manifestazioni fenotipiche ha indotto ad identificare diverse macro-categorie cliniche originate da varianti patogenetiche del CFTR (8, 9). Con il termine FC si intende ormai solo la forma classica, polisintomatica e multiorgano, di malattia. Tutte le forme mono-, oligo-sintomatiche, al momento comprendenti più di dieci diverse entità cliniche (10-15), sono indicate come patologie correlate al CFTR (CFTR-related disorders, CFTR-RD). Le CFTR-RD maggiormente caratterizzate sono l'assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD) in forma monosintomatica come unica manifestazione clinica di alterazione del CFTR (anche presente nella quasi totalità dei pazienti con FC polisintomatica come una delle manifestazioni cliniche), le pancreatiti idiopatiche e le bronchiectasie disseminate. Anche i neonati positivi allo screening neonatale per FC con diagnosi non conclusiva vanno a costituire un'entità clinica separata, denominata Cystic Fibrosis screening positive inconclusive diagnosis (CFSPID) in nomenclatura europea (16) o Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator – related metabolic syndrome (CRMS) in nomenclatura nordamericana (17). L'analisi genetica, volta ad individuare le varianti patogenetiche del CFTR, è fondamentale per la conferma diagnostica, in quanto la FC e le CFTR-RD originano quando entrambi gli alleli sono mutati, in omozigosi o eterozigosi composta. Grande importanza ha anche la ricerca del portatore, con un solo allele mutato che, non manifestando sintomi clinici, è individuabile solo mediante l'analisi genetica. L'elevato numero di varianti del CFTR e la loro combinazione in *cis* (su uno stesso allele, come alleli complessi) (18, 19) e in *trans* (sui due diversi alleli), i numerosi meccanismi molecolari e cellulari che intervengono nel percorso del CFTR dal gene alla

proteina funzionale in membrana, nonché l'intervento di geni modificatori e dell'interattoma del CFTR, rendono complessa l'analisi genetica e la sua interpretazione in chiave diagnostica, prognostica e terapeutica. I test genetici di nuova generazione hanno dato grande impulso alla ricerca mutazionale rendendo realizzabile l'analisi di sequenza del CFTR (ma anche di geni modificatori e interattori del CFTR) rapidamente, a basso costo e ad elevata produttività (20, 21). Un risultato importante della genetica molecolare della FC è stato quello di individuare classi mutazionali del CFTR che possono essere utilizzate per l'uso di agenti terapeutici specifici nell'ambito della medicina personalizzata della FC. Questa complessità genetica e la centralità dell'indagine mutazionale oltre che per scopi diagnostici e prognostici anche per quelli terapeutici di medicina personalizzata (22), ha reso necessario codificare strategie di analisi genetica rigorose e condivise.

STRUTTURA DEL DOCUMENTO

Il documento (1S) tratta gli aspetti specifici dell'analisi genetica in FC e aggiorna le indicazioni contenute nel testo "Modelli di analisi genetica per la fibrosi cistica" del 2005 (elaborato dalla Società italiana di genetica medica e dalla Società italiana di pediatria). Il testo completo è disponibile sui siti web delle società scientifiche coinvolte, oltre che come materiale supplementare collegato a questo breve articolo di presentazione.

Il documento si compone di due parti. Una prima parte tratta della descrizione generale della malattia, della consulenza genetica, delle strategie generali di ricerca mutazionale (in FC, CFTR-RD, infertilità e diagnosi genetica preimpianto), nonché della caratterizzazione di varianti nuove, rare o non precedentemente caratterizzate dal punto di vista funzionale. Una seconda parte si occupa delle strategie specifiche di analisi mutazionale nello screening neonatale, nella diagnosi prenatale, nella ricerca del portatore (individuale e di coppia), nei genitori (di affetti con FC o sospetta FC, anche relativamente all'ipercogenicità intestinale e/o dilatazione delle anse intestinali nel feto), nelle coppie (sia di popolazione generale, sia con aumentato rischio per FC o CFTR-RD), nonché di consanguinei. Sono inoltre presenti capitoli sull'assicurazione di qualità, sulla struttura del referto, sui principali database, siti web e software di analisi, nonché un elenco della bibliografia essenziale. Particolare attenzione è stata data all'appropriatezza dei protocolli di ricerca mutazionale in relazione a specifiche

indicazioni di richiesta.

Il documento è corredato di diagrammi di flusso che guidano l'operatore nella scelta della corretta strategia di ricerca mutazionale in specifiche situazioni genetiche, alle quali sono associate tabelle di rischio che aiutano nell'interpretazione e comunicazione del risultato.

L'intento è quello di fornire agli operatori del settore una guida all'appropriata richiesta e al corretto uso dei test genetici per FC attualmente disponibili, nonché alla corretta interpretazione del risultato del test. È auspicabile che l'ampia condivisione raggiunta tra le società scientifiche coinvolte possa uniformare i comportamenti a livello nazionale e migliorare l'utilità dell'informazione fornita agli utenti, nell'ambito di un continuo processo di miglioramento.

BIBLIOGRAFIA

1. Lucarelli M. Indagini genetiche di nuova generazione e terapia personalizzata: l'esempio vincente della Fibrosi Cistica. *Biochim Clin* 2018;42:44-50.
2. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 2015;16:45-56.
3. Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, et al. A genotypic-oriented view of CFTR genetics highlights specific mutational patterns underlying clinical macrocategories of Cystic Fibrosis. *Mol Med* 2015;21:257-75.
4. Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, et al. The impact on genetic testing of mutational patterns of CFTR gene in different clinical macrocategories of Cystic Fibrosis. *J Mol Diagn* 2016;18:554-65.
5. Terlizzi V, Carnovale V, Castaldo G, et al. Clinical expression of patients with the D1152H CFTR mutation. *J Cyst Fibros* 2015;14:447-52.
6. Terlizzi V, Lucarelli M, Salvatore D, et al. Clinical expression of cystic fibrosis in a large cohort of Italian siblings. *BMC Pulm Med* 2018;18:196.
7. Farrell PM, White TB, Ren CL, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 2017;181S:S4-S15.
8. Bombieri C, Claustres M, De BK, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10 Suppl 2:S86-102.
9. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17:51-65.
10. Rossi T, Grandoni F, Mazzilli F, et al. High frequency of (TG)mTn variant tracts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in men with high semen viscosity. *FertilSteril* 2004;82:1316-22.
11. de Souza DAS, Faucz FR, Pereira-Ferrari L, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology* 2018;6:127-35.
12. Jiang L, Jin J, Wang S, et al. CFTR gene mutations and polymorphism are associated with non-obstructive azoospermia: From case-control study. *Gene* 2017;626:282-9.
13. Bombieri C, Seia M, Castellani C. Genotypes and phenotypes in cystic fibrosis and cystic fibrosis transmembrane regulator-related disorders. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36:180-93.
14. Sofia VM, Surace C, Terlizzi V, et al. Trans-heterozygosity for mutations enhances the risk of recurrent/chronic pancreatitis in patients with Cystic Fibrosis. *Mol Med* 2018;24:38.
15. Kang SH, Piltcher OB, Dalcin Pde T. Sinusoidal alterations in computed tomography scans in cystic fibrosis: a literature review of observational studies. *Int Forum Allergy Rhinol* 2014;4:223-31.
16. Munck A, Mayell SJ, Winters V, et al. Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening. *J Cyst Fibros* 2015;14:706-13.
17. Borowitz D, Parad RB, Sharp JK, et al. Cystic Fibrosis Foundation practice guidelines for the management of infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome during the first two years of life and beyond. *J Pediatr* 2009;155(6 Suppl):S106-16.
18. Lucarelli M, Narzi L, Pierandrei S, et al. A new complex allele of the CFTR gene partially explains the variable phenotype of the L997F mutation. *Genet Med* 2010;12:548-55.
19. Terlizzi V, Castaldo G, Salvatore D, et al. Genotype-phenotype correlation and functional studies in patients with cystic fibrosis bearing CFTR complex alleles. *J Med Genet* 2017;54:224-35.
20. Lucarelli M, Porcaro L, Biffignandi A, et al. A new targeted CFTR mutation panel based on Next-Generation Sequencing Technology. *J Mol Diagn* 2017;19:788-800.
21. Bergougnoux A, D'Argenio V, Sollfrank S, et al. Multicenter validation study for the certification of a CFTR gene scanning method using next generation sequencing technology. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1046-53.
22. Di Lullo AM, Scorza M, Amato F, et al. An "ex vivo model" contributing to the diagnosis and evaluation of new drugs in cystic fibrosis. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2017;37:207-13.

Documento congiunto di SIBIOC, della Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS), della Sezione Italiana della European Ligand Assay Society (ELAS), e della Associazione Medici Endocrinologi (AME) relativo alla nota AIFA 96 sulla prescrivibilità dei farmaci per la carenza di Vitamina D, e raccomandazioni per la refertazione

Ruggero Dittadi^{1,15,16}, Sabrina Corbetta^{2,3,15}, Giuseppe Banfi^{2,4,15}, Francesco Bertoldo^{5,15}, Silvia Migliaccio^{6,15}, Stefano Gonnelli^{7,15}, Maurizio Rossini^{5,17}, Marco Migliardi^{8,16}, Antonio Fortunato^{9,16}, Fabio Vescini^{10,18}, Andrea Palermo^{11,18}, Cristina Vassalle^{12,15}, Silvia Gelsumini^{13,15}, Giovanni Lombardi^{2,14,15,19}

¹UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale dell'Angelo, ULSS3 Serenissima, Mestre

²IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano

³Dipartimento di Scienze Biomediche Chirurgiche e Odontoiatriche, Università degli Studi di Milano

⁴Università Vita Salute San Raffaele, Milano

⁵Dipartimento di Medicina, Università di Verona

⁶Dipartimento di Scienze Motorie, Umane e della Salute, Unità di Endocrinologia, Università degli Studi di Roma "Foro Italico", Roma

⁷Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, Siena

⁸UOC Laboratorio Analisi, A.O. Ordine Mauriziano di Torino

⁹UOC Patologia Clinica ASUR Marche - Area Vasta 5 - Ascoli Piceno

¹⁰SOC Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Azienda Sanitaria-Universitaria Integrata, Santa Maria della Misericordia di Udinea

¹¹UO di Endocrinologia e Diabete, Università Campus Bio-Medico, Roma

¹² Fondazione CNR-Regione Toscana G Monasterio, Pisa

¹³UOC SMEL2 Analisi Chimico Cliniche ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

¹⁴Poznań University of Physical Education, Poznań, Polska

¹⁵Membro del Gruppo di Studio inter-societario SIBioC-SIOMMMS Marcatori biochimici del turnover del tessuto osseo e del tessuto muscolare

¹⁶Membro del Consiglio Direttivo ELAS

¹⁷Presidente SIOMMMS

¹⁸Membro del Gruppo di lavoro AME Metabolismo minerale e osseo

¹⁹Member of the Working Group IFCC Bone markers

ABSTRACT

Joint Document from: Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC), Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases (SIOMMMS), Italiana Section of Ligand Assay (ELAS), Association of Endocrinologists (AME) on "Nota 96" by the Italian Medicine Agency (AIFA) about prescription status of medications for Vitamin D deficiency, and recommendations for reporting

Vitamin D, and its metabolites, have key roles in the functioning of virtually all tissues. Indeed, besides the unquestioned role in bone mineral metabolism, evidences have pointed out roles in inflammation and autoimmunity, skeletal muscle and cardiac function, neuromuscular communication. Therefore, vitamin D deficiency associates with

Questo documento è pubblicato congiuntamente dalle Società Scientifiche che hanno partecipato alla sua stesura.

Corrispondenza a: Giovanni Lombardi, Laboratorio di Biochimica Sperimentale e Biologia Molecolare, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Via Riccardo Galeazzi 4, 20161, Milano, Department of Athletics Strength and Conditioning, Poznań University of Physical Education & Sport, Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań, Polska, E-mail giovanni.lombardi@grupposandonato.it, lombardi@awf.poznan.pl

Ricevuto: 10.06.2020

Accettato: 23.06.2020

Publicato on-line: 07.08.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.075

rickets in the child, osteomalacia and increased risk of fracture in the adulthood and possibly with the increased risk of other pathological conditions.

In order to regulate the prescription of vitamin D supplementation (cholecalciferol, cholecalciferol/calcium salts, calcifediol) to the adult population, and consequently to contain the costs sustained by the National Health System, the Italian Medicine Agency (AIFA) has recently drafted the "Nota 96" identifying the categories of patients, based on the laboratory measurement of serum levels of 25(OH)D, that can benefit from the reimbursement of vitamin D therapy.

If the "Nota 96", AIFA has the merit to define rules in a field only slightly regulated, several considerations emerged from its analysis. From an analytical point of view, the "Nota 96" does not consider the issues of reliability and reproducibility of 25(OH)D measurement and standardization of the units of measurement and reporting. On the clinical side, the "Nota 96" does not consider the epidemic vitamin D insufficiency/deficiency that needs an adequate preventive approach and, furthermore, beyond its roles, the agency indicates the clinical conditions for whom vitamin D prescription is allowed.

This document analyses the content of "Nota 96" highlighting the points that need further evaluations and by giving possible different solutions; the document provides also recommendations on laboratory reporting of vitamin D measurements.

INTRODUZIONE

I vitameri del gruppo D (di seguito globalmente indicati come vitamina D), che includono le classiche 1,25-diidrossi vitamina D₂ e D₃, (calcitriolo) ma anche la forma 24,25-diidrossi, hanno un ruolo centrale nell'omeostasi del calcio e, pertanto, svolgono un ruolo essenziale nel metabolismo e nella corretta funzionalità virtualmente di tutti i tessuti. La vitamina D riveste indiscussi ruoli nel metabolismo minerale osseo e, probabilmente, anche nell'ambito di infiammazione ed autoimmunità, funzione muscolo-scheletrica e cardiaca e comunicazione neuromuscolare. Pertanto, oltre alla ben nota associazione causale tra deficienza di vitamina D e rachitismo nel bambino, osteomalacia ed aumentato rischio di fratture osteoporotiche nell'adulto (1) è plausibile, ed in parte dimostrato, che uno status vitaminico D subottimale possa associarsi ad altre condizioni patologiche (2).

Carenza e deficienza di vitamina D sono comuni nelle popolazioni che vivono alle alte latitudini soprattutto durante la stagione invernale, ma in realtà uno status vitaminico subottimale è ormai di frequentissimo riscontro anche alle nostre latitudini ed è associato all'odierno stile di vita caratterizzato, soprattutto, dalla ridotta attività svolta all'esterno e, pertanto, dall'impossibilità di raggiungere le opportune dosi giornaliere di radiazione UV-B (3,4). Anche nella popolazione italiana si possono riscontrare livelli molto bassi di 25(OH)D, con almeno la metà della popolazione con concentrazioni inferiori a 50 nmol/L (20 ng/mL) (5,6). L'elevata prevalenza di ipovitaminosi D rende conto del frequente, sebbene a volte ingiustificato, ricorso alla supplementazione (7).

Attualmente, il livello sierico di 25(OH)D totale [somma di 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃] è considerato il miglior biomarcatore per la valutazione dello status vitaminico D (8). Sebbene sia un metabolita non attivo, 25(OH)D è caratterizzato da un'emivita maggiore rispetto a 1,25-(OH)D ed i suoi livelli circolanti non sono dipendenti dal paratormone (PTH) che, invece, controlla l'idrossilazione enzimatica in C1 (3).

Al fine di regolamentare la prescrizione di vitamina D

(nelle forme di colecalciferolo, colecalciferolo/sali di calcio, calcifediolo) nella popolazione adulta e, quindi, di contenere i costi sostenuti dal Sistema Sanitario Nazionale (SSN), l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha prodotto un documento, la nota 96 (9), che identifica categorie di pazienti aventi diritto alla rimborsabilità della terapia con vitamina D, individuate sulla base della determinazione dei livelli sierici di vitamina D. Secondo la nota 96, l'appropriatezza prescrittiva della determinazione chimico clinica dei livelli circolanti di vitamina D viene riconosciuta per i soggetti:

- che presentano sintomi suggestivi di carenza di vitamina D;
- in terapia di lunga durata con farmaci interferenti con il metabolismo osseo;
- affetti da condizioni di malassorbimento;
- affetti da patologie ossee accertate;
- con riscontro di valori di PTH elevato e calcemia bassa o normale.

Persone anziane istituzionalizzate, donne in gravidanza o in allattamento e persone affette da osteoporosi o osteopatie accertate non candidate a terapia remineralizzante (vedi Nota 79) (10) sono contraddistinte dal riconoscimento della possibilità di supplementazione diretta con vitamina D, senza necessità della sua preventiva misura. Infine, vale il parere specialistico circa la necessità della determinazione nel caso di pazienti affetti da insufficienza renale, urolitiasi, ipercalcemia, sarcoidosi, neoplasie metastatiche e linfomi.

La prescrivibilità a carico del SSN della supplementazione con vitamina D sarà assicurata con livelli di 25(OH)D al di sotto di 50 nmol/L (20 ng/mL). Il tipo di supplementazione viene differenziato in base alle fasce di concentrazione di 25(OH)D <30 nmol/L [(12 ng/mL) e compreso tra 30 e 50 nmol/L (12 - 20 ng/mL)]. Concentrazioni sieriche >50 nmol/L (>20 ng/mL) vengono considerate "sufficienti" e, pertanto, non giustificano costi a carico del SSN (9). La nota AIFA si presta ad alcune considerazioni che vengono di seguito esposte.

CONSIDERAZIONI IN MERITO ALLA NOTA AIFA 96

Considerazioni nell'ambito del laboratorio

Se la nota 96 raggiungerà, almeno in parte, l'obiettivo del risparmio della spesa farmaceutica relativa alla supplementazione con vitamina D, dal punto di vista del laboratorio si rischia di incrementare la prescrizione della determinazione di 25(OH)D a causa dell'aspecificità dei sintomi indotti dalla carenza prolungata di vitamina D, provocando un possibile e paradossale aumento dei costi della diagnostica a carico del SSN.

Affidabilità e riproducibilità dei diversi metodi di determinazione della 25(OH)D

Data l'importanza affidata dalla nota 96 alla determinazione dei livelli circolanti di 25(OH)D, è obbligatorio considerare l'aspetto più prettamente tecnico della determinazione di vitamina D: i differenti metodi di determinazione disponibili sono tutti caratterizzati da errori sistematici (3) e, inoltre, presentano livelli di discordanza compresi tra il 15% ed il 30% rispetto al valore bersaglio, come risulta dagli ultimi rapporti VEQ "DEQAS" (<http://deqas.kpmc.co.uk>). Come riportato in un'ampia revisione della letteratura recentemente pubblicata, nonostante i grandi sforzi volti a standardizzare i metodi di determinazione e a minimizzarne la variabilità, l'attuale differenza della misura della concentrazione di 25(OH)D tra metodi immunometrici e metodi in cromatografia liquida-spettrometria di massa (liquid chromatography-mass spectrometry - LC-MS) è maggiore delle differenze accettabili per analiti determinati con questi metodi e, pertanto, la variabilità analitica dovrebbe essere considerata nella definizione e nell'utilizzo degli intervalli di riferimento (3). L'assenza di standardizzazione della misura della vitamina D [25(OH)D] ed altri metaboliti, provoca una sostanziale incertezza analitica che è necessario considerare non solo quando si valutano studi epidemiologici, ma anche quando s'interpretano i risultati dei pazienti (11).

Il Centers for Disease Control and Prevention (CDC) promuove il "Vitamin D Standardization Program" (VDSP) con lo scopo di valutare la comparabilità delle diverse procedure analitiche verso materiali di riferimento (12). Sarebbe, quindi, auspicabile che tutti i metodi in commercio aderissero e venissero valutati nell'ambito di questo programma, che può permettere perlomeno un periodico monitoraggio dei bias metodologici.

Va anche ricordato che dal 2019 IFCC ha creato un Comitato unico "Bone metabolism" fondendo tre diversi Working Groups già esistenti che, tra gli altri, sia prefigge di standardizzare i metodi per la determinazione della vitamina D nei laboratori clinici.

Dato il bias intrinseco alla determinazione di vitamina D, è stata suggerita la definizione di intervalli

di riferimento differenziati per metodo (11). Tuttavia, questa soluzione pone notevoli problemi pratici (13), che potrebbero forse essere superati dall'utilizzo di fattori di correzione specifici per metodo che riportino le determinazioni all'interno di un unico intervallo.

Va infine considerato che i metodi di misurazione di 25(OH)D possono risentire dell'effetto di alcuni interferenti. La natura lipofila della vitamina D la rende suscettibile ad interferenze non-specifiche da parte di altri lipidi presenti nel siero o plasma, come le lipoproteine, in termini di capacità dell'agente legante di associarsi alla 25(OH)D del campione e del calibratore nei metodi immunometrici. Per permettere l'accurata determinazione della 25(OH)D, si rende necessario il pretrattamento del campione al fine di separarla dalla proteina di trasporto Vitamin D-Binding Protein (VDBP) utilizzando un denaturante in situ nei metodi immunometrici (14). Data la differenza nelle modalità di estrazione, le differenze nei risultati tra i diversi metodi sono decisamente rilevanti, soprattutto a basse concentrazioni (15). Anche i metodi in LC-MS/MS non sono immuni da interferenze. Esiste una forma di 25(OH) vitamina D, C3 epimero [3-epi-25(OH)D₃ e 3-epi-25(OH)D₂], con differente orientamento chirale in posizione C3. Questo vitamero, scarsamente attivo ma con uguale massa, è presente prevalentemente in età pediatrica, ma è riscontrabile in quantità non trascurabili e relativamente stabili nell'adulto (16): ciò costituisce un possibile interferente per la determinazione in spettrometria di massa, che è una tecnica achirale. Inoltre, con questi metodi la presenza di gel di separazione nelle provette del prelievo può provocare il fenomeno di "soppressione di ioni", cioè un ostacolo al processo di ionizzazione (15).

Uniformità della refertazione: l'unità di misura

La refertazione della vitamina D presenta molte criticità: in primis, il Sistema Internazionale prevede come unità di misura nmol/L ma, di contro, l'unità ng/mL è sicuramente più utilizzata e, pertanto, più familiare (la stessa nota 96 utilizza, purtroppo, come unità di misura esclusivamente ng/mL). L'armonizzazione dell'uso dell'unità di misura è fondamentale e deve essere accompagnata da opportuna formazione dei clinici al fine di evitare fraintendimenti.

Uniformità della refertazione: la definizione della soglia diagnostica/soglia terapeutica dei livelli circolanti di 25(OH)D

In relazione ai valori di riferimento per la determinazione dei livelli di 25(OH)D, la nota AIFA riporta come soglia di sufficienza 50 nmol/L (20 ng/mL) facendo proprie, le indicazioni dell' Institute of Medicine statunitense (IOM) del 2011 (17). È opportuno sottolineare che i limiti definiti da IOM non hanno trovato un accordo universale (13,18,19), e la Endocrine Society definisce come minimo 75 nmol/L

(30 ng/mL) (1,17). Ad oggi, solo Australia e Nuova Zelanda utilizzano intervalli di riferimento che considerano le variazioni stagionali (20). È evidente, pertanto, che si possano creare differenze di trattamento fra i pazienti che eseguono la misura della vitamina D in periodi diversi dell'anno (ad esempio all'inizio dell'autunno rispetto alla fine dell'inverno, con più risultati "normali" nel primo caso ed un maggior numero di "patologici" nel secondo). Le linee guida di SIOMMMS indicano l'adeguatezza del valore soglia di 50 nmol/L (20 ng/mL) per la popolazione generale, mentre per la popolazione a rischio di ipovitaminosi D e per i soggetti osteoporotici sottoposti a terapia come da nota 79 (10) viene consigliata una concentrazione minima di 75 nmol/L (30 ng/mL).

La determinazione dei valori soglia diagnostici di insufficienza di 25(OH)D è stata valutata sulla base dell'ottimizzazione dell'assorbimento intestinale di calcio e/o della normalizzazione dei livelli circolanti di PTH, fornendo purtroppo risultati discordanti. Inizialmente, era stato riscontrato un completo assorbimento intestinale di calcio in presenza di concentrazioni di vitamina D >80 nmol/L (>32 ng/mL) (21). Successivamente Need et al. (22) hanno dimostrato che l'assorbimento intestinale di calcio raggiunge un plateau già in presenza di concentrazioni di 25(OH)D di 20 nmol/L (8 ng/mL), mentre Aloia et al. (23) hanno trovato solo minimi incrementi di assorbimento di calcio per concentrazioni di 25(OH)D comprese tra 40 e 110 nmol/L (16 - 44 ng/mL), senza nessuna evidenza circa una soglia determinabile. Analogamente, un altro studio ha dimostrato che la supplementazione di vitamina D tale da mantenere concentrazioni di 25(OH)D >50 nmol/L (>20 ng/mL), induceva un incremento dell'assorbimento di calcio molto limitato e non associato ad incrementi della densità minerale ossea (24). La valutazione dei livelli di 25(OH)D associati alla normalizzazione delle concentrazioni di PTH ha fornito risultati variabili a seconda del modello di studio utilizzato [da 32 ad oltre 78 nmol/L (da 12,8 ad oltre 31,2 ng/mL)] (25-27), anche a causa della complessa interazione dei diversi fattori coinvolti nel rapporto vitamina D/PTH.

Una revisione del 2009 sui livelli necessari a prevenire osteomalacia e rachitismo (28), ha mostrato che una soglia oltre la quale non sussiste rischio di malattia ossea è difficilmente individuabile. La concentrazione mediana in bambini con rachitismo risultava inferiore a 27 nmol/L (10,8 ng/mL) in 6 studi su 13, ma venivano riportati anche livelli di 30-50 nmol/L (12-20 ng/mL), in funzione del livello di assunzione di calcio nelle diverse popolazioni studiate. In uno studio (29), su 675 persone morte per incidenti o altre cause non naturali, nel quale sono stati determinati i livelli di vitamina D in relazione alla eventuale presenza di osteomalacia diagnosticata mediante biopsia della cresta iliaca, è stato evidenziato che livelli di 25(OH)D >75 nmol/L (>30

ng/mL) non fossero mai associati a segni di osteomalacia. È anche vero che solo nel 3% delle persone con tracce di osteomalacia furono riscontrati livelli di 25(OH)D compresi tra 50 e 75 nmol/L (20-30 ng/mL).

L'associazione fra la concentrazione di vitamina D ed il rischio di fratture mostra sempre una relazione inversa tra i due parametri, ma le concentrazioni al di sopra delle quali non si osserva più alcun miglioramento sono comprese tra 40 e 70 nmol/L (16 - 28 ng/mL) (30-33).

Per quanto riguarda le patologie extra-ossee, diversi studi osservazionali hanno riportato l'associazione fra bassi livelli di 25(OH)D ed un gran numero di malattie, comprese malattie cardiovascolari, cancro, diabete, malattie infettive, autoimmuni e neurodegenerative (34). Negli ultimi anni sono state pubblicate un ampio numero di meta-analisi che valutano queste associazioni, tuttavia gli effetti della supplementazione con 25(OH)D sono spesso discordanti e poco convincenti (35), in particolare per le malattie croniche, come le cardiovascolari ed il cancro (36,37).

Nonostante la numerosa quantità di dati disponibili, ad oggi non sembra possibile ricavare un consenso sui possibili valori di riferimento in specifiche patologie extraossee, così come sui livelli ottimali di assunzione della vitamina D. Gli effetti benefici extra-scheletrici attribuiti alla vitamina D sono, comunque, riferiti a livelli di concentrazione generalmente più elevati rispetto a quelli sul metabolismo del calcio.

Considerazioni cliniche

La nota 96 non prende in considerazione il problema dell'ormai epidemica carenza di vitamina D (38), la quale richiede un approccio preventivo adeguato.

La nota indica le condizioni cliniche per le quali è ammissibile (o consigliabile) la determinazione della vitamina D ma, sebbene la motivazione clinica sia decisamente corretta, la evidente aspecificità della condizione di ipovitaminosi D lascia ampi margini di discrezionalità al medico prescrittore. Se da un lato questo tipo di indicazione esula dalla missione di AIFA, che è limitata alla regolamentazione di uso e prescrizione di un farmaco, dall'altro la praticità applicativa che dovrebbe essere propria di una nota AIFA viene a mancare. Come riferimento vengono, poi, prese le indicazioni del National Institute for Health and Care Excellence (NICE), organismo britannico, ora extra UE, che è stato spesso in contrasto con le indicazioni delle società scientifiche internazionali, soprattutto in ambito di osteoporosi.

È importante però dare atto che la nota 96, finalmente, pone il problema della prescrizione indiscriminata di vitamina D e, nello specifico, riporta che:

- lo screening dell'ipovitaminosi D non deve essere

proposto indiscriminatamente a tutta la popolazione generale. Si deve riconoscere il merito alla nota 96 di aver tentato di identificare delle categorie di intervento. A questo proposito si ritiene che lo screening della 25(OH)D non sia consigliabile anche in un ampio elenco di condizioni notoriamente a rischio di ipovitaminosi, e dove la supplementazione è comunque obbligatoria; una determinazione potrà essere eventualmente eseguita dopo 2-3 mesi dall'inizio della supplementazione per valutare il raggiungimento dell'obiettivo. In accordo con la nota 96, si sconsiglia il continuo monitoraggio dei valori di 25(OH)D, una volta iniziata la supplementazione;

- la prevenzione del rischio autoimmunitario, cardiovascolare, neoplastico, e così via non è al momento oggetto di pratica clinica corrente;
- ribadisce la necessità di supplementare con vitamina D i pazienti candidati a terapia remineralizzante, in accordo con la nota 79 (10).

POSSIBILI RACCOMANDAZIONI

Metodi analitici

Se le precisioni intra-metodo sono mediamente buone, i bias fra metodi sono ancora elevati, tanto che in realtà sarebbe da sconsigliare l'individuazione di soglie predeterminate, perché l'uso di uno stesso valore soglia per metodi diversi può provocare una errata classificazione clinica dei pazienti e andrebbero perciò utilizzati intervalli di riferimento metodo-specifici (11). Il problema si ripropone ogni volta che si cerca di individuare obiettivi terapeutici precisi per molecole i cui metodi di misura sono complessi e/o difficilmente standardizzabili. È pur vero che le esigenze prescrittive impongono di stabilire dei limiti decisionali, ma è altrettanto importante che i clinici siano consci della criticità del problema: a questo scopo, è opportuno che il referto di laboratorio riporti perlomeno l'indicazione esplicita del metodo utilizzato per la determinazione della Vitamina D. Una ulteriore informazione potrebbe essere l'indicazione del bias medio del metodo utilizzato rispetto a metodologie di riferimento, ma, oltre al fatto che questo dato può non essere facilmente reperibile (fra l'altro non tutte le ditte produttrici partecipano al programma VDSP), gli stessi limiti decisionali sono tratti da studi effettuati con metodologie non "di riferimento". L'inserimento di questo dato nel referto, allo stato attuale delle conoscenze, non sembra quindi essere ancora raccomandabile.

Unità di misura

È necessario attuare un processo di armonizzazione che renda facilmente confrontabili i referti generati da diversi laboratori. Una opzione può essere quella di riportare sia l'unità di misura

tradizionale (ng/mL) che quella voluta dal SI (nmol/L) almeno per un periodo di transizione, temporalmente definito, che porti, in ultima istanza, all'adozione dell'unità SI.

Valori soglia

Come si è detto, la nota AIFA 96 stabilisce un unico valore soglia, di 50 nmol/L (20 ng/mL), legato alla rimborsabilità del farmaco. Il citato disaccordo sulle linee guida che hanno portato a questa indicazione è dimostrato dal fatto che al momento vengono generalmente usate dai laboratori le definizioni di "insufficienza" al di sotto di 75 nmol/L (30 ng/mL), con ulteriori limiti di "carenza" sotto i 50 o 25 nmol/L (20 o 10 ng/mL), più vicine alle posizioni della Endocrine Society (1,39). Questa situazione può generare disorientamento e risultati contraddittori, con casi che risulterebbero identificati nel referto come ancora "insufficienti", ma senza la possibilità di rimborso della supplementazione di vitamina D.

Una recente revisione delle linee guida sull'argomento ha rilevato che su 12 linee guida esaminate, 4 si esprimono a favore di una soglia di 50 nmol/L (20 ng/mL) e 8 consigliano il valore di 75 nmol/L (30 ng/mL) (40).

Per quanto riguarda i valori di tossicità, si ritiene che non ci siano prove di nessun tipo tali da indicare un vero valore soglia, ma nella necessità di individuare un qualche limite si suggerisce la concentrazione di almeno di 250 nmol/L (100 ng/mL), come indicato dalla Endocrine Society (1), contrariamente alla soglia di 100 nmol/L (40 ng/mL), riportata in nota 96 ma non sostenuta da alcuna evidenza.

Vista questa situazione e tutti gli aspetti precedentemente descritti, il gruppo di studio è orientato a consigliare una posizione prudente, proponendo questa possibile tipologia di refertazione, con i valori indicati nel riquadro sottostante.

SINOSI DELLE RACCOMANDAZIONI

- Indicare esplicitamente nel referto il metodo utilizzato per la determinazione	
- Utilizzare le unità di misura SI (nmol/L), eventualmente accompagnate per un congruo periodo di tempo dalla espressione del risultato nelle unità di misura tradizionali (ng/mL)	
- Identificare i valori atti ad orientare la valutazione dello status del soggetto	
<50 nmol/L (<20 ng/mL)	valori insufficienti
50-75 nmol/L (20-30 ng/mL)	valori non ottimali, in relazione a possibili co-morbilità associate
>75 nmol/L (>30 ng/mL)	valori ottimali

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin d deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-30.
2. Grant WB. Vitamin d and health in the mediterranean countries. *Hormones (Athens)* 2019;18:23-35.
3. Ferrari D, Lombardi G, Banfi G. Concerning the vitamin D reference range: Pre-analytical and analytical variability of vitamin d measurement. *Biochemia Med* 2017;27:030501.
4. Ferrari D, Lombardi G, Stollo M, et al. Association between solar ultraviolet doses and vitamin d clinical routine data in European mid-latitude population between 2006 and 2018. *Photochem Photobiol Sci* 2019;18:2696-706.
5. Bianchi S, Maffei S, Prontera C, et al. Preanalytical, analytical (DiaSorin LIAISON) and clinical variables potentially affecting the 25-OH vitamin D estimation. *Clin Biochem* 2012;45:1652-7.
6. Adami S, Bertoldo F, Braga V, et al. 25-hydroxy vitamin D levels in healthy premenopausal women: association with bone turnover markers and bone mineral density. *Bone* 2009;45:423-6.
7. Hilger J, Friedel A, Herr R, et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2014;111:23-45.
8. Jones G. Interpreting vitamin d assay results: Proceed with caution. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:331-4.
9. Istituzione della nota AIFA 96. Determinazione n. 1533/2019. Roma, 2019 (<https://www.aifa.gov.it/Nota-96> ultimo accesso: febbraio 2020)
10. Determinazione n. 446/2017. Aggiornamento della Nota 79. Roma, 2017 (http://www.agenziafarmaco.gov.it/sites/default/files/Determinazione_446-2017_agg_nota79.pdfultimo accesso: febbraio 2020)
11. Herrmann M, Farrell CL, Pusceddu I, et al. Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:3-26.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory quality assurance and standardization programs: Hormone standardization program. (<https://www.cdc.gov/labstandards/hs.html> ultimo accesso: maggio 2020)
13. Dittadi R. Vitamina D e recepimento della nota AIFA 96. Implicazioni per il laboratorio. *LigandAssay* 2019;24.
14. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, et al. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin d assays: Influence of vitamin d binding protein concentration. *Clin Chem* 2012;58:543-8.
15. Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin d assays: Confronting the issues. *Cur Drug Targets* 2011;12:19-28.
16. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, et al. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:163-8.
17. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin d from the institute of medicine: What clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:53-8.
18. Fuleihan Gel H, Bouillon R, Clarke B, et al. Serum 25-hydroxyvitamin d levels: variability, knowledge gaps, and the concept of a desirable range. *J Bone Miner Res* 2015;30:1119-33.
19. Bates B, Lennox A, Prentice A, et al. National diet and nutrition survey: Headline results from years 1, 2 and 3 (combined) of the rolling programme (2008/2009–2010/11). In: Agency DoHatFS, London, 2012 (https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/207708/NDNS-Y3-report_All-TEXT-docs-combined.pdf ultimo accesso: febbraio 2020)
20. Nowson CA, McGrath JJ, Ebeling PR, et al. Vitamin d and health in adults in australia and new zealand: A position statement. *Med J Australia* 2012;196:686-7.
21. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, et al. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003;22:142-6.
22. Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, et al. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin d deficiency. *J Bone Miner Res* 2008;23:1859-63.
23. Aloia JF, Dhaliwal R, Shieh A, et al. Vitamin D supplementation increases calcium absorption without a threshold effect. *Am J Clin Nutr* 2014;99:624-31.
24. Hansen KE, Johnson RE, Chambers KR, et al. Treatment of vitamin d insufficiency in postmenopausal women: A randomized clinical trial. *JAMA Int Med* 2015;175:1612-21.
25. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997;7:439-43.
26. Durazo-Arvizu RA, Dawson-Hughes B, Sempos CT, et al. Three-phase model harmonizes estimates of the maximal suppression of parathyroid hormone by 25-hydroxyvitamin D in persons 65 years of age and older. *J Nutr* 2010;140:595-9.
27. Saliba W, Barnett O, Rennert HS, Lavi I, Rennert G. The relationship between serum 25(OH)D and parathyroid hormone levels. *Am J Med* 2011;124:1165-70.
28. Chung M, Balk EM, Brendel M, et al. Vitamin D and calcium: A systematic review of health outcomes. *Evid Rep Technol Assess* 2009:1-420.
29. Priemel M, von Domarus C, Klatte TO, et al. Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: Histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res* 2010;25:305-12.
30. Melhus H, Snellman G, Gedeberg R, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and fracture risk in a community-based cohort of elderly men in Sweden. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2637-45.
31. Lips P, Obrant KJ. The pathogenesis and treatment of hip fractures. *Osteoporos Int* 1991;1:218-31.
32. Cauley JA, Parimi N, Ensrud KE, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and the risk of hip and nonspine fractures in older men. *J Bone Miner Res* 2010;25:545-53.
33. van Schoor NM, Visser M, Pluijm SM, et al. Vitamin D deficiency as a risk factor for osteoporotic fractures. *Bone* 2008;42:260-6.
34. Bischoff-Ferrari HA. "Vitamin D – why does it matter?" – Defining Vitamin D deficiency and its prevalence. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72S:3-6.
35. Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, et al. Vitamin D and multiple health outcomes: Umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ* 2014;348:g2035.
36. Autier P, Mullie P, Macacu A, et al. Effect of vitamin D supplementation on non-skeletal disorders: a systematic review of meta-analyses and randomised trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;5:986-1004.
37. Barbarawi M, Kheiri B, Zayed Y, et al. Vitamin D Supplementation and cardiovascular disease risks in more than 83 000 individuals in 21 randomized clinical trials: A Meta-analysis. *JAMA Cardiol* 2019;4:765-75.
38. Cesareo R, Attanasio R, Caputo M, et al. Italian association of clinical endocrinologists (AME) and Italian chapter of the American Association of Clinical

- Endocrinologists (AACE) position statement: Clinical management of vitamin D deficiency in adults. *Nutrients* 2018;10.
39. Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev* 2010;9:709-15.
 40. Pludowski P, Holick MF, Grant WB, et al. Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018;175:125-35. D, et acta 2015;438:376-81.

Determinazione delle mutazioni del gene isocitrato deidrogenasi 2 nella leucemia mieloide acuta: utilizzo della tecnica Digital Droplet PCR “Drop-Off” per diagnosi e monitoraggio.

Susanna Grassi¹, Francesca Guerrini¹, Serena Salehzadeh¹, Elena Ciabatti¹, Sara Galimberti², Maria Rita Metelli¹

¹Laboratorio di Biologia Molecolare, UO Ematologia, AOUP, Pisa

²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Ematologia, Università di Pisa

Caro Editore,

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una patologia eterogenea originata da aspetti patogenetici diversi che risultano in una stratificazione della prognosi e conseguente approccio terapeutico variabile. Nella sua caratterizzazione, sono spesso coinvolte anomalie cromosomiche o più frequentemente mutazioni geniche che portano all'individuazione di uno o più possibili marcatori, come obiettivi di terapia mirata come pure per il monitoraggio della malattia minima residua (MMR). L'identificazione di un profilo molecolare alla diagnosi diventa quindi di fondamentale importanza permettendo la classificazione della LMA, la stratificazione del rischio e l'approccio terapeutico personalizzato (1). Alterazioni del metabolismo cellulare sono implicate in diverse neoplasie; in particolare l'enzima isocitrato deidrogenasi (IDH) è stato recentemente implicato nella patogenesi della LMA. L'enzima, coinvolto nel Ciclo di Krebs, catalizza la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato ad α -chetoglutarato (α -KG). Quest'ultimo è implicato in molti processi cellulari, tra cui differenziamento e regolazione epigenetica. Le mutazioni somatiche a livello di IDH causano la trasformazione dell' α -KG in un oncometabolita, il 2-idrossiglutarato (2-HG) che stimola la proliferazione e blocca il differenziamento cellulare dei precursori ematopoietici. L'eccesso di 2-HG inibisce inoltre enzimi chiave coinvolti nella demetilazione istonica e del DNA portando ad una ipermetilazione che modifica l'espressione genica delle cellule mutate (2, 3). Le mutazioni somatiche di IDH2 (mIDH2) sono mutazioni puntiformi “hot spot” localizzate a livello dell'esone 4 del gene, nei codoni 140 (Arg) e 172 (Arg), evidenziate complessivamente nel circa il 18-20% delle LMA di nuova diagnosi. Tuttavia, l'impatto di tali mutazioni sulla prognosi e la sopravvivenza dei pazienti rimangono controverse; probabilmente ciò è dovuto anche ai diversi approcci metodologici utilizzati negli studi finora condotti (4, 5). In letteratura, differenti metodiche sono state utilizzate, come il classico Sanger sequencing (6) o il più moderno Next Generation Sequencing (NGS) (7), passando per l' High-Resolution Melting (HRM) analisi (1) e la digital PCR (dPCR) (8). Ognuna di queste tecniche presenta vantaggi ma anche limiti come la bassa sensibilità dei metodi Sanger e HRM (15 e 10% rispettivamente); i costi, le strumentazioni e la competenza necessari per l' NGS e la possibilità di eseguire solo un test specifico per target in ddPCR. Nel laboratorio di biologia molecolare dell'U.O. di Ematologia di Pisa è stato sviluppato un test in “digital droplet polymerase chain reaction” (ddPCR) chiamato “drop-off”, in grado di determinare la presenza di più mutazioni puntiformi all'interno di una sequenza target. Tale approccio permette di individuare la presenza della mutazione alla diagnosi, ma soprattutto permette il suo monitoraggio quantitativo in corso di terapia con una sensibilità dello 0,1%. La ddPCR convenzionale è una tecnica di PCR quantitativa assoluta, il cui vantaggio principale è l'assenza di utilizzo di curve standard, con la capacità di raggiungere una elevata sensibilità (10^{-5}). Si basa sulla partizione del campione di reazione in migliaia di “goccioline” (droplets) della dimensione di nanometri, all'interno delle quali si distribuiscono singole copie di target ed i reagenti della PCR. Al termine dell'amplificazione, i campioni vengono analizzati tramite un lettore in grado di rilevare la fluorescenza all'interno di ogni singola droplet. Grazie all'utilizzo di differenti fluorocromi, il lettore consente di distinguere le droplets all'interno delle quali si è verificata l'amplificazione dell' allele wild-type (wt) da quelle dove è avvenuta l'amplificazione dell'allele mutato (mut), generando la caratteristica rappresentazione grafica a quattro quadranti (Figura 1).

Corrispondenza a: Susanna Grassi, Laboratorio di Biologia Molecolare, UO Ematologia, AOUP, Via del Borghetto 53, 56021, Cascina, Pisa, Tel 3406938717, E-mail grassisusanna@virgilio.it

Ricevuto: 26.03.2020

Revisionato: 30.03.2020

Accettato: 30.04.2020

Pubblicato on-line: 15.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.047

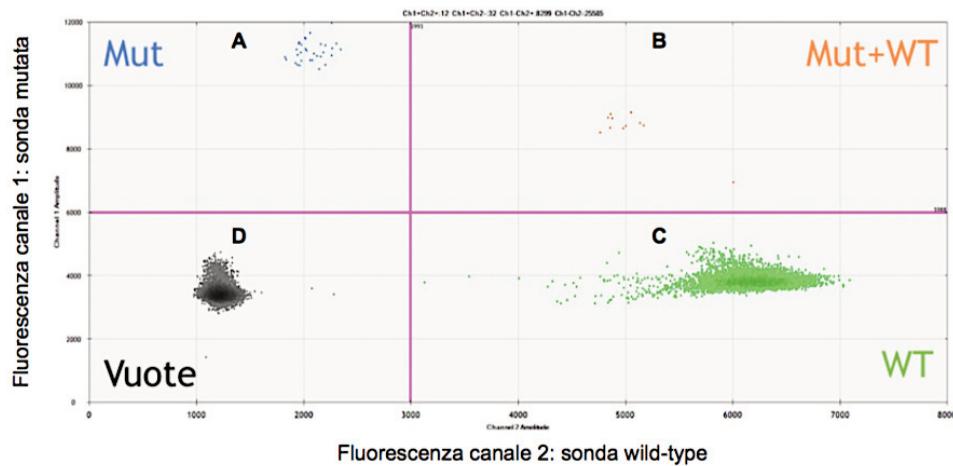


Figura 1

Rappresentazione grafica digital droplet polymerase chain reaction classica.

Nel grafico 2D sono rappresentate le droplets marcate con sonde specifiche, posizionate dal software in 4 quadranti, in base alla presenza di fluorescenza. In A (Mut), le droplets mutate; in B (Mut+WT), le droplets che hanno due ampliconi, sia quello con la mutazione che quello wild-type; in C (Wt), le droplets wild-type; in D (Vuote), droplets rimaste senza amplificato.

L'analisi dei risultati elaborata dal software permette, utilizzando la distribuzione di Poisson, di calcolare le concentrazioni dei differenti alleli. La "drop-off" ddPCR permette di superare il limite della tecnica digital convenzionale identificando, in una unica seduta analitica, più mutazioni all'interno di una sequenza target d'interesse e utilizzando comunque due sole sonde.

All'interno dello stesso amplicone vengono infatti disegnate: in una regione adiacente alla mutazione, una sonda marcata FAM che serve da riferimento; mentre l'altra sonda marcata HEX sul punto d'interesse, ma complementare alla sequenza wt, capace di identificare la mutazione. In caso di presenza di mutazione, la sonda HEX non sarà in grado di legarsi alla sequenza, quindi al termine dell'amplificazione avremo solo il segnale dato dalla sonda di riferimento (FAM). Al contrario, in assenza di mutazioni, entrambe le sonde saranno in grado di legarsi alla sequenza dando così origine ad una doppia positività (FAM/HEX) (Figura 2). Grazie a questo sistema abbiamo analizzato frammenti sintetici di DNA (GeneArt Strings DNA Fragments, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) corrispondenti a tutte le possibili mutazioni all'interno dei codoni 140 e 172 del gene IDH2. Abbiamo verificato che il metodo fosse in grado di amplificare tutte le possibili mutazioni presenti a livello dei codoni presi in esame, con una sensibilità pari allo 0,1% circa. Tale tecnica è stata quindi utilizzata su una serie di 60 pazienti affetti da LMA per i quali la mutazione era stata precedentemente ricercata con Sanger sequencing. Di questi il 13% (8/60) presentava la mutazione con Sanger. Dopo l'analisi con la metodica drop-off la mutazione veniva confermata in tutti i casi risultati positivi in Sanger ma anche in ulteriori 5 casi risultati wt con sequenziamento diretto. Andando a verificare i casi discordanti, ci siamo resi conto che questi erano pazienti che presentavano una frequenza allelica di mutazione (VAF) molto bassa (0,4-12%), inferiore al limite di sensibilità del metodo Sanger. La ddPCR drop-off, seppure in una casistica limitata, ha permesso di recuperare il 9% dei pazienti positivi, rendendo così possibile il loro inserimento in protocolli clinici e consentendo il monitoraggio quantitativo del clone patologico in corso di terapia. Anche in letteratura è riportato che alla diagnosi i cloni IDH2 mutati sono poco rappresentati e frequentemente la VAF è minore del 15-20%, limite di sensibilità del metodo Sanger. Inoltre, il controllo della MMR dopo terapia è consigliato anche per mIDH2, anche se questo è considerato un marcatore non stabile e quindi non ottimale, in caso sia presente alla diagnosi, ma soprattutto nei casi in cui siano assenti altri marcatori convenzionali come le classiche traslocazioni (PML/RARA; AML1/ETO; CBFβ/MYH11) o mutazioni a carico della nucleofosmina (NPM1). Per raggiungere questo obiettivo, è necessaria una tecnica ad elevata sensibilità, come indicano le linee guida dell'European Leukemia Network (ELN) (9). Consapevoli di quanto la corretta caratterizzazione molecolare dei pazienti con AML sia necessaria ed in attesa di ulteriori studi sulla correlazione di mIDH2 e la prognosi/sopravvivenza dei pazienti, riteniamo che la determinazione di mIDH2 sia rilevante nella pratica clinica e che la metodica qui presentata sia una valida alternativa al metodo Sanger o all'NGS; la tecnica risulta applicabile nella routine sia alla diagnosi che come test di monitoraggio per seguire la MMR.

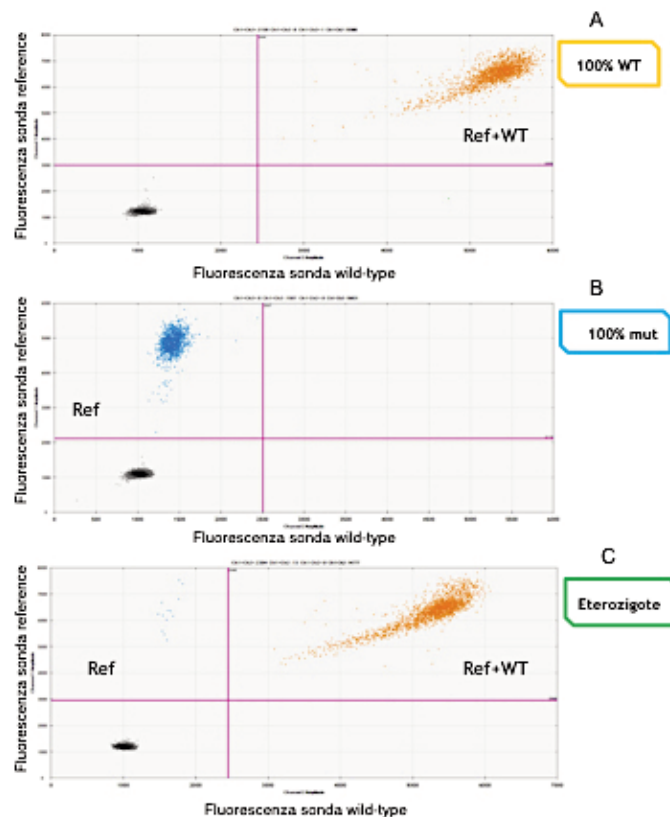


Figura 2

Rappresentazione grafica drop-off digital droplet polymerase chain reaction.

Nei grafici 2D sono rappresentati campioni con diverso genotipo. Le droplets sono posizionate secondo l'analisi della fluorescenza relativa alle sonde specifiche per i target. In A, un campione wild-type (WT) con droplets a doppia fluorescenza per la presenza di entrambe le sonde, di riferimento e wild-type (Ref+WT); in B, un campione 100% mutato, in cui si ha amplificazione della sola sonda di riferimento (Ref); in C, un campione che presenta la mutazione in eterozigosi; sono presenti infatti sia droplets con amplificazione per la sonda di riferimento (Ref) e quindi mutate, che droplets con fluorescenza sia per la sonda di riferimento che per quella wild-type, e quindi non mutate (Ref+WT).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia* 2017;31:272–81.
2. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzymatic activity that converts α -ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010;17:225–34.
3. Aref S, Areida ESK, Aaal MFA, et al. Prevalence and clinical effect of IDH1 and IDH2 mutations among cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15:550–5.
4. DiNardo CD, Ravandi F, Agresta S, et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol* 2015;90:732–6.
5. Petrova L, Vrbacky F, Lanska M, et al. IDH1 and IDH2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: suitable targets for minimal residual disease monitoring? *Clin Biochem* 2018;61:34–9.
6. Chou WC, Peng KY, Lei WC, et al. Persistence of mutant isocitrate dehydrogenase in patients with acute myeloid leukemia in remission. *Leukemia* 2012;26:527–9.
7. Shumilov E, Flach J, Joncourt R, et al. Clinical value of molecular MRD monitoring by next-generation sequencing in patients with IDH2 mutated AML. *Leuk Lymphoma* 2019;60:2588–90.
8. Ferret Y, Boissel N, Helevaut N, et al. Clinical relevance of IDH1/2 mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA group. *Haematol* 2018;103:822–9.
9. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010;115:454–74.

Medicina nel laboratorio. Gli esami: quando, come e perché

Aldo Paolicchi, Antonio Pavan e Mario Plebani

Editore: EDRA S.p.A.

Costo: euro 59,00

Il volume "MEDICINA NEL LABORATORIO. Gli esami: quando, come e perché" è la traduzione in lingua italiana del trattato "Clinical Laboratory Science: Concepts, Procedures, and Clinical Applications" di Mary L. Turgeon, giunto all'ottava edizione, a significare il successo dell'opera.

In realtà, non si tratta di una semplice traduzione, perché assieme ai Colleghi Aldo Paolicchi e Antonio Pavan, il trattato è stato integrato con un capitolo su "Organizzazione dei laboratori clinici, qualità e sicurezza" da me redatto e con un'attenta e rigorosa revisione dei capitoli dell'edizione originale da parte dei Colleghi e di alcuni Collaboratori con competenze diverse e specifiche.

È infatti evidente che la "medicina di laboratorio" è una disciplina composita ed in continuo sviluppo che necessita, specialmente quando la si voglia insegnare, di competenze sempre più complesse e composite. Insegnare medicina di laboratorio e quindi adottare un volume per l'insegnamento a studenti, specializzandi e per l'aggiornamento dei professionisti può sembrare "mission impossible", quando si prenda in considerazione l'enorme

e continuo progresso nel trasferimento delle conoscenze fisiopatologiche e delle scienze di base nella pratica clinica.

Devo peraltro sottolineare come spesso gli studenti del corso di medicina e chirurgia nel quale insegno da molti anni, e spesso anche gli specializzandi, manifestino un'avversione per l'acquisto di un libro di testo, sottoponendo il docente a continue richieste per "registrare le lezioni", ottenere le diapositive ed "esigere" che l'esame si concentri solamente su quanto spiegato durante il corso.

E qui veniamo al volume ed alla sua utilità: infatti il trattato che volutamente si intitola "Medicina NEL laboratorio" vuole spiegare il significato dello strumento (esame di laboratorio), della misura e del metodo specifico nel contesto del problema clinico. E cerca di farlo in modo semplice e didascalico con ricca iconografia e spunti per migliorare la capacità di pensiero critico. Le domande di autovalutazione, con risposte disponibili su un particolare sito web, sono uno strumento fondamentale sia per i docenti che per i lettori (studenti, specializzandi, e professionisti che vogliono aggiornarsi) per comprendere la qualità dell'apprendimento e, quindi, dell'insegnamento.

Mi è molto piaciuta la frase che accompagna la prefazione dell'autore "*ogni giorno dev'esser un'avventura di apprendimento*", a sottolineare che il volume dev'essere letto capitolo per capitolo, magari dopo aver seguito una lezione accademica e/o una relazione, e aver digerito il contenuto per trasformare la lettura in un reale miglioramento delle conoscenze e delle capacità operative. Solo in questo modo, la didattica coglie il vero obiettivo e diviene motore di miglioramento del processo diagnostico-terapeutico.

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



Ringraziamento

Il Direttore e l'Editore della rivista ringraziano i componenti del Comitato Editoriale e tutti i Colleghi che hanno collaborato per la revisione dei manoscritti inviati a Biochimica Clinica nel corso del 2020.

Acknowledgement

The Editor-in-Chief and the Publisher would like to thank the members of the Editorial Board and all the colleagues for their kind assistance in reviewing articles submitted to Biochimica Clinica in 2020.

*Fausto Adami, Padova
Sara Altinier, Padova
Antonio Antico, Vicenza
Carlo Artusi, Padova
Fiamma Balboni, Firenze
Gaetano Bernardi, Milano
Marco Besozzi, Milano
Andrea Bolner, Verona
Graziella Bonetti, Brescia
Laura Bonfili, Macerata
Emma Borrelli, Siena
Paolo Brambilla, Monza
Paolo Bucchioni, La Spezia
Sabrina Buoro, Milano
Francesco Paolo Busardò, Roma
Ettore Capoluongo, Roma
Giuseppe Castaldo, Napoli
Ferruccio Ceriotti, Milano
Aldo Clerico, Pisa
Giorgio Da Rin, Genova
Valeria D'Argenio, Napoli
Federica De Liso, Milano
Laura De Marchis, Roma
Alberto Dolci, Milano
Anna Falanga, Bergamo
Antonio Fortunato, Ascoli Piceno
Massimo Franchini, Mantova
Davide Giavarina, Vicenza
Giovanni Ivaldi, Genova
Eleonora Leggiero, Napoli
Bruna Lo Sasso, Palermo
Barbara Lombardo, Napoli
Silvia Mengozzi, Cesena
Martina Montagnana, Verona
Benedetto Morelli, Brescia
Andrea Mosca, Milano
Michele Mussap, Cagliari
Cosimo Ottomano, Monza
Roberta Pacifici, Roma
Andrea Padoan, Padova
Renata Paleari, Milano
Lucilla Parnetti, Perugia
Paola Pezzati, Firenze
Ricciarda Raffaelli, Verona
Marco Rossi, Catanzaro
Alessandro Terreni, Firenze
Rossella Tomaiuolo, Napoli
Lorella Tripodi, Napoli
Matteo Vidali, Novara
Martina Zaninotto, Padova
Luisa Zanolla, Verona*

Volume 44, 2020

Indice dei contenuti

Index of contents

EDITORIALI - EDITORIALS		RASSEGNE - REVIEWS	
La diagnostica di laboratorio della malattia di von Willebrand è indispensabile per la corretta gestione terapeutica del paziente	12	La valutazione della frammentazione del DNA spermatico nei soggetti infertili	13
La Medicina di Laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2	115	Applicazioni cliniche della presepsina come biomarcatore diagnostico d'infezione: rassegna e aggiornamenti	21
Ruolo chiave del laboratorio nella diagnosi del diabete gestazionale: forse laprevalenza è sotto-stimata	116	Recenti sviluppi nella diagnosi differenziale tra malattia di Parkinson e parkinsonismi atipici	119
Ruolo dei biomarcatori per la diagnosi precoce e il monitoraggio delle malattieneurologiche	117	Il deficit di G6PD in Medicina di Laboratorio	219
Una lezione che arriva da lontano	215	Farmacotossicologia e metodologie di analisi dell'acido gamma-idrossibutirrico nel laboratorio clinico e forense	335
Gestire, integrare e comunicare l'informazione di laboratorio: il futuro della medicina di laboratorio	217		
		CONTRIBUTI SCIENTIFICI - SCIENTIFIC PAPERS	
Il premio Nobel 2020 per la Chimica: dal "gene editing" al "gene drive"	327	Valutazione delle prestazioni analitiche dei conteggi cellulari in automazione su liquidi biologici mediante un programma di controllo di qualità dedicato	28
Due sfide di grande attualità in farmacotossicologia analitica	330	Attività fisica e biomarcatori dello stress ossidativo nell'invecchiamento	36
Il metodo scientifico come strumento efficace per una rigorosa interpretazione degli studi	333	Vitamin D plasma level can affect nivolumab drug exposure in a cohort of patients with non-small-cell lung cancer	45

INDICE

Pazienti diabetici di tipo 2, non in terapia insulinica e albumina glicata: una valutazione multidimensionale	52	Il "Libro Bianco" dei Giovani Professionisti di Medicina di Laboratorio in Italia: risultati dell'indagine del Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists	351
Application of array-Comparative Genomic Hybridization analysis in immune-virotherapy approach	61	Polimorfismi dei geni KLK3, RASA1 e NAALADL2: rischio di cancro alla prostata, aggressività della neoplasia e livelli sierici dell'Antigene Prostatico-Specifico	359
Indagine conoscitiva sulla qualità del referto dell'esame emocromocitometrico per i Gruppi di Studio SIBioC "Diagnostica Ematologica Integrata" e "Variabilità extra-analitica"	129	Titolazioni dei preparati galenici oleosi a base di cannabis in Regione Liguria: progetto sperimentale dei laboratori di riferimento regionale	367
Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale	143	Serial measurements of oxidative stress markers after ozone autohemotherapy	374
Confronto tra un metodo nefelometrico ed un metodo turbidimetrico per la determinazione delle catene leggere libere sieriche: punti di forza e criticità	149	OPINIONI - OPINIONS	
Effetti della restrizione calorica sullo stress ossidativo nell'obesità: sono miglioramenti transitori?	232	Determinazione della presepsina: non solo diagnosi di sepsi	68
ISO 15189 all'ombra dell'Equatore. Descrizione dell'esperienza del North Kinangop Catholic Hospital Laboratory in Kenya	239	Catene leggere libere nella diagnostica liquorale della sclerosi multipla: possibile alternativa alla ricerca delle bande oligoclonali?	157
Pharmacogenetic markers able to predict lipid-related parameters a cohort of ritonavir treated patients	249	Il futuro della Medicina di Laboratorio: un Manifesto per i suoi professionisti	263
A wide next-generation-sequencing panel improves the molecular diagnosis of dyslipidemias	255	Misura e identificazione delle monoclonali plasmatiche: risultati di uno studio multicentrico internazionale	270
		Un mondo senza significatività statistica?	380
		La scienza riproducibile	386

DOCUMENTI

Raccomandazioni per la diagnosi di laboratorio della malattia di von Willebrand 73

Proposta di un protocollo per la gestione degli approfondimenti in ambito coagulativo nel percorso preoperatorio 168

Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica Parte III: diagnostica molecolare 174

DOCUMENTI SIBioC - SIBioC DOCUMENTS

Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: raccomandazioni per la fase postanalitica del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica Apparato Urinario (GIAU) 86

Raccomandazioni per la rilevazione la gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici per il Gruppo di Studio SIBioC sulla Variabilità del Dato di Laboratorio 180

Raccomandazioni italiane di consenso per l'utilizzo dei biomarcatori in pazienti condeterioramento cognitivo lieve: Presentazione del Documento 194

Raccomandazioni italiane di consenso per una diagnosi eziologica basata su biomarcatori in pazienti con deterioramento cognitivo lieve 196

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) 279

Il contributo del laboratorio alla corretta gestione del paziente in terapia ipolipemizzante: le raccomandazioni di EFLM e della Società Europea di Aterosclerosi (EAS) 287

Quantificazione delle lipoproteine aterogeniche per le terapie ipolipemizzanti: Raccomandazioni di Consenso della European Atherosclerosis Society (EAS) e di EFLM 290

Consensus 2019 per l'analisi genetica in Fibrosi Cistica: presentazione del Documento 397

Documento congiunto di SIBIOCI, della Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS), della Sezione Italiana della European Ligand Assay Society (ELAS), e della Associazione Medici Endocrinologi (AME) relativo alla nota AIFA 96 sulla prescrivibilità dei farmaci per la carenza di Vitamina D, e raccomandazioni per la refertazione 400

LETTERE ALL'EDITORE - LETTERS TO THE EDITOR

Utilizzo dei droni per il trasporto di campioni biologici e possibile impiego nella medicina di laboratorio: il progetto PHILOTEA 100

Droni o laboratori clinici a chilometro zero? 103

Impatto delle variabili preanalitiche e analitiche sulla diagnosi di diabete melitogestazionale 206

Il ruolo del laboratorio di Biochimica Clinica nell'organizzazione di un evento sportivo internazionale: la XXX Universiade Estiva 314

INDICE

Determinazione delle mutazioni del gene isocitrato deidrogenasi 2 nella leucemia mieloide acuta: utilizzo della tecnica Digital Droplet PCR "Drop-Off" per diagnosi e monitoraggio	407	I marcatori di clonalità per la diagnosi e la valutazione della risposta alla terapia nell'amiloidosi da catene leggere: il ruolo del laboratorio	e9
NOTIZIE SIBioC - SIBioC NEWS		Mieloma multiplo: da plasmocitoma a coinvolgimento multiorgano	e14
Lab Tests Online Italia oggi	106	Una variante emoglobinica rara	e19
In ricordo di Giorgio Federici	108	È tempo di ridefinire gli intervalli di riferimento e terapeutici della cupruria nella malattia di Wilson?	e22
Il ricordo di un Maestro della Medicina di Laboratorio: Giorgio Federici	110	Una variante emoglobinica co-migrante con le normali frazioni emoglobiniche in HPLC	e26
IFCC Task Force on COVID-19	209	Una complicata valutazione della risposta alla terapia in un paziente con malattia da deposito da catene leggere libere	e29
In ricordo di Jan-Olof Jeppsson	320	Assenza di bande monoclonali liquorali e positività del rispettivo indice siero-liquor: una discrepanza da indagare attentamente	e33
52° Congresso Nazionale: Virtual Edition	321	Monitoraggio molecolare di Isocitrato Deidrogenasi 2 in paziente con Leucemia Mieloide Acuta recidivata	e36
RECENSIONI - BOOK REVIEW			
Il sedimento urinario: atlante per immagini	318		
Medicina nel laboratorio. Gli esami: quando, come e perché	410		
CASI CLINICI - CASE REPORTS			
Il laboratorio nella diagnosi di deficit dell'ormone della crescita e nel monitoraggio dell'aderenza alla terapia sostitutiva	e1		
Approfondimenti necessari sul liquido cerebro spinale	e3		
Un caso di gammapatia monoclonale di significato renale	e6		

Volume 44, 2020

Indice degli autori

Index of authors

Aakre KM.	290	Berardinelli E.	e3
Aita A.	359	Bernardini S.	108, 279, 351
Albertini R.	e6, e9, e29	Bertoldo F.	400
Alessio MG.	86	Bertuzzi F.	52
Altavilla P.	157	Bianchetti A.	196
Angiolillo A.	e1	Bianchi V.	320
Angioni A.	397	Bivona G.	157
Antonucci M.	249	Boccardi M.	196
Apassiti Esposito S.	28	Boccardo S.	45
Aspromonte N.	279	Bolner A.	232, 374
Avataneo V.	249	Bombieri C.	397
Avino D.	129	Bonaguro S.	168
Avogaro A.	52	Bonetti G.	52, 143, 180, 206
Baffico M.	397	Bonizzato A.	397
Balbon F.	86	Bonora S.	249
Banfi G. 21,	400	Borén J.	290
Barbagallo L.	367	Borgo G.	397
Barberio G.	e26	Borrillo F.	13, 174
Barco S.	367	Bosello O.	232, 374
Basset M.	36, e9, e29	Bosoni T.	e6, e9, e29
Basso D.	359	Bozzato D.	359
Baum H.	290	Bozzola M.	e6, e9, e29
Bellia C.	52	Bragato G.	68
Bellini C.	351	Bruckert E.	290
Bellomo G.	117, e33	Brugia M.	e3
Beltramello A.	196	Brunori G.	86
Benedetti E.	e36	Bucchioni P.	367
Berardi M.	106, 351	Buonaiuto A.	255

Buono P.	61	Clerico A.	279
Buoro S.	20, 129	Cobbaert C.	290
Calcagno A.	249	Coco S.	45
Calcaterra I.	255	Coiana A.	397
Caleffi A.	86	Colivicchi F.	279
Candore G.	157	Collinson P.	290
Cangemi G.	367	Comberlato MT.	e19
Cannas C.	367	Corbetta S.	400
Capasso C.	61	Corsi Romanelli M.	21, 52
Capoluongo E.	219	Cossu I.	45
Cappa S.	196	Cremonesi B.	129
Caracciolo A.	28	Crespi I.	e33
Caracciolo F.	e36	Croce D.	52
Cardiero G.	255	Cucinelli MR.	149
Cardinale DM.	279	Cusato J.	45, 249
Careno M.	180	D'Alessio F.	61
Cariati F.	13, 174	D'Apice MR.	397
Carrega P.	45	D'Argenio V.	13, 174
Carta M.	143, 206, e19	D'Avolio A.	45, 249
Castaldo G.	397	Da Rin G.	129
Castellani C.	397	Dal Bello MG.	45
Catalano L.	e14	D'Amora M.	100
Catapano A.	290	de Falco R.	314
Cazzaniga FA.	119	De Gregorio F.	e14
Centrone C.	397	De Nicolò A.	249
Ceriello A.	52	De Santis E.	149
Cerullo V.	61	De Valentin L.	168
Chapman MJ.	290	de Vecchi E.	21
Chiamenti L.	374	Debbia D.	149
Chiasserini D.	196	del Rio A.	335
Ciabatti E.	407	Descamps OS.	290
Ciabatti E.	e36	Di Dato F.	e22
Ciaccio M.	52, 157, 194, 196	Di Fabio AM.	129
Ciardelli ML.	129	Di Giacomo C.	36

Di Girgenti C.	397	Fortunato G.	255, 314
Di Maggio F.	174	Fotia L.	314
Di Perri G.	45, 249	Franceschini P.	367
Di Rienzo G.	86	Franchini M.	12
Di Taranto MD.	255	Francione S.	129
Di Vita A.	e36	Frassanito ML.	180
Dianzani U.	e33	Frisoni GB.	196
Dima F.	129	Frisso G.	314
Dittadi R.	400	Gabrielli D.	279
Domenichini C.	e36	Galimberti S.	407, e36
Dozio E.	52	Galliera E.	21
Drag C.	86	Gambaro G.	86
Dudiez S.	e1	Gambino CM.	157
Duff CJ.	290	Garofalo M.	61
Dumitrescu L.	168	Gelsumini S.	400
Egiziano S.	397	Genova C.	45
Elia AE.	119	Germagnoli L.	129
Epifani MG.	86	Gessoni G.	86
Falini A.	196	Gesualdo L.	86
Falqui L.	52	Giacobbe C.	255
Fanelli A.	129	Giangiobbe S.	e1
Farci Santarcangeli D.	180	Giavarina D.	129, 143, 180, 206, 217, 232, e19
Favarato M.	397	Gioia M.	129
Ferlazzo G.	45	Girelli A.	52
Ferlisi A.	397	Gonnelli S.	400
Ferrario L.	52	Grassi S.	407, e36
Ferraro G.	e6, e9	Graziani MS.	115, 209, 287
Festari C.	196	Graziano S.	335
Fogazzi GB.	86	Grossi F.	45
Foglia E.	52	Guastini A.	e26
Foli A.	e29	Guerra G.	28
Forner L.	e19	Guerra UP.	196
Forte F.	255	Guerrini F.	407, e36
Fortunato A.	279, 400		

Guidolin T.	e19	Marchionne A.	239
Hammerer-Lercher A.	290	Marchioro L.	239
Hirvinen M.	61	Marinaro L.	249
Iannuzzo G.	255	Marini A.	129
Introcaso G.	129	Marini M.	143
Iorio R.	e22	Marzotto G.	e19
Ivaldi G.	e26	Mascolo M.	e14
Kamstrup PR.	290	Massaccesi L.	21
Kolovou G.	290	Matarazzo M.	e22
Kronenberg F.	290	Mazzaccara C.	314
Kuryk L.	61	Melotti P.	397
Lamonaca M.	e33	Meneghini MG.	e19
Langlois MR.	290	Messeri G.	106
Langsted A.	290	Metelli MR.	407, e36
Lavatelli F.	e6, e9	Migliaccio S.	400
Leggieri A.	45	Migliardi M.	279, 400
Leggiero E.	61	Milani P.	e6, e9, e29
Lillo F.	367	Mingari MC.	45
Lippi G.	180, 321	Minicucci L.	397
Liverani A.	86	Mion MM.	68
Livoti E.	367	Moda F.	119
Lo Sasso B.	157	Modenese A.	180
Lombardi G.	400	Montagnana M.	116
Lombardo B.	61	Morbelli S.	196
Lucarelli M.	397	Morelli B.	73, 180
Luzi S.	168	Moretti M.	e3
Macchiaroli A.	e1	Mosca A.	116, 219, 320, 351
Maffia A.	367	Moz S.	359
Maione G.	255	Muscio C.	196
Malaguarnera M.	36	Mussap M.	270
Manenti B.	129	Mwangi PN.	239
Manoni F.	86	Nannini S.	351
Marchei E.	335	Napolitano G.	28
Marchetti C.	143	Natali P.	149

Navaglia F.	359	Perrone M.	279
Nicolosi V.	196	Perrotta C.	61
Nicolucci A.	52	Perseghin G.	52
Njuru JW.	239	Petricciani G.	367
Nobili F.	196	Pezzati P.	215, 333
Nordera G.	232	Pieretti B.	86
Nordera G.	374	Piersimoni C.	e3
Nordestgaard BG.	290	Pietra G.	45
Nunziato M.	327	Pipitone S.	129
Nuvolone M.	e6, e9, e29	Pirolini L.	e6
Orecchioni F.	e3	Pirolini L.	e9
Ortolani C.	129	Pizzini FB.	196
Ottomano C.	86	Plebani M.	52, 68, 103, 263, 279, 318, 359, 410
Ottonello S.	45	Pocognoli A.	e3
Pacifici R.	330	Prayer Galetti T.	359
Padoan A.	68, 279, 359	Ragusa A.	397
Padovani A.	196	Ranieri A.	61, 397
Pajola R.	129	Ravasio R.	86
Paleari R.	219	Rebesco B.	367
Palermi A.	249	Renis M.	36
Palermo A.	400	Riggi M.	e33
Palladini G.	e6, e9, e29	Rijavec E.	45
Palma D.	255	Ripepi J.	e6, e9, e29
Papa A.	129	Rizzi LA.	e26
Pappalardo EM.	157	Rolla R.	129
Parnetti L.	117, 196	Rossini M.	400
Passarelli F.	e33	Rotolo MC.	335
Passino C.	279	Russo E.	367
Pastore L.	61	Saccani G.	86
Patelli G.	149	Salehzadeh S.	407, e36
Pellegrini M.	335	Saliva E.	e33
Pelloso M.	359	Salvatore F.	61, 110, 327
Pelo E.	397	Salvini Porro G.	196
Perani D.	196		

Sancesario G.	196, 351	Vassalle C.	400
Sandri MT.	279	Verdesca F.	61
Santoni F.	e26	Vescini F.	400
Savoia M.	e14, e22	Vettori R.	180
Savoldi G.	397	Vidali M.	386
Sbarbaro IM.	367	Vinci S.	e26
Schettini F.	52	Vitale A.	61
Schillaci O.	196	von Eckardstein A.	290
Sciacovelli L.	279, 321	Wiklund O.	290
Secchiero S.	86	Zambon CF.	359
Seia M.	397	Zaninotto M.	52, 68, 279
Serino R.	e33	Zanolla L.	380
Sierchio L.	e14	Zardo L.	168
Starita MF.	e22	Zattoni F.	359
Stufano F.	73		
Sulas MG.	e33		
Tagliavini F.	196		
Tarrini G.	e36		
Termini L.	397		
Tiraboschi P.	196		
Tomaiuolo R.	13, 174		
Tomasello B.	36, 45		
Tosato F.	129		
Trabucchi M.	196		
Trabuio E.	180		
Trenti T.	149, 279, 321		
Tripodi C.	e19, 367		
Turrini R.	168		
Urbani D.	143		
Valentini U.	52		
Valverde S.	86		
Vanzo A.	232		
Varani M.	149		
Vasco A.	e14		

STAT PROFILE
Prime+[®]

L'evoluzione tecnologica nel Critical Care Testing

Fino a 22 Analiti, compresi
importanti test:



Tecnologia Nova MicroSensor
Card[™] senza Manutenzione

CQ liquido automatico
e preciso

Protezione Clot Block[™]

Menù:

pH, PCO_2 , PO_2 , Na, K, Cl, iCa,
iMg, Glu, Lac, Urea (BUN),
Creat, Hct, TCO_2 , $SO_2\%$, O_2Hb ,
COHb, MetHb, HHb, tBil,
tHb, HbF



nova[®]
biomedical
novabio.us.it

Nova Biomedical Italia S.r.l.
Via Como 19 - 20020 Lainate (MI)
Tel. +39 02 87070041
it-info@novabio.com





BIO MEDIA

La condivisione del sapere

“ Da oltre vent'anni al servizio della comunità scientifica ”



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

Biomedica progetta, organizza e coordina eventi formativi ECM medico-scientifici residenziali e a distanza. È partner di numerose Società Scientifiche, editore in ambito sanitario, ed è attiva nell'ambito della comunicazione digitale, realizzando servizi sviluppati e gestiti *in house*.